Identifizierung und biochemische Charakterisierung von p120ctn als Interaktionspartner der GTPase RhoC in der humanen Pankreaskarzinomzelllinie PANC-1

Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades Dr. rer. nat.
der Fakultät für Naturwissenschaften
der Universität Ulm

vorgelegt von
Martina Liska
aus Wien, Österreich
Ulm 2009

Amtierender Dekan:	Prof. Dr. P. Bäuerle
Erstgutachter:	Prof. Dr. K.-D. Spindler
Zweitgutachter:	Prof. Dr. T. Wirth
Tag der Promotion:	3. Juli 2009

1. Einleitung ____ 1

1.1 Rho-GTPasen ... 1
1.1.1 Regulation der Aktivität von Rho-GTPasen ... 1
1.1.2 Struktur der Rho-GTPasen ... 5
1.1.3 Funktion der Rho-GTPasen ... 7
1.1.4 RhoA und RhoC ... 8
1.2 Zell-Zell-Adhäsion ... 9
1.3 Humanes p120 Catenin (p120ctn) ... 10
1.3.1 Struktur von p120ctn ... 11
1.3.2 Funktion von p120ctn ... 12
1.3.3 Expression und Funktion von p120ctn in Tumoren ... 14
1.4 Das Pankreaskarzinom ... 15
1.5 Zielsetzung der Arbeit ... 17

2. Material ____ 18

2.1 Chemikalien ... 18
2.2 Verbrauchsmaterialien ... 21
2.3 Prokaryontische und eukaryontische Zellen ... 22
2.3.1 *Escherichia coli* Stämme ... 22
2.3.2 Eukaryontische Zelllinien ... 22
2.3.3 Stabil exprimierende Zelllinien ... 23
2.4 Plasmide ... 23
2.5 Enzyme und molekularbiologische *Kits* ... 24
2.6 Antikörper ... 25
2.6.1 Primäre Antikörper ... 25
2.6.2 Sekundäre Antikörper ... 26
2.7 Molekulargewichtsmarker für die SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE) ... 26
2.8 Marker für Agarose-Gelelektrophorese ... 27
2.9 Radioaktiv-markierte Nukleotide ... 27
2.10 Oligonukleotide ... 27
2.10.1 siRNA ... 29
2.11 Medien und Standardlösungen ... 29
2.11.1 Bakterienkulturmedium ... 29
2.11.2 Zellkulturmedium ... 29
2.11.3 Standardlösungen ... 30
2.12 Geräte ... 30
2.13 Software ... 31

3. Methoden _____ 32

3.1 Mikrobiologische Methoden 32
3.1.1 Herstellung von Luria-Bertani (LB)-Medium 32
3.1.2 Antibotika zur Selektion transformierter Bakterien 32
3.1.3 Herstellung kompetenter Bakterien 33
3.1.4 Transformation kompetenter Bakterien 33
3.1.5 Gefrierkulturen von transformierten Bakterien 34
3.2 Molekularbiologische Methoden 34
3.2.1 Isolierung von Plasmid-DNA 34
3.2.2 Ethanolfällung von DNA 34
3.2.3 Bestimmung der DNA-Konzentration 35
3.2.4 DNA-Sequenzierung 35
3.2.5 Spaltung von Plasmid-DNA mit Restriktionsenzymen 35
3.2.6 Agarose-Gelelektrophorese von DNA-Fragmenten 36
3.2.7 DNA-Fragmentisolierung aus Agarosegelen 37
3.2.8 Dephosphorylierung von Plasmid-DNA 38
3.2.9 Ligation von DNA-Fragmenten 38
3.2.10 Klonierung der kodierenden DNA-Sequenz der humanen p120ctn-Isoformen 1A, 2A, 3A und 4A in das Expressionsplasmid pGEX-4T1 39
3.2.11 *In vitro* DNA-Mutagenese mittels PCR 39
3.2.12 Transformation der PCR-Produkte in *XL1-Blue Supercompetent Cells* 41
3.2.13 Herstellung von Rho-Mutanten durch *in vitro* DNA-Mutagenese 41
3.3 Proteinbiochemische Methoden 43
3.3.1 Proteinexpression in *Escherichia coli* 43
3.3.1.1 Expression und Aufreinigung von GST-Proteinen und GST-Rho-Fusionsproteinen 43
3.3.1.2 Expression und Aufreinigung von GST-mp120ctn 1N-Fusionsproteinen 46
3.3.1.3 Expression und Aufreinigung von GST-RhoGDIα-Fusionsproteinen 47
3.3.2 Expression und Aufreinigung von GST-TRBD (Rhotekin) 48
3.3.3 Expression und Aufreinigung von GST-PAK-CD 50
3.3.4 Expression und Aufreinigung von GST-C3lim 52
3.3.4.1 ADP-Ribosylierung von GST-Rho-Fusionsproteinen mit GST-C3lim 53
3.3.5 Bestimmung der Proteinkonzentration 53
3.3.5.1 Bestimmung der Proteinkonzentration mittels BSA-Standard im SDS-Polyacrylamidgel 54
3.3.6 SDS-Polyacrylamidelektrophorese (SDS-PAGE) 54
3.3.7 Coomassie-Blau-Färbung von Polyacrylamidgelen 56
3.3.8 Immunblotting von Proteinen (*Western Blot*) 56
3.3.9 Detektion von Proteinen mit spezifischen Antikörpern 57

3.3.9.1 Nachweis immunreaktiver Proteine durch das ECL *Western Blotting*- bzw. das ECL *Advance Western Blotting*-Detektionssystem 58
3.3.9.2 Nachweis immunreaktiver Proteine mittels alkalischer Phosphatase 58
3.3.10 Elution gebundener Proteine von der Nitrozellulosemembran 59
3.3.11 P*reloading* von GST-Rho-Fusionsproteinen und Rho-Proteinen mit [^{35}S]GTP[S] zur Ermittlung der aktiven Proteinkonzentration 59
3.3.12 Präparation von partikulären und löslichen Zellfraktionen 61
3.3.13 Präparation von caveolinhältigen Zellkompartimenten 62
3.3.14 Herstellung von Zelllysaten 63
3.3.15 Immunpräzipitation 64
3.3.15.1 Immunpräzipitation mit anti-GFP-Antikörper 65
3.3.15.2 Immunpräzipitation mit anti-GFP-Antikörper zur Analyse von EGFP-Rho/ RhoGDI-Proteinkomplexen 65
3.3.15.3 Immunpräzipitation mit µMACS™ anti-GFP *MicroBeads* zur Analyse von p120ctn/ EGFP-Rho-Proteinkomplexen 67
3.3.16 Präzipitation von p120ctn aus PANC-1-Zelllysaten mittels GST-Rho-Fusionsproteinen 68
3.3.17 Präzipitation von p120ctn aus PANC-1-Zelllysaten mittels ADP-ribosylierter GST-Rho-Fusionsproteine 69
3.3.18 Präzipitation von EGFP-RhoC aus Zelllysat mittels GST-mp120ctn 1N-Fusionsproteinen 71
3.3.19 Translokation von Rho-GTPasen aus der Plasmamembran durch RhoGDIs 72
3.3.20 Bestimmung der Aktivität von Rho-Proteinen in GST-TRBD-Präzipitationsstudien 73
3.3.21 Bestimmung der Aktivität von Rac1 in GST-PAK-CD-Präzipitationsstudien 74
3.4 Zellbiologische Methoden 76
3.4.1 Kultivierung eukaryontischer Zellen 76
3.4.2 Passagieren von Zellen mittels Trypsin-EDTA-Lösung 76
3.4.3 Zellzahlbestimmung mittels Neubauer-Zählkammer 77
3.4.4 Einfrieren von Zellen 77
3.4.5 Auftauen von Zellen 78
3.4.6 Transiente Transfektion von PANC-1-Zellen mit DMRIE-C *Reagent* 78
3.4.7 Transfektion von PANC-1-Zellen mit p120ctn-siRNA 79
3.5 Auswertung 79
3.6 Densitometrie 80

4. Ergebnisse 81

4.1 Charakterisierung von EGFP-RhoA und EGFP-RhoC in PANC-1-Zellen 81

4.1.1 Nachweis der Expression von EGFP-RhoA, EGFP-RhoC und EGFP mittels Fluoreszenzmikroskopie ... 81
4.1.2 Nachweis der Expression von EGFP-RhoA, EGFP-RhoC und EGFP im Immunblotverfahren ... 83
4.2 Identifikation von Rho-spezifischen Interaktionspartnern in PANC-1-Zellen ... 85
4.2.1 Nachweis der Expression von RhoGDIs in PANC-1-Zellen ... 85
4.2.2 Analyse von EGFP-Rho/RhoGDI-Proteinkomplexen mittels Co-Immunpräzipitation ... 86
4.2.3 Translokation von Rho-GTPasen aus der Plasmamembran durch RhoGDIα ... 89
4.3 Interaktion von p120ctn mit rekombinantem GST-RhoA und GST-RhoC ... 91
4.3.1 Expression und Aufreinigung rekombinanter GST-Proteine und GST-Rho-Fusionsproteine in *E. coli* ... 91
4.3.2 Expression von p120ctn in verschiedenen humanen Pankreaskarzinom-zelllinien ... 93
4.3.3 Expression von p120ctn in EGFP-RhoA- und EGFP-RhoC- exprimierenden PANC-1-Zellen ... 94
4.3.4 Nachweis der Interaktion von p120ctn mit GST-Rho-Fusionsproteinen ... 95
4.3.5 Nachweis der Interaktion von GST-RhoC-Mutanten mit p120ctn ... 98
4.3.6 Nachweis der Interaktion von p120ctn mit GST-RhoA, GST-RhoC und GST-RhoC/A sowie mit den Mutanten GST-RhoC (S152G) und GST-RhoC/A (S152G) ... 101
4.3.7 Vergleichende Analyse der Interaktion der Mutanten RhoA (G152S) und RhoC (S152G) mit p120ctn ... 103
4.3.8 Bestimmung der [^{35}S]GTP[S]-Bindung der GST-Rho-Fusionsproteine zur Ermittlung der aktiven Proteinkonzentration ... 105
4.3.9 Einfluss von GDP und GTP auf die Interaktion von GST-RhoA und GST-RhoC mit p120ctn ... 107
4.3.10 Interaktion von ADP-ribosylierten GST-Rho-Fusionsproteinen mit p120ctn ... 110
4.4 Nachweis der Interaktion von EGFP-RhoC mit GST-mp120ctn ... 113
4.5 Nachweis von p120ctn im Komplex mit EGFP-Rho-Fusionsproteinen durch Co-Immunpräzipitation ... 116
4.6 Nachweis der Rho-GTPasen RhoA und RhoC sowie p120ctn in Caveolin-hältigen Zellkompartimenten (*lipid rafts*) ... 118
4.7 Bestimmung der Rho-Aktivität ... 121
4.7.1 Expression und Aufreinigung von GST-TRBD ... 121
4.7.2 Einfluss von p120ctn 1A auf die Aktivität der Rho-GTPasen RhoA und RhoC ... 122

4.7.3 Vergleichende Analyse des Einflusses von p120ctn 1A-4A auf die Aktivität von RhoC ... 125
4.8 Bestimmung der Rac1-Aktivität ... 128
4.8.1 Expression und Aufreinigung von GST-PAK-CD ... 128
4.8.2 Einfluss von p120ctn auf die Aktiviät von Rac1 ... 129
4.9 Einfluss von p120ctn-siRNA auf die Aktivität von RhoA und RhoC ... 132
4.10 Analyse der Expression von E-Cadherin und N-Cadherin in EGFP-Rho-exprimierenden PANC-1-Zellen ... 135

5. Diskussion ... 137

5.1 Lokalisation von EGFP-RhoA und EGFP-RhoCin PANC-1-Zellen ... 137
5.2 Interaktion von RhoGDIs mit RhoA und RhoC in PANC-1-Zellen ... 140
5.3 Identifikation von p120ctn als Interaktionspartner von RhoC in PANC-1-Zellen ... 142
5.3.1 Expression von p120ctn-Isoformen in PANC-1-Zellen ... 143
5.3.2 Nachweis der Interaktion von p120ctn mit rekombinantem GST-RhoA und GST-RhoC ... 145
5.4 Einfluss von Guaninnukleotiden auf die Interaktion von GST-Rho und p120ctn ... 147
5.5 Interaktion von p120ctn mit EGFP-RhoC in EGFP-RhoC-exprimierenden PANC-1-Zellen ... 149
5.6 Einfluss von p120ctn auf die RhoA-, RhoC- und Rac1-Aktivität ... 150
5.7 Expression von E-Cadherin und N-Cadherin in PANC-1-Zellen ... 151

6. Zusammenfassung ... 153

7. Literaturverzeichnis ... 157

8. Danksagung ... 175

9. Lebenslauf ... 176

10. Publikationen ... 177

Abkürzungen

Abb.	Abbildung
Amp	Ampizillin
AP	alkalische Phosphatase
APS	Ammoniumpersulfat
AS	Aminosäure
BCA	*bicinchoninic acid*
BCIP	5-Brom-4-chlor-3-indolylphosphat-Toluidinsalz
bp	basepairs
BSA	Rinderserumalbumin
bzw.	beziehungsweise
°C	Grad Celsius
cAMP	zyklisches Adenosinmonophosphat
Ci	Curie
CMF-PBS	Calcium- und Magnesium-freies PBS
cm	Zentimeter
cpm	*counts per minute*
d.h.	das heißt
DH	*Dbl homology*
DMEM	*Dulbeccos's Modified Eagle Medium*
DMF	Dimethylformamid
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoxynukleosid-Triphosphat
DTT	Dithiothreitol
E. coli	*Escherichia coli*
ECL	*enhanced chemiluminescence*
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EGTA	Ethylenglykol-bis(2-aminoethylether)-N,N,N´,N´-Tetraessigsäure
FCS	fötales Kälberserum
Fmol	Femtomol
g	Erdbeschleunigung (9,81 m/s^2)
g	Gramm
GAP	GTP*ase-activating protein*

GDP	Guanosin-5'-diphosphat
GEF	*guanine nucleotide exchange factor*
Gr.	Größe
GST	Glutathion-S-Transferase
GTP	Guanosin-5'-triphosphat
GTP[S]	Guanosin-5'-(3-*O*-thio)-triphosphat
h	Stunde
HEPES	N-2-Hydroxyethylpiperazin-N'-2-ethansulfonsäure
HRP	*horse-radish peroxidase* (Meerrettich-Peroxidase)
IgG	Immunglobulin G
IPTG	Isopropyl-β-D-Thiogalaktopyranosid
kDa	Kilodalton
l	Liter
LB-Medium	Luria Bertani-Medium
LPA	Lysophosphatidsäure
M	Mol pro Liter oder molar
µg	Mikrogramm
µM	Mikromol pro Liter
mA	Milliampere
MES	Morpholinoethansulfonsäure
mg	Milligramm
min	Minute
ml	Milliliter
mm	Millimeter
mM	Millimol pro Liter
mmol	Millimol
mRNA	*messenger* RNA
m/V	Masse pro Volumen
NAD	Nicotinamidadenindinukleotid
NBT	4-Nitroblau-Tetrazoliumchlorid
ng	Nanogramm
nm	Nanometer
OD	optische Dichte
PCR	Polymerase-Kettenreaktion

p.a.	pro analysi
PBS	*Phosphat-buffered saline*
PH-Domäne	*pleckstrin homology* Domäne
PMSF	Phenylmethylsulfonylfluorid
Rac	*Ras-related C3 botulinum toxin substrate*
Ras	*rat sarcoma*
Rho	*ras homologous protein*
RhoGDI	Rho-*guanine nucleotide dissociation inhibitor*
RNA	Ribonukleinsäure
RT	Raumtemperatur
s	Sekunde
SDS	Natriumdodecylsulfat
SDS-PAGE	SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese
siRNA	*small interference* RNA
Tab.	Tabelle
TCA	Trichloressigsäure
TBS	*Tris-buffered saline*
TEMED	N, N, N', N' –Tetramethylethylendiamin
Tm	Schmelztemperatur
Tris	Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan
U	*unit*
Upm	Umdrehungen pro Minute
UV	Ultraviolett
V	Volt
V/V	Volumen pro Volumen

1. Einleitung

1.1 Rho-GTPasen

Rho-GTPasen (*ras homologous proteins*) sind monomere GTPasen der Ras-Superfamilie mit einem Molekulargewicht von 20-30 kDa (Bishop und Hall, 2000). Sie weisen auf Aminosäuresequenzebene eine Übereinstimmung von 30 % zu den Ras-Proteinen (Takai *et al*., 2001) und eine Übereinstimmung von 40-95 % innerhalb der Familie der Rho-GTPasen auf (Wennerberg und Der, 2004). In Säugern wird die Familie der Rho-GTPasen in 8 Untergruppen unterteilt und umfasst 22 Mitglieder: (1) Cdc42-Subfamilie mit den Mitgliedern Cdc42, TC10, TCL, Chp und Wrch-1; (2) Rac-Subfamilie mit Rac1, Rac2, Rac3 und RhoG; (3) Rho-Subfamilie mit RhoA, RhoB und RhoC; (4) Rnd-Subfamilie mit Rnd1, Rnd2 und Rnd3/RhoE; (5) RhoD-Subfamilie mit den Mitgliedern RhoD und Rif; (6) RhoH/TTF; (7) RhoBTB-Subfamilie mit RhoBTB1 und RhoBTB2 und (8) Miro-Subfamilie mit den Mitgliedern Miro-1 und Miro-2 (Sorokina und Chernoff, 2005). Am ausführlichsten wurden in humanen Zellen RhoA und RhoB, Rac1 und Rac2 sowie Cdc42 hinsichtlich ihrer Auswirkungen auf die Zytoskelett-Reorganisation und die Zellmigration untersucht (Ridley, 2001). Die Rho-Subfamilie umfasst die GTPasen RhoA, RhoB und RhoC. Die humanen Proteine weisen auf Aminosäuresequenzebene eine Übereinstimmung von 85 % auf (Arthur *et al*., 2002). Die Abbildung 3 zeigt den Vergleich der Aminosäuresequenzen von RhoA und RhoC. Als Guaninnukleotid-bindende und GTP-hydrolysierende Proteine fungieren Rho-GTPasen als molekulare Schalter, die zwischen einem aktiven, GTP-gebundenen Zustand und einem inaktiven, GDP-gebundenen Zustand wechseln (Ridley und Hall, 1992). In der GTP-gebundenen Form katalysieren sie die Signalübertragung von extrazellulären Signalen zu intrazellulären Effektorproteinen und sind an der Regulation der Organisation des Aktin-Zytoskeletts, der Zellpolarität, der Gentranskription, der Zellzyklusprogression und der Zellmigration beteiligt (Bishop und Hall, 2000; Etienne-Manneville und Hall, 2002; Jaffe und Hall, 2005).

1.1.1 Regulation der Aktivität von Rho-GTPasen

Rho-GTPasen wechseln zwischen einem aktiven, GTP-gebundenen und einem inaktiven, GDP-gebundenen Zustand und dieser Wechsel wird durch verschiedene akzessorische

Proteinen reguliert. Abbildung 1 zeigt schematisch den Regulationszyklus der Rho-GTPasen. Guaninnukleotid-Austauschfaktoren (GEFs; *guanine nucleotide exchange factors*) katalysieren den Austausch von GDP zu GTP und aktivieren die Rho-GTPasen. Die Aktivierung der Rho-GTPasen wird durch extrazelluläre Signale, wie z. B. Wachstumsfaktoren oder Chemokine stimuliert. Im aktiven Zustand können Rho-GTPasen mit verschiedenen zellulären Effektoren interagieren. GTPase-aktivierende Proteine (GAPs*; GTPase activating proteins*) katalysieren die Hydrolyse von GTP zu GDP. Über die Stimulation der intrinsischen GTPase-Aktivität werden die Rho-GTPasen inaktiviert. Durch die Bindung von Rho-Guaninnukleotid-Dissoziations-Inhibitoren (RhoGDIs; *Rho GDP dissociation inhibitors*) an GDP-gebundene Rho-GTPasen wird der Austausch von GDP zu GTP inhibiert. Die inaktiven Rho-GTPasen verbleiben im Komplex mit GDIs im Zytoplasma (Jaffe und Hall, 2005).

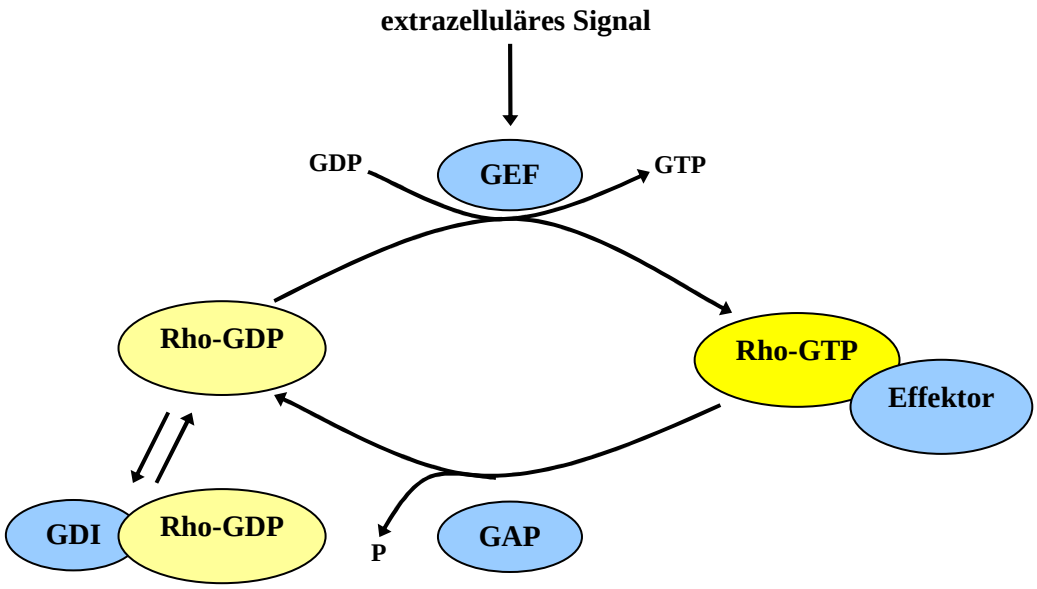


Abbildung 1: Regulation der Aktivität von Rho-GTPasen. Rho-GTPasen wechseln zwischen einem inaktiven, GDP-gebundenen Zustand und einem aktiven, GTP-gebundenen Zustand. Dieser Zyklus wird durch GEFs reguliert, die den Austausch von GDP zu GTP katalysieren. GAPs erhöhen die intrinsische GTPase-Aktiviät, wodurch die Rho-GTPasen inaktiviert werden. GDIs binden an die GDP-gebundenen Rho-GTPasen und halten sie im inaktiven Zustand. Die aktivierten, GTP-gebundenen Rho-GTPasen beeinflussen durch die Interaktion mit verschiedenen Effektorproteinen zahlreiche zelluläre Prozesse (nach Jaffe und Hall, 2005).

Die Aktivierung der Rho-GTPasen erfolgt über den Austausch von GDP zu GTP und wird durch GEFs katalysiert. Bei Säugern sind über 60 Rho-GEFs bekannt (Cheng *et al.*, 2004). Alle GEFs besitzen eine *Dbl homology* (DH)-Domäne, die für die katalytische Aktivität des

Proteins notwendig ist, und eine *pleckstrin homology* (PH)-Domäne, durch die vermutlich die subzelluläre Lokalisation vermittelt wird (Cerione und Zheng, 1996). GEFs binden reversibel an die inaktive Rho-GTPase, destabilisieren den GDP-GTPase-Komplex und katalysieren die Dissoziation von GDP. Im nukleotidfreien Zustand bildet die Rho-GTPase mit dem GEF einen relativ stabilen Komplex. Da der intrazelluläre Anteil an GTP etwa 30mal höher ist als der Anteil an GDP, kommt es zur spontanen Bindung von GTP an die Rho-GTPase, wodurch das GEF verdrängt und die Rho-GTPase aktiviert wird (Cherfils und Chardin, 1999; Cheng *et al.*, 2004). Einige GEFs weisen eine hohe Spezifität zu einzelnen Rho-GTPasen auf. Lbc und p115RhoGEF interagieren spezifisch mit RhoA, Tiam1 interagiert spezifisch mit Rac1 und Fgd1 mit Cdc42. Die Austauschfaktoren Vav1, Vav2 und Dbl hingegen sind weniger spezifisch und binden an RhoA, Rac1 und Cdc42 (Mackay und Hall, 1998; Schmidt und Hall, 2002). Der Austauschfaktor XPLN katalysiert den Nukleotidaustausch bei RhoA und RhoB, aber nicht bei RhoC, RhoG, Rac1 oder Cdc42 (Arthur *et al*., 2002).

Im Gegensatz zu GEFs erhöhen GAPs die geringe intrinsische GTPase-Aktivität der Rho-GTPasen. Durch Hydrolyse des gebundenen GTP und Abspaltung des γ-Phosphats katalysieren GAPs die Inaktivierung der Rho-GTPase (Jaffe und Hall, 2002). Die Mitglieder der Familie der RhoGAPs, von denen bisher über 80 humane Proteine bekannt sind, haben eine konservierte RhoGAP-Domäne, die 150 Aminosäuren umfasst und für die Interaktion mit den GTP-gebundenen Rho-Proteinen notwendig ist (Moon und Zheng, 2003).

Der Austausch von GDP zu GTP wird durch die Bindung von RhoGDIs an die GDP-gebundenen Rho-GTPasen verhindert. RhoGDIs können membrangebundene, posttranslational modifizierte GDP-gebundene Rho-GTPasen durch Bindung an das prenylierte, carboxy-terminale Ende aus der Plasmamembran extrahieren. Die inaktiven Rho-GTPasen liegen dann im Komplex mit RhoGDIs im Zytoplasma der Zellen vor (Rivero *et al.*, 2002). Durch eine direkte Interaktion der Proteine der ERM (Ezrin, Radixin, Moesin)-Proteinfamilie mit RhoGDIs werden GDP-gebundene Rho-GTPasen vermutlich aus dem Komplex mit RhoGDIs verdrängt und können nach der Assoziation mit der Membran wieder von GEFs aktiviert werden (Takahashi *et al.*, 1997; Sasaki und Takai, 1998; Olofsson, 1999). Nach Freisetzung der Rho-GTPasen aus dem gemeinsamen Komplex werden die RhoGDIs durch die Kinase Src phosphoryliert und können die Rho-GTPasen nicht mehr binden. Durch die Phosphorylierung der RhoGDIs wird das Zirkulieren der Rho-GTPasen zwischen aktivem und inaktivem Zustand bzw. zwischen Membran und Zytosol kontrolliert (DerMardirossian *et al.*, 2006). RhoGDIs können auch an aktive, GTP-gebundene Rho-GTPasen binden, wodurch die intrinsische GTPase-Aktivität der Rho-GTPasen sowie die durch GAPs katalysierte

GTPase-Aktivität inhibiert wird und die Interaktion mit Effektorproteinen verhindert wird (Hoffman *et al.*, 2000; Rivero *et al.*, 2002).

Derzeit sind drei humane RhoGDIs bekannt: RhoGDIα (RhoGDI-1), RhoGDIβ (RhoGDI-2 oder D4/Ly-GDI) und RhoGDIγ (RhoGDI-3). RhoGDIα wird in allen Zellen und Geweben exprimiert und interagiert bevorzugt mit RhoA, aber auch mit Rac1 und Cdc42 (Sasaki und Takai, 1998). RhoGDIβ wird in hämatopoetischen Zellen, insbesondere in B- und T-Lymphozyten exprimiert und bindet ebenso an RhoA, Rac1 und Cdc42 jedoch mit einer 10-fach geringeren Affinität als RhoGDIα (Adra *et al.*, 1997; Gorvel *et al.*, 1998). RhoGDIα und RhoGDIβ weisen auf Aminosäuresequenzebene eine Übereinstimmung von 78 % auf (Scherle *et al.*, 1993). Sasaki und Mitarbeiter konnten zeigen, dass RhoGDIα und RhoGDIβ sowohl mit der inaktiven, GDP-gebundenen Form der Rho-GTPasen, als auch mit der aktiven, GTP-gebundenen Form interagieren (Sasaki *et al.*, 1993). RhoGDIγ ist über eine amphipatische Helix in der Plasmamembran verankert und wird bevorzugt in Zellen des Gehirns, des Pankreas, der Lunge, der Niere und der Hoden exprimiert (Dovas und Couchman, 2005). RhoGDIγ bindet an RhoB und RhoG, mit geringerer Affinität an RhoA und Cdc42 und nicht an Rac1 und Rac2 (Zalcman *et al.*, 1996, Adra *et al.*, 1997). RhoGDIγ inhibiert den Austausch von GDP zu GTP bei RhoB, kann jedoch GTP-gebundenes RhoB nicht aus der Plasmamembran extrahieren (Zalcman *et al.*, 1996).

Alle Mitglieder der Rho-GTPasen werden am carboxy-terminalen Ende durch Prenylierung des endständigen Cysteins posttranslational modifiziert (Adamson *et al.* 1992). Diese Modifikation ist für eine Interaktion mit der Plasmamembran und mit Effektoren sowie für die Funktion der Rho-GTPasen erforderlich (Ridley, 2001). Eine CAAL-Sequenz (C, Cystein; A aliphatische Aminosäure; L, Leucin) am carboxy-terminalen Ende der Rho-GTPasen dient als Signal für die drei aufeinander folgenden Vorgänge bei der posttranslationalen Modifikation: (1) Prenylierung, (2) Proteolyse und (3) Carboxy-Methylierung. Die endständige Aminosäure Leucin der CAAL-Sequenz von RhoA, RhoB, RhoC, Rac1, Rac2 und Cdc42 ist Substrat für die Geranylgeranyltransferase Typ I, die die Prenylierung durch Anhängen einer Geranylgeranylgruppe, die 20 C-Atome enthält, katalysiert (Adamson *et al.*, 1992; Seabra, 1998). Alternativ kann RhoB auch durch Anhängen einer Farnesylgruppe mit 15 C-Atomen prenyliert werden. Diese Modifikation wird ebenso durch die Geranylgeranyltransferase Typ I katalysiert. RhoD und RhoE werden, wie die Ras-Proteine, durch die Farnesyltransferase farnesyliert (Adamson *et al.*, 1992; Foster *et al.*, 1996). Die Einführung einer Punktmutation in Kodon 14, bei der die Aminosäure Glycin gegen Valin ausgetauscht wird, führt zu einer stark verminderten intrinsischen und GAP-induzierten GTPase-Aktivität der GTP-

gebundenen Rho-GTPase. Durch diese Veränderung entstehen konstitutiv aktive Rho (V14)-Mutanten, die permanent im GTP-gebundenen Zustand vorliegen (Qiu *et al.*, 1995; Bishop und Hall, 2000). Durch die Einführung einer Punktmutation in Kodon 19, durch die ein Threonin gegen ein Asparagin ausgetauscht wird, weisen diese Rho (N19)-Mutanten eine höhere Affinität zu GDP als zu GTP auf. Sie können deshalb nicht aktiviert werden und nachfolgend mit Effektoren interagieren (Feig, 1999).

1.1.2 Struktur der Rho-GTPasen

Die Struktur von Rho-GTPasen und Ras-Proteinen wurde mittels röntgenkristallographischer Untersuchungen aufgeklärt (Wei *et al.*, 1997; Ihara *et al.*, 1998; Worthylake *et al.*, 2000; Vetter und Wittinghofer, 2001; Fiegen *et al.*, 2002; Dias und Cerione, 2007). Die Abbildung 2 zeigt ein dreidimensionales Strukturmodell der konstitutiv aktiven Mutante RhoA (V14) im Komplex mit GTPγS und einem Magnesiumion (Ihara *et al.*, 1998). Die Grundstruktur besteht bei Rho- sowie Ras-GTPasen aus sechs β-Faltblattstrukturen (B1-B6), die den Kern der Proteine bilden. In RhoA und RhoC ist dieser Kern von fünf α-Helices (A1, A3, A3' A4 und A5) und drei 3_{10}-Helices (H1-H3) umgeben. Die fünf α-Helices und die sechs β-Faltblattstrukturen bezeichnet man zusammen mit 5 Polypeptidschleifen als G-Domäne. Diese 20 kDa große, katalytische Domäne ist bei allen Rho-GTPasen ähnlich (Paduch *et al.*, 2001; Dias und Cerione, 2007).

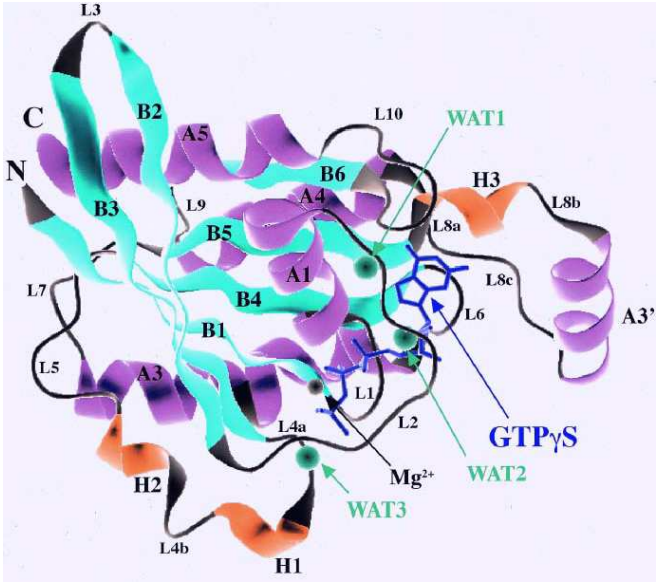


Abbildung 2: Dreidimensionale Darstellung von RhoA (V14)-GTPγS. Die Abbildung zeigt die Mutante RhoA (V14) im Komplex mit GTPγS (blau) und Mg^{2+} (grau) als Strukturmodell. Die Proteinstruktur bildet sich aus sechs β-Faltblattstrukturen (B1-B6), die in Türkis dargestellt sind. Diese

sind umgeben von fünf α-Helices (A1, A3, A3', A4 und A5), die in Lila dargestellt sind und von drei 3_{10}-Helices (H1-H3), die in Rot markiert sind. Drei Wassermoleküle (WAT1-3) sind in Grün dargestellt (nach Ihara et al., 1998).

Weitere funktionelle Abschnitte bilden die *switch* I- und *switch* II-Region und die Phosphat-Bindungsdomäne (*P-loop*). Die *switch* I-Region entspricht der Polypeptidschleife L2, die die α-Helix A1 mit dem β-Faltblatt B2 verbindet (Ihara *et al.*, 1998). Sie beinhaltet einen essentiellen Threonin-Rest (Thr-37 bei RhoA und RhoC), an den ein Mg^{2+}-Ion bindet, welches essentiell für die GTP-Hydrolyse und die GTP-Bindung ist. Diese Region ist des Weiteren für die Interaktion mit Effektoren und GAPs verantwortlich (Sprang und Coleman, 1998; Shimizu *et al.*, 2000). Die *switch* II-Region entspricht dem Polypeptidsegment, das zwischen den β-Faltblattstrukturen B3 und B4 liegt und enthält einen konservierten Aspartat-Rest (Asp-59 bei RhoA und RhoC), der als H_2O-vermittelter Mg^{2+}-Ligand von Bedeutung ist. Die *switch* II-Region ist ein sehr flexibler Teil der katalytischen G-Domäne und ist an der Bindung des γ-Phosphats von GTP beteiligt (Ihara *et al.*, 1998; Sprang und Coleman, 1998). Durch die Bindung von GDP oder GTP an die G-Domäne der Rho-GTPasen, kommt es zu Konformationsänderungen, insbesondere in den äußerst flexiblen *switch*-Regionen. Im aktiven Zustand der Rho-GTPasen wird die γ-Phosphatgruppe des gebundenen GTP von der *switch* I- und *switch* II-Region umschlossen. Durch die Freisetzung dieses Phosphatrestes nach der GTP-Hydrolyse kommt es beim Übergang in die GDP-gebundene Konformation zu einer Entspannung in den *switch*-Regionen (Vetter und Wittinghofer, 2001). An der Bindung der α- und β-Phosphatgruppen von GDP und GTP ist eine Region beteiligt, die *P-loop* genannt wird. Sie entspricht der Polypeptidschleife L1, die die β-Faltblattstruktur B1 und die α-Helix A1 verbindet. Diese Region beinhaltet einen konservierten Threonin-Rest (Thr-19 bei RhoA und RhoC), der die Bindung des Mg^{2+}-Ions koordiniert (Ihara *et al.*, 1998; Sprang und Coleman, 1998; Dias und Cerione, 2007). Rho-GTPasen besitzen im Vergleich zu Ras-Proteinen eine zusätzliche α-Helix (A3'), die als Insert-Region (AS 124-136) bezeichnet wird. Die Insertregion ist an der Bindung von GDIs beteiligt (Ridley, 2000). Zusätzlich haben Rho-GTPasen eine Effektorregion im Bereich der Aminosäuren 31-42, die für die Interaktion mit GAPs und Effektorproteinen erforderlich ist (Ridley, 2000). In Bezug auf die Rolle von Mg^{2+}-Ionen als wichtiger Kofaktor bei der Nukleotidbindung und Hydrolyse von GTP wurde die Kristallstruktur von RhoA in der GDP-gebundenen Form in einem Mg^{2+}-freien Zustand untersucht (Zhang *et al.*, 2000). Die Dissoziation von Mg^{2+}-Ionen induziert signifikante Konformationsänderungen in der *switch* I-Region der Rho-GTPasen, durch die die Nukleotidbindungsstelle geöffnet wird (Shimizu *et al.*, 2000). Es wurde festgestellt, dass

Mg^{2+}-Ionen für den Vorgang der Nukleotidbindung selbst nicht notwendig sind, jedoch als Regulator der Kinetik des Nukleotidaustausches und als Stabilisator für das gebundene Nukleotid von Bedeutung sind (Zhang *et al.*, 2000).

1.1.3 Funktion der Rho-GTPasen

Rho-GTPasen regulieren eine große Anzahl unterschiedlicher biologischer Prozesse, deren Signaltransduktionswege zum Teil sehr gut untersucht sind, insbesondere die Regulation der Organisation des Aktin-Zytoskeletts (Mackay und Hall, 1998; Nobes und Hall, 1999). Die meisten Kenntnisse über die Funktion der Rho-GTPasen beruhen auf Studien von RhoA, Rac1 und Cdc42. Untersuchungen in Fibroblasten zur Regulation des Aktinzytoskeletts haben gezeigt, dass die Aktivierung von RhoA zum Beispiel durch Lysophosphatidsäure (LPA) zur Bildung von kontraktilen Bündeln von Aktin-Myosin-Filamenten, sogenannten Stressfasern, und zur Ausbildung von fokalen Adhäsionskomplexen führt. Die Aktivierung von Rac1 durch *platelet-derived growth factor* (PDGF) oder Insulin führt hingegen zur Polymerisation von Aktin an der Zellperipherie und in Folge davon zur Ausbildung von Lamellipodien und Membranauffaltungen. Die Aktivierung von Cdc42 durch Bradykinin führt zu dünnen, fingerähnlichen, aktinreichen Ausstülpungen der Plasmamembran, sogenannten Filopodien (Nobes und Hall, 1995; Hall, 1998; Mackay und Hall, 1998; Aspenström, 1999). Neben der Regulation der Aktin-Zytoskelett-Organisation sind die Rho-GTPasen an der Regulation der Zellpolarität und Zellmigration, der Transkription, der Zelladhäsion, der Dynamik von Mikrotubuli, von Vesikeltransport und von enzymatischen Vorgängen beteiligt (Etienne-Mannevielle und Hall, 2002; Jaffe und Hall, 2005; Villalonga und Ridley, 2006). Rho-GTPasen sind außerdem an der Regulation der Zytokinese (Prokopenko *et al.*, 2000), der Phagozytose (Caron und Hall, 1998), der Pinozytose (Ridley und Hall, 1992) und der onkogenen Zelltransformation (Westwick *et al.*, 1997) beteiligt. Des Weiteren koordinieren Rho-GTPasen die Genexpression durch die Regulation von Signaltransduktionswegen von der Plasmamembran in den Kern. RhoA, Rac1 und Cdc42 aktivieren die *serum response factor* (SRF)-abhängige Transkription (Hill *et al.*, 1995) und den Transkriptionsfaktor NFκB (Perona *et al.*, 1997). Rac1 und Cdc42 können darüber hinaus den *c-Jun N-terminal kinase* (JNK)- und den p38-MAP (*mitogen-activated protein*)-Kinase-Signalweg aktivieren (Coso *et al.*, 1995; Lin *et al.*, 1997; Jaffe und Hall, 2005). Rac1 ist außerdem ein wichtiger Regulator des NADPH-Oxidase-Enzymkomplexes, der für die Phagozytose von Mikrooraganismen durch Neutrophile und Monozyten wichtig ist (Abo *et al.*, 1991). RhoA, Rac1 und Cdc42 sind als

Regulatoren an der G_1-Progression im Zellzyklus und somit an der Zellteilung beteiligt (Olson *et al.*, 1995).

1.1.4 RhoA und RhoC

Die beiden Rho-GTPasen RhoA und RhoC bilden mit RhoB die Rho-Subfamilie der Rho-GTPasen (Chardin *et al.*, 1988). RhoA und RhoC weisen auf Aminosäureebene eine Sequenzidentität von 92 % auf. Sie unterscheiden sich in nur 16 von insgesamt 193 Aminosäuren, wobei davon 9 Aminosäuren am carboxy-terminalen Ende der Proteine lokalisiert sind. In Abbildung 3 ist der Vergleich der Aminosäuresequenzen von RhoA und RhoC gezeigt. In wichtigen Bereichen wie der Effektorregion und der Insertregion sind die Sequenzen von RhoA und RhoC identisch. Die Aminosäuren, die an der Bindung, Stabilisierung und Regulation der GTP-Hydrolyse beteiligt sind (Gly-14, Thr-19, Phe-30 und Gln-63), sind bei RhoA bzw. bei RhoC konserviert (Wheeler und Ridley, 2004).

```
                                                 Effektorregion
RhoA: MAAIRKKLVI VGDGACGKTC LLIVFSKDQF PEVYVPTVFE NYVADIEVDG
RhoC: MAAIRKKLVI VGDGACGKTC LLIVFSKDQF PEVYVPTVFE NYIADIEVDG
               10          20          30          40          50

RhoA: KQVELALWDT AGQEDYDRLR PLSYPDTDVI LMCFSIDSPD SLENIPEKWT
RhoC: KQVELALWDT AGQEDYDRLR PLSYPDTDVI LMCFSIDSPD SLENIPEKWT
               60          70          80          90          100

                                     Insertregion
RhoA: PEVKHFCPNV PIILVGNKKD LRNDEHTRRE LAKMKQEPVK PEEGRDAMNR
RhoC: PEVKHFCPNV PIILVGNKKD LRQDEHTRRE LAKMKQEPVR SEEGRDAMNR
               110         120         130         140         150

RhoA: IGAFGYMECS AKTKDGVREV FEMATRAALQ ARRGKKKSGC CVL
RhoC: ISAFGYLECS AKTKEGVREV FEMATRAGLQ VRKNKRRRGC PIL
               160         170         180         190
```

Abbildung 3: Vergleich der Aminosäuresequenzen von RhoA und RhoC. Die Aminosäuren, in denen sich RhoA und RhoC unterscheiden, sind in Rot markiert. Strukturell wichtige Regionen wie Effektorregion und Insertregion sind gekennzeichnet. Die Zahlen bezeichnen die Aminosäurepositionen.

Trotz ihrer hohen Sequenzidentität weisen RhoA und RhoC funktionelle Unterschiede auf. So induziert der von Arthur und Mitarbeitern identifizierte Austauschfaktor XPLN den Austausch von GDP zu GTP bei RhoA und RhoB, jedoch nicht bei RhoC. Der Unterschied, dass XPLN mit RhoA und nicht mit RhoC interagiert, beruht auf einer unterschiedlichen

Aminosäure an Position 43. An dieser Position ist bei RhoA ein Valin und bei RhoC ein Isoleucin (Arthur *et al.*, 2002).

Des Weiteren ist die Beteiligung von RhoA bzw. RhoC bei der Transformation, Migration, Invasion und Metastasierung von Tumorzellen interessant. Hierbei wird, im Unterschied zu den konstitutiv aktiv wirkenden Punktmutationen bei Ras, die Überexpression von RhoA bzw. RhoC mit der Entstehung von Tumoren beim Menschen in Verbindung gebracht (Sahai und Marshall, 2002). Einige Untersuchungen von primären humanen Tumoren zeigten, dass RhoA in Darm-, Brust- und Lungenkarzinomzellen verstärkt exprimiert vorliegt (Fritz *et al.*, 1999; Sahai und Marshall, 2002). Die Überexpression von RhoC wurde im duktalen Adenokarzinom des Pankreas (Suwa *et al.*, 1998) und bei inflammatorischem Brustkrebs (van Golen *et al.*, 2000; Kleer *et al.*, 2002) festgestellt. Darüber hinaus konnte gezeigt werden, dass RhoC an der Regulation der Migration und Metastasierung von humanen Melanomzellen beteiligt ist. Bei stark metastasierenden Melanomen verstärkt die Überexpression von RhoC die tumorigenen und metastatischen Eigenschaften von Tumorvorläuferzellen (Clark *et al.*, 2000). Im metastasierenden Ovarialkarzinom wird sowohl RhoA als auch RhoC stärker exprimiert als in benignen Ovarialtumoren wobei die Expression in den Metastasen bedeutend höher als im Primärtumor selbst ist (Horiuchi *et al.*, 2003). Für Epithelzellen konnte gezeigt werden, dass RhoA für die Bildung und Stabilisierung von Cadherin-vermittelter Zell-Zell-Adhäsion von Bedeutung ist (Braga *et al.*, 1997, Takaishi *et al.*, 1997).

1.2 Zell-Zell-Adhäsion

Funktionelle Zell-Zell-Kontakte sind für die Entwicklung und den Erhalt von komplex differenzierten Geweben notwendig. Bei Epithelzellen wird die Zell-Zell-Adhäsion durch Bindungskomplexe wie *adherens junctions, tight junctions* und Desmosomen ermöglicht. *Adherens junctions* und *tight junctions* sind mit Aktinfilamenten, Desmosomen mit Intermediärfilamenten verknüpft (Tsukita *et al.*, 1993; Takaishi *et al*, 1997).

Ein strukturell entscheidendes Protein der *adherens junctions* sind die Cadherine, die eine Familie von transmembranen Glykoproteinen bilden. Über ihre extrazellulären Domänen bilden Cadherine kalziumabhängige Zell-Zell-Kontakte. In epithelialem Gewebe ist hauptsächlich E-Cadherin für die Cadherin-vermittelte Zell-Zell-Adhäsion verantwortlich (Takeichi *et al.*, 1995). In diesen Geweben ist E-Cadherin an der Etablierung und Aufrechterhaltung der Zellpolarität sowie dem Zusammenhalt des Gewebes maßgeblich beteiligt (Hinck *et al.*, 1994). Die E-Cadherin-Moleküle werden durch Proteinkomplexe

stabilisiert, die sich aus Mitgliedern der Familie der *armadillo repeat*-Proteine zusammensetzen. Diese Protein-Interaktionen sind für eine effiziente Zell-Zell-Adhäsion unbedingt notwendig. So binden β-Catenin oder γ-Catenin an die Catenin-Bindungsdomäne im cytoplasmatischen Teil von E-Cadherin und interagieren mit α-Catenin (Aberle *et al.*, 1996; Yap *et al.*, 1998). Das aktin-bindende Protein EPLIN (*epithelial protein lost in neoplasm*), auch bekannt als Lima-1, interagiert mit α-Catenin und verbindet den Cadherin-Catenin-Komplex mit dem Aktin-Zytoskelett (Abe und Takeichi, 2008). Des Weiteren bindet p120 Catenin (p120ctn), ebenfalls ein *armadillo repeat*-Protein, an die juxtamembrane Domäne von E-Cadherin und stabilisiert den Cadherin-Catenin-Komplex (Yap *et al.*, 1998, Ireton *et al.*, 2002). p120ctn reguliert vermutlich indirekt über die Aktivität von Rho-GTPasen die Verbindung zwischen E-Cadherin und Aktin-Zytoskelett (Anastasiadis *et al.*, 2000; Noren *et al.*, 2000).

1.3 Humanes p120 Catenin (p120ctn)

p120 Catenin (in weiterer Folge als p120ctn bezeichnet) wird zur Familie der *armadillo repeat*-Proteine gezählt (Anastasiadis und Reynolds, 2000). Diese Proteinfamilie ist durch eine zentrale Domäne charakterisiert, die sich aus einer variablen Anzahl von Wiederholungen eines bis zu 45 Aminosäuren langen Sequenzmotivs, der sogenannten *armadillo*-Sequenz zusammensetzt und ursprünglich im Produkt des Segmentpolaritätsgen Armadillo bei *Drosophila melanogaster* identifiziert wurde (Riggleman *et al.*, 1989; Peifer *et al.*, 1994). Die p120ctn-Subfamilie der *armadillo repeat*-Proteine umfasst in höheren Organismen zwei Protein-Gruppen. Zur ersten Gruppe zählen außer p120ctn selbst noch ARVCF, δ-Catenin/NPRAP/Neurojungin und p0071. Diese Proteine interagieren mit Cadherinen an *adherens junctions*. Die zweite Gruppe umfasst die Plakophiline 1, 2 und 3, die an Desmosomen lokalisiert sind (Hatzfeld, 2005). Die *armadillo repeat*-Proteine erfüllen unterschiedlichste Funktionen in verschiedenen Zellprozessen wie z. B. Zelladhäsion, Tumorprogression und intrazelluläre Signaltransduktion (Hatzfeld und Nachtsheim, 1996). p120ctn wurde zunächst als Substrat der onkogenen Src-Kinase und von Rezeptor-Tyrosinkinasen beschrieben und deshalb zunächst als p120cas (*cadherin-associated Src substrate*) bezeichnet (Reynolds *et al.*, 1992). Später jedoch wurde es als Catenin identifiziert, da es an die zytoplasmatische, juxtamembrane Domäne am carboxy-terminalen Ende von E-, N- und C-Cadherinen bindet und in p120ctn umbenannt (Reynolds *et al.*, 1994; Thoreson *et al.*, 2000).

1.3.1 Struktur von p120ctn

Das humane Gen CTNND1, das für p120ctn codiert, besteht aus 21 Exons und ist auf Chromosom 11q11 lokalisiert (Bonné *et al.*, 1998). p120ctn wird in verschiedenen Isoformen exprimiert, die sich am amino-terminalen und carboxy-terminalen Ende unterscheiden. Die Nomenklatur der p120ctn-Isoformen richtet sich nach dem verwendeten Startkodon 1, 2, 3 oder 4 und dem verwendeten Exon A, B oder C. Die Abbildung 4 zeigt schematisch die Struktur der theoretisch längsten, humanen p120ctn-Isoform 1ABC, die aus 968 Aminosäuren besteht (Keirsebilck *et al.*, 1998). Alle Isoformen besitzen eine zentrale *armadillo repeat*-Domäne, die aus 10 imperfekten Wiederholungen einer Sequenz von 45 Aminosäuren besteht. Die Isoformen 1-4 entstehen durch den Gebrauch der alternativen ATG-Startkodons 1-4 bei der Translation. Die Aminosäuren 1-45 am amino-terminalen Ende der p120ctn-Isoformen 1 kodieren für eine *coiled-coil*-Domäne, die bei den p120ctn-Isoformen 2, 3 und 4 durch den späteren Translationsstart nicht auftritt. Eine weitere regulatorische Domäne, die einige Tyrosine beinhaltet, die durch Tyrosinkinasen phosphoryliert werden, tritt nur bei den p120ctn-Isoformen 1-3, jedoch nicht bei p120ctn-Isoform 4 auf. Weitere Isoformen kommen durch alternatives Spleißen und durch Kombinationen der Exone A (Exon 18), B (Exon 20) und C (Exon 11 in der sechsten Wiederholung der *armadillo*-Sequenz) zustande (Keirsebilck *et al.*, 1998). In Abbildung 4 sind die Exone A, B und C gekennzeichnet. Wird keines der carboxy-terminalen Exons verwendet, wird diese Isoform mit dem Buchstaben N bezeichnet (z. B. p120ctn Isoform 1N) (Anastasiadis und Reynolds, 2000).

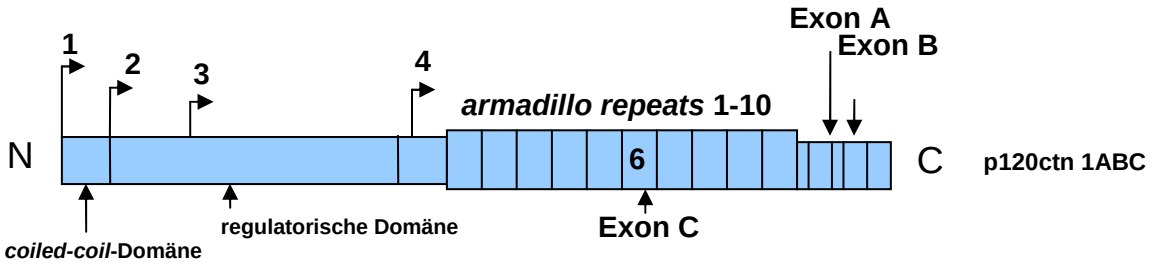


Abbildung 4: Schematische Struktur der p120ctn-Isoform 1ABC. Das Protein setzt sich aus einer amino-terminalen Domäne, einer zentralen *armadillo repeat*-Domäne und einem carboxy-terminalen Teil zusammen. Verschiedene Isoformen kommen durch den Gebrauch der alternativen Startkodons 1-4 bzw. durch alternatives Spleißen und Kombinationen der Exone A, B und C zustande. 1, 2, 3, 4: ATG Startkodons; N: amino-terminales Ende; C: carboxy-terminales Ende

1.3.2 Funktion von p120ctn

p120ctn ist ein multifunktionelles Protein, das in Zellen an der Plasmamembran bei der Zell-Zell-Adhäsion, im Zellkern bei der Genregulation und im Zytoplasma bei der Regulation der Zytoskelett-Organisation eine Rolle spielt. Die charakteristischen Eigenschaften von p120ctn sind die Interaktion mit dem cytoplasmatischen Teil von Cadherin und die damit verbundene Regulation der Stabilität des Cadherin-Catenin-Komplexes an *adherens junctions* und der Cadherin-vermittelten Zell-Zell-Adhäsion. Die Interaktion zwischen p120ctn und Cadherin an der Plasmamembran erfolgt über die *armadillo repeat*-Domäne von p120ctn (*armadillo repeats* 1-7) und der Juxtamembran-Domäne (JMD) des zytoplasmatischen Teils der Cadherine (Yap *et al.*, 1998; Thoreson *et al.*, 2000; Davis *et al.*, 2003). Reynolds, Carnahan und Mitarbeiter konnten zeigen, dass die gezielte Inhibierung der p120ctn-Expression zu einem Abbau von E-Cadherin in Epithelzellen führt. Außerdem soll p120ctn einen direkten Einfluss auf die Stärke der Adhäsion haben und die Anzahl von E-Cadherin-Molekülen kontrollieren, die an der Zelloberfläche für Zell-Zell-Kontakte zur Verfügung stehen (Reynolds und Carnahan, 2004). Die Expression von p120ctn hat keinen Einfluss auf die mRNA-Synthese von E-Cadherin, jedoch wird die Halbwertszeit der E-Cadherin-Moleküle auf mehr als das Doppelte verlängert. Dies lässt den Schluss zu, dass p120ctn E-Cadherin stabilisiert (Ireton *et al.*, 2002). Durch die Phosphorylierung von p120ctn durch Src wird die Bindung mit E-Cadherin verstärkt (Roura *et al.*, 1999).

Im Zytoplasma kontrolliert p120ctn das Zusammenwirken von E-Cadherin und dem Aktin-Zytoskelett durch Interaktion mit den Rho-GTPasen RhoA, Rac1 und Cdc42 (Anastasiadis *et al.*, 2000; Noren *et al.*, 2000; Grosheva *et al.*, 2001). In *in vitro*-Experimenten konnte für die Rho-GTPase Rho1, dem *Drosophila*-Homolog zum humanen RhoA, eine direkte Interaktion mit p120ctn im Zytoplasma gezeigt werden. Die Interaktion von p120ctn und Rho1 konnte vorwiegend für die GDP-gebundene Form der Rho-GTPase festgestellt werden (Magie *et al.*, 2002). Anastasiadis und Mitarbeiter konnten für humanes RhoA zeigen, dass p120ctn *in vivo* in Epithelzellen die Aktivität von RhoA inhibiert und bevorzugt an die GDP-gebundene Form der Rho-GTPase bindet (Anastasiadis *et al.*, 2000). Diese Befunde führen zu der Vermutung, dass zytoplasmatisches p120ctn als GDI fungiert, einen inhibitorischen Komplex mit RhoA bildet und so der Austausch von GDP zu GTP verhindert wird (Anastasiadis *et al.*, 2000). Die Überexpression von p120ctn führte in Fibroblasten und Epithelzellen zu einer Inaktivierung von RhoA. Darauf folgend konnte in diesen Zellen der Abbau von Stressfasern und fokalen Kontakten sowie eine erhöhte Migration der Zellen festgestellt werden. In Fibroblasten und Epithelzellen konnte gezeigt werden, dass die Expression von p120ctn zwar einen

inhibierenden Einfluss auf RhoA hat, jedoch zur Aktivierung der Rho-GTPasen Rac1 und Cdc42 führt (Noren *et al.*, 2000). Die Aktivierung von Rac1 und Cdc42 durch p120ctn beeinflusst das Aktin-Zytoskelett der Zellen. So entsteht in Fibroblasten durch eine abnorme Verlängerung von Lamellipodien und Filopodien der sogenannte *branching phenotype* (Grosheva *et al.*, 2001).

Neben der Lokalisation von p120ctn an der Plasmamembran an *adherens junctions* und im Zytoplasma konnte p120ctn auch im Zellkern nachgewiesen werden. Welches Sequenzmotiv von p120ctn für den Transport des Proteins in den Zellkern verantwortlich ist und wie dieser reguliert wird, ist zurzeit noch weitgehend unklar. Es wurden verschiedene *nuclear localization signals* (NLSs) am amino-terminalen Ende bzw. in der *armadillo repeat*-Domäne entdeckt, über die ein Import von p120ctn in den Zellkern potentiell ermöglicht wird (Mariner *et al.*, 2001; Roczniak-Ferguson und Reynolds, 2003; Kelly *et al.*, 2004). Darüber hinaus konnte gezeigt werden, dass p120ctn-Isoformen, die das auf Exon B, nahe dem carboxy-terminalen Ende von p120ctn, kodierte funktionelle *nuclear export signal* (NES) besitzen, aus dem Zellkern heraus ins Zytoplasma und an die Membran translozieren können (van Hengel *et al.*, 1999). Im Hinblick auf eine mögliche nukleäre Funktion von p120ctn konnte gezeigt werden, dass p120ctn mit dem Transkriptionsrepressor Kaiso interagiert (Daniel und Reynolds, 1999). Kaiso gehört zur Familie der *pox virus* und *zinc finger* (POZ/ZF) Transkriptionsfaktoren. Da POZ/ZF-Proteine wie Kaiso kein *nuclear localization signal* besitzen, ermöglicht p120ctn durch die Bindung an Kaiso sowohl dessen Import in den Zellkern als auch den Export aus dem Zellkern. Des Weiteren reguliert p120ctn die Bindung von Kaiso an DNA und dessen Aktivität als Transkriptionsrepressor (Daniel und Reynolds, 1999; Daniel, 2007; Ogden *et al.*, 2008). Für einige p120ctn-Isoformen konnte eine gewebe- bzw. zelltypspezifische Expression festgestellt werden, die auf funktionelle Unterschiede der p120ctn-Isoformen schließen lässt (Mo und Reynolds, 1996; Aho *et al.*, 1999). Die p120ctn-Isoform 1, die am amino-terminalen Ende eine *coiled-coil*-Domäne besitzt, ist bevorzugt in motilen Zellen wie Fibroblasten und Makrophagen, aber auch in Melanozyten zu finden. Die p120ctn-Isoformen 2 und 3, die diese Domäne nicht aufweisen, werden bevorzugt in sessilen Zelltypen, wie Epithelzellen exprimiert (Mo und Reynolds, 1996). Die kurze Isoform 4A wird überwiegend in Keratinozyten und Melanozyten exprimiert (Anastasiadis und Reynolds, 2000; Montonen *et al.*, 2001). Über RT-PCR-Analyse konnten Aho und Mitarbeiter zeigen, dass Isoformen, die das Exon B enthalten, in Geweben von Darm, Prostata und Pankreas, jedoch nicht in Tumorgeweben dieser Organe zu finden sind (Aho *et al.*, 2002).

1.3.3 Expression und Funktion von p120ctn in Tumoren

Die Entstehung eines metastastasierenden, invasiven Phänotyps von Karzinomzellen ist häufig durch den Verlust der Zell-Zell-Adhäsion und durch das Fehlen von E-Cadherin und E-Cadherin-assoziierten Proteinen gekennzeichnet. Das Fehlen oder die verminderte bzw. veränderte Expression von p120ctn ist in den meisten Karzinomen beim Menschen zu beobachten und korreliert durch die damit verbundene Destabilisierung des E-Cadherin-Catenin-Komplexes mit einer reduzierten Zell-Zell-Adhäsion (Reynolds und Carnahan, 2004). Invasive Karzinomzellen zeigen eine Veränderung vom epithelialen zum mesenchymalen Phänotyp. Dieser Vorgang wird als EMT *(epithelial to mesenchymal transition)* bezeichnet. Der Wechsel im Zelltyp ist charakterisiert durch den Verlust der Zellpolarität und der Zell-Zell-Adhäsion, der Reduktion der E-Cadherin-Expression und einer erhöhten Zellmotilität (Thiery, 2002). Bei der Veränderung der Zellen vom epithelialen zum mesenchymalen Typ während der Tumorprogression ist p120ctn aufgrund des Verlustes von E-Cadherin vermehrt im Zytoplasma lokalisiert. Untersuchungen von E-Cadherin-defizienten Brustkrebszellen konnten eine Lokalisation von p120ctn im Zytoplasma und einen daraus resultierenden invasiven Phänotyp bestätigen (Shibata *et al.*, 2004). Zum gleichen Ergebnis führten Untersuchungen von Darmkarzinomzellen. Auch hier konnte gezeigt werden, dass die Lokalisation von p120ctn im Zytoplasma als Folge der Veränderung der Zellen vom epithelialen zum mesenchymalen Typ mit der Entwicklung von aggressiven Darmkarzinomen einhergeht (Bellovin *et al.*, 2005).

Andere Daten zeigen, dass auch die fehlende Expression von p120ctn bzw. einzelner p120ctn-Isoformen beim Menschen zur Tumorbildung in verschiedenen Geweben beitragen kann (Keirsebilck *et al.*, 1998; Aho *et al.*, 2002; Thoreson und Reynolds, 2002). Untersuchungen von humanen Prostatakarzinomzellen zeigten, dass sich die Expression der p120ctn-Isoformen 1 und 3 in Abhängigkeit der Expression von E- oder N-Cadherin veränderte. In N-Cadherin-positiven Prostatakarzinomzellen wurde vorwiegend die p120ctn-Isoform 1 exprimiert (Tran *et al.*, 1999). In MIA PaCa-2 Pankreaskarzinomzellen konnte die Interaktion von N-Cadherin mit einer langen p120ctn-Isoform von 120 kDa gezeigt werden. Für E-Cadherin konnte gezeigt werden, dass es bevorzugt eine kürzere p120ctn-Isoform von 95 kDa bindet, was mit einer stärkeren Zell-Zell-Adhäsion korrelierte (Seidel *et al.*, 2004).

1.4 Das Pankreaskarzinom

Die Untersuchung von Pankreaskarzinomzellen zeigte eine Erhöhung der mRNA-Expression und des Proteingehalts von p120ctn, wobei sich die Lokalisation hauptsächlich auf das Zytoplasma beschränkte (Mayerle *et al.*, 2003). Menke und Mitarbeiter konnten zeigen, dass sich die p120ctn-Isoformen, die an E- und N-Cadherin binden, in Pankreaskarzinomzellen unterscheiden und dadurch die Zell-Zell-Adhäsion beeinflusst wird (Seidel *et al.*, 2004). Das duktale Adenokarzinom des Pankreas ist die vierthäufigste Krebsart beim Menschen. Die mittlere Überlebenszeit liegt bei weniger als 6 Monaten und die 5-Jahres-Überlebensrate bei nur 3 %, was durch eine fehlende effektive Therapie bestimmt wird (Bardeesy und DePinho, 2002; Jemal *et al.*, 2008). Das Pankreaskarzinom ist durch invasives Wachstum, rasche Progression und weitgehende Therapieresistenz charakterisiert (Li *et al.*, 2004). Die Diagnose erfolgt in der Regel erst in fortgeschrittenem Stadium, da spezifische Frühsymptome fehlen und bislang keine Verfahren zur routinemäßigen Früherkennung existieren. Die einzige Möglichkeit ist die operative Entfernung des Tumors. Durch das invasive Einwachsen des Tumors in umliegendes Gewebe erfolgt die Resektion des Tumors meistens nicht vollständig oder ist bei 15-20 % der Patienten nicht möglich. Nach einer Resektion liegt die 5-Jahres-Überlebensrate bei 20 % (Bardeesy und DePinho, 2002). Eine Chemotherapie mit 5-Fluorouracil oder Gemcitabin kombiniert mit einer Bestrahlungstherapie führen zur Verbesserung der Lebensqualität der Patienten, hat jedoch nur einen begrenzten positiven Effekt auf die Überlebensrate. Einer der Gründe der geringen Überlebensrate beim duktalen Adenokarzinom liegt an der Tatsache, dass sich schon im frühen Stadium der Tumorentwicklung, bevor klinische Symptome auftreten oder der Tumor diagnostiziert werden kann, Mikrometastasen bilden (Li *et al.*, 2004). Eine genetische Prädisposition ist nur in etwa 10 % der Pankreaskarzinome gegeben. Erbliche Keimbahnmutationen der Gene *p16*, *BRCA2*, *LKB1*, *MLH1* und *PRSS1* werden mit einem erhöhten Risiko, an einem Pankreasadenokarzinom zu erkranken, assoziiert (Lowenfels *et al.*, 1997; Jaffe *et al.*, 2002). In vielen Tumoren konnten chromosomale Instabilität und eine hohe Rate an Translokationen und Deletionen festgestellt werden. Aktivierende Mutationen im K-*ras*-Gen treten bei 95 % der untersuchten Pankreasadenokarzinoma auf. Weitere Mutationen konnten im Tumorsuppressorgen *p53* und dem Gen *smad4*, kodierend für den Transkriptionsregulator der TGFβ-Signalkaskade, mit einer Rate von etwa 50 % nachgewiesen werden (Hilgers und Kern, 1999; Bardeesy und DePinho, 2002; Jaffee *et al*., 2002). Darüber hinaus konnten Jones und Mitarbeiter eine Anzahl weiterer mutierte Gene in Pankreaskarzinomen identifizieren, die an wichtigen Signalwegen (z. B. Wnt/Notch-Signalweg, Apoptosis) beteiligt sind (Jones *et al.*,

2008). Generell ist zu beobachten, dass die Mutationen in Abhängigkeit der Tumorprogression auftreten. Hruban *et al.* haben aufgrund von morphologischen, klinischen und genetischen Untersuchungen ein Progressionsmodell erstellt, dass die Entstehung des duktalen Adenokarzinoms des Pankreas charakterisiert (Hruban *et al.*, 2000a; Hruban *et al.*, 2000b). Es kommt zu einer schrittweisen Veränderung der normalen Pankreasepithelzellen zu einem malignen, infiltrativen Tumor. Diese Entwicklung lässt sich mit Hilfe von vier histologisch definierten Stadien, den *pancreatic intraepithelial neoplasias* (PanIN-1A, 1B, 2 und 3) charakterisieren. Genetische Veränderungen der Gene K-*ras*, *HER-2/neu*, *p16*, *BRCA2*, *DPC4* und *p53* wurden in einen zeitlichen Kontext gestellt und können den einzelnen Stadien zugeordnet werden. In den frühen Stadien PanIN-1A und PanIN-1B kommt es zu aktivierenden Mutationen des K-*ras*-Gens (Hruban *et al.*, 1993; Caldas *et al.*, 1994) und zur Überexpression des EGF-Rezeptors HER-2/neu (Day *et al.*, 1996). Im Stadium PanIN-2 konnte häufig eine Inaktivierung des Tumorsuppressorgens *p16* beobachtet werden (Wilentz *et al.*, 1998). Zusätzlich konnte im fortgeschrittenen Stadium PanIN-3 (*carcinomas in situ*) eine Inaktivierung weiterer Tumorsuppressorgene, nämlich *p53*, *DPC4* und *BRCA2* (DiGiuseppe *et al.*, 1994; Wilentz *et al.*, 2000; Goggins *et al.*, 2000) als charakteristische Veränderung nachgewiesen werden. Neben diesen genetischen Veränderungen ist die Entwicklung eines invasiven und metastasierenden Adenokarzinom durch ein verändertes Migrationsverhalten der Zellen charakterisiert, das durch Veränderungen im Aktin-Zytoskelett und in der Zelladhäsion bedingt wird. Rho-GTPasen nehmen bei diesen Veränderungen in der Zelle eine regulatorische Funktion ein (Ridley, 2004). Auf mRNA- und Proteinebene konnte eine erhöhte Expression für RhoC bei Pankreaskarzinomen gezeigt werden. Die erhöhte Expression von RhoC korreliert bei den untersuchten Karzinomen mit der vermehrten Entstehung von Metastasen (Suwa *et al.*, 1998; Clark *et al.*, 2000; Kleer *et al.*, 2002). Für Pankreaskarzinomzellen konnten Suwa und Mitarbeiter zeigen, dass die mRNA-Expression von RhoC in metastasierenden Pankreaskarzinomen signifikant höher war, als in nicht metastasierenden Pankreaskarzinomen. Außerdem konnten Sie einen Zusammenhang zwischen der Überexpression von RhoC und der Ausbildung eines duktalen Adenokarzinoms des Pankreas herstellen (Suwa *et al.*, 1998). Das Fehlen von E-Cadherin wird assoziiert mit einem invasiven Phänotyp von Pankreaskarzinomen. Die reduzierte Expression von E-Cadherin-Molekülen in den Karzinomzellen ist ein wichtiger Aspekt für die Entwicklung eines metastasierenden Pankreaskarzinom (Joo et al., 2002).

1.5 Zielsetzung der Arbeit

In dieser Arbeit sollten mittels biochemischer Methoden spezifische Interaktionspartner der Rho-GTPasen RhoA und RhoC in humanen PANC-1 Pankreaskarzinomzellen identifiziert und charakterisiert werden. Ein erstes Ziel stellte die Untersuchung der Expression der bekannten Interaktionspartner von Rho-GTPasen, RhoGDIα und RhoGDIβ und deren Interaktion mit den Rho-GTPasen RhoA und RhoC in PANC-1-Zellen dar. Ein weiteres Ziel der Arbeit bestand darin, die Expression von p120ctn in PANC-1-Zellen zu untersuchen. Des Weiteren sollte die Interaktion von RhoA und RhoC mit p120ctn mittels *in vitro*-Bindungsexperimenten mit rekombinanten GST-Rho-Fusionsproteinen und durch Co-Immunpräzipitation analysiert werden. Da die beiden Rho-GTPasen RhoA und RhoC auf Aminosäureebene eine Sequenzidentität von 92 % aufweisen, sollten mögliche Unterschiede in der Bindung an Interaktionspartner charakterisiert werden. Abschließend sollte der Einfluss der Expression von p120ctn auf die Aktivität von RhoA und RhoC in PANC-1-Zellen mittels Rho-TRBD-Bindungsexperimenten untersucht werden.

2. Material

2.1. Chemikalien

Acrylamidlösung 30 % (m/V)	Roth, Karlsruhe
Agar Agar *high gel strength*	Serva-Bioproducts, Heidelberg
Agarose, *molecular biology grade*	Sigma, Taufkirchen
Ammoniumpersulfat (APS)	Serva-Bioproducts, Heidelberg
Ampizillin, Natriumsalz	Sigma, Taufkirchen
Aprotinin (Trasylol® 0,5)	Bayer, Leverkusen
Bacto™ Trypton	Becton-Dickinson, Heidelberg
BCA™ *Protein Assay Reagent* A	Pierce, St. Augustin
Bisacrylamidlösung 2 % (m/V)	Roth, Karlsruhe
5-Brom-4-chlor-3-indolylphosphat-Toluidinsalz (BCIP)	AppliChem, Darmstadt
Bromphenolblau	Serva-Bioproducts, Heidelberg
Coomassie® Brilliant Blue R 250	Serva-Bioproducts, Heidelberg
Dinatriumhydrogenphosphat-Dihydrat	Sigma, Taufkirchen
Dimethylformamid (DMF)	VWR, Darmstadt
Dimethylsulfoxid (DMSO)	VWR, Darmstadt
Dithiothreitol (DTT)	Serva-Bioproducts, Heidelberg
DMRIE-C *Reagent*	Invitrogen, Groningen, Niederlande
Dulbeccos's Modified Eagle Medium (DMEM)	Invitrogen, Groningen, Niederlande
ECL Advance Blocking Reagent	Amersham Biosciences, Freiburg
ECL Advance Western Blotting Detection Kit	Amersham Biosciences, Freiburg
ECL Western Blotting Detection Reagent	Amersham Biosciences, Freiburg
Essigsäure	Fluka, Neu-Ulm
Ethanol, p.a.	Fluka, Neu-Ulm
Ethidiumbromid	Genaxis Biotechnology, Spechbach
Ethylendiamintetraessigsäure-Dinatriumsalz (EDTA)	VWR, Darmstadt
Ethylenglykol-bis(2-aminoethylether)-N,N,N',N'-Tetraessigsäure (EGTA)	Sigma, Taufkirchen
fötales Kälberserum (FCS)	Invitrogen, Groningen, Niederlande

Guanosin-5’-diphosphat (GDP)	Roche Diagnostics, Mannheim
Geniticin (G-418-Sulfat)	PAA Laboratories, Linz, Österreich
Glukose	Roth, Karlsruhe
Glutathion-Sepharose 4B	Amersham Biosciences, Freiburg
Glyzerin	Roth, Karlsruhe
Glyzin	AppliChem, Darmstadt
Guanosin-5’-triphosphat (GTP)	Roche Diagnostics, Mannheim
Guanosin-5'-(3-*O*-thio)-triphosphat (GTP[S])	Roche Diagnostics, Mannheim
N-2-Hydroxyethylpiperazin-N’-2-ethansulfonsäure (HEPES)	Roth, Karlsruhe
IgG_{2a} (Maus)	DakoCytomation, Hamburg
Isobutanol	VWR, Darmstadt
Isopropanol	VWR, Darmstadt
Isopropyl-β-D-thiogalaktopyranosid (IPTG)	Roth, Karlsruhe
Kalziumchlorid	Sigma, Taufkirchen
Kaliumchlorid	VWR, Darmstadt
Kaliumdihydrogenphosphat	Roth, Karlsruhe
Kanamyzin	Serva-Bioproducts, Heidelberg
Kupfer(II)-sulfat	Sigma, Taufkirchen
Leupeptin	Serva-Bioproducts, Heidelberg
L-Glutamin (200 mM)	PAA Laboratories, Linz, Österreich
L-Glutathion, reduziert	Sigma, Taufkirchen
Lysozym	Sigma, Taufkirchen
Magermilchpulver	Fluka, Neu-Ulm
Magnesiumchlorid	Roth, Karlsruhe
Magnesiumsulfat	VWR, Darmstadt
Methanol	VWR, Darmstadt
Morpholinoethansulfonsäure (MES)	Roth, Karlsruhe
Natriumazetat	AppliChem, Darmstadt
Natriumkarbonat	VWR, Darmstadt
Natriumchlorid	AppliChem, Darmstadt
Natrium-Deoxycholat	Serva-Bioproducts, Heidelberg
Natriumdodecylsulfat (SDS)	Serva-Bioproducts, Heidelberg
Natriumhydroxid	AppliChem, Darmstadt

Natriumthiosulfat-Pentahydrat	Roth, Karlsruhe
Nicotinamidadenindinukleotid (NAD)	Roche Diagnostics, Mannheim
4-Nitroblau-Tetrazoliumchlorid (NBT)	AppliChem, Darmstadt
NZ-Amine	Sigma, Taufkirchen
OptiMEM I	Invitrogen, Groningen, Niederlande
Penicillin/Streptomycin-Lösung (10 mg/ml)	PAA Laboratories, Linz, Österreich
Pepstatin A	Serva-Bioproducts, Heidelberg
Phenylmethylsulfonylfluorid (PMSF)	Sigma, Taufkirchen
Ponceau S	Sigma, Taufkirchen
Protein A-Agarose	Roche Diagnostics, Mannheim
Protein G-Agarose	Roche Diagnostics, Mannheim
Rinderserumalbumin (BSA, Fraktion V)	Serva-Bioproducts, Heidelberg
RTU 60 Entwickler/Fixierer	Adefo-Chemie, Dietzenbach
Saccharose	Roth, Karlsruhe
Salzsäure 37% (m/V)	Fluka, Neu-Ulm
Scintillation cocktail Quicksafe A	Zinsser Analytic, Frankfurt
N,N,N',N'-Tetramethylethylendiamin (TEMED)	AppliChem, Darmstadt
Trichloressigsäure (TCA)	Serva-Bioproducts, Heidelberg
Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan (Tris)	USB, Cleveland, Ohio, USA
Triton X-100	Sigma, Taufkirchen
Trypsin/EDTA-Lösung (0,25 %)	PAA Laboratories, Linz, Österreich
Trypsin-Inhibitor (aus Sojabohnen)	Fluka, Neu-Ulm
Xylene Cyanol FF	Sigma, Taufkirchen
Yeast extract Servabacter (Hefe-Extrakt)	Serva-Bioproducts, Heidelberg

Alle weiteren verwendeten und hier nicht angeführten Chemikalien und Lösungsmittel wurden in p.a.-Qualität von den Firmen VWR, Darmstadt, Roth, Karlsruhe, oder Sigma, Taufkirchen, bezogen.

2.2 Verbrauchsmaterialien

Agfa Cronex 5, *medical x-ray film*	Agfa-Gevaert, Mortsel, Belgien
Biosphere-Qualitätsspitzen, steril	Sarstedt, Nümbrecht
Dialyseschlauch Spectra/Por® (Porengrösse 6-8 kDa)	Roth, Karlsruhe
Kanülen Gr. 18 (0,45 x 25 mm)	Braun, Melsungen
Kryoröhrchen (2 ml)	Nunc, Kamstrup, Dänemark
Nitrozelluloserundfilter (0,45 µm, Ø 32 mm)	Advanced Microdevices, Ambala Cantonment, Indien
Mikro-Schraubröhrchen (1,5 ml)	Sarstedt, Nümbrecht
Millex-GS Sterilfilter (0,22 µm)	Millipore Corporation, Bedford, USA
Millex-GS Sterilfilter (0,45 µm)	Millipore Corporation, Bedford, USA
µ-Säulen	Miltenyi-Biotech, Bergisch-Gladbach
Protran® BA85 *Nitrocellulose Transfer Membran*	Schleicher & Schuell, Dassel
Pasteurpipetten	Brand, Wertheim
Petrischalen (Ø 100 mm)	Sarstedt, Nümbrecht
Pipettenspitzen	Greiner bio-one, Frickenhausen
Reaktionsgefäße (1,5 ml)	Sarstedt, Nümbrecht
Reaktionsgefäße (0,5 ml/ 1,5 ml/ 2 ml) *Safelock-Tubes*	Eppendorf, Hamburg
Polyethylengefäße für Flüssigszintillationszählung (6 ml)	Packard BioScience, Groningen/ Niederlande
Polypropylenröhrchen (3,5 ml/ 13 ml/ 15 ml/ 50 ml)	Sarstedt, Nümbrecht
Skalpelle	Aesculap, Tuttlingen
Tuberkulin-Spritzen (1 ml)	Becton-Dickinson, Heidelberg
Ultrazentrifugationsgefäße (1,5 ml)	Beckman, München
Whatman® Papier	Schleicher & Schuell, Dassel
Zellkulturflaschen (150 cm^2)	Renner, Dannstadt
Zellkulturschalen (Ø 100 mm)	Renner, Dannstadt
Zellkulturschalen (Ø 60 mm)	Falcon/Becton-Dickinson, Heidelberg
Zellschaber (30 cm)	Renner, Dannstadt

2.3 Prokaryontische und eukaryontische Zellen

2.3.1 *Escherichia coli* Stämme

Escherichia coli BL21 (DE3)	R&D Systems, Wiesbaden-Nordenstadt
Escherichia coli DH5α	Clontech/TCC Biotechnology, Heidelberg

2.3.2 Eukaryontische Zelllinien

Tabelle 1: Eukaryontische Zelllinien

Zelllinie	Beschreibung	ATCC Nr.
AsPC-1	Humane duktale Pankreaskarzinomzelllinie, bei der eine Punktmutation im Kodon 12 in beiden Allelen des K-*ras*-Gens (GGT→GAT) zu einem Austausch von Glyzin gegen Asparaginsäure und damit zu einem konstitutiv aktiven K-Ras-Protein führt (Aoki *et al*., 1997).	CRL-1682
BxPC-3	Humane Pankreaskarzinomzelllinie, bei der eine Mutation im Kodon 220 des p53-Gens (TAT→TGT) zum Austausch von Tyrosin gegen Glyzin führt, die aber keine K-*ras*-Mutationen aufweist (Giehl *et al*., 2000; Tan *et al*., 1986).	CRL-1687
IMIM PC1	Humane Pankreaskarzinomzelllinie aus einer Lebermetastase eines Pankreasadenokarzinoms mit aktivierender K-*ras*-Mutation (Vilá *et al*., 1995).	Dr. F. X. Real, Barcelona, Spanien
IMIM PC2	Humane Pankreaskarzinomzelllinie (Vilá *et al*., 1995) Eine Punktmutation im Kodon 12 des K-*ras*-Gens (GGT→GAT) führt zu einem konstitutiv-aktiven K-Ras-Protein (Moore *et al*., 2001).	Dr. F. X. Real, Barcelona, Spanien
MiaPaCa-2	Humane Pankreaskarzinomzelllinie epithelialen Ursprunges, die sowohl eine Mutation im *p53*-Gen (Position 248, CGG→TGG), als auch eine Punktmutation in beiden Allelen des K-*ras*-Gens enthält. Letztere führt zu einem Austausch von Glyzin gegen Cystein und hat zur Folge, dass die Zellen ein konstitutiv aktives K-Ras-Protein exprimieren (Berrozpe *et al*., 1994).	CRL-1420
PANC-1	Humane Pankreaskarzinomzelllinie epithelialer Morphologie (Lieber *et al*., 1975), bei der eine mono-allelische Punktmutation im Kodon 12 des K-*ras*-Gens (GGT→GAT) zum Austausch von Glyzin gegen Asparaginsäure und damit zu einem konstitutiv-aktiven K-Ras-Protein führt (Giehl *et al*., 2000).	CRL-1469

PaTu 8988 s	Humane Pankreaskarzinomzelllinie aus einer Lebermetastase eines Adenokarzinoms des Pankreas mit K-*ras*-Mutation (Elsässer *et al*. 1993a).	Dr. H. F. Kern, Marburg
PaTu 8988 t	Humane Pankreaskarzinomzelllinie aus einer Lebermetastase eines Adenokarzinoms des Pankreas mit K-*ras*-Mutation (Elsässer *et al*. 1993a).	Dr. H. F. Kern, Marburg

ATCC: American Type Culture Collection, Manassas, USA

2.3.3 Stabil exprimierende Zelllinien

Tabelle 2: Stabil exprimierende Zelllinien

Zelllinie	transfiziertes Plasmid
PANC-1/EGFP-21	pEGFP-C3
PANC-1/RhoAwt7	pEGFP-C2/RhoA
PANC-1/RhoCwt3	pEGFP-C1/RhoC

Alle stabil exprimierenden Zelllinien wurden in der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Klaudia Giehl durch Transfektion mit DMRIE-C *Reagent* und anschließender Selektion in Wachstumsmedium mit G418 (1,5 mg/ml) hergestellt (Fensterer *et al*., 2004).

2.4 Plasmide

Tabelle 3: Plasmide

pGEX-2TK	Amersham Biosciences, Freiburg
pGEX-2TK/TRBD	von J. Bos, Utrecht, Niederlande
pGEX-2TK/PAK-CD	von J. Collard, Amsterdam, Niederlande
pGEX-2T/RhoGDIα	von D. Illenberger, Ulm
pGEX-4T1/mp120ctn 1N	von A. Menke, Ulm
pGEX-4T1/hp120ctn 1A	
pGEX-4T1/hp120ctn 2A	
pGEX-4T1/hp120ctn 3A	
pGEX-4T1/hp120ctn 4A	
pCR2.1/hp120ctn 1A	
pCR2.1/hp120ctn 2A	
pCR2.1/hp120ctn 3A	
pCR2.1/hp120ctn 4A	
pEFBOS/hp120ctn 1A	von F. van Roy, Gent, Belgien
pEGFP-C2	Clontech/TCC Biotechnology, Heidelberg

pEGFP-C2/p120ctn 1A	von A. Menke, Ulm
pEGFP-C2/p120ctn 2A	von A. Menke, Ulm
pEGFP-C2/p120ctn 3A	von A. Menke, Ulm
pEGFP-C2/p120ctn 4A	von A. Menke, Ulm
RhoA	
pGEX-2T/RhoA	von D. Illenberger, Ulm
pGEX-2T/RhoA (V14)	von K. Giehl, Ulm
pGEX-2T/RhoA (N19)	von K. Giehl, Ulm
pGEX-2T/RhoA (G152S)	
pEGFP-C2/RhoA	von K. Giehl, Ulm
RhoC	
pGEX-2TK/RhoC	von K. Giehl, Ulm
pGEX-2TK/RhoC (V14)	von K. Giehl, Ulm
pGEX-2TK/RhoC (N19)	von K. Giehl, Ulm
pGEX-2TK/RhoC/A	von K. Giehl, Ulm
pGEX-2TK/RhoC (I43V)	
pGEX-2TK/RhoC (Q123N)	
pGEX-2TK/RhoC (R140K)	
pGEX-2TK/RhoC (S141P)	
pGEX-2TK/RhoC (S152G)	
pGEX-2TK/RhoC (L157M)	
pGEX-2TK/RhoC (E165D)	
pGEX-2TK/RhoC/A (S152G)	
pEGFP-C1/RhoC	von K. Giehl, Ulm

2.5 Enzyme und molekularbiologische *Kits*

Alkalische Phosphatase	Roche Diagnostics, Mannheim
Dephosphorylierungspuffer (10 x)	Roche Diagnostics, Mannheim
µMACS™ *anti-GFP Epitope Tagged Protein Isolation Kit*	Miltenyi-Biotec, Bergisch-Gladbach
NucleoSpin® *Extraction Kit*	Macherey-Nagel, Düren
NucleoSpin® *Plasmid Kit*	Macherey-Nagel, Düren
QuikChange™ *Site-Directed Mutagenesis Kit*	Stratagene, Heidelberg
Restriktionsenzyme	Fermentas, St. Leon-Rot
Restriktionspuffer	Fermentas, St. Leon-Rot
StrataPrep® EF *Plasmid Midiprep Kit*	Stratagene, Heidelberg
T4-DNA-Ligase	New England Biolabs, Frankfurt/Main

2.6 Antikörper

2.6.1 Primäre Antikörper

Tabelle 4: Primäre Antikörper

anti-β-Aktin Verdünnung 1:8000 in (2)	monoklonal, Maus	Sigma, Taufkirchen Best.-Nr. A 1978
anti-E-Cadherin Verdünnung 1:4000 in (1)	monoklonal, Maus	BD Biosciences, Heidelberg Best.-Nr. C-20820
anti-N-Cadherin Verdünnung 1:2000 in (1)	monoklonal, Maus	BD Biosciences, Heidelberg Best.-Nr. C-70320
anti-α-Catenin Verdünnung 1:5000 in (1)	polyklonal, Kaninchen	Sigma, Taufkirchen Best.-Nr. C2081
anti-β-Catenin Verdünnung 1:2000 in (1)	monoklonal, Maus	BD Biosciences, Heidelberg Best.-Nr. 610154
anti-Caveolin 1 Verdünnung 1:1000 in (1)	monoklonal, Maus	BD Biosciences, Heidelberg Best.-Nr. 610407
anti-GFP Klon 7.1 & 13.1 Verdünnung 1:2000 in (2)	monoklonal, Maus	Roche Diagnostics, Mannheim Best.-Nr. 1814460
anti-GFP (FL) Verdünnung 1:500 in (2)	polyklonal, Kaninchen	Santa Cruz Biotech. Inc., Heidelberg Best.-Nr. sc-8334
anti-GFP für Immunpräzipitation	monoklonal, Maus	BioMol (Rockland), Hamburg Best.-Nr. 600-301-215
anti-GFP-HRP Verdünnung 1:4000 in (1)	monoklonal, Maus	Miltenyi-Biotec, Bergisch-Gladbach Best.-Nr. 130-091-833
anti-GST (Z-5) Verdünnung 1:1000 in (2)	polyklonal, Kaninchen	Santa Cruz Biotech. Inc., Heidelberg Best.-Nr. sc-459
anti-LyGDI (C-20) Verdünnung 1:1000 in (1)	polyklonal, Ziege	Santa Cruz Biotech. Inc., Heidelberg Best.-Nr. sc-6047
anti-p120ctn Verdünnung 1:2000 in (2)	monoklonal, Maus	BD Biosciences, Heidelberg Best.-Nr. 610134
anti-p120ctn (S-19) Verdünnung 1:2000 in (2)	polyklonal, Kaninchen	Santa Cruz Biotech. Inc., Heidelberg Best.-Nr. sc-1101
anti-RhoA (26C4) Verdünnung 1:500 in (2)	monoklonal, Maus	Santa Cruz Biotech. Inc., Heidelberg Best.-Nr. sc-418
anti-RhoGDIα (K-21) Verdünnung 1:1000 in (1)	polyklonal, Kaninchen	Santa Cruz Biotech. Inc., Heidelberg Best.-Nr. sc-359
anti-RhoGDIγ (N-19) Verdünnung 1:500 in (2)	polyklonal, Ziege	Santa Cruz Biotech. Inc., Heidelberg Best.-Nr. sc-6910

Abkürzung: HRP: *horse-radish peroxidase*; (1): 0,5 % (m/V) Magermilchpulver in TBS
(2): 2 % (m/V) *Blocking*-Reagenz (Amersham Biosciences, Freiburg) in TBS

2.6.2 Sekundäre Antikörper

Tabelle 5: Peroxidase (HRP)-gekoppelte Antikörper

anti-Kaninchen-IgG Verdünnung 1:2000	affinitätsgereinigt aus Ziegen-Antiserum	Sigma, Taufkirchen Best.-Nr. A-6154
anti-Maus-IgG Verdünnung 1:2000	IgG-Fraktion aus Ziegen-Antiserum	Sigma, Taufkirchen Best.-Nr. A-5278
anti-Maus-IgG Verdünnung 1:7000	affinitätsgereinigt aus Ziegen-Antiserum	Pierce, St. Augustin Best-Nr. 31430
anti-Ziegen/Schaf-IgG, Verdünnung 1:15000	gereinigt aus GT-34 Maus-Hybridoma-Zellen	Sigma, Taufkirchen Best.-Nr. A 9452

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

Tabelle 6: Alkalische Phosphatase-gekoppelte Antikörper

anti-Maus-IgG Verdünnung 1:1000	affinitätsgereinigt aus Ziegen-Antiserum	Sigma, Taufkirchen Best.-Nr. A-3562
anti-Kaninchen-IgG Verdünnung 1:1000	affinitätsgereinigt aus Maus-Antiserum	Jackson Immuno Research Laboratories Inc., Baltimore, USA Best.-Nr. 211-055-109

Abkürzung: IgG: Immunglobulin G

2.7 Molekulargewichtsmarker für die SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)

Tabelle 7: *Low molecular weight marker*, SDS-7, Sigma, Taufkirchen

Protein	Molekulargewicht (kDa)
Rinderserumalbumin	66
Ovalbumin	45
Glyzerinaldehyd-3-P-Dehydrogenase	36
Carboanhydrase, Rindererythrozyten	29
Trypsinogen, Rinderpankreas	24
Trypsininhibitor, Sojabohnen	20
α-Lactalbumin, Rind	14,2

Tabelle 8: *High molecular weight marker*, SDS-6H, Sigma, Taufkirchen

Protein	Molekulargewicht (kDa)
Myosin, Kaninchenmuskel	205
β-Galaktosidase, *E. coli*	116
Phosphorylase B, Kaninchenmuskel	96
Rinderserumalbumin	66
Ovalbumin	45
Carboanhydrase, Rindererythrozyten	29

2.8 Marker für Agarose-Gelelektrophorese

Lambda DNA/*Eco*RI+*Hind*III Marker #3, Fermentas, St. Leon-Rot

Fragmentgrößen in Basenpaaren (bp): 21226, 5148, 4973, 4268, 3530, 2027, 1904, 1584, 1375, 947, 831, 564, 125

2.9 Radioaktiv-markierte Nukleotide

[^{35}S]GTP[S] (1250 Ci/mmol) Du Pont NEN, Köln

2.10 Oligonukleotide

Tabelle 9: Sequenzierprimer

Primer	Sequenz	Länge
pGEX 5´-Primer	5´GGGCTGGCAAGCCACGTTTGGTG3´	23 bp
pGEX 3´-Primer	5´CCGGGAGCTGCATGTGTCAGAGG3´	23 bp
EGFP-C 5´-Primer	5´CATGGTCCTGCTGGAGTTCGTG3´	22 bp
EGFP-C 3´-Primer	5´TAACAACAACAATTGCATTC3´	20 bp

Primer von: Thermo Electron, Ulm

Tabelle 10: Primer für PCR der humanen p120ctn Isoformen 1A, 2A, 3A und 4A

Primer	Sequenz	Länge	*template*
p120ctn-Iso1 5'Primer	5´CCCCTTGAATTCATGGACGACTCAG3´	25 bp	pEFBOS/hp120ctn 1A
p120ctn-Iso2 5'Primer	5´CAACGAATTCATGGCCAACGGCAC3´	24 bp	pEFBOS/hp120ctn 1A
p120ctn-Iso3 5'Primer	5´CATCGAATTCATGCAGGAGCCGG3´	23 bp	pEFBOS/hp120ctn 1A
p120ctn-Iso4 5'Primer	5´GCTATGAATTCATGATTGGTGAGGAGGTG3´	29 bp	pEFBOS/hp120ctn 1A
p120ctn-Stop 3'Primer	5´GGAACGGAGATAGAATTCCTAAATCTTCTG3´	30 bp	pEFBOS/hp120ctn 1A

Primer von: Thermo Electron, Ulm

Tabelle 11: Primer für *in vitro* DNA-Mutagenese

Primer	Sequenz	Länge
RhoC(I43V)-5´Primer	5´CTACTGTCTTTGAGAACTATGTGGCGGACATTGAGGTGGACG3´	42 bp
RhoC(I43V)-3´Primer	5´CGTCCACCTCAATGTCCGCCACATAGTTCTCAAAGACAGTAG3´	42 bp
RhoC(Q123N)-5´Primer	5´ATAAGAAGGACCTGAGGAATGACGAGCACACCAGGAG3´	37 bp
RhoC(Q123N)-3´Primer	5´CTCCTGGTGTGCTCGTCATTCCTCAGGTCCTTCTTAT3´	37 bp
RhoC(R140K)-5´Primer	5´GAAGCAGGAGCCCGTTAAGTCTGAGGAAGGCCGGG3´	35 bp
RhoC(R140K)-3´Primer	5´CCCGGCCTTCCTCAGACTTAACGGGCTCCTGCTTC3´	35 bp
RhoC(S141P)-5´Primer	5´CAGGAGCCCGTTCGGCCTGAGGAAGGCCGGG3´	31 bp
RhoC(S141P)-3´Primer	5´CCCGGCCTTCCTCAGGCCGAACGGGCTCCTG3´	31 bp
RhoC(S152G)-5´Primer	5´CATGGCGAACCGGATCGGCGCCTTTGGCTACCTTG3´	35 bp
RhoC(S152G)-3´Primer	5´CAAGGTAGCCAAAGGCGCCGATCCGGTTCGCCATG3´	35 bp
RhoC(L157M)-5´Primer	5´CAGTGCCTTTGGCTACATGGAGTGCTCAGCCAAGAC3´	36 bp
RhoC(L157M)-3´Primer	5´GTCTTGGCTGAGCACTCCATGTAGCCAAAGGCACTG3´	36 bp
RhoC(E165D)-5´Primer	5´GCCAAGACCAAGGATGGAGTGCGGGAGGTG3´	30 bp
RhoC(E165D)-3´Primer	5´CACCTCCCGCACTCCATCCTTGGTCTTGGC3´	30 bp
RhoA(G152S) 5´Primer	5´GATATGGCAAACAGGATTAGCGCTTTTGGGTACATGG3´	37 bp
RhoA(G152S) 3´Primer	5´CCATGTACCCAAAAGCGCTAATCCTGTTTGCCATATC3´	37 bp

Primer von: Thermo Electron, Ulm

2.10.1 siRNA

p120ctn-siRNA I (20 nm)	Qiagen, Hilden
p120ctn-siRNA II (20 nm)	Qiagen, Hilden
SignalSilence® *Control* siRNA (*Fluorescein Conjugate*) (10 µM)	Cell Signaling, Frankfurt/Main

2.11 Medien und Standardlösungen

2.11.1 Bakterienkulturmedium

Luria-Bertani-Flüssigmedium (LB-Medium):

1,0 % (m/V) Bacto™ Trypton
0,5 % (m/V) Hefeextrakt
1,0 % (m/V) NaCl
pH 7,5
in dH_2O

LB-Agar: 1,5 % (m/V) Agar in LB-Medium

2.11.2 Zellkulturmedium (Wachstumsmedium)

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

10 % (V/V) fötales Kälberserum (FCS)
1 % (V/V) Penicillin/Streptomycin (10000 U/ml und 10 mg/ml)
1 % (V/V) L-Glutamin (200 mM)

Stabil exprimierende PANC-1-Zellen wurden in DMEM (*high glucose*; 4,5 g/l*)* mit folgenden Zusätzen kultiviert:

10 % (V/V) fötales Kälberserum (FCS)
1,5 mg/ml Geniticin (G418-Sulfat)
1 % (V/V) Penicillin/Streptomycin (10000 U/ml und 10 mg/ml)
1 % (V/V) L-Glutamin (200 mM)

Alle Medienzusätze wurden jeweils vor Gebrauch durch einen Sterilfilter (0,22 µm; Millipore Corporation, Bedford,USA) filtriert.

2.11.3 Standardlösungen

1 x CMF-PBS: 140 mM NaCl
2,6 mM KCl
8 mM Na_2HPO_4 x 2 H_2O
1,5 mM KH_2PO_4
pH 7,2

1 x TBS: 50 mM Tris/HCl, pH 7,5
150 mM NaCl

Die Lösungen wurden vor Gebrauch autoklaviert.

2.12 Geräte

Axiovert-25 Mikroskop	Carl Zeiss Jena GmbH, Jena
Certomat BS-1	Braun, Melsungen
CO_2-Inkubator, Typ CB 210	WTB Binder Labortechnik, Tuttlingen
Concentrator 5301 (*speed vac*)	Eppendorf, Hamburg
DNA-Photometer *GeneQuant pro*	Amersham Biosciences, Freiburg
EGFP-Filter F41/014 für Olympus-Mikroskop	AHF-Analysentechnik, Tübingen
Vertikal-Elektrophoresekammer 10 x 8 cm	Sigma, Taufkirchen
Vertikal-Elektrophoresekammer 14 x 12,5 cm	Eigenbau, Werkstatt Universität Ulm
Flüssigszintillationszähler Tri-Carb 2200 CA	Packard, Dreieich
Heraeus Sepatech Megafuge 1.0	Kendro, Hanau
Horizontal-Gelkammer	MBT-Brand, Heidelberg
Immunoblot-Transfer-Kammer	Renner GmbH, Darmstadt
Inverses Fluoreszenzmikroskop IX 70	Olympus, Hamburg
J2-HS Zentrifuge; Rotoren JA10, JA20	Beckman Instruments, München
Miniblotkammer B 2157	Sigma, Taufkirchen
Minifuge GL	Kendro, Hanau

MultiCycler PTC 200	Biozym Diagnostik, Hess. Oldendorf
Optima TLX Ultrazentrifuge; Rotor TLA.45	Beckman Instruments, München
Sicherheitswerkbank	Kendro, Hanau
Sonifier® B-12	Branson Sonic Power Company, Danbury, Conneticut/ USA
Sorvall Ultrazentrifuge; Rotor SW41	Kendro, Hanau
Tischzentrifuge 5417-C	Eppendorf, Hamburg
Überkopf-Rotor REAX 2	Heidolph, Schwabach

2.13 Software

AnalySIS 3.2 Imaging System	Soft Imaging System, Münster
GraphPad Prism Version 3.0 32 bit version for Windows 95	GraphPad Software Inc., San Diego, USA
ImageQuant 5.0	Molecular Dynamics (GE Healthcare), Freiburg
Micrografx Designer 9.0	Micrografx Inc., München
Micrografx Picture Publisher 9.0	Micrografx Inc., München

3. Methoden

3.1 Mikrobiologische Methoden

3.1.1 Herstellung von Luria-Bertani-Flüssigmedium (LB-Medium)

Die *Escherichia coli*-Stämme DH5α und BL21(DE3) wurden in Luria-Bertani (LB)-Medium kultiviert. Das Medium wurde durch Autoklavieren sterilisiert. Zur Herstellung von Agarplatten wurde LB-Agar-Medium (LB-Medium mit 1,5 % (m/V) Agar) hergestellt. Das durch Autoklavieren sterilisierte LB-Agar-Medium wurde auf Handwärme abgekühlt und mit entsprechendem Antibiotikum (siehe Kapitel 3.1.2) versetzt. Anschließend wurden 20 ml Medium in sterile Petrischalen (100 mm) gegossen. Diese wurden nach dem Erstarren des Agars bei 4 °C gelagert.

LB-Medium: 1,0 % (m/V) Bacto™ Trypton
0,5 % (m/V) Hefeextrakt
1,0 % (m/V) NaCl
pH 7,5
in dH_2O

LB-Agar: 1,5 % (m/V) Agar in LB-Medium

3.1.2 Antibotika zur Selektion transformierter Bakterien

Durch Auflösen des als Natriumsalz in Pulverform vorliegenden Antibiotikums Ampizillin in ddH_2O wurde eine Stocklösung von 75 mg/ml Ampizillin steril hergestellt. Das Antibiotikum Kanamyzin wurde ebenso in ddH_2O gelöst und eine Stocklösung von 25 mg/ml steril hergestellt. Die Stocklösungen wurden aliquotiert und bei -20 °C gelagert. Für die Selektion transformierter Bakterien wurden Ampizillin bzw. Kanamycin in einer Verdünnung von 1:1000 dem LB-Medium zugesetzt.

3.1.3 Herstellung kompetenter Bakterien

Eine Einzelkolonie des Bakterienstammes *Escherichia coli* BL21(DE3) oder DH5α wurde mit Hilfe einer sterilen Pipettenspitze in 3 ml LB-Medium gegeben und über Nacht bei 37 °C und 200 Upm inkubiert. Mit dieser Vorkultur wurden 100 ml LB-Medium mit einer optischen Dichte bei 600 nm (OD_{600nm}) von 0,2 angeimpft und die Bakterienkultur bei 37 °C und 200 Upm bis zu einer OD_{600nm} von 0,6 inkubiert. Die Bakterien wurden anschließend bei 2000 x g für 10 min bei 4 °C abzentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das Pellet in 25 ml eiskalter, steriler 100 mM $CaCl_2$-Lösung resuspendiert. Nach Inkubation der Bakterien für 1 h auf Eis wurde der Ansatz erneut bei 2000 x g für 10 min bei 4 °C zentrifugiert. Das Pellet wurde in 5 ml eiskalter, steriler 100 mM $CaCl_2$-Lösung mit 30 % (V/V) Glyzerin resuspendiert. Die nun kompetenten, also zur Aufnahme von Plasmid-DNA bereiten Bakterien, wurden in Portionen zu 600 µl aliquotiert, in einem Ethanol-Trockeneisbad schock gefroren und anschließend bei -80 °C gelagert.

Lösungen: 100 mM $CaCl_2$
100 mM $CaCl_2$ und 30 % (V/V) Glyzerin

3.1.4 Transformation kompetenter Bakterien

Für die Transformation wurden 200 µl kompetente Bakterien der Stämme *Escherichia coli* BL21(DE3) oder DH5α auf Eis aufgetaut und mit 0,2-0,4 µg Plasmid-DNA und 100 µl TCM-Puffer (4 °C) versetzt. Der Ansatz wurde für 30 min auf Eis inkubiert. Es folgte ein Hitzeschock für 3 min bei 42 °C. Anschließend wurde der Ansatz für 1 min auf Eis inkubiert, um die Aufnahme der Plasmid-DNA in die Bakterien zu ermöglichen. Nach Zugabe von 700 µl LB-Medium (Raumtemperatur) wurden die Bakterien für 45 min bei 37 °C bei 200 Upm inkubiert. Aus diesem Ansatz wurden anschließend 100-400 µl mit einem Drygalsky-Spatel auf Antibiotikum-haltigen LB-Platten ausgestrichen. Das verwendete Antibiotikum richtete sich nach der Resistenz der transformierten Plasmide. Die LB-Platten wurden über Nacht bei 37 °C in einem Brutschrank inkubiert.

TCM-Puffer: 10 mM Tris/HCl, pH 7,5
10 mM $CaCl_2$
10 mM $MgCl_2$

3.1.5 Gefrierkulturen von transformierten Bakterien

Um für eine spätere Plasmid-Präparation wieder auf einen bestimmten Bakterienklon zurückgreifen zu können, wurden Gefrierkulturen der Bakterienklone angelegt. Hierzu wurde 1 ml einer Über-Nacht-Kultur in LB-Medium gewachsenen Bakterien-Suspension mit 200 µl Glyzerin (100 % V/V) versetzt, in ein 1,5 ml-Mikro-Schraubröhrchen gegeben und nach sorgfältigem Mischen bei -80 °C eingefroren.

3.2. Molekularbiologische Methoden

3.2.1 Isolierung von Plasmid-DNA

Die Isolierung von DNA-Mengen bis zu 60 µg erfolgte mit Hilfe des NucleoSpin® Plasmid-Kit (Macherey-Nagel, Düren). Aus 1,5 ml Bakterienkultur, die maximal für 16 h bei 37 °C inkubiert worden war, wurde die DNA nach Angaben des Herstellers aus den Zellen isoliert. Für die Isolierung von DNA-Mengen bis zu 350 µg wurden Bakterienzellen aus 200 ml Über-Nacht-Kultur sedimentiert. Die DNA wurde mit Hilfe des StrataPrep® EF Plasmid Midiprep Kit (Stratagene, Heidelberg) entsprechend den Angaben des Herstellers isoliert. Die erhaltene DNA wurde anschließend durch Ethanolfällung (siehe Kapitel 3.2.2) zusätzlich gereinigt.

3.2.2 Ethanolfällung von DNA

Zur Reinigung von Plasmid-DNA wurde die DNA-Lösung mit ddH_2O auf 500 µl aufgefüllt, 50 µl 3 M Natriumazetat (pH 7,0) sowie 1 ml 100 % Ethanol (-20 °C) zugefügt und die DNA über Nacht bei -20 °C oder für 1 h bei -80 °C präzipitiert. Anschließend wurde die DNA durch Zentrifugation für 30 min bei 4 °C und 14000 Upm (Tischzentrifuge 5417-C, Eppendorf, Hamburg) sedimentiert, der Überstand vorsichtig abgenommen und verworfen. Das Pellet wurde mit 500 µl 70 % Ethanol (-20 °C) überschichtet und erneut für 15 min unter den oben genannten Bedingungen zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen, das Pellet in einem Vakuumkonzentrator (Concentrator 5301, Eppendorf, Hamburg) getrocknet und in einem angemessenen Volumen ddH_2O aufgenommen (DNA-Endkonzentration 0,5-1,0 µg/µl). Die Plasmid-DNA wurde bei -20 °C gelagert.

Lösungen: 100 % (V/V) Ethanol p.a. (-20 °C)
70 % (V/V) Ethanol p.a. (-20 °C)
3 M Natriumazetat, pH 7,0

3.2.3 Bestimmung der DNA-Konzentration

Die DNA-Konzentration wurde spektrophotometrisch durch Messung der Extinktion bei 260 nm mit einer Quarzküvette in einem DNA-Photometer (*GeneQuant pro*, Amersham, Biosciences, Freiburg) bestimmt. Eine optische Dichte von 1,0 einer doppelsträngigen DNA entspricht 50 µg DNA/ml.

Die Konzentration der DNA (µg/µl) lässt sich wie folgt berechnen:
(VF = Verdünnungsfaktor)

$$\frac{OD_{260nm} \cdot 50\ \mu g \cdot VF}{1000\ \mu l}$$

Das Verhältnis der Extinktionen bei 260 nm zu 280 nm gibt Aufschluss über die Reinheit von DNA-Lösungen. Reine DNA-Lösungen weisen einen Wert zwischen 1,8 und 2,0 auf.

3.2.4 DNA-Sequenzierung

Die automatisierte Sequenzierung wurde mit einem Perkin Elmer ABI PRISM 310 *Genetic Analyzer*® durchgeführt. Im Allgemeinen setzte sich ein Sequenzierungsansatz aus maximal 3,5 µl DNA (200-400 ng), 2,5 µl Primer (Stammlösung: 2 pmol/µl) und 4 µl ABI PRISM DNA *BigDye*®*Terminator Cycle Sequencing Kit* (Perkin Elmer, Norwalk, CT) zusammen. Alle Sequenzierungen wurden von Frau Susanne Gierschik, Abteilung Pharmakologie, durchgeführt.

3.2.5 Spaltung von Plasmid-DNA mit Restriktionsenzymen

Restriktionsenzyme werden von Bakterien gebildet, um virale DNA nach ihrem Eindringen in die Zelle zu zerstören und sie so vor Viren zu schützen. Restriktionsendonukleasen des Typs 2 spalten DNA an bestimmten palindromischen Basensequenzen und ermöglichen so die

Entstehung von linearer DNA mit glatten Enden (*blunt ends*) oder überstehenden 3' bzw. 5'-Enden (*sticky ends*).

Die DNA wurde mit dem jeweiligen gewünschten Restriktionsenzym und dem vom Hersteller (Fermentas, St. Leon-Rot) hierfür vorgesehenen Puffer inkubiert. Durch Zugabe von ddH_2O wurde der Ansatz auf das Gesamtvolumen aufgefüllt. Ein Restriktionsansatz mit einem Volumen von 10 µl setzte sich wie folgt zusammen:

Restriktionsansatz:
x µl DNA (0,5-1 µg)
1 µl 10 x Restriktionspuffer (Fermentas, St. Leon-Rot)
0,1-0,5 µl Restriktionsenzym (1-5 U/µl)
(Fermentas, St. Leon-Rot)
mit ddH_2O auf 10 µl auffüllen

Nach sorgfältigem Mischen der Lösungen wurde der Ansatz für 60 min bei der für das Restriktionsenzym optimalen Temperatur, in der Regel 37 °C, inkubiert. Zur Kontrolle der erfolgreichen Spaltung wurde die DNA in einem Agarosegel aufgetrennt (siehe Kapitel 3.2.6).

3.2.6 Agarose-Gelelektrophorese von DNA-Fragmenten

Die Auftrennung von DNA erfolgte entsprechend ihres Molekulargewichtes in einem Agarosegel in einem elektrischen Feld. Aufgrund ihrer negativen Ladung wanderte DNA im elektrischen Feld durch das Gel zur Anode. Nach Beendigung der Elektrophorese wurden die DNA-Banden mit Ethidiumbromid angefärbt, das zwischen die Basenpaare der DNA interkaliert. Die Größenbestimmung der DNA-Fragmente erfolgte mit Hilfe eines DNA-Markers, bestehend aus DNA-Fragmenten bekannter Größen (Lambda DNA/*Eco*RI+*Hind*III Marker #3, Fermentas, St. Leon-Rot, siehe Kapitel 2.8). Die Konzentration des verwendeten Agarosegels richtete sich nach der Größe der aufzutrennenden Fragmente (siehe Tabelle 11). In der Regel wurde eine 1 %ige Agaroselösung verwendet.

Zur Herstellung eines Agarosegels wurde die Agarose in 1 x TAE-Puffer durch Aufkochen gelöst und in den vorbereiteten Gelschlitten (Größe: 8,5 x 7,5 cm) mit einem 8 oder 12 Taschen enthaltenden Kamm gegossen. Nach dem Auspolymerisieren des Gels wurde der Gelschlitten in eine Horizontal-Gelkammer gesetzt, welche mit 1 x TAE-Puffer gefüllt wurde. Der Kamm wurde entfernt und die im Verhältnis 6:1 mit DNA-Probenpuffer versetzten DNA-Proben in die Taschen des Gels geladen. Die Auftrennung erfolgte bei einer konstanten

Spannung von 100 V für 45 min. Das Gel wurde anschließend mit Ethidiumbromid (10 µg/ml) gefärbt und die DNA-Banden nach Interkalation des Ethidiumbromids in der DNA durch ultraviolettes Licht bei 312 nm sichtbar gemacht.

Tabelle 12: Agarose-Gelelektrophorese

Agarosemenge in % (m/V)	Trennbereich linearer DNA (kb)
0,7	0,8-10
0,9	0,5-7
1,2	0,4-6
1,5	0,2-3

(nach Sambrook *et al.*, 1989)

1 x TAE-Puffer: 40 mM Tris/HCl, pH 8,0
20 mM Essigsäure
1 mM EDTA

6 x DNA-Probenpuffer: 0,25 % (m/V) Bromphenolblau
0,25 % (m/V) Xylene Cyanol FF
30 % (V/V) Glyzerin
in dH_2O

3.2.7 DNA-Fragmentisolierung aus Agarosegelen

Für die Extraktion von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen wurde der NucleoSpin® *Extraction Kit* von Macherey-Nagel, Düren, verwendet. Die gewünschte DNA-Bande wurde zunächst mit einem Skalpell nach Visualisierung bei 312 nm auf dem UV-Tisch aus dem Agarosegel ausgeschnitten und anschließend entsprechend den Angaben des Herstellers aus dem Agarosegel eluiert.

3.2.8 Dephosphorylierung von Plasmid-DNA

Vor der Ligation linearisierter Plasmid-DNA mit DNA-Fragmenten, wurde die Plasmid-DNA dephosphoryliert, um eine Rezirkularisierung zu verhindern. Die Entfernung der Phosphatreste am 5'-Ende erfolgte mit einer aus Kälberdarm isolierten alkalischen Phosphatase (CIP: *calf intestine phosphatase*). Ein Dephosphorylierungsansatz mit einem Gesamtvolumen von 100 µl setzte sich wie folgt zusammen:

Ansatz: x µl Plasmid-DNA (3-5 µg)
10 µl 10 x Dephosphorylierungspuffer (Roche Diagnostics, Mannheim)
1 µl alkalische Phosphatase (*calf intestine phosphatase*)
(1 U/ul; Roche Diagnostics, Mannheim)
mit ddH_2O auf 100 µl auffüllen

Nach Inkubation für 30 min bei 37 °C wurde die alkalische Phosphatase bei 65 °C für 10 min hitzeinaktiviert. Danach wurde die Plasmid-DNA mit 10 µl 3 M Natriumazetat (pH 7,0) und 600 µl Isopropanol 30 min bei Raumtemperatur gefällt. Anschließend daran wurde der Ansatz bei 14000 Upm und Raumtemperatur für 30 min zentrifugiert, das DNA-Pellet zweimal mit 500 µl 70 % Ethanol p.a. (-20 °C) gewaschen und dann in einem Vakuumkonzentrator (Concentrator 5301, Eppendorf, Hamburg) getrocknet. Die getrocknete DNA wurde in 25 µl ddH_2O resuspendiert.

3.2.9 Ligation von DNA-Fragmenten

Die Ligation von linearen DNA-Stücken in hydrolysierte Plasmide erfolgte mit Hilfe der T4-DNA-Ligase, welche die Phosphodiesterbindungen zwischen der 5´-Phosphatgruppe an einem DNA-Ende und der 3´-Hydroxylgruppe an dem anderen DNA-Ende schließen. Das Verhältnis von Fragment zu Plasmid richtete sich nach der Art der Schnittstellen. Liegt eine *sticky end*-Schnittstelle vor, so werden Plasmid und Fragment im Verhältnis 1:5 eingesetzt, bei einer *blunt end*-Schnittstelle beträgt das Verhältnis von Plasmid zu Fragment 1:10. Ein Ligationsansatz mit einem Gesamtvolumen von 10 µl setzte sich wie folgt zusammen:

Ligationsansatz: 1-5 µl *Insert*-DNA (0,1-0,5 µg)
1 µl Plasmid-DNA (20-50 ng)
1 µl T4-DNA-Ligase (1 U/µl; New England Biolabs, Frankfurt/Main)
1 µl 10 x Puffer (New England Biolabs, Frankfurt/Main)
mit ddH_2O auf 10 µl auffüllen

Der Ansatz wurde sorgfältig gemischt und für 16 h bei 16 °C inkubiert.

3.2.10 Klonierung der kodierenden DNA-Sequenz der humanen p120ctn Isoformen 1A, 2A, 3A und 4A in das Expressionsplasmid pGEX-4T1

Das Plasmid pEFBOS/hp120ctn 1A war der Ausgang für diese Klonierung. Mittels PCR wurden die cDNA-Sequenzen der humanen p120ctn Isoformen 1A, 2A, 3A und 4A amplifiziert. Als *template* diente das Plasmid pEFBOS/hp120ctn 1A und die 5'-Primer hp120ctn-Iso1, 2, 3 oder 4 und jeweils als 3'-Primer hp120ctn-Stop. Die Primersequenzen sind im Kapitel 2.10, Tabelle 10 angegeben. Die PCR-Fragmente wurden in einem 1 %igen Agarosegel aufgetrennt (siehe Kapitel 3.2.6), aus diesem extrahiert (siehe Kapitel 3.2.7) und in das Plasmid pCR2.1 insertiert (siehe Kapitel 3.2.8). Anschließend wurden die cDNA-Sequenzen der hp120ctn Isoformen 1A, 2A, 3A und 4A mit dem Restriktionsenzym EcoRI (Fermentas, St.Leon-Rot) aus dem Plasmid pCR2.1 herausgeschnitten (siehe Kapitel 3.2.5). Das Plasmid pGEX-4T1 wurde ebenfalls mit EcoRI geschnitten und dephosphoryliert (siehe Kapitel 3.2.9). Das linearisierte Plasmid und die cDNA-Fragmente wurden in einem 1 %igen Agarosegel aufgetrennt und aus diesem extrahiert. Anschließend wurden die cDNA-Fragmente in das Plasmid pGEX-4T1 insertiert. Die Insertion der cDNA-Fragmente in das Plasmid pGEX-4T1 wurde durch Restriktionsanalyse mit dem Restriktionsenzym XhoI und Sequenzierung (siehe Kapitel 3.2.4) überprüft.

3.2.11 *In vitro* DNA-Mutagenese mittels PCR

Der *QuikChange™ Site-Directed Mutagenesis Kit* von Stratagene, Heidelberg, ermöglicht die gezielte Einführung von Punktmutationen in doppelsträngige Plasmid-DNA ohne weitere Klonierungen. Nach erfolgter PCR mit mutationsspezifischen Primern wurde die parentale DNA durch das Restriktionsenzym *Dpn*I verdaut. Die DNA der meisten *E. coli* Stämme ist

durch die Methylase *dam* methyliert und wird daher von der methylierungsabhängigen *Dpn*I-Endonuklease als Substrat erkannt. Mutierte, mittels PCR *in vitro* amplifizierte DNA ist dagegen nicht methyliert und vor einem Verdau geschützt. Synthetisch hergestellte Oligonukleotide, die die gewünschte Mutation enthielten, dienten als Primer, die am 5´- und am 3´-Ende der zu mutierenden DNA-Sequenz an die Matrix banden. Die Primersequenzen sind im Kapitel 2.10, Tabelle 11 angegeben.

Standardansatz: 0,5-5 µl DNA-Matrize (ca. 400 ng Plasmid-DNA)
5 µl 10 x *Reaction buffer*
1,25 µl 5'Oligonukleotid-Primer (100 ng/µl)
1,25 µl 3'Oligonukleotid-Primer (100 ng/µl)
1 µl dNTP-Mix (je 25 mM der dNTPs)
mit ddH_2O auf 50 µl auffüllen
1 µl *PfuTurbo* DNA Polymerase (2,5 U/µl)

Die Substanzen 10 x *Reaction buffer*, dNTP-Mix und *PfuTurbo* DNA Polymerase waren im *QuikChange™ Site-Directed Mutagenesis Kit* (Stratagene, Heidelberg), enthalten. Die Oligonukleotide für den Standardansatz wurden synthetisch hergestellt (Thermo Electron, Ulm). Die Herstellung der Primerlösung mit der entsprechenden Konzentration erfolgte entsprechend den Angaben des Herstellers (Thermo Electron, Ulm).

PCR-Reaktionsbedingungen:

Zunächst wurde der Ansatz für 30 s auf 95 °C erhitzt, um die Plasmid-DNA vollständig zu denaturieren. Nach Abkühlung auf 55 °C erfolgte die Anlagerung der Primer (*annealing*) für die Dauer von 1 min. Die hitzestabile *PfuTurbo* DNA Polymerase verlängerte anschließend, ausgehend von den jeweiligen Primern, den DNA-Strang bei 68 °C. Die Zeit für die Reaktion betrug 2 min/kb DNA. Diese drei Schritte zusammen bildeten den PCR-Zyklus. Zum Einführen einer Punktmutation wurde der PCR-Zyklus 35-mal wiederholt. Nach Ablauf der Zyklen im DNA-Thermocycler (MultiCycler PTC 200, Biozym Diagnostik, Hess. Oldendorf) wurden die Proben auf 4 °C gekühlt.

Um die methylierte *template*-DNA zu verdauen, wurde 1 µl *Dpn*I-Restriktionsenzym (10 U/µl), das im Kit enthalten war, zum Ansatz gegeben und für 1 h bei 37 °C inkubiert. Anschließend wurde die DNA mittels Agarose-Gelelektrophorese aufgetrennt (siehe Kapitel 3.2.6) und die amplifizierte DNA kontrolliert.

3.2.12 Transformation der PCR-Produkte in XL1-*Blue Supercompetent Cells*

Nach erfolgter PCR und Kontrolle der PCR-Produkte mittels Agarose-Gelelektrophorese wurden die PCR-Produkte in XL1-*Blue Supercompetent Cells*, die im *QuikChange™ Site-Directed Mutagenesis Kit* (Stratagene, Heidelberg) enthalten waren, transformiert.
Die Bakterienzellen (50 µl) wurden auf Eis aufgetaut, mit 1 µl des *Dpn*I-behandelten PCR-Ansatzes versetzt und für 30 min auf Eis inkubiert. Nach dem darauf folgenden Hitzeschock bei 42 °C für 1 min wurde der Ansatz für 2 min auf Eis gekühlt. Nach Zugabe von 500 µl NZY^+-Medium wurde der Ansatz bei 37 °C und 225-250 Upm für 1 h inkubiert. Der gesamte Ansatz wurde auf Agarplatten, die das entsprechende Antibiotikum für das Plasmid enthielten, ausplattiert und für mindestens 16 h bei 37 °C inkubiert.

NZY^+-Medium: 1 % (m/V) NZ-Amine
0,5 % (m/V) Hefeextrakt
0,5 % (m/V) NaCl
in H_2O

Zugabe von: 1,25 ml von 1M $MgCl_2$ /100 ml (12,5 mM)
1,25 ml von 1 M $MgSO_4$ /100 ml (12,5 mM)
1 ml von 2 M Glukose-Lösung /100 ml (20 mM)

3.2.13 Herstellung von Rho-Mutanten durch *in vitro* DNA-Mutagenese

Die cDNA von wildtypischem RhoC war in der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Klaudia Giehl, Ulm, in den prokaryotischen Expressionsvektor pGEX-2TK bzw. die cDNA von wildtypischem RhoA in den Vektor pGEX-2T kloniert worden. Die Chimäre RhoC/A war in der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Klaudia Giehl, Ulm hergestellt worden. Im Rahmen dieser Arbeit wurden durch *in vitro*-Mutagenese (siehe Kapitel 3.2.11) in die doppelsträngige Plasmid-DNA pGEX-2TK/RhoC, pGEX-2TK/RhoC/A bzw. pGEX-2T/RhoA Punkmutationen eingeführt und die in Tabelle 12 angeführten RhoC-Mutanten, die RhoC/A-Mutante und eine RhoA-Mutante generiert.
Die erforderlichen Oligonukleotid-Primer für die Mutagenese wurden individuell entworfen. Die Angaben zum Primerdesign wurden der Anleitung von Stratagene, Heidelberg, entnommen. Jeweils der 5'- und der 3'-Primer mußten die gewünschte Mutation enthalten und

sollten zwischen 25 und 45 Basen lang sein. Die Schmelztemperatur sollte größer bzw. gleich 78 °C sein und wurde der folgenden Formel entsprechend ermittelt:

$$Tm = 81{,}5 + 0{,}41\ (\%\ GC) - 675/N - \%\ \text{mutierte Basen}$$

Tm: Schmelztemperatur

G: Guanin

C: Cytosin

N: Primerlänge gesamt in Basen

Die gewünschte Mutation sollte in der Mitte des Primers liegen und der Anteil der Basen Guanin und Cytosin sollte mindestens 40 % betragen. Die Primersequenzen sind im Kapitel 2.10, Tabelle 11 dargestellt. Die PCR wurde mit einer Primerkonzentration von 100 ng/µl durchgeführt. Zur Kontrolle der korrekten Einführung der Mutation in die Plasmide, wurden Sequenzanalysen (siehe Kapitel 3.2.4) durchgeführt.

Tabelle 13: Rho-Mutanten durch *in vitro* DNA-Mutagenese

Mutante	Kodon	Primer	Länge	Basenaustausch/Aminosäure	Tm
RhoC (I43V)	43	RhoC (I43V)-5´-Primer RhoC (I43V)-3´-Primer	42 bp	ATT/Isoleucin → GTG/Valin	75,1 °C
RhoC (Q123N)	123	RhoC (Q123N)-5'-Primer RhoC (Q123N)-3'-Primer	37 bp	CAA/Glutamin → AAT/Asparagin	72,3 °C
RhoC (R140K)	140	RhoC (R140K)-5'-Primer RhoC (R140K)-3'-Primer	35 bp	CGG/Arginin → AAG/Lysin	77,2 °C
RhoC (S141P)	141	RhoC (S141P)-5'-Primer RhoC (S141P)-3'-Primer	31 bp	TCT/Serin → CTT/Prolin	74,2 °C
RhoC (S152G)	152	RhoC (S152G)-5'-Primer RhoC (S152G)-3'-Primer	35 bp	AGT/Serin → GGC/Glycin	81,1 °C
RhoC (L157M)	157	RhoC (L157M)-5'-Primer RhoC (L157M)-3'-Primer	36 bp	CTT/Leucin → ATG/Methionin	74,7 °C
RhoC (E165D)	165	RhoC (E165D)-5'-Primer RhoC (E165D)-3'-Primer	30 bp	GAG/Glutaminsäure → GAT/Asparaginsäure	74,3 °C

RhoC/A (S152G)	152	RhoC (S152G)-5'-Primer RhoC (S152G)-3'-Primer	35 bp	AGT/Serin → GGC/Glycin	81,1 °C
RhoA (G152S)	152	RhoA (G152S)-5'-Primer RhoA (G152S)-3'-Primer	37 bp	GGC Glycin → AGC Serin	72 °C

Abkürzungen: bp: Basenpaare; A: Adenin; C: Cytosin; G: Guanin; T: Thymin; Tm: Schmelztemperatur

3.3 Proteinbiochemische Methoden

3.3.1 Proteinexpression in *Escherichia coli*

Das Glutathion S-Transferase-(GST) *Gene-Fusion-System* (Amersham Biosciences, Freiburg) wurde für die Expression, Aufreinigung und Detektion eines in *E. coli* hergestellten Fusionproteins verwendet. Dieses Expressionssystem enthält die cDNA-Sequenz für das Enzym Glutathion-*S*-Transferase (GST) in den im Rahmen dieser Arbeit verwendeten Plasmide pGEX-2T, pGEX-2TK oder pGEX-4T1. Die cDNA der Rho-GTPasen RhoA und RhoC sowie deren Mutanten bzw. der murinen p120ctn Isoform 1N und der humanen p120ctn Isoformen 1A, 2A, 3A ud 4A wurden im Leserahmen eines der angeführten pGEX-Plasmide an das carboxyterminale Ende des Glutathion S-Transferase-Gens in die *multiple cloning site* kloniert (siehe Kapitel 3.2.10). Einige Expressionsplasmide wurden zur Verfügung gestellt. Die Expression in *E. coli* BL21(DE3) erfolgte nach Induktion des *tac*-Promotors mit dem Laktose-Analogon Isopropyl-β-D-thiogalaktopyranosid (IPTG).

3.3.1.1 Expression und Aufreinigung von GST-Proteinen und GST-Rho-Fusionsproteinen

Für die im Ergebnisteil beschriebenen Versuche zur Analyse der Interaktion von p120ctn mit rekombinanten GST-Rho-Fusionsproteinen wurden für die Expression der GST-RhoA- und der GST-RhoC-Fusionsproteine sowie deren Mutanten bzw. der GST-Proteine zunächst eine Über-Nacht-Kultur hergestellt. Dafür wurde je eine Kolonie des frisch transformierten *E. coli*-Stammes BL21(DE3)/pGEX-2T/RhoA, BL21(DE3)/pGEX-2TK/RhoC bzw. BL21(DE3)/pGEX-2TK in 3 ml LB-Amp-Medium aufgenommen und für 6 h bei 37 °C und

200 Upm inkubiert. Die Kultur wurde in 200 ml LB-Amp-Medium überführt und für 12-16 h über Nacht bei 37 °C und 200 Upm inkubiert. Anschließend wurden 40 ml dieser Über-Nacht-Kultur in 400 ml LB-Amp-Medium überführt und bei 26 °C und 160 Upm bis zu einer optischen Dichte bei 600 nm (OD_{600nm}) von 0,6-0,8 inkubiert. Danach wurde die Proteinexpression durch Zugabe von 0,5 mM IPTG induziert. Die Proteinexpression erfolgte bei 20 °C und 160 Upm für 4 h.

Die Ernte der Bakterienkulturen erfolgte durch Zentrifugation bei 5000 Upm und 4 °C für 10 min (J2-HS Zentrifuge, Rotor JA10, Beckman Instruments, München). Der Überstand wurde verworfen und das Zellpellet in 20 ml Tris-Puffer aufgenommen. Diese Suspension wurde bei 6000 Upm und 4 °C für 15 min zentrifugiert (Minifuge GL, Kendro, Hanau) und der Überstand verworfen. Anschließend wurde das Zellpellet in flüssigem Stickstoff schock gefroren und bis zur weiteren Verwendung bei -80 °C gelagert.

Tris-Puffer:
20 mM Tris/HCl, pH 7,5
5 mM $MgCl_2$
1 mM DTT
0,1 mM PMSF

Das aufgetaute Zellpellet von 400 ml *E. coli*-Kultur wurde in 20 ml Lysispuffer resuspendiert. Die Bakteriensuspension wurde auf Eis dreimal für je 1 min mit Ultraschall bei 50 Watt (Sonifier® B-12, Branson Sonic Power Company, Danbury, Conneticut, USA) behandelt und zwischendurch jeweils für 1 min auf Eis abgekühlt. Anschließend wurde die Suspension bei 10000 Upm und 4 °C für 30 min zentrifugiert (J2-HS Zentrifuge, Rotor JA20, Beckman Instruments, München). Der Überstand mit den löslichen Proteinen wurde abgenommen, in neue Röhrchen überführt und auf Eis gelagert.

Lysispuffer:
50 mM Tris/HCl, pH 7,5
50 mM NaCl
5 mM $MgCl_2$
1 mM DTT
1 mM PMSF
0,1 mg/ml Lysozym

Die Reinigung der GST-Proteine und der GST-Rho-Fusionsproteine erfolgte affinitätschromatographisch. Alle Arbeitsschritte wurden auf Eis oder bei 4 °C durchgeführt. Zunächst wurden 250 µl Glutathion-Sepharose 4B zweimal mit je 500 µl Waschpuffer durch Zentrifugation bei 3000 Upm und 4 °C für 1 min (Tischzentrifuge 5417-C, Eppendorf, Hamburg) gewaschen. Der Überstand aus den Waschschritten wurde jeweils verworfen. Der lösliche Überstand des Bakterienlysats (20 ml) wurde zu den gewaschenen Glutathion-Sepharose-*beads* gegeben und der Ansatz für 2 h bei 4 °C im Überkopf-Rotor (Heidolph, Schwabach) inkubiert. Anschließend wurden die Glutathion-Sepharose-*beads* bei 3000 Upm und 4 °C für 1 min sedimentiert (Minifuge GL, Kendro, Hanau) und der Überstand verworfen. Die Glutathion-Sepharose-*beads* wurden anschließend noch viermal mit jeweils 10 ml Waschpuffer durch Zentrifugation bei 3000 Upm und 4 °C für 1 min gewaschen (Minifuge GL) und die jeweiligen Überstände verworfen.

Um die gebundenen GST-Proteine und GST-Rho-Fusionsproteine von den Glutathion-Sepharose-*beads* zu eluieren, wurden die Glutathion-Sepharose-*beads* dreimal mit je 1 ml Elutionspuffer im Überkopf-Rotor für 15 min bei 4 °C inkubiert. Dieser Puffer enthält reduziertes Glutathion, das mit GST um die Bindung an die Glutathion-Sepharose konkurriert. Anschließend wurden die Glutathion-Sepharose-*beads* bei 3000 Upm und 4 °C für 1 min sedimentiert (Minifuge GL), der Überstand (Eluat) abgenommen und in 1,5 ml-Reaktionsgefäße gegeben. Die drei Eluate wurden vereinigt und in einen Dialyseschlauch (Porengrösse 6-8 kDa; Roth, Karlsruhe) überführt. Die GST-Proteine und GST-Rho-Fusionsproteine wurden gegen 1 l Dialysepuffer bei 4 °C für mindestens 16 h dialysiert. Die gereinigten Proteine wurden zur Aufbewahrung aliquotiert (20-100 µl), in flüssigem Stickstoff schock gefroren und bei -80 °C gelagert. Die Effizienz von Expression, Lyse und Aufreinigung wurde durch SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (siehe Kapitel 3.3.6) und anschließender Coomassie-Blau-Färbung (siehe Kapitel 3.3.7) oder im Immunblotverfahren (siehe Kapitel 3.3.8) analysiert. Die Bestimmung der Proteinkonzentration erfolgte durch den Vergleich der GST- bzw. GST-Rho-Proteinbanden mit einer BSA (*bovine serum albumin*)-Konzentrationsreihe, die im selben Gel aufgetrennt wurde (siehe Kapitel 3.3.5.1).

Waschpuffer: 50 mM Tris/HCl, pH 7,5
50 mM NaCl
5 mM $MgCl_2$
1 µM GDP

Elutionspuffer: 50 mM Tris/HCl, pH 8,0
150 mM NaCl
5 mM $MgCl_2$
1 mM DTT
0,1 mM PMSF
1 µM GDP
5 mM L-Glutathion

Dialysepuffer: 20 mM HEPES, pH 7,4
0,1 % (V/V) Triton X-100
150 mM NaCl
10 mM $MgCl_2$
10 % (V/V) Glyzerin

3.3.1.2 Expression und Aufreinigung von GST-mp120ctn 1N-Fusionsproteinen

Für die im Ergebnisteil beschriebenen Versuch zur Analyse der Interaktion von EGFP-RhoC mit rekombinantem GST-mp120ctn 1N (murines p120ctn Isoform 1N) wurde die Expression der GST-p120ctn 1N-Fusionsproteine, wie in Kapitel 3.3.1.1 beschrieben, durchgeführt.
Mit einer Kolonie des frisch transformierten *E. coli*-Stammes BL21(DE3)/pGEX-4T1/mp120ctn 1N wurden 40 ml Über-Nacht-Kultur hergestellt. Die Kultur wurde in 400 ml LB-Amp-Medium überführt und bei 26 °C und 160 Upm bis zu einer optischen Dichte bei 600 nm (OD_{600nm}) von 0,6-0,8 inkubiert. Danach wurde die Proteinexpression durch Zugabe von 0,5 mM IPTG induziert. Die Proteinexpression erfolgte bei 20 °C und 160 Upm für 4 h. Die Ernte der Bakterienkultur, die Lyse des Zellpellets und die Aufreinigung der GST-mp120ctn 1N-Fusionsproteine erfolgten zu den gleichen Bedingungen wie in Kapitel 3.3.1.1 beschrieben. Die gereinigten Proteine wurden zur Aufbewahrung aliquotiert (200 µl), in flüssigem Stickstoff schock gefroren und bei -80 °C gelagert. Die Effizienz von Expression, Lyse und Aufreinigung wurde durch SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (siehe Kapitel 3.3.6) und anschließender Coomassie-Blau-Färbung (siehe Kapitel 3.3.7) oder im Immunblotverfahren (siehe Kapitel 3.3.8) analysiert. Die Bestimmung der Proteinkonzentration erfolgte durch den Vergleich der GST-Proteinbanden mit einer BSA (*bovine serum albumin*)-Konzentrationsreihe, die im selben Gel aufgetrennt wurde (siehe Kapitel 3.3.5.1).

3.3.1.3 Expression und Aufreinigung von GST-RhoGDIα-Fusionsproteinen

Für die im Ergebnisteil beschriebenen Versuche zur Analyse der Interaktion von RhoGDIs mit Rho-GTPasen wurde für die Expression von GST-RhoGDIα-Fusionsproteinen und GST-Proteinen mit je einer Kolonie der frisch transformierten *E. coli*-Stämme BL21(DE3)/pGEX-2T/RhoGDIα bzw. BL21(DE3)/pGEX-2TK eine 40ml-Über-Nacht-Kultur hergestellt. Die Kultur wurde in 400 ml LB-Amp-Medium überführt und bei 26 °C und 160 Upm bis zu einer optischen Dichte bei 600 nm (OD_{600nm}) von 0,6-0,8 inkubiert. Danach wurde die Proteinexpression durch Zugabe von 0,5 mM IPTG induziert. Die Proteinexpression erfolgte bei 16 °C und 160 Upm für 16 h. Die Ernte der Bakterienkulturen, die Lyse der Zellpellets und die Aufreinigung der GST-Proteine und der GST-RhoGDIα-Fusionsproteine erfolgten methodisch zu den gleichen Bedingungen wie in Kapitel 3.3.1.1 beschrieben. Jedoch wurden für die Ernte der Bakterienkulturen der Tris-Puffer, für die Lyse der Lysispuffer, für die Aufreinigung der GST-Proteine und der GST-RhoGDIα-Fusionsproteine der Waschpuffer und der Elutionspuffer und für die Dialyse der Dialysepuffer mit 1 mM EDTA anstelle von 5 bzw. 10 mM $MgCl_2$ versetzt. Die gereinigten Proteine wurden zur Aufbewahrung aliquotiert (100 µl), in flüssigem Stickstoff schock gefroren und bei -80 °C gelagert. Die Effizienz von Expression, Lyse und Aufreinigung wurde durch SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (siehe Kapitel 3.3.6) und anschließender Coomassie-Blau-Färbung (siehe Kapitel 3.3.7) oder im Immunblotverfahren (siehe Kapitel 3.3.8) analysiert. Die Bestimmung der Proteinkonzentration erfolgte durch den Vergleich der GST-Proteinbanden mit einer BSA (*bovine serum albumin*)-Konzentrationsreihe, die im selben Gel aufgetrennt wurde (siehe Kapitel 3.3.5.1).

Tris-Puffer: 20 mM Tris/HCl, pH 7,5
1 mM EDTA
1 mM DTT
0,1 mM PMSF

Lysispuffer: 50 mM Tris/HCl, pH 7,5
50 mM NaCl
1 mM EDTA
1 mM DTT
1 mM PMSF
0,1 mg/ml Lysozym

Waschpuffer: 50 mM Tris/HCl, pH 7,5
50 mM NaCl
1 mM EDTA

Elutionspuffer: 50 mM Tris/HCl, pH 8,0
150 mM NaCl
1 mM EDTA
1 mM DTT
0,1 mM PMSF
5 mM L-Glutathion

Dialysepuffer: 20 mM Tris/HCl, pH 7,5
1 mM EDTA
1 mM DTT
0,1 mM PMSF
10 % (V/V) Glyzerin

3.3.2 Expression und Aufreinigung von GST-TRBD (Rhotekin)

Zur Isolierung von aktivem RhoA- bzw. RhoC-GTP aus Zelllysaten wurde die Rho-Bindungsdomäne TRBD (Aminosäuren 7-89) des Rho-Effektors *Rhotekin* als Glutathion-S-Transferase (GST) Fusionsprotein (GST-TRBD) in *E. coli* exprimiert (Stähle *et al.*, 2003).
Von einer Über-Nacht-Kultur von *E. coli* BL21(DE3)/pGEX-2TK/TRBD wurden 50 ml in 500 ml LB-Amp-Medium überführt und bei 37 °C und 200 Upm bis zu einer optischen Dichte bei 600 nm (OD_{600nm}) von 0,6 inkubiert. Die Proteinexpression wurde durch Zugabe von 0,8 mM IPTG induziert. Die Bakterienkultur wurde für 6 h bei 24 °C und 200 Upm inkubiert und anschließend durch Zentrifugation bei 5000 Upm und 4 °C für 10 min sedimentiert (J2-HS Zentrifuge, Rotor JA10, Beckman Instruments, München). Der Überstand wurde verworfen und das Pellet in 10 ml Lysispuffer resuspendiert. Um einen vollständigen Aufschluss der Bakterien zu erreichen, wurde die Bakteriensuspension dreimal mit Ultraschall bei 50 Watt für 30 s auf Eis behandelt (Sonifier B-12, Branson Sonic Power Company, Danbury, Conneticut, USA) und dazwischen jeweils für 1 min auf Eis abgekühlt. Um die unlöslichen bakteriellen Bestandteile abzutrennen, wurde das Lysat bei 10000 Upm und 4 °C für 20 min zentrifugiert (J2-HS Zentrifuge, Rotor JA20, Beckman Instruments, München). Alle weiteren

Arbeitsschritte wurden auf Eis durchgeführt. Zur Reinigung von GST-TRBD aus dem Lysat wurden 500 µl Glutathion-Sepharose 4B zweimal mit je 1 ml Waschpuffer durch Zentrifugation bei 3000 Upm und 4 °C für 1 min (Tischzentrifuge 5417-C, Eppendorf, Hamburg) gewaschen. Der Überstand aus den Waschschritten wurde jeweils verworfen. Die gewaschenen Glutathion-Sepharose-*beads* wurden zum löslichen Überstand des Bakterienlysats gegeben und der Ansatz für 1 h im Überkopf-Rotor (Heidolph, Schwabach) bei 4 °C inkubiert. Anschließend wurden die Glutathion-Sepharose-*beads* bei 3000 Upm und 4 °C für 1 min sedimentiert (Minifuge GL, Kendro, Hanau) und der Überstand verworfen. Die Glutathion-Sepharose-*beads* wurden viermal mit jeweils 10 ml Waschpuffer durch Zentrifugation bei 3000 Upm und 4 °C für 1 min gewaschen (Minifuge GL) und die jeweiligen Überstände verworfen. Danach wurden die mit GST-TRBD angereicherten Glutathion-Sepharose-*beads* in 2 ml Waschpuffer, dem Glyzerin bis zu einer Endkonzentration von 40 % (V/V) zugesetzt worden war, resuspendiert. Anschließend wurde die Suspension in Portionen zu 200 µl aliquotiert, bei -80 °C gelagert und aufgrund der Instabilität des GST-TRBD maximal vier Wochen verwendet.

Zur Kontrolle der Expression und zur Konzentrationsbestimmung der gereinigten GST-TRBD-Fusionproteine wurden 2, 5, 10 und 20 µl GST-TRBD-Glutathion-Sepharose-*beads* mit 10 µl 5 x SDS-Probenpuffer versetzt und in einem 12,5 %igen SDS-Polyacrylamidgel aufgetrennt (siehe Kapitel 3.3.6). Die semiquantitative Bestimmung der GST-TRBD-Konzentration erfolgte durch Auftrennung von 5, 10, 20 und 30 µg BSA im selben Gel. Das Gel wurde anschließend mit Coomassie-Blau gefärbt (siehe Kapitel 3.3.7) und die Stärke der Proteinbanden verglichen.

Lysispuffer:
50 mM Tris/HCl, pH 8,0
10 % (V/V) Glyzerin
20 % (m/V) Saccharose
0,2 mM Natriumthiosulfat
2 mM $MgCl_2$
2 mM DTT
0,2 mM PMSF
10 µg/ml Aprotinin
10 µg/ml Leupeptin

Waschpuffer: 50 mM Tris/HCl, pH 7,6
1 % (V/V) Triton X-100
150 mM NaCl
10 mM $MgCl_2$
0,2 mM PMSF
10 µg/ml Aprotinin
10 µg/ml Leupeptin

3.3.3 Expression und Aufreinigung von GST-PAK-CD

Die hohe Affinität von Rac1-GTP zur CRIB-Domäne (CD) des Effektors PAK1b (Aminosäuren 56-141), welche als rekombinantes Fusionsprotein GST-PAK-CD an Glutathion-Sepharose 4B gekoppelt eingesetzt wird, ermöglicht eine spezifische Isolierung von Rac1-GTP aus einem Zelllysat (Stähle *et al.*, 2003).

Von einer Über-Nacht-Kultur des frisch transformierten *E. coli*-Stammes BL21(DE3)/pGEX-2TK/PAK-CD wurden 50 ml in 500 ml LB-Amp-Medium überführt und bei 37 °C und 200 Upm bis zu einer optischen Dichte bei 600 nm (OD_{600nm}) von 0,6 inkubiert. Die Proteinexpression wurde durch Zugabe von 0,5 mM IPTG induziert, die Bakterienkultur für 3 h bei 30 °C und 200 Upm inkubiert und anschließend durch Zentrifugation bei 5000 Upm und 4 °C für 10 min sedimentiert (J2-HS Zentrifuge, Rotor JA10, Beckman Instruments, München). Der Überstand wurde verworfen und das Pellet in 10 ml Lysispuffer resuspendiert. Um einen vollständigen Aufschluss der Bakterien zu erreichen, wurde die Bakteriensuspension zur mechanischen Lyse mit Ultraschall dreimal bei 50 Watt für 30 s auf Eis behandelt (Sonifier B-12, Branson Sonic Power Company, Danbury, Conneticut, USA) und dazwischen jeweils für 1 min auf Eis abgekühlt. Um die unlöslichen bakteriellen Bestandteile abzutrennen, wurde das Lysat bei 10000 Upm und 4 °C für 20 min zentrifugiert (J2-HS Zentrifuge, Rotor JA20, Beckman Instruments, München). Alle weiteren Arbeitsschritte wurden auf Eis durchgeführt. Zunächst wurden 500 µl Glutathion-Sepharose 4B zweimal mit je 1 ml Waschpuffer durch Zentrifugation bei 3000 Upm und 4 °C für 1 min (Tischzentrifuge 5417-C, Eppendorf, Hamburg) gewaschen. Der Überstand aus den Waschschritten wurde jeweils verworfen. Die gewaschenen Glutathion-Sepharose-*beads* wurden zum löslichen Überstand des Bakterienlysats gegeben und der Ansatz für 1 h im Überkopf-Rotor (Heidolph, Schwabach) bei 4 °C inkubiert. Anschließend wurden die Glutathion-Sepharose-*beads* bei 3000 Upm und 4 °C für 1 min sedimentiert (Minifuge GL,

Kendro, Hanau) und der Überstand verworfen. Die Glutathion-Sepharose-*beads* wurden viermal mit jeweils 10 ml Waschpuffer und zuletzt einmal mit 10 ml Waschpuffer mit 10 % (V/V) Glyzerin durch Zentrifugation bei 3000 Upm und 4 °C für 1 min gewaschen (Minifuge GL) und die jeweiligen Überstände verworfen. Nach dem letzten Waschschritt wurden die mit GST-PAK-CD angereicherten Glutathion-Sepharose-*beads* in 4 ml Waschpuffer mit 10 % (V/V) Glyzerin resuspendiert. Die Suspension wurde in Portionen zu 250 µl aliquotiert, bei -80 °C gelagert und aufgrund der Instabilität des GST-PAK-CD maximal vier Wochen verwendet.

Zur Kontrolle der Expression und zur Konzentrationsbestimmung der gereinigten GST-PAK-CD-Fusionproteine wurden 2, 5, 10 und 20 µl GST-PAK-CD-Glutathion-Sepharose-*beads* mit 10 µl 5 x SDS-Probenpuffer versetzt und in einem 12,5 %igen SDS-Polyacrylamidgel aufgetrennt (siehe Kapitel 3.3.6). Die semiquantitative Bestimmung der GST-TRBD-Konzentration erfolgte durch Auftrennung von 5, 10, 20 und 30 µg BSA im selben Gel. Das Gel wurde anschließend mit Coomassie-Blau gefärbt (siehe Kapitel 3.3.7) und die Stärke der Proteinbanden verglichen.

PAK-Lysis-Puffer:
50 mM Tris/HCl, pH 7,5
150 mM NaCl
1 % (V/V) Triton X-100
5 mM $MgCl_2$
1 mM DTT
1 mM PMSF
10 µg/ml Aprotinin
10 µg/ml Leupeptin

PAK-Waschpuffer:
50 mM Tris/HCl, pH 7,6
150 mM NaCl
0,5 % (V/V) Triton X-100
5 mM $MgCl_2$
1 mM PMSF
10 µg/ml Aprotinin
10 µg/ml Leupeptin

3.3.4 Expression und Aufreinigung von GST-C3lim

Das Exoenzym C3lim-Transferase, eine ADP-Ribosyltransferase von *Clostridium limosum*, ist relativ spezifisch und inaktiviert Rho-GTPasen (Just *et al.*, 1992).

Die Expression und Aufreinigung von GST-C3lim wurden in der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Holger Barth, Abteilung für Toxikologie, Universität Ulm, dankenswerterweise durchgeführt.

Von einer Über-Nacht-Kultur des frisch transformierten *E. coli*-Stammes BL21(DE3)/pGEX-2TK/C3lim wurden 40 ml in 1000 ml LB-Amp-Medium überführt und bei 37 °C und 200 Upm bis zu einer optischen Dichte bei 600 nm (OD_{600nm}) von 0,6-0,8 inkubiert. Die Proteinexpression wurde durch Zugabe von 1 mM IPTG induziert, die Bakterienkultur über Nacht bei 29 °C und 200 Upm inkubiert und anschließend durch Zentrifugation bei 5000 Upm und 4 °C für 10 min sedimentiert (J2-HS Zentrifuge, Rotor JA10, Beckman Instruments, München). Der Überstand wurde verworfen. Alle weiteren Arbeitsschritte wurden auf Eis durchgeführt. Das Pellet wurde in 10 ml kaltem Lysispuffer resuspendiert. Um einen vollständigen Aufschluss der Bakterien zu erreichen, wurde die Bakteriensuspension zur mechanischen Lyse mit Ultraschall sechsmal bei 50 Watt für 15 s auf Eis behandelt (Sonifier B-12, Branson Sonic Power Company, Danbury, Conneticut, USA) und dazwischen jeweils für 15 s auf Eis abgekühlt. Um die unlöslichen Bestandteile abzutrennen, wurde das Lysat bei 12000 Upm und 4 °C für 10 min zentrifugiert (J2-HS Zentrifuge, Rotor JA20, Beckman Instruments, München) und der Überstand weiter verwendet. Es wurden 400 µl Glutathion-Sepharose 4B zweimal mit je 5 ml PBS durch Zentrifugation bei 1000 Upm und 4 °C für 5 min (Minifuge GL, Kendro, Hanau) gewaschen. Der Überstand aus den Waschschritten wurde jeweils verworfen. Der lösliche Überstand des Bakterienlysats wurde zu den gewaschenen Glutathion-Sepharose-*beads* gegeben und der Ansatz für 1 h im Überkopf-Rotor (Heidolph, Schwabach) bei 4 °C inkubiert. Anschließend wurden die Glutathion-Sepharose-*beads* bei 1000 Upm und 4 °C für 5 min sedimentiert (Minifuge GL) und der Überstand verworfen. Die Glutathion-Sepharose-*beads* wurden zweimal mit jeweils 5 ml Waschpuffer und zweimal mit je 1 ml PBS durch Zentrifugation bei 1000 Upm und 4 °C für 5 min gewaschen (Minifuge GL) und die jeweiligen Überstände verworfen. Danach wurden die mit GST-C3lim angereicherten Glutathion-Sepharose-*beads* in 500 µl PBS resuspendiert und die Suspension bei -20 °C gelagert.

Lysispuffer: 20 mM Tris/HCl, pH 7,4
10 mM NaCl
1 % (V/V) Triton X-100

1 mM PMSF

Waschpuffer: 20 mM Tris/HCl, pH 7,4
150 mM NaCl

PBS: 137 mM NaCl
2,7 mM KCl
8 mM Na_2HPO_4 x 2 H_2O
1,5 mM KH_2PO_4
1,2 mM $CaCl_2$
0,5 mM $MgCl_2$
pH 7,4

3.3.4.1 ADP-Ribosylierung von GST-Rho-Fusionsproteinen mit GST-C3lim

Die C3-Transferase katalysiert die Hydrolyse von NAD zu Nicotinamid und ADP-Ribose sowie die Übertragung der ADP-Ribose-Untereinheit auf die Rho-GTPase. Dadurch wird die Rho-GTPase inaktiviert und verbleibt im GDP-gebundenen Zustand (Holbourn *et al.*, 2006).
Die GST-Proteine und GST-Rho-Fusionsproteine wurden in *E. coli* exprimiert und mittels Glutathion-Sepharose 4B affinitätschromatographisch aufgereinigt (siehe Kapitel 3.3.1.1). Die Expression und Aufreinigung des GST-C3lim erfolgte wie in Kapitel 3.3.4 beschrieben und wurde, ebenso wie die ADP-Ribosylierung der GST-Rho-Fusionsproteine, in der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Holger Barth, Abteilung für Toxikologie, Universität Ulm, durchgeführt. Für die ADP-Ribosylierung wurden je 30 µg GST-Proteine und GST-Rho-Fusionsproteine mit 30 ng GST-C3lim angereicherten Glutathion-Sepharose-*beads* und Zusatz von 10 µM NAD und 5 mM $MgCl_2$ für 3 h bei 37 °C inkubiert und anschließend bei 4 °C gelagert.

3.3.5 Bestimmung der Proteinkonzentration

Die Proteinkonzentration wurde kolorimetrisch mittels BCA (*bicinchoninic acid*) nach der Methode von Smith (Smith *et al.*, 1985) bestimmt. Bei dieser Methode wird Cu^{2+} in Abhängigkeit von der Proteinkonzentration zu Cu^{+} reduziert. Cu^{+} bildet mit BCA einen Komplex, der bei 562 nm photometrisch gemessen werden kann. Zur Erstellung einer

Standardreihe wurden 0 µl, 10 µl, 20 µl, 30 µl, 40µl und 50 µl einer Proteinstandardlösung (2 mg/ml BSA) eingesetzt. Von der zu bestimmenden Proteinlösung wurden 5 oder 10 µl eingesetzt. Als Kontrolle wurde die gleiche Menge Lysispuffer verwendet. Alle Ansätze wurden mit ddH_2O auf 50 µl Endvolumen aufgefüllt. Zu jedem Ansatz wurde 1 ml BCA-Reagenzlösung (Pierce, St. Augustin) gegeben und die Proben anschließend für 30 min bei 37 °C inkubiert. Anschließend wurde die Extinktion photometrisch bei 562 nm gemessen. Sowohl für die Standardreihe als auch für die Proben wurden Doppelbestimmungen durchgeführt. Über lineare Regression wurde eine Eichgerade erstellt, anhand derer die Proteinkonzentration der Proben ermittelt wurde.

BCA-Reagenzlösung: 10 ml BCA™ *Protein Assay Reagent* A
200 µl $CuSO_4$-Lösung

3.3.5.1 Bestimmung der Proteinkonzentration mittels BSA-Standard im SDS-Polyacrylamidgel

Da sehr geringe Proteinmengen mit der BCA-Methode nicht korrekt bestimmt werden können, wurde die Proteinkonzentration gereinigter Proteine anhand eines Vergleiches mit einem BSA-Standard in einem SDS-Polyacrylamidgel (siehe Kapitel 3.3.6) bestimmt. In einem 10 %igen bzw. 12,5 %igen Gel wurden verschiedene Verdünnungen des BSA-Standards (2 mg/ml) neben verschiedenen Mengen der zu bestimmenden Proteinproben aufgetrennt. Nach Färben des Gels in Coomassie-Blau-Färbelösung und anschließender Entfärbung (siehe Kapitel 3.3.7) konnte die Proteinkonzentration durch Vergleich der Stärke der Proteinbanden ermittelt werden.

3.3.6 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)

Die SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE) wurde basierend auf der Methode von Laemmli (Laemmli *et al.*, 1970) durchgeführt. Aus den Monomeren Acrylamid und Bisacrylamid wird in Anwesenheit von N,N,N',N'-Tetramethylethylendiamin (TEMED) und Ammoniumpersulfat (APS) durch Radikalkettenpolymerisation ein quervernetztes Polyacrylamid-Gel hergestellt. Der Vernetzungsgrad und damit auch der Trennbereich der Proteine ist vom Verhältnis Acrylamid zu Bisacrylamid im Trenngel sowie von der Acrylamid-Gesamtkonzentration abhängig (7,5 %, 10 % oder 12,5 %).

Je nach Gelgröße wurden zwei verschiedene Gelapparaturen verwendet: (a) Gelplatten: 14 x 12,5 cm, Abstandhalter mit 1 mm Dicke für die in der Werkstatt der Universität Ulm hergestellte vertikale Elektrophoresekammer (Trennkapazität 70-120 µg Protein) und (b) Gelplatten: 10 x 8 cm, Abstandhalter mit 1 mm Dicke für die Vertikal-Elektrophoresekammer der Firma Sigma, Taufkirchen (Trennkapazität 20-70 µg Protein). In Tabelle 13 sind die Bestandteile des Trenngels je nach Acrylamidkonzentration aufgelistet. Die angegebenen Mengen sind für 4 Gele der Größe 10 x 8 cm bzw. für ein Gel der Größe 14 x 12,5 cm (Angabe in Klammern) ausreichend. Zuerst wurden die Bestandteile des Trenngels pipettiert und gut gemischt. Die Lösung wurde zwischen die gereinigten, fettfreien Glasplatten gegossen und mit wassergesättigtem Isobutanol überschichtet. Nach dem Auspolymerisieren des Trenngels wurde das Isobutanol vollständig entfernt, das Sammelgel in der oben angegebenen Zusammensetzung gemischt, auf das Trenngel gegossen und ein Kamm (14, 12 oder 10 Taschen) eingesetzt.

Tabelle 14: Zusammensetzung von Trenngel und Sammelgel

	7,5 %	**10 %**	**12,5 %**	**Sammelgel**
30 % (m/V) Acrylamidlösung	10 (3) ml	13 (3,9) ml	16,25 (4,9) ml	0,76 ml
2 % (m/V) Bisacrylamidlösung	4 (1,2) ml	5 (1,5) ml	6 (1,8) ml	0,3 ml
3 M Tris pH 8,8	5 (1,5) ml	5 (1,5) ml	5 (1,5) ml	-
1 M Tris pH 6.8	-	-	-	0,76 ml
10 % (m/V) SDS	0,4 (0,12) ml	0,4 (0,12) ml	0,4 (0,12) ml	0,06 ml
60 % (m/V) Saccharose	-	-	-	1,5 ml
H_2O	20,5 (6,2) ml	16,5 (4,9) ml	12,25 (3,7) ml	2,6 ml
TEMED	40 (12) µl	40 (12) µl	40 (12) µl	8 µl
10 % (m/V) APS	250 (75) µl	250 (75) µl	250 (75) µl	80 µl
Trennbereich	40-200 kDa	30-130 kDa	20-100 kDa	-

Die Elektrophorese erfolgte in 1 x Tris-Glyzin-Puffer bei einer konstanten Stromstärke von 50 mA [Gelapparatur (a)] bzw. bei einer konstanten Spannung von 110 V [Gelapparatur (b)]. Von den zu analysierenden Proben wurden je nach Gelgröße 20 µg bis 120 µg Protein mit mindestens 20 % (V/V) 5 x SDS-Probenpuffer versetzt. Die Proteine wurden vor dem Auftragen für 5 min bei 95 °C denaturiert und anschließend in die Geltaschen geladen und aufgetrennt.

1 x Tris-Glyzin-Puffer: 50 mM Tris, pH 8,5
0,5 M Glyzin
0,1 % (m/V) SDS

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

3.3.7 Coomassie-Blau-Färbung von Polyacrylamidgelen

Nach Beendigung der SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese wurde das Trenngel in 50-100 ml Coomassie-Blau-Färbelösung über Nacht unter leichtem Schütteln auf einer Wippe inkubiert. Zum Entfärben wurde das Gel in 50-100 ml Entfärbelösung überführt und solange darin inkubiert, bis sich die blau gefärbten Proteinbanden deutlich abzeichneten und der Hintergrund farblos war.

Färbelösung: 0,025 % (m/V) *Coomassie® Brilliant Blue* R 250
10 % (V/V) Essigsäure
25 % (V/V) Isopropanol

Entfärbelösung: 10 % (V/V) Essigsäure
12,5 % (V/V) Isopropanol

3.3.8 Immunoblotting von Proteinen (*Western Blot*)

Nach Auftrennung der Proteine mittels SDS-PAGE erfolgte der Transfer der Proteine auf eine Nitrozellulosemembran (Protran® BA85, Schleicher & Schuell, Dassel). Dazu wurde das Gel luftblasenfrei auf eine in Transferpuffer äquilibrierte Nitrozellulosemembran gelegt und beides zwischen zwei Whatman®-Papiere und zwei Schwämmen zwischen zwei Plastikgitter geklemmt und in eine mit Transferpuffer gefüllte Blotkammer gestellt. Durch Anlegen einer

konstanten Spannung von 80 V erfolgte der Transfer der negativ geladenenen Proteine vom Gel auf die Nitrozellulose in einer Miniblotkammer (Sigma, Taufkirchen). Hierbei befand sich die Nitrozellulosemembran auf der Seite der Anode. Bei 10 x 8 cm großen und 1 mm dicken Gelen erfolgte die Übertragung für 45 min, bei 14 x 12,5 cm großen und 1 mm dicken Gelen für 1 h. Der Transfer von Proteinen ab einer Größe von 100 kDa erfolgte bei einer konstanten Stromstärke von 125 mA für 10 h in einer Immunoblot-Transfer-Kammer (Renner GmbH, Darmstadt).

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

3.3.9 Detektion von Proteinen mit spezifischen Antikörpern

Nach dem Blotten wurden die auf die Nitrozellulosemembran transferierten Proteine in 0,2 % (m/V) Ponceau S-Lösung gefärbt, um den Proteinstandard sichtbar zu machen und den Transfer der Proteine zu kontrollieren. Der Proteinstandard wurde markiert und die Membran anschließend in einer leicht basischen H_2O-Lösung wieder entfärbt. Zum Blockieren unspezifischer Bindungsstellen wurde die Membran für 1 h in 1 x TBS mit 5 % (m/V) Magermilchpulver (Fluka, Neu-Ulm) oder in 1 x TBS mit 2 % *ECL Advance Blocking*-Reagenz (Amersham Biosciences, Freiburg) inkubiert. Der Nachweis immunreaktiver Proteine erfolgte durch anschließende Inkubation mit dem entsprechenden primären Antikörper für 12 h bei 4 °C unter konstantem Schütteln auf einer Wippe. Der primäre Antikörper wurde, wie in Kapitel 2.6.1 beschrieben, in 0,5 % (m/V) Magermilchpulver bzw. 2 % (m/V) *ECL Advance Blocking*-Reagenz in 1 x TBS verdünnt. Anschließend wurde die Membran dreimal mit 1 x TBS für jeweils 10 min gewaschen. Die Inkubation mit dem sekundären Antikörper erfolgte für 1 h bei Raumtemperatur unter leichtem Schütteln auf einer Wippe. Der sekundäre Antikörper wurde in der in Kapitel 2.6.2 angegebenen Verdünnung in 1 x TBS eingesetzt. Nach erneutem, dreimaligem Waschen mit 1 x TBS für jeweils 10 min erfolgte die Detektion der Proteine. Je nach Modifikation des zweiten Antikörpers, d.h. die Koppelung an HRP (*horse-radish peroxidase*/Meerrettich-Peroxidase) oder alkalische Phosphatase, wurden die Protein-Antikörper-Komplexe entweder mit Hilfe des *ECL Western Blotting*-Detektionssystems (ECL) oder des *ECL Advance Western Blotting*-

Detektionssystems (ECL-*Advance*) (siehe Kapitel 3.3.9.1) bzw. durch eine Farbreaktion mittels alkalischer Phosphatase (siehe Kapitel 3.3.9.2) detektiert.

Ponceau S-Lösung: 0,2 % (m/V) Ponceau S
3 % (m/V) TCA

3.3.9.1 Nachweis immunreaktiver Proteine durch das ECL *Western Blotting*- bzw. das ECL *Advance Western Blotting*-Detektionssystem

Zum Nachweis von HRP-gekoppelten Antikörpern wurden die beiden ECL-Lösungen 1 und 2 des ECL *Western Blotting Kit* (Amersham Biosciences, Freiburg) bzw. des ECL *Advance Western Blotting Detection Kit* (Amersham Biosciences, Freiburg) im Verhältnis 1:1 gemischt und die Nitrozellulosemembran für 5 min in der Lösung inkubiert. Die Membran wurde auf eine gereinigte Glasplatte gelegt und mit Frischhaltefolie abgedeckt. In einer Dunkelkammer wurde für 1 s bis 30 min (je nach Signalstärke) ein Röntgenfilm aufgelegt und anschließend entwickelt (RTU 60 Entwickler/Fixierer, Adefo-Chemie, Dietzenbach).

3.3.9.2 Nachweis immunreaktiver Proteine mittels alkalischer Phosphatase

Zum Nachweis von alkalischer Phosphatase-gekoppelten Antikörpern wurde die Nitrozellulosemembran einmal in 10-30 ml AP-Puffer gewaschen. Zur Darstellung der Protein-Antikörper-Komplexe wurde 1 Teil NBT- und 1 Teil BCIP-Lösung mit 100 Teilen AP-Puffer gemischt und darin die Nitrozellulosemembran im Dunkeln inkubiert. Die enzymatische Aktivität der alkalischen Phosphatase-Antikörper-Komplexe führte an der jeweiligen Stelle auf dem Blot zu einer Braunfärbung in Form einer Bande. Sobald diese Banden deutlich erkennbar waren, wurde die Entwicklerlösung mit H_2O abgespült und die Nitrozellulosemembran getrocknet.

AP-Puffer: 50 mM Tris/HCl, pH 9,5
50 mM $MgCl_2$

NBT-Lösung: 3 % (m/V) 4-Nitroblau-Tetrazoliumchlorid (NBT)
in 70 % (V/V) Dimethylformamid

BCIP-Lösung: 1,5 % (m/V) 5-Brom-4-chlor-3-indolylphosphat-Toluidinsalz (BCIP) in 100 % Dimethylformamid

3.3.10 Elution gebundener Proteine von der Nitrozellulosemembran

Zur Entfernung gebundener Antikörper wurde die Nitrozellulosemembran für 5 min in Elutionspuffer unter Schütteln auf einer Wippe inkubiert. Danach wurde die Membran zweimal in einem großen Volumen H_2O (> 100 ml) für 10 min gewaschen. Anschließend erfolgte ein weiterer Waschschritt für 10 min in 1 x TBS. Daraufhin wurde der Immunblot wieder in 0,5 % Magermilchpulver (Fluka, Neu-Ulm) oder 2 % *ECL Advance Blocking*-Reagenz (Amersham Biosciences, Freiburg) in 1 x TBS inkubiert und erneut mit primären und sekundären Antikörper behandelt.

Elutionspuffer: 0,2 M Glyzin
0,5 M NaCl; pH 2,8

3.3.11 P*reloading* von GST-Rho-Fusionsproteinen mit [^{35}S]GTP[S] zur Ermittlung der aktiven Proteinkonzentration

Zur Bestimmung der Aktivität, d. h. der GTP-Bindungsfähigkeit von GST-Rho-Fusionsproteinen (siehe Kapitel 3.3.1.1), wurden die schwer hydrolysierbaren GTP-Strukturanaloga GTP[S] und [^{35}S]GTP[S] verwendet. Das Gesamtvolumen eines Probenansatzes betrug 20 µl, wobei 10 µl auf die mit XPLN-Puffer verdünnte Proteinlösung (0,1 µg und 0,2 µg GST-Rho-Fusionsproteine) und 10 µl auf das [^{35}S]GTP[S]- und GTP[S]-enthaltende Reaktionsgemisch entfielen. Durch Zugabe des Reaktionsgemisches zur Proteinlösung wurde die Reaktion gestartet. Die Inkubationszeit betrug 10 min bei 30 °C im Wasserbad. Die Reaktion wurde durch die Zugabe von 2 ml kaltem Stopp-Puffer (4 °C) beendet und die Proben über feuchte Nitrozelluloserundfilter (∅ 32 mm, Advanced Microdevices, Ambala Cantonment, Indien) filtriert. Anschließend wurden die Filter dreimal mit je 2 ml Stopp-Puffer gewaschen, in Szintillationsgefäßen für 30 min getrocknet und mit 4 ml Szintillationsflüssigkeit (Zinsser Analytic, Frankfurt) versetzt. Nach gutem Durchmischen der Proben wurde die auf den Filtern zurückgehaltene Radioaktivität im Flüssigszintillationszähler (Tri-Carb 2200 CA, Packard, Dreieich) gemessen (cpm_{Probe}). Jeder

Wert wurde durch Dreifachbestimmung ermittelt. Die Gesamtmenge eingesetzter Radioaktivität im Ansatz wurde durch direktes Messen von 10 µl Reaktionsgemisch in 4 ml Szintillationsflüssigkeit bestimmt (cpm_{Total}). Unspezifische Bindungen von [^{35}S]GTP[S] wurden durch Messungen von Ansätzen bestimmt, in denen durch Zugabe von 1 mM GTP[S] die Bindung von [^{35}S]GTP[S] weitgehend verhindert wurde ($cpm_{unspezifisch}$).

XPLN-Puffer:	20 mM HEPES, pH 7,4
	1 % (V/V) Triton X-100
	150 mM NaCl
	10 mM $MgCl_2$
	10 µg/ml Aprotinin
	10 µg/ml Leupeptin
Reaktionsgemisch:	80 mM Tris/HCl, pH 7,5
	8 mM $MgCl_2$
	9 mM DTT
	100 mM NaCl
	20 mM EDTA
	8 nM [^{35}S]GTP[S]
	4 µM GTP[S]
Endkonzentrationen im Probenansatz:	50 mM Tris/HCl, pH 7,5
	5 mM $MgCl_2$
	5 mM DTT
	50 mM NaCl
	10 mM EDTA
	4 nM [^{35}S]GTP[S]
	2 µM GTP[S]
Stopp-Puffer:	50 mM Tris/HCl, pH 8,0
	50 mM NaCl
	5 mM $MgCl_2$

Die in den einzelnen Ansätzen enthaltene Menge GTP-bindender Proteine wurde wie folgt berechnet und so der Anteil an aktivem Protein bestimmt:

$$X = \frac{(Z + Y) \times (n_1 - n_2)}{n_3}$$

X: GTP-bindende Proteine [fmol]

Z: [^{35}S]GTP[S] im Ansatz [fmol]

Y: GTP[S] im Ansatz [fmol]

n_1: cpm_{Probe}

n_2: $cpm_{unspezifisch}$

n_3: cpm_{Total}

3.3.12 Präparation von partikulären und löslichen Zellfraktionen

Um die Verteilung von Proteinen in der Zelle zu analysieren, wurde eine subzelluläre Fraktionierung durchgeführt. Dazu wurden aus dem Gesamtzelllysat eine lösliche Zellfraktion (zytosolische Fraktion oder S100-Fraktion) und eine partikuläre Fraktion (membranhaltige Fraktion oder P100-Fraktion) durch Ultrazentrifugation bei 100 000 x g gewonnen.

Für die Gewinnung der partikulären und der löslichen Fraktionen von PANC-1-Zellen wurden die Zellen bis zur Konfluenz in Wachstumsmedium gezogen und anschließend zweimal mit 5 ml eiskaltem 1 x CMF-PBS pro 100 mm-Schale gewaschen. Nach Zugabe von 250 µl HEPES-Puffer wurden die Zellen mit Hilfe eines Zellschabers vom Boden der Kulturschale gelöst, das Lysat mit einer Gilson-Pipette 5-mal auf- und abpipettiert und in ein auf Eis vorgekühltes 1,5 ml-Reaktionsgefäß überführt. Zur Lyse wurden die Zellen 10-mal durch eine Kanüle (Gr. 18, 0,45 x 25 mm) in eine 1 ml Tuberkulin-Spritze aufgezogen. Zellbruchstücke, Zellkerne und nicht lysierte Zellen wurden durch Zentrifugation bei 2500 Upm und 4 °C für 10 min abgetrennt (Tischzentrifuge 5417-C, Eppendorf, Hamburg). Der Überstand wurde in ein 1,5 ml-Ultrazentrifugationsgefäß überführt und das Pellet verworfen. Um die Membran zu pelletieren, wurde bei 40000 Upm (entspricht 100 000 x g) und 4 °C für 60 min zentrifugiert (Optima TLX, Rotor TLA.45, Beckman Instruments, München). Der Überstand mit der löslichen Fraktion (S100) wurde abgenommen und in ein neues 1,5 ml-Reaktionsgefäß überführt. Das Pellet wurde dreimal mit 250 µl HEPES-Puffer gewaschen und zwischen den Waschschritten bei 40000 Upm und 4 °C für 15 min zentrifugiert (Optima TLX, Rotor TLA.45). Der Überstand wurde verworfen, das Pellet mit einer Hamilton-Spritze trocken gesaugt und in 100 µl XPLN-Puffer mit einem Pistill homogenisiert, um die partikuläre

Fraktion (P100) zu erhalten. Anschließend wurde von beiden Fraktionen die Proteinkonzentration bestimmt (siehe Kapitel 3.3.5).

HEPES-Puffer: 50 mM HEPES, pH 7,6
8,6 % (m/V) Saccharose
10 mM EDTA
10 mM EGTA
1 mM PMSF
40 µg/ml Leupeptin
400 µg/ml Trypsin-Inhibitor (aus Sojabohnen)
40 µg/ml Pepstatin A

XPLN-Puffer: 20 mM HEPES, pH 7,4
1 % (V/V) Triton X-100
150 mM NaCl
10 mM $MgCl_2$
10 µg/ml Aprotinin
10 µg/ml Leupeptin

3.3.13 Präparation von caveolinhältigen Zellkompartimenten

(Niv *et al.*, 2002)

Um die Verteilung von Proteinen in caveolinhältigen Zellkompartimenten, sogenannten *lipid-rafts*, zu untersuchen, wurden diese *lipid-rafts* extrahiert. Es wurden Zellen von EGFP-, EGFP-RhoA- und EGFP-RhoC-exprimierenden PANC-1-Zellen bis zur Konfluenz in Wachstumsmedium gezogen und anschließend zweimal mit 10 ml eiskaltem 1 x CMF-PBS pro Zellkulturflasche (150 cm^2) gewaschen. Nach Zugabe von 800 µl Lysispuffer wurden die Zellen mit Hilfe eines Zellschabers vom Boden der Zellkulturflasche gelöst, das Lysat in einem Dounce-Glashomogenisator mit Glaspistill durch 10 Hübe homogenisiert und in ein auf Eis vorgekühltes 1,5 ml-Ultrazentrifugationsgefäß überführt. Zur Gewinnung der Membranfraktion wurde das Lysat bei 40000 Upm und 4 °C für 30 min (Optima TLX Ultrazentrifuge, Rotor TLA.45, Beckman Instruments, München) zentrifugiert und danach der Überstand verworfen. Das Membranpellet wurde in 2 ml Lysispuffer resuspendiert und in ein

auf Eis vorgekühltes 13 ml-Polypropylenröhrchen überführt. Nun wurde das Membran-Homogenat mit 2 ml 90 % (m/V) Saccharose in MBS-Puffer vermischt und anschließend mit 4 ml 35 % (m/V) Saccharose in MBS-Puffer mit 250 mM Na_2CO_3 und 4 ml 5 % (m/V) Saccharose in MBS-Puffer mit 250 mM Na_2CO_3 überschichtet. Danach erfolgte die Zentrifugation bei 39000 Upm und 4 °C für 16-20 h (Sorvall, Rotor SW41, Kendro, Hanau). Dann wurden 12-mal 1 ml Portionen von oben, dem Saccharose-Gradienten folgend, abgenommen und jede Fraktion in ein eigenes, auf Eis vorgekühltes 2 ml-Reaktionsgefäß überführt.

Zur Fällung der Proteine wurden 1 ml 20 % (m/V) TCA pro 1 ml Probe zugegeben, die Proben für 45 min auf Eis inkubiert und dann bei 13000 Upm und 4 °C für 5 min zentrifugiert (Tischzentrifuge 5417-C, Eppendorf, Hamburg). Der Überstand wurde verworfen. Die Pellets wurden mit 1 ml 2 % (m/V) Natriumazetat in 100 % Ethanol überschichtet und nochmals bei 13000 Upm und 4 °C für 5 min zentrifugiert. Der Überstand wurde abermals verworfen und die Pellets mit 100 µl 5 x SDS-Probenpuffer versetzt und die Proteine in einem 10 %igen SDS-Polyacrylamidgel aufgetrennt (siehe Kapitel 3.3.6).

Lysispuffer: 500 mM Na_2CO_3, pH 11

MBS-Puffer: 25 mM MES, pH 6,5
150 mM NaCl

3.3.14 Herstellung von Zelllysaten

Zur Herstellung von Zelllysaten wurden PANC-1-Zellen bis zu einer Konfluenz von 90-95 % kultiviert. Das Medium wurde abgesaugt und die Zellen zweimal mit 5 ml eiskaltem 1 x CMF-PBS gewaschen. Nach Zugabe von 500 µl (für 100 mm-Schalen) bzw. 200 µl (für 60 mm-Schalen) XPLN-Puffer wurden die Zellen mit einem Zellschaber vom Schalenboden gelöst. Das Lysat wurde sofort in ein auf Eis vorgekühltes 1,5 ml-Reaktionsgefäß transferiert und danach mit einer Spritze (Tuberkulin-Spritze 1 ml; Kanüle Gr. 18, 0,45 x 25 mm) durch 5-maliges Aufziehen homogenisiert. Die Lysate wurden bei 14000 Upm und 4 °C für 10 min zentrifugiert (Tischzentrifuge 5417-C, Eppendorf, Hamburg), um unlösliche Zellbestandteile abzutrennen. Die löslichen Proteine im Überstand wurden in ein neues Reaktionsgefäß überführt und die Proteinkonzentration bestimmt (siehe Kapitel 3.3.5).

XPLN-Puffer: 20 mM HEPES, pH 7,4
0,1 % (V/V) Triton X-100
150 mM NaCl
10 mM $MgCl_2$
10 µg/ml Aprotinin
10 µg/ml Leupeptin

3.3.15 Immunpräzipitation

Die Immunpräzipitation von Proteinen mittels spezifischer Antikörper ermöglicht die selektive Anreicherung eines Proteins aus einem Zelllysat. Dies wird durch Bindung spezifischer Antikörper an Immunglobulin-Fc-Bindungsstellen (Fc: *fragment crystallizable*) von Protein A oder Protein G erreicht. Die verwendeten Protein A- bzw. Protein G-Moleküle sind an Agarose-*beads* gebunden und können somit aus der Proteinlösung über Zentrifugation sedimentiert werden.

Zunächst wurden 0,5-1 µg Antikörper in 500 µl Lysispuffer mit 20-40 µl Protein A- oder G-Agarose für 45 min im Überkopf-Rotor bei 4 °C inkubiert, um die Antikörper an die *beads* zu binden. Gleichzeitig wurde Zelllysat mit einer Proteinmenge von 1-10 mg mit 15-20 µl Protein A- oder Protein G-Agarose/mg Protein und 0,2 µg Protein von IgG_{2a} Maus/mg Protein (0,1 mg/ml, DakoCytomation, Hamburg) für 1 h im Überkopf-Rotor bei 4 °C inkubiert. Dieser Ansatz stellte die Vorreinigung (*pre-clearing*) des Zelllysates dar. Dabei sollten Moleküle aus dem Ansatz entfernt werden, die unspezifisch an Protein A- oder Protein-G-Agarose bzw. IgG-Moleküle binden und das Ergebnis verfälschen würden. Nach der Inkubation wurden beide Ansätze bei 3000 Upm und 4 °C für 1 min (Tischzentrifuge 5417-C, Eppendorf, Hamburg) zentrifugiert und die Agarose-*beads* dadurch präzipitiert. Das vorgereinigte Zelllysat wurde zu den mit Antikörper angereicherten Agarose-*beads* gegeben. Die Immunpräzipitation des gewünschten Proteins erfolgte für 2 h im Überkopf-Rotor bei 4 °C. Danach wurden die Agarose-*beads* viermal mit 1 ml Lysispuffer oder einem spezifischen Waschpuffer gewaschen. Zwischen den Waschschritten wurde der Ansatz jeweils für 10 min im Überkopf-Rotor bei 4 °C inkubiert und dann bei 3000 Upm für 1 min (Tischzentrifuge) zentrifugiert. Nach dem letzten Waschschritt wurden die Agarose-*beads* mit einer Hamilton-Spritze trocken gesaugt, mit 20-40 µl 5 x SDS-Probenpuffer versetzt (siehe Kapitel 3.3.6) und 10 min bei 95 °C gekocht. Nach der elektrophoretischen Auftrennung in einem SDS-Polyacrylamidgel (siehe Kapitel 3.3.6) wurde in der Immunblotanalyse ein spezifischer

Antikörper zur Detektion des immunpräzipitierten bzw. des co-immunpräzipitierten Proteins eingesetzt (siehe Kapitel 3.3.9).

3.3.15.1 Immunpräzipitation mit anti-GFP-Antikörper

Zur Analyse von Interaktionspartnern der Rho-GTPasen RhoA und RhoC wurden Zelllysate von EGFP-, EGFP-RhoA- und EGFP-RhoC-exprimierenden PANC-1-Zellen hergestellt. Je Probe wurden 5 mg Zelllysat zur Vorreinigung mit 15-20 µl Protein G-Agarose und 1 µg IgG_{2a} Maus (DakoCytomation, Hamburg) für 1 h im Überkopf-Rotor bei 4 °C inkubiert. Gleichzeitig wurden 1 µg monoklonaler anti-GFP-Antikörper (Biomol, Hamburg) in 500 µl Lysispuffer mit 20 µl Protein G-Agarose für 45 min im Überkopf-Rotor bei 4 °C inkubiert. Nach der Inkubation wurden die Ansätze bei 3000 Upm und 4 °C für 1 min (Tischzentrifuge 5417-C, Eppendorf, Hamburg) zentrifugiert und die Agarose-*beads* dadurch präzipitiert. Die vorgereinigten Zelllysate wurden zu den mit GFP-Antikörper angereicherten Agarose-*beads* gegeben. Die Immunpräzipitation von EGFP-Rho erfolgte für 2 h im Überkopf-Rotor bei 4 °C. Danach wurden die Agarose-*beads* viermal mit je 1 ml Lysispuffer gewaschen. Zwischen den Waschschritten wurde der Ansatz jeweils für 10 min im Überkopf-Rotor bei 4 °C inkubiert und dann bei 3000 Upm für 1 min (Tischzentrifuge) zentrifugiert. Nach dem letzten Waschschritt wurden die Agarose-*beads* mit einer Hamilton-Spritze trocken gesaugt, mit 20 µl 5 x SDS-Probenpuffer versetzt (siehe Kapitel 3.3.6) und 10 min bei 95 °C gekocht. Nach der elektrophoretischen Auftrennung in einem 12,5 %igen SDS-Polyacrylamidgel (siehe Kapitel 3.3.6) wurde in der Immunblotanalyse für die Detektion der immunpräzipitierten EGFP-Rho-Proteine ein monoklonaler Peroxidase-konjugierter anti-GFP Antikörper (Miltenyi-Biotec, Bergisch-Gladbach) in der Verdünnung 1:4000 verwendet.

Lysispuffer:
20 mM HEPES, pH 7,4
0,1 % (V/V) Triton X-100
150 mM NaCl
10 mM $MgCl_2$
10 µg/ml Aprotinin
10 µg/ml Leupeptin

3.3.15.2 Immunpräzipitation mit anti-GFP-Antikörper zur Analyse von EGFP-Rho/RhoGDI-Proteinkomplexen

Um die Interaktion von EGFP-Rho-Proteinen und RhoGDIs nachzuweisen, wurden Zelllysate von EGFP-, EGFP-RhoA- und EGFP-RhoC-exprimierenden PANC-1-Zellen hergestellt. Durch subzelluläre Fraktionierung des Gesamtzelllysat durch Ultrazentrifugation bei 100 000 x g wurden eine lösliche Zellfraktion (S100-Fraktion) und eine partikuläre Fraktion (P100-Fraktion) gewonnen (siehe Kapitel 3.3.12). Je Probe wurden 3 mg der S100-Fraktion und 0,3 mg der P100-Fraktion zur Vorreinigung mit 15-20 µl Protein G-Agarose für 1 h im Überkopf-Rotor bei 4 °C inkubiert. Gleichzeitig wurden 1 µg monoklonaler anti-GFP-Antikörper (Biomol, Hamburg) in 500 µl IP-Puffer mit 20 µl Protein G-Agarose für 45 min im Überkopf-Rotor bei 4 °C inkubiert. Nach der Inkubation wurden die Ansätze bei 3000 Upm und 4 °C für 1 min (Tischzentrifuge 5417-C, Eppendorf, Hamburg) zentrifugiert und die Agarose-*beads* dadurch präzipitiert. Die vorgereinigten Zelllysate wurden zu den mit Antikörper angereicherten Agarose-*beads* gegeben. Die Immunpräzipitation von EGFP-Rho erfolgte für 2 h im Überkopf-Rotor bei 4 °C. Danach wurden die Agarose-*beads* viermal mit je 1 ml IP-Puffer gewaschen. Zwischen den Waschschritten wurde der Ansatz jeweils für 10 min im Überkopf-Rotor bei 4 °C inkubiert und dann bei 3000 Upm für 1 min (Tischzentrifuge) zentrifugiert. Nach dem letzten Waschschritt wurden die Agarose-*beads* mit einer Hamilton-Spritze trocken gesaugt, mit 20 µl 5 x SDS-Probenpuffer versetzt (siehe Kapitel 3.3.6) und 10 min bei 95 °C gekocht. Nach der elektrophoretischen Auftrennung in einem 12,5 %igen SDS-Polyacrylamidgel (siehe Kapitel 3.3.6) wurde in der Immunblotanalyse für die Detektion der immunpräzipitierten EGFP-Rho-Proteine ein monoklonaler, Peroxidase-konjugierter anti-GFP-Antikörper (Miltenyi-Biotec, Bergisch-Gladbach) in der Verdünnung 1:4000 verwendet. Für die Detektion des co-immunpräzipitierten RhoGDIα wurde ein polyklonaler anti-RhoGDI (K-21)-Antikörper (Santa Cruz Biotech. Inc., Heidelberg) in der Verdünnung 1:1000 verwendet. Das co-immunpräzipitierte RhoGDIβ wurde mit einem polyklonalen anti-LyGDI (C-20)-Antikörper (Santa Cruz Biotech. Inc., Heidelberg) in der Verdünnung 1:1000 detektiert.

IP-Puffer:
20 mM HEPES, pH 7,4
0,1 % (V/V) Triton X-100
150 mM NaCl
5 mM $MgCl_2$
10 µg/ml Aprotinin

10 µg/ml Leupeptin

3.3.15.3 Immunpräzipitation mit µMACS™ anti-GFP *MicroBeads* zur Analyse von p120ctn/EGFP-Rho-Proteinkomplexen

Um die Bindung von p120ctn an EGFP-Rho-Proteine nachzuweisen, wurden Zelllysate von EGFP-, EGFP-RhoA- und EGFP–RhoC-exprimierenden PANC-1-Zellen mit µMACS™ anti-GFP *MicroBeads*, enthalten im µMACS™ *Epitope Tagged Protein Isolation Kit* (Miltenyi-Biotech, Bergisch-Gladbach), inkubiert, um entsprechende Protein-Protein-Komplexe zu isolieren. Bei diesem System werden Proteinkomplexe mit Hilfe von anti-GFP-Antikörper-haltigen, magnetischen *MicroBeads* aus Zelllysaten immunpräzipitiert und über sogenannte µ-Säulen (Miltenyi-Biotech, Bergisch-Gladbach), die sich in einem magnetischen Feld befinden, gereinigt.

Hierzu wurde je Probe Zelllysat mit einer Proteinmenge von 9 mg einer Vorreinigung durch Zugabe von 20 µl Protein G-Agarose und 1,8 µg Maus-IgG_{2a} (DakoCytomation, Hamburg) unterzogen und für 1 h im Überkopf-Rotor bei 4 °C inkubiert. Danach wurde der Ansatz bei 3000 Upm und 4 °C für 1 min (Tischzentrifuge 5417-C, Eppendorf, Hamburg) zentrifugiert und die Agarose-*beads* und die Antikörper dadurch präzipitiert. Zu dem vorgereinigten Zelllysat wurden anschließend 50 µl µMACS™ anti-GFP *MicroBeads* zugegeben und für 1 h im Überkopf-Rotor bei 4 °C inkubiert. Des Weiteren wurde ein Ansatz mit 50 µl µMACS™ anti-GFP *MicroBeads* mit 500 µl XPLN-Puffer versetzt. Um die entstandenen Proteinkomplexe anzureichern, wurden die Ansätze auf µ-Säulen aufgetragen. Die Säulen waren zuvor in einem µMACS-Magneten (Separator) platziert und mit 200 µl XPLN-Puffer äquilibriert worden. Nach Applikation der Proben wurden die Säulen viermal mit 500 µl XPLN-Puffer gewaschen. Um Detergentien und Salze zu entfernen, wurden die Säulen anschließend zweimal mit 500 µl Waschpuffer gewaschen. Zur Vorbereitung der Elution der Proteinkomplexe wurden zunächst 20 µl 95 °C heißer Elutionspuffer auf die µ-Säulen gegeben und für 5 min inkubiert. Die Elution der Proteine erfolgte durch Zugabe von 50 µl heißem Elutionspuffer. Das Eluat wurde in 1,5 ml-Reaktionsgefäßen aufgefangen und mit 10 µl 5x SDS-Probenpuffer (siehe Kapitel 3.3.6) versetzt. Die Proben wurden 5 min bei 95 °C gekocht und anschließend direkt für die SDS-PAGE (siehe Kapitel 3.3.6) verwendet. Nach der elektrophoretischen Auftrennung in einem 12,5 %igen SDS-Polyacrylamidgel wurde in der Immunblotanalyse für die Detektion der immunpräzipitierten EGFP-Rho-Proteine ein monoklonaler Peroxidase-konjugierter anti-GFP Antikörper (Miltenyi-Biotec, Bergisch-

Gladbach) in der Verdünnung 1:4000 verwendet. Für die Detektion von co-immunpräzipitiertem p120ctn wurde ein monoklonaler p120ctn-Antikörper (BD Biosciences, Heidelberg) in der Verdünnung 1:2000 verwendet.

XPLN-Puffer: 20 mM HEPES, pH 7,4
0,1 % (V/V) Triton X-100
150 mM NaCl
10 mM $MgCl_2$
10 µg/ml Aprotinin
10 µg/ml Leupeptin

Waschpuffer: 20 mM Tris/HCl, pH 7,5

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

3.3.16 Präzipitation von p120ctn aus PANC-1-Zelllysaten mittels GST-Rho-Fusionsproteinen

Für diese *in vitro*-Bindungsstudie mit rekombinanten Proteinen und Proteinen aus Zelllysaten wurden PANC-1-Zellen bis zur Konfluenz in Zellkulturschalen (100 mm) kultiviert und Zelllysate in 300 µl XPLN-Puffer je Zellkulturschale hergestellt (siehe Kapitel 3.3.14). Es wurde eine Proteinbestimmung mit BCA-Reagenz (siehe Kapitel 3.3.5) durchgeführt. Für jede Probe wurden 3-5 mg Protein aus PANC-1-Zelllysat und 20 µl Glutathion-Sepharose 4B in einem 1,5 ml-Reaktionsgefäß vermischt und für 1 h im Überkopf-Rotor bei 4 °C inkubiert. Durch diese Vorreinigung des Zelllysats sollten Proteine, die eventuell unspezifische Bindungen mit den Glutathion-Sepharose-*beads* eingehen, aus dem Zelllysat entfernt werden, da diese das Ergebnis verfälschen könnten. Anschließend wurden die Ansätze bei 3000 Upm und 4 °C für 1 min (Tischzentrifuge 5417-C, Eppendorf, Hamburg) zentrifugiert und die Überstände in frische 1,5 ml-Reaktionsgefäße überführt und für den weiteren Versuch

verwendet. Zu den vorgereinigten PANC-1-Zelllysaten wurden 30 µg GST-Proteine bzw. GST-Rho-Fusionsproteine gegeben und die Ansätze über Nacht (für mind. 16 h) im Überkopf-Rotor bei 4 °C inkubiert. Die in diesem Versuch verwendeten GST-Proteine und GST-Rho-Fusionsproteine waren, wie in Kapitel 3.3.1.1 beschrieben, exprimiert und gereinigt worden. Nach der Inkubation über Nacht wurden zu jeder Probe 20 µl Glutathion-Sepharose 4B zugegeben und für 2 h im Überkopf-Rotor bei 4 °C inkubiert. Nach diesem Inkubationsschritt wurden die Proben zweimal mit je 1 ml XPLN-Puffer gewaschen und zwischen den Waschschritten jeweils für 10 min im Überkopf-Rotor bei 4 °C inkubiert, um ungebundene Proteine entfernen zu können. Anschließend erfolgte jeweils ein Zentrifugationsschritt bei 3000 Upm und 4 °C für 1 min (Tischzentrifuge) und der Überstand wurde verworfen. Die Glutathion-Sepharose-*beads* wurden nach dem letzten Waschschritt mit einer Hamilton-Spritze trocken gesaugt, mit je 30 µl 5 x SDS-Probenpuffer versetzt (siehe Kapitel 3.3.6) und die Proben für 5 min bei 95 °C gekocht. Nach der elektrophoretischen Auftrennung in einem 10 %igen SDS-Polyacrylamidgel (siehe Kapitel 3.3.6) und Transfer der Proteine auf Nitrozellulose für 10 h bei 125 mA wurde in der Immunblotanalyse ein monoklonaler anti-p120ctn-Antikörper (BD Biosciences, Heidelberg) in der Verdünnung 1:2000 zur Detektion von präzipitiertem p120ctn eingesetzt.

XPLN-Puffer: 20 mM HEPES, pH 7,4
0,1 % (V/V) Triton X-100
150 mM NaCl
10 mM $MgCl_2$
10 µg/ml Aprotinin
10 µg/ml Leupeptin

3.3.17 Präzipitation von p120ctn aus PANC-1-Zelllysaten mittels ADP-ribosylierter GST-Rho-Fusionsproteine

Für diese *in vitro*-Bindungsstudie wurden rekombinante GST-Rho-Fusionsproteine und GST-Proteine verwendet, die in *E. coli* exprimiert und anschließend mit Hilfe von Glutathion-Sepharose 4B affinitätschromatographisch gereinigt wurden (siehe Kapitel 3.3.1.1). Anschließend wurden die GST-Rho-Fusionsproteine, wie in Kapitel 3.3.4.1 beschrieben, mit GST-C3lim behandelt und dadurch ADP-ribosyliert, d. h. die Rho-Proteine inaktiviert. GST-C3lim wurde, wie in Kapitel 3.3.4 beschrieben, in *E. coli* exprimiert. PANC-1-Zellen wurden

bis zur Konfluenz in Zellkulturschalen (100 mm) kultiviert und Zelllysate in 300 µl XPLN-Puffer je Zellkulturschale hergestellt (siehe Kapitel 3.3.14). Es wurde eine Proteinbestimmung mit BCA-Reagenz (siehe Kapitel 3.3.5) durchgeführt. Für jeden Ansatz wurden 3 mg Protein aus PANC-1-Zelllysat und 20 µl Glutathion-Sepharose 4B in einem 1,5 ml-Reaktionsgefäß vermischt und für 1 h im Überkopf-Rotor bei 4 °C inkubiert. Durch diese Vorreinigung des Zelllysats sollten Proteine, die eventuell unspezifische Bindungen mit den Glutathion-Sepharose-*beads* eingehen, aus dem Zelllysat entfernt werden, da diese das Ergebnis verfälschen könnten. Anschließend wurden die Ansätze bei 3000 Upm und 4 °C für 1 min (Tischzentrifuge 5417-C, Eppendorf, Hamburg) zentrifugiert und die Überstände in frische 1,5 ml-Reaktionsgefäße überführt und für den weiteren Versuch verwendet. Zu den vorgereinigten PANC-1-Zelllysaten wurden 30 µg ADP-ribosylierte GST-Rho-Fusionsproteine bzw. GST-C3lim gebunden an Glutathion-Sepharose-*beads* gegeben. Des Weiteren wurden 30 µg nicht-ADP-ribosylierte GST-Rho-Fusionsproteine bzw. GST-Proteine und dem Zusatz von 30 µl Glutathion-Sepharose-*beads* mit PANC-1-Zelllysat inkubiert. Die Ansätze wurden für 2 h im Überkopf-Rotor bei 4 °C inkubiert. Nach diesem Inkubationsschritt wurden die Proben zweimal mit 1 ml XPLN-Puffer gewaschen und zwischen den Waschschritten für 10 min im Überkopf-Rotor bei 4 °C inkubiert, um ungebundene Proteine zu entfernen. Anschließend erfolgte jeweils ein Zentrifugationsschritt bei 3000 Upm und 4 °C für 1 min (Tischzentrifuge) und der Überstand wurde verworfen. Die Glutathion-Sepharose-*beads* wurden nach dem letzten Waschschritt mit einer Hamilton-Spritze trocken gesaugt, mit je 30 µl 5 x SDS-Probenpuffer versetzt (siehe Kapitel 3.3.6) und die Proben für 5 min bei 95 °C gekocht. Nach der elektrophoretischen Auftrennung in einem 10 %igen SDS-Polyacrylamidgel (siehe Kapitel 3.3.6) und Transfer der Proteine auf Nitrozellulose für 10 h bei 125 mA wurde in der Immunblotanalyse ein monoklonaler anti-p120ctn-Antikörper (BD Biosciences, Heidelberg) in der Verdünnung 1:2000 zur Detektion von präzipitiertem p120ctn eingesetzt.

XPLN-Puffer: 20 mM HEPES, pH 7,4
0,1 % (V/V) Triton X-100
150 mM NaCl
10 mM $MgCl_2$
10 µg/ml Aprotinin
10 µg/ml Leupeptin

3.3.18 Präzipitation von EGFP-RhoC aus Zelllysat mittels GST-mp120ctn 1N-Fusionsproteinen

Für diese *in vitro*-Bindungsstudie wurden rekombinante GST-mp120ctn 1N-Fusionsproteine (murines p120ctn Isoform 1N) verwendet, die in *E. coli* exprimiert und anschließend mit Hilfe von Glutathion-Sepharose 4B affinitätschromatographisch gereinigt worden waren (siehe Kapitel 3.3.1.2). EGFP-, EGFP-RhoA- und EGFP–RhoC-exprimierende PANC-1-Zellen wurden bis zur Konfluenz in Zellkulturschalen (100 mm) kultiviert und Zelllysate in 300 µl XPLN-Puffer je Zellkulturschale hergestellt (siehe Kapitel 3.3.14). Es wurde eine Proteinbestimmung mit BCA-Reagenz (siehe Kapitel 3.3.5) durchgeführt. Zur Entfernung von Proteinen aus dem Zelllysat, die unspezifisch mit Glutathion-Sepharose 4B interagieren, wurden je Ansatz 8-15 mg Protein aus Zelllysat mit 30 µl Glutathion-Sepharose 4B gemischt und für 1 h im Überkopf-Rotor bei 4 °C inkubiert. Danach wurde der Ansatz bei 3000 Upm und 4 °C für 1 min (Tischzentrifuge 5417-C, Eppendorf, Hamburg) zentrifugiert und der Überstand weiter verwendet. Parallel dazu wurden je Ansatz 30 µg GST-mp120ctn 1N und 25 µl Glutathion-Sepharose 4B für 1 h im Überkopf-Rotor bei 4 °C inkubiert. Anschließend wurde dieser Ansatz bei 3000 Upm und 4 °C für 1 min (Tischzentrifuge) zentrifugiert und der Überstand verworfen. Die Glutathion-Sepharose-*beads* mit den gekoppelten GST-Fusionsproteinen wurden mit dem vorgereinigten PANC-1-Zelllysat versetzt und für 2 h im Überkopf-Rotor bei 4 °C inkubiert. Zur Kontrolle von GST-mp120ctn 1N in Hinsicht auf die Höhe der Bande im SDS-Polyacrylamidgel wurde eine Probe mitgeführt, die statt Zelllysat nur Puffer enthielt. Nach der Inkubation wurden die Proben viermal mit 1 ml XPLN-Puffer gewaschen und zwischen den Waschschritten für 10 min im Überkopf-Rotor bei 4 °C inkubiert. Anschließend erfolgte jeweils ein Zentrifugationsschritt bei 3000 Upm und 4 °C für 1 min (Tischzentrifuge) und der Überstand wurde verworfen. Die Glutathion-Sepharose-*beads* wurden nach dem letzten Waschschritt mit einer Hamilton-Spritze trocken gesaugt, mit je 25 µl 5 x SDS-Probenpuffer versetzt (siehe Kapitel 3.3.6) und die Proben im Heizblock für 5 min bei 95 °C gekocht. Nach der elektrophoretischen Auftrennung in einem 12,5 %igen SDS-Polyacrylamidgel (siehe Kapitel 3.3.6) und Transfer der Proteine auf Nitrozellulose für 1 h bei 80 V wurde in der Immunblotanalyse ein monoklonaler, Peroxidase-konjugierter anti-GFP-Antikörper (Miltenyi-Biotech, Bergisch-Gladbach) in der Verdünnung 1:4000 zur Detektion von präzipitiertem EGFP-Rho eingesetzt.

XPLN-Puffer: 20 mM HEPES, pH 7,4
0,1 % (V/V) Triton X-100
150 mM NaCl
10 mM $MgCl_2$
10 µg/ml Aprotinin
10 µg/ml Leupeptin

3.3.19 Translokation von Rho-GTPasen aus der Plasmamembran durch RhoGDIs

(Illenberger *et al*., 1998)

Um die Translokation von Rho-GTPasen mittels RhoGDIs aus der Plasmamembran von PANC-1-Zellen nachzuweisen, wurde die partikuläre Zellfraktion von EGFP-, EGFP-RhoA- und EGFP-RhoC-exprimierenden PANC-1-Zellen gewonnen (siehe Kapitel 3.3.12). Die in diesem Versuch verwendeten GST-Proteine und GST-RhoGDIα-Fusionsproteine waren, wie in Kapitel 3.3.1.3 beschrieben, exprimiert und aufgereinigt worden. Von der partikulären Zellfraktion wurden 80-250 µg Protein mit 40 µM gereinigtem, rekombinanten GST-Protein oder GST-RhoGDIα-Fusionsprotein in 1,5 ml-Ultrazentrifugationsgefäßen vermischt, mit Translokationspuffer auf ein Gesamtvolumen von 100-150 µl aufgefüllt und für 4 h im Überkopf-Rotor bei 4 °C inkubiert. Die Zellmembranen wurden mittels Ultrazentrifugation bei 40000 Upm (entspricht 100 000 x g) und 4 °C für 15 min (Optima TLX Ultrazentrifuge, Rotor TLA.45, Beckman Instruments, München) pelletiert. Der Überstand wurde abgenommen und das Membranpellet mit 50 µl 5 x SDS-Probenpuffer versetzt (siehe Kapitel 3.3.6) und die Proben im Heizblock für 5 min bei 95 °C gekocht. Für die elektrophoretische Auftrennung in einem 12,5 %igen SDS-Polyacrylamidgel (siehe Kapitel 3.3.6) wurden 25 µl der Proben verwendet und im Immunblotverfahren (siehe Kapitel 3.3.8) analysiert. Für die Detektion von EGFP-Rho wurde ein monoklonaler anti-GFP-Antikörper (Roche, Mannheim) in der Verdünnung 1:2000 und für endogenes RhoA ein monoklonaler anti-RhoA (26C4)-Antikörper (Santa Cruz Biotech. Inc., Heidelberg) in der Verdünnung 1:500 verwendet.

Translokationspuffer: 20 mM Tris/HCl, pH 7,5
1 mM EDTA
1 mM DTT
0,1 mM PMSF

3.3.20 Bestimmung der Aktivität von Rho-Proteinen in GST-TRBD-Präzipitationsstudien

(Stähle *et al.*, 2003)

Zur Bestimmung der Rho-Aktivität, d. h. des Gehaltes an GTP-gebundenen Rho-Proteinen in Zelllysaten, wurden PANC-1-Zellen in Zellkulturschalen (100 mm) bis zum Erreichen einer Konfluenz von 95 % in Wachstumsmedium gezogen. Die Zellen wurden 24 h vor der Lyse in DMEM ohne Zusätze inkubiert. Anschließend wurden die Zellen in 500 µl Rho-RIPA-Puffer aufgenommen, mit einem Zellschaber vom Schalenboden gelöst, das Lysat sofort in ein auf Eis vorgekühltes 1,5 ml-Reaktionsgefäß transferiert und mit einer Spritze (Tuberkulin-Spritze 1 ml; Kanüle Gr. 18, 0,45 x 25 mm) durch 5-maliges Aufziehen homogenisiert. Die löslichen Bestandteile der Zelllysate wurden durch Zentrifugation bei 14000 Upm und 4 °C für 10 min (Tischzentrifuge 5417-C, Eppendorf, Hamburg) von den unlöslichen Bestandteilen getrennt. Alle Schritte wurden auf Eis und/oder bei 4 °C durchgeführt. Der Proteingehalt im Überstand wurde mittels BCA-Proteinbestimmung ermittelt (siehe Kapitel 3.3.5). Für die Bestimmung der Aktivität von Rho-Proteinen wurden 0,5-3 mg Protein in ein auf Eis vorgekühltes 1,5 ml-Reaktionsgefäß gegeben. Je Probe wurde ein Aliquot von 30-60 µg Protein vom Zelllysat abgenommen, mit 10 µl 5 x SDS-Probenpuffer versetzt (siehe Kapitel 3.3.6) und separat in einem 10 %igen SDS-Polyacrylamidgel (siehe Kapitel 3.3.6) aufgetrennt, um den gleichmäßigen Einsatz der Proteinmengen zu kontrollieren. Die verbleibenden Ansätze wurden mit Rho-RIPA-Puffer auf ein Endvolumen von 500 µl aufgefüllt. Nach Zugabe von 20-50 µg GST-TRBD, gebunden an Glutathion-Sepharose-*beads* (siehe Kapitel 3.3.2), wurden die Ansätze für 30 min im Überkopf-Rotor bei 4 °C inkubiert. Anschließend wurden die Proben viermal mit je 500 µl Rho-RBD-Waschpuffer gewaschen und zwischen den Waschschritten bei 3000 Upm und 4 °C jeweils 1 min (Tischzentrifuge) zentrifugiert. Der Überstand wurde jeweils verworfen. Danach wurden die *beads* mit einer Hamilton-Spritze trocken gesaugt, mit 20 µl 5 x SDS-Probenpuffer versetzt, die Proteine in einem 12,5 %igen SDS-Polyacrylamidgel aufgetrennt (siehe Kapitel 3.3.6) und im Immunblotverfahren analysiert (siehe Kapitel 3.3.8). Für die Detektion von EGFP-Rho-GTP wurde ein monoklonaler, Peroxidase-konjugierter anti-GFP-Antikörper (Miltenyi-Biotec, Bergisch-Gladbach) in der Verdünnung 1:4000 verwendet.

Rho-RIPA-Puffer: 50 mM Tris/HCl, pH 7,2
500 mM NaCl
10 mM $MgCl_2$

1 % (V/V) Triton X-100
0,5 % (m/V) Natrium-Deoxycholat
0,1 % (m/V) SDS
10 µg/ml Leupeptin
10 µg/ml Aprotinin
1 mM PMSF

Rho-RBD-Waschpuffer: 50 mM Tris/HCl, pH 7,2
150 mM NaCl
10 mM $MgCl_2$
1 % (V/V) Triton X-100
10 µg/ml Leupeptin
10 µg/ml Aprotinin
0,1 mM PMSF

3.3.21 Bestimmung der Aktivität von Rac1 in GST-PAK-CD-Präzipitationsstudien

(Stähle *et al.*, 2003)

Für die Bestimmung des Gehaltes an GTP-gebundenem Rac1 in Zelllysaten wurden PANC-1-Zellen in Zellkulturschalen (100 mm) bis zum Erreichen einer Konfluenz von 95 % in Wachstumsmedium gezogen. Die Zellen wurden 24 h vor der Lyse in DMEM ohne Zusätze inkubiert. Anschließend wurden die Zellen in 500 µl Rac-RIPA-Puffer aufgenommen, mit einem Zellschaber vom Schalenboden gelöst und das Lysat sofort in ein auf Eis vorgekühltes 1,5 ml-Reaktionsgefäß transferiert und mit einer Spritze (Tuberkulin-Spritze 1 ml; Kanüle Gr. 18, 0,45 x 25 mm) durch 5-maliges Aufziehen homogenisiert. Die löslichen Bestandteile der Zelllysate wurden durch Zentrifugation bei 14000 Upm und 4 °C für 10 min (Tischzentrifuge 5417-C, Eppendorf, Hamburg) von den unlöslichen Bestandteilen getrennt. Alle Schritte wurden auf Eis und/oder bei 4 °C durchgeführt. Der Proteingehalt im Überstand wurde mittels BCA-Proteinbestimmung ermittelt (siehe Kapitel 3.3.5). Für den Versuch wurden 1-3 mg Protein in ein auf Eis vorgekühltes 1,5 ml-Reaktionsgefäß gegeben. Je Probe wurde ein Aliquot von 30-60 µg Protein vom Zelllysat abgenommen, mit 10 µl 5 x SDS-Probenpuffer versetzt (siehe Kapitel 3.3.6) und separat in einem 10 %igen SDS-Polyacrylamidgel aufgetrennt (siehe Kapitel 3.3.6), um den Einsatz gleicher Mengen an Protein zu

kontrollieren. Die verbleibenden Ansätze wurden mit Rac-RIPA-Puffer auf ein Endvolumen von 500 µl aufgefüllt. Nach Zugabe von 20-50 µg GST-PAK-CD, gebunden an Glutathion-Sepharose-*beads* (siehe Kapitel 3.3.3), wurden die Ansätze für 45 min im Überkopf-Rotor bei 4 °C inkubiert. Anschließend wurden die Proben viermal mit je 500 µl PAK-Waschpuffer gewaschen und zwischen den Waschschritten bei 3000 Upm und 4 °C jeweils 1 min (Tischzentrifuge) zentrifugiert. Der Überstand wurde jeweils verworfen. Danach wurden die *beads* mit einer Hamilton-Spritze trocken gesaugt, mit 20 µl 5 x SDS-Probenpuffer versetzt und die Proteine in einem 12,5 %igen SDS-Polyacrylamidgel aufgetrennt (siehe Kapitel 3.3.6) und im Immunblotverfahren analysiert (siehe Kapitel 3.3.8). Für die Detektion von EGFP-Rac1-GTP wurde ein monoklonaler, Peroxidase-konjugierter anti-GFP-Antikörper (Miltenyi-Biotec, Bergisch-Gladbach) in der Verdünnung 1:4000 verwendet.

Rac-RIPA-Puffer:
50 mM Tris/HCl, pH 7,2
150 mM NaCl
10 mM $MgCl_2$
1 % (V/V) Triton X-100
0,5 % (m/V) Natrium-Deoxycholat
0,1 % (m/V) SDS
10 µg/ml Leupeptin
10 µg/ml Aprotinin
1 mM PMSF

PAK-Waschpuffer:
50 mM Tris/HCl, pH 7,2
150 mM NaCl
10 mM $MgCl_2$
1 % (V/V) Triton X-100
10 µg/ml Leupeptin
10 µg/ml Aprotinin
0,1 mM PMSF

3.4 Zellbiologische Methoden

3.4.1 Kultivierung eukaryontischer Zellen

Die in der vorliegenden Arbeit verwendeten Zelllinien wachsen adhärent und wurden in Wachstumsmedium (siehe Kapitel 2.11.2) bei 37 °C, 10 % CO_2 und 90 % relativer Luftfeuchtigkeit in einem CO_2-Inkubator (Typ CB 210, WTB Binder Labortechnik, Tuttlingen) kultiviert. Alle Zellkulturarbeiten wurden unter sterilen Bedingungen in einer Sicherheitswerkbank (Kendro, Hanau) durchgeführt. Die Kultivierung der Zellen erfolgte in 8-10 ml Wachstumsmedium bei Verwendung von 100 mm-Zellkulturschalen. Das Wachstumsmedium der Kulturen wurde nach 2-3 Tage erneuert. Nach Erreichen einer konfluenten Zellschicht wurden die Zellen durch Passagieren auf neue Kulturschalen verteilt.

3.4.2 Passagieren von Zellen mittels Trypsin-EDTA-Lösung

Zum Passagieren der Zellen wurde bei den bis zur Konfluenz kultivierten Zellen zunächst das Kulturmedium abgesaugt und die Zellen mit 5 ml 1 x CMF-PBS (für 100 mm-Zellkulturschalen) gewaschen. Die bestehenden Zell-Zell-Kontakte sowie die Zell-Matrix-Kontakte wurden durch Zugabe von 1 ml (für 100 mm-Schale) 0,25 %iger Trypsin/EDTA-Lösung (PAA Laboratories, Linz, Österreich) und Inkubation der Zellen für 2-5 min gelöst. Sobald sich die Zellen unter Mikroskopkontrolle sichtbar vom Schalenboden abgelöst hatten, wurden die Zellen durch Zugabe von 5 ml Kulturmedium von der Schale gespült und in ein steriles 15 ml-Polypropylenröhrchen überführt. Die Zellen wurden durch Zentrifugation bei 1000 Upm und Raumtemperatur für 2 min (Heraeus Sepatech Megafuge 1.0, Kendro, Hanau) sedimentiert. Anschließend wurde der Überstand abgesaugt, die Zellen in 5 ml Wachstumsmedium resuspendiert und in der gewünschten Verdünnung auf neue Schalen verteilt.

1 x CMF-PBS: 140 mM NaCl
2,6 mM KCl
8 mM Na_2HPO_4 x 2 H_2O
1,5 mM KH_2PO_4; pH 7,2

3.4.3 Zellzahlbestimmung mittels Neubauer-Zählkammer

Zur Bestimmung der Zellzahl wurden die Zellen, wie in Kapitel 3.4.2 beschrieben, mit Trypsin-EDTA-Lösung vom Schalenboden gelöst, durch Zentrifugation sedimentiert und in Wachstumsmedium resuspendiert. Zur Bestimmung der Zellzahl wurden 10 µl der Zellsuspension in eine Neubauer-Zählkammer pipettiert und die Zellen unter dem Mikroskop ausgezählt. Die Anzahl der Zellen in einem der großen Quadrate mit dem Volumen von 0,1 mm^3 bzw. 1 x 10^{-4} ml berechnet sich nach folgender Formel:

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

Die Ermittlung der Zellzahl erfolgte jeweils als Mittelwert aus zwei unabhängigen Bestimmungen.

3.4.4 Einfrieren von Zellen

Zur Langzeitlagerung von Zellen wurden von den einzelnen Zelllinien Gefrierkulturen angelegt. Etwa 2-5 x 10^6 Zellen wurden mit 0,25 %iger Trypsin/EDTA-Lösung vom Schalenboden gelöst und durch Zentrifugation bei 200 x g und Raumtemperatur für 2 min sedimentiert (Heraeus Sepatech Megafuge 1.0, Kendro, Hanau). Anschließend wurden die Zellen in 1 ml kaltem Wachstumsmedium resuspendiert und in ein vorgekühltes 2 ml-Kryoröhrchen gegeben. Nach Zugabe von 1 ml eiskaltem Einfriermedium wurden die Röhrchen in einem Isopropanol-Bad langsam auf -80 °C gekühlt und letztendlich zur Langzeitlagerung in flüssigem Stickstoff eingefroren.

Einfriermedium:

Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM, *high glucose*) mit folgenden Zusätzen:

20 % (V/V) fötales Kälberserum (FCS)
1 % (V/V) Penicillin/Streptomycin-Lösung (10 mg/ml)
1 % (V/V) L-Glutamin (200 mM)
10 % (V/V) Dimethylsulfoxid (DMSO)

Für die Lagerung von Zellen der stabil exprimierenden PANC-1-Klone wurde dem Medium zusätzlich 1,5 mg/ml Geniticin G418-Sulfat zugesetzt.

3.4.5 Auftauen von Zellen

Die Zellen wurden direkt nach der Entnahme aus dem Stickstoffbehälter in einem Wasserbad bei 37 °C aufgetaut, sofort in 5 ml Wachstumsmedium überführt und anschließend bei 1000 Upm bei Raumtemperatur für 2 min sedimentiert (Heraeus Sepatech Megafuge 1.0, Kendro, Hanau). Da das beim Einfrieren zugesetzte DMSO für die Zellen toxisch ist, wurde der Überstand sofort abgenommen und die Zellen in 5 ml frischem Wachstumsmedium resuspendiert. Die Zellen wurden in 60 mm- oder 100 mm-Zellkulturschalen ausgesät und unter Standardbedingungen (10 % CO_2; 37 °C; 90 % relative Luftfeuchtigkeit) inkubiert. Das Medium wurde nach 12-24 h gewechselt, um abgestorbene Zellen zu entfernen.

3.4.6 Transiente Transfektion von PANC-1-Zellen mit DMRIE-C *Reagent*

Bei einer transienten Transfektion wird ein Plasmid in Zellkulturzellen übertragen. Bei einem Teil der Zellen gelangt das Plasmid in den Zellkern und wird transkribiert. Das Transfektionsreagenz DMRIE-C *Reagent* (Invitrogen, Groningen, Niederlande) enthält das kationische Lipid 1,2-Dimyristyloxopropyl-3-dimethyl-hydroxy-ethyl-ammoniumbromid sowie Cholesterin in wässriger Lösung. Das Reagenz interagiert in Lösung spontan mit DNA unter Ausbildung eines Lipid-DNA-Komplexes, welcher vermutlich durch Endozytose durch die Zellmembran ins Zellinnere (Felgner, 1996; Felgner *et al*., 1987) aufgenommen wird und dann in den Zellkern gelangt.

Für eine Transfektion wurden 3 x 10^6 PANC-1-Zellen in Zellkulturschalen (100 mm) ausgesät und über Nacht bei 37 °C und 10 % CO_2 im CO_2-Inkubator (Typ CB 210, WTB Binder Labortechnik, Tuttlingen) kultiviert. Pro Transfektion wurden zwei Ansätze vorbereitet. Im ersten Ansatz wurden 30 µl DMRIE-C *Reagent* mit 470 µl OptiMEM ohne Zusätze gemischt, im zweiten Ansatz wurden 5-10 µg DNA und 500 µl OptiMEM ohne Zusätze gemischt. Die Ansätze wurden für 10 min bei Raumtemperatur inkubiert, danach vereinigt, gemischt und für weitere 20 min bei Raumtemperatur inkubiert. Die Zellen wurden zweimal mit DMEM ohne Zusätze gewaschen, mit 4 ml DMEM ohne Zusätze überschichtet und der Transfektionsansatz tropfenweise zugegeben. Die Inkubation erfolgte für 6 h im CO_2-Inkubator bei 37 °C und 10 % CO_2. Anschließend wurde das Medium abgesaugt, die Zellen mit 10 ml DMEM + 10 % FCS überschichtet und die Zellen je nach Fragestellung des Versuches 24-72 h im CO_2-Inkubator bei 37 °C und 10 % CO_2 weiter kultiviert.

3.4.7 Transfektion von PANC-1-Zellen mit p120ctn-siRNA

PANC-1-Zellen sowie stabil transfizierte, EGFP-, EGFP-RhoA- und EGFP-RhoC-exprimierende PANC-1-Zellen wurden mit siRNA für p120ctn (Qiagen, Hilden) sowie mit Fluoreszenz-markierter Kontroll-siRNA (Cell Signaling, Frankfurt/Main) transfiziert. Als Transfektionsreagenz wurde DMRIE-C *Reagent* verwendet.

Für die Transfektion wurden 2 x 10^6 PANC-1-Zellen sowie stabil transfizierte, EGFP-, EGFP-RhoA- und EGFP-RhoC-exprimierende PANC-1-Zellen in Zellkulturschalen (60 mm) ausgesät und über Nacht in 5 ml DMEM + 10 % FCS (Wachstumsmedium) in einem CO_2-Inkubator (Typ CB 210, WTB Binder Labortechnik, Tuttlingen) bei 37 °C und 10 % CO_2 kultiviert. Je Transfektionsansatz (siRNA bzw. Kontroll-siRNA) wurden zum einen 18,6 µl DMRIE-C *Reagent* mit 200 µl OptiMEM I-Medium gemischt und für 10 min bei Raumtemperatur inkubiert. Zum anderen wurden 7,6 µl p120ctn-siRNA (20 µM) bzw. 15,2 µl Kontroll-siRNA (10 µM) mit 200 µl OptiMEM I-Medium gemischt und ebenfalls für 10 min bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wurden die beiden Ansätze gemischt und weitere für 10 min bei Raumtemperatur inkubiert. In der Zwischenzeit wurden die Zellen zweimal mit Wachstumsmedium gewaschen und mit 1,6 ml Wachstumsmedium überschichtet. Der Transfektionsansatz wurde auf die Zellen getropft, so dass die Endkonzentration der siRNA 100 nM betrug. Der Ansatz wurde für 6 h in einem CO_2-Inkubator bei 37 °C inkubiert. Anschließend wurden 3 ml Wachstumsmedium zugegeben. Nach 24 h wurde das Medium abgesaugt und durch 5 ml frisches Wachstumsmedium ersetzt. Je nach Fragestellung wurden die Zellen bis zu 72 h inkubiert, wobei in Abhängigkeit von der Zellmorphologie alle 24 h ein Medienwechsel vorgenommen wurde. Zur Bestimmung der Transfektionseffizienz wurde mit Hilfe eines Fluoreszenzmikroskops der Anteil der Zellen bestimmt, die grün fluoreszierende Kontroll-siRNA aufgenommen hatten.

3.5 Auswertung

Alle Experimente wurden mindestens dreimal wiederholt. Ähnliche und identische Trends wurden bei jedem der Versuche erzielt. Die Ergebnisse von repräsentativen Experimenten sind dargestellt.

Aus den bestimmten Werten wurde der *standard error of the mean* (SEM) wie folgt ermittelt:

$$SEM = \frac{SD}{\sqrt{n}}$$

SD: Standardabweichung; n: Anzahl der Bestimmungen

Die Standardabweichung (SD) quantifiziert die Variabilität. Sie wurde wie folgt berechnet:

$$SD = \sqrt{\frac{\sum(y_i - y_{mean})}{n-1}}$$

Hierbei entspricht jedes y_i einem Einzelwert, y_{mean} ist der Mittelwert aus allen y_i.

3.6 Densitometrie

Die Proteinbanden der Immunblots wurden durch Auswertung mit Hilfe des Programms ImageQuant 5.0 von Molecular Dynamics (GE Healthcare), Freiburg, quantifiziert. Die Werte, die jeweils für die Summe der Intensität aller Pixel der ausgewählten Proteinbanden des Immunblots erhalten wurden, wurden für die Darstellung in Grafiken verwendet.

4. Ergebnisse

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

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

Für die Experimente der vorliegenden Arbeit wurden stabil transfizierte humane PANC-1 Pankreaskarzinomzellen verwendet, die grünfluoreszierendes EGFP, EGFP-RhoA und EGFP-RhoC ektop dauerhaft exprimieren. Die stabil exprimierenden Zelllinien PANC-1-EGFP Klon 21 (EGFP 21), PANC-1-EGFP-RhoA Klon 7 (EGFP-RhoA 7) und PANC-1-EGFP-RhoC Klon 3 (EGFP-RhoC 3) sowie weitere EGFP- und EGFP-Rho-exprimierende Zellklone, die zur weiteren Kontrolle der beobachteten Effekte untersucht wurden, wurden in der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Klaudia Giehl, Institut für Pharmakologie und Toxikologie, Universität Ulm, durch Selektion in G418-haltigem Wachstumsmedium (1,5 mg/ml Geniticin G418-Sulfat) und Einzelzellklonierung hergestellt. Die Transfektion und Selektion der stabilen Zellklone wurde, wie in Fensterer *et al.*, 2004 beschrieben, durchgeführt. Zum Nachweis der Expression der EGFP-Proteine und der EGFP-Rho-Fusionsproteine in den stabil exprimierenden PANC-1-Zellen wurden die Zellen mit Fluoreszenzlicht mit Wellenlängen um 488 nm angeregt und die Emission um 507 nm detektiert. Mittels dieser Methode wurde die Lokalisation der exprimierten EGFP-Proteine und EGFP-Rho-Fusionsproteine festgestellt. Die Morphologie der Zellen wurde durch Phasenkontrast-Analysen untersucht. Zur Kontrolle wurden parentale PANC-1-Zellen eingesetzt. In Abbildung 5 sind Phasenkontrast- und Fluoreszenzmikroskopie-Aufnahmen gezeigt, die die Morphologie und die Expression von EGFP-, EGFP-RhoA- und EGFP-RhoC in lebenden PANC-1-Zellen zeigen. Die Phasenkontrastaufnahmen zeigen die Morphologie der parentalen PANC-1-Zellen (A) und der stabil exprimierenden Zellen (B-D). Zum Zeitpunkt der Aufnahmen waren die abgebildeten Zellen noch nicht konfluent gewachsen, sodass sie nur zum Teil eine zusammenhängende, einzellige Schicht bilden (*Monolayer*). In den Abbildungen A-D ist ein epithelialer Phänotyp mit rundlicher bis trapezoider Zellmorphologie zu erkennen. Die Phasenkontrastaufnahmen in den Abbildungen B-D zeigen, dass die Expression von EGFP bzw. von EGFP-RhoA sowie von EGFP-RhoC keinen Einfluss auf die

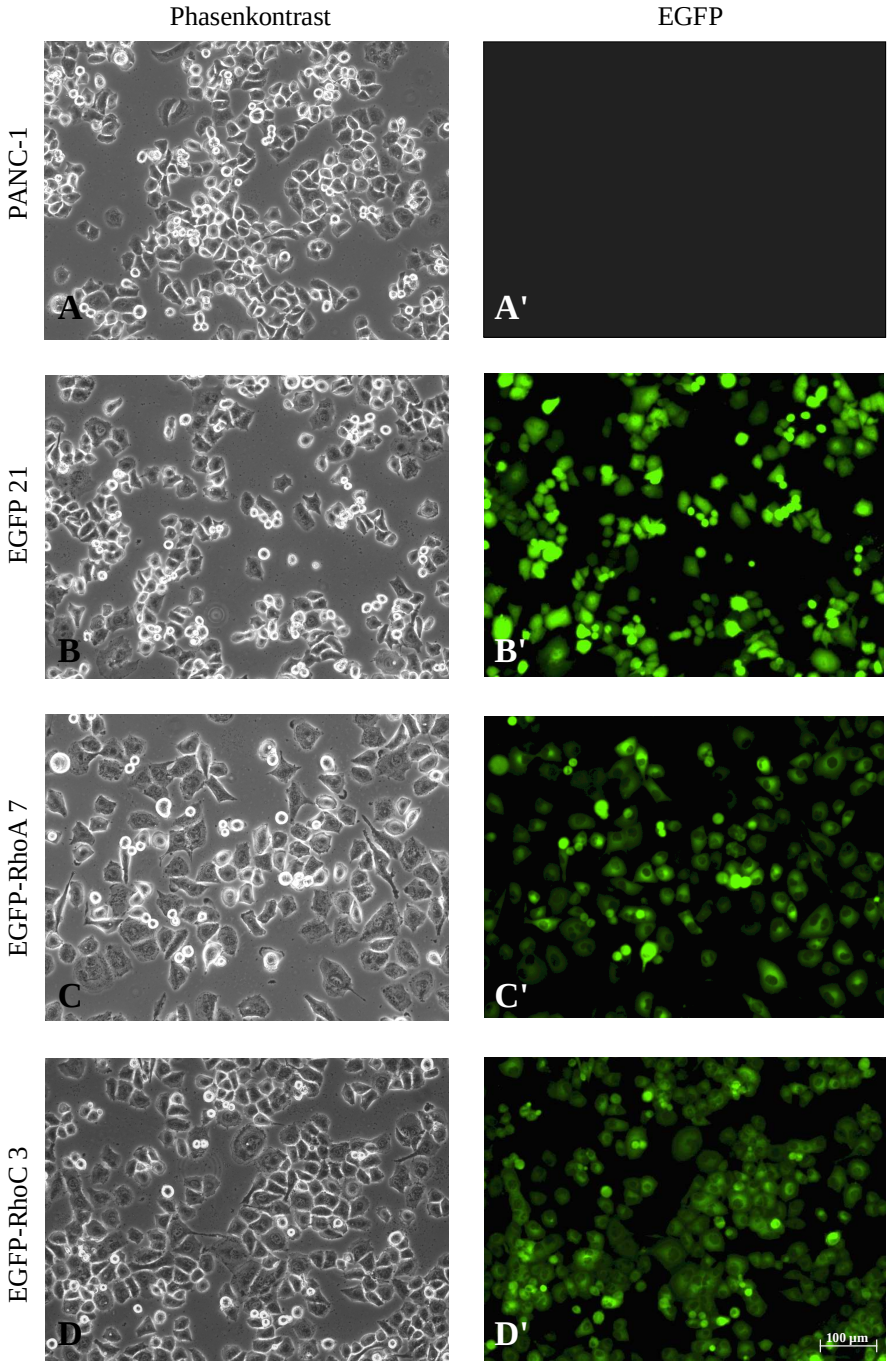


Abbildung 5: Phasenkontrast- und Fluoreszenzaufnahmen von lebenden EGFP-, EGFP-RhoA und EGFP-RhoC-exprimierenden PANC-1-Zellen. Die Abbildung zeigt die Phasenkontrastaufnahmen (A-D) und die korrespondierenden EGFP-Fluoreszenzaufnahmen (A'-D') von parentalen PANC-1-Zellen, EGFP-exprimierenden PANC-1-Zellen des Klons 21, von EGFP-RhoA-exprimierenden PANC-1-Zellen des Klons 7 und von EGFP-RhoC-exprimierenden PANC-1-Zellen des Klons 3. Die Fluoreszenz der Proteine wurde bei Wellenlängen um 488 nm angeregt und die Emission um 507 nm detektiert. Die Phasenkontrastaufnahmen zeigen die Morphologie der Zellen, die Fluoreszenzaufnahmen die Verteilung der exprimierten EGFP-Proteine bzw. der EGFP-Rho-Fusionsproteine in den Zellen. Die Zellen wurden mit 10-facher Vergrößerung aufgenommen. Die Länge des Messbalkens entspricht 100 µm.

Morphologie der PANC-1-Zellen hat. Die EGFP bzw. EGFP-Rho-exprimierenden Zellen zeigen den gleichen epithelialen Phänotyp wie parentale PANC-1-Zellen. Die korrespondierenden Fluoreszenzaufnahmen zeigen, dass die exprimierten EGFP-Proteine (B') im gesamten Zytosol und im Zellkern diffus verteilt vorliegen. Die exprimierten EGFP-RhoA- und EGFP-RhoC-Fusionsproteine (C' und D') befinden sich im Gegensatz dazu deutlich im Zytosol. Der Zellkern ist weitgehend frei von EGFP-RhoA- und EGFP-RhoC-Fusionsproteinen. Bei Fluoreszenzaufnahmen mit stärkerer Vergrößerung, als der in der Abbildung dargestellten, war zu sehen, dass ein Anteil der exprimierten EGFP-RhoA- und EGFP-RhoC-Fusionsproteine an der Plasmamembran lokalisiert ist.

4.1.2 Nachweis der Expression von EGFP-RhoA, EGFP-RhoC und EGFP im Immunblotverfahren

Um die subzelluläre Verteilung bzw. die Lokalisation von EGFP-Proteinen sowie von EGFP-RhoA- und EGFP-RhoC-Fusionsproteinen in stabil exprimierenden PANC-1-Zellen zu untersuchen, wurde eine subzelluläre Fraktionierung durchgeführt (siehe Kapitel 3.3.6). EGFP 21-, EGFP-RhoA 7- und EGFP-RhoC 3-exprimierende PANC-1-Zellen wurden in Wachstumsmedium bis zur Konfluenz kultiviert und anschließend in HEPES-Puffer lysiert. Durch Zentrifugation bei geringer g-Zahl wurden Zellkerne und nicht lysierte Zellen entfernt. Aus dem Überstand wurde eine lösliche (zytosolische Fraktion oder S100-Fraktion) und eine partikuläre (membranhaltige Fraktion oder P100-Fraktion) Zellfraktion durch Ultrazentrifugation bei 100 000 x g gewonnen. Die Proteine der löslichen und der partikulären Fraktion sowie vom Gesamtzelllysat wurden in einem 12,5 %igen SDS-Polyacrylamidgel aufgetrennt. Der Nachweis von EGFP-Proteinen und EGFP-Rho-Fusionsproteinen erfolgte im Immunblotverfahren mit einem Peroxidase-konjugierten, monoklonalen anti-GFP-Antikörper und ECL-Detektion. Eine Kontrolle der gleichmäßigen, vergleichbaren Proteinbeladung in den einzelnen Spuren erfolgte mit einem monoklonalen anti-β-Aktin-Antikörper und ECL-Detektion. Dieser Versuch wurde mit vier voneinander unabhängig hergestellten Proteinpräparationen durchgeführt. Der in Abbildung 6 dargestellte obere Immunblot zeigt die subzelluläre Verteilung der EGFP-Proteine sowie der EGFP-Rho-Fusionsproteine. Es zeigt sich, dass die EGFP-Rho-Fusionsproteine mit einem Molekulargewicht von 50 kDa sowohl in der löslichen als auch in der partikulären Fraktion nachgewiesen wurden. EGFP-RhoA wurde in der löslichen Fraktion deutlich stärker nachge-

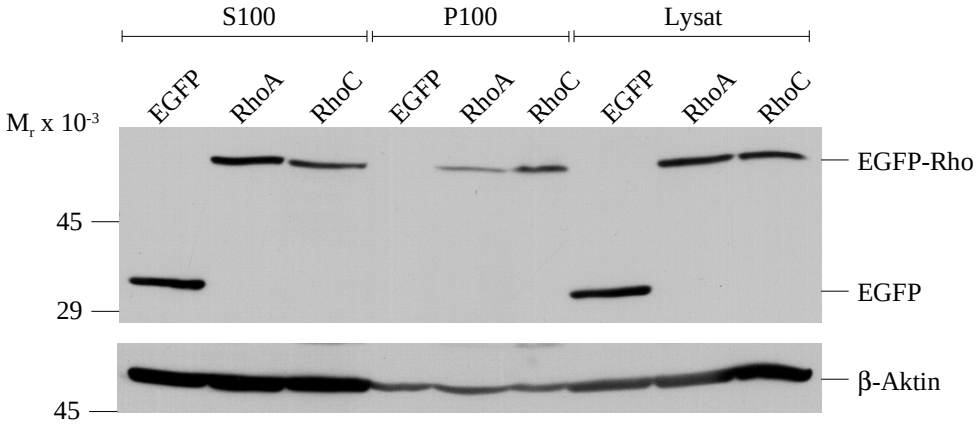


Abbildung 6: Nachweis der subzellulären Verteilung von EGFP-Proteinen und EGFP-Rho-Fusionsproteinen in EGFP-, EGFP-RhoA- und EGFP-RhoC-exprimierenden PANC-1-Zellen. Zur Analyse der subzellulären Verteilung von EGFP-Proteinen sowie EGFP-RhoA- und EGFP-RhoC-Fusionsproteinen wurden Zelllysate durch Ultrazentrifugation in eine lösliche (*S100*) und eine partikuläre (*P100*) Zellfraktion getrennt. Anschließend wurden 30 µg Protein der löslichen Fraktion (*S100*), 40 µg Protein der partikulären Fraktion (*P100*) und 25 µg Protein vom Gesamtzelllysat (*Lysat*) in einem 12,5 %igen SDS-Polyacrylamidgel aufgetrennt und im Immunblotverfahren analysiert. Der Nachweis von EGFP-Proteinen und EGFP-Rho-Fusionsproteinen erfolgte mit einem monoklonalen, Peroxidase-konjugierten anti-GFP-Antikörper und ECL-Detektion. Der obere Immunblot zeigt EGFP-Proteine und EGFP-Rho-Fusionsproteine in den verschiedenen Zellfraktionen. Der Nachweis von β-Aktin mit einem monoklonalen β-Aktin-Antikörper und ECL-Detektion wurde zur Kontrolle der gleichmäßigen Proteinbeladung in den einzelnen Spuren durchgeführt. Ein Proteinstandard ist links markiert.

wiesen als in der partikulären Fraktion. Der Vergleich der EGFP-RhoC-Expression in der löslichen und in der partikulären Fraktion zeigt, dass EGFP-RhoC ungefähr in gleichem Maße in beiden Fraktionen nachgewiesen wurde. Hierbei ist jedoch zu berücksichtigen, dass im dargestellten Versuch von der löslichen Fraktion 30 µg, von der partikulären Fraktion 40 µg und vom Gesamtzelllysat 25 µg im SDS-Polyacrylamidgel aufgetrennt wurden. Diese Verteilung wurde zum Zweck der Anschaulichkeit gewählt und um eine Überladung des Gels zu verhindern. Des Weiteren zeigt sich bei einem Vergleich der EGFP-RhoA- und EGFP-RhoC-Mengen in den einzelnen Fraktionen, dass mehr EGFP-RhoA als EGFP-RhoC in der löslichen Fraktion nachgewiesen wurde. Im Gegensatz dazu konnte mehr EGFP-RhoC als EGFP-RhoA in der partikulären Fraktion nachgewiesen werden. Die EGFP-Proteine mit einem Molekulargewicht von 29 kDa waren nur in der löslichen Fraktion und nicht in der partikulären Fraktion nachweisbar. Im Gesamtzelllysat (*Lysat*) konnten EGFP-Proteine und EGFP-Rho-Proteine in gleichen Mengen nachgewiesen werden. Bei diesen Lysaten handelt es sich um die Zelllysate, die vor der Ultrazentrifugation abgenommen worden waren. Zusammenfassend konnte mit Hilfe der subzellulären Fraktionierung gezeigt werden, dass vergleichbare Mengen EGFP-RhoA und EGFP-RhoC in Gesamtzelllysaten von EGFP-Rho-

exprimierenden PANC-1-Zellen nachgewiesen wurden. Es konnte mehr EGFP-RhoA als EGFP-RhoC in der löslichen Fraktion nachgewiesen werden. Im Gegensatz dazu wurden in der partikulären, membranhaltigen Fraktion mehr EGFP-RhoC nachgewiesen als EGFP-RhoA. Die Ergebnisse sind vergleichbar mit denen der Immunfluoreszenzbildern, die in der Abbildung 5 (C' und D') dargestellt sind.

4.2 Identifikation von Rho-spezifischen Interaktionspartnern in PANC-1-Zellen

4.2.1 Nachweis der Expression von RhoGDIs in PANC-1-Zellen

RhoGDIs interagieren mit Rho-GTPasen und verhindern den Austausch von GDP zu GTP und damit die Aktivierung der Rho-GTPasen. Zur Analyse der Expression und der Verteilung von RhoGDIs in EGFP 21-, EGFP-RhoA 7- und EGFP-RhoC 3-exprimierenden PANC-1-Zellen wurden Zelllysate in HEPES-Puffer hergestellt. Durch Ultrazentrifugation bei 100 000 x g wurden die lösliche (S100) und die partikuläre (P100) Zellfraktion gewonnen und jeweils 50 µg der beiden Fraktionen in einem 12,5 %igen SDS-Polyacrylamidgel aufgetrennt und anschließend im Immunblotverfahren analysiert. Der Nachweis von RhoGDIα erfolgte mit einem polyklonalen anti-RhoGDI (K-21)-Antikörper und von RhoGDIβ (Synonym: LyGDI) mit einem polyklonalen anti-LyGDI (C-20)-Antikörper mit anschließender ECL-Detektion. Die Spezifität der polyklonalen anti-RhoGDI (K-21)-Antikörper und der polyklonalen anti-LyGDI (C-20)-Antikörper wurde mit Hilfe von rekombinantem GST-RhoGDIα- bzw. GST-RhoGDIβ-Proteinen im Immunblotverfahren untersucht und bestätigt (Daten nicht gezeigt). Die in Abbildung 7 gezeigten Immunblots zeigen, dass RhoGDIα und RhoGDIβ mit einem Molekulargewicht von 23 kDa in der löslichen Fraktion (S100) in den getesteten Zellklonen nachweisbar waren. In EGFP-exprimierenden Zellen wurde RhoGDIβ als Doppelbande detektiert. Dies konnte in allen durchgeführten Versuchen (n=3) in diesem Zellklon beobachtet werden. Ob es sich bei der zusätzlichen Bande um eine EGFP- oder RhoGDI-Abbaubande handelte, wurde im Rahmen dieser Arbeit nicht weiter untersucht. In der partikulären Fraktion (P100) wurde in keinem der Zellklone RhoGDIα oder RhoGDIβ nachgewiesen. Dieser Versuch wurde mit drei voneinander unabhängig hergestellten Proteinpräparationen mit identischen Ergebnissen durchgeführt. RhoGDIγ, das bevorzugt in Zellen von Gehirn, Pankreas, Lunge und Hoden exprimiert wird (Dovas und Couchman,

2005), konnte mit einem polyklonalen anti-RhoGDIγ (N-19)-Antikörper in den Zelllysaten von EGFP-, EGFP-RhoA und EGFP-RhoC-exprimierenden PANC-1-Zellen nicht detektiert werden (Daten nicht gezeigt). In Folge dessen kann keine Aussage zur Expression von RhoGDIγ in PANC-1-Zellen getroffen werden, da dieser Versuch nur einmal durchgeführt wurde. Die Funktion des Antikörpers konnte durch den fehlenden Nachweis von RhoGDIγ in HeLa-Zellen als Positivkontrolle nicht bestätigt werden. Abschließend kann zu den erzielten Ergebnissen gesagt werden, dass RhoGDIα und RhoGDIβ in der löslichen Fraktion von EGFP- sowie EGFP-Rho-exprimierenden PANC-1-Zellen nachgewiesen wurden. Die unterschiedlichen Bandenstärken zeigen, dass RhoGDIα besser als RhoGDIβ detektiert wurde. Ob RhoGDIα auch stärker exprimiert wird, konnte mit den vorhandenen Mitteln nicht abschließend geklärt werden.

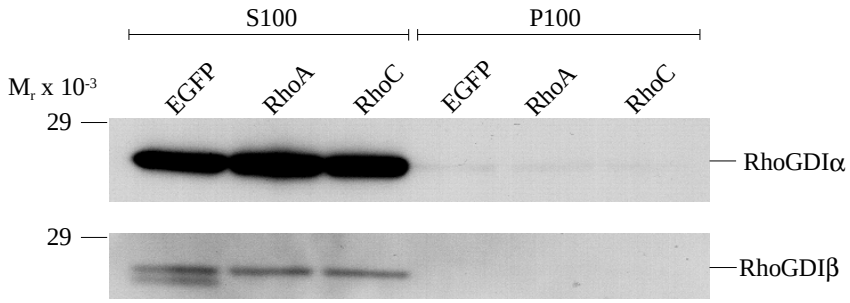


Abbildung 7: Subzelluläre Verteilung von RhoGDIα und RhoGDIβ. Für die Untersuchung der subzellulären Verteilung von RhoGDIs wurden Zelllysate von EGFP 21-, EGFP-RhoA 7- und EGFP-RhoC 3-exprimierenden PANC-1-Zellen durch Ultrazentrifugation in die lösliche (S100) und die partikuläre (P100) Zellfraktion getrennt. Je 50 µg der Zellfraktionen wurden in einem 12,5 %igen SDS-Polyacrylamidgel aufgetrennt und die Verteilung von RhoGDIα und RhoGDIβ im Immunblotverfahren analysiert. Der Nachweis von RhoGDIα erfolgte mit einem polykonalen anti-RhoGDI (K-21)-Antikörper und von RhoGDIα mit einem polyklonalen anti-LyGDI (C-20)-Antikörper mit anschließender ECL-Detektion. Der obere Immunblot zeigt das in EGFP 21-, EGFP-RhoA 7- und EGFP-RhoC 3-exprimierenden PANC-1-Zellen enthaltene RhoGDIα, der untere Immunblot das in den Zelllysaten enthaltene RhoGDIβ. Ein Proteinstandard ist links markiert.

4.2.2 Analyse von EGFP-Rho/RhoGDI-Proteinkomplexen mittels Co-Immunpräzipitation

Um einen möglichen zellulären Proteinkomplex der Rho-GTPasen EGFP-RhoA bzw. EGFP-RhoC mit RhoGDIs in PANC-1-Zellen nachzuweisen, wurden Co-Immunpräzipitationen durchgeführt. Diese Methode ermöglicht die selektive Anreicherung von Proteinen bzw. Proteinkomplexen mittels spezifischer Antikörper. Aufgrund der Ergebnisse der subzellulären Verteilung von RhoGDIα und RhoGDIβ (siehe Kapitel 4.2.1) wurden für den Nachweis von

EGFP-Rho/RhoGDI-Proteinkomplexen die lösliche Zellfraktion von EGFP-, EGFP-RhoA- und EGFP-RhoC-exprimierenden PANC-1-Zellen verwendet. Hierzu wurden Zelllysate von EGFP 21-, EGFP-RhoA 7- und EGFP-RhoC 3-exprimierenden PANC-1-Zellen in HEPES-Puffer hergestellt. Die lösliche Zellfraktion wurde durch Ultrazentrifugation der HEPES-Zelllysate bei 100 000 x g gewonnen und die Co-Immunpräzipitation mit einem monoklonalen anti-GFP-Antikörper durchgeführt (siehe Kapitel 3.3.15.2). Es wurden sechs Co-Immunpräzipitationsexperimente mit vier voneinander unabhängig hergestellten Proteinpräparationen durchgeführt. Zur Minimierung von unspezifischen Bindungen von Proteinen an Protein G-Agarose während der Co-Immunpräzipitation wurden je Ansatz 3 mg Protein der löslichen Zellfraktion mit 20 µl Protein G-Agarose vermischt und zur Vorreinigung für 1 h inkubiert. Gleichzeitig wurden je Ansatz 20 µl Protein G-Agarose mit 1 µg monoklonalem anti-GFP-Antikörper (Fa. BioMol) für 45 min inkubiert. Nach Präzipitation der Antikörper-beladenen Agarose-*beads* durch Zentrifugation wurden die vorgereinigten, löslichen Zellfraktionen zugegeben und für 2 h inkubiert. Zur Kontrolle wurden die mit Antikörper angereicherten Agarose-*beads* in einem Ansatz mit Puffer inkubiert. Nach vier identischen Waschschritten wurden die Agarose-*beads* der verschiedenen Ansätze durch Zentrifugation sedimentiert. Die immunpräzipitierten Proteine wurden in einem 12,5 %igen SDS-Polyacrylamidgel aufgetrennt und anschließend im Immunblotverfahren analysiert. Durch Färbung des Immunblots mit Ponceau S konnte in den Immunpräzipitationsansätzen jeweils die gleiche GFP-Antikörpermenge nachgewiesen werden (Daten nicht gezeigt). Der Nachweis der immunpräzipitierten EGFP-Proteine und EGFP-Rho-Fusionsproteine erfolgte mit einem Peroxidase-konjugierten, monoklonalen anti-GFP-Antikörper und ECL-Detektion. Der Nachweis des co-immunpräzipitierten RhoGDIα erfolgte mit einem polyklonalen anti-RhoGDI (K-21)-Antikörper und der Nachweis des co-immunpräzipitierten RhoGDIβ mit einem polyklonalen anti-LyGDI (C-20)-Antikörper und ECL-Detektion. In Abbildung 8 sind repräsentative Ergebnisse eines Co-Immunpräzipitationsexperimentes gezeigt. Im oberen Immunblot ist der Nachweis des co-immunpräzipitierten RhoGDIα nach Immunpräzipitation der EGFP-/EGFP-Rho-Proteine mit anti-GFP-Antikörper dargestellt. Es zeigt sich, dass RhoGDIα sowohl mit EGFP-RhoA als auch mit EGFP-RhoC co-immunpräzitiert wurde. Im mittleren Immunblot ist der Nachweis des co-immunpräzipitierten RhoGDIβ dargestellt. Hierbei zeigt sich das mit EGFP-RhoA und EGFP-RhoC co-immunpräzipitierte RhoGDIβ. Im unteren Immunblot ist immunpräzipitiertes EGFP, EGFP-RhoA und EGFP-RhoC zur Kontrolle der Immunpräzipitation dargestellt. Die Kontrolle in Spur 4 (*Ak*), die Antikörper und Puffer enthielt, zeigt bei allen drei Immunblots,

dass keine Kreuzreaktivität zwischen dem im Versuch verwendeten monoklonalen anti-GFP-Antikörper und dem bei der Immunblotanalyse verwendeten Antikörpern festzustellen ist. Der untere Immunblot zeigt, dass mehr EGFP-RhoC immunpräzipitiert wurde als EGFP-RhoA. Dies ist auch der Grund dafür, dass im abgebildeten Experiment mehr RhoGDIα bzw. RhoGDIβ mit EGFP-RhoC co-immunpräzipitiert wurde als mit EGFP-RhoA. Das Ergebnis dieser Co-Immunpräzipitationsstudie und der weiteren vier nicht dargestellten Experimente zeigt, dass EGFP-RhoA sowie EGFP-RhoC sowohl im Komplex mit RhoGDIα als auch im Komplex mit RhoGDIβ aus PANC-1-Zellen immunpräzipitiert werden konnten und es hierbei keine Unterschiede zwischen EGFP-RhoA und EGFP-RhoC gibt.

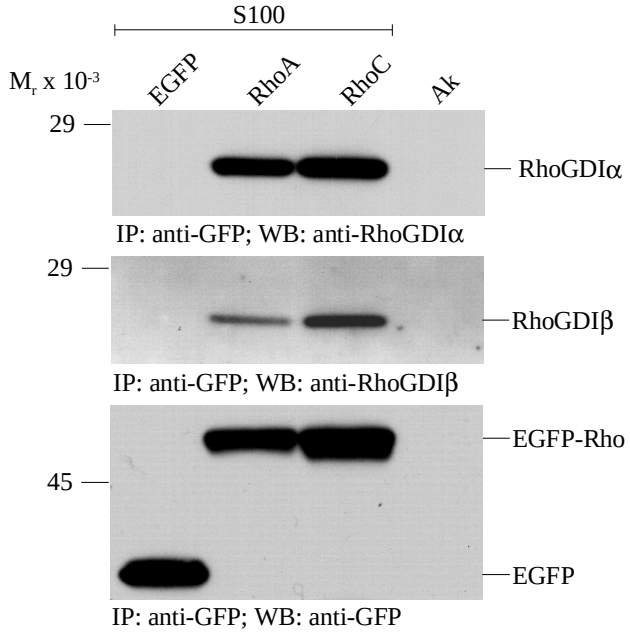


Abbildung 8: Nachweis von EGFP-Rho/RhoGDI-Proteinkomplexen durch Co-Immunpräzipitation. Die lösliche Zellfraktion (S100) wurde aus HEPES-Zelllysaten von EGFP 21-, EGFP-RhoA 7- und EGFP-RhoC 3-exprimierenden PANC-1-Zellen durch Ultrazentrifugation bei 100 000 x g gewonnen. Für die Co-Immunpräzipitation wurden 1 µg anti-GFP-Antikörper an 20 µl Protein G-Agarose gekoppelt und anschließend mit je 3 mg Protein der vorgereinigten S100-Zellfraktionen für 2 h inkubiert. Zur Kontrolle wurden in einem Ansatz mit Antikörper angereicherte Agarose-*beads* mit Puffer inkubiert (Spur 4, Ak). Anschließend wurden die Protein G-Agarose-*beads* durch Zentrifugation präzipitiert und in SDS-Probenpuffer resuspendiert. Die präzipitierten Proteine wurden in einem 12,5 %igen SDS-Polyacrylamidgel aufgetrennt und im Immunblotverfahren analysiert. Der Nachweis der immunpräzipitierten EGFP-Proteine und EGFP-Rho-Fusionsproteine erfolgte mit einem monoklonalen, Peroxidase-konjugierten anti-GFP-Antikörper und ECL-Detektion. Der Nachweis des co-immunpräzipitierten RhoGDIα erfolgte mit einem polyklonalen anti-RhoGDI (K-21)-Antikörper (oberer Immunblot) und der Nachweis des co-immunpräzipitierten RhoGDIβ mit einem polyklonalen anti-LyGDI (C-20)-Antikörper (mittlerer Immunblot) und ECL-Detektion. Der untere Immunblot zeigt den Nachweis von immunpräzipitiertem EGFP, EGFP-RhoA und EGFP-RhoC. Links ist ein Proteinstandard markiert.

4.2.3 Translokation von Rho-GTPasen aus der Plasmamembran durch RhoGDIα

Zur weiteren Analyse der Interaktion von Rho-GTPasen und RhoGDIs wurden Versuche durchgeführt, um eine mögliche Translokation von Rho-GTPasen mittels RhoGDIs aus der Plasmamembran von PANC-1-Zellen in die lösliche Fraktion nachzuweisen. Für die Translokationsversuche (siehe Kapitel 3.3.19) wurden in vier voneinander unabhängigen Experimenten 80-250 µg der membranhaltigen Zellfraktion von EGFP 21-, EGFP-RhoA 7- und EGFP-RhoC 3-exprimierenden PANC-1-Zellen mit 40 µM bakteriell exprimierten und gereinigten GST-Proteinen und GST-RhoGDIα-Fusionsproteinen für 4 h inkubiert. Die unterschiedlichen Mengen membranhaltiger Zellfraktion beruhten auf den Ergebnissen eines Abgleichgels und waren notwendig, um gleiche Mengen an EGFP-Proteinen sowie EGFP-Rho-Proteinen einzusetzen. Anschließend wurden die Zellmembranen durch Ultrazentrifugation bei 100 000 x g pelliert. Die sedimentierten Proteine wurden in einem 12,5 %igen SDS-Polyacrylamidgel aufgetrennt und im Immunblotverfahren analysiert. Der Nachweis von EGFP-Rho-Fusionsproteinen und EGFP-Proteinen erfolgte mit einem monoklonalen anti-GFP-Antikörper, und der Nachweis des endogenen RhoA mit einem monoklonalen anti-RhoA (26C4)-Antikörper und ECL-Detektion.

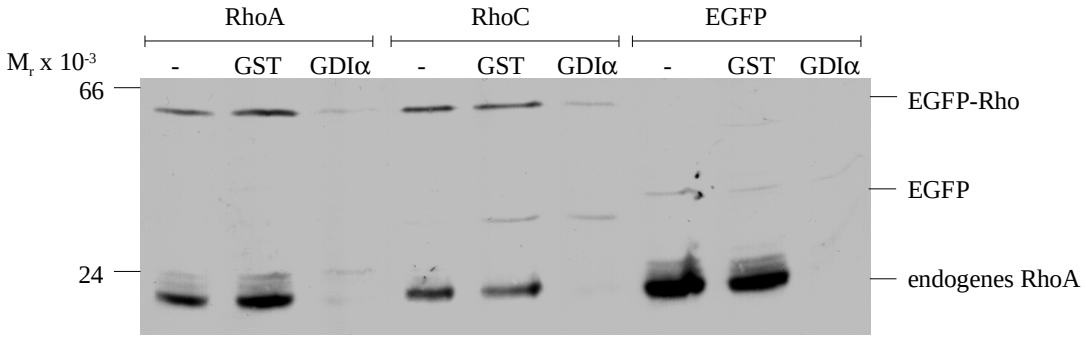


Abbildung 9: Interaktion von Rho-GTPasen und RhoGDIα. Um die Translokation von Rho-GTPasen aus der Plasmamembran und damit die Interaktion von Rho-GTPasen und RhoGDIα zu analysieren, wurden 80-250 µg, je nach Mengenabschätzung basierend auf einem Abgleichgel, der membranhaltigen Zellfraktion von EGFP 21-, EGFP-RhoA 7- und EGFP-RhoC 3-exprimierenden PANC-1-Zellen mit 40 µM gereinigten, rekombianten GST-Proteinen (GST) bzw. GST-RhoGDIα-Fusionsproteinen (GDIα) inkubiert. Als Kontrolle wurde ein Ansatz mitgeführt, der nur Translokationspuffer und Membranfraktion enthielt (-). Nach Inkubation für 4 h wurden die Zellmembranen durch Ultrazentrifugation bei 100 000 x g pelletiert. Die Proteine wurden in einem 12,5 %igen SDS-Polyacrylamidgel aufgetrennt und im Immunblotverfahren analysiert. Der Nachweis von EGFP-Rho und EGFP erfolgte mit einem monoklonalen anti-GFP-Antikörper und der des endogenen RhoA mit einem monoklonalen anti-RhoA (26C4)-Antikörper und ECL-Detektion. Der Immunblot zeigt EGFP-RhoA und EGFP-RhoC bzw. endogenes RhoA in der membranhaltigen Zellfraktion in Ab- bzw. Anwesenheit von GST-RhoGDIα. Ein Proteinstandard ist links markiert.

Abbildung 9 zeigt die im Immunblotverfahren nachgewiesenen EGFP-RhoA- und EGFP-RhoC-Fusionsproteine sowie endogenes RhoA. In den Spuren 1, 4 und 7 wurde jeweils ein Ansatz aufgetrennt, der membranhaltige Zellfraktion und Translokationspuffer, aber kein GST-RhoGDIα enthielt (-). Hierbei zeigt sich, dass in der membranhaltigen Zellfraktion EGFP-RhoA- bzw. EGFP-RhoC-Fusionsproteine und endogenes RhoA in gleichen Mengen nachgewiesen wurden. In der membranhaltigen Zellfraktion von EGFP-exprimierenden PANC-1-Zellen konnte EGFP nicht nachgewiesen werden, da dieses, wie in Kapitel 4.1.2, Abbildung 6 gezeigt wurde, im Zytosol lokalisiert ist. Die in den Spuren 2, 5 und 8 aufgetrennten Ansätze enthielten GST-Proteine und membranhaltige Zellfraktion (*GST*). Es zeigt sich, dass EGFP-RhoA und EGFP-RhoC sowie endogenes RhoA in der membranhaltigen Zellfraktion nachgewiesen wurden und keine unspezifischen Interaktionen mit dem GST-Anteil GST-RhoGDIα nachweisbar waren. Die nachgewiesenen Mengen an EGFP-RhoA, EGFP-RhoC sowie endogenem RhoA in der membranhaltigen Zellfraktion der EGFP-RhoA und EGFP-RhoC-exprimierenden PANC-1-Zellen entsprechen den Mengen, die in den Ansätzen ohne GST-Protein nachgewiesen werden konnten (-). Gleiches gilt für die Mengen von endogenem RhoA in EGFP-exprimierenden PANC-1-Zellen. In den Spuren 3, 6 und 9 wurden jene Ansätze aufgetrennt, die GST-RhoGDIα und membranhaltige Fraktion enthielten (*GDIα*). Hierbei zeigt sich, dass EGFP-RhoA und EGFP-RhoC schwach und endogenes RhoA nicht mehr in der präzipitierten Membranfraktion nachweisbar waren. Der Ansatz mit membranhaltiger Fraktion von EGFP-exprimierenden PANC-1-Zellen diente zur Kontrolle der spezifischen Interaktion von RhoGDIα mit den Rho-GTPasen RhoA und RhoC und nicht mit dem EGFP-Proteinanteil. Die hier dargestellten und weiteren nicht gezeigte Ergebnisse zeigen eine deutliche Abnahme von EGFP-RhoA und EGFP-RhoC und endogenem RhoA in der membranhaltigen Zellfraktion unter Einfluss von GST-RhoGDIα. Die beiden Rho-GTPasen EGFP-RhoA und EGFP-RhoC wurden durch die Zugabe von löslichem GST-RhoGDIα in gleichem Maße aus der Plasmamembran extrahiert. Somit konnte mit diesem Translokationsexperiment die Interaktion von RhoGDIα mit EGFP-RhoA und EGFP-RhoC sowie mit endogenem RhoA gezeigt werden, die zu einer Translokation der Rho-GTPasen aus der Zellmembran führen kann.

4.3. Interaktion von p120ctn mit rekombinantem GST-RhoA und GST-RhoC

In der Literatur wurde von verschiedenen Arbeitsgruppen die Interaktion von p120ctn mit Rho-GTPasen beschrieben (Anastasiadis *et al.*, 2000; Grosheva *et al.*, 2001; Magie *et al.*, 2002, Noren *et al.*, 2000). Diese Interaktion, direkt oder indirekt über weitere Bindungspartner, wird im Zusammenhang mit der Kanzerogenese und Metastasierung von Tumorzellen diskutiert. In dieser Hinsicht wurde im Rahmen der vorliegenden Arbeit die Interaktion von RhoA und RhoC mit p120ctn vergleichend untersucht. Zur Analyse der Interaktion von p120ctn und RhoA bzw. RhoC wurden *in vitro*-Bindungsstudien mit bakteriell exprimierten und gereinigten GST-Rho-Fusionsproteinen und Zelllysaten von PANC-1 Zellen durchgeführt, die in den nachfolgenden Kapiteln beschrieben sind.

4.3.1 Expression und Aufreinigung rekombinanter GST-Proteine und GST-Rho-Fusionsproteine in *E. coli*

Für die Durchführung der in den folgenden Kapiteln beschriebenen *in vitro*-Bindungsexperimente wurden GST-RhoA- bzw. GST-RhoC-Fusionsproteine und deren Mutanten verwendet, die in *E. coli* BL21(DE3) exprimiert und aus der löslichen Lysatfraktion affinitätschromatographisch durch die Bindung an Glutathion-Sepharose gereinigt worden waren. Die in der vorliegenden Arbeit verwendeten bakteriellen Expressionsplasmide pGEX-2TK, pGEX-2T/RhoA, pGEX-2TK/RhoC sowie pGEX-2TK/RhoC/A wurden für die Proteinexpression in kompetente *E. coli* BL21(DE3)-Bakterien transformiert. Die Chimäre RhoC/A, in der die letzten 13 Aminosäuren von RhoC gegen die korrespondierenden Aminosäuren von RhoA ausgetauscht sind, war in der Arbeitsgruppe von PD Dr. Klaudia Giehl, Ulm, hergestellt und die cDNA in das pGEX-2TK-Plasmid kloniert worden. Die durch Einführung einer Punktmutation durch *in vitro*-Mutagenese (siehe Kapitel 3.2.11) generierten Plasmide pGEX-2T/RhoA (G152S), pGEX-2TK/RhoC (I43V), pGEX-2TK/RhoC (Q123N), pGEX-2TK/RhoC (R140K), pGEX-2TK/RhoC (S141P), pGEX-2TK/RhoC (S152G), pGEX-2TK/RhoC (L157M), pGEX-2TK/RhoC (E165D) wurden ebenfalls in kompetente *E. coli* BL21(DE3)-Bakterien transformiert und die kodierten Proteine exprimiert (siehe Kapitel 3.3.1). Die Proteinexpression der GST-Proteine sowie der GST-Rho-Fusionsproteine und deren Mutanten erfolgte für 4 h bei 20 °C nach Induktion der Expression durch Zugabe von 0,5 mM IPTG. Die Bakterienzellen wurden durch Ultraschallbehandlung lysiert. Die

Reinigung der GST-Proteine und der GST-Rho-Fusionsproteine erfolgte affinitätschromatographisch aus der löslichen Lysatfraktion durch die Bindung an Glutathion-Sepharose und anschließender Elution mit reduziertem Glutathion. Die Bestimmung der Konzentrationen der gereinigten GST-Rho-Fusionsproteine erfolgte durch den Vergleich der Bandenstärken der gereinigten GST-Rho-Fusionsproteine mit den Bandenstärken einer BSA-Standard-Konzentrationsreihe in 12,5 %igen Polyacrylamidgelen (siehe Kap. 3.3.5.1). Zur vergleichenden Analyse der Proteine wurden je 10 µg der gereinigten GST-RhoA-, GST-RhoC/A- sowie GST-RhoC-Fusionsproteine und der GST-RhoC-Mutanten mit 20 µl Glutathion-Sepharose-*beads* für 1 h inkubiert. Anschließend wurden die Glutathion-Sepharose-*beads* durch Zentrifugation sedimentiert und in einem 12,5 %igen SDS-Polyacrylamidgel aufgetrennt. Danach wurden die Proteine im Gel mit Coomassie-Blau angefärbt. In Abbildung 10 sind exemplarisch gereinigte GST-RhoA-, GST-RhoC/A- sowie die GST-RhoC-Fusionsproteine und die GST-RhoC-Mutanten einer von fünf Proteinpräparationen dargestellt. Mit Hilfe des Acrylamidgels konnten die Mengen der GST-Rho-Fusionsproteine abgeschätzt werden, die in weiterer Folge in den beschriebenen *in vitro*-Bindungsexperimenten verwendet wurden.

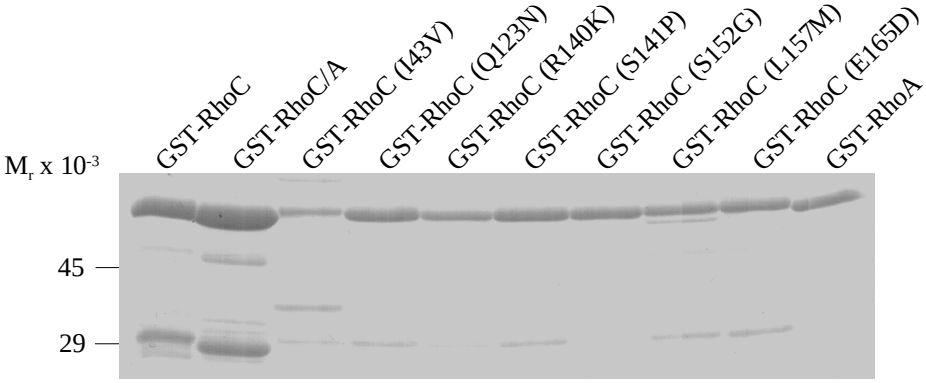


Abbildung 10: Nachweis gereinigter GST-Rho-Fusionsproteine. GST-RhoC, GST-RhoC-Mutanten, GST-RhoC/A und GST-RhoA wurden in *E. coli* BL21(DE3) exprimiert. Die Proteine wurden affinitätschromatographisch durch Bindung an Glutathion-Sepharose-*beads* und anschließender Elution mit reduziertem Glutathion aus der löslichen Lysatfraktion gereinigt. Zur vergleichenden Analyse der gereinigten GST-Rho-Fusionsprotein wurden je 10 µg Protein mit 20 µl Glutathion-Sepharose 4B für 1 h inkubiert. Die gewaschenen Glutathion-Sepharose-*beads* wurden durch Zentrifugation sedimentiert, mit 20 µl SDS-Probenpuffer versetzt und die präzipitierten Proteine in einem 12,5 %igen SDS-Polyacrylamidgel aufgetrennt und mit Coomassie-Blau angefärbt. Ein Proteinstandard ist links markiert.

4.3.2 Expression von p120ctn in verschiedenen humanen Pankreaskarzinomzelllinien

Aufgrund der Verwendung von alternativen Startcodons bei der Translation bzw. durch alternatives Spleißen und Kombination von drei verschiedenen Exons wird p120ctn in verschiedenen Isoformen exprimiert. Zur vergleichenden Analyse der in humanen Pankreaskarzinomzelllinien (siehe Kapitel 2.3.2) exprimierten p120ctn-Isoformen wurden Zelllysate von PANC-1-Zellen in XPLN-Puffer hergestellt (siehe Kapitel 3.3.14). Die Zelllysate anderer humaner Pankreaskarzinomzelllinien (BxPC-3, MiaPaCa-2, PaTu 8988 s, PaTu 8988 t, IMIM PC-1, IMIM PC-2 und AsPC-1) waren in der Arbeitsgruppe vorhanden. Von jedem Zelllysat wurden 50 µg Protein in einem 10 %igen SDS-Polyacrylamidgel aufgetrennt und der Gehalt an p120ctn-Isoformen im Immunblotverfahren analysiert. Der Nachweis von p120ctn erfolgte mit einem monoklonalen anti-p120ctn-Antikörper, der alle p120ctn-Isoformen erkennt, und ECL-Detektion. In Abbildung 11 ist gezeigt, dass die verschiedenen humanen Pankreaskarzinomzelllinien unterschiedliche p120ctn-Isoformen exprimieren. Die Zelllinien PANC-1 und MiaPaCa-2 zeigen das gleiche p120ctn Proteinbandenmuster. Auch IMIM PC-1, IMIM PC-2 und AsPC-1 zeigen eine vergleichbare p120ctn Proteinexpression. Für PANC-1, MiaPaCa-2, IMIM PC-1, IMIM PC-2 und AsPC-1 zeigt sich, dass vor allen Dingen drei lange Isoformen exprimiert werden. Die Proteinbanden mit einem Molekulargewicht von 116 kDa, 100 kDa und 97 kDa könnten den Isoformen 1, 2 und 3 entsprechen. Die Proteinbanden mit weniger als 90 kDa könnten Abbaubanden der langen Isoformen sein. Die Proteinbande von 66-70 kDa könnte jedoch auch der Isoform 4 zugeordnet werden. Die Zelllinien BxPC-3 und PaTu 8988 s exprimieren keine langen Isoformen über 100 kDa und PaTu 8988 t exprimiert p120ctn kaum. Eine genaue Zuordnung der exprimierten Isoformen ist aufgrund eines fehlenden p120ctn-Isoform-Standards nicht möglich. Der verwendete anti-p120ctn-Antikörper von BD Biosciences bindet am carboxy-terminalen Ende außerhalb der *armadillo repeat*-Domäne von p120ctn und detektiert alle Isoformen. Der von Wu und Mitarbeitern hergestellte und beschriebene monoklonale anti-p120ctn-Antikörper 6H11, der am amino-terminalen Ende der langen p120ctn-Isoform 1 bindet (Wu *et al*., 1998), wurde in der vorliegenden Arbeit nicht verwendet.

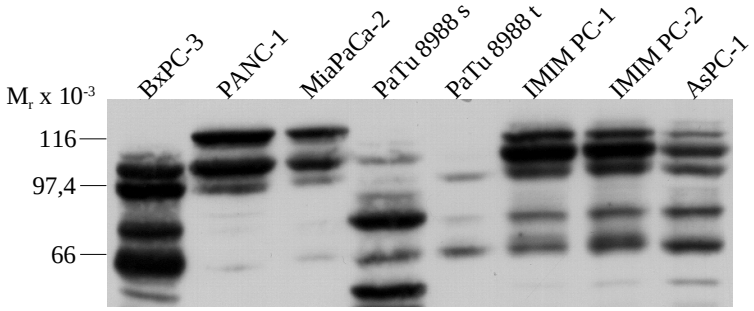


Abbildung 11: Nachweis der Expression von p120ctn in verschiedenen humanen Pankreaskarzinomzelllinien. Zur vergleichenden Analyse der Expression von p120ctn wurden je 50 µg Protein der Zelllysate der humanen Pankreaskarzinomzelllinien BxPC-3, PANC-1, MiaPaCa-2, PaTu 8988 s, PaTu 8988 t, IMIM PC-1, IMIM PC-2, AsPC-1 in einem 10 %igen SDS-Polyacrylamidgel aufgetrennt und im Immunblot analysiert. Der Nachweis von p120ctn erfolgte mit einem monokonalen anti-p120ctn-Antikörper und ECL-Entwicklung. Der Immunblot zeigt die in den humanen Pankreaskarzinomzelllinien exprimierten Isoformen von p120ctn. Ein Proteinstandard ist links markiert.

4.3.3 Expression von p120ctn in EGFP-RhoA- und EGFP-RhoC-exprimierenden PANC-1-Zellen

Zur Analyse der Expression von p120ctn in EGFP-RhoA- und EGFP-RhoC-exprimierenden PANC-1-Zellen wurden Zelllysate in RIPA-Puffer hergestellt. Es wurden jeweils 25 µg Protein der Zelllysate von EGFP 21-, EGFP-RhoA 7- und EGFP-RhoC 3-exprimierenden PANC-1-Zellen in einem 10 %igen SDS-Polyacrylamidgel aufgetrennt und im Immunblotverfahren analysiert. Der Nachweis von p120ctn erfolgte mit einem polyklonalen anti-p120ctn-Antikörper und ECL-Detektion. Der Antikörper bindet an das carboxy-terminale Ende und erkennt alle p120ctn-Isoformen. In Abbildung 12 sind die in den untersuchten Zellen exprimierten p120ctn-Isoformen gezeigt. Es zeigt sich, dass in allen drei Zellklonen gleiche Mengen an p120ctn nachgewiesen wurden. In dem dargestellten und in den nicht dargestellten Versuchen wurden vier verschiedene p120ctn-Isoformen in den EGFP-, EGFP-RhoA- und EGFP-RhoC-exprimierenden PANC-1-Zellen exprimiert. Die Proteinbanden mit einem Molekulargewicht von 116 kDa, 100 kDa, 97 kDa und 70 kDa könnten den Isoformen 1, 2, 3 und 4 entsprechen. Eine eindeutige Zuordnung ist allerdings mit den zur Verfügung stehenden Mitteln und Methoden nicht möglich.

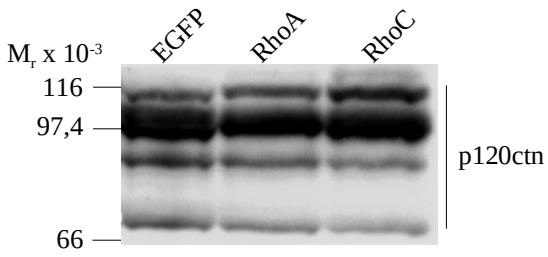


Abb. 12: Nachweis der Expression von p120ctn in EGFP-, EGFP-RhoA- und EGFP-RhoC-exprimierenden PANC-1-Zellen. Zur Analyse der Expression von p120ctn wurden je 25 µg Protein von RIPA-Zelllysat von EGFP 21-, EGFP-RhoA 7- und EGFP-RhoC 3- exprimierenden PANC-1-Zellen in einem 10 %igen SDS-Polyacrylamidgel aufgetrennt. Der Nachweis der exprimierten p120ctn-Isoformen erfolgte mit einem polyklonalen anti-p120ctn-Antikörper und ECL-Detektion. Ein Proteinstandard ist links markiert.

4.3.4 Nachweis der Interaktion von p120ctn mit GST-Rho-Fusionsproteinen

Die Interaktion von p120ctn mit den Rho-GTPasen RhoA und RhoC wurde in *in vitro*-Bindungsexperimenten mit gereinigten GST-Rho-Fusionsproteinen und mit Zelllysaten von PANC-1-Zellen analysiert (siehe Kapitel 3.3.16). Die in den Experimenten verwendeten GST-Proteine sowie die GST-RhoA-, GST-RhoC- und GST-RhoC/A-Fusionsproteine wurden, wie in Kapitel 3.3.1.1 beschrieben, in *E. coli* BL21(DE3) exprimiert und durch Bindung an Glutathion-Sepharose und nachfolgender Elution mit reduziertem Glutathion gereinigt. PANC-1-Zellen wurden bis zur Konfluenz kultiviert und Zelllysate in XPLN-Puffer hergestellt. Zur Vorreinigung des Zelllysates zur Minimierung von unspezifischen Bindungen an Glutathion-Sepharose wurden je Ansatz 3-5 mg Protein aus PANC-1-Zelllysat mit 20 µl Glutathion-Sepharose für 1 h inkubiert. Anschließend wurden die vorgereinigten Überstände bzw. XPLN-Puffer (als Kontrolle) mit je 30 µg GST-RhoA-, GST-RhoC- und GST-RhoC/A-Fusionsproteinen für 16-20 h inkubiert. Zur Kontrolle unspezifischer Bindungen von p120ctn an den GST-Anteil der GST-Rho-Fusionsproteine wurde ein Ansatz mitgeführt, der 30 µg GST-Proteine und Zelllysat enthielt. Nach der Inkubation wurden die Ansätze mit 20 µl Glutathion-Sepharose versetzt, um GST-Protein-Komplexe aus den Ansätzen zu präzipitieren. Die präzipitierten Proteine wurden in einem 10 %igen SDS-Polyacrylamidgel aufgetrennt und im Immunblotverfahren analysiert. Zur Kontrolle des p120ctn-Gehaltes in PANC-1-Zellen wurde 20 µg Protein aus PANC-1-Zelllysat aufgetrennt. Der Nachweis des präzipitierten sowie im Zelllysat enthaltenen p120ctn erfolgte mit einem monoklonalen anti-p120ctn-Antikörper und ECL-Detektion. In Abbildung 13 ist ein Experiment von drei unabhängig

voneinander durchgeführten Interaktionsstudien gezeigt. In Abbildung 13 A zeigen die beiden oberen Immunblots bei unterschiedlichen Belichtungszeiten p120ctn-Isoformen, die unter den genannten *in vitro*-Versuchsbedingungen mit gereinigten GST-Rho-GTPasen aus PANC-1-Zelllysat präzipitiert werden konnten. Die Immunblots zeigen, dass p120ctn vor allem mit GST-RhoC und GST-RhoC/A interagiert. Die Bindung mit GST-RhoA ist im abgebildeten Experiment nur sehr schwach. Die durch GST-RhoA präzipitierten p120ctn-Isoformen wurden erst sichtbar detektierbar, nachdem der Immunblot nochmals mit ECL behandelt und länger exponiert worden war. In den beiden oberen Immunblots zeigt sich, dass deutlich mehr p120ctn durch GST-RhoC und GST-RhoC/A präzipitiert werden konnte als mit GST-RhoA. Dass es sich bei den präzipitierten Proteinen in den Spuren 4 und 6 der beiden oberen Immunblots um p120ctn-Isoformen handelt, wurde durch den Vergleich mit dem im Zelllysat enthaltenen p120ctn-Isoformen in Spur 8 bestätigt (*PANC-1-Lysat*). Die detektierten Proteinbanden zeigen, dass drei verschiedene p120ctn-Isoformen präzipitiert wurden, wobei im Rahmen dieser Arbeit mangels isoformspezifischer Antikörper nicht geklärt werden konnte, welche Isoformen den Proteinbanden zuzuordnen sind. In Spur 7 wurde zur Kontrolle unspezifischer Bindungen von p120ctn an den GST-Anteil der GST-Rho-Fusionsproteine ein Ansatz aufgetrennt, der GST-Proteine und PANC-1-Zelllysat enthielt (*GST*). In diesem Ansatz konnte kein p120ctn nachgewiesen werden, sodass p120ctn spezifisch mit RhoC bzw. RhoA interagiert. Zum Nachweis der eingesetzten Menge an GST-Rho-Fusionsproteinen wurde der Immunblot mit einem polyklonalen anti-GST-Antikörper und Detektion mit alkalischer Phosphatase nachbehandelt. Dieser Immunblot ist im unteren Teil der Abbildung 13 A gezeigt. Bei kritischer Betrachtung des untersten Immunblots wurde in diesem Experiment mehr GST-RhoC/A eingesetzt als GST-RhoC. Es ist auch zu berücksichtigen, dass weniger GST-RhoA eingesetzt wurde als GST-RhoC und GST-RhoC/A. Die Abbildung 13 B zeigt die quantitative Auswertung der Bindung von p120ctn und GST-Rho mittels Densitometrie (siehe Kapitel 3.6) des p120ctn Nachweises von drei unabhängig voneinander durchgeführten *in vitro*-Bindungsexperimenten. Es wurden die Quotienten aus den Werten für präzipitiertes p120ctn und für das im Experiment eingesetzte GST-Rho gebildet. Als Referenz diente die Bindung von p120ctn an GST-RhoC und wurde gleich 1 gesetzt. Der Bindungsfaktor von p120ctn zu GST-Rho beträgt für GST-RhoA 0,52 $\pm$ 0,19 ($\pm$ SD, n=3) und für GST-RhoC/A 0,89 $\pm$ 0,09 ($\pm$ SD, n=3). Es zeigt sich, dass im Verhältnis zu GST-RhoC mit GST-RhoA fast um die Hälfte, d. h. um den Faktor 0,48 $\pm$ 0,19 weniger p120ctn präzipitiert wurde. GST-RhoC/A verhält sich bei der Interaktion mit p120ctn ähnlich wie

GST-RhoC. Dieses Ergebnis lässt die Folgerung zu, dass das carboxy-terminale Ende von GST-RhoC für die starke Bindung von p120ctn nicht bestimmend ist.

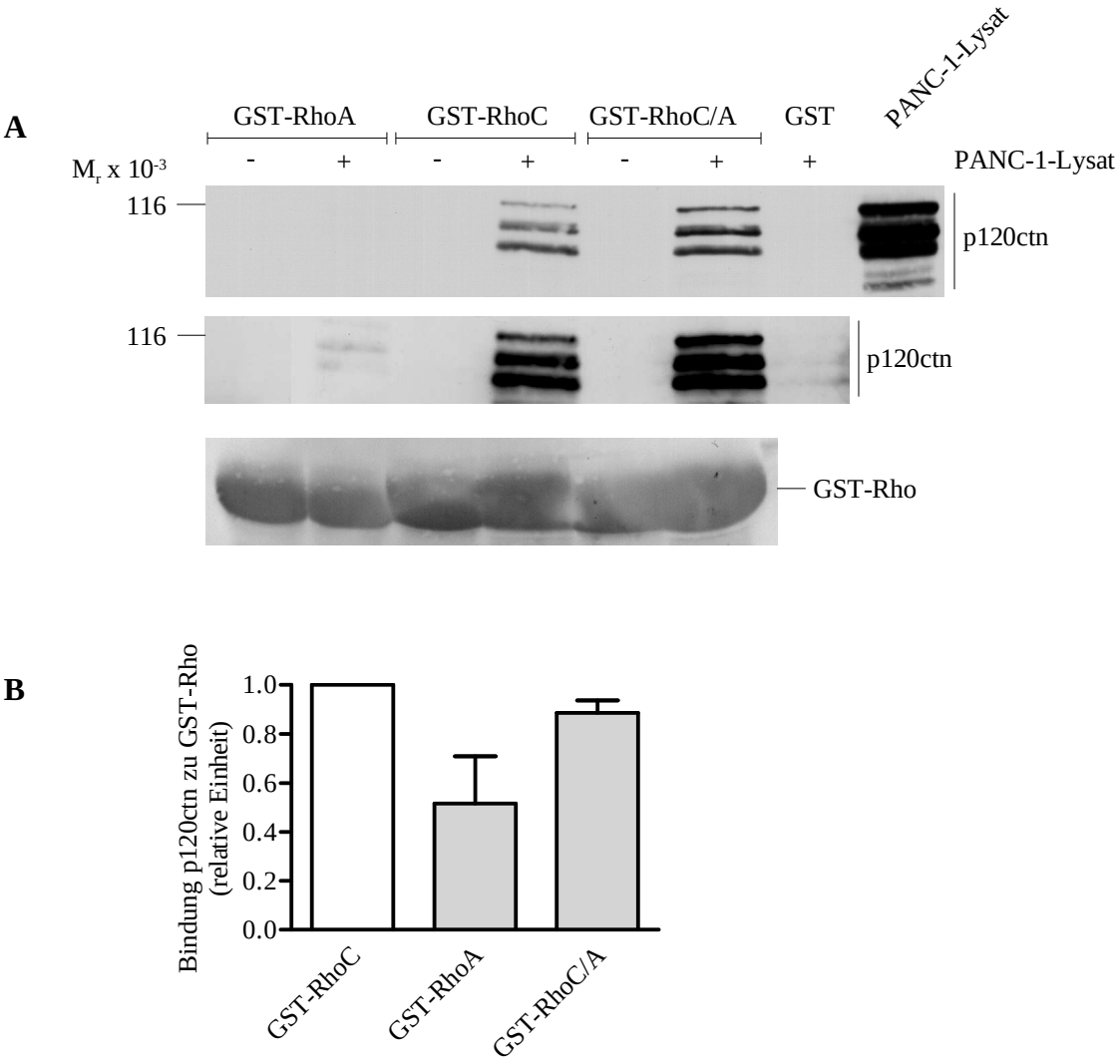


Abbildung 13 : Präzipitation von p120ctn mit GST-Rho-Fusionsproteinen. Um die Interaktion der Rho-GTPasen RhoA und RhoC mit p120ctn zu analysieren, wurden 30 µg der gereinigten GST-Rho-Fusionsproteine entweder mit 3 mg PANC-1-Zelllysat (+) oder mit XPLN-Puffer (-) inkubiert. Zur Minimierung von unspezifischen Proteinbindungen an Glutathion-Sepharose wurde das Zelllysat zuvor mit Glutathion-Sepharose-*beads* präinkubiert und der vorgereinigte Überstand für die Interaktionsversuche verwendet. Zur Kontrolle von unspezifischen Bindungen von p120ctn an GST wurde ein Ansatz mitgeführt, der 30 µg GST-Proteine und Zelllysat enthielt (GST). Nach einer Inkubationzeit von 16-20 h wurden allen Ansätzen 20 µl Glutathion-Sepharose-*beads* zugesetzt und die Ansätze für weitere 2 h inkubiert. Anschließend wurden die Glutathion-Sepharose-*beads* durch Zentrifugation sedimentiert, mit SDS-Probenpuffer versetzt und die gebundenen Proteine in einem 10 %igen SDS-Polyacrylamidgel aufgetrennt und im Immunblotverfahren analysiert. Als Kontrolle für den Nachweis von p120ctn wurden in der Spur 8 im selben Gel 20 µg Protein von PANC-1-Zelllysat aufgetrennt (PANC-1-Lysat). Der Nachweis von präzipitiertem und im Zelllysat enthaltenen p120ctn erfolgte mit einem monoklonalen anti-p120ctn-Antikörper und ECL-Detektion. **A**) Der obere und der mittlere Immunblot zeigen präzipitiertes sowie im Zelllysat enthaltenes p120ctn, wobei der mittlere Immunblot zum Nachweis einer sehr schwachen p120ctn-Bindung an GST-RhoA-Proteine länger exponiert wurde. Der unterste Immunblot wurde mit einem polyklonalen anti-GST-Antikörper behandelt und die GST-Rho-Fusionsproteine mittels alkalischer Phosphatase detektiert. Dieser Immunblot zeigt die in den einzelnen Ansätzen eingesetzten Mengen der GST-Rho-Fusionsproteine. Links ist ein Proteinstandard markiert. **B**) Die Grafik zeigt die quantitative Auswertung mittels

Densitometrie. Es wurden die Quotienten aus den Werten für die Menge des präzipitierten p120ctn und für die im Experiment eingesetzten Mengen an GST-Rho (graue Balken) in Relation zu GST-RhoC (weißer Balken) gebildet. Es sind die Mittelwerte ± Standardabweichung (SD) von drei unabhängig voneinander durchgeführten Experimenten als relative Einheit dargestellt (n=3).

4.3.5 Nachweis der Interaktion von GST-RhoC-Mutanten mit p120ctn

Da sich die beiden Rho-GTPasen RhoA und RhoC nur in 16 von insgesamt 193 Aminosäuren unterscheiden und eine Sequenzidentität von 92 % auf Aminosäureebene aufweisen, sollte als nächstes geklärt werden, welche Aminosäuren zu dem unterschiedlichen Bindungsverhalten mit p120ctn beitragen. Durch Verwendung der Chimäre GST-RhoC/A konnte bereits gezeigt werden, dass das carboxy-terminale Ende der Rho-GTPase nicht für die starke Bindung von p120ctn an GST-RhoC verantwortlich ist. Für das GEF XPLN konnte gezeigt werden, dass es *in vitro* den Guaninnukleotidaustausch von RhoA und RhoB, jedoch nicht von RhoC induziert. Dieser Unterschied wird durch die unterschiedliche Aminosäure an Position 43 der drei Rho-GTPasen erklärt. Bei RhoA und RhoB ist an dieser Position Valin, bei RhoC ist es Isoleucin (Arthur *et al*., 2002). Um zu analysieren, ob das unterschiedliche Bindungsverhalten von RhoA und RhoC mit p120ctn ebenfalls durch eine der unterschiedlichen Aminosäuren begründet ist, wurden sieben RhoC-Mutanten hergestellt. Die restlichen neun Aminosäuren am carboxy-terminalen Ende der Rho-GTPase wurden bereits in der Chimäre RhoC/A berücksichtigt. Durch *in vitro*-Mutagenese (siehe Kapitel 3.2.11) wurden in die doppelsträngige Plasmid-DNA pGEX-2TK-/RhoC Punktmutationen in den Kodons 43, 123, 140, 141, 152, 157 und 165 eingeführt. Durch den Austausch einer Base auf DNA-Ebene wurden so die entsprechenden RhoC-Mutanten RhoC (I43V), (Q123N), (R140K), (S141P), (S152G), (L157M) und (E165D) generiert (siehe Kapitel 3.2.13). Die mutierten Kodons in RhoC kodierten nun für die korrespondierende Aminosäure von RhoA. Die GST-RhoC-Mutanten wurden in *E. coli* BL21(DE3) exprimiert und affinitätschromatographisch durch Bindung an Glutathion-Sepharose und anschließender Elution mit reduziertem Glutathion gereinigt (siehe Kapitel 3.3.1.1/4.3.1)). Die *in vitro*-Bindungsexperimente (siehe Kapitel 3.3.16) zur Präzipitation von p120ctn wurden, wie im vorangegangenen Kapitel beschrieben, durchgeführt. Für die Bindungsexperimente wurden 3 mg vorgereinigtes PANC-1-Zelllysat mit 30 µg GST-RhoC-Fusionsproteinen und GST-RhoC-Mutanten für 16-20 h inkubiert. Anschließend wurden je 20 µl Glutathion-Sepharose zugegeben und die Ansätze erneut für 2 h inkubiert. Nach Sedimentation der Glutathion-Sepharose-*beads* durch Zentrifugation

wurden die gebundenen Proteine in einem 10 % igen SDS-Polyacrylamidgel aufgetrennt und im Immunblotverfahren analysiert. Der Nachweis von präzipitiertem sowie im Zelllysat enthaltenen p120ctn erfolgte mit einem monoklonalen anti-p120ctn-Antikörper und ECL-Detektion. In Abbildung 14 sind repräsentative Ergebnisse eines von acht durchgeführten *in vitro*-Bindungsexperimenten mit wildtypischem GST-RhoC und GST-Rho-Mutanten gezeigt. Die Immunblots in Abbildung 14 A zeigen, dass sowohl mit wildtypischem GST-RhoC als auch mit den Mutanten GST-RhoC (I43V), (Q123N), (R140K), (L157M), (S141P) und (E165D) p120ctn aus PANC-1-Zelllysat nahezu gleich gut präzipitiert werden konnte. Die Ausnahme bildete die Mutante GST-RhoC (S152G), mit der deutlich weniger p120ctn präzipitiert wurde. Der rechte Immunblot zeigt in Spur 4 in PANC-1-Zelllysat enthaltenes p120ctn (*PANC-1-Lysat*). Im Vergleich mit präzipitiertem p120ctn in den übrigen Spuren der beiden Immunblots zeigt sich, dass in diesem exemplarisch dargestellten Experiment und in den nicht dargestellten Experimenten die p120ctn-Isoform, die als die unterste der drei Proteinbanden detektiert wurde, mehr an GST-RhoC und dessen Mutanten bindet als die anderen beiden p120ctn-Isoformen. Im linken Immunblot wurde in Spur 7 die Kontrolle zur Überprüfung von unspezifischen Bindungen von p120ctn an den GST-Anteil der GST-RhoC-Fusionsproteine aufgetrennt (*GST*). Es zeigt sich, dass p120ctn nicht nachgewiesen werden konnte. Im unteren Teil der Abbildung 14 A ist die Färbung des Immunblots mit Ponceau S gezeigt. Es wurden im abgebildeten Experiment unterschiedliche Mengen GST-RhoC-Fusionsproteine eingesetzt. Um die Menge an gebundenem p120ctn in Relation zur eingesetzten Menge GST-Rho darzustellen, wurden die in 14 A abgebildeten Immunblots mittels Densitometrie quantitativ analysiert. Es wurden die Quotienten aus den Werten für präzipitiertes p120ctn und für das im Experiment eingesetzte GST-Rho gebildet. Als Referenz diente die Bindung von p120ctn an GST-RhoC und wurde gleich 1 gesetzt. Die Ergebnisse dieser Analyse sind als Grafik in Abbildung 14 B dargestellt. Die Bindungsfaktoren der GST-RhoC-Mutanten, mit Ausnahme von GST-RhoC (S152G), betragen zwischen 0,81 und 0,93. Bei GST-RhoC (S152G) beträgt der Bindungsfaktor 0,64, d. h. ein Drittel weniger als bei GST-RhoC. Als Ergebnis dieser *in vitro*-Bindungsexperimente zeigt sich, dass sowohl mit wildtypischem GST-RhoC als auch mit den Mutanten GST-RhoC (I43V), (Q123N), (R140K), (L157M), (S141P) und (E165D) gleich viel p120ctn aus PANC-1-Zelllysat präzipitiert werden konnte. Im Immunblot konnte gezeigt und durch quantitative Analyse mittels Densitometrie bestätigt werden, dass weniger p120ctn an die RhoC-Mutante (S152G) bindet, als an wildtypisches RhoC bzw. an eine der anderen sechs Mutanten.

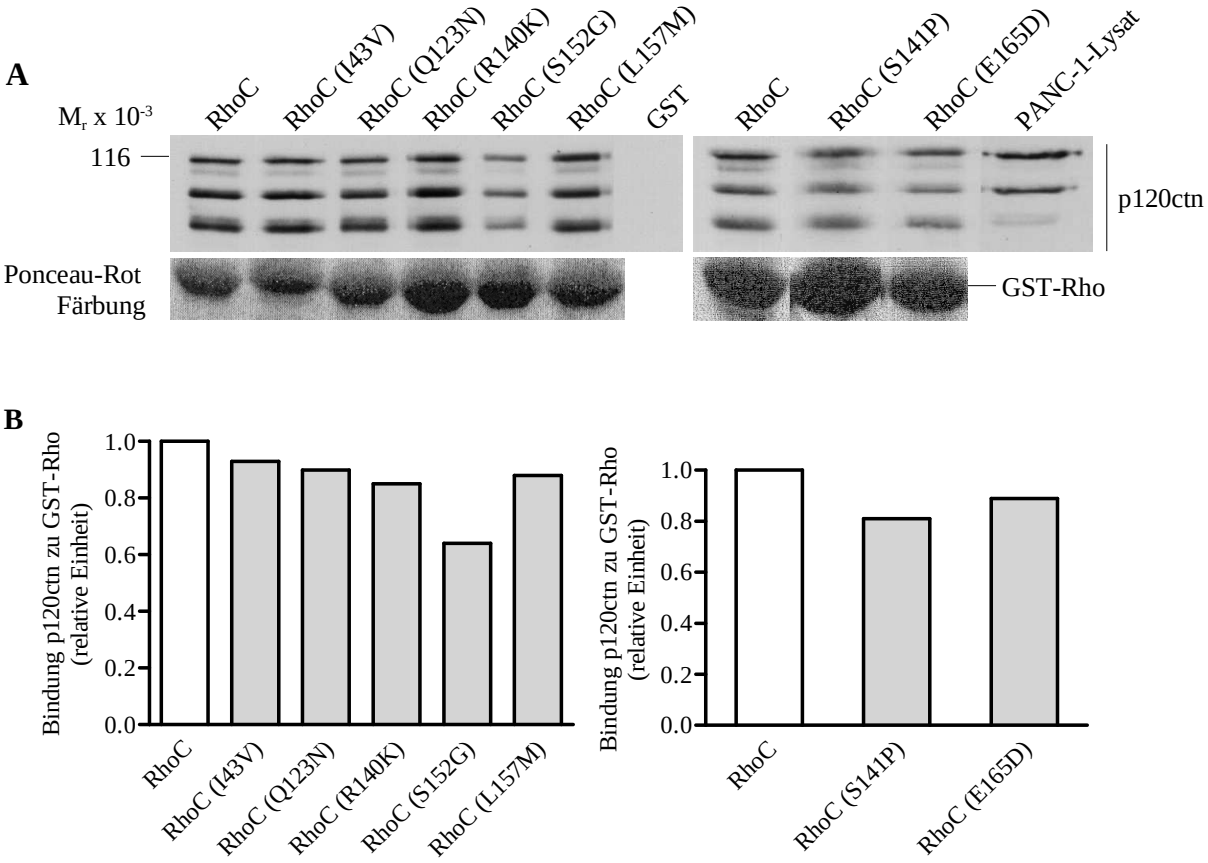


Abbildung 14: Präzipitation von p120ctn mit GST-RhoC-Mutanten. Um die Interaktion von p120ctn und GST-RhoC sowie GST-RhoC-Mutanten zu analysieren, wurden 30 µg der gereinigten GST-RhoC-Fusionsproteine und GST-RhoC-Mutanten mit 3 mg vorgereinigtem PANC-1-Zelllysat inkubiert. Zur Kontrolle von unspezifischen Bindungen von p120ctn an GST wurde ein Ansatz mitgeführt, der GST-Proteine und Zelllysat enthielt (GST). Nach einer Inkubationzeit von 16-20 h wurden Glutathion-Sepharose-*beads* zugegeben und die Ansätze für weitere 2 h inkubiert. Anschließend wurden die Glutathion-Sepharose-*beads* durch Zentrifugation sedimentiert und mit SDS-Probenpuffer versetzt. Die gebundenen Proteine wurden in einem 10 %igen SDS-Polyacrylamidgel aufgetrennt und im Immunblotverfahren analysiert. Der Nachweis von präzipitiertem und im Zelllysat enthaltenen p120ctn erfolgte mit einem monoklonalen anti-p120ctn-Antikörper und ECL-Detektion. Als Kontrolle wurden im rechten Immunblot in Spur 4 2 µg Protein von PANC-1-Zelllysat aufgetrennt (PANC-1-Lysat). **A**) Die Immunblots im oberen Teil der Abbildung zeigen präzipitiertes sowie im Zelllysat enthaltenes p120ctn. Unterhalb der Immunblots ist die mit Ponceau-Rot gefärbte Nitrozellulose-Membran dargestellt und zeigt die im Versuch eingesetzten Mengen GST-RhoC-Fusionsproteine. Links ist ein Proteinstandard markiert. **B**) Die Grafik zeigt die quantitative Auswertung mittels Densitometrie. Es wurden die Quotienten aus den Werten für präzipitiertes p120ctn und für die im Experiment eingesetzten Mengen an GST-Rho (graue Balken) in Relation zu GST-RhoC (weißer Balken) gebildet.

4.3.6 Nachweis der Interaktion von p120ctn mit GST-RhoA, GST-RhoC und GST-RhoC/A sowie mit den Mutanten GST-RhoC (S152G) und GST-RhoC/A (S152G)

Zur genaueren Analyse des Bindungsverhaltens der GST-RhoC-Mutante (S152G) mit p120ctn im Vergleich zu GST-RhoC, GST-RhoA und der Mutante GST-RhoC/A (S152G) wurden weitere *in vitro*-Bindungsexperimente mit gereinigten GST-Rho-Fusionsproteinen durchgeführt (siehe Kapitel 3.3.16). In den bisherigen Experimenten konnte gezeigt werden, dass mit GST-RhoA um den Faktor 0,52 $\pm$ 0,19 weniger p120ctn aus PANC-1-Zelllysaten präzipitiert wurde als mit GST-RhoC. Mit der Chimäre GST-RhoC/A konnte im Verhältnis zu GST-RhoC ungefähr gleich viel p120ctn präzipitiert werden. Diese Ergebnisse führten zu der Annahme, dass das carboxy-terminale Ende von GST-RhoC nicht an der starken Bindung von p120ctn an die Rho-GTPase beteiligt ist. Um zu analysieren, ob der Austausch der Aminosäuren Serin gegen Glycin an Position 152 auch einen Einfluss auf das Bindungsverhalten der Chimäre RhoC/A hat, wurde durch *in vitro*-Mutagenese (siehe Kapitel 3.2.11) eine Punktmutation an dieser Position in die doppelsträngige Plasmid-DNA pGEX-2TK-/RhoC/A eingefügt und so die Mutante GST-RhoC/A (S152G) generiert (siehe Kapitel 3.2.13). Die in den Experimenten verwendeten GST-Proteine, die GST-RhoA-, GST-RhoC- und GST-RhoC/A-Fusionsproteine sowie die Mutanten GST-RhoC (S152G) und GST-RhoC/A (S152G) wurden, wie in Kapitel 3.3.1.1/4.3.1 beschrieben, in *E. coli* BL21(DE3) exprimiert und durch Bindung an Glutathion-Sepharose und nachfolgender Elution mit reduziertem Glutathion gereinigt. Die *in vitro*-Bindungsexperimente wurden, wie in den vorangegangen Kapiteln beschrieben, durchgeführt. Für jeden Ansatz wurden 5 mg der vorgereinigten PANC-1-Zelllysate mit je 30 µg GST-Rho-Fusionsproteinen für 16-20 h inkubiert, anschließend je 25 µl Glutathion-Sepharose zugegeben und erneut für 2 h inkubiert. Daran anschließend wurden die Glutathion-Sepharose-*beads* sedimentiert, die gebundenen Proteine in einem 10 %igen SDS-Polyacrylamidgel aufgetrennt und im Immunblotverfahren analysiert. Der Nachweis von präzipitiertem sowie im Zelllysat enthaltenen p120ctn erfolgte mit einem monoklonalen anti-p120ctn-Antikörper und ECL-Detektion. Der Immunblot in Abbildung 15 A zeigt, dass in diesem *in vitro*-Bindungsexperiment mit GST-RhoC und GST-RhoC/A etwa ein Drittel mehr p120ctn aus PANC-1-Zelllysat präzipitiert wurde als mit GST-RhoC (S152G) und GST-RhoC/A (S152G) und etwa doppelt so viel als mit GST-RhoA. In Abbildung 15 A ist in Spur 7 in PANC-1-Zelllysat enthaltenes p120ctn gezeigt (*PANC-1-Lysat*). Der Kontrollansatz zur Überprüfung von unspezifischen Bindungen von p120ctn an den GST-Anteil der GST-Rho-Fusionsproteine wurde in Spur 6 aufgetrennt (*GST*).

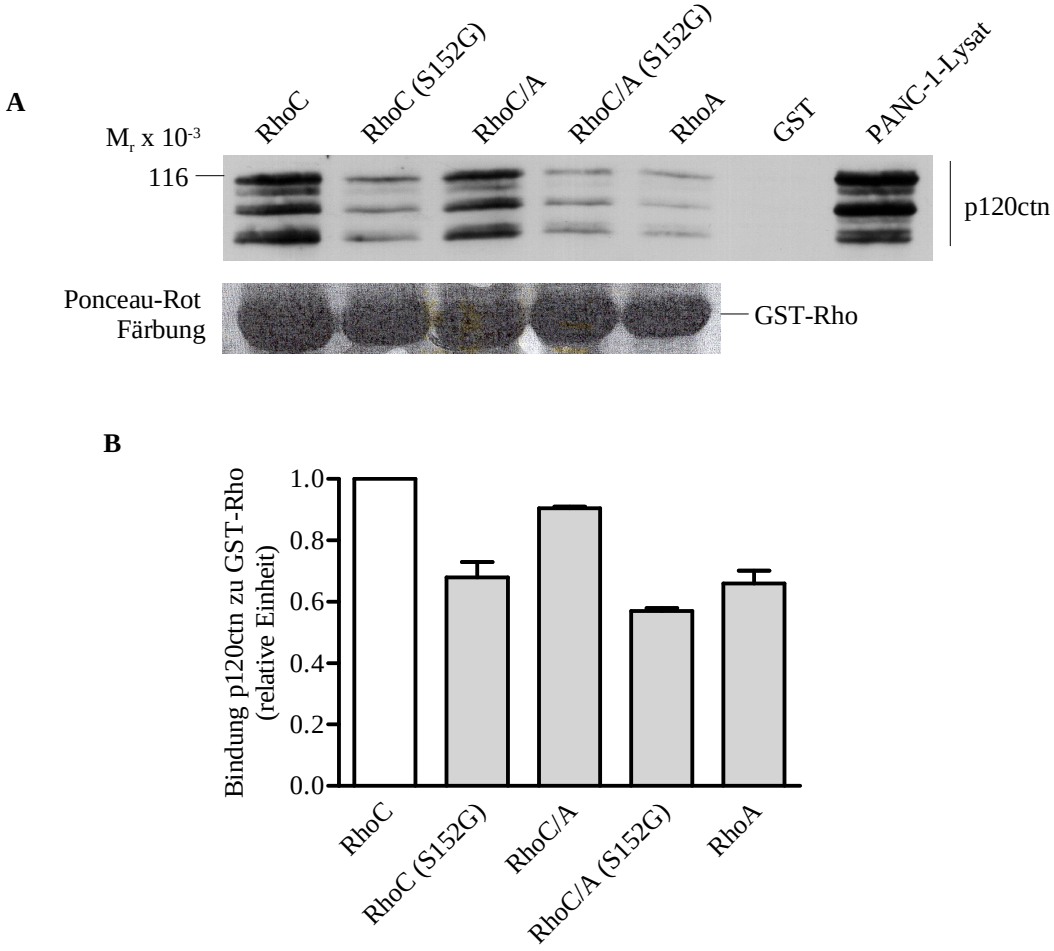


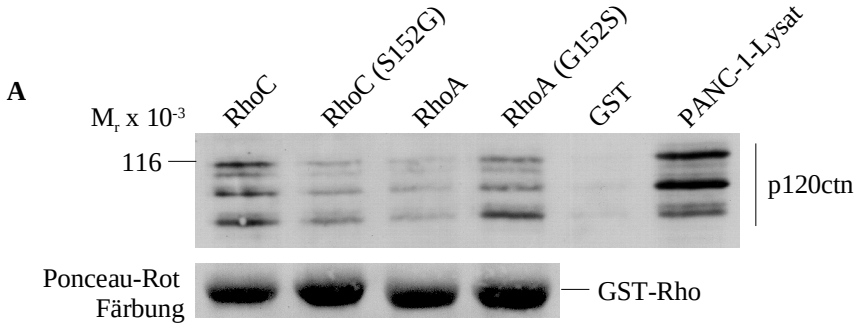
Abbildung 15: Nachweis der Interaktion von GST-RhoA, GST-RhoC, GST-RhoC/A und den Mutanten GST-RhoC (S152G) und GST-RhoC/A (S152G) mit p120ctn. Zur Analyse der Interaktion von p120ctn mit Rho-GTPasen wurden 30 µg der gereinigten GST-Rho-Fusionsproteine mit 5 mg vorgereinigtem PANC-1-Zelllysat inkubiert. Zur Kontrolle von unspezifischen Bindungen von p120ctn an GST wurde ein Ansatz mitgeführt, der GST-Proteine und Zelllysat enthielt (GST). Nach einer Inkubationzeit von 16-20 h wurden allen Ansätzen Glutathion-Sepharose-*beads* zugesetzt und die Ansätze für weitere 2 h inkubiert. Anschließend wurden die Glutathion-Sepharose-*beads* durch Zentrifugation sedimentiert, mit SDS-Probenpuffer versetzt und die gebundenen Proteine wurden in einem 10 %igen SDS-Polyacrylamidgel aufgetrennt und im Immunblotverfahren analysiert. Der Nachweis von präzipitiertem und im Zelllysat enthaltenen p120ctn erfolgte mit einem monoklonalen anti-p120ctn-Antikörper und ECL-Detektion. Als Kontrolle für den Nachweis von p120ctn wurden 5 µg Protein von PANC-1-Zelllysat in Spur 7 aufgetrennt (PANC-1-Lysat). **A**) Der Immunblot zeigt präzipitiertes sowie im Zelllysat enthaltenes p120ctn. Unterhalb des Immunblots ist die mit Ponceau-Rot gefärbte Nitrozellulose-Membran dargestellt und zeigt die im Versuch eingesetzten Mengen GST-Rho-Fusionsproteine. Ein Proteinstandard ist links markiert. **B**) Die Grafik zeigt die quantitative Auswertung mittels Densitometrie. Es wurden die Quotienten aus den Werten für präzipitiertes p120ctn und für die im Experiment eingesetzten Mengen an GST-Rho (graue Balken) in Relation zu GST-RhoC (weißer Balken) gebildet. Es sind die Mittelwerte ± Standardabweichung (SD) von drei unabhängig voneinander durchgeführten Experimenten als relative Einheit dargestellt (n=3).

Hierbei zeigt sich, dass p120ctn nicht nachgewiesen wurde. Durch Färbung des Immunblots mit Ponceau S konnte die eingesetzte Menge der GST-Rho-Fusionsproteine in den einzelnen Ansätzen nachgewiesen werden. Der Immunblot ist im unteren Teil der Abbildung 15 A gezeigt. Die densitometrische Auswertung von drei unabhängig voneinander durchgeführten Experimenten ist in Abbildung 15 B gezeigt. Es wurden die Quotienten aus den Werten für präzipitiertes p120ctn und für das im Experiment eingesetzte GST-Rho gebildet. Als Referenz diente die Bindung von p120ctn an GST-RhoC und wurde gleich 1 gesetzt. In Relation zur eingesetzten Menge an GST-Rho beträgt der Bindungsfaktor für GST-RhoC (S152G) 0,68 $\pm$ 0,07 ($\pm$ SD, n=3), für die Mutante der Chimäre GST-RhoC/A (S152G) 0,57 $\pm$ 0,01 ($\pm$ SD, n=3) und für GST-RhoA 0,66 $\pm$ 0,07 ($\pm$ SD, n=3). Es zeigt sich, dass bei GST-RhoC (S152G) und GST-RhoC/A (S152G) durch die Mutation an der Position 152 die Interaktion mit p120ctn auf das Niveau von GST-RhoA reduziert wurde. Die Interaktion von GST-RhoC und GST-RhoC/A mit p120ctn ist ähnlich stark und beträgt für GST-RhoC/A 0,91 $\pm$ 0,007 ($\pm$ SD, n=3). Somit zeigen die *in vitro*-Bindungsexperimente, dass der Austausch der Aminosäure an Position 152 einen inhibierenden Einfluss auf das Bindungsverhalten von RhoC und RhoC/A mit p120ctn hat. Das carboxy-terminale Ende von RhoC und RhoA hat keinen Einfluss auf das Bindungsverhalten mit p120ctn.

4.3.7 Vergleichende Analyse der Interaktion der Mutanten RhoA (G152S) und RhoC (S152G) mit p120ctn

In weiteren *in vitro*-Bindungsexperimenten sollte nun analysiert werden, ob das Bindungsverhalten von GST-RhoA zu p120ctn gesteigert werden kann, wenn bei RhoA das Glycin an Position 152 gegen ein Serin wie in RhoC ausgetauscht wird. Hierfür wurde über *in vitro*-Mutagenese (siehe Kapitel 3.2.11) in die doppelsträngige Plasmid-DNA pGEX-2T/RhoA eine Punktmutation eingeführt und durch den Austausch von Glycin an Position 152 durch ein Serin die Mutante GST-RhoA (G152S) generiert (siehe Kapitel 3.2.13). Die GST-RhoA-Mutante wurde in *E. coli* BL21(DE3) exprimiert und affinitätschromatographisch durch Bindung an Glutathion-Sepharose und anschließender Elution mit reduziertem Glutathion gereinigt (siehe Kapitel 3.3.1.1). Die *in vitro*-Bindungsexperimente wurden, wie in den vorangegangen Kapiteln beschrieben, durchgeführt. Die präzipitierten Proteine wurden in einem 10 %igen SDS-Polyacrylamidgel aufgetrennt und im Immunblotverfahren analysiert. Der Nachweis von präzipitiertem sowie im Zelllysat enthaltenen p120ctn erfolgte mit einem monoklonalen anti-p120ctn-Antikörper und ECL-Detektion. In Abbildung 16 ist das Ergebnis

eines von fünf durchgeführten *in vitro*-Bindungsexperimenten gezeigt. Im oberen Immunblot in Abbildung 16 A zeigt sich, dass mit der Mutante GST-RhoC (S152G) sowie mit GST-RhoA deutlich weniger p120ctn präzipitiert wurde als mit GST-RhoC und mit der Mutante GST-RhoA (G152G). Durch den Austausch der Aminosäure an Position 152 (Serin gegen Glycin) wurde bei RhoC das Bindungsverhalten zu p120ctn negativ beeinflusst. Bei GST-RhoA (G152S) wirkte sich der Austausch des Glycins an Position 152 gegen ein Serin aktivierend auf die Interaktion mit p120ctn aus. Die Menge des mit GST-RhoA (G152S) präzipitiertem p120ctn erreichte nahezu die Menge p120ctn, die mit GST-RhoC präzipitiert werden konnte. Die GST-RhoC-Mutante (S152G) verhielt sich somit bei der Interaktion mit p120ctn wie GST-RhoA, wie auch in den vorangegangen Kapiteln gezeigt werden konnte. In Spur 6 des Immunblots ist in PANC-1-Zelllysat enthaltenes p120ctn gezeigt (*PANC-1-Lysat*). In Spur 5 wurde ein Ansatz zur Überprüfung von unspezifischen Bindungen von p120ctn an den GST-Anteil der GST-Rho-Fusionsproteine aufgetrennt, der GST-Proteine und PANC-1-Zelllysat enthielt (*GST*). Es zeigt sich, dass p120ctn nicht nachgewiesen werden konnte. Durch Färbung des Immunblots mit Ponceau S konnte in den einzelnen Ansätzen die eingesetzte Menge der GST-Rho-Fusionsproteine nachgewiesen werden und ist im unteren Teil der Abbildung 16 A gezeigt. In Abbildung 16 B ist die quantitative Auswertung mittels Densitometrie von fünf unabhängig voneinander durchgeführten Experimenten gezeigt. Es wurden die Quotienten aus den Werten für präzipitiertes p120ctn und für das im Experiment eingesetzte GST-Rho gebildet. Als Referenz diente die Bindung von p120ctn an GST-RhoC und wurde gleich 1 gesetzt. Der Bindungsfaktor der Mutante GST-RhoC (S152G) beträgt 0,76 $\pm$ 0,03 ($\pm$ SD, n=5) sowie für GST-RhoA 0,65 $\pm$ 0,06 ($\pm$ SD, n=5). Es zeigt sich, dass mit GST-RhoC (S152G) bzw. GST-RhoA ungefähr ein Drittel weniger p120ctn präzipitiert wurde als mit GST-RhoC. Mit der Mutante GST-RhoA (G152G) konnte mit einem Bindungsfaktor von 0,82 $\pm$ 0,13 ($\pm$ SD, n=5) ähnlich viel p120ctn wie mit GST-RhoC gebunden werden. Die Ergebnisse dieser *in vitro*-Bindungsexperimente zeigen, dass die unterschiedlichen Aminosäuren in Position 152 den Unterschied im Bindungsverhalten von RhoA und RhoC zu p120ctn bedingen.



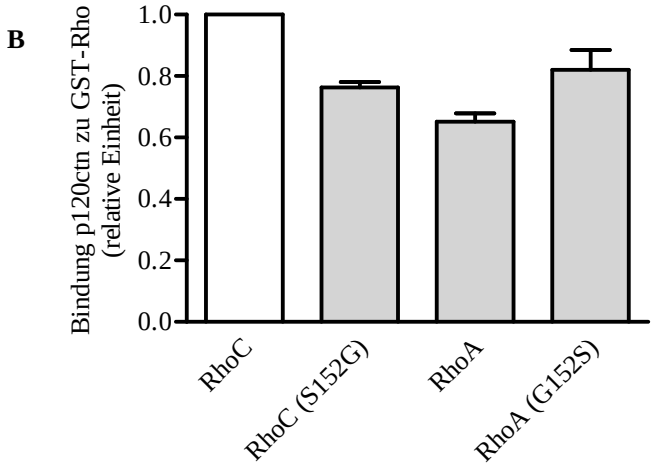


Abbildung 16: Nachweis der Interaktion von GST-RhoA (G152S) und GST-RhoC (S152G) mit p120ctn. Um die Interaktion von p120ctn mit GST-RhoA (G152S) und GST-RhoC (S152G) zu analysieren, wurden 30 µg der gereinigten GST-Rho-Fusionsproteine mit 3 mg vorgereinigtem PANC-1-Zelllysat inkubiert. Zur Kontrolle von unspezifischen Bindungen von p120ctn an GST wurde ein Ansatz mitgeführt, der GST-Proteine und Zelllysat enthielt (GST). Nach einer Inkubationzeit von 16-20 h wurden allen Ansätzen Glutathion-Sepharose-*beads* zugesetzt und die Ansätze für weitere 2 h inkubiert. Anschließend wurden die Glutathion-Sepharose-*beads* durch Zentrifugation sedimentiert und mit SDS-Probenpuffer versetzt. Die gebundenen Proteine wurden in einem 10 %igen SDS-Polyacrylamidgel aufgetrennt und im Immunblotverfahren analysiert. Der Nachweis von präzipitiertem und im Zelllysat enthaltenen p120ctn erfolgte mittels einem monoklonalen anti-p120ctn-Antikörper und ECL-Detektion. Als Kontrolle für den Nachweis von p120ctn wurden in Spur 6 3 µg Protein von PANC-1-Zelllysat aufgetrennt (PANC-1-Lysat). **A**) Der Immunblot zeigt präzipitiertes sowie im Zelllysat enthaltenes p120ctn. Unterhalb ist die mit Ponceau-Rot gefärbte Nitrozellulose-Membran dargestellt und zeigt die im Versuch eingesetzten Mengen der GST-Rho-Fusionsproteine. Links ist ein Proteinstandard markiert. **B**) Die Grafik zeigt die quantitative Auswertung mittels Densitometrie. Es wurden die Quotienten aus den Werten für präzipitiertes p120ctn und für die im Experiment eingesetzten Mengen an GST-Rho (graue Balken) in Relation zu GST-RhoC (weißer Balken) gebildet. Es sind die Mittelwerte $\pm$ Standardabweichung (SD) von fünf unabhängig voneinander durchgeführten Experimenten als relative Einheit dargestellt (n=5).

4.3.8 Bestimmung der [^{35}S]GTP[S]-Bindung der GST-Rho-Fusionsproteine zur Ermittlung der aktiven Proteinkonzentration

Um die Fähigkeit der gereinigten GST-Rho-Fusionsproteine zu überprüfen, GTP zu binden, wurde die Aktiviät der GST-Rho-Fusionsproteine mittels GTP[S]-Bindungsexperimenten mit [^{35}S]GTP[S] untersucht. Der Nukleotidaustausch wird in intakten Zellen durch GEFs (*guanine nucleotide exchange factors*) und durch GAPs (*GTPase-activating proteins*) stimuliert. In den durchgeführten Experimenten zur Ermittlung der GTP-Bindungsfähigkeit wurde die Affinität der GST-Rho-GTPasen zu den schwer hydrolysierbaren GTP-Strukturanaloga [^{35}S]GTP[S] und GTP[S] ohne Einfluss von GEFs und GAPs *in vitro* bestimmt.

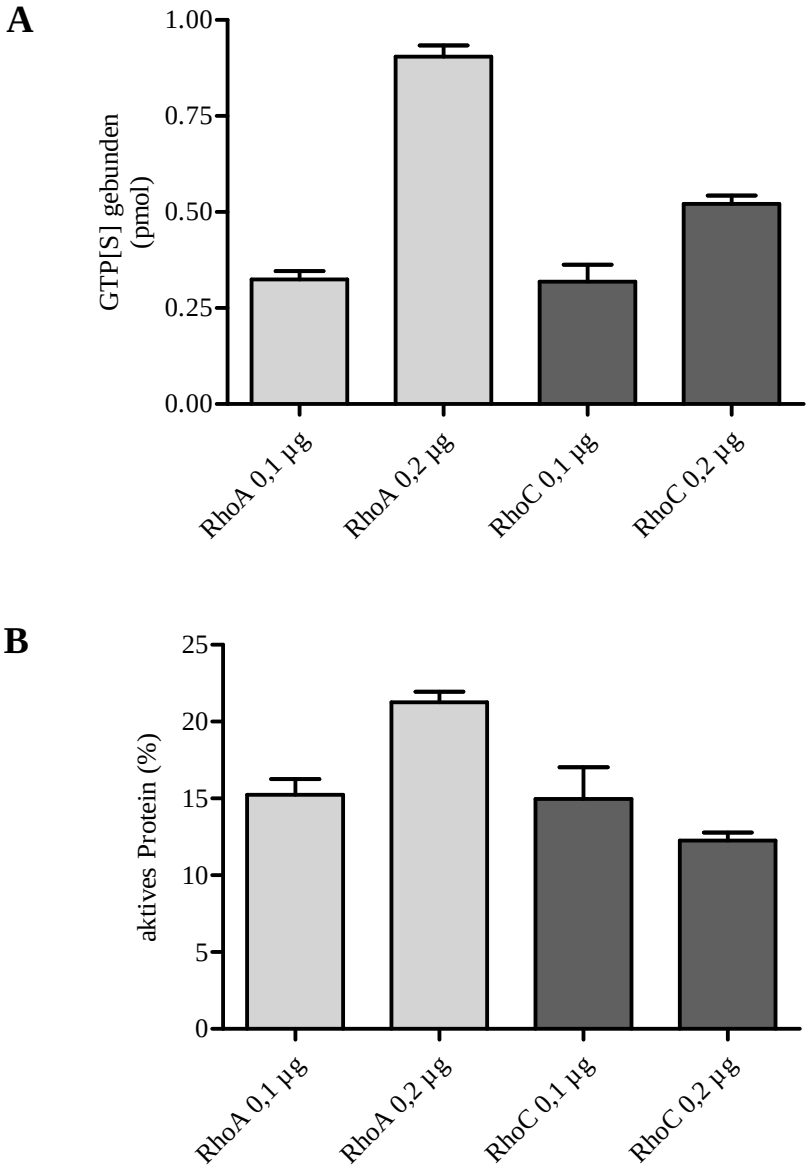


Abbildung 17: Darstellung der GTP[S]-Bindung. Zur Bestimmung der GTP[S]-Bindungsfähigkeit von GST-RhoA- und GST-RhoC-Fusionsproteinen wurden GTP[S]-Bindungsexperimente mit [^{35}S]GTP[S] und GTP[S] durchgeführt. In einem Gesamtvolumen von 20 µl wurden in jedem Ansatz 0,1 µg bzw. 0,2 µg GST-RhoA sowie GST-RhoC mit 4 nM [^{35}S]GTP[S] und 2 µM GTP[S] versetzt. Die Ansätze wurden bei 30 °C für 10 min inkubiert. Durch Zugabe von Stopp-Puffer wurde die Reaktion beendet und die Ansätze über Nitrozellulosefilter filtriert. Anschließend wurde die auf den Filtern verbliebene Radioaktiviät bestimmt. In Abbildung **A** sind auf der X-Achse die eingesetzten Proteinmengen in µg dargestellt, auf der Y-Achse sind die berechneten Gesamtmengen des gebundenen GTP[S] in pmol dargestellt. In Abbildung **B** sind auf der X-Achse die eingesetzten Proteinmengen in µg dargestellt. Auf der Y-Achse sind die errechneten Anteile aktiven Proteins in % dargestellt. Es sind die Mittelwerte sowie die Standardabweichung (SD) der Dreifachbestimmung eines Experiments dargestellt.

Die GTP[S]- Bindungsexperimente wurden mit 0,1 µg (106,4 nM) bzw. 0,2 µg (212,7 nM) GST-Rho-Fusionsproteinen und Zugabe eines Reaktionsgemisches, das 4 nM [^{35}S]GTP[S] und 2 µM GTP[S] enthielt, durchgeführt (siehe Kapitel 3.3.11). Die gebundene Menge an [^{35}S]GTP[S] wurde über die auf den Nitrozellulosefiltern verbliebene Radioaktivität bestimmt. Anschließend wurde über die gebundene Gesamtmenge an GTP[S] der Anteil des aktiven Proteins berechnet. In Abbildung 17 ist das Ergebnis eines von vier durchgeführten GTP[S]-Bindungsexperimenten für 0,1 µg und 0,2 µg GST-RhoA- und GST-RhoC-Fusionsproteinen dargestellt. Die Abbildung 17 A zeigt die errechneten Mengen gebundenen GTP[S], die bei 0,1 µg GST-RhoA 0,33 $\pm$ 0,04 pmol ($\pm$ SD, n=3) und bei 0,2 µg GST-RhoA 0,92 $\pm$ 0,05 pmol ($\pm$ SD, n=3) bzw. bei 0,1 µg GST-RhoC 0,32 $\pm$ 0,08 pmol ($\pm$ SD, n=3) und bei 0,2 µg GST-RhoC 0,52 $\pm$ 0,04 pmol ($\pm$ SD, n=3) betrugen. Die Anteile an aktivem Protein in % errechneten sich durch die Gegenüberstellung der gebundenen Menge an GTP[S] in pmol zu der eingesetzten Menge an GST-Rho-Fusionsprotein in pmol. Diese Ergebnisse sind in Abbildung 17 B dargestellt. Für GST-RhoA lag der Anteil aktiver Proteine für 0,1 µg bei 15,2 $\pm$ 1,8 % ($\pm$ SD, n=3) und für 0,2 µg bei 21,3 $\pm$ 1,2 % ($\pm$ SD, n=3) bzw. für 0,1 µg GST-RhoC bei 15 $\pm$ 3,6 % ($\pm$ SD, n=3) und für 0,2 µg 12,3 $\pm$ 0,9 % ($\pm$ SD, n=3). Vergleicht man die Werte bei einer eingesetzten Menge von 0,2 µg, so zeigt sich, dass in der jeweiligen Präparation etwa ein Fünftel aktives, d. h. zur Nukleotidbindung fähiges GST-RhoA und etwa ein Zehntel aktives GST-RhoC vorlag.

4.3.9 Einfluss von GDP und GTP auf die Interaktion von GST-RhoA und GST-RhoC mit p120ctn

Als nächstes sollte untersucht werden, ob die Aktivität der Rho-GTPasen RhoA bzw. RhoC, d. h. das gebundene Nukleotid in Form von GDP oder GTP, die Bindung von p120ctn mit GST-Rho beeinflusst. Hierfür wurden die Mutanten RhoA (V14) und RhoA (N19) sowie RhoC (V14) und RhoC (N19), die in der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Klaudia Giehl, Ulm, hergestellt worden waren, als GST-Rho-Fusionsproteine in *E. coli* BL21(DE3) exprimiert und durch Bindung an Glutathion-Sepharose und anschließender Elution mit reduziertem Glutathion gereinigt (siehe Kapitel 3.3.1.1). Die konstitutiv aktive Mutante V14 bindet überwiegend GTP während die dominant negative Mutante N19 überwiegend im GDP-gebundenen Zustand vorliegt. Für die *in vitro*-Bindungsexperimente wurden je Ansatz 3 mg vorgereinigtes PANC-1-Zelllysat mit je 30 µg GST-Rho-Fusionsproteinen jeweils im Doppelansatz versetzt. Ein Ansatz des Doppelansatzes wurde mit 100 µM GDP und der

zweite Ansatz mit 100 µM GTP versetzt. Des Weiteren wurden zu jedem Ansatz 30 µl Glutathion-Sepharose zugegeben und alle Ansätze für 2 h inkubiert. Nach der Inkubation wurden die Glutathion-Sepharose-*beads* durch Zentrifugation sedimentiert, die gebundenen Proteine in einem 10 %igen SDS-Polyacrylamidgel aufgetrennt und im Immunblotverfahren analysiert. Der Nachweis von präzipitiertem sowie im Zelllysat enthaltenen p120ctn erfolgte mit einem monoklonalen anti-p120ctn-Antikörper und ECL-Detektion. Der Nachweis der eingesetzten Mengen an GST-Rho-Fusionsproteinen erfolgte mit einem polyklonalen anti-GST-Antikörper und Detektion mit alkalischer Phosphatase. In Abbildung 18 sind die repräsentativen Ergebnisse eines von drei durchgeführten *in vitro*-Bindungsexperimenten gezeigt. In Abbildung 18 A zeigt der obere Immunblot, dass im Vergleich bei RhoA (V14) + GDP mit RhoA (V14) + GTP kein Unterschied in der Menge des gebundenen p120ctn zu beobachten war. Gleiche Ergebnisse wurden auch für den Vergleich von RhoA (N19) + GDP mit RhoA (N19) + GTP erhalten. RhoA (V14) bzw. (N19) binden deutlich weniger p120ctn als RhoC und das gebundene Nukleotid hat keinen Einfluss auf die Bindung. Für RhoC zeigt sich, dass im Vergleich beim Wildtyp und bei den RhoC-Mutanten (V14) bzw. (N19) + GDP bzw. + GTP kein Unterschied in der Interaktion mit p120ctn zu beobachten war. RhoC bzw. die RhoC-Mutanten (V14) bzw. (N19) binden deutlich mehr p120ctn als die Mutanten RhoA (V14) bzw. (N19) und das gebundene Nukleotid hat auch hier keinen erkennbaren Einfluss auf die Interaktion von p120ctn mit den GST-Rho-Fusionsproteinen. In Spur 11 ist in PANC-1-Zelllysat enthaltenes p120ctn gezeigt (*PANC-1-Lysat*). Im Vergleich mit präzipitiertem p120ctn in den übrigen Spuren des Immunblots zeigt sich, dass in diesem exemplarisch dargestellten Experiment und in den nicht dargestellten Experimenten die p120ctn-Isoform, die als die unterste der drei Proteinbanden detektiert wurde, mehr an GST-Rho bindet als die beiden anderen. Die Abbildung 18 B zeigt die quantitative Auswertung mittels Densitometrie des dargestellten Experiments. Es wurden die Quotienten aus den Werten für präzipitiertes p120ctn und für das im Experiment eingesetzte GST-Rho gebildet. Als Referenz diente die Bindung von p120ctn an GST-RhoC und wurde gleich 1 gesetzt. Es zeigt sich, dass die konstitutiv aktive Mutante GST-RhoA (V14) + GDP mit einem Bindungsfaktor von 0,6 bzw. die dominant negative Mutante GST-RhoA (N19) + GDP mit dem Faktor 0,56 deutlich weniger p120ctn binden als GST-RhoC. GST-RhoA (V14) + GTP bindet um den Faktor 0, 22 und GST-RhoA (N19) + GTP um den Faktor 0,39 weniger p120ctn als GST-RhoC. Mit einem Bindungsfaktor von 0,92 für GST-RhoC (V14) + GDP bzw. von 0,99 für GST-RhoC (N19) + GDP binden die beiden RhoC-Mutanten etwa gleich viel p120ctn wie der Wildtyp GST-RhoC. Die konstitutiv aktive Mutante GST-RhoC (V14) + GTP mit einem Bindungsfaktor

von 1,12 und die dominant negative Mutante GST-RhoC (N19) + GTP mit 0,98 binden ebenfalls etwa gleich viel p120ctn wie GST-RhoC. Zusammenfassend zeigen die Ergebnisse, dass das gebundene Nukleotid und damit die Aktivität von RhoA und RhoC keinen Einfluss auf das Bindungsverhalten zu p120ctn haben.

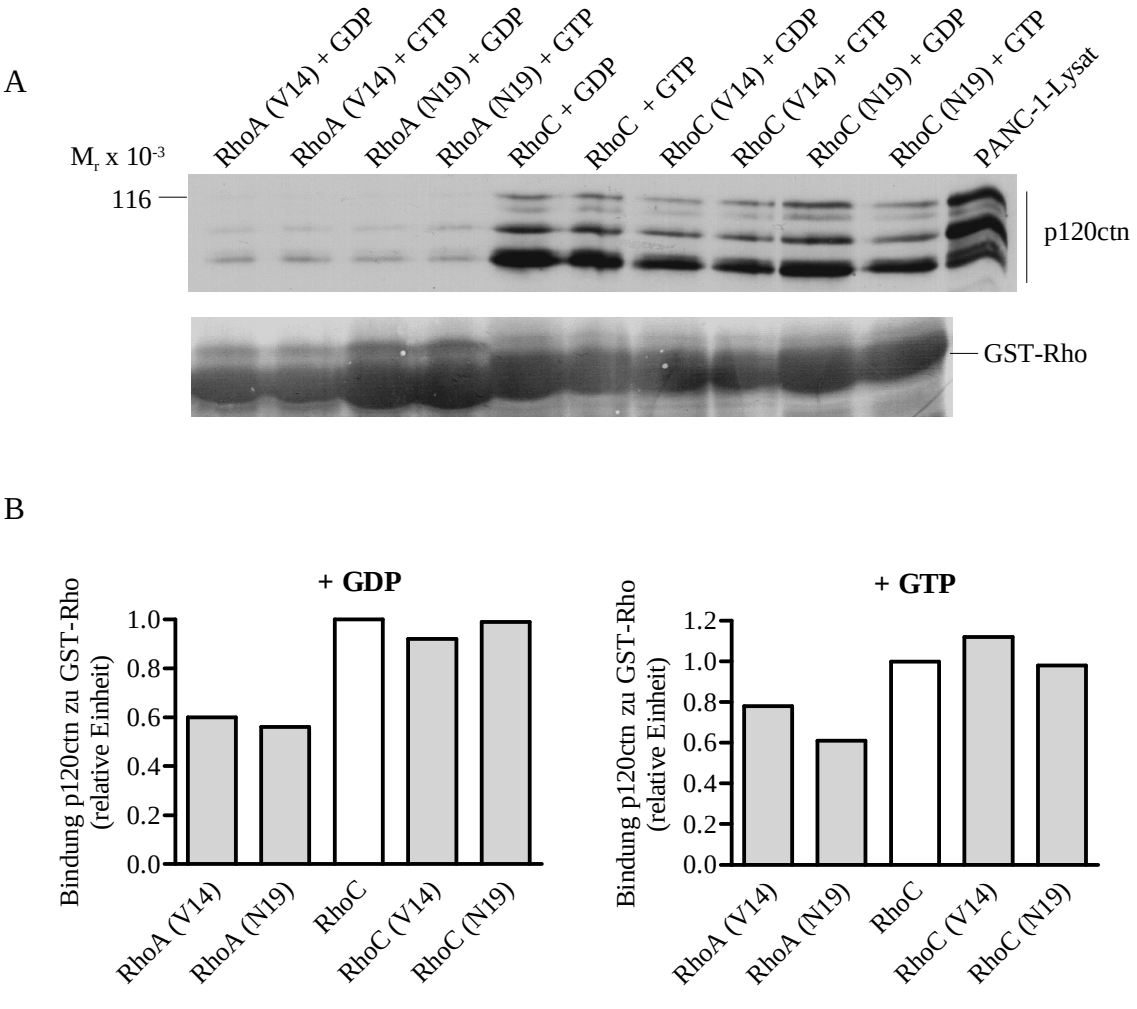


Abbildung 18: Nachweis der Interaktion von p120ctn mit GST-RhoA bzw. GST-RhoC in Abhängigkeit von GDP oder GTP. Zur Analyse der Interaktion von p120ctn mit bzw. GST-RhoC und den Mutanten GST-RhoC (V14) und (N19) sowie den GST-RhoA-Mutanten (V14) und (N19) in Abhängigkeit von Guaninnukleotiden wurden für jeden Ansatz 30 µg der gereinigten GST-Rho-Fusionsproteine, 3 mg vorgereinigtes PANC-1-Zelllysat sowie 30 µl Glutathion-Sepharose-*beads* gemischt und mit jeweils 100 µM GDP oder GTP versetzt und für 2 h inkubiert. Anschließend wurden die Glutathion-Sepharose-*beads* durch Zentrifugation sedimentiert und mit SDS-Probenpuffer versetzt. Die gebundenen Proteine wurden in einem 10 %igen SDS-Polyacrylamidgel aufgetrennt und im Immunblotverfahren analysiert. Der Nachweis von präzipitiertem und im Zelllysat enthaltenen p120ctn erfolgte mit einem monoklonalen anti-p120ctn-Antikörper und ECL-Detektion. Als Kontrolle für den Nachweis von p120ctn wurden 3 µg Protein von PANC-1-Zelllysat im selben Gel aufgetrennt (PANC-1-Lysat). **A**) Der obere Immunblot zeigt präzipitiertes sowie im Zelllysat enthaltenes p120ctn. Der untere Immunblot wurde mit einem polyklonalen anti-GST-Antikörper behandelt und die GST-Rho-Fusionsproteine mittels alkalischer Phosphatase detektiert. Dieser Immunblot zeigt die in den einzelnen Ansätzen eingesetzten Mengen der GST-Rho-Fusionsproteine. Links ist ein Proteinstandard markiert. **B**) Die Grafik zeigt die quantitative Auswertung mittels Densitometrie. Es wurden die

Quotienten aus den Werten für präzipitiertes p120ctn und für die im Experiment eingesetzten Mengen an GST-Rho (graue Balken) in Relation zu GST-RhoC (weißer Balken) gebildet.

4.3.10 Interaktion von ADP-ribosylierten GST-Rho-Fusionsproteinen mit p120ctn

Aufbauend auf den Ergebnissen der vorherigen Experimente sollte nun analysiert werden, ob die Nukleotid-Bindungsstelle der GTPasen an der Bindung zu p120ctn beteiligt ist. Hierzu wurde untersucht, ob die ADP-Ribosylierung in der *Switch I*-Region (Aminosäure 31-43) von RhoA und RhoC die Bindung von GST-RhoA bzw. GST-RhoC mit p120ctn beeinflusst. Bakterielle Toxine werden vielfach verwendet, um die Aktivität von Rho-GTPasen zu modifizieren und ihre Funktion zu untersuchen. Das Exoenzym C3lim-Transferase, eine ADP-Ribosyltransferase von *Clostridium limosum*, bindet spezifisch an die Rho-GTPasen RhoA, RhoB und RhoC und inaktiviert diese (Just *et al.*, 1992, Aktories *et al.*, 2004). Die C3lim-Transferase katalysiert die Hydrolyse von NAD zu Nicotinamid und ADP-Ribose und überträgt die ADP-Ribose-Untereinheit auf ein Asparagin an der Position 41 in der *Switch I*-Region der Rho-GTPasen. Dies führt dazu, dass die Rho-GTPase im GDP-gebundenen Zustand bleibt und dadurch funktionell inaktiviert wird. Durch die große, stark negativ geladene ADP-Ribose-Untereinheit an der Effektorregion wird die Interaktion mit Effektoren sterisch beeinflusst (Just *et al.*, 2001; Holbourn *et al*., 2006). Zur Analyse des Einflusses der ADP-Ribosylierung von RhoA und RhoC auf das Bindungsverhalten zu p120ctn wurden *in vitro*-Bindungsexperimente mit GST-Rho-Fusionsproteinen bzw. mit ADP-ribosylierten GST-Rho-Fusionsproteinen zur Präzipitation von p120ctn aus PANC-1-Zelllysat durchgeführt (siehe Kapitel 3.3.17). Die in diesen Experimenten verwendeten ADP-ribosylierten GST-RhoA- und GST-RhoC-Fusionsproteine wurden dankenswerter Weise in der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Holger Barth, Abteilung Toxikologie, Universität Ulm, nach der in Kapitel 3.3.4.1 beschriebenen Methode hergestellt. Für die ADP-Ribosylierung wurde die C3lim-Transferase als GST-C3lim-Fusionsproteine in *E. coli* BL21(DE3) exprimiert und durch Bindung an Glutathion-Sepharose und anschließender Elution mit reduziertem Glutathion gereinigt (siehe Kapitel 3.3.4). Anschließend wurden je 30 µg GST-RhoA- bzw. GST-RhoC-Fusionsproteine mit 30 ng GST-C3lim angereicherten Glutathion-Sepharose-*beads*, 10 µM NAD und 5 mM $MgCl_2$ für 3 h inkubiert. Zur Kontrolle wurden Ansätze mit je 30 µg GST-RhoA bzw. GST-RhoC-Fusionsproteinen sowie GST-Proteinen mitgeführt, die mit 10 µM NAD und 5 mM $MgCl_2$ ohne Zusatz von GST-C3lim für 3 h inkubiert wurden. Die

nachfolgenden *in vitro*-Bindungsexperimente zur Bestimmung der Interaktion mit p120ctn wurden, wie in den vorherigen Kapiteln beschrieben, durchgeführt. Es wurden je Ansatz 3 mg vorgereinigtes PANC-1-Zelllysat mit je 30 µg ADP-ribosylierten GST-RhoA- und GST-RhoC-Fusionsproteinen gebunden an Glutathion-Sepharose-*beads* bzw. mit 30 µg nicht-ribosylierten GST-RhoA- und GST-RhoC-Fusionsproteinen und dem Zusatz von 30 µl Glutathion-Sepharose-*beads* für 2 h inkubiert. Nach der Inkubation wurden die Glutathion-Sepharose-*beads* durch Zentrifugation sedimentiert, die gebundenen Proteine in einem 10 %igen SDS-Polyacrylamidgel aufgetrennt und im Immunblotverfahren analysiert. Der Nachweis von präzipitiertem sowie im Zelllysat enthaltenen p120ctn erfolgte mit einem monoklonalen anti-p120ctn-Antikörper und ECL-Detektion. In Abbildung 19 ist eines von zwei unabhängig durchgeführten *in vitro*-Bindungsexperimenten gezeigt. Der Immunblot in Abbildung 19 A zeigt zunächst einmal, dass wie in allen anderen Versuchen bisher gezeigt, mehr p120ctn mit GST-RhoC präzipitiert wurde als mit GST-RhoA. Darüber hinaus zeigt sich, dass die ADP-Ribosylierung kaum Einfluss auf das Bindungsverhalten von GST-RhoA hat. Jedoch wurde mit ribosyliertem GST-RhoC weniger p120ctn gebunden als mit nicht-ribosyliertem GST-RhoC. In Spur 7 ist in PANC-1-Zelllysat enthaltenes p120ctn gezeigt (*PANC-1-Lysat*). Im Vergleich mit präzipitiertem p120ctn in den übrigen Spuren des Immunblots zeigt sich, dass in diesem exemplarisch dargestellten Experiment von der p120ctn-Isoform, die als die unterste der drei Proteinbanden detektiert wurde, mehr mit GST-RhoA und GST-RhoC präzipitiert wurde als von den anderen beiden detektierten p120ctn-Isoformen. Die Kontrollansätze zur Überprüfung von unspezifischen Bindungen von p120ctn an den GST-Anteil der ADP-ribosylierten bzw. der nicht-ribosylierten GST-Rho-Fusionsproteine wurden in den Spuren 3 (*GST*) bzw. 6 (*ribosyl. GST*) aufgetrennt. Hierbei zeigt sich, dass p120ctn nicht nachgewiesen wurde. Im unteren Teil der Abbildung 19 A ist die Ponceau-Rot Färbung des Immunblots abgebildet. Es zeigt sich, dass mehr ADP-ribosylierte als nicht-ribosylierten GST-Rho-Fusionsproteinen eingesetzt worden waren. Des Weiteren zeigt sich das bei der ADP-Ribosylierung in den Ansätzen verbliebene GST-C3lim. Die Abbildung 19 B zeigt die quantitative Auswertung mittels Densitometrie der p120ctn- und GST-Rho-Proteinbanden des Immunblots des abgebildeten Experiments. Es wurden die Quotienten aus den Werten für präzipitiertes p120ctn und für das im Experiment eingesetzte GST-Rho gebildet. Als Referenz diente die Bindung von p120ctn an GST-RhoC und wurde gleich 1 gesetzt. Es zeigt sich, dass nicht-ribosyliertes GST-RhoA mit einem Bindungsfaktor von 0,44 weniger p120ctn bindet als GST-RhoC. Das ribosylierte GST-RhoA bindet mit einem p120ctn-Bindungsfaktor von 0,33 etwas weniger p120ctn als nicht-ribosyliertes GST-

RhoA. Mit einem Bindungsfaktor von 0,61 bindet ribosyliertes GST-RhoC weniger p120ctn als unbehandeltes GST-RhoC. Das Ergebnis dieser Experimente macht deutlich, dass p120ctn an die Rho-GTPasen RhoA und RhoC, trotz der Bindung der ADP-Ribose-Untereinheit in der *Switch I*-Region mit den Rho-GTPasen interagiert. Jedoch dürfte es durch die Bindung der stark negativ geladenen Ribose-Unterheit zu einer sterischen Behinderung der Interaktion von p120ctn mit den Rho-GTPasen, vor allem mit RhoC, kommen. Da die ADP-Ribose-Untereinheit die Bindung von RhoA und RhoC mit p120ctn nicht blockiert, lässt darauf schließen, dass p120ctn in einem anderen Bereich an die beiden Rho-GTPasen bindet.

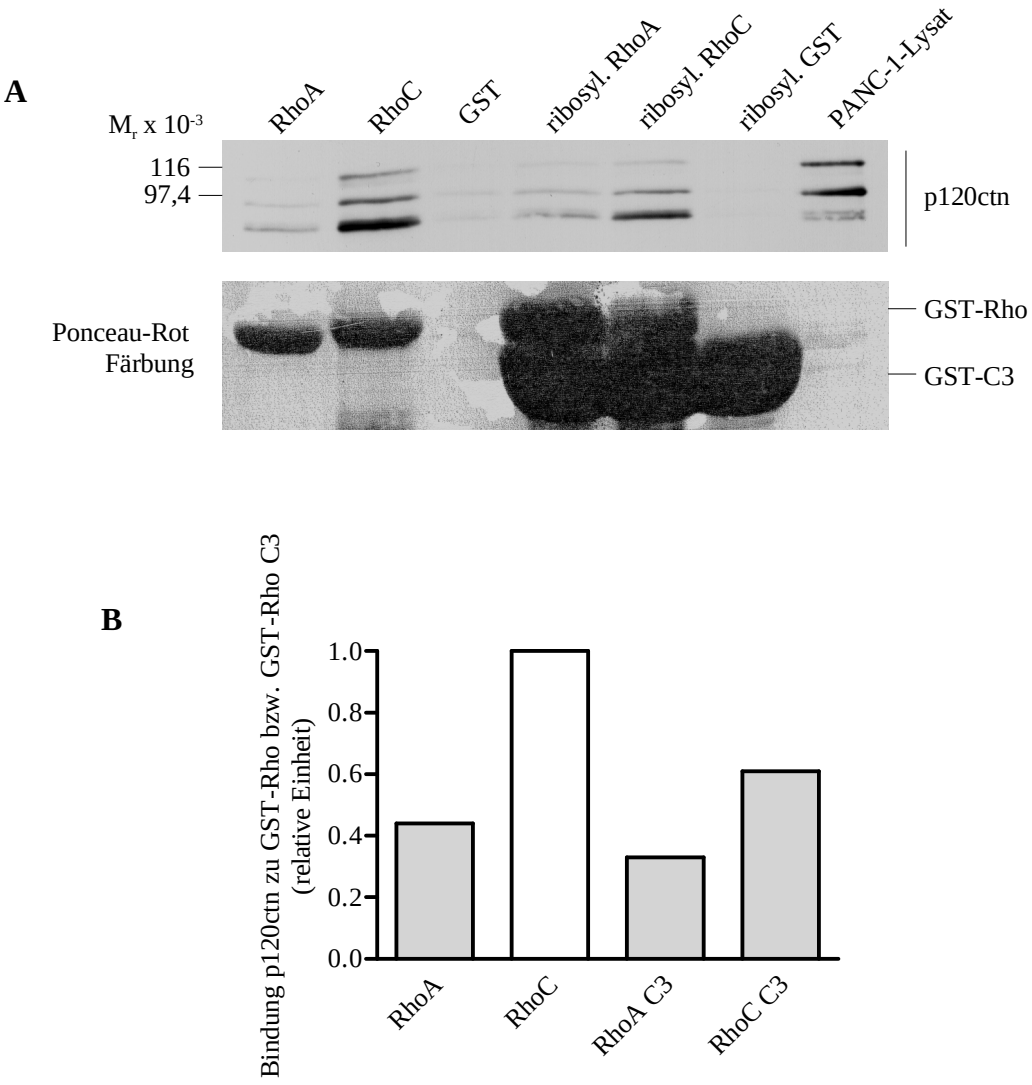


Abbildung 19: Nachweis der Interaktion von ADP-ribosylierten GST-Rho-Fusionsproteinen mit p120ctn. Um die Interaktion von ADP-ribosylierten GST-Rho-GTPasen mit p120ctn zu analysieren, wurden 30 µg der gereinigten und ADP-ribosylierten GST-Rho-Fusionsproteine mit 3 mg vorgereinigtem PANC-1-Zelllysat und 30 µl Glutathion-Sepharose für 2 h inkubiert. Des Weiteren wurden 30 µg nicht-ribosylierte GST-Rho-Fusionsproteine mit 3 mg vorgereinigtem PANC-1-Zelllysat und 30 µl Glutathion-Sepharose inkubiert. Zur Kontrolle von unspezifischen Bindungen von p120ctn an GST wurde je ein Ansatz mitgeführt, der GST-Proteine bzw. ADP-ribosylierte GST-Proteine und Zelllysat enthielt (GST bzw. ribosyl. GST). Nach der Inkubation wurden die Glutathion-

Sepharose-*beads* durch Zentrifugation sedimentiert, die gebundenen Proteine in einem 10 %igen SDS-Polyacrylamidgel aufgetrennt und im Immunblotverfahren analysiert. Der Nachweis von präzipitiertem und im Zelllysat enthaltenen p120ctn erfolgte mittels eines monoklonalen anti-p120ctn-Antikörpers und ECL-Detektion. Als Kontrolle für den Nachweis von p120ctn wurden in Spur 7 3 µg Protein von PANC-1-Zelllysat aufgetrennt (PANC-1-Lysat). **A**) Der Immunblot im oberen Teil der Abbildung zeigt präzipitiertes sowie im Zelllysat enthaltenes p120ctn. Im unteren Teil der Abbildung ist die mit Ponceau-Rot gefärbte Nitrozellulose-Membran dargestellt und zeigt die eingesetzten Mengen der GST-Rho-Fusionsproteine sowie bei der ADP-Ribosylierung in den Ansätzen verbliebenes GST-C3. Ein Proteinstandard ist links markiert. **B**) Die Grafik zeigt die quantitative Auswertung mittels Densitometrie. Es wurden die Quotienten aus den Werten für präzipitiertes p120ctn sowie für die im Experiment eingesetzten Mengen an GST-Rho und GST-Rho C3 (graue Balken) in Relation zu GST-RhoC (weißer Balken) gebildet.

4.4. Nachweis der Interaktion von EGFP-RhoC mit GST-mp120ctn

In den nächsten Experimenten wurde überprüft, ob in *in vitro*-Bindungsexperimenten mit gereinigten GST-mp120ctn 1N-Fusionsproteinen EGFP-Rho aus EGFP-RhoA- und EGFP-RhoC-exprimierenden PANC-1-Zelllysaten präzipitiert werden konnte. Murines p120ctn 1N, dass eine Sequenzidentität von 90 % zum humanen p120ctn aufweist, wurde dankenswerter Weise von der Arbeitsgruppe von PD Dr. Andre Menke, Abteilung Innere Medizin I, Universität Ulm als Expressionsvektor pGEX-4T1/mp120ctn 1N für die nachfolgend beschriebenen Experimente zur Verfügung gestellt. Die GST-mp120ctn 1N-Fusionsproteine wurden in *E. coli* BL21(DE3) exprimiert und affinitätschromatographisch durch Bindung an Glutathion-Sepharose und anschließender Elution mit reduziertem Glutathion gereinigt (siehe Kapitel 3.3.1.2). Zur Überprüfung der gereinigten Proteine wurden Aliquots mit 2, 5, 10 und 15 µl der gereinigten GST-mp120ctn 1N-Fusionsproteine in einem 12,5 %igen SDS-Polyacrylamidgel aufgetrennt und die Proteine durch Anfärben des Gels mit Coomassie-Blau sichtbar gemacht. Um die Mengen der gereinigten GST-mp120ctn 1N-Fusionsproteine zu bestimmen, wurden 2, 5, 10 und 20 µg BSA im selben Gel aufgetrennt und die Proteinkonzentration der gereinigten GST-mp120ctn 1N-Fusionsproteine durch Vergleich der Stärke der Proteinbanden ermittelt. Abbildung 20 zeigt exemplarisch ein mit Coomassie-Blau gefärbtes Gel einer von drei Proteinaufreinigungen. In den ersten vier Spuren sind gereinigte GST-mp120ctn 1N-Fusionsproteine mit einem Molekulargewicht von 120 kDa in ansteigender Menge gezeigt. Unterhalb der Proteinbande bei 120 kDa ist eine Vielzahl von Abbaubanden erkennbar, was auf eine Instabilität des Fusionsproteins schließen lässt. In den Spuren 5-8 ist BSA in aufsteigender Konzentration gezeigt. Für GST-mp120ctn 1N ergibt sich nach Vergleich der Stärke der Proteinbanden mit BSA-Standard eine Konzentration von

0,1 µg/µl. Die Ausbeute betrug 0,1 mg/l *E. coli*-Kultur. Bei zwei weiteren nicht abgebildeten Proteinaufreinigungen wurden ähnliche Ergebnisse erzielt.

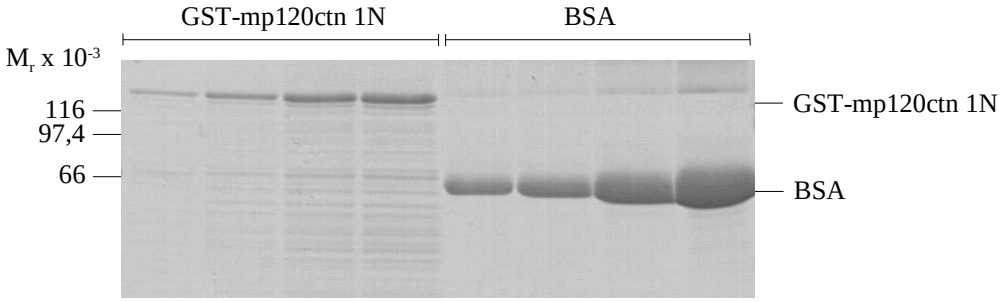


Abbildung 20: Bestimmung der Proteinkonzentration von GST-mp120ctn 1N durch Vergleich mit einer BSA-Konzentrationsreihe. GST-mp120ctn 1N wurde in *E. coli* BL21(DE3) exprimiert. Die Proteine wurden affinitätschromatographisch durch Bindung an Glutathion-Sepharose und anschließender Elution mit reduziertem Glutathion gereinigt. Es wurden 2, 5, 10 und 15 µl der gereinigten GST-mp120ctn 1N-Fusionsproteine in einem 12,5 %igem SDS-Polyacrylamidgel aufgetrennt und die Proteine anschließend mit Coomassie-Blau angefärbt. Zur Analyse der Menge der gereinigten GST-mp120ctn 1N-Fusionsproteine wurden im selben Gel 2, 5, 10 und 20 µg BSA aufgetrennt. Links ist ein Proteinstandard markiert.

Für die *in vitro*-Bindungsexperimente zur Präzipitation von EGFP-Rho mit GST-mp120ctn 1N (siehe Kapitel 3.3.18) wurden EGFP 21-, EGFP-RhoA 7- und EGFP-RhoC 3-exprimierende PANC-1-Zellen bis zur Konfluenz kultiviert und Zelllysate in XPLN-Puffer hergestellt. Zur Minimierung von unspezifischen Bindungen an Glutathion-Sepharose wurden je Ansatz 8-15 mg Protein aus Zelllysat von jeweils EGFP-, EGFP-RhoA 7- bzw. EGFP-RhoC 3-exprimierenden PANC-1-Zellen mit 30 µl Glutathion-Sepharose vermischt und für 1 h zur Vorreinigung des Zelllysates inkubiert. Des Weiteren wurden je Ansatz 30 µg GST-mp120ctn 1N-Fusionsproteine mit 25 µl Glutathion-Sepharose für 1 h inkubiert. Anschließend wurden die Glutathion-Sepharose-*beads* durch Zentrifugation sedimentiert. Die mit GST-mp120ctn 1N angereicherten Glutathion-Sepharose-*beads* wurden mit den entsprechenden PANC-1-Zelllysaten versetzt und für 2 h inkubiert. Zur Kontrolle unspezifischer Antikörperbindungen im Immunblot wurde ein Ansatz mitgeführt, der anstelle von Zelllysat XPLN-Puffer enthielt (*ohne Lysat*). Nach der Inkubation wurden die Glutathion-Sepharose-*beads* mit XPLN-Puffer gewaschen, sedimentiert, die gebundenen Proteine in einem 12,5 %igen SDS-Polyacrylamidgel aufgetrennt und im Immunblotverfahren analysiert. Im gleichen Gel wurden je 20 µg Protein aus Zelllysat von EGFP-, EGFP-RhoA 7- und EGFP-RhoC 3-exprimierenden PANC-1-Zellen zum Nachweis der EGFP-Proteine aufgetrennt (*Lysat*). Der Nachweis von präzipitiertem EGFP-Rho sowie im Zelllysat

enthaltenen EGFP bzw. EGFP-Rho erfolgte mit einem monoklonalen, Peroxidase-konjugierten anti-GFP-Antikörper und ECL-Detektion. Zur Kontrolle der eingesetzten Mengen an GST-mp120ctn 1N-Fusionsproteinen wurde der Immunblot mit einem monoklonalen anti-p120ctn-Antikörper und ECL-Entwicklung nachbehandelt.

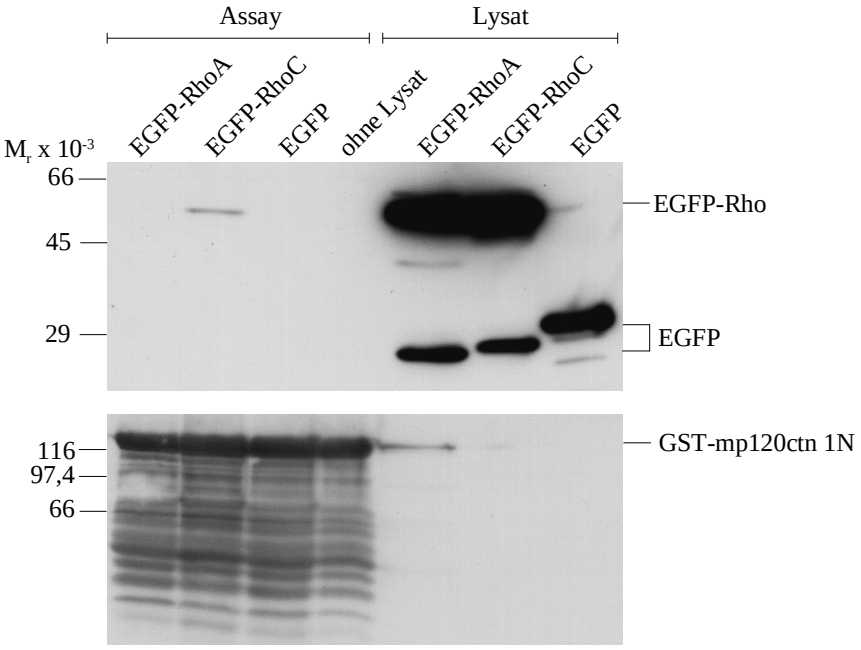


Abbildung 21: Präzipitation von EGFP-RhoC aus Zelllysat mittels GST-mp120ctn 1N. Um die Interaktion von EGFP-Rho-Fusionsproteinen mit p120ctn zu analysieren, wurden 30 µg GST-mp120ctn 1N-Fusionsprotein mit Glutathion-Sepharose für 1 h inkubiert und anschließend mit 8 mg vorgereinigtem Zelllysat von EGFP 21-, EGFP-RhoA 7- und EGFP-RhoC 3-exprimierenden PANC-1-Zellen für 2 h inkubiert. Zur Kontrolle von unspezifischen Antikörperbindungen im Immunblot wurde eine Probe mitgeführt, die anstelle von Zelllysat Puffer enthielt. Die Glutathion-Sepharose-*beads* wurden durch Zentrifugation sedimentiert und mit SDS-Probenpuffer vermischt. Die gebundenen Proteine wurden in einem 12,5 %igen SDS-Polyacrylamidgel aufgetrennt und im Immunblotverfahren analysiert. Der Nachweis von präzipitierten EGFP-Rho-Fusionsproteinen sowie im Zelllysat enthaltene EGFP-Rho-Fusionsproteine bzw. EGFP-Proteine erfolgte mit einem monoklonalen, Peroxidase-konjugierten anti-GFP-Antikörper und ECL-Detektion. Im Gel wurden 20 µg Protein aus Zelllysat von EGFP 21-, EGFP-RhoA 7- und EGFP-RhoC 3-exprimierenden PANC-1-Zellen aufgetrennt. Der obere Immunblot zeigt präzipitierte EGFP-RhoC-Fusionsproteine, sowie im Lysat enthaltene EGFP-Rho-Fusionsproteine bzw. EGFP-Proteine. Der untere Immunblot zeigt die eingesetzten Mengen von GST-mp120ctn 1N-Fusionsproteinen, das mit einem monoklonalen anti-p120ctn-Antikörper und ECL-Detektion nachgewiesen wurde. Ein Proteinstandard ist links markiert.

Der obere Immunblot in Abbildung 21 zeigt, dass mit GST-mp120ctn 1N spezifisch EGFP-RhoC aus EGFP-RhoC-exprimierenden PANC-1-Zellen präzipitiert werden konnte. Die Präzipitation von EGFP-RhoA mit GST-mp120ctn 1N konnte in keinem der durchgeführten Experimente nachgewiesen werden. In den Spuren 5-7 (*Lysat*) sind im Zelllysat von EGFP-RhoA-, EGFP-RhoC und EGFP-exprimierenden PANC-1-Zellen enthaltene EGFP-Rho-Fusionsproteine bzw. EGFP-Proteine gezeigt. Die Höhe der detektierten Bande in Spur 2 bei

50 kDa entspricht dabei der Höhe der Bande von EGFP-RhoC im Lysat von EGFP-RhoC exprimierenden PANC-1-Zellen (Spur 6). Die Proteinbanden bei 29 kDa in den Spuren 5 und 6 zeigen EGFP-Proteine als Abbaubanden von EGFP-RhoA- und EGFP-RhoC-Fusionsproteinen. Der untere Immunblot der Abbildung 21 zeigt die im Experiment eingesetzten Mengen an GST-mp120ctn 1N-Fusionsproteinen mit einem Molekulargewicht von 120 kDa. Die Proteinbanden unterhalb von 120 kDa sind Abbauprodukte der GST-mp120ctn 1N-Fusionsproteine. Die Bande in Spur 5 ist GST-mp120ctn 1N aus Spur 4. Diese und weitere identisch durchgeführte Experimente (n=3) belegen, dass mit gereinigtem, rekombinanten GST-mp120ctn 1N EGFP-RhoC aus EGFP-RhoC-exprimierenden PANC-1-Zellen präzipitiert werden konnte. EGFP-RhoA wurde aus EGFP-RhoA-exprimierenden PANC-1-Zellen nicht oder in nicht nachweisbaren Mengen präzipitiert, obwohl es in gleichen Mengen eingesetzt wurde. Diese Daten zeigen, dass die Interaktion von p120ctn mit RhoC eine deutlich höhere Affinität aufweist als die Interaktion mit RhoA.

4.5. Nachweis von p120ctn im Komplex mit EGFP-Rho-Fusionsproteinen durch Co-Immunpräzipitation

Als nächstes sollte nun untersucht werden, ob p120ctn im Komplex mit EGFP-Rho in Zellen mittels Co-Immunpräzipitation nachgewiesen werden kann. Es wurden Co-Immunpräzipitationsexperimente mittels µMacs™ anti-GFP *MicroBeads* durchgeführt, um mögliche EGFP-Rho/p120ctn-Komplexe aus Zelllysat von PANC-1-Zellen sowie aus Zelllysat von EGFP 21-, EGFP-RhoA 7- und EGFP-RhoC 3-exprimierenden PANC-1-Zellen zu präzipitieren. Für die Co-Immunpräzipitationen von p120ctn (siehe Kapitel 3.3.15.3) wurden je Ansatz 9 mg vorgereinigtes Zelllysat mit 50 µl µMacs™ anti-GFP *MicroBeads* versetzt und für 1 h inkubiert. Die entstandenen Proteinkomplexe wurden mittels des µMacs™ anti-GFP *Epitope Tagged Protein Isolation Kit* isoliert. Es wurden 40 µl der Eluate in einem 12,5 %igen SDS-Polyacrylamidgel und 10 µl der Eluate in einem 10 %igen SDS-Polyacrylamidgel aufgetrennt und im Immunblotverfahren analysiert. Das co-immunpräzipitierte sowie im Zelllysat enthaltene p120ctn wurde mit einem monoklonalen anti-p120ctn-Antikörper und ECL-Detektion nachgewiesen. Der Nachweis von immunpräzipitierten EGFP-Rho-Fusionsproteinen sowie im Zelllysat enthaltenen EGFP-Proteinen bzw. EGFP-Rho-Fusionsproteinen erfolgte mit einem polykonalen anti-GFP-Antikörper und anschließender Detektion mit alkalischer Phosphatase. Die Ergebnisse eines

repräsentativen von zwei identisch durchgeführten Experimenten sind in Abbildung 22 dargestellt. Der obere Immunblot zeigt in Spur 3 das mit EGFP-RhoC-Proteinen co-immunpräzipitierte p120ctn aus EGFP-RhoC-exprimierenden PANC-1-Zellen. Mit EGFP-RhoA konnten nur sehr geringe Mengen p120ctn aus EGFP-RhoA-exprimierenden PANC-1-Zellen präzipitiert werden. In den Spuren 6-9 ist im Zelllysat von EGFP-, EGFP-RhoA- und EGFP-RhoC-exprimierenden PANC-1-Zellen und von PANC-1-Zellen enthaltenes p120ctn gezeigt (*Lysat*). Der untere Immunblot der Abbildung 22 zeigt immunpräzipitierte sowie im Zelllysat enthaltene EGFP-Proteine und EGFP-RhoA- und EGFP-RhoC-Fusionsproteine. Die Höhe der detektierten Banden der Spuren 2 und 3 bei 50 kDa entspricht dabei der Höhe der Banden der Spuren 7 und 8 von EGFP-RhoA- bzw. EGFP-RhoC-Fusionsproteinen in EGFP-RhoA- bzw. EGFP-RhoC-exprimierenden PANC-1-Zellen. Der Kontrollansatz für unspezifische Antikörperbindungen in Spur 5 der beiden Immunblots zeigt keine Interaktion (*anti-GFP-beads*). Das Ergebnis dieser Experimente zeigt, dass der zelluläre Proteinkomplex EGFP-RhoC/p120ctn in PANC-1-Zellen nachgewiesen wurde. Es wurde gezeigt, dass auch in Zellen eine Bindung von RhoC und p120ctn vorliegt.

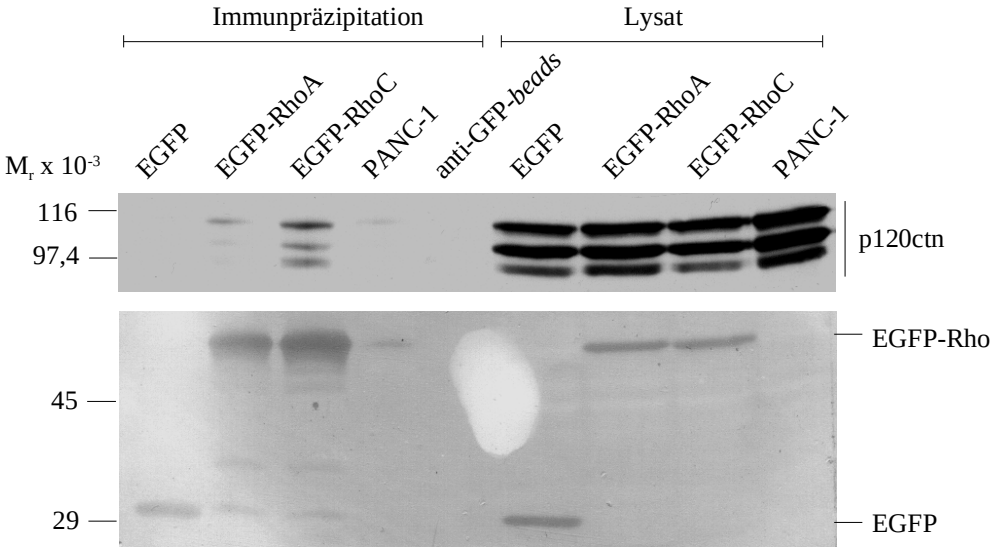


Abbildung 22: Nachweis von p120ctn im Komplex mit EGFP-Rho durch Co-Immunpräzipitation. Zum Nachweis der Interaktion von EGFP-Rho und p120ctn wurden mittels µMacs™ anti-GFP *MicroBeads* die Protein-Protein-Komplexe EGFP-Rho/p120ctn aus Zelllysat von PANC-1-Zellen sowie aus Zelllysat von EGFP 21-, EGFP-RhoA 7- und EGFP-RhoC 3-exprimierenden PANC-1-Zellen präzipitiert. Für die Ansätze wurden je 50 µl µMacsTM anti-GFP *MicroBeads* mit je 9 mg vorgereinigtem Zelllysat von PANC-1-Zellen sowie von EGFP 21-, EGFP-RhoA 7- und EGFP-RhoC 3-exprimierenden PANC-1-Zellen für 1 h inkubiert. Als Kontrolle für unspezifische Antikörperbindungen im Immunblot wurde ein Ansatz, der nur µMacsTM anti-GFP *MicroBeads* und Puffer enthielt, mitgeführt. Die entstandenen Proteinkomplexe wurden mit Hilfe des µMacsTM *anti-GFP Epitope Tagged Protein Isolation Kit* isoliert. Die gebundenen Proteine wurden mit 50 µl Elutionspuffer eluiert und die Eluate aufgefangen. Zum Nachweis von co-

immunpräzipitiertem p120ctn wurden 40 µl der Eluate in einem 10 %igen SDS-Polyacrylamidgel aufgetrennt. Zum Nachweis der immunpräzipitierten EGFP-Rho-Fusionsproteine wurde ein Aliquot von 10 µl von jedem Ansatz in einem 12,5 %igen SDS-Polyacrylamidgel aufgetrennt. Zusätzlich wurden in jedem der beiden Gele je 10 µg Protein aus Zelllysat von PANC-1-Zellen sowie aus Zelllysat von EGFP 21-, EGFP-RhoA 7- und EGFP-RhoC 3-exprimierenden PANC-1-Zellen aufgetrennt. Die aufgetrennten Proteine wurden im Immunblotverfahren analysiert. Der Nachweis von co-immunpräzipitiertem sowie im Zelllysat enthaltenen p120ctn erfolgte mit einem monoklonalen anti-p120ctn-Antikörper und ECL-Detektion. Der Nachweis von immunpräzipitierten EGFP-Rho-Fusionsproteinen sowie im Zelllysat enthaltenen EGFP-Proteinen bzw. EGFP-Rho-Fusionsproteinen erfolgte mit einem polykonalen anti-GFP-Antikörper und anschließender Entwicklung mit alkalischer Phosphatase. Der obere Immunblot zeigt co-immunpräzipitiertes p120ctn sowie im Zelllysat enhaltenes p120ctn. Der untere Blot zeigt immunpräzipitierte EGFP-Rho-Fusionsproteine sowie im Zelllysat enthaltene EGFP-Rho-Fusionsproteine bzw. EGFP-Proteine. Ein Proteinstandard ist links markiert.

4.6 Nachweis der Rho-GTPasen RhoA und RhoC sowie p120ctn in Caveolin-hältigen Zellkompartimenten (*lipid rafts*)

Die in den vorangegangenen Kapiteln beschriebenen Ergebnisse zeigen eine deutlich stärkere Interaktion von RhoC mit p120ctn als von RhoA. Als nächstes wurde untersucht, ob diese Interaktion *in vivo* durch eine gemeinsame Lokalisation in *lipid rafts* gefördert wird. Als *lipid rafts* werden Cholesterin- und Sphingolipid-reiche Mikrodomänen an der Plasmamembran bezeichnet, in denen zahlreiche Signalprozesse der Zelle gesteuert werden. Caveolin-1 ist ein integrales Membranprotein und Hauptbestandteil der Struktur der *lipid rafts*, die auch Caveolen genannt werden. Die Rho-GTPasen RhoA und RhoC haben eine Caveolin-1-Bindungsdomäne (Gingras *et al.*, 1998; Lin *et al.*, 2005). Zur Analyse der Lokalisation von EGFP-RhoA- und EGFP-RhoC-Fusionsproteinen sowie p120ctn in *lipid rafts* wurden von EGFP-, EGFP-RhoA- und EGFP-RhoC-exprimierende PANC-1-Zellen Zelllysate hergestellt und anschließend durch Ultrazentrifugation bei 100 000 x g die membranhaltige Fraktion der Zellen gewonnen. Die Präparation von caveolinhältigen Zellkompartimenten (siehe Kapitel 3.3.13) erfolgte mittels Saccharose-Gradienten und durch anschließende Fraktionierung für 16-20 h durch Zentrifugation. Anschließend wurden 1 ml-Fraktionen von oben, dem Saccharose-Gradient folgend, abgenommen. Die Proteine der einzelnen Fraktionen wurden mit Trichloressigsäure präzipitiert, in einem 10 %igen SDS-Polyacrylamidgel aufgetrennt und im Immunblotverfahren analysiert. Der Nachweis von EGFP-Proteinen sowie von EGFP-RhoA- und EGFP-RhoC-Fusionsproteinen erfolgte mit einem monoklonalen anti-GFP-Antikörper und ECL-Detektion. Der Nachweis von p120ctn erfolgte mit einem monoklonalen

anti-p120ctn-Antikörper und der von Caveolin-1 mit einem anti-Caveolin-1-Antikörper und ECL-Detektion. In Abbildung 23 sind exemplarisch die Immunblots einer von drei durchgeführten *lipid rafts*-Präparationen gezeigt. Die Immunblots im Teil A zeigen, dass sowohl EGFP-RhoA als auch p120ctn und Caveolin-1 hauptsächlich in den Fraktionen 3, 4 und 5 von EGFP-RhoA-exprimierenden PANC-1-Zellen nachgewiesen werden konnte. Des Weiteren wurde in geringen Maßen EGFP-RhoA in den Fraktionen 9, 11 und 12 und p120ctn in der Fraktion 12 detektiert. Caveolin-1 konnte ebenfalls in den Fraktionen 9-12 nachgewiesen werden. Die Abbildung B zeigt, dass EGFP-RhoC, p120ctn und Caveolin-1 in den Fraktionen 3-5 und in Fraktion 7 von EGFP-RhoC-exprimierenden PANC-1-Zellen nachgewiesen wurde. Im Vergleich mit der Abbildung A konnte in keiner der anderen Fraktionen EGFP-RhoC, p120ctn oder Caveolin-1 detektiert werden. In Abbildung C sind die Immunblots gezeigt, die EGFP-Proteine in den Fraktionen 2-12, p120ctn in den Fraktionen 3-12 und Caveolin-1 in den Fraktionen 3-5, 7 und 8 von EGFP-exprimierenden PANC-1-Zellen zeigen. In allen durchgeführten *lipid rafts*-Präparationen von EGFP-exprimierenden PANC-1-Zellen konnte p120ctn in fast allen Fraktionen nachgewiesen werden. Vermutlich ist p120ctn in diesen Zellen nicht nur in Caveolin-1-hältigen Zellkompartimenten lokalisiert. Als Ergebnis dieser exemplarisch gezeigten *lipid rafts*-Präparation und der nicht dargestellten Präparationen zeigt sich, dass EGFP-RhoA und EGFP-RhoC gemeinsam mit Caveolin-1 in *lipid rafts*-hältigen Fraktionen nachgewiesen wurde. Zusätzlich wurde p120ctn jeweils in denselben Fraktionen, jedoch nicht ausschließlich, nachgewiesen. EGFP-RhoC wurde nur in einer anderen, zusätzlichen Fraktion nachgewiesen als EGFP-RhoA. Zusammenfassend zeigen die Ergebnisse, dass sowohl EGFP-RhoA als auch EGFP-RhoC in *lipid-rafts*-hältigen Fraktionen gemeinsam mit Caveolin-1 und p120ctn präpariert wurden. So liegt die Annahme nahe, dass für die stärkere Interaktion von RhoC und p120ctn im Vergleich zu RhoA, die in den vorangegangen Kapiteln gezeigt wurde, die Lokalisation in Caveolin-hältigen Zellkompartimenten nicht ausschlaggebend ist. Andererseits könnten die gezeigten Ergebnisse auch dahingehend interpretiert werden, dass p120ctn durch Expression von EGFP-RhoA bzw. EGFP-RhoC verstärkt in Caveolin-1-hältigen Fraktionen konzentriert vorliegt.

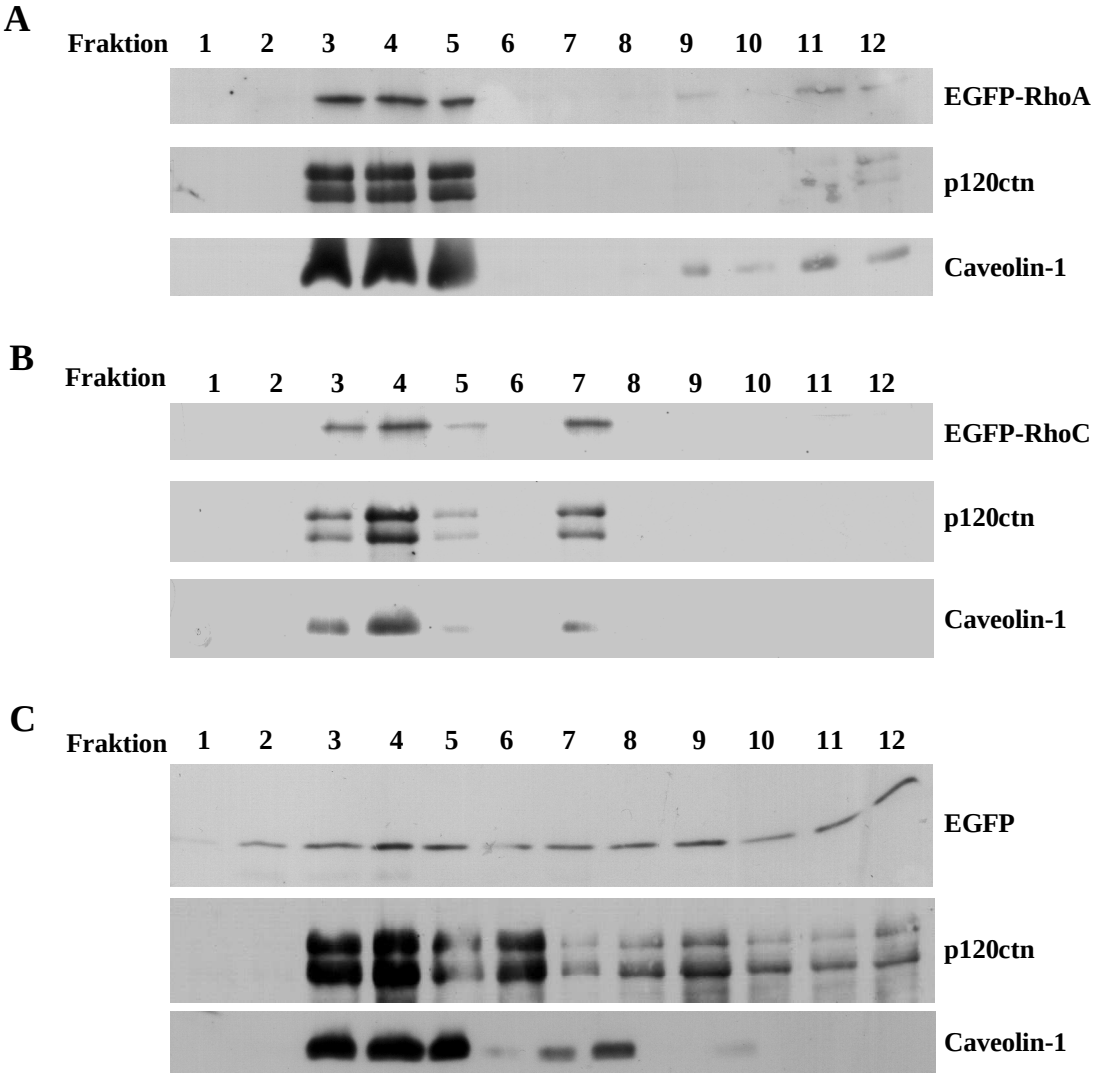


Abbildung 23: Nachweis von EGFP-RhoA, EGFP-RhoC und p120ctn in Caveolin-haltigen Zellkompartimenten (*lipid-rafts*). Um das Vorkommen von EGFP-RhoA, EGFP-RhoC und p120ctn in *lipid-rafts* zu analysieren, wurde aus Zelllysaten von EGFP-, EGFP-RhoA und EGFP-RhoC-exprimierenden PANC-1-Zellen die membranhaltige Fraktion durch Ultrazentrifugation bei 100 000 x g extrahiert. Die membranhaltigen Fraktionen wurden jeweils mit einem Saccharose-Gradienten überschichtet. Die Fraktionierung erfolgte für 16-20 h durch Zentrifugation. Anschließend wurden 1 ml-Fraktionen von oben (Fraktion 1) nach unten (Fraktion 12) dem Gradient folgend abgenommen. Die Proteine wurden mit Trichloressigsäure präzipitiert, in einem 10 %igen SDS-Polyacrylamidgel aufgetrennt und im Immunblotverfahren analysiert. Der Nachweis von EGFP, EGFP-RhoA und EGFP-RhoC erfolgte mit einem monoklonalen anti-GFP-Antikörper, der Nachweis von p120ctn mit einem monoklonalen anti-p120ctn-Antikörper und der Nachweis von Caveolin-1 erfolgte mit einem monoklonalen anti-Caveolin-1-Antikörper und ECL-Detektion. **A**) Nachweis in EGFP-RhoA-exprimierenden PANC-1-Zellen: Die oberen beiden Immunblots zeigen EGFP-RhoA und p120ctn vorwiegend in den Fraktionen 3, 4 und 5. Der untere Immunblot zeigt Caveolin-1 ebenfalls vorwiegend in den Fraktionen 3, 4 und 5. **B**) Nachweis in EGFP-RhoC-exprimierenden PANC-1-Zellen: Die oberen beiden Immunblots zeigen EGFP-RhoC und p120ctn in den Fraktionen 3, 4, 5 und 7. Der untere Immunblot zeigt Caveolin-1 in denselben Fraktionen. **C**) Nachweis in EGFP-exprimierenden PANC-1-Zellen: Der obere Immunblot zeigt EGFP in den Fraktionen 2-12. Der mittlere Immunblot zeigt p120ctn in den Fraktionen 3-12. Der untere Immunblot zeigt Caveolin-1 in den Fraktionen 3-5, 7 und 8.

4.7 Bestimmung der Rho-Aktivität

Die Menge an GTP-gebundenem und somit aktivem Rho wurde mittels Rho-TRBD-Bindungsexperimenten bestimmt. Der spezifischen Präzipitation von Rho-GTP liegt zugrunde, dass GTP-gebundenes, aktives Rho an die Rho-Bindundsdomäne TRBD des Rho-Effektors Rhotekin bindet (Stähle *et al.*, 2003). Die Rho-Bindundsdomäne TRBD wurde als Glutathion-S-Transferase (GST)-Fusionsprotein (GST-TRBD) in *E.coli* BL21(DE3) exprimiert und durch Bindung an Glutathion-Sepharose gereinigt (siehe Kapitel 3.3.2).

4.7.1 Expression und Aufreinigung von GST-TRBD

Für die Isolierung von Rho-GTP aus Zelllysaten durch die selektive Bindung an die Rho-Bindungsdomäne TRBD wurde GST-TRBD mit Hilfe des Expressionsplasmids pGEX-2TK/TRBD in *E.coli* BL21(DE3) exprimiert. Die Proteinexpression erfolgte für 6 h bei 24 °C nach Induktion durch Zugabe von 0,8 mM IPTG. Anschließend wurde die Bakterienkultur bei 5000 Upm und 4 °C für 10 min geerntet. Die Bakterienzellen wurden durch Ultraschallbehandlung lysiert und durch Zentrifugation die löslichen Proteine von den unlöslichen Zellteilen getrennt. Die Reinigung der GST-TRBD-Proteine erfolgte affinitätschromatographisch aus der löslichen Lysatfraktion durch die Bindung an Glutathion-Sepharose. Zur Kontrolle der Expression und zur Konzentrationsbestimmung des gereinigten GST-TRBD wurden 2, 5, 10 und 20 µl mit GST-TRBD angereicherte Glutathion-Sepharose-*beads* in einem 12,5 %igen SDS-Polyacrylamidgel aufgetrennt. Die semiquantitative Bestimmung der GST-TRBD-Konzentration erfolgte durch Auftrennung von 5, 10, 20 und 30 µg BSA im selben Gel und durch Vergleich der Stärke der Proteinbanden. Die Proteine im Gel wurden mit Coomassie-Blau angefärbt. In Abbildung 24 ist an Glutathion-Sepharose gebundenes GST-TRBD mit einem Molekulargewicht von 36 kDa von einer von zwei Aufreinigungen und BSA für die semiquantitative Bestimmung der GST-TRBD-Konzentration gezeigt. Die Bandenstärken wurden verglichen und für die Rho-GTP-Bindungsassay wurden 40 µg GST-TRBD eingesetzt.

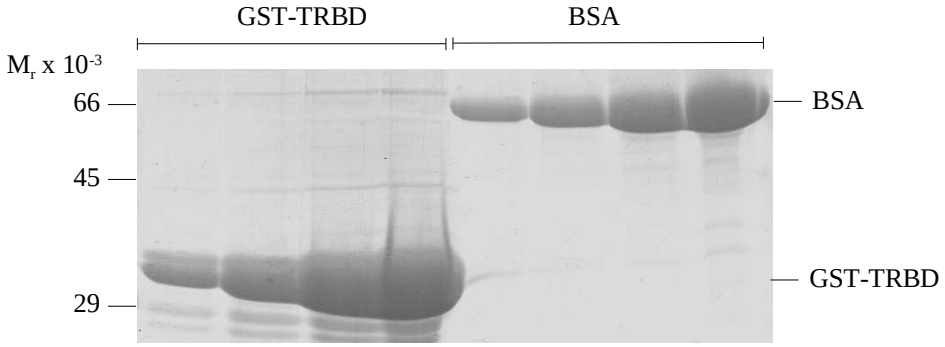


Abbildung 24: Quantifizierung der GST-TRBD-Expression. GST-TRBD wurde in *E. coli* BL21(DE3) exprimiert und die Proteine affinitätschromatographisch durch Bindung an Glutathion-Sepharose aus der löslichen Lysatfraktion gereinigt. Zur Analyse des gereinigten GST-TRBD wurden 2, 5, 10 und 20 µl der mit GST-TRBD angereicherten Glutathion-Sepharose-*beads* mit SDS-Probenpuffer versetzt, die Proteine in einem 12,5 %igen SDS-Polyacrylamidgel aufgetrennt und und mit Coomassie-Blau angefärbt. Zur Quantifizierung der Expression wurden im selben Gel 5, 10, 20 und 30 µg BSA aufgetrennt. Ein Proteinstandard ist links markiert.

4.7.2 Einfluss von p120ctn 1A auf die Aktivität der Rho- GTPasen RhoA und RhoC

Um zu überprüfen, ob die Interaktion von p120ctn mit Rho-GTPasen einen Einfluss auf die Aktivität von EGFP-RhoA oder EGFP-RhoC hat, wurden nach transienter Kotransfektion von pEGFP/RhoA oder pEGFP/RhoC und pEGFP/p120ctn 1A bzw. von pEGFP-C2 in PANC-1-Zellen Rho-GTP-Bindungsexperimente durchgeführt (siehe Kapitel 3.3.20). Es wurden 3 x 10^6 PANC-1-Zellen ausgesät und über Nacht bei 37°C kultiviert. Die Zellen wurden jeweils mit 5 µg pEGFP/RhoA bzw. mit 5 µg pEGFP/RhoA und 5 µg pEGFP/p120ctn 1A sowie mit 5 µg pEGFP/RhoC bzw. mit 5 µg pEGFP/RhoC und 5 µg pEGFP/p120ctn 1A bzw. mit pEGFP-C2 transient transfiziert (siehe Kapitel 3.4.6). Nach 24 h Expressionszeit in serumhaltigem Wachstumsmedium wurden die Zellen für 4 h in DMEM ohne Zusätze inkubiert. Anschließend wurden Zelllysate in Rho-RIPA-Puffer hergestellt. Zur Überprüfung der Expression von EGFP-RhoA, EGFP-RhoC und EGFP-p120ctn 1A und zur Abschätzung der Proteinmengen, die in weiterer Folge in den Experimenten verwendet wurden, wurden je 50 µg Protein der Zelllysate in einem 10 %igen SDS-Polyacrylamidgel aufgetrennt und im Immunblotverfahren analysiert. Die Expression von EGFP-RhoA, EGFP-RhoC und EGFP-p120ctn 1A konnte in den Zelllysaten der transfizierten PANC-1-Zellen nachgewiesen werden (Daten nicht gezeigt). Für die einzelnen Ansätze wurden je nach Expressionsstärke von EGFP-RhoA bzw. EGFP-RhoC 0,5-1,5 mg Protein der Zelllysate mit 40 µg GST-TRBD, gebunden an Glutathion-Sepharose-*beads*, versetzt und für 30 min inkubiert. Zuvor wurden

zur Kontrolle des gleichmäßigen, vergleichbaren Einsatzes der Proteinmengen in den Experimenten jeweils Aliquots von 1/20-1/50 der Proteinmenge im Ansatz in einem 10 %igen SDS-Polyacrylamid-Gel aufgetrennt und im Immunblotverfahren analysiert. Nach der Inkubation wurden die gewaschenen Glutathion-Sepharose-*beads* sedimentiert, die gebundenen Proteine in einem 12,5 %igen SDS-Polyacrylamidgel aufgetrennt und im Immunblotverfahren analysiert. Der Nachweis von präzipitiertem EGFP-RhoA-GTP und EGFP-RhoC-GTP bzw. in Zelllysat enthaltenem EGFP, EGFP-RhoA, EGFP-RhoC und EGFP-p120ctn 1A erfolgte mit einem monoklonalen, Peroxidase-konjugierten anti-GFP-Antikörper und ECL-Detektion. In Abbildung 25 A ist das Ergebnis eines von drei durchgeführten Rho-GTP-Bindungsexperimenten dargestellt. Im oberen Immunblot ist das mit GST-TRBD präzipitierte EGFP-RhoA-GTP und EGFP-RhoC-GTP gezeigt. Es zeigt sich, dass weniger EGFP-RhoA-GTP bzw. EGFP-RhoC-GTP aus Zelllysat von PANC-1-Zellen präzipitiert werden konnte, die mit pEGFP/p120ctn 1A transient kotransfiziert worden waren als aus Zelllysat von PANC-1-Zellen, die nur mit pEGFP/Rho transfiziert worden waren. Die Rho-Aktivität wurde durch die Kotransfektion der PANC-1-Zellen mit pEGFP/p120ctn 1A sowohl von EGFP-RhoA als auch von EGFP-RhoC vermindert. Bei der Kontrolle für unspezifische Bindungen (*EGFP)* zeigt sich, dass EGFP-Proteine nicht mit GST-TRBD interagierten. Der mittlere Immunblot zeigt im Zelllysat enthaltenes EGFP-Rho bzw. EGFP als Kontrolle für den gleichmäßigen Einsatz der Proteinmengen im Experiment. Es zeigt sich, dass mehr EGFP-RhoC im Rho-GTP-Bindungsexperiment eingesetzt worden war als EGFP-RhoA. Der unterste Immunblot zeigt im Zelllysat enthaltenes EGFP-p120ctn 1A. In Abbildung 25 B sind die Ergebnisse der densitometrischen Auswertung der Immunblots von drei unabhängig voneinander durchgeführten Rho-GTP-Bindungsexperimenten grafisch dargestellt. Die Mittelwerte für EGFP-RhoA-GTP bzw. EGFP-RhoC-GTP wurden gleich 1 gesetzt. Die Mittelwerte $\pm$ Standardabweichung (SD) für präzipitiertes EGFP-RhoA-GTP bzw. EGFP-RhoC-GTP nach Kotransfektion mit p120ctn 1A wurden unter Berücksichtigung der eingesetzten Proteinmenge von EGFP-RhoA bzw. EGFP-RhoC dazu ins Verhältnis gesetzt. Es zeigt sich eine Verminderung der Aktivität von EGFP-RhoA um 35 % $\pm$ 0,17 % ($\pm$ SD, n=3) bzw. von EGFP-RhoC um 22 % $\pm$ 0,155 % ($\pm$ SD, n=3) in PANC-1-Zellen bei gleichzeitiger Proteinexpression von p120ctn 1A. Die statistische Signifikanz (p-Wert < 0,05) der Ergebnisse wurde mit dem t-test analysiert und bestätigt, wobei der p-Wert für EGFP-RhoA-GTP + p120ctn 1A 0,0224 und für EGFP-RhoC-GTP + p120ctn 1A 0,0131 betrug. Zusammenfassend konnte mit diesen Rho-GTP-Bindungsexperimenten gezeigt werden, dass

die Aktivität von EGFP-RhoA als auch von EGFP-RhoC unter dem Einfluss von p120ctn 1A vermindert wurde.

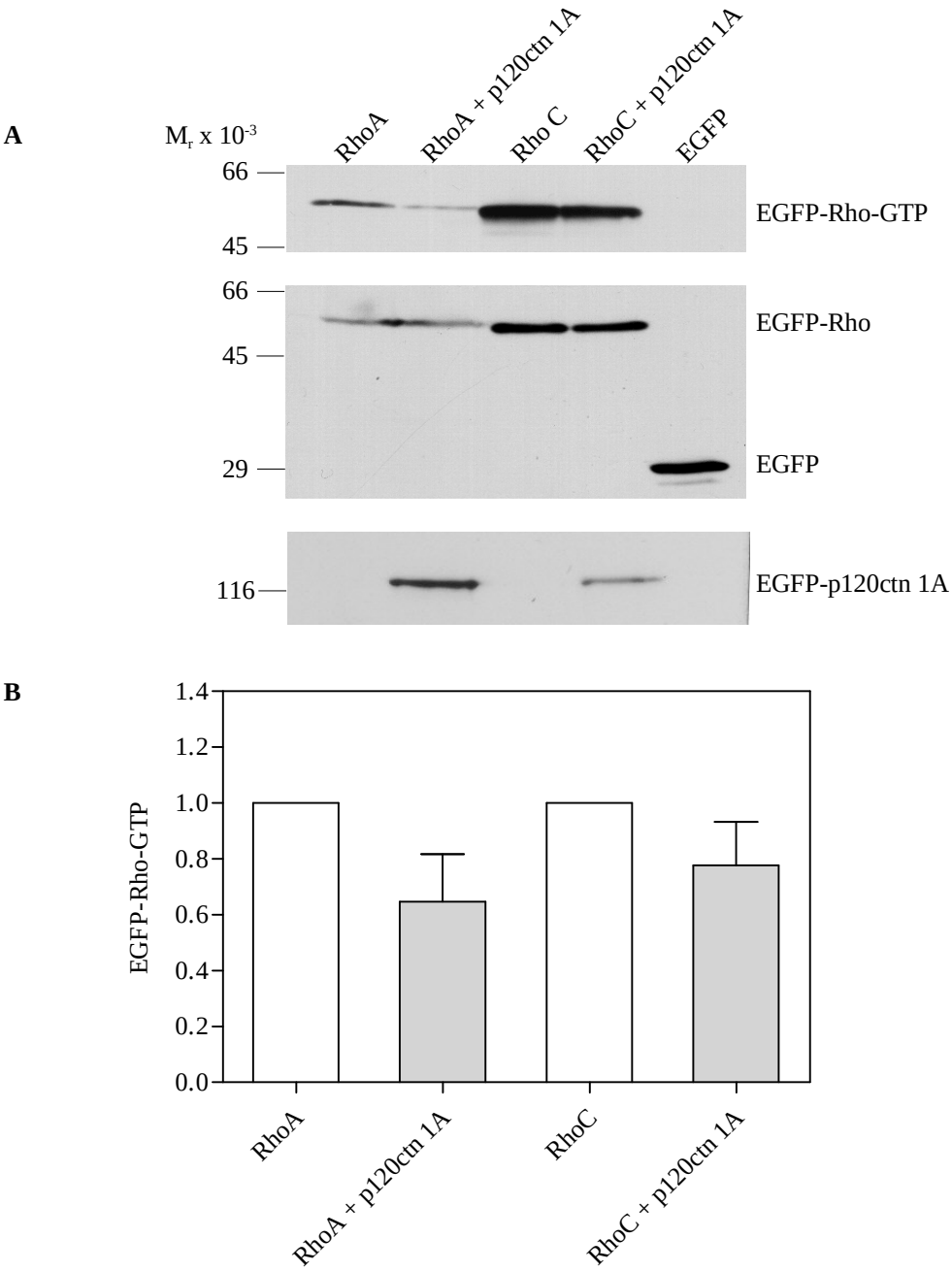


Abbildung 25: Nachweis der Rho-Aktivität und des Einflusses von p120ctn 1A auf die Aktivität von EGFP-Rho. Von PANC-1-Zellen, die mit pEGFP-C2, pEGFP-RhoA bzw. pEGFP-RhoA und pEGFP-p120ctn 1A sowie pEGFP-RhoC sowie pEGFP-RhoC und pEGFP-p120ctn 1A transient transfiziert worden waren, wurden Rho-RIPA-Zelllysate hergestellt. Es wurden 1,5 mg Protein der Zelllysate mit 40 µg GST-TRBD-angereicherten Glutathion-Sepharose-*beads* versetzt und 30 min inkubiert. Die Glutation-Sepharose-*beads* wurden durch Zentrifugation sedimentiert, die gebundenen Proteine in einem 12,5 %igen SDS-Polyacrylamidgel aufgetrennt und im Immunblotverfahren analysiert. Zur Kontrolle des gleichmäßigen Einsatzes der EGFP-Proteinmengen wurden 40 µg Protein der Zelllysate in einem 10 %igen SDS-Polyacrylamidgel aufgetrennt und ebenfalls im Immunblotverfahren analysiert. Das präzipitierte EGFP-Rho-GTP sowie das im Zelllysat enthaltene EGFP, EGFP-Rho und EGFP-p120ctn 1A wurden mit einem monoklonalen, Peroxidase-konjugierten anti-GFP-Antikörper und ECL-Detektion nachgewiesen. **A**) Im oberen Immunblot ist mit GST-TRBD präzipitiertes EGFP-RhoA-GTP sowie EGFP-RhoC-GTP gezeigt. Der mittlere Immunblot zeigt im

Zelllysat enthaltenes EGFP-RhoA, EGFP-RhoC und EGFP. Der unterste Immunblot zeigt im Zelllysat enthaltenes EGFP-p120ctn 1A. Ein Proteinstandard ist links markiert. **B**) Die Grafik zeigt die quantitative Auswertung der detektierten Proteinbanden des präzipitierten EGFP-RhoA-GTP und EGFP-RhoC-GTP mittels Densitometrie von drei unabhängig voneinander durchgeführten Rho-GTP-Bindungsexperimenten. Die Mittelwerte für präzipitiertes EGFP-Rho-GTP ohne p120ctn 1A wurden gleich 1 gesetzt (weiße Balken). Die Mittelwerte $\pm$ Standardabweichung (SD) für EGFP-Rho-GTP bei gleichzeitiger Expression von p120ctn 1A wurden unter Berücksichtigung der eingesetzten Proteinmengen von EGFP-Rho dazu ins Verhältnis gesetzt (graue Balken).

4.7.3 Vergleichende Analyse des Einflusses von p120ctn 1A-4A auf die Aktivität von RhoC

In weiteren Rho-GTP-Bindungsexperimenten wurde der Einfluss der p120ctn-Isoformen 1A, 2A, 3A oder 4A auf die Aktivität von RhoC vergleichend analysiert. Hierfür wurden 3 x 10^6 PANC-1-Zellen mit 5 µg pEGFP/RhoC bzw. mit 5 µg pEGFP/RhoC und 5 µg pEGFP/p120ctn 1A, 2A, 3A oder 4A transient transfiziert. Die Zellen wurden unter Standardbedingungen kultiviert und 4 h vor der Lyse in DMEM ohne Zusätze inkubiert. Es wurden Zelllysate in Rho-RIPA-Puffer hergestellt. Zur Überprüfung der Expression und zur Abschätzung der Proteinmengen von EGFP-RhoC und von EGFP-p120ctn-Isoformen 1A-4A, wurden je 50 µg Protein der Zelllysate in einem 10 %igen SDS-Polyacrylamidgel aufgetrennt und im Immunblotverfahren analysiert. Es konnte die Expression von EGFP-RhoC und EGFP-p120ctn 1A-4A in den Zelllysaten der transfizierten PANC-1-Zellen nachgewiesen werden (Daten nicht gezeigt). Die Rho-GTP-Bindungsexperimente wurden, wie im Kapitel 4.7.2 beschrieben, durchgeführt. Das mit GST-TRBD präzipitierte EGFP-RhoC-GTP wurde in einem 12,5 %igen SDS-Polyacrylamidgel aufgetrennt und im Immunblotverfahren analysiert. In einem 10 %igen SDS-Polyacrylamidgel wurde 1/20 der Proteinmenge, die im Experiment eingesetzt worden war, aufgetrennt und ebenfalls im Immunblotverfahren analysiert. Der Nachweis von präzipitiertem EGFP-RhoC-GTP erfolgte mit einem monoklonalen, Peroxidase-konjugierten anti-GFP-Antikörper und ECL-Entwicklung. Der Nachweis von EGFP-RhoC und EGFP-p120ctn 1A-4A im Zelllysat erfolgte mit einem monoklonalen anti-GFP-Antikörper und Detektion mit alkalischer Phosphatase. In Abbildung 26 A ist das Ergebnis eines von zwei unabhängig voneinander durchgeführten Rho-GTP-Bindungsexperimenten gezeigt. Im oberen Immunblot ist EGFP-RhoC-GTP gezeigt, das mittels GST-TRBD aus Zelllysaten von transient transfizierten PANC-1-Zellen präzipitiert wurde. Es zeigt sich, dass weniger EGFP-RhoC-GTP aus Zelllysaten von PANC-1-Zellen präzipitert wurde, die mit pEGFP/RhoC und pEGFP-p120ctn 1A, 2A oder 4A transient kotransfiziert worden waren, als aus Zelllysaten von PANC-1-Zellen, die mit pEGFP/RhoC

alleine transient transfiziert worden waren. Des Weiteren zeigt sich, dass bei Kotransfektion der PANC-1-Zellen mit pEGFP/RhoC und pEGFP-p120ctn 3A mehr EGFP-RhoC-GTP präzipitiert wurde, als bei Transfektion mit pEGFP/RhoC. Die Aktivität von EGFP-RhoC wurde bei gleichzeitiger Expression von EGFP-p120ctn 1A, 2A oder 4A leicht vermindert und bei Expression von 3A leicht erhöht. Der mittlere Immunblot zeigt als Kontrolle für den gleichmäßigen Einsatz der Proteinmengen im Experiment im Zelllysat enthaltenes EGFP-RhoC. Es zeigt sich, dass in den Proben mit EGFP-p120ctn 3A bzw. 4A mehr EGFP-RhoC eingesetzt worden war, als bei den übrigen Proben. Der unterste Immunblot zeigt im Zelllysat enthaltenes EGFP-p120ctn 1A-4A. In Abbildung 26 B sind die Ergebnisse der densitometrischen Auswertung der Immunblots von zwei unabhängig voneinander durchgeführten Rho-GTP-Bindungsexperimenten grafisch dargestellt. Der Mittelwerte für EGFP-RhoC-GTP ohne kotransfiziertes pEGFP/p120ctn wurde gleich 1 gesetzt. Die Mittelwerte $\pm$ Standardabweichung (SD) für präzipitiertes EGFP-RhoC-GTP nach Kotransfektion mit p120ctn 1A, 2A, 3A oder 4A wurden unter Berücksichtigung der eingesetzten Proteinmenge von EGFP-RhoC dazu ins Verhältnis gesetzt. Es zeigt sich, dass die Aktivität von EGFP-RhoC bei gleichzeitiger Proteinexpression der p120ctn-Isoformen 1A, 2A oder 4A in PANC-1-Zellen gering vermindert wurde. Bei gleichzeitiger Proteinexpression von EGFP-p120ctn 3A wurde die Aktivität von EGFP-RhoC in PANC-1-Zellen leicht erhöht. Unter Berücksichtigung der Standardabweichung zeigt sich für p120ctn 2A bzw. 3A nur ein sehr geringer Einfluss auf die Aktivität von EGFP-RhoC. Die statistische Signifikanz der Ergebnisse (p-Wert $< 0,05$) wurde mit dem t-test analysiert und teilweise bestätigt. Die p-Werte für EGFP-RhoC + p120ctn 1A bzw. 3A betrugen 0,0339 bzw. 0,0277 welche die Signifikanz der Ergebnisse bestätigen. Für EGFP-RhoC + p120ctn 2A bzw. 4A mit p-Werten von 0,0806 bzw. 0,0591 konnte die Signifikanz der Ergebnisse nicht bestätigt werden. Zusammenfassend wurde mit diesen Rho-GTP-Bindungsexperimenten gezeigt, dass bei Kotransfektion der PANC-1-Zellen mit pEGFP/p120ctn 1A, 2A oder 4A die Aktivität von EGFP-RhoC leicht vermindert wird und mit pEGFP/p120ctn 3A leicht erhöht wurde.

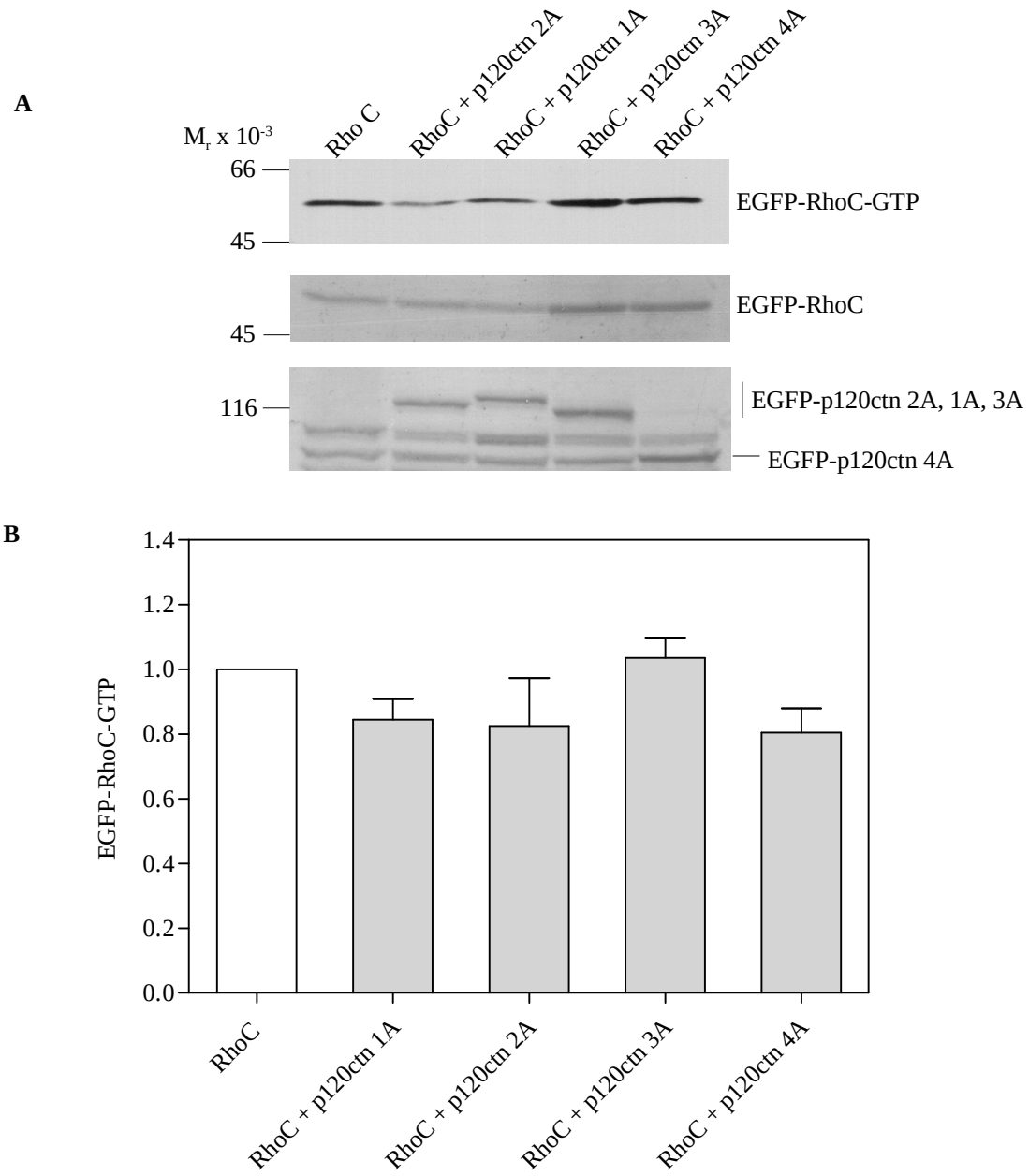


Abbildung 26: Nachweis der EGFP-RhoC-Aktivität und des Einflusses von p120ctn 1A-4A auf die Aktivität von EGFP-RhoC. Zur Analyse der Aktivität von EGFP-RhoC bei Kotransfektion mit p120ctn 1A, 2A, 3A oder 4A wurden 3 x 10^6 PANC-1-Zellen jeweils mit 5 µg pEGFP/RhoC bzw. mit 5 µg pEGFP/RhoC und 5 µg pEGFP/p120ctn 1A, 2A, 3A oder 4A transient transfiziert. Die Zellen wurden unter Standardbedingungen kultiviert und 4 Stunden vor der Lyse in DMEM ohne Zusätze inkubiert. Die Zellen wurden in Rho-RIPA-Puffer aufgenommen und Rho-GTP aus 1 mg Protein der Zelllysate mit 30 µg GST-TRBD, gebunden an Glutathion-Sepharose-*beads*, präzipitiert. Die Glutathion-Sepharose-*beads* wurden durch Zentrifugation sedimentiert. Die gebundenen Proteine wurden in einem 12,5 %igen SDS-Polyacrylamidgel aufgetrennt und im Immunblotverfahren analysiert. Der Nachweis von präzipitiertem EGFP-RhoC-GTP erfolgte mit einem monoklonalen, Peroxidase-konjugierten anti-GFP-Antikörper und ECL-Detektion. Zur Kontrolle der eingesetzten Mengen an EGFP-RhoC-Fusionsproteinen und der im Zelllysat enthaltenen EGFP-p120ctn-Proteine wurden 50 µg Protein der Zelllysate in einem 10 %igen SDS-Polyacrylamidgel aufgetrennt und im Immunblotverfahren analysiert. Der Nachweis von im Zelllysat enthaltenen EGFP-RhoC oder EGFP-p120ctn 1A-4A erfolgte mit einem monoklonalen anti-GFP-Antikörper und Detektion mit alkalischer Phosphatase. **A**) Der obere Immunblot zeigt mittels GST-TRBD präzipitiertes EGFP-RhoC-GTP. Im mittleren Immunblot ist im Zelllysat enthaltenes EGFP-RhoC gezeigt. Der unterste Immunblot zeigt im Zelllysat enthaltenes EGFP-p120ctn 1A-4A. Ein Proteinstandard ist links markiert. **B**) Die Grafik

zeigt die quantitative Auswertung der detektierten Proteinbanden des präzipitierten EGFP-RhoC-GTP mittels Densitometrie von zwei unabhängig voneinander durchgeführten Rho-GTP-Bindungsexperimenten. Der Mittelwert für präzipitiertes EGFP-RhoC-GTP ohne kotransfiziertes p120ctn wurde gleich 1 gesetzt (weißer Balken). Die Mittelwerte ± Standardabweichung (SD) für EGFP-RhoC-GTP bei gleichzeitiger Expression von EGFP-p120ctn 1A, 2A, 3A oder 4A wurden unter Berücksichtigung der eingesetzten Proteinmengen von EGFP-RhoC dazu ins Verhältnis gesetzt (graue Balken).

4.8 Bestimmung der Rac1-Aktivität

Die Ergebnisse der Rho-GTP-Bindungsstudien zeigten, dass nach transienter Kotransfektion von PANC-1-Zellen mit EGFP-RhoA bzw. EGFP-RhoC mit p120ctn 1A eine Verminderung der Rho-Aktivität zu beobachten war. Mittels Rac1-GTP-Bindungsexperimenten sollte analysiert werden, ob p120ctn 1A nach transienter Kotransfektion mit Rac1 in PANC-1-Zellen einen Einfluss auf die Rac1-Aktivität hat. Einige Forschungsgruppen konnten zeigen, dass die Überexpression von p120ctn in verschiedenen Säugerzellsystemen zu einer Stimulation der Aktivität von Rac1 führt, jedoch eine Inhibierung von RhoA bewirkt (Grosheva *et al*., 2001; Noren *et al.*, 2000).

4.8.1 Expression und Aufreinigung von GST-PAK-CD

Die hohe Affinität von Rac1-GTP zur CRIB-Domäne (CD) des Effektors PAK1b ermöglicht die spezifische Präzipitation von Rac1-GTP. Zur Analyse der Aktivität von Rac1, d.h. dem Gehalt an GTP-gebundenen Rac1-Proteinen, wurden GST-PAK-CD-Bindungsexperimente (siehe Kapitel 3.3.21) durchgeführt (Stähle *et al.*, 2003). Für die Bindungsstudien wurden GST-PAK-CD-Fusionsproteine mit Hilfe des Expressionsplasmids pGEX-2TK/PAK-CD in *E. coli* BL21(DE3) exprimiert und durch Bindung an Glutathion-Sepharose gereinigt (siehe Kapitel 3.3.3). Die Expression der GST-PAK-CD-Fusionsproteine erfolgte für 3 h bei 30 °C nach Induktion durch Zugabe von 0,5 mM IPTG. Anschließend wurde die Bakterienkultur bei 5000 Upm und 4 °C für 10 min geerntet. Die Bakterienzellen wurden durch Ultraschallbehandlung lysiert und durch Zentrifugation die löslichen Proteine von den unlöslichen Zellteilen getrennt. Die GST-PAK-CD-Fusionsproteine wurden affinitätschromatographisch aus der löslichen Lysatfraktion durch die Bindung an Glutathion-Sepharose gereinigt. Zur Konzentrationsbestimmung und zur Kontrolle der Expression der gereinigten GST-PAK-CD-Proteine wurden 2, 5, 10 und 20 µl mit GST-PAK-CD angereicherte Glutathion-Sepharose-*beads* in einem 12,5 %igen SDS-Polyacrylamidgel

aufgetrennt. Um die Konzentration der GST-PAK-CD-Proteine zu bestimmen, wurden im selben Gel 5, 10, 20 und 30 µg BSA aufgetrennt. Die Proteine im Gel wurden mit Coomassie-Blau angefärbt. Die semiquantitative Bestimmung erfolgte durch Vergleich der Stärke der Proteinbanden von GST-PAK-CD und BSA. Die Abbildung 27 zeigt an Glutathion-Sepharose gebundenes GST-PAK-CD mit einem Molekulargewicht von 36 kDa von einer von zwei Aufreinigungen. Des Weiteren ist BSA mit einem Molekulargewicht von 66 kDa für die semiquantitative Bestimmung der GST-PAK-CD-Konzentration gezeigt. In den durchgeführten Rac1-GTP-Bindungsexperimenten wurden 30 µg GST-PAK-CD eingesetzt.

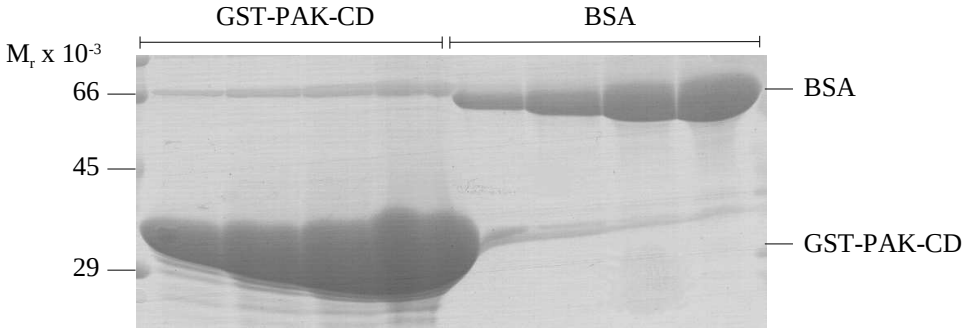


Abbildung 27: Quantifizierung der GST-PAK-CD-Expression. GST-PAK-CD-Fusionsproteine wurden im *E. coli*-Stamm BL21(DE3) exprimiert und die Proteine affinitätschromatographisch durch Bindung an Glutathion-Sepharose aus der löslichen Lysatfraktion gereinigt. Zur Analyse der gereinigten GST-PAK-CD-Fusionsproteine wurden 2, 5, 10 und 20 µl der mit GST-PAK-CD angereicherten Glutathion-Sepharose-*beads* mit SDS-Probenpuffer versetzt, die Proteine in einem 12,5 %igen SDS-Polyacrylamidgel aufgetrennt und mit Coomassie-Blau angefärbt. Zur Quantifizierung wurden im gleichen Gel 5, 10, 20 und 30 µg BSA aufgetrennt. Ein Proteinstandard ist links markiert.

4.8.2 Einfluss von p120ctn auf die Aktivität von Rac1

Um zu analysieren, ob p120ctn 1A die Aktivität von Rac1 beeinflusst, wurden, nach Transfektion von Rac1 und p120ctn 1A in PANC-1-Zellen, Rac1-GTP-Bindungsexperimente durchgeführt (siehe Kapitel 3.3.21). Für die Transfektion wurden 3 x 10^6 PANC-1-Zellen ausgesät und über Nacht bei 37°C kultiviert. Die Zellen wurden jeweils mit 5 µg pEGFP/Rac1, mit 5 µg pEGFP/Rac1 und 5 µg pEGFP-C2 bzw. mit 5 µg pEGFP/Rac1 und pEGFP/p120ctn 1A transient transfiziert (siehe Kapitel 3.4.6). Nach 24 h Expressionszeit in serumhaltigem Wachstumsmedium und Inkubation der Zellen für 4 h in DMEM ohne Zusätze wurden Zelllysate in Rac-RIPA-Puffer hergestellt. Zur Überprüfung der Expression und zur Abschätzung der Proteinmengen von EGFP-Rac1 und EGFP-p120ctn 1A im Zelllysat wurden je 30 µg Protein der Zelllysate in einem 10 %igen SDS-Polyacrylamidgel aufgetrennt und im

Immunblotverfahren analysiert. Die Expression von EGFP-Rac1 und EGFP-p120ctn 1A wurde in den Zelllysaten der transfizierten PANC-1-Zellen nachgewiesen (Daten nicht gezeigt). Für die einzelnen Ansätze wurden je nach Expressionstärke von EGFP-Rac1 0,2-2 mg Protein der Zelllysate mit 30 µg GST-PAK-CD, gebunden an Glutathion-Sepharose-*beads*, für 45 min inkubiert. Danach wurden die Glutathion-Sepharose-*beads* durch Zentrifugation sedimentiert, die gebundenen Proteine in einem 12,5 %igen SDS-Polyacrylamidgel aufgetrennt und im Immunblotverfahren analysiert. Zur Überprüfung der eingesetzten Proteinmengen im Experiment wurden jeweils Aliquots mit 10 µg Protein der Zelllysate in einem 10 %igen SDS-Polyacrylamid-Gel aufgetrennt und im Immunblotverfahren analysiert. Der Nachweis von präzipitiertem EGFP-Rac1-GTP und im Zelllysat enthaltenen EGFP-Rac1 bzw. EGFP-p120ctn 1A erfolgte mit einem monoklonalen, Peroxidase-konjugierten anti-GFP-Antikörper und ECL-Detektion. Die Abbildung 28 A zeigt das Ergebnis eines von fünf unabhängig voneinander durchgeführten Rac1-GTP-Bindungsexperimenten. Im oberen Immunblot ist EGFP-Rac1-GTP gezeigt, das mittels GST-PAK-CD aus Zelllysaten von transient transfizierten PANC-1-Zellen präzipitiert wurde. Es zeigt sich, dass etwas weniger EGFP-Rac1-GTP aus Zelllysaten von PANC-1-Zellen präzipitiert wurde, die mit pEGFP/Rac1 und pEGFP/p120ctn 1A transient kotransfiziert worden waren als aus PANC-1-Zellen, die mit pEGFP/Rac1 und pEGFP-C2 transient transfiziert worden waren. Der mittlere Immunblot zeigt als Kontrolle für den gleichmäßigen Einsatz der Proteinmengen im Experiment im Zelllysat enthaltenes EGFP-Rac1 und EGFP. Es zeigt sich, dass bei Rac1 + p120ctn 1A weniger EGFP-Rac1 eingesetzt worden war, als bei den beiden anderen Proben. Unter Berücksichtigung der unterschiedlich eingesetzten Proteinmengen zeigt sich, dass die Rac1-Aktivität durch die Kotransfektion der PANC-1-Zellen mit pEGFP/p120ctn 1A nicht beeinflusst bzw. minimal vermindert wurde. Im untersten Immunblot ist im Zelllysat enthaltenes EGFP-p120ctn 1A gezeigt. In der Abbildung 28 B sind die Ergebnisse der densitometrischen Auswertung der Immunblots von fünf unabhängig voneinander durchgeführten Rac1-GTP-Bindungsexperimenten grafisch dargestellt. Der Mittelwert für EGFP-Rac1-GTP + EGFP wurde gleich 1 gesetzt. Der Mittelwert $\pm$ Standardabweichung für EGFP-Rac1-GTP nach Kotransfektion von p120ctn 1A wurde unter Berücksichtigung der eingesetzten Proteinmenge von EGFP-Rac1 dazu ins Verhältnis gesetzt. Es zeigt sich, dass die Proteinexpression von p120ctn 1A keinen Einfluss auf die Rac1-Aktivität in PANC-1-Zellen hat.

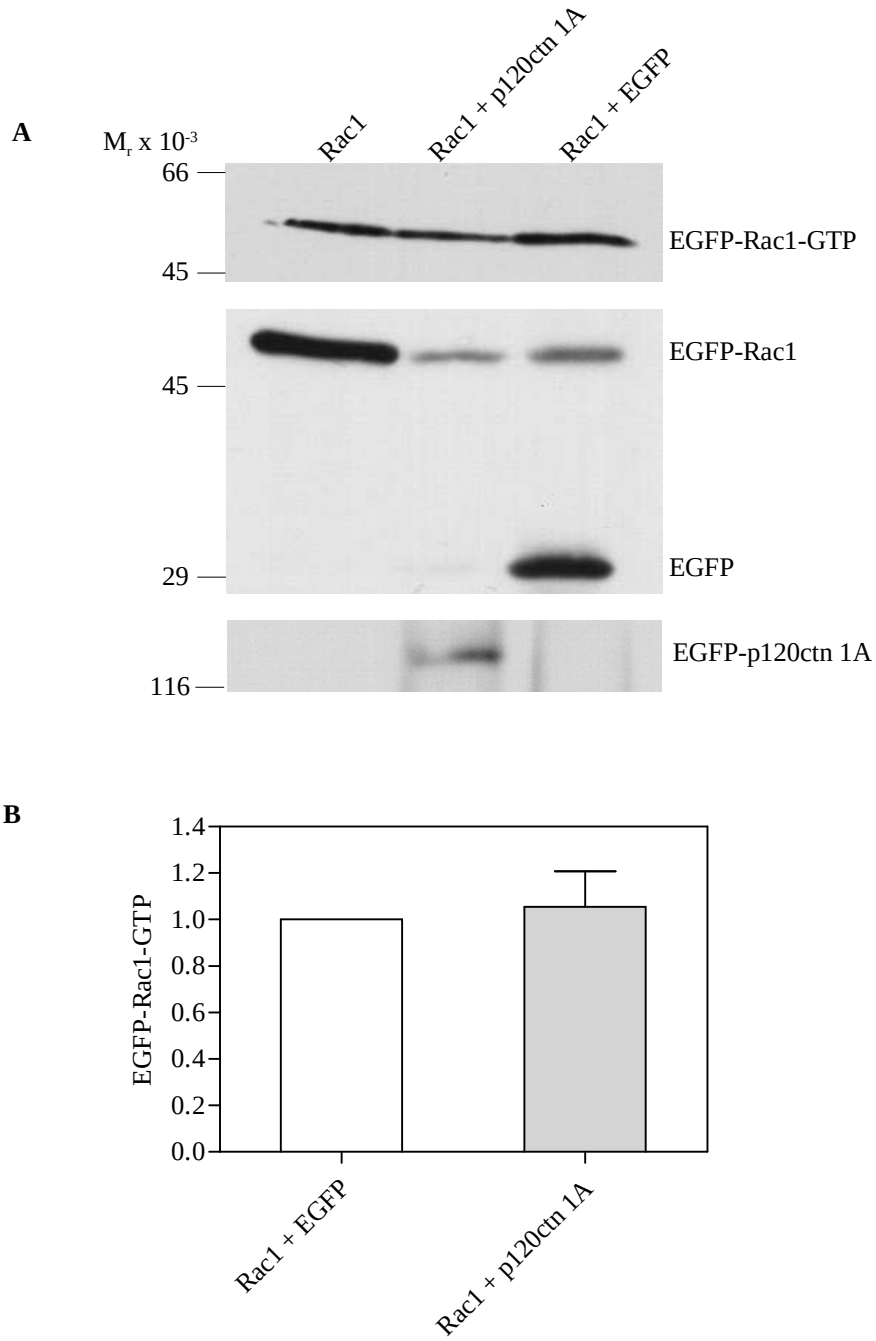


Abbildung 28: Nachweis der Rac1-Aktivität und des Einflusses von p120ctn 1A auf die Aktivität von EGFP-Rac1. Zur Analyse der Aktivität von Rac1 unter dem Einfluss von p120ctn 1A wurden 3 x 10^6 PANC-1-Zellen jeweils mit 5 µg pEGFP/Rac1, mit 5 µg pEGFP/Rac1 und 5 µg EGFP-C2 bzw. mit 5 µg pEGFP/Rac1 und 5 µg pEGFP/p120ctn 1A transient transfiziert. Die Zellen wurden unter Standardbedingungen kultiviert und 24 Stunden vor der Lyse in DMEM ohne Zusätze inkubiert. Die Zellen wurden in Rac-RIPA-Puffer aufgenommen und 0,8 mg Protein der Zelllysate mit 30 µg GST-PAK-CD angereicherten Glutathion-Sepharose-*beads* 45 min inkubiert. Die Glutathion-Sepharose-*beads* wurden durch Zentrifugation sedimentiert, die gebundenen Proteine in einem 12,5 %igen SDS-Polyacrylamidgel aufgetrennt und im Immunblotverfahren analysiert. Zur Kontrolle des gleichmäßigen Einsatzes der Proteinmengen von EGFP-Rac1 wurden 10 µg der Zelllysate in einem 10 %igen SDS-Polyacrylamidgel aufgetrennt und ebenfalls im Immunblotverfahren analysiert. Der Nachweis von präzipitiertem EGFP-Rac1-GTP bzw. im Zelllysat enthaltenes EGFP-Rac1, EGFP und EGFP-p120ctn 1A erfolgte mit einem monoklonalen, Peroxidase-konjugierten anti-GFP-Antikörper und ECL-Detektion. **A**) Der obere Immunblot zeigt mit GST-PAK-CD präzipitiertes EGFP-Rac1-GTP. Im mittleren Immunblot ist im Zelllysat enthaltenes EGFP-Rac1 und EGFP gezeigt. Der unterste

Immunblot zeigt im Zelllysat enthaltenes EGFP-p120ctn 1A. Links ist ein Proteinstandard markiert. **B**) Die Grafik zeigt die quantitative Auswertung der detektierten Proteinbanden des präzipitierten EGFP-Rac1-GTP mittels Densitometrie von fünf unabhängig voneinander durchgeführten Rac1-GTP-Bindungsexperimenten. Der Mittelwert für EGFP-Rac1-GTP wurde gleich 1 gesetzt(weißer Balken). Die Mittelwerte ± Standardabweichung (SD) für EGFP-Rac1-GTP unter dem Einfluss von p120ctn 1A wurden dazu ins Verhältnis gesetzt(grauer Balken). Die Mittelwerte und die Standardabweichung wurden von fünf Experimenten ermittelt.

4.9 Einfluss von p120ctn-siRNA auf die Aktivität von RhoA und RhoC

Die in den Kapiteln 4.7.2 und 4.7.3 dargestellten Ergebnisse zeigten, dass durch die gleichzeitige Proteinexpression von EGFP-RhoA bzw. EGFP-RhoC sowie von p120ctn 1A die Aktivität der beiden Rho-GTPasen beeinflusst wurde. Des Weiteren wurde gezeigt, dass p120ctn 2A und 4A die Aktivität von EGFP-RhoC leicht vermindern bzw. p120ctn 3A die Aktivität leicht erhöht. Nun sollte geklärt werden, ob und wenn ja welchen Effekt die Hemmung der Proteinexpression von p120ctn auf die Aktivität der Rho-GTPasen RhoA und RhoC hat. Um dies zu untersuchen, wurde die Proteinexpression von p120ctn in EGFP-RhoA- und EGFP-RhoC-exprimierende PANC-1-Zellen mittels *small interference RNA* (siRNA) gehemmt und anschließend die Aktivität von EGFP-RhoA und EGFP-RhoC mittels GST-TRBD-Präzipitationsstudien (siehe Kapitel 3.3.20) analysiert. Es wurden 5 x 10^6 EGFP-RhoA- und EGFP-RhoC-exprimierende PANC-1-Zellen ausgesät und über Nacht bei 37°C kultiviert. Für die Transfektion wurde p120ctn-siRNA I bzw. II verwendet, welche gegen unterschiedliche Zielsequenzen im p120ctn Gen gerichtet sind. Zur Kontrolle einer unspezifischen Hemmung durch siRNA und zur Kontrolle der Transfektionseffizienz wurden die Zellen mit Fluoreszenz-markierter Kontroll-siRNA transfiziert (siehe Kapitel 3.4.7). Die Endkonzentration der p120ctn-siRNA I bzw. II und der Kontroll-siRNA in den Ansätzen betrug 100 nM. Die Transfektionseffizienz wurde mit Hilfe eines Fluoreszenzmikroskops 24 h nach der Transfektion überprüft und lag bei 80-95 %. 72 h nach der Transfektion wurden die Zellen in Rho-RIPA-Puffer aufgenommen. Für die Rho-GTP-Bindungsexperimente wurden 1 mg Protein der Zelllysate mit 30 µg GST-TRBD, gebunden an Glutathion-Sepharose-*beads* für 45 min inkubiert. Danach wurden die Glutathion-Sepharose-*beads* durch Zentrifugation sedimentiert, die gebundenen Proteine in einem 12,5 %igen SDS-Polyacrylamidgel aufgetrennt und im Immunblotverfahren analysiert. Zur Kontrolle, dass gleiche EGFP-Rho-Proteinmengen im Experiment verwendet wurden und für den Nachweis der Hemmung von p120ctn durch p120ctn-siRNA I und II, wurden jeweils Aliquots der

Zelllysate (1/20-1/50 der eingesetzten Proteinmenge) in einem 10 %igen SDS-Polyacrylamid-Gel aufgetrennt und im Immunblotverfahren analysiert. Der Nachweis von präzipitiertem EGFP-Rho-GTP und im Zelllysat enthaltenen EGFP-Rho erfolgte mit einem monoklonalen, Peroxidase-konjugierten anti-GFP-Antikörper und ECL-Detektion. Im Zelllysat enthaltenes p120ctn wurde mit einem monoklonalen anti-p120ctn-Antikörper und ECL-Detektion nachgewiesen. In Abbildung 29 A ist das Ergebnis eines von drei unabhängig voneinander durchgeführten Rho-GTP-Bindungsexperimenten gezeigt. Der unterste Immunblot zeigt im Zelllysat enthaltenes p120ctn und zwar in nicht-transfizierten bzw. mit Kontroll-siRNA transfizierten EGFP-RhoA- bzw. EGFP-RhoC-Zellen. Es zeigt sich, dass die Proteinexpression aller p120ctn-Isoformen durch die Transfektion der Zellen mit p120ctn-siRNA I bzw. II gleichermaßen vollständig inhibiert wurde. Der oberste Immunblot zeigt mittels GST-TRBD präzipitiertes EGFP-RhoA-GTP bzw. EGFP-RhoC-GTP. Es wurde mehr EGFP-RhoC-GTP präzipitiert als EGFP-RhoA-GTP. Es zeigt sich weder ein Einfluss auf die Aktivität von EGFP-RhoA noch auf die Aktivität von EGFP-RhoC wenn die Proteinexpression von p120ctn durch p120ctn-siRNA I bzw. II inhibiert wird. Im mittleren Blot ist als Kontrolle für den gleichmäßigen Einsatz der Proteinmengen im Experiment im Zelllysat enthaltenes EGFP-RhoA bzw. EGFP-RhoC gezeigt. Es zeigt sich, dass in allen Ansätzen vergleichbare Proteinmengen im Experiment eingesetzt worden waren. In der Abbildung 29 sind die Ergebnisse der densitometrischen Auswertung der Immunblots von drei unabhängig voneinander durchgeführten GST-TRBD-Präzipitationsstudien grafisch dargestellt. Die Mittelwerte für präzipitiertes EGFP-Rho-GTP nach Transfektion mit Kontroll-siRNA wurden gleich 1 gesetzt. Die Mittelwerte $\pm$ Standardabweichung für präzipitiertes EGFP-Rho-GTP nach Transfektion mit p120ctn-siRNA I bzw. II wurden unter Berücksichtigung der eingesetzten Proteinmengen dazu ins Verhältnis gesetzt. Es zeigt sich, dass die Inhibition der Proteinexpression von p120ctn, wenn die Standardabweichung berücksichtigt wird, keinen Einfluss auf die Aktivität von EGFP-RhoA bzw. EGFP-RhoC hat. Die statistische Signifikanz (p-Wert < 0,05) der Ergebnisse wurde mit dem t-test analysiert und teilweise bestätigt. Die p-Werte für EGFP-RhoC + p120ctn-siRNA I bzw. II betrugen 0,0126 bzw. 0,0490 und bestätigen die Signifikanz der Ergebnisse. Für EGFP-RhoA + p120ctn-siRNA I bzw. II mit p-Werten von 0,1279 bzw. 0,0692 konnte die Signifikanz nicht bestätigt werden. Zusammenfassend zeigen die Ergebnisse, dass die Proteinexpression von p120ctn spezifisch durch p120ctn-siRNA gehemmt werden kann. Der Einfluss auf die Rho-Aktivtät wurde weder bei EGFP-RhoA noch bei EGFP-RhoC festgestellt.

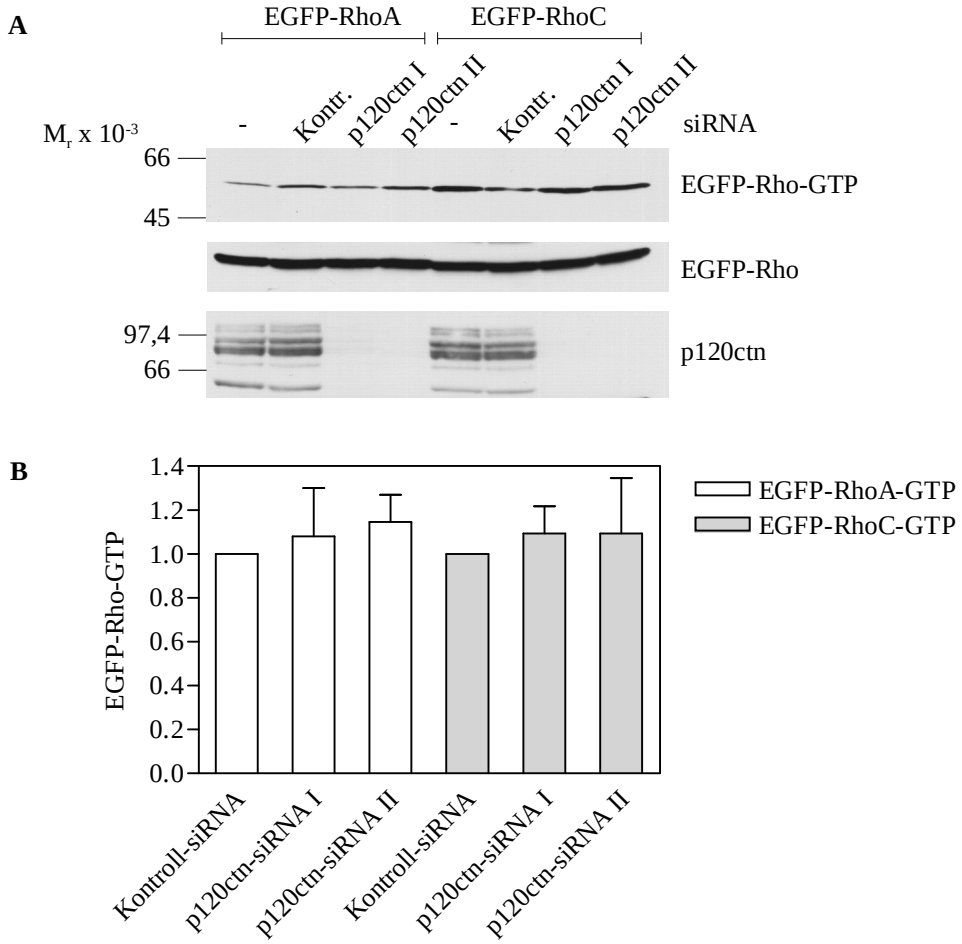


Abbildung 29: Nachweis der Rho-Aktivität und des Einflusses von p120ctn-siRNA auf die Aktivität von EGFP-Rho-Fusionsproteinen. Zur Analyse der Aktivität von EGFP-RhoA und EGFP-RhoC bei Hemmung der Proteinexpression von p120ctn mit p120ctn-siRNA wurden 5 x 10^6 EGFP-RhoA- sowie EGFP-RhoC-exprimierende PANC-1-Zellen ausgesät. Die Zellen wurden jeweils mit p120ctn-siRNA I bzw. II sowie zur Kontrolle der Transfektionseffizienz mit Fluoreszenz-markierter Kontroll-siRNA transfiziert und in Wachstumsmedium kultiviert. 72 h nach der Transfektion wurden Zelllysate in Rho-RIPA-Puffer hergestellt und GST-TRBD-Bindungsexperimente durchgeführt. Es wurden 1 mg Protein der Zelllysate mit 30 µg GST-TRBD, gebunden an Glutathion-Sepharose-*beads*, für 45 min inkubiert. Danach wurden die Glutathion-Sepharose-*beads* durch Zentrifugation sedimentiert, die gebundenen Proteine in einem 12,5 %igen SDS-Polyacrylamidgel aufgetrennt und im Immunblotverfahren analysiert. Zur Kontrolle der eingesetzten Mengen an EGFP-RhoA- und EGFP-RhoC-Fusionsproteinen und für den Nachweis der Hemmung der p120ctn-Expression wurden 50 µg der Zelllysate in einem 10 %igen SDS-Polyacrylamidgel aufgetrennt und im Immunblotverfahren analysiert. Der Nachweis von präzipitiertem EGFP-RhoA-GTP und EGFP-RhoC-GTP bzw. im Zelllysat enthaltenem EGFP-RhoA und EGFP-RhoC erfolgte mit einem monoklonalen, Peroxidase-konjugierten anti-GFP-Antikörper und ECL-Detektion. Der Nachweis von p120ctn erfolgte mit einem monoklonalen anti-p120ctn-Antikörper und ECL-Detektion. **A**) Der oberste Immunblot zeigt mit GST-TRBD präzipitiertes EGFP-Rho. Der mittlere Blot im Zelllysat enthaltenes EGFP-RhoA und EGFP-RhoC. Im untersten Blot ist im Zelllysat enthaltenes p120ctn gezeigt. Ein Proteinstandard ist links markiert. **B**) Die Grafik zeigt die quantitative Auswertung von drei unabhängig voneinander durchgeführten GST-TRBD-Bindungsexperimenten mittels Densitometrie der detektierten Proteinbanden des präzipitierten EGFP-RhoA-GTP (weiße Balken) sowie EGFP-RhoC-GTP (graue Balken). Die Mittelwerte für EGFP-Rho-GTP nach Transfektion mit Kontroll-siRNA wurden gleich 1 gesetzt. Die Mittelwerte $\pm$ Standardabweichung für EGFP-Rho-GTP nach Transfektion mit p120ctn-siRNA I bzw. II wurden dazu ins Verhältnis gesetzt.

4.10 Analyse der Expression von E-Cadherin und N-Cadherin in EGFP-Rho-exprimierenden PANC-1-Zellen

Die im Rahmen dieser Arbeit ermittelten Daten zeigen, dass in PANC-1-Zellen p120ctn mit den Rho-GTPasen RhoC und in geringeren Maßen mit RhoA interagiert. Noren und Mitarbeiter postulieren ein Modell, wobei p120ctn im Zytoplasma mit Rho-GTPasen interagiert und an der Plasmamembran an den zytoplasmatischen Teil von E-Cadherin bindet (Noren *et al.*, 2000). Durch die direkte Bindung an die juxtamembrane Domäne von E-Cadherin stabilisiert p120ctn den Cadherin-Catenin-Proteinkomplex und ist an der Regulation der Cadherin-vermittelten Zell-Zell-Adhäsion beteiligt. E-Cadherin, N-Cadherin, α-Catenin und β-Catenin sind am Aufbau des Cadherin-Catenin-Proteinkomplexes in epithelialen Zelltypen beteiligt und spielen bei der Zell-Zell-Adhäsion eine wichtige Rolle (Anastasiadis und Reynolds, 2000; Ireton *et al.*, 2002). Um zu analysieren, ob ein Unterschied zwischen EGFP-RhoA- bzw. EGFP-RhoC-exprimierenden PANC-1-Zellen in Bezug auf die Expression von E-Cadherin, N-Cadherin, α-Catenin und β-Catenin festgestellt werden kann, wurden Zelllysate von EGFP-, EGFP-RhoA- sowie EGFP-RhoC-exprimierende PANC-1-Zellen auf den Gehalt dieser Proteine untersucht. Die Zellen wurden bis zur Konfluenz kultiviert und anschließend Zelllysate in RIPA-Puffer hergestellt. Je 80 µg Protein der Zelllysate wurden in einem 7,5 %igen SDS-Polyacrylamidgel aufgetrennt und im Immunblotverfahren analysiert. Für die Expressionsanalysen wurden Zelllysate von zwei unabhängigen Präparationen verwendet. Die Proteine wurden mit spezifischen Antikörpern und ECL detektiert. Die Immunblots der Abbildung 30 zeigen die Expression von E-Cadherin, N-Cadherin, α-Catenin und β-Catenin in EGFP-, EGFP-RhoA- sowie EGFP-RhoC-exprimierende PANC-1-Zellen. Hierbei zeigt sich, dass EGFP-RhoA-Zellen mehr E-Cadherin exprimieren als EGFP-Zellen. EGFP-RhoC-exprimierende PANC-1-Zellen weisen einen deutlich geringeren Gehalt an E-Cadherin auf als EGFP-Zellen. Für N-Cadherin zeigt sich ein größerer Gehalt bei EGFP-RhoC-Zellen als bei EGFP-Zellen. In EGFP-RhoA-Zellen zeigt sich ein geringerer Gehalt an N-Cadherin als in EGFP-Zellen. Als Kontrolle für gleichmäßig eingesetzte Proteinmengen diente der Nachweis von β-Aktin in den einzelnen Proben. Im unteren Teil der Abbildung 30 ist in den Immunblots die Expression von α-Catenin bzw. von β-Catenin in EGFP-, EGFP-RhoA- sowie EGFP-RhoC-exprimierende PANC-1-Zellen dargestellt. Es zeigt sich, dass der Gehalt von α-Catenin in EGFP-RhoA- bzw. in EGFP-RhoC-exprimierenden Zellen geringer ist als in EGFP-Zellen. Des Weiteren zeigt sich, dass in EGFP-RhoA-Zellen mehr und in

EGFP-RhoC-Zellen weniger β-Catenin exprimiert wird als in EGFP-Zellen. Als Ergebnis dieser Expressionsanalyse zeigt sich, dass im Vergleich von EGFP-RhoA- und EGFP-RhoC-Zellen mehr E-Cadherin in EGFP-RhoA-Zellen als in EGFP-RhoC-Zellen exprimiert wird. Der N-Cadherin-Gehalt verhält sich genau umgekehrt dazu. In EGFP-RhoC-Zellen wird mehr N-Cadherin exprimiert als in EGFP-RhoA-Zellen. Die Expression von β-Catenin ist in EGFP-RhoA-Zellen höher als in EGFP-RhoC-Zellen.

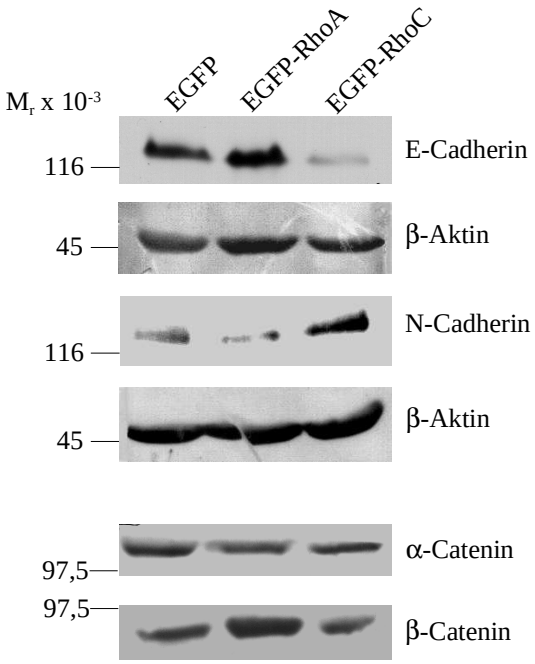


Abbildung 30: Nachweis der Expression von E-Cadherin, N-Cadherin, α-Catenin und β-Catenin in EGFP-, EGFP-RhoA- und EGFP-RhoC-exprimierenden PANC-1-Zellen. Zur Analyse der Expression von E-Cadherin und N-Cadherin sowie von α-Catenin und β-Catenin wurden Zelllysate von EGFP-, EGFP-RhoA- und EGFP-RhoC-exprimierenden PANC-1-Zellen in RIPA-Puffer hergestellt. Je 80 µg Protein der Zelllysate wurden in einem 7,5 %igen SDS-Polyacrylamidgel aufgetrennt und anschließend im Immunblotverfahren analysiert. Der Nachweis von E-Cadherin erfolgte mit einem monoklonalen anti-E-Cadherin-Antikörper und ECL-Detektion. Der Nachweis von N-Cadherin erfolgte mit einem monoklonalen anti-N-Cadherin-Antikörper und ECL-Detektion. Zur Kontrolle der eingesetzten Proteinmengen in den einzelnen Spuren wurden die Immunblots mit einem monoklonalen anti-β-Aktin-Antikörper inkubiert und die Proteine durch Behandlung mit alkalischer Phosphatase detektiert. Für den Nachweis von α-Catenin wurde der Immunblot mit einem polyklonalen anti-α-Catenin-Antikörper und für den Nachweis von β-Catenin mit einem monoklonalen anti-β-Catenin-Antikörper nachbehandelt. Die Proteine wurden bei beiden Immunblots durch Behandlung mit alkalischer Phosphatase detektiert. Die oberen Immunblots zeigen die Expression von E-Cadherin (120 kDa) und N-Cadherin (130 kDa) in EGFP-, EGFP-RhoA- und EGFP-RhoC-exprimierenden PANC-1-Zellen. Jeweils unterhalb der beiden Immunblots ist zur Kontrolle der eingesetzten Proteinmengen von EGFP-, EGFP-RhoA- und EGFP-RhoC-exprimierenden PANC-1-Zellen der Nachweis von β-Aktin (45 kDa) gezeigt. Die beiden Immunblots im unteren Teil der Abbildung zeigen die Expression von α-catenin (102 kDa) und β-Catenin (94 kDa) in EGFP-, EGFP-RhoA- und EGFP-RhoC-exprimierenden PANC-1-Zellen in den gleichen Zelllysaten. Ein Proteinstandard ist links markiert.

5. Diskussion

Die monomeren GTPasen RhoA und RhoC sind Mitglieder der Ras-Superfamilie (Bishop und Hall, 2000), deren wichtigste Funktion die Regulation der Organisation des Aktin-Zytoskeletts darstellt (Etienne-Manneville und Hall, 2002; Jaffe und Hall, 2005). RhoA und RhoC weisen auf Aminosäureebene eine Sequenzidentität von 92 % auf, jedoch sind funktionelle Unterschiede der sehr ähnlichen Rho-GTPasen bei der Regulation der Migration und Invasion von Tumorzellen bekannt (Suwa *et al.*, 1998; Clark *et al.*, 2000; Kleer *et al.*, 2002). In der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Klaudia Giehl wurde im Rahmen von Migrationsexperimenten für PANC-1 Pankreaskarzinomzellen gezeigt, dass die stabile Expression von EGFP-RhoC im Vergleich zur Expression von EGFP und EGFP-RhoA eine verstärkte spontane Migration und Invasion der PANC-1-Zellen induziert. Darüber hinaus konnten Unterschiede in der Menge der mRNA Expression der Rho-GTPasen in Tumorzellen im Vergleich zu Normalgewebe gezeigt werden. Für perineural-invasive, metastasierende duktale Adenokarzinome des Pankreas wurde eine Überexpression von RhoC auf mRNA-Ebene gezeigt (Suwa *et al.*, 1998). Horiuchi und Mitarbeiter konnten zeigen, dass in metastasierenden Ovarialkarzinomen die Expression der mRNA von RhoA und RhoC höher ist als in benignen Ovarialtumoren (Horiuchi *et al.*, 2003). Fritz und Mitarbeiter konnten auf Proteinebene eine verstärkte Expression von RhoA in Darm-, Brust- und Lungenkarzinomzellen im Vergleich zu Normalgewebe nachweisen (Fritz *et al.*, 1999).

In der vorliegenden Arbeit wurden Interaktionspartner von RhoA und RhoC in PANC-1 Pankreaskarzinomzellen, die als Modellsystem ausgewählt wurden, identifiziert und die Interaktionen näher charakterisiert. Zunächst wurde die Expression der bekannten Interaktionspartner RhoGDIα und RhoGDIβ in PANC-1-Zellen nachgewiesen und die Interaktion von RhoA und RhoC mit diesen RhoGDIs untersucht. Des Weiteren wurde eine differentielle Interaktion von p120ctn mit RhoA und RhoC in PANC-1-Zellen beobachtet und mögliche Ursachen für das unterschiedliche Bindungsverhalten analysiert.

5.1 Lokalisation von EGFP-RhoA und EGFP-RhoC in PANC-1-Zellen

Für die Experimente, die in der vorliegenden Arbeit beschrieben wurden, wurden die stabil exprimierenden PANC-1-Zelllinien PANC-1-EGFP 21, PANC-1-EGFP-RhoA 7 und PANC-1-EGFP-RhoC 3 verwendet. Die Expression der EGFP-Proteine und der EGFP-Rho-

Fusionsproteine wurde mittels Fluoreszenzanalyse lebender Zellen und mittels Immunblotanalyse nach subzellulärer Fraktionierung von Zelllysaten nachgewiesen. Die Fluoreszenzanalyse von lebenden EGFP-exprimierenden Zellen zeigte, dass die EGFP-Proteine überwiegend im Zytoplasma und ein geringer Anteil im Zellkern vorlagen. Diese Daten stimmen mit Daten von Ogawa und Mitarbeiter überein, die mittels Fluoreszenzanalysen zeigten, dass in Epithelzellen unterschiedlichen Ursprungs GFP sowohl im Zytoplasma als auch im Zellkern diffus verteilt vorlag (Ogawa *et al.*, 1995). Die Fluoreszenzanalysen von EGFP-RhoA- und EGFP-RhoC-exprimierenden PANC-1-Zellen (siehe Abb. 5) verdeutlichen, dass der überwiegende Anteil an EGFP-RhoA- und EGFP-RhoC-Fusionsproteinen im Zytoplasma lokalisiert ist. Der Zellkern war weitgehend frei von EGFP-RhoA- und EGFP-RhoC-Fusionsproteinen. Bei stärkerer Vergrößerung war zu erkennen, dass ein Anteil der EGFP-Rho-Fusionsproteine an der Plasmamembran lokalisiert war. Die Daten für EGFP-RhoA stehen im Einklang mit Ergebnissen der Arbeitsgruppe um Michaelson. In Fluoreszenzanalysen von transient mit GFP-RhoA-Expressionsplasmiden transfizierten COS-1-Nierenzellen und MDCK-Nierenepithelzellen konnte gezeigt werden, dass RhoA im Zytoplasma dieser Zellen lokalisiert war (Michaelson *et al.*, 2001). In dieser Studie wurde auch die Lokalisation von anderen Rho-GTPasen untersucht. Michaelson und Mitarbeiter konnten RhoB überwiegend an der Plasmamembran und in geringeren Maßen am Golgiapparat nachweisen. Rac1 war in den untersuchten Zellen fast gänzlich an der Plasmamembran nachzuweisen. Die Verteilung von RhoC wurde in dieser Studie nicht untersucht (Michaelson *et al.*, 2001). In einer neueren Studie mit humanen SGC-7901-Magenkarzinomzellen konnte mittels Immunfluoreszenzanalysen und Immunblotanalysen die Lokalisation von RhoA im Nukleus aber auch an der Plasmamembran und im Zytoplasma nachgewiesen werden. Eine Veränderung der Lokalisation von RhoA konnte durch die Stimulation von Zellen mit Lysophosphatidsäure (LPA) bewirkt werden (Tao *et al.*, 2008). LPA induzierte eine Zunahme des Anteils an RhoA in der Plasmamembran und im Nukleus und eine Abnahme im Zytoplasma. Tao und Mitarbeiter vermuten, dass RhoA im Nukleus eine Rolle bei der Regulation der Mitogenese spielt (Tao *et al.*, 2008). Die Lokalisation von EGFP-RhoA bzw. EGFP-RhoC im Zellkern wurde in der vorliegenden Arbeit nicht näher analysiert.

Nach der subzellulären Fraktionierung von Zelllysaten von EGFP-, EGFP-RhoA- und EGFP-RhoC-exprimierenden PANC-1-Zellen in eine lösliche und eine partikuläre Fraktion konnten in der anschließenden Immunblotanalyse die EGFP-Proteine nur in der löslichen Fraktion nachgewiesen werden. Für die subzelluläre Verteilung der EGFP-Rho-Proteine zeigte sich,

dass mehr EGFP-RhoA in der löslichen Fraktion nachgewiesen werden konnte als EGFP-RhoC. In der membranhaltigen Fraktion konnte hingegen mehr EGFP-RhoC als EGFP-RhoA nachgewiesen werden. Die unterschiedliche Lokalisation von RhoA und RhoC könnte einen Hinweis auf den Aktivitätszustand der Rho-GTPase geben. In der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Klaudia Giehl konnte in GST-TRBD-Präzipitationsstudien gezeigt werden, dass mehr EGFP-RhoC als EGFP-RhoA präzipitiert wurde. Darüber hinaus konnte in der Arbeitsgruppe gezeigt werden, dass in ruhenden EGFP-RhoA- und EGFP-RhoC-exprimierenden PANC-1-Zellen nach Zugabe von LPA bzw. FCS EGFP-RhoA aktiviert wurde und vom Zytosol an die Plasmamembran translozierte. Es konnte jedoch keine Translokation von EGFP-RhoC festgestellt werden. Dies ist möglicherweise entweder darauf zurückzuführen, dass RhoC nicht über G-Protein-gekoppelte Rezeptoren aktiviert wird oder aber bereits maximal aktiviert in den Zellen vorliegt. Diese Ergebnisse deuten darauf hin, dass EGFP-RhoC vermehrt im aktiven Zustand und nicht als inaktives Protein gebunden an RhoGDIs im Zytoplasma lokalisiert ist. Die unterschiedliche Lokalisation von RhoA und RhoC könnte auf eine unterschiedliche Interaktion mit RhoGDIs zurückzuführen sein. Takaishi und Mitarbeiter verwendeten für die Analyse der Lokalisation von RhoA stabil transfizierte myc-RhoA exprimierende MDCK-Zelllinien. Die immunhistochemischen Untersuchungen zeigten, dass myc-RhoA in ruhenden Zellen im Zytoplasma lokalisiert war. Nach Stimulation der Zellen mit *hepatocyte growth factor* (HGF) konnte eine Translokation von myc-RhoA vom Zytoplasma an die Plasmamembran festgestellt werden. Diese Translokation des Proteins an die Plasmamembran konnte durch vorherige Mikroinjektion von RhoGDI in die Zellen, die die Aktivierung von myc-RhoA inhibieren, verhindert werden (Takaishi *et al.*, 1995). Boukharov und Cohen entwickelten ein *in vitro*-System zur Analyse der nukleotidabhängigen Translokation und Assoziation von RhoA mit der Plasmamembran in humanen Erythrozyten. Mit diesem System konnte gezeigt werden, dass inaktives RhoA, dass mit RhoGDIs im Komplex vorliegt, durch Zugabe von GTP[S] aktiviert wird und vom Zytoplasma zur Plasmamembran transloziert, was zu einer Zunahme von aktivem RhoA an der Erythrozytenmembran führte (Boukharov und Cohen, 1998). Diese Arbeiten zeigen, dass RhoA inaktiv an RhoGDIs gebunden im Zytoplasma vorliegt und im aktiven Zustand mit der Plasmamembran interagiert. RhoC wurde in diesen Arbeiten nicht berücksichtigt.

5.2 Interaktion von RhoGDIs mit RhoA und RhoC in PANC-1-Zellen

Im vorangegangenen Kapitel wurde dargestellt, dass EGFP-RhoA und EGFP-RhoC im Zytoplasma und in der Plasmamembran von EGFP-RhoA- und EGFP-RhoC-exprimierenden PANC-1-Zellen lokalisiert sind. Durch einen semiquantitativen Vergleich der EGFP-RhoC- und EGFP-RhoA-Mengen konnte gezeigt werden, dass mehr EGFP-RhoC in der Plasmamembran als im Zytoplasma nachgewiesen wurde. Aufgrund dieses Befundes ergab sich die Frage, ob die Ursache hierfür eine unterschiedliche Interaktion von RhoA und RhoC mit RhoGDIs ist. Die Ergebnisse der Untersuchungen zur Expression und Verteilung von RhoGDIs in der löslichen und der partikulären Fraktion von EGFP-, EGFP-RhoA- und EGFP-RhoC-exprimierenden PANC-1-Zellen zeigten, dass RhoGDIα und RhoGDIβ ausschließlich in der löslichen Fraktion der Zellen lokalisiert sind. In Co-Immunpräzipitationsexperimenten wurden EGFP-RhoA sowie EGFP-RhoC sowohl im Komplex mit RhoGDIα als auch im Komplex mit RhoGDIβ jeweils in der löslichen Fraktion der Zellen nachgewiesen. Hierbei zeigten sich keine quantitativen Unterschiede zwischen EGFP-RhoA und EGFP-RhoC in der Interaktion mit RhoGDIα sowie mit RhoGDIβ. Des Weiteren konnte in *in vitro*-Bindungsexperimenten gezeigt werden, dass EGFP-RhoA bzw. EGFP-RhoC in gleichem Maße durch die Interaktion mit GST-RhoGDIα aus der Plasmamembran von EGFP-RhoA- bzw. EGFP-RhoC-exprimierenden PANC-1-Zellen extrahiert werden konnten. Diese Daten lassen den Schluss zu, dass die Interaktion der RhoGDIs mit den Rho-GTPasen zu einer Translokation der Rho-GTPasen ins Zytoplasma führen kann. Ein Zusammenhang zwischen der unterschiedlichen Lokalisation von EGFP-RhoA und EGFP-RhoC in der Plasmamembran bzw. dem Zytoplasma aufgrund einer unterschiedlichen Interaktion der beiden Rho-GTPasen mit RhoGDIα und RhoGDIβ scheint somit nicht zu bestehen. Die Interaktion von RhoGDIs mit RhoA wurde von verschiedenen Arbeitsgruppen analysiert. Hori und Mitarbeiter reinigten RhoA aus Zellen der glatten Muskulatur der bovinen Aorta als auch als rekombinante Proteine aus *E. coli* sowie RhoGDIα aus bovinem Gehirn auf. Sie konnten in *in vitro*-Experimenten zeigen, dass RhoGDIα mit [^{3}H]GDP-gebundenem RhoA nur dann Komplexe bildet, wenn die Rho-GTPase isoprenyliert ist (Hori *et al.*, 1991). Eine andere Arbeitsgruppe isolierte GDP-gebundenes RhoA im Komplex mit RhoGDIα aus dem Zytoplasma von bovinen, neutrophilen Zellen (Bourmeyster *et al.*, 1994). Scherle und Mitarbeiter konnten aus Zelllysaten von lymphoiden und nicht-lymphoiden Zelllinien mittels GST-RhoGDIβ RhoA isolieren und die Interaktion der beiden

Proteine nachweisen (Scherle et al., 1993). Die Interaktion von RhoA mit RhoGDIβ bzw. die Interaktion von RhoC mit RhoGDIs in Pankreaskarzinomzellen wurde bisher nicht gezeigt.
Rho-GTPasen interagieren im inaktiven, GDP-gebundenen Zustand mit RhoGDIs. Diese binden an das prenylierte, carboxy-terminale Ende der Rho-GTPasen und können diese aus der Plasmamembran extrahieren. Durch die Interaktion von Rho mit RhoGDI wird der Austausch des Guaninnukleotids verhindert und das Protein in seinem inaktiven, GDP-gebundenen Zustand im Zytoplasma gehalten (Olofsson, 1999). RhoGDIs interagieren auch mit GTP-gebundenen Rho-GTPasen. Durch diese Interaktion wird die intrinsische GTPase-Aktivität der Rho-GTPasen inhibiert und die Interaktion mit Effektorproteinen verhindert (Rivero *et al.*, 2002). Bis heute wurden drei humane RhoGDIs beschrieben. Das RhoGDIα-Protein, das ubiquitär exprimiert wird, besteht aus 204 Aminosäuren mit einem Molekulargewicht von 23,4 kDa und interagiert mit isoprenyliertem RhoA, RhoB, Rac1, Rac2 und Cdc42 (Olofsson, 1999). In der vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, dass auch RhoC mit RhoGDIα interagiert. Das aus 201 Aminosäuren bestehende RhoGDIβ wird speziell in humanen und murinen hämatopoetischen Zellen exprimiert und bisher wurde eine Interaktion mit RhoA beschrieben. Die Daten der vorliegenden Arbeit zeigen eindeutig die Interaktion von RhoC mit RhoGDIβ. RhoGDIα bzw. RhoGDIβ weisen auf Aminosäuresequenzebene eine Übereinstimmung von 78 % auf, wobei die größten Unterschiede im amino-terminalen Enden zu finden sind (Scherle *et al.*, 1993; Olofsson, 1999). Die dritte Isoform RhoGDIγ wird bevorzugt in Zellen des Gehirns, des Pankreas und der Lunge exprimiert (Adra *et al*, 1997). Das Protein umfasst 225 Aminosäuren mit einem Molekulargewicht von 25,3 kDa (Olofsson, 1999) und weist auf Aminosäuresequenzebene eine etwa 50 %ige Übereinstimmung zu RhoGDIα bzw. RhoGDIβ auf. In Zellen ist RhoGDIγ im Zytoplasma lokalisiert, wo es im Unterschied zu RhoGDIα bzw. RhoGDIβ über eine amino-terminal gelegene hydrophobe Domäne mit perinukleären Vesikeln interagieren kann. RhoGDIγ bindet bevorzugt an RhoB und mit geringerer Affinität als RhoGDIα bzw. RhoGDIβ an RhoA und Cdc42. Eine Interaktion mit Rac1 und Rac2 wurde nicht nachgewiesen (Zalcman *et al.*, 1996; Adra *et al*, 1997). Im Unterschied zu anderen Arbeitsgruppen, die die Expression der mRNA von RhoGDIγ in Pankreaszellen nachgewiesen haben (Dovas und Couchman, 2005), konnte in der vorliegenden Arbeit RhoGDIγ in PANC-1 Pankreaskarzinomzellen mit einem anti-RhoGDIγ-Antikörper nicht detektiert werden. Zusammenfassend zeigen die Daten dieser Arbeit erstmals die Expression von RhoGDIα bzw. RhoGDIβ in PANC-1 Pankreaskarzinomzellen. Des Weiteren konnte zum ersten Mal die Interaktion von RhoGDIα bzw. RhoGDIβ mit EGFP-RhoC gezeigt werden. Hinsichtlich der

Interaktion mit RhoGDIs konnten keine Unterschiede zwischen RhoA und RhoC nachgewiesen werden, die eine Grundlage zur Erklärung der unterschiedlichen Lokalisation dieser beiden Proteine in PANC-1-Zellen geben könnten.

5.3 Identifikation von p120ctn als Interaktionspartner von RhoC in PANC-1-Zellen

Das *armadillo repeat*-Protein p120ctn wurde in dieser Arbeit erstmals als Interaktionspartner von RhoC in *in vitro*-Bindungsexperimenten mit gereinigten GST-Rho-Fusionsproteinen und in Co-Immunpräzipitationsexperimenten in humanen PANC-1 Pankreaskarzinomzellen identifiziert. Dabei konnte festgestellt werden, dass mit GST-RhoC etwa 40 % mehr p120ctn-Isoformen als mit GST-RhoA präzipitiert wurden. Da sich die beiden Rho-GTPasen RhoA und RhoC nur in 16 von insgesamt 193 Aminosäuren unterscheiden, ergab sich die Frage, welche Aminosäuren zu dem unterschiedlichen Bindungsverhalten mit p120ctn beitragen. In i*n vitro*-Bindungsexperimenten mit der Chimäre GST-RhoC/A wurde gezeigt, dass die neun carboxy-terminalen Aminosäuren der Rho-GTPase nicht für die starke Bindung zwischen p120ctn und GST-RhoC verantwortlich sind. Mittels *in vitro*-Mutagenese wurden sieben weitere GST-RhoC-Mutanten generiert, in denen jeweils die mutierten Kodons in RhoC nun für die korrespondierende Aminosäure von RhoA kodierten. In weiteren *in vitro*-Bindungsexperimenten konnte mit Hilfe dieser Mutanten gezeigt werden, dass die Aminosäure Serin an Position 152 von RhoC entscheidend für die verstärkte Interaktion von RhoC mit p120ctn-Isoformen im Vergleich zu RhoA verantwortlich ist. Die GST-RhoC-Mutante RhoC (S152G) bindet deutlich weniger p120ctn als wildtypisches GST-RhoC bzw. eine der anderen sechs GST-RhoC-Mutanten. Die vergleichenden Analysen der Interaktion der Mutanten RhoA (G152S) und RhoC (S152G) mit p120ctn belegten eindeutig, dass die unterschiedlichen Aminosäuren an Position 152 den Unterschied im Bindungsverhalten von RhoA und RhoC zu p120ctn bedingen.

p120ctn ist an der Plasmamembran in *adherens junctions* lokalisiert. Das Protein reguliert durch Bindung an den zytoplasmatischen Teil von E-Cadherin und durch dessen Stabilisierung in der Plasmamebram die E-Cadherin-vermittelte Zell-Zell-Adhäsion (Yanagisawa *et al.*, 2008). Einige Arbeitsgruppen konnten zeigen, dass p120ctn im Zytoplasma mit den Rho-GTPasen RhoA direkt bzw. über Vav2, einem Rho-GEF, mit Rac1 und Cdc42 interagiert und die Aktivität der Rho-GTPasen verändert (Anastasiadis *et al.*,

2000; Noren *et al.*, 2000; Grosheva *et al.*, 2001). Anastasiadis und Mitarbeiter konnten für humanes RhoA in *in vivo*-Experimenten mit Epithelzellen zeigen, dass p120ctn die Aktivität von RhoA inhibiert (Anastasiadis *et al.*, 2000). Noren und Mitarbeiter zeigten, dass in Fibroblasten und Epithelzellen die Überexpression von p120ctn zur Inaktivierung von RhoA führte, Rac1 und Cdc42 jedoch über die Interaktion mit Vav2 aktiviert wurden (Noren *et al.*, 2000). Grosheva und Mitarbeiter konnten für SV80-Zellen, die mit GFP-p120ctn transfiziert wurden, eine erhöhte Migration zeigen, die auf die veränderten Aktivitäten von RhoA, Rac1 und Cdc42 zurückgeführt wird (Grosheva *et al.*, 2001). Durch die funktionelle Interaktion von p120ctn mit den Rho-GTPasen RhoA, Rac1 und Cdc42 fungiert p120ctn als Regulator der Zelladhäsion und der Zellmotilität (Reynolds, 2007). Magie und Mitarbeiter konnten in *in vitro* GST-*pulldown*-Experimenten die direkte Interaktion von p120ctn und GST-Rho1, das homolog zu humanem RhoA ist, nachweisen. Die Daten der *in vitro*-Experimente konnten durch die Ergebnisse der Co-Immunpräzipitationsexperimente mit Zelllysaten von *Drosophila*-Embryonen bestätigt werden (Magie *et al.*, 2002). Die Expression von p120ctn in PANC-1-Zellen wurde in der vorliegenden Arbeit näher analysiert und erstmals die spezifische Interaktion von p120ctn-Isoformen mit RhoC in diesen Zellen nachgewiesen.

5.3.1 Expression von p120ctn-Isoformen in PANC-1-Zellen

Zunächst wurde die Expression von p120ctn-Isoformen in PANC-1-Zellen und in anderen Pankreaskarzinomzelllinien und in EGFP-, EGFP-RhoA- und EGFP-RhoC-exprimierenden PANC-1-Zellen vergleichend untersucht. Aus Literaturdaten ist bekannt, dass von p120ctn durch alternatives Spleißen und der Verwendung von alternativen Startkodons bei der Translation die Isoformen 1-4 mit den jeweiligen Spleißvarianten A, B, und C exprimiert werden (Keirsebilck *et al.*, 1998; Aho *et al.*, 2002). In den untersuchten Pankreaskarzinomzelllinien konnten vier verschiedene p120ctn-Varianten in verschiedenen Expressionsmustern detektiert werden (siehe Abb. 11). Bei den Proteinbanden mit einem Molekulargewicht von etwa 116 kDa, 100 kDa, 97 kDa und 70 kDa könnte es sich um die Isoformen 1, 2, 3 und 4 handeln. Der für die Analysen verwendete polyklonale anti-p120ctn-Antikörper bindet am carboxy-terminalen Ende außerhalb der *armadillo repeat*-Domäne der p120ctn-Proteine und detektiert somit alle Isoformen 1-4 ohne zwischen den Spleißvarianten A, B und C zu differenzieren. Von Wu und Mitarbeitern wurde ein selbst hergestellter, monoklonaler anti-p120ctn-Antikörper 6H11 beschrieben, der am amino-terminalen Ende des p120ctn-Proteins bindet und ausschließlich die lange p120ctn-Isoform 1 detektiert (Wu *et al.*,

1998). Dieser Antikörper stand für die im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten Analysen nicht zur Verfügung. Die vergleichende Analyse der Expression von p120ctn-Isoformen in PANC-1-Zellen und anderen humanen Pankreaskarzinomzelllinien zeigte ein recht unterschiedliches Bild in Bezug auf die exprimierten p120ctn-Isoformen. Es zeigt sich, dass in PANC-1-Zellen vor allem drei lange p120ctn-Isoformen (> 90 kDa) exprimiert werden, die nach dem apparenten Molekulargewicht der Proteinbanden den Isoformen 1, 2 und 3 zugeordnet werden könnten. Zwei Zelllinien, BxPC-3 und PaTu 8988 s, exprimieren keine langen Isoformen über 100 kDa, PaTu 8988 t exprimiert p120ctn-Isoformen kaum. Die vergleichende Analyse der EGFP-, EGFP-RhoA- und EGFP-RhoC-exprimierenden PANC-1-Zellen zeigte keine Beeinflussung der Expression von p120ctn-Isoformen durch die verstärkte Expression von EGFP-RhoA bzw. EGFP-RhoC in diesen Zellen. Aus diesen Ergebnissen ergibt sich die Frage, weshalb die Expressionsmuster zwischen den Pankreaskarzinomzellen variieren und ob die Expression zelltypspezifisch erfolgt. Mo und Reynolds analysierten die Expression von p120ctn-Isoformen in verschiedenen murinen Zelltypen. Mittels Immunpräzipitation mit einem monoklonalen anti-p120ctn-Antikörper, der an alle bekannten p120ctn-Isoformen bindet und dem monoklonalen anti-p120ctn-Antikörper 2B12, der ausschließlich p120ctn-Varianten der Isoform 1 bindet, konnte gezeigt werden, dass die langen p120ctn-Isoformen 1 bevorzugt in motilen Zellen wie Fibroblasten und Makrophagen exprimiert werden. In Epithelzellen werden bevorzugt die p120ctn-Isoformen 2 und 3 exprimiert (Mo und Reynolds, 1996). Eine Analyse mittels RT-PCR-Technik zeigte, dass Transkripte der p120ctn-Isoformen, die über Exon B gespleißt werden, in normalen Zellen von Pankreas, Darm und Prostata, jedoch nicht in Adenokarzinomzellen dieser Organe nachweisbar sind (Aho *et al.,* 2002). Mayerle und Mitarbeiter führten mittels *Northern Blot*-Analyse eine Untersuchung der Expression von p120ctn im Pankreas durch und verglichen dabei die p120ctn-mRNA Expression aus Pankreaskarzinomgewebe und der Expression in normalem Pankreasgewebe. Es zeigte sich eine signifikante Erhöhung der Expression von p120ctn-mRNA in den Tumorgewebeproben (Mayerle *et al,* 2003). In der Literatur wird ein Zusammenhang zwischen der zelltypspezifischen Expression der p120ctn-Isoformen und funktionellen Unterschieden in den Zellen diskutiert. Aho und Mitarbeiter konnten zeigen, dass in Melanomzellen und in Keratinozyten der so genannte *branching phenotype*, eine abnorme Verlängerung von Lamellipodien und Filopodien, durch die Überexpression der p120ctn-Isoformen 1A, 2A und 3A, jedoch nicht durch die kürzeste Isoform 4A, induziert wird (Aho *et al.,* 2002). Die zelluläre Bedeutung dieser morphologischen Veränderung ist bisher nicht bekannt. Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit zeigen, dass in PANC-1

Pankreaskarzinomzellen zwei p120ctn-Isoformen bevorzugt exprimiert werden. Es könnte sich hierbei um die p120ctn-Isoformen 2 und 3 handeln, wie es für die in Epithelzellen bevorzugt exprimierten p120ctn-Isoformen in der Literatur beschrieben wurde (Mo und Reynolds, 1996).

5.3.2 Nachweis der Interaktion von p120ctn mit rekombinantem GST-RhoA und GST-RhoC

Mit Hilfe von *in vitro*-Bindungsexperimenten mit gereinigten GST-Rho-Fusionsproteinen konnte im Rahmen dieser Arbeit erstmals gezeigt werden, dass p120ctn-Isoformen mit RhoC interagieren. Die aus den Daten der quantitativen Auswertung der Immunblots mittels Densitometrie ermittelten Bindungsfaktoren von p120ctn und GST-Rho sind in Tabelle 15 zusammenfassend dargestellt. Im Verhältnis wurden mit GST-RhoC etwa 40 % mehr p120ctn-Isoformen präzipitiert als mit GST-RhoA. Es wurden drei verschiedene p120ctn-Isoformen präzipitiert. Die Proteinbanden von ca. 116, 100 und 97 kDa könnten den p120ctn-Isoformen 1, 2 und 3 entsprechen. In der Literatur wurde eine Interaktion von p120ctn mit RhoC bisher nicht beschrieben. Für das GEF XPLN konnten Arthur und Mitarbeiter zeigen, dass es *in vitro* den Guaninnukleotidaustausch von RhoA und RhoB, jedoch nicht von RhoC induziert. Dieser Unterschied wird durch die unterschiedliche Aminosäure an Position 43 der drei Rho-GTPasen begründet. Bei RhoA und RhoB ist an dieser Position ein Valin, bei RhoC ist es ein Isoleucin (Arthur *et al.*, 2002). Wie die Ergebnisse der *in vitro*-Bindungsexperimente mit der Chimäre GST-RhoC/A zeigten, sind die neun Aminosäuren am carboxy-terminalen Ende von GST-RhoC, die in der Chimäre GST-RhoC/A durch die korrespondierenden Aminosäuren von RhoA ersetzt wurden, für die unterschiedliche Interaktion der beiden Rho-Isoformen mit p120ctn-Isoformen nicht verantwortlich. GST-RhoC/A verhielt sich bei der Interaktion mit p120ctn vergleichbar mit GST-RhoC. Die mit den GST-RhoC-Mutanten (I43V), (Q123N), (R140K), (S141P), (S152G), (L157M) und (E165D) durchgeführten *in vitro*-Bindungsexperimente zeigten ein interessantes Ergebnis. Es wurde festgestellt, dass mit der RhoC-Mutante (S152G) weniger p120ctn-Isoformen präzipitiert wurden, als mit wildtypischem GST-RhoC bzw. mit einer der anderen sechs RhoC-Mutanten. Die Mengen p120ctn-Isoformen, die mit der Mutante GST-RhoC (S152G) interagierten, wurden auf das Niveau der Mengen p120ctn-Isoformen, die mit wildtypischem GST-RhoA interagierten, reduziert. Der Austausch von Serin gegen Glycin an Position 152 hat einen inhibierenden Einfluss auf die Interaktion von GST-RhoC (S152G) mit p120ctn. Bei

der Chimäre GST-RhoC/A führte der Austausch der Aminosäure Serin an Position 152 zu einem Glycin ebenfalls zu einer deutlich verminderten Interaktion mit p120ctn-Isoformen. Vergleichende Analysen mit den Mutanten GST-RhoA (G152S) und GST-RhoC (S152G) zeigten, dass durch den Austausch an Position 152 zu einem Serin wie in GST-RhoC, die Interaktion von GST-RhoA zu p120ctn gesteigert werden konnte. Mit der Mutante GST-RhoA (G152S) konnte ähnlich viel p120ctn wie mit GST-RhoC präzipitiert werden. Die Ergebnisse der *in vitro*-Bindungsexperimente sprechen dafür, dass der Unterschied in der Interaktion von p120ctn mit den beiden Rho-GTPasen GST-RhoA und GST-RhoC in der Aminosäure an Position 152 begründet ist. Serin ist eine ungeladene, hydrophile Aminosäure mit einer polaren Gruppe (-OH) in der Seitenkette, die eine Wasserstoff-Brückenbindung eingehen kann. Glycin ist nicht polar und nimmt nicht an hydrophoben Wechselwirkungen teil (Karlson *et al.*, 1994). Möglicherweise ist das unterschiedliche Interaktionsverhalten von RhoA und RhoC mit p120ctn in der Ausbildung einer zusätzlichen Wasserstoff-Brückenbindung zwischen RhoC und p120ctn begründet.

In der Literatur beschreiben nur Magie und Mitarbeiter die Interaktionsdomäne bei Rho1 für p120ctn (Magie *et al.*, 2002). Diese entspricht einer bei Ihara und Mitarbeitern beschriebenen Region zwischen der switch I- und der switch II-Domäne (AS 39-60) (Ihara *et al.*, 1998). Dvorsky und Ahmadian geben eine vergleichende Zusammenstellung der Interaktionsdomänen von RhoA, Rac1 und Cdc42 für GDIs, GEFs, GAPs und Effektorproteine an. Es zeigt sich, dass die Interaktionspartner der Rho-GTPasen unabhängig von ihrer Funktion mit konservierten Aminosäureresten der switch I- (AS 29-42) und der switch II-Domäne (AS 62-68) interagieren. Für den Bereich um die Aminosäureposition 152 sind keine Interaktionspartner beschrieben (Dvorsky und Ahmadian, 2004). Als Interaktionsdomäne beim p120ctn-Protein geben Castaño und Mitarbeiter an, dass RhoA mit der amino-terminalen regulatorischen Domäne von p120ctn (AS 45-347) interagiert (Castaño *et al.*, 2007). Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurde die Interaktionsdomäne von p120ctn mit GST-RhoC und GST-RhoA nicht analysiert. Die Daten der vorliegenden Arbeit belegen eindeutig, dass das Serin an Position 152 von RhoC an der Interaktion mit p120ctn-Isoformen beteiligt ist.

Tabelle 15: Auswertung der GST-Rho-p120ctn *in vitro*-Bindungsexperimente

	Bindungsfaktor ± SD im Vergleich zu GST-RhoC	**P-Wert***	
GST-RhoC	1		
GST-RhoA	0,6 ± 0,12	< 0,0001	n = 12
GST-RhoC/A	0,89 ± 0,06	< 0,0001	n = 5
GST-RhoC (S152G)	0,72 ± 0,07	< 0,0001	n = 6
GST-RhoC/A (S152G)	0,57		n = 2
GST-RhoA (G152S)	0,82 ± 0,13	0,0011	n = 4

* t-Test

5.4 Einfluss von Guaninnukleotiden auf die Interaktion von GST-Rho und p120ctn

Zur weiteren Analyse der unterschiedlichen Interaktion von RhoA und RhoC mit p120ctn-Isoformen aus PANC-1-Zellen wurde untersucht, ob der Aktivitätszustand der beiden Rho-GTPasen einen Einfluss auf die jeweilige Interaktion hat. Hierfür wurden *in vitro*-Bindungsexperimente mit konstitutiv aktiven GST-RhoA- und GST-RhoC- V14 sowie dominant negativen Rho-N19 Mutanten in Anwesenheit von GDP bzw. GTP im Reaktionsgemisch durchgeführt. Im Rahmen dieser Experimente wurde festgestellt, dass durch den Aktivitätszustand der Rho-GTPase die Interaktion mit p120ctn-Isoformen nicht beeinflusst wird. Magie und Mitarbeiter konnten in GST-*pulldown*-Experimenten zeigen, dass p120ctn vorwiegend mit der inaktiven, GDP-gebundenen Form von Rho1, dem Homolog zu humanen RhoA in *Drosophila*, interagiert. Für diese Experimente wurden p120ctn *in vitro* translatiert und rekombinantes, in *E. coli* exprimiertes GST-Rho1 verwendet (Magie *et al.*, 2002). Die Daten von Magie und Mitarbeiter werden durch Ergebnisse von Anastasiadis und Mitarbeiter unterstützt, wonach p120ctn RhoA im inaktiven, GDP-gebundenen Zustand im Zytoplasma lokalisiert hält und den Austausch von GDP zu GTP verhindert (Anastasiadis *et al.*, 2000). Es wurde mit aus Sf9-Insektenzellen gereinigten Proteinen gezeigt, dass p120ctn den durch das GEF Lbc stimulierten Nukleotidaustausch an RhoA verhindert und p120ctn somit die Funktion eines RhoGDIs zugeschrieben werden kann. Die bevorzugte Interaktion von p120ctn mit GST-Rho-GDP, die die Arbeitsgruppen von Magie sowie Anastasiadis beschreiben, konnte in der vorliegenden Arbeit nicht gezeigt werden. Mögliche Gründe für

die unterschiedliche Interaktion der Rho-Proteine mit p120ctn in Bezug auf ihren Aktivitätszustand müssten in weiteren Experimenten analysiert werden.

In weiterer Folge der vorliegenden Arbeit wurde mittels *in vitro*-Bindungsexperimenten analysiert, ob die Region um die Nukleotid-Bindungsstelle von RhoA und RhoC an der Interaktion mit p120ctn beteiligt ist. Hierzu wurden GST-Rho-Fusionsproteine verwendet, die mittels einer ADP-Ribosyltransferase von *Clostridium limosum* ADP-ribosyliert wurden. Die ADP-Ribosyltransferase überträgt die aus der Hydrolyse von NAD hervorgehende ADP-Ribose-Untereinheit auf einen Asparaginrest an Position 41 in der *switch* I-Region der Rho-GTPase. Die Rho-GTPase wird dadurch funktionell inaktiviert und verbleibt im GDP-gebundenen Zustand (Holbourn *et al.*, 2006). Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit zeigen, dass p120ctn-Isoformen aus PANC-1-Zellen ungeachtet der Bindung der ADP-Ribose-Untereinheit an Position 41 der Rho-GTPasen mit RhoA und RhoC interagiert. Diese Ergebnisse lassen ebenfalls den Schluss zu, dass die Region um die Nukleotid-Bindungsstelle der Rho-GTPase nicht an der Bindung mit p120ctn beteiligt ist und stehen im Einklang mit den Daten aus den Analysen der Interaktion von p120ctn mit RhoA bzw. RhoC unter Berücksichtigung des Aktivitätszustandes der Rho-GTPasen. Des Weiteren kann aus diesen Ergebnissen geschlossen werden, dass p120ctn in einem anderen Bereich als der *switch* I-Region, die für die Interaktion mit Effektoren, GEFs, GDIs und GAPs verantwortlich ist (Dvorsky und Ahmadian, 2004), an die beiden Rho-GTPasen bindet. Nach den in der vorliegenden Arbeit erzielten Ergebnissen beinhaltet die Bindungsregion der Rho-GTPase die Aminosäure Serin an Postition 152. Magie und Mitarbeiter beschreiben hingegen für Rho1, dass p120ctn bevorzugt in der Region zwischen der *switch* I- und der *switch* II- Region bindet (Magie *et al.*, 2002). Dvorsky und Ahmadian beschreiben für diesen Bereich Kontaktstellen für GDIs, GEFs, GAPs und Effektoren von RhoA. RhoC wurde in dieser Studie nicht berücksichtigt (Dvorsky und Ahmadian, 2004).

Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit zeigen erstmals, dass p120ctn-Isoformen unabhängig vom gebundenen Nukleotid mit RhoA und RhoC interagieren. Des Weiteren wurde erstmals gezeigt, dass der Bereich um die Aminosäure 152 von RhoA und RhoC an der Interaktion mit p120ctn beteiligt ist. Die Position 152 liegt zwischen der α-Helix A4 und der β-Faltblattstruktur B6 (Dvorsky und Ahmadian, 2004). Für diesen Bereich sind bisher keine Kontaktstellen für Interaktionspartner beschrieben worden.

5.5 Interaktion von p120ctn mit EGFP-RhoC in EGFP-RhoC-exprimierenden PANC-1-Zellen

Mit Hilfe der *in vitro*-Bindungsexperimente unter Verwendung von gereinigten, rekombinanten GST-RhoA- sowie GST-RhoC-Fusionsproteinen und PANC-1-Zelllysaten konnte p120ctn als RhoC-spezifischer Interaktionspartner identifiziert werden. In weiteren *in vitro*-Bindungsexperimenten konnte gezeigt werden, dass mit gereinigten, rekombinanten GST-mp120ctn 1N-Fusionsproteinen EGFP-RhoC aus EGFP-RhoC-exprimierenden PANC-1-Zellen präzipitiert werden konnte. Darüber hinaus konnten p120ctn-Isoformen im zellulären Proteinkomplex mit EGFP-RhoC durch Co-Immunpräzipitation in PANC-1-Zellen nachgewiesen werden. Bei beiden Experimenten mussten relativ große Menge, etwa 8 mg Protein aus Gesamtzelllysaten eingesetzt werden, um eine Bindung nachweisen zu können. Diese Ergebnisse deuten darauf hin, dass es sich unter den gewählten Versuchsbedingungen bei der Interaktion von p120ctn und RhoC um eine Interaktion von geringer Affinität handelt. Der zelluläre Komplex von p120ctn-Isoformen und EGFP-RhoA und eine Präzipitation von EGFP-RhoA durch GST-mp120ctn 1N waren unter vergleichbaren Bedingungen kaum nachweisbar. Ob die Interaktion von p120ctn und RhoC in PANC-1-Zellen direkt oder indirekt über andere Bindungspartner erfolgt, müsste in weiterführenden Experimenten geklärt werden. Als Versuchsansatz wäre der Nachweis der direkten Interaktion mit gereinigten, rekombinanten Fusionsproteinen denkbar. Dazu könnte in *E. coli* exprimiertes GST-p120ctn aus dem bakteriellen Lysat mittels eines anti-p120ctn-Antikörpers immunpräzipitiert und die Interaktion mit rekombinantem GST-Rho in *in vitro*-Präzipitationsexperimenten bestimmt werden. Zur Analyse von Interaktionspartnern, die die indirekte Interaktion zwischen p120ctn und Rho katalysieren, könnten in Co-Immunpräzipitationsexperimenten mit einem anti-Rho-Antikörper oder einem anti-p120ctn-Antikörper Bindungsproteine präzipitiert und durch massenspektometrische Analysen identifiziert werden. Magie und Mitarbeiter verwendeten für den Nachweis der direkten Interaktion von Rho1 und p120ctn gereinigte, bakteriell exprimierte GST-Rho1- und His-p120ctn-Fusionsproteine. Außerdem konnte *in vivo* p120ctn im Komplex mit Rho1 aus Lysaten von *Drosophila*-Embryonen co-immunpräzipitiert werden (Magie *et al.*, 2002). Neben der direkten Interaktion von p120ctn mit RhoA konnten Noren und Mitarbeiter mittels Co-Immunpräzipitationsexperimenten in HEK293 Nierenepithelzellen die Interaktion von p120ctn mit Vav2, einem Rho-GEF, das bei RhoA, Cdc42 und Rac1 aktiv ist, feststellen.

Diese Daten sprechen dafür, dass p120ctn direkt mit RhoA und indirekt über Vav2 mit Rac1 und Cdc42 interagiert (Noren *et al.*, 2000).

5.6 Einfluss von p120ctn auf die RhoA-, RhoC- und Rac1-Aktivität

Die Analysen zur unterschiedlichen Interaktion von RhoA und RhoC mit p120ctn-Isoformen zeigten, dass das gebundene Guaninnukleotid und damit der Aktivitätszustand der Rho-GTPasen keinen Einfluss auf die Interaktion mit p120ctn-Isoformen haben. In Anbetracht der Tatsache, dass p120ctn die Aktivität von RhoA, Rac1 und Cdc42 modulieren kann (Grosheva *et al.*, 2001), wurde im Rahmen der vorliegenden Arbeit untersucht, ob die Interaktion mit p120ctn einen Einfluss auf die Aktivität von RhoA und RhoC hat. In Rho-GTP-Bindungsexperimenten konnte gezeigt werden, dass die Aktivität von EGFP-RhoA und EGFP-RhoC bei gleichzeitiger Expression von EGFP-p120ctn 1A in co-transfizierten PANC-1-Zellen vermindert wurde. Des Weiteren wurde gezeigt, dass die Aktivität von EGFP-RhoC bei gleichzeitiger Expression von EGFP-p120ctn 2A sowie 4A in co-transfizierten PANC-1-Zellen leicht vermindert und durch EGFP-p120ctn 3A leicht erhöht wurde. In weiterer Folge wurde untersucht, ob p120ctn einen aktivierenden Einfluss auf Rac1 hat. Im Rahmen dieser Experimente konnte gezeigt werden, dass die Aktivität von EGFP-Rac1 bei gleichzeitiger Expression von EGFP-p120ctn 1A in co-transfizierten PANC-1-Zellen nicht beeinflusst wird. In der Literatur wurde von mehreren Arbeitsgruppen eine Verminderung der Aktivität von RhoA durch p120ctn beschrieben. Eine Angabe, welche p120-Isoformen für die beschriebenen Experimenten verwendet wurden, wurde nicht gemacht (Anastasiadis *et al.*, 2000; Grosheva *et al.*, 2001). Anastasiadis und Mitarbeiter untersuchten in Transfektions-Experimenten, ob die Überexpression von p120ctn die Aktivierung von RhoA beeinflusst. In den dargestellten Experimenten wurden HEK293T-Zellen mit p120ctn transient transfiziert und Rho-GTP-Bindungsstudien durchgeführt. Es wurde eine signifikante, 50 %ige Reduktion von LPA-stimuliertem RhoA-GTP bei Überexpression von p120ctn beobachtet (Anastasiadis *et al.*, 2000). Auf zellulärer Ebene wurde in Zusammenhang mit dem Einfluss von p120ctn auf die Aktivität von RhoA von Grosheva und Mitarbeitern eine Veränderung der Zellmorphologie beschrieben. Nach transienter Transfektion von SV80- und CHO-Zellen mit GFP-p120ctn zeigten die Ergebnisse der Immunfluoreszenzanalysen, dass die Überexpression von p120ctn in diesen Zellen zur vermehrten Bildung von Filopodien und Lamellipodien

sowie zur Reduktion von fokalen Kontakten führt. Diese Beobachtungen werden auf eine p120ctn-induzierte Inhibierung von RhoA sowie eine Aktivierung von Rac1 und Cdc42 zurückgeführt und konnten mit GTPase-spezifischen Aktivitäts-Assays bestätigt werden (Grosheva *et al.*, 2001). Eine Beeinflussung der Aktivitäten von Rac1 und von RhoA in PANC-1 Pankreaskarzinomzellen unter dem Einfluss von p120ctn-Isoformen wurden in den in der vorliegenden Arbeit beschriebenen Rho-GTP- bzw. Rac1-GTP-Bindungsexperimenten nicht beobachtet. Cozzolino und Mitarbeiter konnten Unterschiede im Einfluss von p120ctn auf die Aktivität von RhoA in Epithelzellen bzw. in Fibroblasten feststellen. In murinen, mit p120ctn-infizierten Keratinozyten konnte eine Zunahme der Aktivität von RhoA, jedoch kein Einfluss auf die Aktivität von Rac1 durch die Überexpression von p120ctn festgestellt werden. In murinen, mit p120ctn-infizierten NIH3T3 Fibroblasten wurde eine Zunahme der Rac1-Aktivität und eine Verminderung der RhoA-Aktivität festgestellt. Der Einfluss von p120ctn auf die Aktivität der Rho-GTPasen stellte sich in dieser Studie als vom Zelltyp abhängig dar (Cozzolino *et al.*, 2003).

In der vorliegenden Arbeit wurde in weiteren Rho-GTP-Bindungsexperimenten kein Einfluss auf die Aktivität von EGFP-RhoA und EGFP-RhoC in PANC-1-Zellen festgestellt, wenn die Expression von p120ctn-Isoformen durch die Transfektion von p120ctn-siRNA-Oligonukleotiden gehemmt wurde. Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit zeigen somit, dass die Überexpression einzelner EGFP-p120ctn-Isoformen die Aktivität von EGFP-RhoA und EGFP-RhoC in PANC-1-Zellen beeinflusst, die Aktivität von Rac1 jedoch nicht verändert wird.

5.7 Expression von E-Cadherin und N-Cadherin in PANC-1-Zellen

p120ctn stabilisiert durch die Bindung an den zytoplasmatischen Teil von E-Cadherin den Cadherin-Catenin-Komplex an der Plasmamembran und ist an der Regulation der Zell-Zell-Adhäsion beteiligt (Yanagisawa und Anastasiadis, 2006). Für Metastasen-bildende Tumore ist die verminderte Expression von E-Cadherin beschrieben (Reynolds und Carnahan, 2004). In diesen Zellen ist p120ctn vorwiegend im Zytoplasma lokalisiert, wo es zur Interaktion von p120ctn mit Rho-GTPasen kommt, was die Zellmotilität fördern kann (Reynolds und Carnahan, 2004). Die Ergebnisse der Untersuchungen der vorliegenden Arbeit zur Proteinexpression von E-Cadherin und N-Cadherin in EGFP-RhoA- und EGFP-RhoC-

exprimierenden PANC-1-Zellen zeigen, dass EGFP-RhoC-Zellen einen deutlich geringeren Gehalt an E-Cadherin als EGFP-RhoA-Zellen aufweisen. Für N-Cadherin verhält es sich genau umgekehrt. In EGFP-RhoA-Zellen war weniger N-Cadherin nachweisbar als in EGFP-RhoC-Zellen. Der Proteingehalt an α-Catenin und β-Catenin, die beide Bestandteile des E-Cadherin-Catenin-Komplexes sind, ist in EGFP-RhoC-Zellen geringer verglichen mit dem Proteingehalt in EGFP-RhoA-Zellen. Zusammenfassend zeigen die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit somit einen geringeren Proteingehalt von E-Cadherin, α-Catenin und β-Catenin in EGFP-RhoC-exprimierenden Zellen, was zu einer Destabilisierung der Zell-Zell-Adhäsion in diesen Zellen führen könnte. Für invasive Karzinomzellen wurde eine Veränderung vom epithelialen zum mesenchymalen Phänotyp durch die Reduktion der E-Cadherin- und der Zunahme der N-Cadherin-Expression beschrieben (Nakajima *et al.*, 2004; Christiansen und Rajasekaran, 2006). Dass in EGFP-RhoC-exprimierenden PANC-1-Zellen mehr N-Cadherin als E-Cadherin nachgewiesen werden konnte, könnte auf eine solche Veränderung hindeuten. Mayerle und Mitarbeiter konnten im Tumorgewebe des Pankreas eine erhöhte Expression der p120ctn-mRNA mittels *Northern Blot*-Analyse zeigen. Die immunzytochemischen Untersuchungen von normalem Pankreasgewebe und Tumorgewebe zeigen eine vermehrte Lokalisation von p120ctn im Zytoplasma (Mayerle *et al.*, 2003). Es wäre denkbar, dass durch die Überexpression von RhoC, wie sie in EGFP-RhoC-exprimierenden PANC-1-Zellen gegeben ist, p120ctn vermehrt im Zytoplasma lokalisiert ist und es dadurch zu einer Destabilisierung und Reduktion der E-Cadherin-Moleküle an der Plasmamembran kommt. Diese Hypothese und ein Zusammenhang zwischen der Lokalisation von p120ctn und der E-Cadherin-Expression bzw. der Stabilität der Adhhäsionskomplexe muss in weiteren Analysen aufgeklärt werden.

Zusammenfassend zeigen die Ergebnisse dieser Arbeit erstmals die Interaktion von RhoC und p120ctn-Isoformen *in vitro* und in PANC-1-Pankreaskarzinomzellen, die deutlich stärker ist als die Interaktion von RhoA mit p120ctn-Isoformen aus PANC-1-Zellen. Die vorliegenden Daten belegen eine Beteiligung des Serinrestes an Position 152 von RhoC an dieser Interaktion und dieser Aminosäurerest scheint die unterschiedliche Interaktion von RhoA und RhoC mit p120ctn-Isoformen zu begründen. Ob es sich um eine direkte oder indirekte Interaktion zwischen RhoC und p120ctn-Isoformen handelt, muss in weiteren Experimenten geklärt werden. Die Erkenntnisse der vorliegenden Arbeit können für ein besseres Verständnis der Rolle der Interaktion von RhoC und p120ctn in Tumorzellen von Bedeutung sein.

6. Zusammenfassung

Rho-GTPasen sind Mitglieder der Ras-Superfamilie monomerer GTP-bindender Proteine, die zwischen einem aktiven, GTP-gebundenen Zustand und einem inaktiven, GDP-gebundenen Zustand wechseln. In der vorliegenden Arbeit wurden die beiden Rho-GTPasen RhoA und RhoC, die auf Aminosäureebene eine Sequenzidentität von 92 % aufweisen, mit dem Ziel vergleichend charakterisiert, mögliche differentiell bindende Interaktionspartner der beiden Rho-GTPasen zu identifizieren. In PANC-1-Pankreaskarzinomzellen konnte erstmals die Expression der bekannten Rho-Interaktionspartner RhoGDIα und RhoGDIβ in der löslichen Fraktion der Zelllysate von EGFP-, EGFP-RhoA- und EGFP-RhoC-exprimierenden PANC-1-Zellen mittels Immunblotanalyse nachgewiesen werden. Darüber hinaus wurde durch Co-Immunpräzipitation die bisher noch nicht gezeigte Interaktion von EGFP-RhoC mit RhoGDIα bzw. RhoGDIβ dargestellt. Diese Interaktion unterscheidet sich in Co-Immunpräzipitationsexperimenten und in *in vitro*-Bindungsstudien nicht von der Interaktion von EGFP-RhoA mit RhoGDIα bzw. RhoGDIβ.

In weiteren Untersuchungen bezüglich unterschiedlicher Interaktionspartner von RhoA und RhoC konnte eine Interaktion sowohl von RhoA als auch erstmalig von RhoC mit Mitgliedern der *armadillo-repeat*-Proteinfamilie p120ctn festgestellt werden. p120ctn-Isoformen konnten in Gesamtzelllysaten von EGFP-, EGFP-RhoA- und EGFP-RhoC-exprimierenden PANC-1-Zellen gleichermaßen mittels Immunblotverfahren nachgewiesen werden. In *in vitro*-Bindungsexperimenten mit rekombinanten, in *E. coli* exprimierten, gereinigten GST-RhoA- und GST-RhoC-Fusionsproteinen konnte eine differentielle Interaktion der beiden Rho-GTPasen mit p120ctn-Isoformen gezeigt werden. In diesen Experimenten zeigte sich, dass mit GST-RhoC etwa 40 % mehr p120ctn-Isoformen als mit GST-RhoA aus PANC-1-Zelllysaten präzipitiert werden konnten. Somit wurde in der vorliegenden Arbeit zum ersten Mal die Interaktion von p120ctn-Isoformen mit RhoC in PANC-1-Zellen nachgewiesen. In weiterführenden *in vitro*-Bindungsexperimenten mit GST-RhoC-Mutanten wurde bei RhoC ein Serinrest in Position 152 als bedeutsam für die Interaktion mit p120ctn-Isoformen identifiziert. Die vorliegenden Daten belegen eindeutig, dass diese Aminosäure an der differentiellen Interaktion von RhoC, im Vergleich zu RhoA, mit p120ctn-Isoformen beteiligt ist.

Neben der Interaktion der Rho-GTPasen mit p120ctn *in vitro*, konnte in Co-Immunpräzipitationsstudien der zelluläre Proteinkomplex bestehend aus EGFP-RhoC/p120ctn in EGFP-RhoC-exprimierenden PANC-1-Zellen nachgewiesen werden. Mit Hilfe von *in vitro*-Bindungsexperimenten mit konstitutiv aktiven GST-RhoA- und GST-RhoC- V14 sowie

dominant negativen Rho-N19 Mutanten wurde außerdem gezeigt, dass der Aktivitätszustand der Rho-GTPase keinen Einfluss auf die Interaktion mit p120ctn-Isoformen hat. Durch die ADP-Ribosylierung eines Aminosäurerestes in der GTP-Bindungsregion von GST-RhoA- bzw. GST-RhoC-Proteinen wurde in *in vitro*-Bindungsexperimenten ebenfalls kein Einfluss dieser Region auf die Interaktion mit p120ctn festgestellt.

In der vorliegenden Arbeit wurde ferner untersucht, ob die Interaktion mit p120ctn-Isoformen die Aktivität von RhoA, RhoC bzw. Rac1 beeinflusst. In Rho-GTP-Bindungsexperimenten mit Zelllysaten von mit pEGFP-RhoA bzw. pEGFP-RhoC und pEGFP-p120ctn-Isoformen co-transfizierten PANC-1-Zellen wurde gezeigt, dass die Überexpression einzelner EGFP-p120ctn-Isoformen die Aktivität von EGFP-RhoA bzw. EGFP-RhoC schwach beeinflusst. Die Inhibition der Expression von p120ctn-Isoformen durch das Einbringen von p120ctn-siRNA führte hingegen zu keiner Beeinflussung der Aktivität von EGFP-RhoA und EGFP-RhoC in PANC-1-Zellen. Mit Hilfe von Rac1-GTP-Bindungsexperimenten konnte gezeigt werden, dass die Überexpression von EGFP-p120ctn 1A keinen Einfluss auf die Aktivität von EGFP-Rac1 in PANC-1-Zellen hat.

Zusammenfassend wurde in der vorliegenden Arbeit somit zum ersten Mal die Interaktion zwischen der Rho-GTPase RhoC und p120ctn-Isoformen gezeigt und die unterschiedliche Aminosäure in Position 152 bei RhoA und RhoC konnte als jene identifiziert werden, die den Unterschied bei der Interaktion mit p120ctn maßgeblich begründet.

Abstract

Rho GTPases are members of the Ras superfamily of monomeric GTP-binding proteins which cycle between an active GTP-bound and an inactive GDP-bound state. In the present study RhoA and RhoC, which exhibit 92 % amino acid identity, were characterised comparatively. The aim was to identify interaction partners that bind differentially to both Rho GTPases. Immunoblot analysis showed for the first time the expression of RhoGDIα and RhoGDIβ, which are already known interaction partners of Rho GTPases, in the soluble fraction of EGFP-, EGFP-RhoA-, and EGFP-RhoC expressing PANC-1 cells. Furthermore, the interaction of EGFP-RhoC with RhoGDIα and RhoGDIβ was demonstrated for the first time in coimmunoprecipitation experiments. *In vitro* binding studies and coimmunoprecipitation experiments revealed no differences in the interaction of EGFP-RhoA or EGFP-RhoC, respectively, with RhoGDIα and RhoGDIβ.

Further analyses revealed an interaction of RhoA and for the first time of RhoC with members of the *armadillo-repeat* protein family p120ctn. p120ctn isoforms were equally detected in cell lysates of EGFP-RhoA- and EGFP-RhoC expressing PANC-1 cells by immunoblot analysis. By using purified, recombinant, bacterially expressed GST-RhoA- and GST-RhoC fusion proteins in *in vitro* binding experiments a differential interaction of RhoA and RhoC with p120ctn isoforms could be demonstrated. In these experiments, approximately 40 % more of p120ctn isoforms were precipitated with GST-RhoC than with GST-RhoA from cell lysates of PANC-1 cells. Thus, within the present study the interaction of p120ctn isoforms with RhoC in PANC-1 cells was demonstrated for the first time. Furthermore, additional *in vitro* binding experiments with GST-RhoC mutants led to the identification of the serine residue in position 152 of the RhoC amino acid sequence as important for the interaction of RhoC and p120ctn isoforms. The presented results clearly established that this amino acid is important for the differential interaction of RhoC with p120ctn isoforms compared to RhoA. Besides the interaction of Rho GTPases with p120ctn *in vitro*, the cellular complex of EGFP-RhoC and p120ctn was demonstrated in EGFP-RhoC expressing PANC-1 cells by coimmunoprecipitation. By using constitutive active mutants (V14) and dominant negative mutants (N19) of GST-RhoA and GST-RhoC proteins in *in vitro* binding experiments it was shown that the activity state of the Rho GTPases had no influence to the interaction with p120ctn isoforms. Moreover, the ADP-ribosylation of an amino acid residue in the GTP binding region of GST-RhoA and GST-RhoC proteins also did not influence the interaction with p120ctn isoforms, as analysed by *in vitro* binding experiments.

In addition, the influence of forced expression of p120ctn isoforms on the activity of RhoA, RhoC and Rac1 was investigated in the present study. Rho-GTP binding experiments with PANC-1 cells which had been cotransfected with pEGFP-RhoA or pEGFP-RhoC and pEGFP-p120ctn isoforms revealed that the forced expression of some EGFP-p120ctn isoforms marginally influenced the activity of EGFP-RhoA and EGFP-RhoC. However, inhibition of the expression of p120ctn isoforms through p120ctn siRNAs showed no influence on the activity of EGFP-RhoA and EGFP-RhoC in PANC-1 cells. By performing Rac1-GTP binding experiments it was demonstrated that forced expression of EGFP-p120ctn 1A had no influence on the activity of EGFP-Rac1 in PANC-1 cells.

In summary, the present study demonstrated for the first time an interaction between the Rho GTPase RhoC and p120ctn isoforms. The different amino acids of RhoA and RhoC in position 152 were identified as important amino acids in causing the differential interaction of these two GTPases with p120ctn isoforms.

7. Literaturverzeichnis

Abe K. und Takeichi M. (2008): EPLIN mediates linkage of the cadherin-catenin complex to F-actin and stabilizes the circumferential actin belt. *PNAS* **105**(1): 13-19

Aberle H., Schwartz H., Kemler R. (1996): Cadherin-catenin complex: protein interactions and their implications for cadherin function. *J. Cell. Biochem*. **61**: 514-523

Abo A., Pick E., Hall A., Totty N., Teahan C.G., Segal A.W. (1991): Activation of the NADPH oxidase involves the small GTP-binding protein $p21^{rac1}$. *Nature* **353**: 668-670

Adamson P., Marshall C.J., Hall A., Tilbrook P.A. (1992): Post-translational modifications of $p21^{rho}$ proteins. *J. Biol. Chem*. **267**(28): 20033-20038

Adra C.N., Manor D., Ko J.L., Zhu S., Horiuchi T., Van Aelst L., Cerione R.A., Lim B. (1997): RhoGDIγ: A GDP-dissociation inhibitor for Rho proteins with preferential expression in brain and pancreas. *Proc. Natl. Acad. Sci*. **94**: 4279-4284

Aho S., Rothenberger K., Uitto J. (1999): Human $p120^{ctn}$ catenin: tissue-specific expression of isoforms and molecular interactions with BP180/type XVII collagen. *J. Cell. Biochem*. **73**: 390-399

Aho S., Levänsuo L., Monotonen O., Kari C., Rodeck U., Uitto J. (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*. **115**: 1391-1402

Aktories K., Wilde C., Vogelsgesang M. (2004): Rho-modifying C3-like ADP-ribosyltransferases. *Rev. Physiol. Biochem. Pharmacol*. **152**: 1-22

Anastasiadis P.Z. und Reynolds A.B. (2000): The p120 catenin family: complex roles in adhesion, signaling and cancer. *J. Cell Sci*. **113**: 1319-1334

Anastasiadis P.Z., Moon S.Y., Thoreson M.A., Mariner D.J., Crawford H.C., Zheng Y., Reynolds A.B. (2000): Inhibition of RhoA by p120 catenin. *Nat. Cell. Biol*. **2**: 637-644

Anastasiadis P.Z. und Reynolds A.B. (2001): Regulation of Rho GTPases by p120-catenin. *Curr. Opin. Cell Biol.* **13** (5): 604-610

Aoki K., Yoshida T., Matsumoto N., Ide H., Sugimura T., Terada M. (1997): Suppression of Ki-ras p21 levels leading to growth inhibition of pancreatic cancer cell lines with Ki-ras mutation but not those without Ki-ras mutation. *Mol. Carcinog.* **20**(2): 251-258

Aspenström P. (1999): The Rho GTPases have multiple effects on the actin cytoskeleton. *Exp. Cell Res.* **246**: 20-25

Arthur W.T., Ellerbroek S.M., Der C.J., Burridge K., Wennerberg K. (2002): XPLN, a guanine nucleotide exchange factor for RhoA and RhoB, but not RhoC. *J. Biol. Chem*. **277**(45): 42964-42972

Bardeesy N. und DePinho R.A. (2002): Pancreatic cancer biology and genetics. *Nat. Rev*. **2**: 897-909

Bellovin D.I., Bates R.C., Muzikansky A., Rimm D.L., Mercurio A.M. (2005): Altered localization of p120 catenin during epithelial to mesenchymal transition of colon carcinoma is prognostic for aggressive disease. *Cancer Res*. **65**: 10938-10945

Berrozpe G., Schaeffer J., Peinado M.A., Real F.X., Perucho M. (1994): Comparative analysis of mutations in the p53 and K-ras genes in pancreatic cancer. *Int. J. Cancer*. **58**(2): 185-191

Bishop A.L. und Hall A. (2000): Rho GTPases and their effector proteins. *Biochem. J.* **348:** 241-255

Bonné S., van Hengel J., van Roy F. (1998): Chromosomal mapping of human armadillo genes belonging to the p120(ctn)/plakophilin subfamily. *Genomics* **51**(3): 452-454

Boukharov A.A. und Cohen C.M. (1998): Guanine nucleotide-dependent translocation of RhoA from cytosol to high affinity membrane binding sites in human erythrocytes. *Biochem. J*. **330**: 1391-1398

Bourmeyster N., Boquet P., Vignais P.V. (1994): Role of bound GDP in the stability of the RhoA-Rho GDI complex purified from neutrophil cytosol. *Biochem. Biophys. Res. Comm.* **205**(1): 174-179

Braga V.M.M., Machesky L.M., Hall A., Hotchin N.A. (1997): The small GTPases Rho and Rac are required for the establishment of cadherin-dependent cell-cell contacts. *J. Cell Biol*. **137**(6): 1421-1431

Caldas C., Hahn S.A., Redston M.S., Yeo C.J., Kern S.E. (1994): Detection of K-ras mutations in the stool of patients with pancreatic adenocarcinoma and pancreatic ductal hyperplasia. *Cancer Res.* **54**: 3568-3573

Caron E. und Hall A. (1998): Identification of two distinct mechanisms of phagocytosis controlled by different Rho GTPases. *Science* **282**: 1717-1721

Castaño J., Solanas G., Casagolda D., Raurell I., Villagrasa P., Bustelo X.R., Garcia de Herreros A., Dunach M. (2007): Specific phosphorylation of p120-catenin regulatory domain differntly modulates its binding to RhoA. *Mol. Cell Biol*. **27**(5): 1745-1757

Cerione R.A. und Zheng Y. (1996): The Dbl family of oncogenes. *Curr. Opin. Cell Biol*. **8**: 216-222

Chardin P., Madaule P., Tavitian A. (1988): Coding sequence of human *rho* cDNAs clone 6 and clone 9. *Nucl. Acids Res*. **16**(6): 2717

Cheng L., Mahon G.M., Kostenko E.V., Whitehead I.P. (2004): Pleckstrin homology domain-mediated activation of the Rho-specific guanine nucleotide exchange factor Dbs by Rac1. *J. Biol. Chem*. **279**(13): 12786-12793

Cherfils J. und Chardin P. (1999): GEFs: structural basis for their activation of small GTP-binding proteins. *Trends Biochem. Sci*. **24**(8): 306-311

Christiansen J.J. und Rajasekaran A.K. (2006): Reassessing epithelial to mesenchymal transition as a prerequisite for carcinoma invasion and metastasis. *Cancer Res*. **66**(17): 8319-8326

Clark E.A., Golub T.R., Lander E.S., Hynes R.O. (2000): Genomic analysis of metastasis reveals an essential role for RhoC. *Nature* 406(6795): 532-535

Coso O.A., Chiariello M., Yu J.-C., Teramoto H., Crespo P., Xu N., Miki T., Gutkind J.S. (1995): The Small GTP-binding proteins Rac1 and Cdc42 regulate the activity of the JNK/SAPK signaling pathway. *Cell* **81**: 1137-1146

Cozzolino M., Stagni V., Spinardi L., Campioni N., Fiorentini C., Salvati E., Alemà S., Salvatore A.M. (2003): p120 catenin is required for growth factor-dependent cell motility and scattering in epithelial cells. *Mol. Biol. Cell* **14**: 1964-1977

Daniel J.M und Reynolds A.B. (1999): The catenin p120(ctn) interacts with Kaiso, a novel BTB/POZ domain zinc finger transcription factor. *Mol. Cell. Biol*. **19**: 3614-3623

Daniel J.M. (2007): Dancing in and out of the nucleus: p120ctn and the transcription factor Kaiso. *Biochim. Biophys. Acta* **1773**: 59-68

Davis M.A., Ireton R.C., Reynolds A.B. (2003): A core function for p120-catenin in cadherin turnover. *J. Cell Biol*. **163**(3): 525-534

Day J.D., DiGiuseppe J.A., Yeo C., Lai-Goldman M., Anderson S.M., Goodman S.N., Kern S.E., Hruban R.H. (1996): Immunohistochemical evaluation of HER-2/neu expression in pancreatic adenocarcinoma and pancreatic intraepithelial neoplasms. *Hum. Pathol*. **27**(2): 119-124

DerMardirossian C., Rocklin G., Seo J.-Y., Bokoch G.M. (2006): Phosphorylation of RhoGDI by Src regulates Rho GTPase binding and cytosol-membrane cycling. *Mol. Biol. Cell* **17**: 4760-4768

Dias S.M.G. und Cerione R.A. (2007): X-ray crystal structures reveal two activated states for RhoC. *Biochem*. **46**: 6547-6558

DiGiuseppe J.A., Hruban R.H., Goodman S.N., Polak M., van den Berg F.M., Allison D.C., Cameron J.L., Offerhaus G.J. (1994): Overexpression of p53 protein in adenocarcinoma of the pancreas. *Am. J. Clin. Pathol.* **101**(6): 684-688

Dovas A. und Couchman J.R. (2005): RhoGDI: multiple functions in the regulation of Rho family GTPase activities. *Biochem. J.* **390**: 1-9

Dvorsky R. und Ahmadian M.R. (2004): Always look on the bright site of Rho: structural implications for a conserved intermolecular interface. *EMBO reports* **5**(12): 1130-1136

Elsässer H.P., MacDonald R., Dienst M., Kern H.F. (1993): Characterization of a transglutaminase expressed in human pancreatic adenocarcinoma cells. *Eur. J. Cell. Biol*. **61**(2): 321-328

Etienne-Manneville S. und Hall A. (2002): Rho GTPases in cell biology. *Nature* **420**: 629-635

Feig L.A. (1999): Tools of the trade: use of dominant-inhibitory mutants of Ras-family GTPases. *Nature Cell Biol*. **1**: E25-E27

Felgner P.L., Gadek T.R., Holm M., Roman R., Chan H.W., Wenz M., Northrop J.P., Ringold G.M., Danielsen M. (1987): Lipofection: a highly efficient, lipid-mediated DNA-transfection procedure. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **84:** 7413-7417

Felgner P.L. (1996): Improvements in cationic liposomes for in vivo gene transfer. *Hum. Gene Ther.* **7:** 1791-1793

Fensterer H., Giehl K., Bucholz M., Ellrieder V., Buck A., Kestler H.A., Adler G., Gierschik P., Gress T.M. (2004): Expression profiling of the influence of RAS mutants on the TGFB1-induced phenotype of the pancreatic cancer cell line PANC-1. *Genes Chromosomes Cancer* **39**(3): 224-235

Fiegen D., Blumenstein L., Stege P., Vetter I.R., Ahmadian M. R. (2002): Crystal structure of Rnd3/RhoE: functional implications. *FEBS Letters* **525**: 100-104

Foster R., Hu K.-Q., Lu Y., Nolan K.M., Thissen J., Settleman J. (1996): Identification of a novel human Rho protein with unusual properties: GTPase deficiency and in vivo farnesylation. *Mol. Cell. Biol*. **16**(6): 2689-2699

Fritz G., Just I., Kaina B. (1999): Rho GTPases are over-expressed in human tumors. *Int. J. Cancer* **81**: 682-687

Giehl K., Skripczynski B., Mansard A., Menke A., Gierschik P. (2000): Growth factor-dependent activation of the Ras-Raf-MEK-ERK-MAPK pathway in the human pancreatic carcinoma cell line PANC-1 carrying activated K-ras: implications for cell proliferation and cell migration. *Oncogene* **19:** 2930-2942

Gingras D., Gauthier F., Lamy S., Desrosiers R.R., Béliveau R. (1998): Localization of RhoA GTPase to endothelial caveolae-enriched membrane domains. *Biochem. Biophys. Res. Comm.* **247**: 888-893

Goggins M., Hruban R.H., Kern S.E. (2000): *BRCA2* is inactivated late in the development of pancreatic intraepithelial neoplasia. *Am. J. Path.* **156**(5): 1767-1771

van Golen K.L., Wu Z.-F., Qiao X.T., Bao L.W., Merajver S.D. (2000): RhoC GTPase, a novel transforming oncogene for human mammary epithelial cells that partially recapitulates the inflammatory breast cancer phenotype. *Cancer Res*. **60**: 5832-5838

Gorvel J.-P., Chang T.-C., Boretto J., Azuma T., Chavrier P. (1998): Differential properties of D4/LyGDI versus RhoGDI: phosphorylation and rho GTPase selectivity. *FEBS Lett*. **422**(2): 269-273

Grosheva I., Shtutman M., Elbaum M., Bershadsky A.D. (2001): p120 catenin affects cell motility via modulation of activity of Rho-family GTPases: a link between cell-cell contact formation and regulation of cell locomotion. *J. Cell Sci.* **114**: 695-707

Hall A. (1998): Rho GTPases and the actin cytoskeleton. *Science* **279**: 509-514

Hatzfeld M. und Nachtsheim C. (1996): Cloning and characterization of a new *armadillo* family member, p0071, associated with the junctional plaque: evidence for a subfamily of closely related proteins. *J. Cell Sci.* **109**: 2767-2778

Hatzfeld M. (2005): The p120 family of cell adhesion molecules. *Eur. J. Cell Biol*. **84**: 205-214

van Hengel J., Vanhoenacker P., Staes K., Van Roy F. (1999): Nuclear localization of the $p120^{ctn}$ armadillo-like catenin is counteracted by a nuclear export signal an by E-cadherin expression. *Proc. Natl. Acad. Sci*. **96**: 7980-7985

Hilgers W. und Kern S.E. (1999): Molecular genetic basis of pancreatic adenocarcinoma. *Genes Chrom. Cancer* **26**: 1-12

Hill C.S., Wynne J., Treisman R. (1995): The Rho family GTPases RhoA, Rac1, and CDC42Hs regulates transcriptional activation by SRF. *Cell* **81**: 1159-1170

Hinck L., Näthke I.S., Papkoff J., Nelson W.J. (1994): Dynamics of cadherin/catenin complex formation: novel protein interactions and pathways of complex assembly. *J. Cell Biol*. **125**(6): 1327-1340

Hoffman G.R., Nassar N., Cerione R.A. (2000): Structure of the Rho family GTP-binding protein Cdc42 in complex with the multifunctional regulator RhoGDI. *Cell* **100**: 345-356

Holbourn K. P., Shone C.C., Acharya K.R. (2006): A familiy of killer toxins - Exploring the mechanism of ADP-ribosylating toxins. *FEBS J.* **273**: 4579-4593

Hori Y., Kikuchi A., Isomura M., Katayama M., Miura Y., Fujioka H., Kaibuchi K., Takai Y. (1991): Post-translational modifications of the c-terminal region of the *rho* protein are important for its interaction with membranes and the stimulatory and inhibitory GDP/GTP exchange proteins. *Oncogene* **6**: 515-522

Horiuchi A., Imai T., Wang C., Ohira S., Feng Y., Nikaido T., Konishi I. (2003): Up-regulation of small GTPases, RhoA and RhoC, is associated with tumor progression in ovarian carcinoma. *Lab. Inv*. **83**(6): 861-870

Hruban R.H., van Mansfeld A.D.M., Offerhaus G.J.A., van Weering D.H.J., Allison D.C., Goodman S.N., Kensler T.W., Bose K.K., Cameron J.L., Bos J.L. (1993): K-*ras* oncogene activation in adenocarcinoma of the human pancreas. *Am. J. Path*. **143**(2): 545-554

Hruban R.H., Goggins M., Parsons J., Kern S.E. (2000a): Progression model for pancreatic cancer. *Clin. Cancer Res*. **6**: 2969-2972

Hruban R.H., Wilentz R.E., Kern S.E. (2000b): Genetic progression in the pancreatic ducts. *Am. J. Path*. **156**(6): 1821-1825

Ihara K., Muraguchi S., Kato M., Shimizu T., Shirakawa M., Kuroda S., Kaibuchi K., Hakoshima T. (1998): Crystal structure of human RhoA in a dominantly active form complexed with a GTP analogue. *J. Biol. Chem*. **273**(16): 9656-9666

Illenberger D., Schwald F., Pimmer D., Binder W., Maier G., Dietrich A., Gierschik P. (1998): Stimulation of phospholipase C-β_2 by the Rho GTPases Cdc-42Hs and Rac1. *EMBO J*. **17**: 6241-6249

Ireton R.C., Davis M.A., van Hengel J., Mariner D.J., Barnes K., Thoreson M.A., Anastasiadis P.Z., Matrisian L., Bundy L.M., Sealy L., Gilbert B., van Roy F., Reynolds A.B. (2002): A novel role for p120 catenin in E-cadherin function. *J. Cell Biol*. **159**(3): 465-476

Jaffe A.B. und Hall A. (2002): Rho GTPases in transformation and metastasis. *Adv. Cancer Res*. **65**: 57-80

Jaffe A.B. und Hall A. (2005): Rho GTPases: Biochemistry and Biology. *Annu. Rev. Cell. Dev. Biol*. **21**: 247-269

Jaffee E.M., Hruban R.H., Canto M., Kern S.E. (2002): Focus on pancreas cancer. *Cancer Cell* **2**: 25-28

Jemal A., Siegel R., Ward E., Hao Y., Xu J., Murray T., Thun M.J. (2008): Cancer statistics, 2008. *CA Cancer J. Clin.* **58**(2): 71-96

Jones S., Zhang X., Parsons D.W., Lin J.C.-H., Leary R.J., Angenendt P., Mankoo P., Carter H., Kamiyama H., Jimeno A., Hong S.-M., Fu B., Lin M.-T., Calhoun E.S., Kamiyama M., Walter K., Nikolskaya T., Nikolsky Y., Hartigan J., Smith D.R., Hidalgo M., Leach S.D., Klein A.P., Jaffee E.M., Goggins M., Maitra A., Iacobuzio-Donahue C., Eshleman J.R., Kern S.E., Hruban R.H., Karchin R., Papadopoulos N., Parmigiani G., Vogelstein B., Velculescu V.E., Kinzler K.W. (2008): Core signaling pathways in human pancreatic cancers revealed by global genomic analyses. *Science* **321**: 1801-1806

Joo Y.-E., Rew J.-S., Park C.-S., Kim S.-J. (2002): Expression of E-Cadherin, alpha- and beta-catenins in patients with pancreatic adenocarcinoma. *Pancreatology* **2**: 129-137

Just I., Mohr C., Schallehn G., Menard L., Didsbury J. R., Vandekerckhove J., van Damme J., Aktories K. (1992): Purification and characterization of an ADP-ribosyltransferase produced by *Clostridium limosum*. *J. Biol. Chem.* **267**(15): 10274-10280

Just I., Hofmann F., Genth H., Gerhard R. (2001): Bacterial protein toxins inhibiting low-molecular-mass GTP-binding proteins. *Int. J. Med. Microbiol*. **291**: 243-250

Karlson P., Doenecke D., Koolman J. (1994): Kurzes Lehrbuch der Biochemie für Mediziner und Naturwissenschaftler. 14. neubearb. Auflage, Georg Thieme Verlag Stuttgart

Keirsebilck A., Bonné S., Staes K., van Hengel J., Nollet F., Reynolds A., van Roy F. (1998): Molecular cloning of the human $p120^{ctn}$ Catenin Gene (CTNND1): Expression of multiple alternatively spliced isoforms. *Genomics* **50**: 129-146

Kelly K.F., Spring C.M., Otchere A.A., Daniel J.M. (2004): NLS-dependent nuclear localization of $p120^{ctn}$ is necessary to relieve Kaiso-mediated transcriptional repression. *J. Cell Sci.* **117**: 2675-2686

Kleer C.G., van Golen K.L., Zhang Y., Wu Z.-F., Rubin M.A., Merajver S.D. (2002): Characterization of RhoC expression in benign and malignant breast disease. *Am. J. Path.* **160**: 579-584

Laemmli U.K. (1970): Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* **227:** 680-685

Li D., Xie K., Wolff R., Abbruzzese J.L. (2004): Pancreatic cancer. *The Lancet* **363**: 1049-1057

Lieber M., Mazzetta J., Nelson-Rees W., Kaplan M., Todaro G. (1975): Establishment of a continous tumor-cell line (PANC-1) from a human carcinoma of the exocrine pancreas. *Int. J. Cancer* **15:** 741-747

Lin M., DiVito M.M., Merajver S.D., Boyanapalli M., van Golen K.L. (2005): Regulation of pancreatic cancer cell migration and invasion by RhoC GTPase and Caveolin-1. *Mol. Cancer* **4**(1): 21

Lin R., Bagrodia S., Cerione R., Manor D. (1997): A novel Cdc42Hs mutant induces cellular transformation. *Curr. Biol.* **7**: 794-797

Lowenfels A.B., Maisonneuve P., DiMagno E.P., Elitsur Y., Gates L.K. Jr., Perrault J., Whitcomb D.C., and the International Hereditary Pancreatitis Study Group. (1997): Hereditary pancreatitis and the risk of pancreatic cancer. *J. Natl. Cancer Inst*. **89**(6): 442-446

Mackay D.J.G. und Hall A. (1998): Rho GTPases. *J. Biol. Chem*. **273**(33); 20685-20688

Magie C.R., Pinto-Santini D., Parkhurst S.M. (2002): Rho1 interacts with p120ctn and α-catenin, and regulates cadherin-based adherens junction components in *Drosophila*. *Development* **129**: 3771-3782

Mariner D. J., Anastasiadis P., Keilhack H., Böhmer F.-D., Wang J., Reynolds A.B. (2001): Identification of Src phosphorylation sites in the catenin $p120^{ctn}$. *J. Biol. Chem*. **276**(30): 28006-28013

Mayerle J., Friess H., Büchler M.W., Schnekenburger J., Weiss F.U., Zimmer K.-P., Domschke W., Lerch M.M. (2003) Up-regulation, nuclear import, and tumor growth stimulation of the adhesion protein p120ctn in pancreatic cancer. *Gastroenterology* **124**: 949-960

Michaelson D., Silletti J., Murphy G., D'Eustachio P., Rush M., Philips M.R. (2001): Differential localization of Rho GTPases in live cells: regulation by hypervariable regions and RhoGDI binding. *J. Cell Biol.* **152**: 111-126

Mo Y-Y. und Reynolds A.B. (1996): Identification of Murine $p120^{cas}$ Isoforms and heterogeneous expression of $p120^{cas}$ isoforms in human tumor cell lines. *Cancer Res.* **56**: 2633-2640

Montonen O., Aho M., Uitto J., Aho S. (2001): Tissue distribution and cell type-specific expression of p120ctn isoforms. *J. Histochem. Cytochem*. **49**(12): 1487-1495

Moon S.Y. und Zheng Y. (2003): Rho GTPase-activating proteins in cell regulation. *Trends Cell Biol*. **13**(1), 13-22

Moore P.S., Sipos B., Orlandini S., Sorio C., Real F.X., Lemoine N.R., Gress T., Bassi C., Klöppel G., Kalthoff H., Ungefroren H., Löhr M., Scarpa A. (2001): Genetic profile of 22 pancreatic carcinoma cell lines. Analysis of K-ras, p53, p16 and DPC4/Smad4. *Virchows Arch*. **439**(6): 798-802

Nakajima S., Doi R., Toyoda E., Tsuji S., Wada M., Koizumi M., Tulachan S.S., Ito D., Kami K., Mori T., Kawaguchi Y., Fujimoto K., Hosotani R., Imamura M. (2004): N-cadherin expression and epithelial-mesenchymal transition in pancreatic carcinoma. *Clin. Canc. Res.* **10**: 4125-4133

Niv H., Gutman O., Kloog Y., Henis Y.I. (2002): Activated K-Ras and H-Ras display different interactions with saturable nonraft sites at the surface of live cells. *J. Cell Biol*. **157**(5): 865-872

Nobes C.D.; Hall A. (1995): Rho, Rac, and Cdc42 GTPases regulate the assembly of multimolecular focal complexes associated with actin stress fibers, lamellipodia, and filopodia. *Cell* **81**: 53-62

Nobes C.D., Hall A. (1999): Rho GTPases control polarity, protrusion, and adhesion during cell movement. *J. Cell Biol*. **144**(6): 1235-1244

Noren N.K., Liu B.P., Burridge K., Kreft B. (2000): p120 catenin regulates the actin cytoskeleton via Rho family GTPases. *J. Cell Biol*. **150**: 567-579

Olofsson B. (1999): Rho guanine dissociation inhibitors: pivotal molecules in cellular signalling. *Cell. Signal.* **11**(8): 545-554

Olson M.F., Ashworth A., Hall A. (1995): An essential role for Rho, Rac, and Cdc42 GTPases in cell cycle progression through G1. *Science* **269**(5228): 1270-1272

Ogawa H., Inouye S., Tsuji F.I., Yasuda K., Umesono K. (1995): Localization, trafficking and temperature-dependence of the *Aeqorea* green fluorescent protein in cultured vertebrate cells. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **92**: 11899-11903

Ogden S.R., Wroblewski L.E., Weydig C., Romero-Gallo J., O'Brien D.P., Israel D.A., Krishna U.S., Fingleton B., Reynolds A.B., Wessler S., Peek R.M. Jr. (2008): p120 and Kaiso regulate *Helicobacter pylori*-induced expression of matrix metalloproteinase-7. *Mol. Biol. Cell* **19**: 4110-4121

Paduch M., Jelen F., Otlewski J. (2001): Structure of small G proteins and their regulators. *Acta. Biochim. Pol*. **48**(4): 829-850

Peifer M., Berg S., Reynolds A.B. (1994): A repeating amino acid motif shared by proteins with diverse cellular roles. *Cell* **76**: 789-791

Perona R., Montaner S., Saniger L., Sánchez-Pérez I., Bravo R., Lacal J.C. (1997): Activation of the nuclear factor-κB by Rho, CDC42, and Rac-1 proteins. *Genes Dev.* **11**: 463-475

Prokopenko S.N., Saint R., Bellen H.J. (2000): Untying the gordian knot of cytokinesis: role of small G proteins and their regulators. *J. Cell Biol*. **148**(5): 843-848

Qiu R.-G., Chen J., McCormick F., Symons M. (1995): A role for Rho in Ras transformation. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **92**: 11781-11785

Reynolds A.B., Herbert L., Cleveland J.L., Berg S.T., Gaut J.R. (1992): p120, a novel substrate of protein tyrosine kinase receptors and of p60v-src is related to cadherin-binding factors beta-catenin, plakoglobin and armadillo. *Oncogene* **7**(12): 2439-2345

Reynolds A.B., Daniel J.M., McCrea P.D., Wheelock M.J., Wu J., Zhang Z. (1994): Identification of a new catenin: the tyrosine kinase substrate $p120^{cas}$ associates with E-cadherin complexes. *Mol. Cell Biol.* **14**(12): 8333-8342

Reynolds A.B und Carnahan R.H (2004): Regulation of cadherin stability and turnover by p120ctn: implications in disease and cancer. *Sem. Cell Dev. Biol*. **15**: 657-663

Ridley A.J. und Hall A. (1992): The small GTP-binding protein rho regulates the assembly of focal adhesions and actin stress fibers in response to growth factors. *Cell* **70**(3): 389-399

Ridley A.J. (2000): Rho. In Frontiers in Molecular Biology: GTPases, edited by Alan Hall. Oxford University Press **24**: 89-136

Ridley A.J. (2001): Rho-GTPases and cell migration. *J. Cell Sci*. **114**: 2713-2722

Ridley A.J. (2004): Rho proteins and cancer. *Breast Cancer Res. Treat.* **84**: 13-19

Riggleman B., Wieschaus E., Schedl P. (1989): Molecular analysis of the *armadillo* locus: uniformly distributed transcripts and a protein with novel internal repeats are associated with a *Drosophila* segment polayrity gene. *Genes Dev*. **3**: 96-113

Rivero F., Illenberger D., Somesh B.P., Dislich H., Adam N., Meyer A.-K. (2002): Defects in cytokinesis, actin reorganization and the contractile vacuole in cells deficient in RhoGDI. *EMBO J*. **21**(17): 4539-4549

Roczniak-Ferguson A. und Reynolds A.B. (2003): Regulation of p120-catenin nucleocytoplasmic shuttling activity. *J. Cell Sci*. **116**: 4201-4212

Roura S., Miravet S., Piedra J., de Herreros A.G., Dunach M. (1999): Regulation of E-cadherin/catenin association by tyrosine phosphorylation. *J. Biol. Chem*. **274**(51): 36734-36740

Sahai E. und Marshall C.J. (2002): Rho-GTPases and cancer. *Nature Rev*. **2**: 133-142

Sambrook J., Fritsch, E.F., Maniatis, T. (1989): Molecular cloning: laboratory manual, 2. Edition, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor

Sasaki T., Kato M. und Takai Y. (1993): Consequences of weak interaction of *rho* GDI with the GTP-bound forms of *rho* p21 and *rac* p21. *J. Biol. Chem*. **268**(32): 23959-23963

Sasaki T. und Takai Y. (1998): The Rho small G protein family-Rho GDI system as a temporal and spatial determinant for cytoskeletal control. *Biochem. Biophys. Res. Comm*. **245**: 641-645

Scherle P., Behrens T., Staudt L.M. (1993): Ly-GDI, a GDP-dissociation inhibitor of the RhoA GTP-binding protein is expressed preferentially in lymphocytes. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **90**: 7568-7572

Schmidt A. und Hall A. (2002): Guanine nucleotide exchange factors for Rho GTPases: turning on the switch. *Genes Dev*. **16**: 1587-1609

Schmitz A.A.P., Govek E.-E., Böttner B., Van Aelst L. (2000): Rho GTPases: Signaling, Migration, and Invasion. *Exp. Cell Res.* **261**: 1-12

Seabra M.C. (1998): Membrane association and targeting of prenylated ras-like GTPases. *Cell. Signal*. **10**(3): 167-172

Seidel B., Braeg S., Adler G., Wedlich D., Menke A. (2004): E- and N-cadherin differ with respect to their associated $p120^{ctn}$ isoforms and their ability to suppress invasive growth in pancreatic cancer cells. *Oncogene* **23**: 5532-5542

Shibata T., Kokubu A., Sekine S., Kanai Y., Hirohashi S. (2004): Cytoplasmic p120ctn regulates the invasive phenotypes of E-Cadherin-deficient breast cancer. *Am. J. Path.* **164**: 2269-2278

Shimizu T., Ihara K., Maesaki R., Kuroda S., Kaibuchi K., Hakoshima T. (2000): An open conformation of switch I revealed by the crystal structure of a Mg^{2+}-free form of RhoA complexed with GDP. *J. Biol. Chem.* **275**(24): 18311-18317

Smith P.K., Krohn R.I., Hermanson G.T., Mallia A.K., Gartner F.H., Provenzano E.K., Fujimoto N.M., Olson B.J., Klenk D.C. (1985): Measurement of protein using bicinchoninic acid. *Anal. Biochem.* **150:** 76-85

Sorokina E.M. und Chernoff J. (2005): Rho-GTPases: new members, new pathways. *J. Cell. Biochem.* **94**: 225-231

Sprang S.R. und Coleman D.E. (1998): Invasion of the nucleotide snatchers: structural insights into the mechanism of G protien GEFs. *Cell* **95**: 155-158

Stähle M., Veit C., Bachfischer U., Schierling K., Skripczynski B., Hall A., Gierschik P., Giehl K. (2003): Mechanisms in LPA-induced tumor cell migration: critical role of phosphorylated ERK. *J. Cell Sci.* **116:** 3835-3846

Suwa H., Ohshio G., Imamura T., Watanabe G., Arii S., Imamura M., Narumiya S., Hiai H., Fukumoto M. (1998): Overexpression of the *rhoC* gene correlates with progression of ductal adenocarcinoma of the pancreas. *J Cancer* **77**(1): 147-152

Takahashi K., Sasaki T., Mammoto A., Takaishi K., Kameyama T., Tsukita S., Tsukita S., Takai Y. (1997): Direct interaction of the Rho GDP dissociation inhibitor with ezrin/radixin/moesin initiates the activation of the Rho small G protein. *J. Biol. Chem.* **272**(37): 23371-23375

Takai Y., Sasaki T., Matozaki T. (2001): Small GTP-Binding Proteins. *Physiol. Rev*. **81**(1): 153-208

Takaishi K., Sasaki T., Kameyama T., Tsukita Sa., Tsukita Sh., Takai Y. (1995): Translocation of activated *Rho* from the cytoplasm to mambrane ruffling area, cell-cell adhesion sites and cleavage furrows. *Oncogene* **11**: 39-48

Takaishi K., Sasaki T., Kotani H., Nishioka H., Takai Y. (1997): Regulation of cell-cell adhesion by Rac and Rho small G proteins in MDCK cells. *J. Cell Biol.* **139**(4): 1047-1059

Tan M.H., Nowak N.J., Loor R., Ochi H., Sandberg A.A., Lopez C., Pickren J.W., Berjian R., Douglass H.O. Jr., Chu T.M. (1986): Characterization of a new primary human pancreatic tumor line. *Cancer Invest.* **4**(1): 15-23

Tao Y., Chen Y.-C., Li Y.-Y., Yang S.-Q., Xu W.-R. (2008): Localization and translocation of RhoA protein in the human gastric cancer cell line SGC-7901. *World J Gastroenter*. **14**(8): 1175-1181

Thiery J.P. (2002): Epithelial-mesenchymal transitions in tumour progression. *Nat. Rev. Cancer* **2**: 442-454

Thoreson M.A., Anastasiadis P.Z., Daniel J.M., Ireton R.C., Wheelock M.J., Johnson K.R., Hummingbird D.K., Reynolds A.B. (2000): Selective uncoupling of $p120^{ctn}$ from E-cadherin disrupts strong adhesion. *J. Cell Biol*. **148**(1): 189-201

Thoreson M.A. und Reynolds A.B. (2002): Altered expression of the catenin p120 in human cancer: implications for tumor progression. *Differentiation* **70**: 583-589

Tran N.L., Nagle R.B., Cress A.E., Heimark R.L. (1999): N-Cadherin expression in human prostate carcinoma cell lines. *Am. J. Path*. **155**(3): 787-798

Tsukita S., Itoh M., Nagafuchi A., Yonemura S., Tsukita S. (1993): Submembranous junctional plaque proteins include potential tumor suppressor molecules. *J. Cell Biol*. **123**(5): 1049-1053

Vetter I.R. und Wittinghofer A. (2001): The guanine nucleotide-binding switch in three dimensions. *Science* **294**: 1299-1304

Villalonga P. und Ridley A.J. (2006): Rho GTPases and cell cycle control. *Growth Factors* **24**(3): 159-164

Vilá M.R., Lloreta J., Schüssler M.H., Berrozpe G., Welt S., Real F.X. (1995): New pancreas cancers cell lines that represent distinct stages of ductal differentiation. *Lab. Invest.* **72**(4): 395-404

Wei Y., Zhang Y., Derewenda U., Liu X., Minor W., Nakamoto R.K., Somlyo A.V., Somlyo A.Pl, Derewenda Z.S. (1997): Crystal structure of RhoA-GDP and its functional implications. *Nat. Struct. Biol*. **4**(9): 699-703

Wennerberg K. und Der C.J. (2004): Rho-family GTPases: it's not only Rac and Rho (and I like it). *J. Cell Sci.* **117**: 1301-1312

Westwick J.K., Lambert Q.T., Clark G.J., Symons M., Van Aelst L., Pestell R.G., Der C.J. (1997): Rac regulation of transformation, gene expression, and actin organization by multiple, PAK-independent pathways. *Mol. Cell. Biol*. **17**(3): 1324-1335

Wheeler A.P. und Ridley A.J. (2004): Why three Rho proteins? RhoA, RhoB, RhoC, and cell motility. *Exp. Cell. Res*. **301**: 43-49

Wilentz R.E., Geradts J., Maynard R., Offerhaus G.J.A., Kang M., Goggins M., Yeo C.J., Kern S.E., Hruban R.H. (1998): Inactivation of the *p16* (*INK4A*) tumor-suppressor gene in pancreatic duct lesions: loss ofintranuclear expression. *Cancer Res.* **58**: 4740-4744

Wilentz R.E., Iacobuzio-Donahue C.A., Argani P., McCarthy D.M., Parsons J.L., Yeo C.J., Kern S.E., Hruban R.H. (2000): Loss of expression of Dpc4 in pancreatic intraepithelial neoplasia: evidence that *DPC4* inactivation occurs late in neoplastic progression. *Cancer Res.* **60**: 2002-2006

Worthylake D.K, Rossman K.L., Sondek J. (2000): Crystal structure of Rac1 in complex with the guanine nucleotide exchange region of Tiam1. *Nature* **408**: 682-688

Wu J., Mariner D.J., Thoreson M.A. und Reynolds A.B. (1998): Production and characterization of monoclonal antibodies to the catenin p120ctn. *Hybridoma* **17**(2): 175-83

Xiao K., Oas R.G., Chiasson C.M., Kowalczyk A.P. (2007): Role of p120-catenin in cadherin trafficking. *Biochim. Biophys. Acta* **1773**: 8-16

Yanagisawa M. und Anastasiadis P.Z. (2006): p120 catenin is essential for mesenchymal cadherin-mediated regulation of cell motility and invasiveness. *J. Cell. Biol.* **174**(7): 1087-1096

Yanagisawa M., Huveldt D., Kreinest P., Lohse C.M., Cheville J.C., Parker A.S., Copland J.A., Anastasiadis P.Z. (2008): A p120 catenin isoform switch affects Rho activity, induces tumor cell invasion, and predicts metastic disease. *J. Biol. Chem.* **283**(26): 18344-18354

Yap A.S., Niessen C.M., Gumbiner B.M. (1998): The juxtamembrane region ot the cadherin cytoplasmic tail supports lateral clustering, adhesive strengthening an interaction with $p120^{ctn}$. *J. Cell Biol.* **141**(3): 779-789

Zalcman G., Closson V., Camonis J., Honoré N., Rousseau-Merck M.-F., Tavitian A., Olofsson B. (1996): RhoGDI-3 is a new GDP dissociation inhibitor (GDI). *J. Biol. Chem.* **271**(48): 30366-30374

Zhang B., Zhang Y., Wang Z.-X., Zheng Y. (2000): The role of Mg^{2+} Cofactor in the guanine nucleotide exchange and GTP hydrolysis reactions of Rho family GTP-binding proteins. *J. Biol. Chem.* **275**(33): 25299-25307

8. Danksagung

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

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

Prof. Dr. Peter Gierschik für die freundliche Aufnahme in der Abteilung, für die hervorragenden Arbeitsbedingungen und das Interesse am Fortgang meiner Arbeit

Angela Mansard, für die Einweisung in verschiedene Labortechniken sowie Rat zu jeder Zeit, Pinelopi Eleftheriou für die Unterstützung bei Mini- und Midipräps und Transformationen sowie mentale Unterstützung und Dr. Monika Unger für den gedanklichen Austausch

dem Laborteam 4204 für die angenehme Arbeitsatmosphäre und die Unterstützung im Labor sowie allen Mitarbeitern der Abteilung für ihre Hilfe und ihre Kollegialität

Dr.Yukiko Imamichi für die Unterstützung mit den vielen Transfektionen für die Rho- und Rac-Assays

Ich danke meiner Familie und meinem Lebensgefährten Wolfgang für die Unterstützung während meines Aufenthaltes im Ulm.

9. Lebenslauf

Persönliche Daten

Name	Martina Liska
Geburtsdatum	23.01.1973
Geburtsort	Wien
Staatsbürgerschaft	Österreich
Familienstand	ledig
Anschrift	Hagedornweg 4/RH 20, 1220 Wien, Österreich

Schulbildung

1979 – 1983	Volksschule, 1210 Wien, Österreich
1983 – 1987	Bundesrealgymnasium, 1210 Wien, Österreich
1987 – 1992	Höhere Bundeslehranstalt für wirtschaftliche Berufe, 1210 Wien, Österreich
Juni 1992	Abschluss mit Matura

Hochschulstudium

1992 – 1994	Studium der Lebensmittel- und Biotechnologie an der Universität für Bodenkultur, 1190 Wien, Österreich
1994 – 2002	Studium der Biologie, Studienzweig Mikrobiologie an der Universität Wien, Österreich
Sept. 2002	Abschluss als Magistra rer. nat.
April 2003 bis heute	Promotion an der Universität Ulm

Nebentätigkeiten

Dez. 2007 – Sept. 2008	bibliothekarische Hilfskraft, Büchereien Wien, Österreich
Febr. 2009 – lfd.	bibliothekarische Hilfskraft, Büchereien Wien, Österreich

10. Publikationen

Kongressbeiträge (Poster/Vortrag):

1. **Liska M.**, Giehl K. (2006): Biochemical and functional differences in the highly homologous Rho GTPases RhoA and RhoC. 3. Treffen des wissenschaftlichen Nachwuchses der Studiengruppe „Biochemische Pharmakologie und Toxikologie“ e.V. (GBM). 9.-10.6.2006, Günzburg/Donau, Deutschland

2. **Liska M.**, Dietrich K., Gierschik P., Giehl K. (2005): Functional and biochemical characterization of RhoC and RhoA. 9th Joint Meeting of the Signal Transduction Society (STS): Signal Transduction, Receptors, Mediators and Genes. 10.-12.11.2005, Weimar, Deutschland

3. Graß S., **Liska M.**, Schwarz R., Gierschik P., Giehl K. (2004): RhoC and RhoA mediate different cellular effects in the pancreatic carcinoma cell line PANC-1. XXIXth European Symposium on Hormones and Cell Regulation: Functional Genomics of Signal Transduction. 17.-20.9.2004, Mont Sainte-Odile, Alsace, Frankreich

4. **Liska M.**, Graß S., Gierschik P., Giehl K. (2004): Regulation of RhoC in the pancreatic carcinoma cell line PANC-1. 2. Treffen des wissenschaftlichen Nachwuchses der Studiengruppe „Biochemische Pharmakologie und Toxikologie“ e.V. (GBM). 16.-17.7.2004, Günzburg/Donau, Deutschland

5. Graß S., **Liska M.**, Mansard A., Gress T, Gierschik P., Giehl K. (2004): A role of RhoC in pancreatic carcinoma cell migration and invasion. 45. Frühjahrs-tagung der Deutschen Gesellschaft für experimentelle und klinische Pharmakologie und Toxikologie, Mainz, Deutschland, Naunyn-Schmiedeberg’s Arch. Pharmacol. Suppl Vol. 369 (1): R 53 (209)

6. Giehl K., Graß S., **Liska M.**, Dietrich K., Schwarz G., Kierschke G., Gierschik P. (2003): RhoA and RhoC in pancreatic carcinoma cell migration. 7th Joint Meeting of the Signal Transduction Society (STS): Signal Transduction, Receptors, Mediators and Genes. 6.-8.11.2003, Weimar, Deutschland