Aus dem Institut für Virologie
– Direktor: Univ.- Prof. Dr. Klenk–

des Fachbereichs Medizin der Philipps- Universität Marburg und des
Universitätsklinikums Gießen und Marburg, Standort Marburg

Entwicklung eines Adenovirus-Vektorsystems zur Untersuchung onkogener Wechselwirkungen von β-catenin und p63- Homologen

Inaugural- Dissertation

zur Erlangung des Doktorgrades der gesamten Humanmedizin

dem Fachbereich Medizin der Philipps- Universität Marburg

vorgelegt von

Wiebke Juliane Krüger
aus Hannover

Marburg, 2007

Angenommen vom Fachbereich Medizin der Philipps- Universität Marburg

Am: 20.12.2007

Gedruckt mit freundlicher Genehmigung des Fachbereichs

Dekan: Prof. Dr. M. Rothmund

Referent: PD Dr. E. Mühlberger

Korreferent: Prof. Dr. H. Wulf

Im Andenken an meine Urgroßmutter

Erika Rummel

Aus dem Institut für Virologie der Philipps- Universität Marburg
– Direktor: Univ.-Prof. Dr. Klenk –

Referent: PD. Dr. Elke Mühlberger
Korreferent:

Zusammenfassung

Titel: *Entwicklung eines Adenovirus-Vektorsystems zur Untersuchung onkogener Wechselwirkungen von β-catenin und p63- Homologen*

Name: Wiebke Juliane Krüger

Das Protein β-catenin ist Regulator des Zellzyklus und Produkt eines Protoonkogens. Das Verständnis seiner Regulation durch zelluläre Mechanismen ist wichtig für das Verständnis der Tumorigenese in einigen humanen Krebsarten, z.B. dem Colonkarzinom. In dieser Arbeit wurde eine Methode entwickelt, um die Wechselwirkung von β-catenin und p53-Homologen, insbesondere ΔNp63α, zu untersuchen. Die Erstellung adenoviraler Vektoren zur Überexpression beteiligter Proteine wird beschrieben. Die Funktion der Viren Adβ-catenin, Adβ-cateninS33Y, AdΔNp63α, AdTCF4flag und AdΔNTCF4flag wurde überprüft und beschrieben. Es wurden Experimente zur Interaktion von ΔNp63α und β-catenin durchgeführt. Die Ergebnisse sind vereinbar mit der Hypothese, dass eine Interaktion stattfindet, doch liegt das Hauptaugenmerk dieser Arbeit auf der Entwicklung des Vektorsystems. Abschließend werden weitere mögliche Versuchsaufbauten besprochen. Die Wertigkeit des entwickelten Systems wird diskutiert.

INHALTSVERZEICHNIS

Einleitung 1
Adenoviren als Vektoren 1
Das AdEasy-System zur Herstellung rekombinanter Adenoviren 2
p63 – ein Protein der p53 Familie 5
ΔNp63α 7
β-catenin 7
β-catenin S33Y 9
TCF-4 und ΔN-TCF-4 9
Interaktion von β-catenin und p63 9
Aufgabenstellung 10
Material 11
Chemikalien, Geräte und Verbrauchsmaterialien 11
Zellkulturmedien und Zusätze 13
Puffer 14
Antikörper 16
Enzyme 16
Kits 17
Oligonukleotide (Primer) 17
Vektoren 18
Bakterien, Viren und Eukaryotenzellen 18
Methoden 19
Zellbiologische Methoden 19
Kultivierung von Zellen 19
Infektion von Zellen mit Adenoviren 20
Präparation hochtitriger Virusstocks rekombinanter Adenoviren 20
Titration der Virusstocks 20
Transfektion von DNA in Zellen (Lipofektion) 21
Proteinchemische & immunologische Methoden 22
Western Blot 22
Immunfluoreszenzfärbung (indirekt) 25
Molekularbiologische Methoden 27
RNA- Präparation aus Virus- infizierten Zellen 27
Herstellung von cDNA durch reverse Transkription 27
Amplifikation von DNA durch Polymerase- Ketten- Reaktion (PCR) 28

Quantifizierung von DNA mittels real-time PCR (qrt-PCR) 30
Verdau doppelsträngiger DNA durch Restriktionsendonukleasen 32
Verknüpfung einzelner DNA- Abschnitte durch Ligation 32
Auftrennung von DNA- Fragmenten im Agarosegel 33
Sequenzierung von DNA 34
Herstellung rekombinanter Adenoviren 35

Ergebnisse 37
Erstellen rekombinanter Adenoviren mit dem pAdEasy- System 37
Adβ-catwt 38
Adβ-catS33Y 42
AdΔNp63α 44
AdTCF4flag 47
AdΔNTCF4flag 49
Untersuchung der Interaktion von ΔNp63α und β-catenin 52
Gesteigerte β-catenin-Expression in Anwesenheit von ΔNp63α 52
Expression β-catenin- regulierter Gene in Gegenwart von p63 53

Diskussion 55
Adenovirale Vektoren 55
Ausblick - Interaktion von β-catenin und ΔNp63α 57
Ausblick- Verwendung des erstellten Vektorsystems 58
Literaturverzeichnis 60
Lebenslauf 65
Verzeichnis der akademischen Lehrer 66
Danksagung 67
Ehrenwörtliche Erklärung 68

Abkürzungsverzeichnis

Ad	Adenovirus
cDNA	komplementäre (copy) DNA
CDS	codierende Sequenz
DNA	Desoxyribonucleinsäure
dNTP	Desoxynukleotid
EB	elution buffer
eGFP	enhanced green fluorescent protein
Ffu	fluoreszenz forming units
GFP	green fluoreszent protein
GSK3	Glykogensynthasekinase 3
GTC	Guanidinisothiocyanatlösung
ITR	inverted terminal repeats
m.o.i.	multiplicity of infection
mRNA	messenger RNA
OT	Objektträger
PBS	Phosphate buffered saline
PBS^{def}	Phosphate buffered saline
qrt PCR	quantitative real time Polymerasekettenreaktion
RNA	Ribonucleinsäure
RNAse	RNA- schneidendes Enzym
RT	Raumtemperatur
SDS-PAGE	Sodiumdodecylsulfat- Polyacrylamid- Gelelektrophorese
UTR	untranslated region
wt	wildtype

Einleitung

Adenoviren als Vektoren

Adenoviren wurden 1953/54 von zwei unabhängigen Arbeitsgruppen aus menschlichen Rachenmandeln isoliert (Hilleman & Werner, 1954; Rowe, Huebner, Gilmore, Parrott, & Ward, 1953). Ihr Name leitet sich von der wissenschaftlichen Bezeichnung Adenoide ab.

Die Familie der Adenoviridae wird in zwei Genera unterteilt. Mastadenoviren, die Säugetiere befallen, und die in Vögeln endemischen Aviadenoviren.

Heute sind über 40 Typen von humanen Adenoviren bekannt. Das für Forschungszwecke am häufigsten verwendete ist der Serotyp 5.

Sein Genom besteht aus einem linearen, 36000 Basenpaare umfassenden, doppelsträngigen DNA-Molekül. Es kann in beide Richtungen abgelesen werden. Auf der Basis von Transkriptionsanalysen zu unterschiedlichen Zeitpunkten nach Infektion wurde das Genom zudem in 4 frühe (E1 – E4) und eine späte (L1) Regionen eingeteilt (Fields, 1996). Diese Einteilung ergibt sich aus dem Zeitpunkt der Expression der einzelnen Regionen relativ zum Start der DNA- Replikation.

Unmittelbar nach der Infektion wird zunächst die Region E1A exprimiert. Ihre Produkte sind essenziell für die Expression der anderen viralen Gene. Ungefähr sechs Stunden später startet die Replikation des viralen Genoms und die späte Region wird exprimiert.

Die Enden des adenoviralen Genoms bestehen aus invertierten Sequenzwiederholungen, den sogenannten ITRs („inverted terminal repeats“). Diese beinhalten den adenoviralen Replikationsursprung. Das jeweilige 5’-Ende der beiden DNA-Stränge ist kovalent mit dem „Terminalen Protein“ verbunden. Dieses dient während der unidirektionalen Replikation als Primer.

Rekombinante Adenoviren werden für unterschiedliche wissenschaftliche Zwecke genutzt, darunter Gentransfer in vitro, Gentherapie und Vakzination in vivo (Alemany, Balague, & Curiel, 2000).

Adenoviren bringen eine Reihe wichtiger Voraussetzung für den Einsatz als Gentransfervektor mit. Serotyp 5 und 2 sind nahezu vollkommen charakterisiert, sie verursachen beim Menschen keine schweren Erkrankungen und habe kein nennenswertes onkogenes Potential. Es kann eine Vielzahl von Gewebetypen infiziert werden, unabhängig von der Zellteilungsaktivität. Das virale Genom liegt nach Infektion episomal vor und wird nur in geringen Raten in das Wirtsgenom integriert. (Fields, 1996)

Die komplexe Transkriptionseinheit stellt ein Problem für die Herstellung von Rekombinanten dar, daher beschränkt man sich hierbei meist auf die Regionen E1, E2A, E3 und E4. Region E3 wird für das Umgehen der Wirtsabwehr benötigt und ist daher entbehrlich, das Ersetzen der E1- Region bringt zudem den Vorteil mit sich, das das Virus replikationsunfähig wird, so dass in den Zielzellen keine infektiösen Partikel gebildet werden können. Zum Vermehrung der Viren muss das Gen in den Trägerzellen in trans bereitgestellt werden.

Das AdEasy-System zur Herstellung rekombinanter Adenoviren

Das AdEasy- System zur vereinfachten Herstellung rekombinanter Adenoviren wurde 1997 von *He et al* vorgestellt (He, Zhou et al., 1998).
Es nutzt die homologe Rekombination in elektrokompetenten E.coli anstelle der aufwändigen Ligation, die zudem nur für kleine Transgene möglich ist.

Die Vorgehensweise ist in Abb. 1.1 schematisch dargestellt. Das Gen von Interesse wird zunächst in einen Shuttle- Vektor (z.B. pAdTrack-CMV) kloniert. Dieser Vektor enthält einen CMV- Promotor, dahinter eine multiple-cloning-site für die Insertion des Transgens. Zusätzlich sind die Informationen für eine Kanamycinresistenz und für das grün- fluoreszierende Protein (GFP) kodiert. Die daran grenzenden Regionen „rechter Arm“ und „linker Arm“ sind virale Sequenzen und dienen der Rekombination.
Ein weiteres Plasmid (backbone plasmid) enthält das komplette Erbgut von Ad5 bis auf die Regionen E1 und E3.

Das fertige Shuttlekonstrukt wird linearisiert und dann mit dem in supercoiled-Form vorliegenden backbone- Plasmid in rekombinativ aktive Bakterienstämme (z.B. E.coli BJ5183) kotransfiziert. Der rechte und linke Arm des Shuttles sind entsprechen Gensequenzen auf dem backbone- Plasmid, hier findet eine homologe Rekombination statt.

Durch die in pAdTrack-CMV enthaltene Kanamycin- Resistenz werden die Klone selektiert, in denen eine Rekombination stattgefunden hat. Das rekombinante Plasmid wird präpariert und die korrekte Rekombination (z.B. durch Restriktionsendonukleaseverdau) überprüft.

Das adenovirale Konstrukt muss nun linearisiert werden, um die inverted terminal repeats freizulegen. Dann erfolgt die Vermehrung des Virus in Zelllinien, die das fehlende E1- Gen enthalten (293, 911).

Über die Expression von GFP kann die Virusvermehrung verfolgt werden. Nach 7 – 10 Tagen kann das Virus geerntet werden.

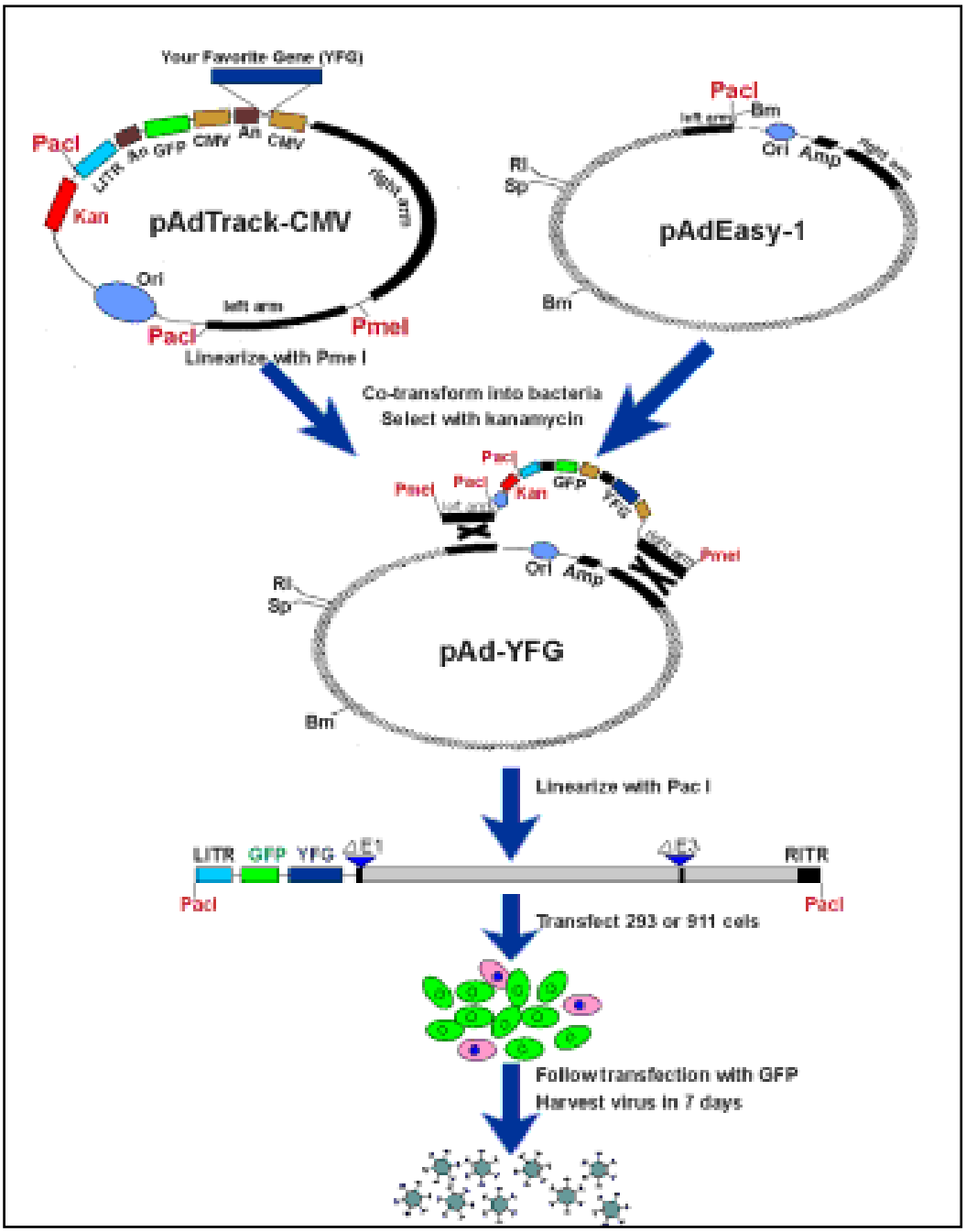

Abb. 1.1: schematische Zusammenfassung des AdEasy- System (He, Zhou et al., 1998) pAdTrack-CMV und pAdEasy-1 werden in Bakterien kotransfiziert, „right arm“ und „left arm“ mediieren die Rekombination. Das erhaltene Plasmid wird linearisiert und in 293 oder 911-Zellen transfiziert. Abkürzungen: LITR, RITR: linke, rechte ITR, An: Polyadenylation site, RI: EcoRI, Bm: BamHI,

p63 – ein Protein der p53 Familie

Gene, die infolge fehlerhafter Aktivierung oder monoallelischer Mutation das maligne Wachstum der Zelle übermäßig stimulieren, nennt man Onkogene (Todd & Wong, 1999). Gene, deren Inaktivierung oder biallelische Mutation zur Malignität führt, heißen Tumorsuppressorgene. Bei nicht ausreichender oder fehlerhafter Produktion ihrer Produkte kann es zu überschießender Proliferation der Zelle kommen (Hinds & Weinberg, 1994; Knudson, 1993).

Das wohl bekannteste menschliche Tumorsuppressorgen ist p53, in über der Hälfte aller menschlichen Tumoren liegt es in mutierter Form vor (Hollstein et al., 1994).

1997 wurden zwei Homologe von p53 entdeckt: p63 und p73 (Kaghad et al., 1997; Schmale & Bamberger, 1997; Yang et al., 1998). Wurde zunächst noch angenommen, dass auch diese beiden Proteine Tumorsuppressoren seien, konnte ihre Mutation nur in wenigen Krebsarten nachgewiesen werden (Yang, Kaghad, Caput, & McKeon, 2002).

Da sie eine hohe strukturelle Ähnlichkeit aufweisen, verdrängen sie möglicherweise p53 von den Promotoren und wirken so als dominant negative Regulatoren (Yang et al., 1998).

Sowohl p63 als auch p73, können alternativ gespleißt oder von einem internen Promoter exprimiert werden, so dass beide auch in einer N-terminal defizienten (ΔN-) Form vorliegen können.

In Knock-out-Studien konnte gezeigt werden, dass p63 eine entscheidende Rolle bei der Differenzierung von ektodermalem Gewebe sowie der Bildung der Extremitäten spielt (Mills et al., 1999; Yang et al., 1999). P73 defiziente Mäuse weisen unter anderem diverse neuronale Dysplasien sowie pathologisch gesteigerte Entzündungsreaktionen auf (Yang et al., 2002).

Diese Befunde legen nahe, dass sowohl p73 wie auch p63 in den entsprechenden Stammzellen für die korrekte Differenzierung erforderlich sind.

Struktur

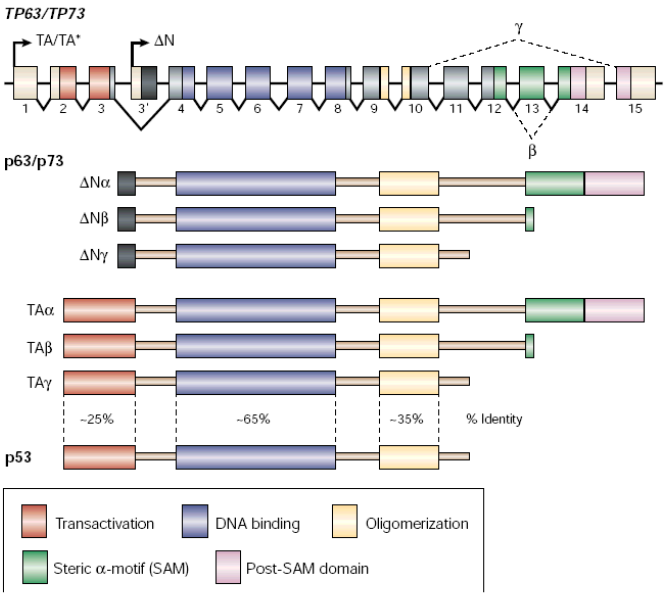

Abb. 1.2: Die p53- Familie

Dargestellt sind die Gene TP63 und TP73 und die durch alternatives Splicing daraus resultierenden Proteinvarianten. Farbig dargestellt sind jeweils unterschiedliche Funktionsdomänen.

Allen Proteinen der p53- Familie gemein ist, wie in Abb. 1.2 gezeigt, die zentrale DNA- bindende Domäne (blau). Diese interagiert mit spezifischen Promotoren.

Am Aminoterminus findet sich eine Transaktivierungsdomäne, an der die Interaktion mit bestimmten Kofaktoren der Transkription stattfindet. Die Gene TP63 und TP73 besitzen zwei Promotoren, so dass diese Proteine auch in der ΔN- Form ohne Transaktivierungsdomäne vorkommen.

Carboxyterminal finden sich eine Oligomerisationsdomäne, die für die typische Bildung von Tetrameren benötigt wird.

Bei einigen Splicevarianten von p63 und p73 liegen weiter C-terminal von der Oligemerisationsdomäne noch andere Domänen vor, deren Funktion bisher weitgehend ungeklärt ist. Diejenigen Splicevarianten, die mit dem griechischen Buchstaben α benannt werden, besitzen zum Beispiel ein steriles alpha Motiv (SAM). Mutationen in diesem Bereich führen über noch nicht geklärte Mechanismen zu schweren Krankheiten wie dem Hay-Wells-Syndrom.

ΔNp63α

Die p63- Isoform, die Gegenstand dieser Arbeit ist, ist ΔNp63α. Ihr kommt eine regulative Aufgabe in epithelialen Stammzellen zu, so kommt es in verschiedenen Formen des Plattenepithelkarzinoms zu einer nukleären Akkumulation (Nylander, Coates, & Hall, 2000). Während der Embryonalentwicklung scheint ΔNp63α ein wichtiger Regulator bei der Zahn- und Haarentwicklung zu sein (Laurikkala et al., 2006). Das Interesse richtet sich hauptsächlich auf die weiter unten beschriebene Interaktion mit β-catenin.

β-catenin

β-catenin ist ein 88kDa schweres Protein. Ihm kommen in der Zelle zwei unterschiedliche Funktionen zu. In seiner Plasmamembran- assoziierten Form ist es gemeinsam mit Cadherin an der Zell-Zelladhäsion (zonulae adhaerentes) beteiligt (Higashi et al., 2004), in der nukleären Form dient es als Aktivator für die Transkription von Proteinen des Zellzykluses (Protoonkogen). Wird die β-catenin-Aktivität nicht streng reguliert, kommt es zu einer überschießenden Proliferation der Zelle (z.B. Colon- Karzinom)(Giles, van Es, & Clevers, 2003). Auch bei der Entwicklung neuronaler Gewebe sowie bei neurodegenerativen Erkrankungen spielt β-catenin eine Rolle (De Ferrari & Moon, 2006).

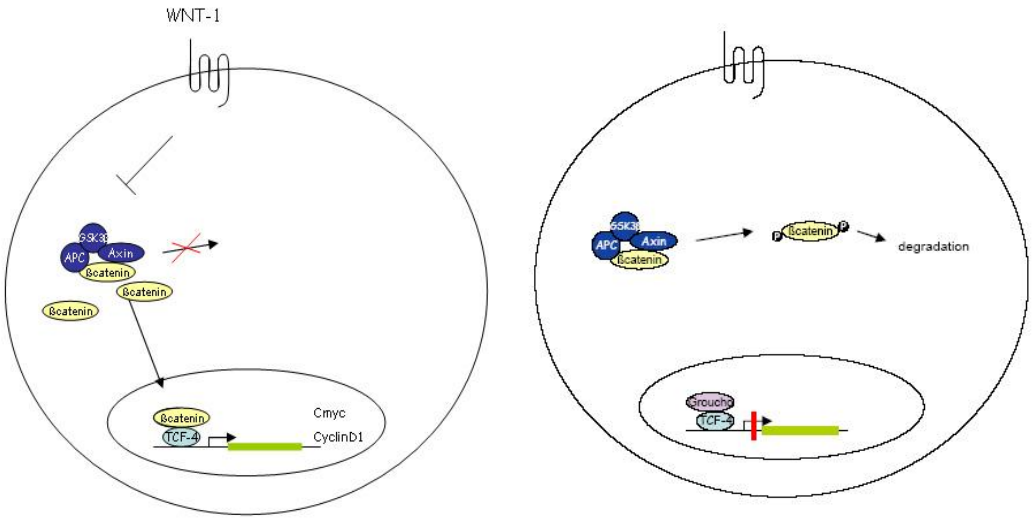

Abb. 1.3: Schema der β-catenin Regulierung
Auf der linken Seite dargestellt ist die Aktivierung der Kaskade durch Bindung von WNT-1 an extrazelluläre Rezeptoren mit nachfolgender Akkumulation und nukleärer Relokation von β-catenin, rechts die inaktive Kaskade.

Ein Regulator der β-catenin- Aktivität ist die WNT-1 Signalkaskade, dargestellt in Abb. 1.3: WNT-1 bindet an extrazelluläre Rezeptoren und inhibiert über second messenger einen Komplex aus Axin, GSK3β- und APC (Nakamura et al., 1998), welcher sonst für die Phosphorylierung und proteosomale Degradation von β-catenin zuständig ist (Aberle, Bauer, Stappert, Kispert, & Kemler, 1997; Rubinfeld et al., 1996) . In Anwesenheit von WNT-1 akkumuliert β-catenin im Zytoplasma und wird in den Nukleus transportiert (Barker, Morin, & Clevers, 2000). Dort ermöglicht es in einem Komplex mit TCF-4 die Transkription von z.B. c-myc und Cyclin D1, die beide eine wichtige Rolle bei der Zellteilung spielen.
In Abwesenheit von WNT-1 wird β-catenin im Zytoplasma degradiert. TCF-4 im Nukleus bleibt inaktiv, weil es von Groucho- Faktoren gebunden ist (Brantjes, Roose, van De Wetering, & Clevers, 2001).

β-catenin S33Y

Wird das Serin an Position 33 in β-catenin durch Tyrosin ersetzt, wird die Bindungsstelle für GSK3 verändert, und die Phosphorylierung und der Abbau werden herabgesetzt. Dieses Protein, welches in vivo in einigen colorektalen Karzinomen sowie in Pilomatricomen gefunden wird, eignet sich in vitro gut, um durch β-catenin ausgelöste Prozesse stärker beobachten zu können. (Chan, 2000; Chan, Gat, McNiff, & Fuchs, 1999; Ilyas, Tomlinson, Rowan, Pignatelli, & Bodmer, 1997)

TCF-4 und ∆N-TCF-4

TCF-4 ist ein Transkriptionsfaktor, welcher für β-catenin regulierte Transkriptionsaktivierung nötig ist (Barker et al., 2000). Bei der N-terminal defizienten Variante ∆N-TCF-4 fehlt die Bindungsstelle für β-catenin und sie wirkt damit dominant negativ auf die β-catenin gesteuerte Transkription.

Interaktion von β-catenin und p63

Da in einigen Krebsarten eine Überexpression von sowohl β-catenin und ∆Np63α beobachtet wurde, z.B. (Ueo et al., 2005), ist die Frage nach einer Interaktion der beiden Proteine berechtigt.

Bei transgenen Mäusen mit einer Überexpression von modifiziertem β-catenin ist eine Veränderung der p63- Expression hin zu ∆Np63α beobachtet worden. (Teuliere et al., 2005)

Eine Überexpression von ∆Np63α führt im Experiment zu Akkumulation und nukleärer Lokalisation von β-catenin, ein Erklärungsansatz hierfür ist die p63-vermittelte Inhibition von GSK3β-, die über verminderte Phosphorylierung von β-catenin zu dessen Akkumulation führt (Patturajan et al., 2002), möglich wäre aber auch eine nukleäre Interaktion, die zur Beeinflussung der Zielgenexpression führt.

Die genaue Charakteristik der Interaktion von β-catenin und ∆Np63α ist jedoch bisher ungeklärt, wie auch die entsprechende Signalkaskade.

Aufgabenstellung

Ziel dieser Arbeit ist es, ein Verfahren zu entwickeln, mit dessen Hilfe die Interaktion von β-catenin und p63 besser als bisher beschrieben untersucht werden kann.

Ansprüche an dieses System sind:

- Überexpression der zu untersuchenden Proteine auf hohem Level
- Steuerbarkeit – die Höhe der Überexpression sollte kontrollierbar sein
- Selektivität – es sollen nur die gewünschten Gene beeinflusst werden

Ich habe hierfür adenovirale Vektoren entwickelt, da diese eine höhere Transgenexpression ermöglichen als die reine Transfektion der DNA.

Durch ihren Einsatz ist die Untersuchung einer Interaktion von ΔNp63α und β-catenin möglich. In verschiedenen Versuchsaufbauten kann der Effekt der einzelnen und gemeinsamen Überexpression in vitro untersucht werden.

Diese Arbeit beschreibt zunächst die Arbeitsschritte zur Virussynthese. Im zweiten Teil der Ergebnisse werden erste, probehafte Versuche mit den Viren beschrieben. Zum Ende wird die Wertigkeit des von mir entwickelten Systems evaluiert und ein Ausblick über weitere sinnvolle Versuchsaufbauten gegeben.

Material

Chemikalien, Geräte und Verbrauchsmaterialien

1, 4-Diazabicyclo-[2.2.2]-oktan (DABCO)	Sigma
1, 4-Dithiothreit (DTT)	Sigma
Aceton	Riedel-de Haën, Seelze
Acrylamid/Bisacrylamid-Lösung (30 %, 29:1)	Bio-Rad
Agarose Electrophoresis Grade	Gibco BRL, Paisley, Scotland
Albumin Bovine (BSA)	Sigma
Alkalische Phosphatase	Roche, Mannheim
Amoniumpersulfat (APS)	BioRad, München
Avidin-Texas Red	Jackson ImmunoResearch
Biomax MR (Filme)	Eastman Kodak, Rochester, USA
Bromphenolblau	Serva, Heidelberg
Caesiumchlorid (CsCl)	Boehringer, Mannheim
Chloroform	J.T.Balker, Holland
DAPI	Boehringer Mannheim
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Merck, Darmstadt
Dinatriumhydrogenphosphat (Na_2HPO_4)	Merck, Darmstadt
DNTP-Mix	Gibco BRL, Karlsruhe
DNA-Größenstandard „1kb ladder“	GibcoBRL
Ethanol	Merck, Darmstadt
Ethidiumbromid, 1% Lösung	Carl Roth, Karlsruhe
Ethylendiamintetraacetat (EDTA)	Roth
Fluoprep	bioMerieux, Nürtingen
Fötales Kälberserum (FCS)	Gibco BRL, Paisley, Scotland
Formaldehyd	Merck, Darmstadt
Formamid	Merck, Darmstadt
Formamid (deionisiert)	Kodak
Glycogen	Roche, Diagnostics, Mannheim

Glycerin	Merck, Darmstadt
Glycin	Roth, Karlsruhe
Harnstoff	Gibco BRL, Paisley, Scotland
H_2O, RNase-frei	Ambion
Iodacetamid	Sigma, Taufkirchen
Isopropanol	Merck, Darmstadt
Lipofectamin Plus (Transfektionsreagenz)	Life Technologies
Luciferase Lysis Puffer 5x	Promega, Madison, WWI, USA
Magermilchpulver	Töpfer, Dietmannsried
Magnesiumchlorid	Merck, Darmstadt
Methanol	Merck, Darmstadt
N, N, N´,N´-Tetramethylendiamin (TEMED)	Bio-Rad, München
Natriumacetat	Merck, Darmstadt
Natriumdodecylsulfat (SDS)	Merck Eurolab GmbH
Protein-Größenstandard „RPN 800“	Amersham Life Science
Streptavidin-Peroxidase	Amersham Biosciences, Freiburg
Triton X-100	Sigma
Trizol®Reagenz	GibcoBRL, Eggenstein
Tween 20	Serva, Heidelberg

12-Loch Zellkulturplatten	Greiner
6-Loch Zellkulturplatten	Greiner
Petrischalen	Greiner
8-Loch Streifen mit Rahmen	Nalge Nunc Int.
Super Frost/Plus® Objektträger	Menzel-Glässer
BIOMAX MR Röntgenfilm	Kodak
Fixogum®	Marabuwerke, Tamm
Gel-Blotting-Papier GB002 (Whatman-Papier)	Schleicher & Schuell
Gene Pulser Küvetten 0,1 cm	BioRad, München
Kammer-Objektträger LabTEK®	Nalge Nunc Int.
Parafilm „M“	Pechiney, Chicago, IL, USA
PCR-Reaktionsgefäße MicroAmp®	PE Biosystems

PROTRAN^{R} Nitrocellulose Transfer Membrane	Schleicher & Schuell
Zellkulturflaschen (162 cm^2, 75 cm^2, 30 cm^2)	Greiner

Fluoreszenzmikroskop (1)	Axiovert, Zeiss, Wetzlar
Fluoreszenzmikroskop (2)	Axiphot, Fa. Zeiss, Wetzlar
ABI Prism™ 377 DNA Sequencer	Perkin Elmer
PCR-Cycler „Gene Amp PCR System 2400“	Perkin Elmer
PCR-Cycler „Primus“	MWG Biotech
PCR-Cycler „PCR Sprint“	Hybaid
Zentrifuge „Megafuge 1,0R“	Heraeus
Gene Pulser II (Elektroporation)	Bio-Rad
Western Blot-Kammer	Bio-Rad
Entwickler-Maschine „Gevamatic 60“	Agfa-Gevaert
Brutschrank „Steri-Cult 200“	Forma Scientific, Inc.
Brutschrank „Hera Cell“	Heraeus
Sterilbank	Prettl

Zellkulturmedien und Zusätze

Ciprofloxacin (Ciprobay®)	Bayer
Dulbecco´s Modified Eagle Medium (DMEM)	GibcoBRL, Karlsruhe
Fötales Kälberserum (fetal calf serum, FCS)	GibcoBRL, Paisley, Scotland
L-Glutamin	GibcoBRL, Eggenstein
Penicillin/Streptavidin	GibcoBRL, Eggenstein
Tetracyclin	Sigma, Deisenhofen
Trypsin/EDTA	GibcoBRL, Eggenstein

DMEM (voll) enthält:	10 µg/ml	Ciprobay
	50 U/ml	Penicillin
	50 µg/ml	Streptavidin
	2 µg/ml	Tetracyclin
	10 %	FCS
	200 µM	L-Glutamin

EZ Mix™ LB Agar	Sigma
Ampicillin [ad 200 µg/ml]	Sigma
Kanamycin [ad 25 µg/ml]	Sigma

Puffer

PBS^{++} (Phosphate buffered saline):

136,9 mM	NaCl
2,7 mM	KCl
8,1 mM	Na_2HPO_4
1,1 mM	$MgCl_2$
1,5 mM	KH_2PO_4
1,2 mM	$CaCl_2$

PBS$^{def.}$:

Zusammensetzung wie PBS^{++}, jedoch ohne $MgCl_2$ und $CaCl_2$

TAE-Puffer (50-fach):

2 M	Tris
1 M	NaOAc
0,1 M	EDTA

RIPA-Puffer:

0,1 % (v/v)	Triton X-100
0,1 % (v/v)	DOC
0,1 % (w/v)	SDS
2 mM	Tris/HCl (pH 8,5)
9 mM	NaCl
1 mM	EDTA
1,4 % (w/v)	Trasylol
18,5 % (w/v)	Jodacetamid

10x Laufpuffer für Proteingele:

0,1 % (w/v)	SDS
25 mM	Tris
192 mM	Glycin

6x Laemmli-Puffer (SDS-Sample Puffer):

0,35 M	Tris/HCl (pH 8,5)
10 % (w/v)	SDS
30 % (v/v)	Glycerin
0,012 % (w/v)	Bromphenolblau
0,93 g	DTT

Elution Buffer (Qiagen): 10 mM Tris-Cl, pH 8,5

10x Western Salts:

250 mM	Tris
3,2 M	Glycin
0,02 % (w/v)	SDS
pH ad 8,3 mit HCl	

Western Blot Transferpuffer:

10 % (v/v)	Western Salts 10x
15 % (v/v)	Methanol

PCR- MasterMix für qRT PCR:

2,5 U	Taq DNA Polymerase
Je 0,4 mM	dATP, dCTP, dGTP, dTTP
20 mM	Tris-HCL
100 mM	KCL
3 mM	$MgCl_2$
0,2 % (v/v)	Brij 35

Antikörper

Primärantikörper

Antikörper	Herkunft	Hersteller	Verdünnung
α- β-catenin	Maus, monoklonal	Santa Cruz	1:300- 1:500
α- p63	Maus, monoklonal	Santa Cruz	1:300- 1:1000
α- TCF4	Maus, monoklonal	Biomol	1:100
α- flag	Maus, monoklonal	Sigma Aldrich	1:75
α- flag	Kaninchen, monoklonal	Sigma Aldrich	1:75
α- E2A (B6-8)	Maus, monoklonal Hybridomaüberstand	Jane Flint, Princeton University	1:20

Sekundärantikörper

Antikörper	Herkunft	Hersteller	Verdünnung
Alexa rot 488 goat α mouse	Ziege	Molecular Probes	1:500
Alexa rot 594 rabbit α mouse	Kaninchen	Molecular Probes	1:200
Alexa rot donkey α rabbit	Esel	Molecular Probes	1: 200
POD- goat α mouse IgG	Ziege	Jackson ImmunoResearch	1:20000
POD- rabbit α goat IgG	Kaninchen	Jackson ImmunoResearch	1:20000

Enzyme

Alkalische Phosphatase (from calf instestine)	Roche
Expand HIFI Polymerase System	Roche
Expand Long Template PCR System	Roche
Pfu turbo® [2,5U/ml]	Stratagene

Restriktionsendonukleasen	New England Biolabs
T4 DNA-Ligase [30 Weiss units/µl]	MBI Fermentas

Kits

1st strand cDNA synthesis Kit for RT-PCR	Roche
LightCycler FastStart DNA MasterPLUS SYBR green 1	Roche
BIORAD Protein Assay	Bio-Rad
E.Z.N.A.® Plasmid Miniprep Kit II	peqlab
Luciferase Assay Kit	Promega
QIAamp® DNA Mini Kit	Qiagen
DNAeasy Mini Kit	Qiagen
QIAfilter Plasmid Maxi Kit	Qiagen
Superscript™ II RT	GibcoBRL
SuperSignal® West Dura	Pierce
SuperSignal® West Femto	Pierce
QiaQuick Gel Extraction Kit	Qiagen

Oligonukleotide (Primer)

Alle Primer synthetisiert von MWG Biotech, Ebersberg.

(Orientierung 5′→3′; Restriktionsschnittstellen unterstrichen)

pAdTrack CMV seq	CAG ATC CGC TAG AGA TCT GG
BglII lam5'UTR p63 hin	GAA GAT CTC AGA TCC CGA GGT CC
p63 XhoI rück	CCG CTC GAG TCA TTC TCC TTC CTC
KpnI β-catenin hin	GGG GTA CCG CCA CCA TGG CTA CTC AAG CTG
β-catenin XbaI rück	GCT CTA GAT TAC AGG TCA GTA TCA AAC
KpnI flag TCF4 hin	GGG GTA CCA CCA TGG ATT ACA AGG ATG ACG ACG ATA AGA TGC CGC AGC TGA ACG
TCF4 XbaI rück	GCT CTA GAC TAT TCT AAA GAC TTG GTG ACG

KpnI flag TCF4(33) hin	GGG GTA CCA CCA TGG ATT ACA AGG ATG ACG ACG ATA AGG AAA ACT CCT CGG CAG
qrt cyclin D1 hin	GGC AGT CCG GGT CAC ACT TG
qrt cyclin D1 rück	GCT CAA GTG GAA CCT GGC CG
qrt c-myc hin	AGC CAG CGG TCC GCA ACC CTT GCC
qrt c-myc rück	AGC TCG AAT TTC TTC CAG ATA TCC

Vektoren

pAd Track CMV	*He et al., 1998*
pAd Easy1	*He et al., 1998*

Bakterien, Viren und Eukaryotenzellen

Bakterien

Escherichia coli DH 10 B „ElectroMax“	GibcoBRL
Escherichia coli BJ 5183	Vogelstein, Baltimore

Virale Vektoren

Ad CMV β- Gal	Koch et al., 2001
Ad CMV β-catenin wt	Wiebke Krüger
Ad CMV β-catenin S33Y	Wiebke Krüger
Ad CMV ΔNp63α	Wiebke Krüger
Ad CMV TCF4-flag	Wiebke Krüger
Ad CMV ΔNTCF4-flag	Wiebke Krüger

Humane Zelllinien

H1299	Tumorzellen aus der Lunge, $p53^{-/-}$	W. Deppert, Universität Hamburg
293	Ad-transformierte Nierenzellen	(Graham, Smiley, Russell, & Nairn, 1977)
HER911	Ad-transformierte Retinazellen	(Fallaux et al., 1996)

Methoden

Zellbiologische Methoden

Kultivierung von Zellen

Alle Zellkulturarbeiten wurden an einer Sterilbank durchgeführt, um eine mikrobielle Kontamination zu vermeiden.

Die Zellen wurden in 162/182 cm^2 großen Gewebekulturflaschen (Greiner/Costar) kultiviert und in einem Inkubator bei 37°C, 5% CO_2 und 95% Luftfeuchtigkeit aufbewahrt. Als Kulturmedium wurden 15ml Dulbecco's MEM^{+++} für H1299- und 911- Zellen und 30 $RPMI^{+}$ für JURKAT- Zellen verwendet. Alle für die Zellkultur notwendigen Materialien wurden kurz vor Gebrauch auf 37°C gebracht.

Das Umsetzen konfluent gewachsener, adhärenter Zellen erfolgte nach Abnahme des Nährmediums und zweimaligem Waschen mit 10ml PBSdef. Es wurde 4 ml Trypsin/EDTA- Lösung auf die Zellen gegeben und die Flasche vorsichtig geschwenkt. EDTA ist ein Chelatbildner, der Kalzium oder Magnesium bindet, und dadurch die Kalzium-abhängige Zell-Zell-Verbindungen auflöst. Trypsin spaltet Proteinbrücken zwischen den einzelnen Zellen und dem Flaschenboden. Sobald sie sich abgelöst hatten, wurden die Zellen in Kulturmedium resuspendiert und in neue Flaschen überführt.

Je nach Bedarf wurden die Zellen auch gezählt und ausgesät oder eingefroren.

Nach einer Über-Nacht-Inkubation im Brutschrank konnten ausgesäte Zellen für Experimente verwendet werden.

Bestimmen der Zellzahl:

Die Zellen wurden in einer Neubauer- Zählkammer gezählt. Dazu wurde ein Tropfen der abgelösten, resuspendierten Zellen in die Zählkammer gegeben. Nach Auszählen von 4 x 16 Feldern und Ermittlung des Mittelwerts ergibt sich die Zellzahl in 1ml durch Multiplikation mit 10^4.

Üblicherweise wurden 50000 Zellen pro Vertiefung im 4well- Objektträger bzw. 200000 Zellen pro Vertiefung einer 6-Loch-Platte ausgesät.

Infektion von Zellen mit Adenoviren

Am Tag vor der Infektion wurden die Zellen ausgesät, und zwar je nach Bedarf in Gewebekulturflaschen, -platten (6, 12 Vertiefungen) oder Chamber slides (Objektträger mit Kammeraufsatz und vier Vertiefungen):
Zellen pro Vertiefung/Kammer:
- 6-Loch-Platte: 200000 für RNA- Präparation und Western blot
- chamber slide: 50000 für Immunfluoreszenz
Bei bekanntem Virustiter und der gewünschten m.o.i. ließ sich das benötigte Volumen des Virusinokulums berechnen.

Infektion von Flaschen: Das Virusinokulum wurde direkt ins gewechselte Medium gegeben, die Flasche sorgfältig geschwenkt und für 24 h bebrütet.
Infektion von Gewebekulturplatte (6- Loch): 24 h nach Aussaat der Zellen wurde das Medium entfernt und das gewünschte Virus mit einer m.o.i. von 100 in 1000 µl $DMEM^{leer}$ zugegeben. Die Zellen wurden für 4 h bei 37°C geschüttelt, danach das Inokulat abgesaugt und 2 ml Vollmedium hinzugegeben. Bebrütung für 24h.
Infektion eines 4-chamer-slides: Virus mit m.o.i. 50 in $DMEM^{leer}$, nach 4 h Vollmedium.

Präparation hochtitriger Virusstocks rekombinanter Adenoviren

Durch leichtes Klopfen wurden die infizierten Zellen von der Flasche abgelöst. Die Zellen wurden durch 10-minütiges Zentrifugieren bei 3000 rpm pelletiert und der Überstand verworfen. Das Pellet wurde in 500µl PBS^{def} aufgenommen und die Zellen durch dreimaliges Frieren und Tauen lysiert. Nach erneutem Zentrifugieren (10min 14000rpm) konnte die Viruslösung von den Zelltrümmern abgenommen und bei -80°C aufbewahrt werden.

Titration der Virusstocks

Für die Bestimmung des Virustiter durch Immunfluoreszenz wurden am Vortag in 4- Kammer- Objektträgern pro well 50000 911- Zellen ausgesät. Am Tag der Infektion wurde das Medium gewechselt und eine serielle Verdünnungsreihe (1:10 – 1:10000) des Virusstocks nach folgendem Schema erstellt:

1 µl des Virusstocks + 99 µl PBS^{def} = 1:100

1 µl davon + 99 µl PBS^{def} = 1:10000

Ins erste well wurden 10 µl der ersten Verdünnung gegeben (dies entspricht einer Verdünnung des Virusstock von 1:10), ins zweite well 1µl der ersten Verdünnung (1:100), ins dritte well 10 µl der zweiten Verdünnung (1:1000) und ins vierte well 1 µl der zweiten Verdünnung (1:10000).

Die Zellen wurden für 20 – 24 h bebrütet. Am nächsten Tag wurden die Zellen gegen E2A immunfluoreszenzgefärbt. E2A ist ein virales Protein, bei gleichzeitiger Färbung der Zellkerne mit DAPI kann die Anzahl der infizierten Zellen ermittelt werden. Gezählt wird optimalerweise in dem well, in dem alle Zellen dem OT anhaften und die Anzahl der nichtinfizierten Zellen bei 70- 95 % liegt. Aus dem Verhältnis infizierter Zellen zur Gesamtzellzahl errechnet sich der Anteil infektiöser Partikel (ffu) pro ml Virusstock.

Transfektion von DNA in Zellen (Lipofektion)

Mit Hilfe von kationischen Lipidvesikeln kann Fremd-DNA durch die Zellmembran in die Zelle geschleust werden. Die DNA wird dabei an die Oberfläche der Lipidvesikel gebunden und bei Fusion mit der Zellmembran ins Zellinnere freigesetzt. Die verwendeten Liposome sind einschichtig und bestehen aus Phospholipiden gemischt mit anderen chemischen Verbindungen, die die Interaktion mit Zellmembran und DNA erleichtern. Die erste dieser Chemikalien war DOTMA (N-[1-(2,3-dioleyloxy)propyl]-N,N,N-trimethylammonium chloride) (Felgner et al., 1987).

In dieser Arbeit wurde die Transfektion hauptsächlich benutzt, um konstruierte Virus- DNA in 911- Zellen einzuschleusen, um dort das Virus zu kultivieren.

Die Transfektion wurde mithilfe des Lipofectamine Transfektions- Kits wie folgt durchgeführt: Am Vortag wurden 100 000 Zellen pro well in einer 6 Loch Kulturplatte ausgesät. Es wurden Proben von 2, 4 und 8 µl DNA in $DMEM^{leer}$ ad 94 µl gevortext, 6 µl Plus- Reagenz wurden hinzugefügt. In einem zweiten Reaktionsgefäß wurden pro Probe je 4 µl Lipofectamine und 96 µl $DMEM^{leer}$ gut gemischt. Dann wurden die beiden Ansätze zusammengegeben und 15 Min bei Raumtemperatur stehen gelassen. Die ausgesäten Zellen wurden in der

Zwischenzeit vorbereitet: Ein Medienwechsel wurde durchgeführt und die Zellen mit 800 µl $DMEM^{leer}$ + Transfektionsansatz bedeckt. Es erfolgte eine dreistündige Inkubation auf dem Schüttler im Brutschrank. Danach wurden die Zellen wieder mit Vollmedium versorgt. Für die Viruserstellung wurde dann das well mit der besten Transfektionseffizienz ausgewählt.

Proteinchemische & immunologische Methoden

Western Blot

Beim Western Blot werden Proteine im SDS-Polyacrylamid- Gel elektrophoretisch nach Molekulargewicht aufgetrennt und danach auf eine Nitrozellulosemembran übertragen (geblottet). Auf der Membran können sie durch immunchemische Methoden sichtbar gemacht werden.

Ernten der Zellen und Probenweiterverarbeitung:

Die Zellen wurden vom Boden der Gewebekulturplatte abgeschabt, mit Medium in ein Eppendorfgefäss überführt und für 5 Minuten bei 1900 rpm zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das Pellet trocken gevortext. Nach dem Zugeben von 200 µl eiskaltem RIPA-Puffer pro Probe, wurde erneut gevortext.
Das Zelllysat wurde mit 50 µl 6xLaemmli-Puffer versetzt.
Die Proben wurden bei 95°C für 5 Minuten denaturiert. Danach wurden sie auf einem Schüttler bei 4°C für 30 min inkubiert, anschließend erfolgte eine Zentrifugation bei maximaler Geschwindigkeit für mindestens 15 Minuten, damit die genomische DNA geschert wurde und sich der Proteinanteil leichter pipettieren ließ.
Wurden die Proben nicht sofort weiterverarbeitet, wurden sie bei -20°C aufbewahrt.
Bevor eingefrorene Proben auf ein Gel aufgetragen wurden, wurden diese bei 95°C aufgekocht und anschließen zentrifugiert.

Auftrennung von Proteinen durch SDS-Gelelektrophorese:

Die SDS-Elektrophorese wurde erstmals von dem Schweizer Wissenschaftler Ulrich Laemmli durchgeführt (Laemmli, 1970).

Die Proben werden durch Erhitzen denaturiert, zusätzlich werden die Disulfidbrücken mittels Zusatz von DTT (Laemmli-Puffer) reduziert.

Der Einsatz des anionischen Tensids Natriumdodecylsulfat (SDS) führt zur Denaturierung der Proteine und zur Überdeckung der Eigenladung, so dass allein der Molekularsiebeffekt des Gels zur Auftrennung der Proben beiträgt.

Um eine bessere Trennschärfe zu erreichen wird dem Trenngel (pH ca. 8,8 – 10% Acrylamid) ein Sammelgel (pH ca. 6,8) vorgeschaltet, in dem die Proben konzentriert werden, bevor sie in das Trenngel eintreten.

Die Taschen des Gels wurden mit 30 µl der Proben beladen. Die Elektrophorese erfolgte bei einer Stromstärke von 250 mA und einer Spannung von 100 V für ca. 60 Minuten. Als Marker wurde der Protein-Größenstandard RPN 800 der Firma Amersham Life Science verwendet.

Blotten der aufgetrennten Proteine auf Nitrozellulose:

Zum Übertragen der aufgetrennten Proteine auf die Nitrozellulosemembran wird eine elektrische Spannung senkrecht zum Gel angelegt. Die Proteine wandern dann entsprechend ihrer Ladung und haften aufgrund hydrophober Wechselwirkungen an der Oberfläche der Membran. Die Übertragung erfolgte in Plastikkammern der Firma BioRad. Auf die weiße Seite des Halters wurde der Aufbau wie folgt geschichtet: In Transferpuffer getränkter Schwamm, drei Lagen Whatmanpapier, die exakt auf das Gel zugeschnittene Nitrozellulose, das Gel, drei Lagen Whatmanpapier, ein weiterer Schwamm. Alles wurde gut mit Transferpuffer getränkt und blasenfrei aufeinandergeschichtet. Der schwarze Plastikhalter wurde geschlossen. Die Kammer wurde vollständig mit Transferpuffer gefüllt und der Plastikhalter so eingebracht, dass die schwarze Seite zur schwarzen Elektrode zeigte. Geblottet wurde bei 37 Volt und maximaler Stromstärke über Nacht.

Immunfärbung des Blots:

Um die auf der Nitrozellulosemembran gebundenen Proteine zu renaturieren und der Detektion durch Antikörper zugänglich zu machen, wird das angelagerte SDS ausgewaschen. Hierzu wurde zunächst die Membran aus der blot- Kammer entnommen, die Seite mit den Proteinen mit Bleistift markiert und die Membran mit PBS^{++} abgespült um Austrocknen zu verhindern.

Danach wurden freie Bindungsstellen auf der Nitrozellulose durch Blocken in Milch-Lösung (PBS^{++}, 5% Magermilchpulver, 0,05% Tween) ab gesättigt. Dies erfolgte für eine halbe Stunde im Taumler bei Raumtemperatur. Es war darauf zu achten, dass die Nitrozellulose vollständig mit Milch bedeckt ist.

Es schlossen sich folgende Schritte an:

- 1. Antikörper: Verdünnung (in Milch- Lösung) und Inkubationszeit je nach dem zu detektierenden Protein (Standard 2h)
- Waschen: 3x kurz PBS^{++}, 1x 15 min Milch- Lösung, 3x kurz PBS^{++}, 1x 15 min Milch- Lösung, 3x kurz PBS^{++}
- 2. Antikörper (Jackson- Peroxidase- gekoppelt): Verdünnung (in 15 ml Milch-Lösung) und Inkubationszeit je nach dem zu detektierenden Protein (Standard 1h)
- Waschen: 3x kurz PBS^{++}, 1x 15 min Milch- Lösung, 3x kurz PBS^{++}, 1x 15 min Milch- Lösung, 3x kurz PBS^{++}

Detektion der markierten Proteine:

Zur Detektion wurden die beiden Komponenten (Luminol/Enhancer und Peroxidlösung) des SuperSignal West Dura / Femto Kits 1:1 gemischt. Durch die am Zweitantikörper gekoppelte Peroxidase wird ein zyklisches Diacylhydrazid (Luminol) oxidiert und in den angeregten Zustand überführt. Beim anschließenden Übergang in den Grundzustand wird die freiwerdende Energie in Licht umgesetzt, das einen Film schwärzt.

Der Blot wurde auf drei Seiten in Plastikfolie eingeschweißt, dadurch konnte er mit möglichst wenig Reagenzlösung optimal bedeckt werden. Anschließend wurden überschüssige Reagenzlösung und Luftblasen durch Ausstreichen entfernt und der Blot vollständig eingeschweißt.

Der eingeschweißte Blot wurde in der Dunkelkammer mit einem Film belegt und dieser nach Exposition in der Entwicklermaschine entwickelt. Die Expositionszeit betrug je nach untersuchtem Protein zwischen 0,5 Sekunden und Exposition über Nacht.

Immunfluoreszenzfärbung (indirekt)

Durch Immunfluoreszenz können virale und körpereigene Proteine in ihrer intrazellulären Lokalisation sichtbar gemacht werden. Dabei wird das Antigen durch spezifische Antikörper gebunden. Ist der Fluoreszenzfarbstoff direkt an den Erstantikörper gebunden, spricht man von direkter Immunfluoreszenz, wird zur Detektion des Erstantikörper- Antigen- Komplexes ein fluoreszenzgekoppelter Zweitantikörper verwendet, wird dies als indirekte Immunfluoreszenz bezeichnet. Das Fluoreszenzsignal bei der indirekten Immunfluoreszenz meist stärker, da hier mehrere Zweitantikörper an den Erstantikörper binden können. In dieser Arbeit wurde ausschließlich die indirekte Immunfluoreszenzfärbung verwendet, um die transgenen Proteine zu detektieren.

Infektion der Zellen:

Es wurden pro Kammer eines 4 chamber-slides 50 000 Zellen ausgesät und nach 12- 24 h mit den jeweiligen Viren infiziert.

Fixierung und Permeabilisierung der Zellen:

24 h nach Transfektion/ Infektion wurden die Zellen mit PBS^{++} gewaschen und mit 400 µl 4% Paraformaldehyd über 20 min bei RT fixiert. Das Paraformaldehyd wurde entfernt, die Zellen 2x mit PBS^{++} gewaschen. Danach erfolgte die Permeabilisierung der Zellen mit 400 µl 0,2% Triton-X-100 in PBS^{++} pro well über 25 min bei RT. Durch die Permeabilisierung wird die Zellmembran durchlässig für den Antikörper. Anschließend wurde 4x mit PBS^{++} gewaschen. Um freie Bindungsstellen zu belegen wurde danach 10 Min mit 400 µl Blocking Solution (10% FCS in PBS^{++}) pro well inkubiert.

Antikörperinkubation:

Die Zellen wurden 1 h bei RT mit dem Erstantikörper inkubiert. Die entsprechenden Verdünnungen (in Blocking Solution) sind bei den Antikörpern angegeben. Danach wurden die Zellen 2x kurz und einmal 5 Minuten mit PBS^{++} gewaschen. Die Inkubation des Zweitantikörpers (Abschnitt 2.4) erfolgte bei RT 30 Min im Dunkeln. Danach wurden die Zellen 2x kurz und einmal 5 Minuten mit PBS^{++} gewaschen und die wells vom Objektträger entfernt.

DAPI-Färbung:

4‘,6’Diamidino-2-phenylindol (DAPI) ist ein DNA- Interkalator, der sich überwiegend an AT-reiche Regionen der großen Furche anlagert. Er fluoresziert im UV- Licht cyanfarben. Die Färbung mit DAPI erfolgte zur Bestimmung der Zellzahl und Lokalisation der Zellkerne. Die Zellen wurden für 5 Min im Dunkeln mit 200µl DAPI (1:10000 in PBS^{++}) überschichtet und danach kurz mit PBS^{++} gewaschen.

Eindeckeln und Auswerten der Immunfärbung:

Die Zellen wurden mit einigen Tropfen Fluoprep (Eindeckmittel mit 5% DABCO) bedeckt und das Deckglas vorsichtig und blasenfrei aufgelegt. Durch leichtes Andrücken von einer Seite her wurden übriggebliebene Blasen und überschüssiges Eindeckmittel entfernt. Die Härtung erfolgte über 30 Min im Dunkeln.

Die Präparate wurden schließlich im Fluoreszenzmikroskop (Axiovert, Zeiss, Wetzlar) betrachtet und mit einer Digitalkamera (Kappa) fotografiert.

Molekularbiologische Methoden

RNA- Präparation aus Virus- infizierten Zellen

Die RNA- Extraktion mit Trizol beruht auf der von Chomczynski und Sacchi beschriebenen single Stepp- Methode (Chomczynski & Sacchi, 1987). Die Zellen werden in GTC lysiert, wodurch Proteine und RNAsen inaktiviert werden, dann werden die denaturierten Proteine in Phenol ausgefällt. Die RNA löst sich in der wässrigen Phase und kann ausgefällt werden.
Die Präparation erfolgt unter möglichst RNase- freien Bedingungen.
Die Zellen wurden 24 h p.i. mit 1ml Trizol überschichtet und 10 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert, waren die Zellen noch adhärent, geschah dies im well, hatten sich viele gelöst, wurden sie zunächst abgeschabt und pelletiert. Danach wurde zur vollständigen Lyse kurz auf und ab pipettiert und das Lysat in ein RNase- freies 2ml Eppi überführt, mit 200 µl Chloroform versetzt und nach kräftigem Schütteln und dreiminütigem Inkubieren 15 Minuten bei 12000rpm zentrifugiert. Hierbei wurden die beiden Phasen getrennt. Die wässrige Phase wurde abgenommen, ohne Teile der organischen Phase mit zu übertragen, und mit 500 µl Isopropanol versetzt. Nach zehnminütiger Inkubation bei Raumtemperatur konnte die ausgefällte RNA durch Zentrifugation pelletiert werden. Das Pellet wurde in 75prozentigem Ethanol gewaschen, getrockenet und anschließend in 20 µl RNase-freiem Wasser mit EB resuspendiert.

Herstellung von cDNA durch reverse Transkription

Da RNAs sehr umweltlabil sind und sich der Amplifikation durch DNA-Polymerasen entziehen, ist es notwendig, sie zur weiteren Analyse in DNA umzuschreiben. Hierfür bedient man sich des viralen Enzyms reverse Trankriptase. Es können genspezifische, Zufalls- Primer oder oligo-dT- Primer verwendet werden. Diese hybridisieren mit dem poly-A- cap der zellulären mRNA, so dass ein Überblick über die aktuell in der Zelle transkribierten Gene gewonnen wird. Auf diese Weise aus mRNA gewonnene DNA wird als copyDNA (cDNA) bezeichnet.

Da die in dieser Arbeit untersuchte RNA weiter mittels qrt-PCR analysiert werden sollte, wurde für die reverse Transkription das „1st strand cDNA synthesis kit for RT-PCR (AMV)“ von Roche verwendet.

Reaktionsansatz:

Reaktionspuffer 10x	2 µl
$MgCl_2$ 25mM	4 µl
dNTP- Mix	2 µl
random primer	2 µl
RNAse inhibitor	1 µl
reverse Transkriptase	0,8 µl
RNA	1 µg
Aqua ad	20 µl

Dieser Reaktionsansatz wurde in sterilen, RNAse freien Mikroeppendorfgefäßen kurz gevortext und für 10 min bei 25°C und für 60 min bei 42°C inkubiert. Nach Abschluss der Reaktion wurde eine qrt-PCR angeschlossen.

Amplifikation von DNA durch Polymerase- Ketten- Reaktion (PCR)

Die Polymerase- Ketten- Reaktion (PCR) ist eine Methode zur Amplifikation eines DNA- Abschnittes, der von zwei Primern (bekannte Oligonukleotide) begrenzt wird. Sie wurde 1983 von Kary Banks Mullis entwickelt und später durch den Einsatz der thermostabilen Taq- Polymerase verbessert (Saiki et al., 1988). Mittels PCR ist der Nachweis auch kleinster Mengen DNA möglich. Es können Fragmente bis zu einer Länge von 3000 bp vervielfältigt werden. Die PCR erfolgt über 20 - 50 Zyklen, die aus folgenden Schritten bestehen:

1. Denaturierung: Schmelzen der Doppelstränge bei >90°C
2. Annealing: Anlagerung der Primer bei Temperaturen von 2-3°C unter deren Schmelzpunkt (ca. 50 -65°C)
3. Elongation: Aufbau des komplementären Strangs durch Polymerase in 3‘- 5‘-Richtung (70°C)

Durchführung der PCR:

Die PCR-Reaktionen wurden in dem programmierbaren Heizblock „geneAmp PCR System 2400“ und in Mikroeppendorfgefäßen durchgeführt.

Reaktionsansatz (Enzym: PFU-turbo-Polymerase):

5 µl PCR-Puffer 10x
0,5 µl dNTP-Mix (20mM)
2 µl Primer vorwärts (100 ng)
2 µl Primer rückwärts (100 ng)
1 µl DNA- Template (50 – 100 ng)
1 µl PFU-turbo-Polymerase (Stratagene)
ad 50 µl H_20 dest.

Die Amplifikation erfolgte nach folgendem Schema:

Denaturierung	94°C	2 min
(1 Zyklus)		
Denaturierung	94°C	15 sec
Annealing	60°C	30 sec
Elongation	72°C	2 min
(10 Zyklen)		
Denaturierung	94°C	15 sec
Annealing	60°C	30 sec
Elongation	72°C	2 min + 5 sec/Zyklus
(20 Zyklen)		
Elongation	72°C	7 min
(1 Zyklus)		

Die amplifizierte DNA wurde mit dem PCR- Purification- Kit (Qiagen) gereinigt und dann entweder weiterverarbeitet (Restriktionsverdau, Sequenzierung, elektrophoretische Auftrennung im Agarose- Gel) oder bei -20°C aufbewahrt.

Quantifizierung von DNA mittels real-time PCR (qrt-PCR)

Um die in einer Probe enthaltene DNA- Menge während der Vervielfältigung zu bestimmen (real time– Messung), wird zum PCR- Reaktionsgemisch ein Fluorochrom (z.B. SYBR- green) hinzugegeben, dessen Fluoreszenz ansteigt, wenn es in doppelsträngige DNA interkaliert. Die real-time PCR kombiniert somit die klassische PCR mit Fluoreszenz- Messungen am Ende jedes Zyklus. Die Reaktion läuft in Glaskapillaren in einer speziellen PCR- Maschine (light cycler) ab, welche auch die Fluoreszenzmessung durchführt. Nach durchgeführter PCR wird eine Schmelzkurvenanalyse durchgeführt, um die Spezifität zu bestimmen. Der Schmelzpunkt des Fragmentes liegt dabei höher als der von Primerdimeren. Durch Fluoreszenzanalyse ist eine relative Quantifizierung möglich, wenn eine interne Kontrolle gewählt wird. Dies sollte das Transkript eines Genes sein, das leicht zu detektieren ist, und dessen Expressivität nicht durch den Zellzyklus oder die experimentelle Behandlung verändert wird. Außerdem wird für jede Probe eine Wasserkontrolle (enthält keine DNA angefertigt, um die Hintergrundfluoreszenz relativieren zu können.
Wenn der qrt-PCR eine reverse Transkription vorausgeschaltet wird, ist eine Quantifizierung der cDNA und somit eine Aussage über die Menge der betreffenden mRNA in der Zelle möglich.

In dieser Arbeit wurde die qrt PCR eingesetzt, um die Transkription der β-catenin-abhängigen Genen c-myc und cyclin D1 unter Einwirkung von ΔNp63α zu analysieren. Als interne Kontrolle wurde GAPDH verwendet. Hierzu wurden folgende PCR- Protokolle erstellt:

Reaktionsansatz

cDNA	5 µl
Primer 5µM	2 µl
MasterMix	4 µl
Aqua ad	15 µl

<u>c-myc + GAPDH</u>

Amplifikation

Denaturierung	95°C	10 sec
Annealing	57°C	10 sec
Elongation	72°C	15 sec
(45 Zyklen)		

Schmelzkurve

62°C → 95°C	+1°C	15 sec

<u>Cyclin D1</u>

Amplifikation

Denaturierung	95°C	10 sec
Annealing	60°C	10 sec
Elongation	72°C	10 sec
(45 Zyklen)		

Schmelzkurve

65°C → 95 °C	+1°C	15 sec

Das entstandene Produkt wurde auf dem Agarosegel analysiert und archiviert.

Verdau doppelsträngiger DNA durch Restriktionsendonukleasen

Durch Verdau mit Restriktionsendonukleasen kann doppelsträngige DNA an vorgegebenen Stellen fragmentiert werden. Bakterielle Restriktionsenzyme werden in drei Typen klassifiziert: Typ I – Enzyme spalten DNA an einer zufälligen Stelle weit von der Erkennungssequenz entfernt. Typ II Enzyme schneiden innerhalb der Erkennungssequenz ohne ATP-Verbrauch und Typ III Enzyme schneiden etwa 25 bp von der Erkennungssequenz entfernt. Daher werden üblicherweise Typ II- Enzyme verwendet. Die nach Verdau der Palindromsequenz entstandenen Fragmente können glatt sein, oder überhängende Enden besitzen.

Restriktionsansatz:
10 µg DNA
10/20 U/µl Restrikionsendonuklease
Puffer
BSA
H_2O

In dieser Arbeit wurde der Restriktionsverdau genutzt, um Vektoren und Inserts für die Klonierung zu schneiden, aber auch, um die Orientierung des Inserts bei blunt- end Ligationen zu überprüfen. Bei bekannter Gensequenz kann die Zahl und Größer der zu erwartenden Fragmente errechnet werden, die sich bei unterschiedlicher Orientierung des Inserts unterscheiden.

Verknüpfung einzelner DNA- Abschnitte durch Ligation

Zur Klonierung von Fremd-DNA in Vektorplasmide bedient man sich der Aktivität des Enzyms Ligase. Diese verknüpft unter ATP- Verbrauch freiliegende DNA- Enden. In dieser Arbeit wurde die T4- Ligase verwendet, welche sowohl glatte als auch überhängende Restriktionsenden verknüpft.
Zunächst wurde der Vektor per Restriktionsverdau linearisiert und gereinigt. Dann wurde Insert im Überschuss zugegeben und 2h bei RT ligiert. Der Ligationserfolg wurde per Gelelektrophorese überprüft.

Ligationsansatz:
1 µl Vektor
6 µl Insert
1 µl T4- Ligase
1 µl T4- Ligasepuffer
1 µl 100 µM ATP

Besitzen Insert und Vektor für eine Klonierung keine Schnittstellen die komplementäre Enden produzieren würden, muss die Ligation blunt end, also ohne überhängende Enden durchgeführt werden. Der Nachteil dieser Methode ist, dass die Orientierung des Inserts variieren kann. Bevor das Produkt weiterverarbeitet werden kann, muss die Orientierung überprüft werden.
Manchmal ist es nötig, überhängende Enden zu “glätten”. Dafür verwendet man die Pfu- Polymerase.

Reaktionsansatz “fill- up- reaction”:

Probe eluiert in	50 µl EB
20 mM dNTPs	0,8 µl
Puffer	5 µl
Cleaved Pfu	2 µl

5 Min bei 37°C, dann Reaktionsstop bei 70°C.

Auftrennung von DNA- Fragmenten im Agarosegel

Die Auftrennung von DNA- Fragmenten unterschiedlicher Größe ist mittels Elektrophorese im Agarosegel möglich. Die Auftrennung der unterschiedlichen Fragmente beruht auf dem Molekularsiebeffekt der Agarose, da die Agarosepolymere eine Netzstruktur ausbilden. Die „Porengröße“ des Gels hängt von der Agarosekonzentration ab. Die üblichen Konzentrationen betragen 0,5 – 2 %. Üblicherweise wird die DNA durch Ethidiumbromid sichtbar gemacht (Sharp, Sugden, & Sambrook, 1973) welches im interkalierten Zustand im UV-Licht fluoresziert, aber auch bei Tageslicht sichtbare Farbstoffe können

verwendet werden(Adkins & Burmeister, 1996). In dieser Arbeit wurden zur Auftrennung von DNA 0,5%ige Gele und zur Auftrennung von RNA 2%ige Gele verwendet, die mit Ethidiumbromid gefärbt wurden. Die Standardspannung liegt bei

$<5V \times cm^{-1}$ Elektrodenabstand, damit das Gel sich nicht erwärmt und schmilzt (Sambrook, Sugden, Keller, & Sharp, 1973).

Durchführung: Die Gießkammer wurde vorbereitet und der Gelkamm gesteckt. Dann wurde die Agarose in TAE- Puffer aufgekocht und auf 60°C abkühlen gelassen, 0,1 µl/ml Ethidiumbromid zugesetzt, das Gel wurde gegossen. Nach vollständigem Aushärten des Geles wurde die seitliche Abdichtung der Gelkammer entfernt und das Gel in die mit TAE gefüllte Elektrophoresekammer gegeben. Vorsichtig wurde es mit einer DNA- Leiter und den mit 6x Probenpuffer versetzen DNA- Proben beladen. Die Pipettenspitze sollte dabei nicht das Gel berühren, die Proben sinken aufgrund des zugesetzen Puffers in die Taschen. Die Auftrennung erfolgte bei einer Spannung von 80 -100 V bis der Kontollfarbstoff aus dem Probenpuffer den unteren Gelrand erreicht hatte. Das Gel wurde dann unter UV- Licht fotografiert und das Ergebnis interpretiert.

Sequenzierung von DNA

Eine auf Kettenabbruch beruhende Methode zur Sequenzierung von DNA wurde von Frederick Sanger entwickelt (Sanger, Nicklen, & Coulson, 1977). In der heutigen Abwandlung werden fluoreszenzmarkierte Didesoxynukleotidphosphate statt radioaktiv markierter verwendet. Jede Base ist mit einem anderen Farbstoff gekennzeichnet, so dass alle vier ddNTPs in einem Reaktionsgemisch gehandhabt werden können. Im Reaktionsgemisch liegen Nukleotide mit allen vier Basen, ein Primer und der zu sequenzierende DNA- Strang in denaturierter Form vor. Während der Sequenzierreaktion, welche der PCR ähnelt, kommt es zum Kettenabbruch, immer wenn ein ddNTP eingebaut wird. Das Endprodukt enthält dann verschieden lange Polynukleotide. Diese werden per Kapillarelektrophorese aufgetrennt, wobei die Farbstoffe durch Laserbestrahlung zur Fluoreszenz angeregt werden. Ein Detektor zeichnet die Basenabfolge auf.

Sequenzieransatz:
100 ng DNA
7,5 pmol Primer
Aqua ad 6 µl

Die Zugabe der Polymerase und des Reaktionsgemisches wurde freundlicherweise von wöchentlich unterschiedlichen Mitgliedern des Instituts für das ganze Labor übernommen. Die Fluoreszenz wurde Computergesteuert ausgewertet (ABI Prism Sequencing Analysis Software, Sequence Navigator, ABI Prism Sequence Analysis).

Herstellung rekombinanter Adenoviren

Das System von He et al zur Generierung rekombinanter Adenoviren wurde in Abschnitt 1.2 vorgestellt.
Das Zielgen wird zunächst in einen Shuttlevektor (pAdTrackCMV) kloniert. Dieser enthält eine Kanamycinresistenz, eine PmeI- und zwei PacI-Schnittstellen und zwei CMV- Promotoren. Einem ist GFP nachgeschaltet, der andere reguliert später das Zielgen.
Dieses Plasmid wird nach Vermehrung in DH10b- E.colis und Linearisierung mit PmeI in E.coli Bakterien elektroporiert, die bereits ein Plasmid (BJ5183 pAdEasy1) enthalten, in dem das virale backbone kodiert wird. Durch Rekombination wird in den Bakterien das komplette Virusgenom hergestellt. Die Funktion dieses Plasmides wird durch Nachweis der Fremdgenexpression überprüft.
Das Virus ist E1 defizient und kann sich daher nur in Zellen vermehren, die E1 enthalten, z.B. 911 Zellen. In diesen wird das Virus nach Exzision mit PacI vermehrt. Die Vermehrung wird anhand der GFP- Expression verfolgt. Wenn alle Zellen durchinfiziert sind, wird das Virus geerntet.

Hier eine Übersicht über die Herstellung von Viren in dieser Arbeit in tabellarischer Form:

Ad-	β-catenin	β-cat S33Y	ΔN p63α	TCF4	ΔN TCF4
Primer mit Restriktionsschnittstelle für Insert	nein	ja (siehe Material)	ja	ja	ja
Insert geschnitten mit	XbaI NheI	BglII XhoI	BglII XhoI	KpnI XbaI	KpnI XbaI
AdTrackCMV geschnitten	Eco RV	Bgl II Xho I	Bgl II XhoI	KpnI XbaI	KpnI XbaI
Ligation	blunt end	sticky end	sticky end	sticky end	sticky end
Insert/Vektor	6:1	6:1	6:1	6:1	6:1
Elektroporation in	DH10b AdEasy1	DH10b AdEasy1	DH10b AdEasy1	DH10b AdEasy1	DH10b AdEasy1
Überprüfung durch	Sequenzierung	Luc-Assay	Luc-Assay	IF-Färbung	IF-Färbung
Virusernte nach	10d	10d	10d	11d	11d

Ergebnisse

Erstellen rekombinanter Adenoviren mit dem pAdEasy- System

Für die Herstellung rekombinanter Adenoviren mit Hilfe des pAdEasy- Systems wurden die gewünschten Transgene zunächst in den Shuttlevektor pAdTrack-CMV kloniert. Dieser wurde dann in E.coli mit pAdEasy-1 rekombiniert um das Virus- backbone zu erhalten.

Zur Untersuchung sämtlicher Komponenten der β-catenin- gesteuerten Genexpression sollen Vektoren zur Überexpression von β-catenin, ΔNp63α und TCF-4 erstellt werden. Zur Negativkontrolle zudem für die N-terminal defiziente Form TCF-4 ΔN, die dominant negativ auf die β-catenin – vermittelte Transkription wirkt. Ebenso für β-cateninS33Y, eine Mutante, die nicht durch GSK-3β- phosphoryliert und destabilisiert wird, und daher länger und stärker aktiv ist.

Adβ-catwt

Der Genort für β-catenin befindet sich auf Chromosom 3p21. Die CDS ist in Abb. 4.1 dargestellt.

Der für die Virusgenerierung benutze Shuttle- Vektor pAd-Track-CMV-β-catenin-wt ist in Abbildung 4.2 dargestellt. Das Plasmid enthält hinter einem CMV- Promotor das Zielgen β-catenin (gelb) und ein Reportergen (eGFP, grün) zur Beurteilung der Virusreplikation. Blau dargestellt sind die zur Rekombination nötigen adenoviralen Sequenzen. Nach Verdau mit PacI entfällt die für die bakterielle Selektion notwendige Kanamycin- Resistenz (orange). Entsprechend dem Protokoll von He et al. (Methoden, Abschnitt 3.3.9) wurde das Virus Ad β-catenin gewonnen. Das fertige Viruskonstrukt wurde mit PmeI linearisiert und in 911- Zellen transfiziert. Die Virusreplikation wurde über die Expression von GFP beobachtet. Nach 10 Tagen wurde der Virusstock präpariert.

```
 241                              at ggctactcaa gctgatttga tggagttgga
 301 catggccatg gaaccagaca gaaaagcggc tgttagtcac tggcagcaac agtcttacct
 361 ggactctgga atccattctg gtgccactac cacagctcct tctctgagtg gtaaaggcaa
 421 tcctgaggaa gaggatgtgg atacctccca agtcctgtat gagtgggaac agggattttc
 481 tcagtccttc actcaagaac aagtagctga tattgatgga cagtatgcaa tgactcgagc
 541 tcagagggta cgagctgcta tgttccctga gacattagat gagggcatgc agatcccatc
 601 tacacagttt gatgctgctc atcccactaa tgtccagcgt ttggctgaac catcacagat
 661 gctgaaacat gcagttgtaa acttgattaa ctatcaagat gatgcagaac ttgccacacg
 721 tgcaatccct gaactgacaa aactgctaaa tgacgaggac caggtggtgg ttaataaggc
 781 tgcagttatg gtccatcagc tttctaaaaa ggaagcttcc agacacgcta tcatgcgttc
 841 tcctcagatg gtgtctgcta ttgtacgtac catgcagaat acaaatgatg tagaaacagc
 901 tcgttgtacc gctgggacct tgcataacct ttcccatcat cgtgagggct tactggccat
 961 ctttaagtct ggaggcattc ctgccctggt gaaaatgctt ggttcaccag tggattctgt
1021 gttgttttat gccattacaa ctctccacaa ccttttatta catcaagaag gagctaaaat
1081 ggcagtgcgt ttagctggtg ggctgcagaa aatggttgcc ttgctcaaca aaacaaatgt
1141 taaattcttg gctattacga cagactgcct tcaaatttta gcttatggca accaagaaag
1201 caagctcatc atactggcta gtggtggacc ccaagcttta gtaaatataa tgaggaccta
1261 tacttacgaa aaactactgt ggaccacaag cagagtgctg aaggtgctat ctgtctgctc
1321 tagtaataag ccggctattg tagaagctgg tggaatgcaa gctttaggac ttcacctgac
1381 agatccaagt caacgtcttg ttcagaactg tctttggact ctcaggaatc tttcagatgc
1441 tgcaactaaa caggaaggga tggaaggtct ccttgggact cttgttcagc ttctgggttc
1501 agatgatata aatgtggtca cctgtgcagc tggaattctt tctaacctca cttgcaataa
1561 ttataagaac aagatgatgg tctgccaagt gggtggtata gaggctcttg tgcgtactgt
1621 ccttcgggct ggtgacaggg aagacatcac tgagcctgcc atctgtgctc ttcgtcatct
1681 gaccagccga caccaagaag cagagatggc ccagaatgca gttcgccttc actatggact
1741 accagttgtg gttaagctct tacacccacc atcccactgg cctctgataa aggctactgt
1801 tggattgatt cgaaatcttg ccctttgtcc cgcaaatcat gcacctttgc gtgagcaggg
1861 tgccattcca cgactagttc agttgcttgt tcgtgcacat caggataccc agcgccgtac
1921 gtccatgggt gggacacagc agcaatttgt ggagggggtc cgcatggaag aaatagttga
1981 aggttgtacc ggagcccttc acatcctagc tcgggatgtt cacaaccgaa ttgttatcag
2041 aggactaaat accattccat tgtttgtgca gctgctttat tctcccattg aaaacatcca
2101 aagagtagct gcaggggtcc tctgtgaact tgctcaggac aaggaagctg cagaagctat
2161 tgaagctgag ggagccacag ctcctctgac agagttactt cactctagga atgaaggtgt
2221 ggcgacatat gcagctgctg ttttgttccg aatgtctgag gacaagccac aagattacaa
2281 gaaacggctt tcagttgagc tgaccagctc tctcttcaga acagagccaa tggcttggaa
2341 tgagactgct gatcttggac ttgatattgg tgcccaggga gaacccccttg gatatcgcca
2401 ggatgatcct agctatcgtt cttttcactc tggtggatat ggccaggatg ccttgggtat
2461 ggaccccatg atggaacatg agatgggtgg ccaccaccct ggtgctgact atccagttga
2521 tgggctgcca gatctggggc atgcccagga cctcatggat gggctgcctc caggtgacag
2581 caatcagctg gcctggtttg atactgacct gtaa
```

Abb. 4.1:CDS β-catenin, GeneID:1499 OMIM: 116806

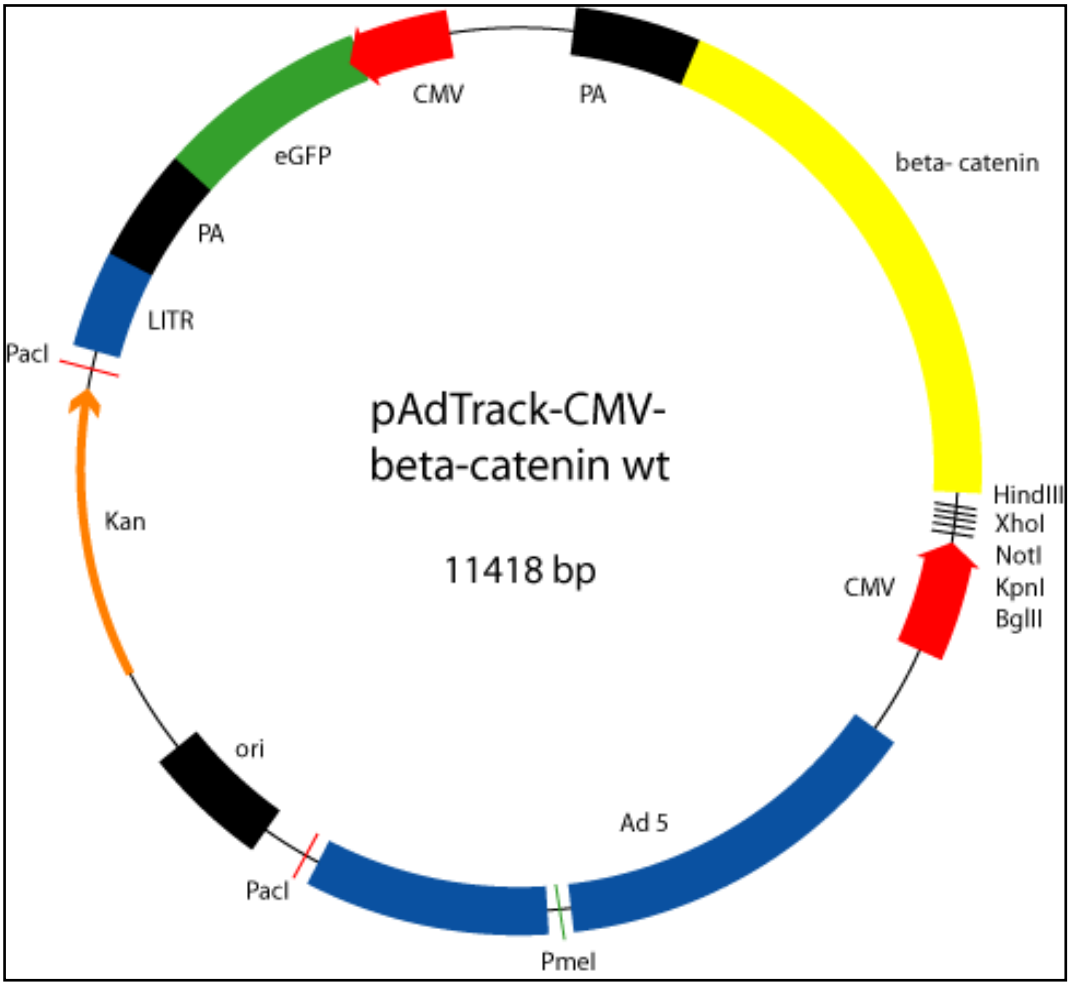

Abb. 4.2: pAdTrackCMV-β-catenin

Balken stellen Gene dar, Querstriche mögliche Restriktionsschnittstellen

Blau dargestellt: Adenovirale Sequenzen. Rot: Promotor. Gelb: Fremdgen. Grün: Reportergen

Abkürzungen: ori = origin, Kan = Kanamycinresistenz, Ad 5 = virale Proteine, PA = Polyadenylierungssite, LITR = linke ITR

Die β-catenin- Expression durch das Virus wurde in 911- und H1299- Zellen überprüft (Abb. 4.3)

Die Immunfluoreszenz zeigt, dass β-catenin im Kern und Zytoplasma infizierter H1299- Zellen exprimiert wird. Dargestellt ist die Negativkontrolle (Zeile 1) und die mit β-catenin infizierten Zellen (Zeile 2). In der ersten Spalte ist die DAPI-Färbung der Zellkerne gezeigt, in der zweiten die rote Fluoreszenz der Antkörper gegen β-catenin, in der dritten GFP. Eine Expression von β-catenin im Zellkern ist zu beobachten.

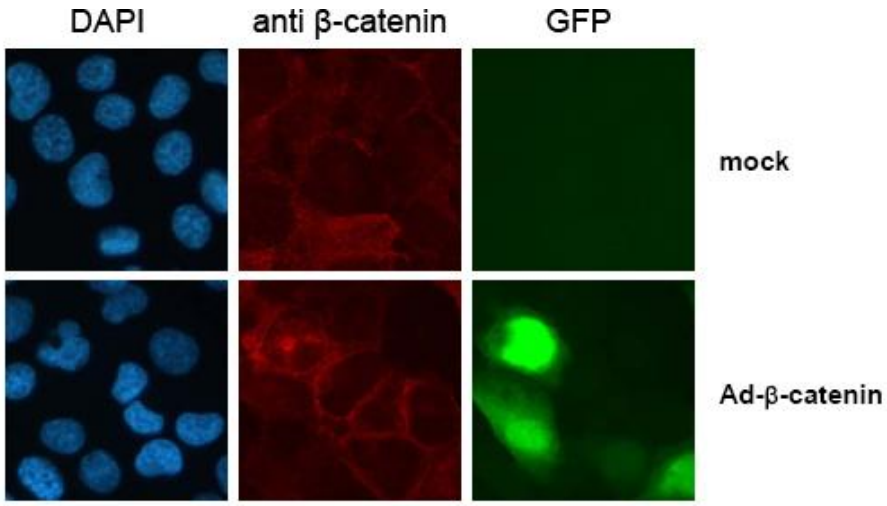

Abb. 4.3: Nachweis der Transgenexpression in H1299- Zellen

H1299- Zellen wurden in 4-well- Objektträgern ausgesät und mit einer und Ad-β-catenin infiziert. Als Negativkontrolle wurden uninfizierte Zellen benutzt (Zeile 1). 24 h p.i. wurden die Zellen fixiert und immunfluoreszenzgefärbt.

Adβ-catS33Y

Zur Herstellung des Shuttlevektors pAdTrack-CMV β-catS33Y wurde die Gensequenz aus einem Plasmid der Arbeitsgruppe herausgeschnitten. Abb. 4.4 zeigt den fertigen Shuttlevektor. Er enthält neben Ziel- und Reportergen (gelb und grün) auch die für die Rekombination notwendigen adenoviralen Sequenzen (blau).

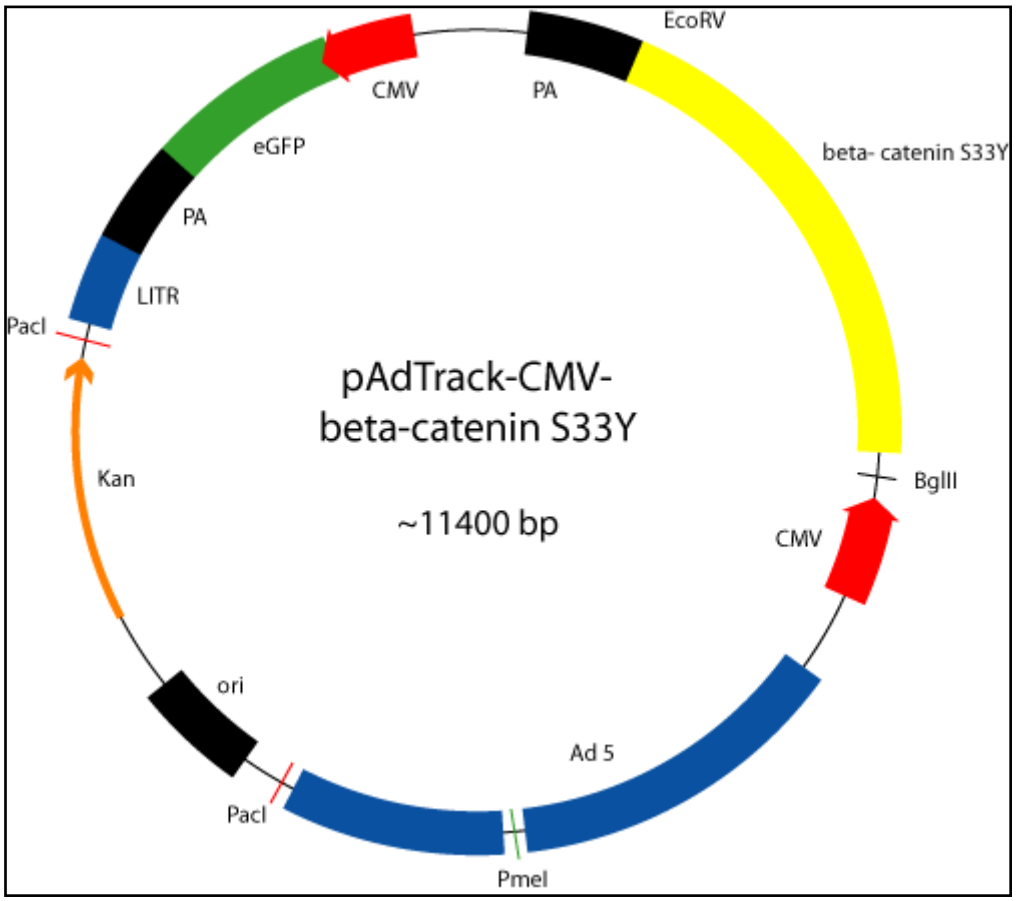

Abb. 4.4: pAdTrackCMV-β-catenin S33Y

Balken stellen Gene dar, Querstriche mögliche Restriktionsschnittstellen

Blau dargestellt: Adenovirale Sequenzen. Rot: Promotor. Gelb: Fremdgen. Grün: Reportergen

Abkürzungen: ori = origin, Kan = Kanamycinresistenz, Ad 5 = virale Proteine, PA = Polyadenylierungssite, LITR = linke ITR

Die Transgenexpression durch das nach Rekombination gewonnene Plasmid pAdEasyβ-catS33Y wurde in H1299-Zellen mittels SDS-PAGE überprüft.

Das fertige Viruskonstrukt wurde in 911- Zellen transfiziert. Über die GFP-Expression wurde die Virusvermehrung beurteilt. Nach 10 Tagen wurde der Virusstock präpariert.

Die Transgenexpression in H1299– Zellen wurde mittels Immunfluoreszenzfärbung überprüft. Abb. 4.6 zeigt die Expression von β-cateninS33Y im Zytoplasma virusinfizierter Zellen. Die erste Spalte zeigt die Zellkerne in DAPI- Färbung, die zweite Spalte zeigt das mit einem rot-fluoreszierenden Antikörper markierte β-cateninS33Y, in der dritten Spalte ist die Fluoreszenz von GFP im grünen Kanal zu sehen. Es wird im Zytoplasma von Zellen exprimiert, die mit dem Virus infiziert sind. In der ersten Zeile ist die Negativkontrolle dargestellt.

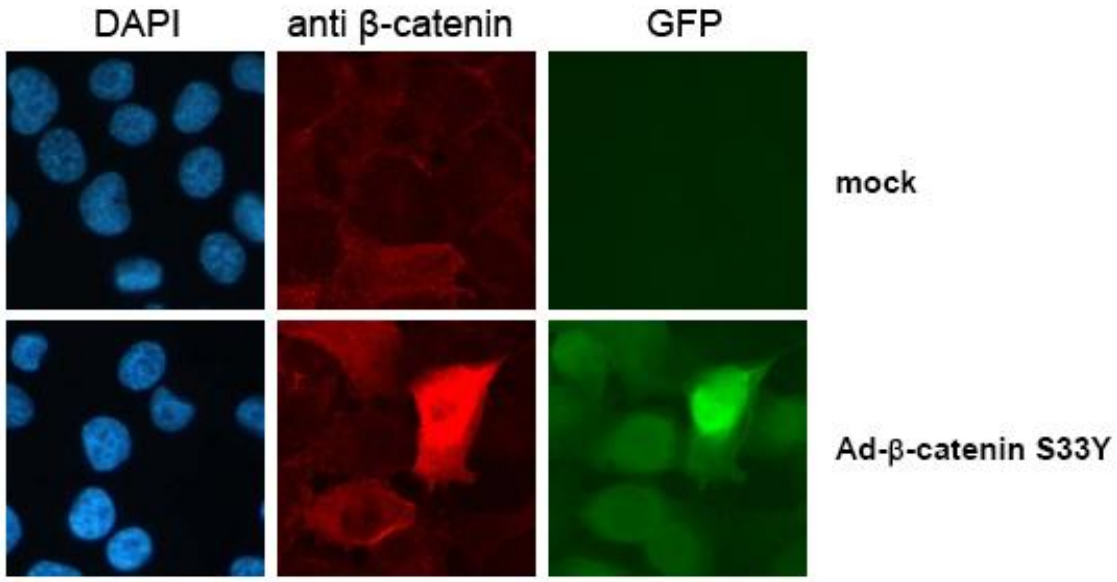

Abb.4.5 Nachweis der Transgenexpression in H1299- Zellen

H1299- Zellen wurden in 4-well- Objektträgern ausgesät und mit einer m.o.i 5 Ad-β-cateninS33Y infiziert. In der ersten Zeile ist die Negativkontrolle dargestellt. 24 h p.i. wurden die Zellen fixiert und immunfluoreszenzgefärbt.

Ad∆Np63α

Das Gen für ∆Np63α befindet sich beim Menschen auf Chromosom 3q27-q29. Die CDS des in dieser Arbeit verwendeten Proteins ist in Abb. 4.6 dargestellt.

```
   1 atgttgtacc tggaaaacaa tgcccagact caatttagtg agccacagta cacgaacctg
  61 gggctcctga acagcatgga ccagcagatt cagaacggct cctcgtccac cagcccctac
 121 aacacagacc acgcacagaa tagcgtgacg gcgccctcgc cctatgcaca gcccagctcc
 181 acctttgatg ccctctctcc atcccctgcc attccctcca acacagatta cccgggccca
 241 cacagcttcg atgtgtcctt ccagcagtca agcactgcca agtcagccac ctggacgtat
 301 tccaccgaac tgaagaagct gtactgccag attgcgaaga catgccccat ccagatcaag
 361 gtgatgaccc cacccccaca gggcgctgtt atccgtgcca tgcctgtcta caagaaagct
 421 gagcatgtca ccgaggttgt gaaacgatgc cctaaccatg agctgagccg tgagttcaat
 481 gagggacaga ttgcccctcc cagtcatctg attcgagtag aagggaacag ccatgcccag
 541 tatgtagaag atcctatcac gggaaggcag agcgtgctgg tcccttatga gccaccacag
 601 gttggcactg aattcacaac agtcctgtac aatttcatgt gtaacagcag ctgcgtcgga
 661 ggaatgaaca gacgtccaat tttaatcatc gttactctgg aaaccagaga tgggcaagtc
 721 ctgggccgac ggtgctttga ggcccggatc tgtgcttgcc caggaagaga ccggaaggca
 781 gatgaagaca gcatcagaaa gcagcaagta tcggacagcg caaagaacgg cgatggtacg
 841 aagcgccctt tccgtcagaa tacacacgga atccagatga cttccatcaa gaaacggaga
 901 tccccagatg atgagctgct gtacctacca gtgagaggtc gtgagacgta cgagatgttg
 961 ctgaagatca aagagtcact ggagctcatg cagtacctcc ctcagcacac gatcgaaacg
1021 tacaggcagc agcagcagca gcagcaccag cacctacttc agaaacagac ctcgatgcag
1081 tctcagtctt catatggcaa cagttcccca cctctgaaca aaatgaacag catgaacaag
1141 ctgccttccg tgagccagct tatcaaccca cagcagcgca atgccctcac tcccaccacc
1201 atgcctgagg gcatgggagc caacattcct atgatgggca ctcacatgcc aatggctgga
1261 gacatgaatg gactcagccc tacccaagct ctccctcctc cactctccat gccctccacc
1321 tcccactgca ccccaccacc gccctacccc acagactgca gcattgtcag tttcttagca
1381 aggttgggct gctcatcatg cctggactat ttcacgaccc aggggctgac caccatctat
1441 cagattgagc attactccat ggatgatttg gcaagtctga agatccctga acagttccga
1501 catgccatct ggaagggcat cctggaccac aggcagctgc acgacttctc ctcacctcct
1561 catctcctga ggaccccaag tggtgcctct accgtcagtg tgggctccag tgagacccgt
1621 ggtgaacgtg tgatcgatgc cgtgcgcttt accctccgcc agaccatctc ttttccaccc
1681 cgtgacgagt ggaatgattt caactttgac atggattctc gtcgcaacaa gcagcagcgt
1741 atcaaagagg aaggagaatg a
```

Abb. 4.6: CDS ∆Np63alpha, mus musculus PMID: AF075439

Abb. 4.7 zeigt den Shuttlevektor pAdTrack-CMV-ΔNp63α. Das Zielgen (orange-gelb-schwarz) liegt hinter einem CMV- Promotor, ebenso das Reportergen eGFP (grün). Desweiteren enthält das Plasmid für die Rekombination in e.coli notwendige adenovirale Sequenzen (blau) und eine Kanamycinresistenz für die Selektion der vermehrenden Bakterien.

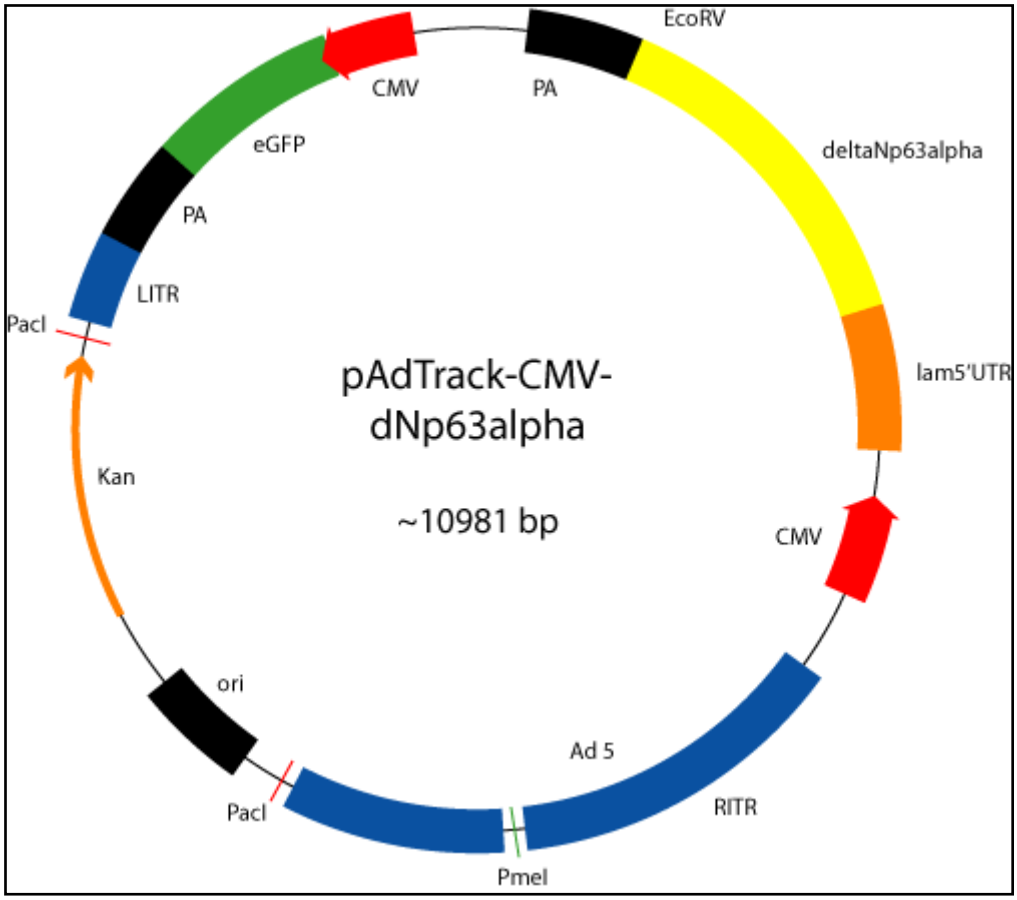

Abb. 4.7: pAdTrackCMV-ΔNp63α

Balken stellen Gene dar, Querstriche mögliche Restriktionsschnittstellen

Blau dargestellt: Adenovirale Sequenzen. Rot: Promotor. Gelb: Fremdgen. Grün: Reportergen

Abkürzungen: ori = origin, Kan = Kanamycinresistenz, Ad 5 = virale Proteine, PA = Polyadenylierungssite, LITR = linke ITR, RITR = rechte ITR

Der gereinigte und konzentrierte Shuttlevektor wurde mit PmeI linearisiert und in elektrokompetenten BJ E.coli mit pAdEasy1 kotransfiziert. Die Fremdgenexpression durch pAdTrackCMVΔNp63α wurde mittels Proteinelektrophorese überprüft.

Nach Transfektion in 911-Zellen konnte die Virusvermehrung über die GFP-Expression beobachtet werden. Nach 10 Tagen waren über 90% der Zellen infiziert und der Virusstock wurde präpariert.

Um die Funktionalität der erhaltenen Viren zu überprüfen, wurden Immunfluoreszenzen angefertigt. Abb. 4.8 zeigt uninfizierte (1. Zeile) mit

AdΔNp63α (zweite Zeile) infizierte H1299-Zellen in der DAPI- Färbung (Spalte 1), im grünen Kanal (Spalte 3) und mit rot-fluoreszierenden α-p63 (Spalte 2). Man beobachtet die Expression von p63 im Zellkern infizierter Zellen.

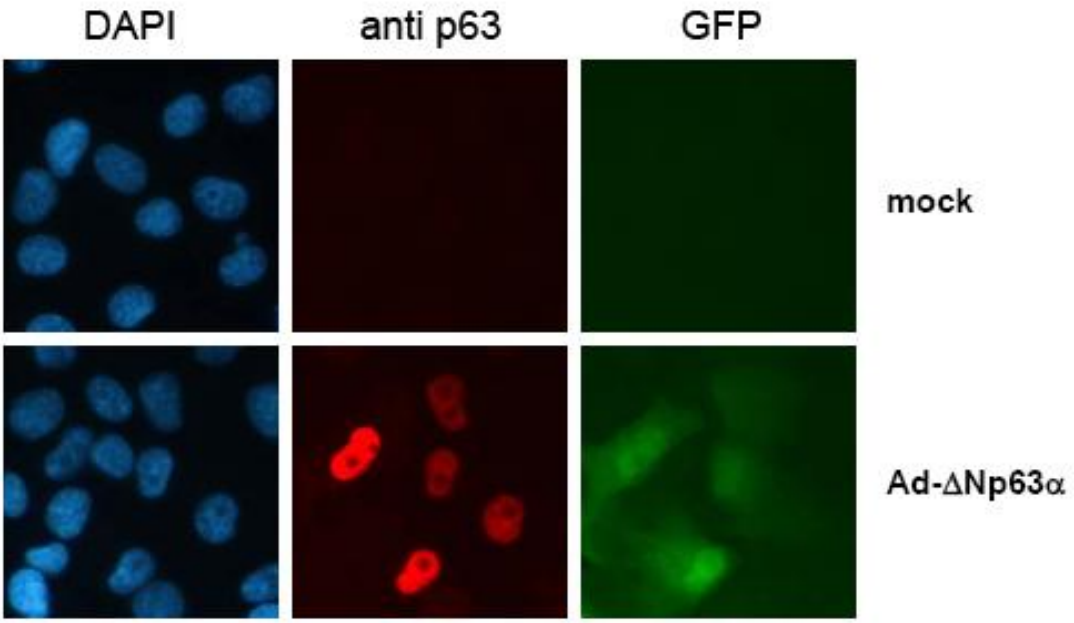

Abb. 4.8: Nachweis der Transgenexpression in H1299- Zellen

H1299- Zellen wurden in 4-well- Objektträgern ausgesät und mit einer m.o.i 5 mit Ad-β-Galactosidase und Ad-ΔNp63α infiziert. 24 h p.i. wurden die Zellen fixiert und immunfluoreszenzgefärbt. 1.Zeile: Negativkontrolle

AdTCF4flag

Sequenz:

```
       1 gtgtgtggat gtgtgagtga gagggaacga gagtaagaga aagaaagaag tgaggggatg
      61 taaactcgaa taaatttcaa agtgcctccg agggatgcaa cgggcaaaaa ctgaactgtt
     121 caggcttcag attgtaactg acgatctgag gaaaaatgag gtgctcgatg aattttcgtt
     181 tgtatttttt ggcgaggcgg gggaggtgtt gagatttttt ttttttcccc tcggggtggg
     241 tgcgaggggg atgcatccta gcctgcccga cccggagcaa gtcgcgtctc cccgccggag
     301 ccccccacc catttctttg ctgaacttgc aattccgtgc gcctcggcgt gtttcccccc
     361 cccccttcc ctccgtcccc tcccctcccc ggagaagaga gttggtgtta agagtcaggg
     421 atcttggctg tgtgtctgcg gatctgtagt ggcggcggcg gcggcggcgg cggggaggca
     481 gcaggcgcgg gagcgggcgc aggagcaggc ggcggcggtg gcggcggcgg ttagacatga
     541 acgccgcctc ggcgccggcg gtgcacggag agccccttct cgcgcgcggg cggtttgtgt
     601 gattttgcta aaatgcatca ccaacagcga atggctgcct tagggacgga caaagagctg
     661 agtgatttac tggatttcag tgcgatgttt tcacctcctg tgagcagtgg gaaaaatgga
     721 ccaacttctt tggcaagtgg acattttact ggctcaaatg tagaagacag aagtagctca
     781 gggtcctggg ggaatggagg acatccaagc ccgtccagga actatggaga tgggactccc
     841 tatgaccaca tgaccagcag ggaccttggg tcacatgaca atctctctcc acctttgtc
     901 aattccagaa tacaaagtaa aacagaaagg ggctcatact catcttatgg gagagaatca
     961 aacttacagg gttgccacca gcagagtctc cttggaggtg acatggatat gggcaaccca
    1021 ggaacccttt cgcccaccaa acctggttcc cagtactatc agtattctag caataatccc
    1081 cgaaggaggc ctcttcacag tagtgccatg gaggtacaga caaagaaagt tcgaaaagtt
    1141 cctccaggtt tgccatcttc agtctatgct ccatcagcaa gcactgccga ctacaatagg
    1201 gactcgccag gctatccttc ctccaaacca gcaaccagca ctttccctag ctccttcttc
    1261 atgcaagatg gccatcacag cagtgaccct tggagctcct ccagtgggat gaatcagcct
    1321 ggctatgcag gaatgttggg caactcttct catattccac agtccagcag ctactgtagc
    1381 ctgcatccac atgaacgttt gagctatcca tcacactcct cagcagacat caattccagt
    1441 cttcctccga tgtccacttt ccatcgtagt ggtacaaacc attacagcac ctcttcctgt
    1501 acgcctcctg ccaacgggac agacagtata atggcaaata gaggaagcgg ggcagccggc
    1561 agctcccaga ctggagatgc tctggggaaa gcacttgctt cgatctattc tccagatcac
    1621 actaacaaca gcttttcatc aaacccttca actcctgttg gctctcctcc atctctctca
    1681 gcaggcacag ctgtttggtc tagaaatgga ggacaggcct catcgtctcc taattatgaa
    1741 ggacccttac actctttgca aagccgaatt gaagatcgtt tagaaagact ggatgatgct
    1801 attcatgttc tccggaacca tgcagtgggc ccatccacag ctatgcctgg tggtcatggg
    1861 gacatgcatg gaatcattgg accttctcat aatggagcca tgggtggtct gggctcaggg
    1921 tatggaaccg gccttctttc agccaacaga cattcactca tggtggggac ccatcgtgaa
    1981 gatggcgtgg ccctgagagg cagccattct cttctgccaa accaggttcc ggttccacag
    2041 cttcctgtcc agtctgcgac ttcccctgac ctgaacccac cccaggaccc ttacagaggc
    2101 atgccaccag gactacaggg gcagagtgtc tcctctggca gctctgagat caaatccgat
    2161 gacgagggtg atgagaacct gcaagacacg aaatcttcgg aggacaagaa attagatgac
    2221 gacaagaagg atatcaaatc aattactagc aataatgacg atgaggacct gacaccagag
    2281 cagaaggcag agcgtgagaa ggagcggagg atggccaaca atgcccgaga gcgtctgcgg
    2341 gtccgtgaca tcaacgaggc tttcaaagag ctcggccgca tggtgcagct ccacctcaag
    2401 agtgacaagc cccagaccaa gctcctgatc ctccaccagg cggtggccgt catcctcagt
    2461 ctggagcagc aagtccgaga aaggaatctg aatccgaaag ctgcgtgtct gaaaagaagg
    2521 gaggaagaga aggtgtcctc agagcctccc cctctctcct tggccggccc acaccctgga
    2581 atgggagacg catcgaatca catgggacag atgtaaaagg gtccaagttg ccacattgct
    2641 tcattaaaac aagagaccac ttccttaaca gctgtattat cttaaaccca cataaacact
    2701 tctccttaac ccccattttt gtaatataag acaagtctga gtagttatga atcgc….
```

Abb. 4.9: mRNA TCF4 PMID: NM 003199, OMIM: 602272

Ein Teil der mRNA für TCF4 ist in Abb. 4.9 dargestellt, grau unterlegt ist die CDS. Da das TCF4- Protein mit einem N-terminalem flag-tag versehen werden sollte, wurden die Primer für die Isolation des Inserts mit einer KpnI-Schnittstelle, gefolgt von der Kozac-Sequenz und einer für das flag-tag-

kodierenden Sequenz designt (siehe Abschnitt 2.7). Abb. 4.10 zeigt den Shuttlevektor pAdTrack-CMV-TCF4. Außer den adenoviralen Sequenzen (blau) enthält er das Reportergen eGFP (grün), eine Kanamycinresistenz (orange) und die CDS für TCF4 (gelb) mit N-terminalem flag-tag.

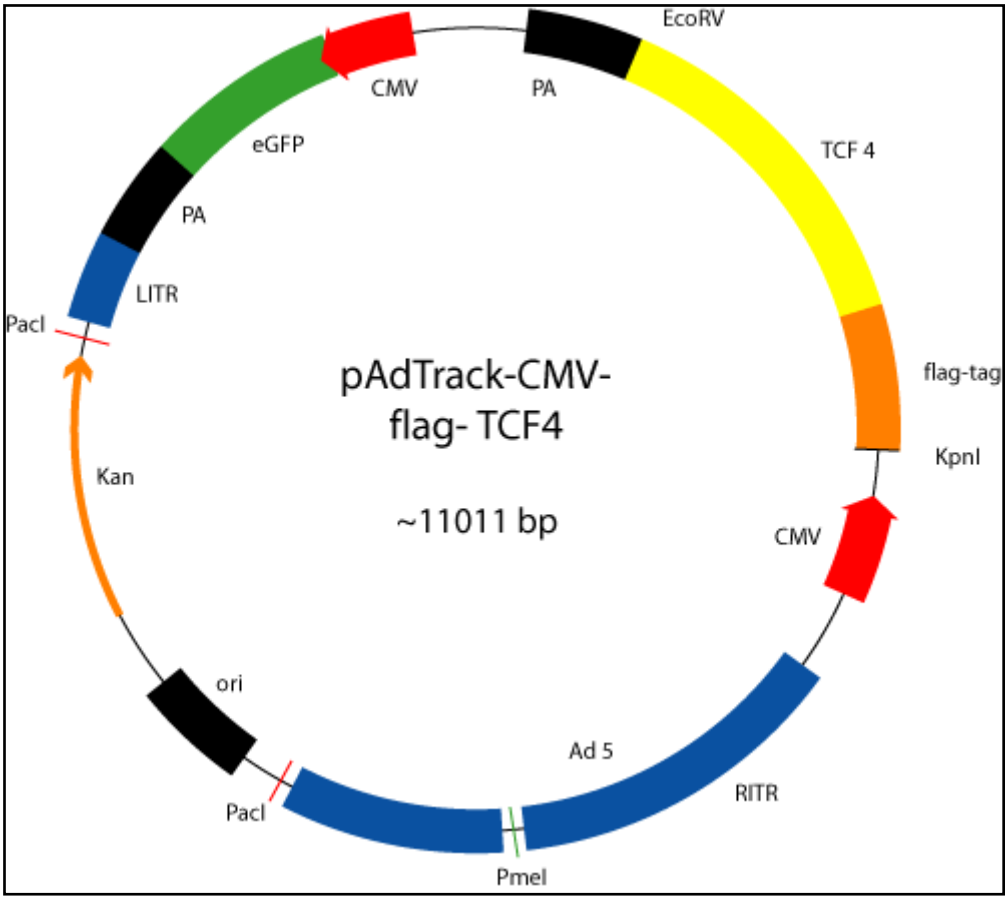

Abb. 4.10: pAdTrackCMV-TCF4wt

Balken stellen Gene dar, Querstriche mögliche Restriktionsschnittstellen

Blau dargestellt: Adenovirale Sequenzen. Rot: Promotor. Gelb: Fremdgen. Grün: Reportergen

Abkürzungen: ori = origin, Kan = Kanamycinresistenz, Ad 5 = virale Proteine, PA = Polyadenylierungssite, LITR = linke ITR, RITR = rechte ITR

Zum Nachweis der Fremdgenexpression wurden H1299- Zellen 24 h nach Infektion mit AdTCF4flag mit einem Antikörper gegen flag (Abb. 4.12) und einem Antikörper gegen TCF4 gefärbt (Abb. 4.13). In der flag- Färbung sieht man wenig spezifische Fluoreszenz, in der TCF4- Färbung hingegen ist deutliche Fluoreszenz in mit Virus infizierten Zellen erkennbar.

Ad∆NTCF4flag

Für die Sequenz wurden aus der mRNA von TCF4 die 32 ersten codierenden Aminosäuretriplets weggelassen.

Der Shuttlevektor pAdTrack∆NTCF4flag entspricht pAdTrackTCF4flag, bis auf die fehlenden 32 N-terminalen AS- Triplets.

Zum Nachweis der Fremdgenexpression wurden H1299 Zellen mit Ad-flag-ΔN-TCF4 infiziert und 24 h p.i. Immunfluoreszenzgefärbt. Abb. 4.12 zeigt die Färbung mit α-flag-, Abb. 4.13 die Färbung mit α-TCF4- Antikörpern. In beiden Abbildungen ist keine spezifische Fluoreszenz für ΔN-TCF4 in den virusinfizierten Zellen zu erkennen.

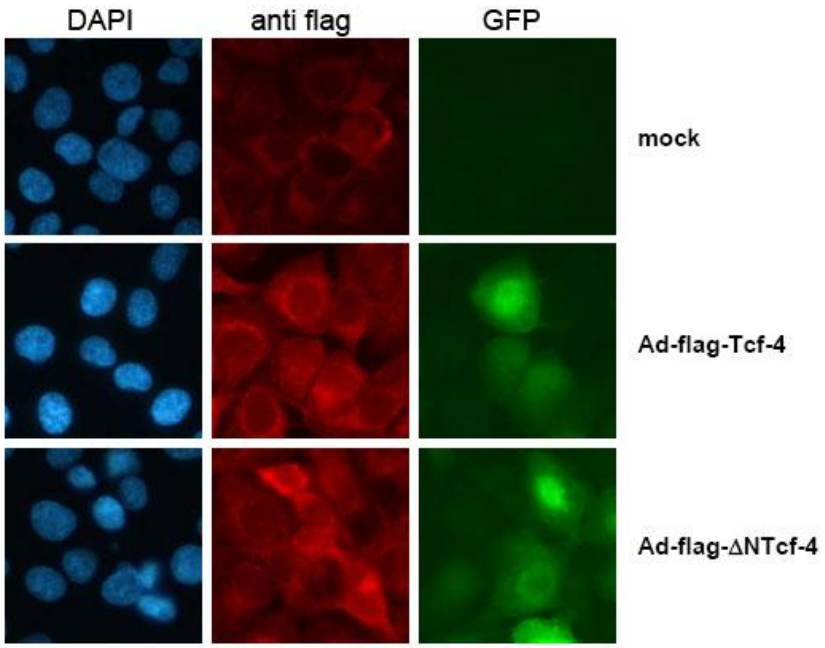

Abb. 4.12: Nachweis der Fremdgenexpression in H1299- Zellen
H1299- Zellen wurden mit einer m.o.i 5 mit Ad-flag-TCF4 (2.Zeile) und Ad-flag-ΔN-TCF4 (3. Zeile) infiziert. 1. Zeile: Negativkontrolle. 24 h p.i. wurden die Zellen geerntet und mit α-flag gefärbt. In der ersten Spalte ist die DAPI- Färbung der Zellkerne dargestellt, in der zweiten die Fluoreszenz der Antikörper und in der dritten Spalte die Fluoreszenz von eGFP (Infektionsmarker)

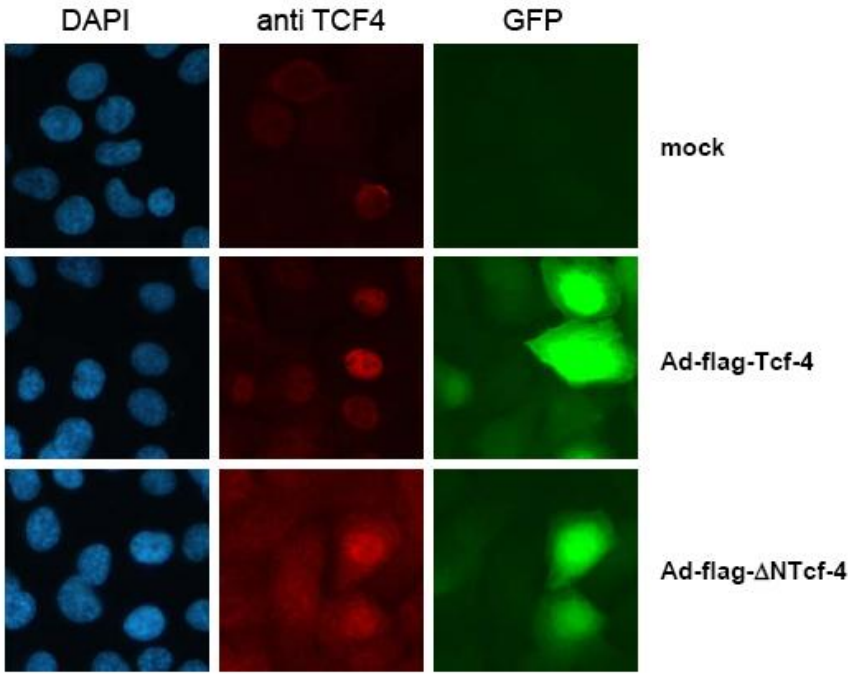

Abb. 4.13 Nachweis der Transgenexpression in H1299- Zellen
H1299- Zellen wurden mit einer m.o.i 5 mit Ad-flag-TCF4 (2.Zeile) und Ad-flag-ΔN-TCF4 (3. Zeile) infiziert. 1.Zeile: Negativkontrolle. 24 h p.i. wurden die Zellen geerntet und mit α-TCF4 gefärbt. In der ersten Spalte ist die DAPI- Färbung der Zellkerne dargestellt, in der zweiten die Fluoreszenz der Antikörper und in der dritten Spalte die Fluoreszenz von eGFP (Infektionsmarker)

Um die Expressivität von ΔNTCF4 zu überprüfen, wurde ein Western blot durchgeführt. In Abb. 4.14 ist die Färbung des Gels mit α-TCF4-Antikörpern gezeigt. In Zeile 1 ist die Negativkontrolle aufgetragen, in Zeile 2 die Kontrolle mit β-Gal. Zeile 3 und 4 zeigen die Proteinexpression in mit AdTCF4 und AdΔNTCF4 infizierten Zellen: In mit AdTCF4 infizierten Zellen wird TCF4 exprimiert, in mit AdΔNTCF4 findet sich kein Signal.

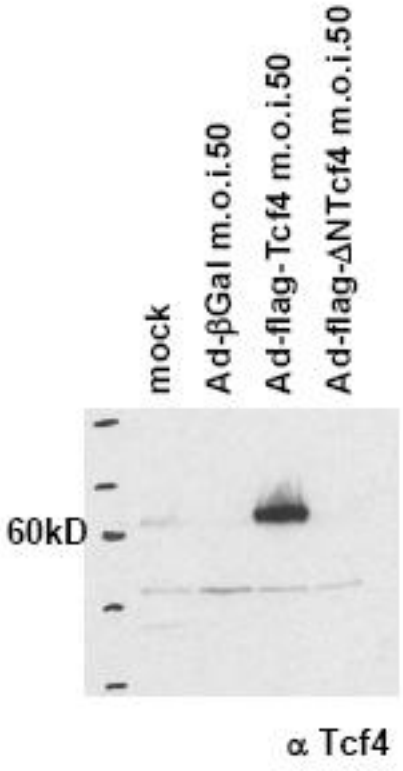

Abb. 4.14: Expression von TCF4 in 911- Zellen

911- Zellen wurden infiziert mit Adβ-Gal, AdTCF4 und AdΔNTCF4 (jedes Virus MOI=50).

24 h p.i. wurden die Zellen geerntet, die Proteine durch SDS-PAGE aufgetrennt, geblottet und mit einem Antikörper gegen TCF4 gefärbt. Die Detektion erfolgte mit einem Peroxidase-gekoppelten Zweitantikörper (Erstantikörper: Verdünnung: αTCF4 1:500, Inkubationszeit: 2h, Zweitantikörper: Verdünnung 1:20000, Inkubationszeit: 1h)

Spur 1: Negativkontrolle, Spur 2: Adβ-Gal, Spur 3: AdTCF4flag, Spur 4: AdΔNTCF4flag

Untersuchung der Interaktion von ΔNp63α und β-catenin

Gesteigerte β-catenin-Expression in Anwesenheit von ΔNp63α

Im Proteinblot sollte untersucht werden, ob die Expressionsrate von β-catenin in der Gegenwart von ΔNp63α verändert wird. Dazu wurden H1299- Zellen mit AdβGal, Adβ-catenin, AdΔNp63α und Kombinationen infiziert. Abbildung 4.21 zeigt die Ergebnisse des Western Blots: In Anwesenheit von ΔNp63α wird die Konzentration von sowohl intrinsischem als auch transgenem β-catenin erhöht. Bei der inaktivierbaren S33Y- Variante scheint dieser Effekt umgekehrt zu sein. Um einen Auftragefehler auszuschließen wurde eine Kontrolle mit β-actin durchgeführt. β-actin ist ein Strukturprotein und wird in Zellen einer Zelllinie gleichmäßig exprimiert. Wenn in allen Kammern des Geles gleichviel Protein aufgetragen wurde, müssten die Banden für β-actin in allen Spalten gleich stark sein. Abb. 4.21 zeigt deutlich, dass dies nicht der Fall ist. Die Ergebnisse dieses Versuchs sind demnach nicht verwertbar.

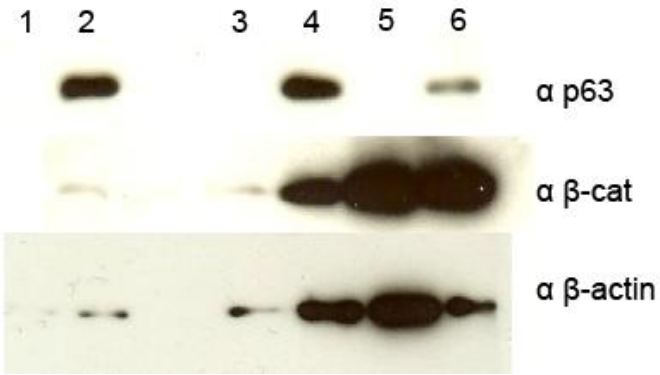

Abb. 4.21: Koexpression von ΔNp63α und β-catenin (Western blot):
H1299- Zellen wurden infiziert mit Adβ-Gal, Adβ-catenin und Adβ-cateninS33Y in Kombination mit Adβ-Gal und AdΔNp63α (jedes Virus MOI=50). 24 h p.i. wurden die Zellen geerntet, die Proteine durch SDS-PAGE aufgetrennt, geblottet und mit einem Antikörper gegen p63 (erste Zeile), β-catenin (zweite Zeile) und gegen β-actin (dritte Zeile) gefärbt. Die Detektion erfolgte mit einem Peroxidase-gekoppelten Zweitantikörper (Erstantikörper: Verdünnung: αβ-catenin 1:500 αp63 1:1000, αβactin 1:50000. Inkubationszeit: 2h, Zweitantikörper: Verdünnung 1:20000, Inkubationszeit: 1h)
Spur 1: Adβ-Gal + Adβ-Gal, Spur 2: Adβ-Gal + AdΔNp63α, Spur 3: Adβ-catenin + Adβ-Gal, Spur 4: Adβ-catenin + AdΔNp63α, Spur 5: Adβ-cateninS33Y + Adβ-Gal, Spur 6: Adβ-cateninS33Y + AdΔNp63α

Expression β-catenin- regulierter Gene in Gegenwart von p63

Mittels quantitativer real-time PCR sollte die Expression von β-catenin-responsiven Genen in Anwesenheit von ΔNp63α untersucht werden. Hierzu wurden c-myc und cyclin D1 gewählt, zwei Proteine des Zellzyklus, deren Expression TCF4 vermittelt durch β-catenin verstärkt wird. (He, Sparks et al., 1998) (Shtutman et al., 1999; Tetsu & McCormick, 1999)

H1299- Zellen wurden mit unterschiedlichen Kombinationen der erstellten Viren infiziert, und die Genexpression durch qrt-PCR verglichen.

Abbildung 4.22 zeigt eine graphische Darstellung der erhaltenen Werte. In blau dargestellt ist die relative Menge an c-myc-RNA, in lila die relative Menge an mRNA für cyclin D1. Als Referenzwert (erstes Säulenpaar, Wert = 1) wurde die gemessene Menge der jeweiligen RNA in mit Ad-β-catenin infizierten Zellen gesetzt. β-cateninS33Y verstärkt die Expression von c-myc und cyclin D1 nur gering. Bei Transfektion von nur ΔNp63α ist keine Veränderung zu erkennen. Die Kotransfektion von β-catenin und ΔNp63α führt zu einer Zunahme der Expression von c-myc aber nicht von cyclin D1, ebenso bei Kotransfektion von β-cateninS33Y und ΔNp63α; die Expression von c-myc wird gesteigert, die von cyclin D1 kaum.

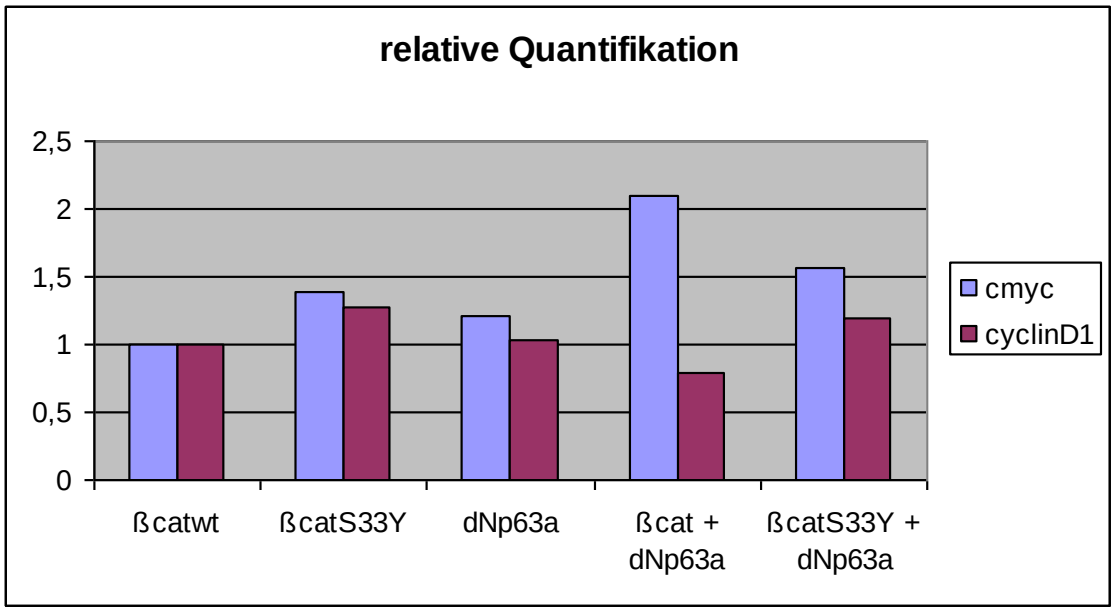

Abb.4.22: Auswirkung von ΔNp63α auf die Expression β-cat-responsiver Gene (qrtPCR): H1299-Zellen wurden infiziert mit Adβ-cat, Adβ-catS33Y, Adβ-Gal in Kombination mit und ohne AdΔNp63α (jedes Virus MOI=50). 24h p.i. wurden die Zellen geerntet, die RNA mit Trizol extrahiert und eine qrtPCR mit Primern für jeweils c-myc (blaue Säulen) und cyclin D1 (lila Säulen) durchgeführt. Für die Darstellung wurde die RNA- Konzentration in den Zellen, die nur mit Adβ-cat infiziert wurden, gleich 1 gesetzt.

Diskussion

Adenovirale Vektoren

Die Zielsetzung dieser Arbeit war, ein System zu entwickeln, mit dem die Wechselwirkungen zwischen β-catenin und ΔNp63α untersucht werden können. Zu diesem Zweck wurden funktionsfähige Adenoviren zur Überexpression von β-catenin wildtyp, β-cateninS33Y, ΔNp3α und TCF4 entwickelt. Die Entwicklung eines Virus, welches die Negativkontrolle TCF4ΔN exprimieren sollte ist fehlgeschlagen.
Hinsichtlich der zu Beginn formulierten Ansprüche ist das System folgendermaßen zu bewerten:

Überexpression der zu untersuchenden Proteine auf hohem Level

Mithilfe der adenoviralen Viren ist eine Überexpression in stärkerem Maße als mittels Transfektion möglich. Zudem ist die Infektion mit replikationsunfähigen Viren für die Zelle weniger toxisch als Transfektion. Da die Infektion der Zellen an den Coxsackie- Adenovirus- Rezeptor gebunden ist (Bergelson et al., 1997), dessen Anzahl auf der Zelloberfläche limitiert ist, ist somit auch die maximale Überexpression begrenzt.

Steuerbarkeit – die Höhe der Überexpression sollte kontrollierbar sein

Durch die Titration der Virusstocks ist es möglich die m.o.i. für jedes Experiment genau festzulegen, somit ist auch die Höhe der transfizierten DNA pro Zelle festgelegt, und damit die Höhe der Überexpression bestimmt. Adenovirale Vektoren eignen sich damit gut, um verschiedene Mengen an Protein zu exprimieren. Allerdings ist mit steigender m.o.i. auch ein Anstieg unspezifischer Effekte beschrieben (Gerszten et al., 1996). So sollte die m.o.i. im Hinblick auf die gewünschte Expressivität und mögliche unspezifische Effekte sorgfältig gewählt werden.

Selektivität – es sollen nur die gewünschten Gene beeinflusst werden

Durch adenovirale Infektion wird eine gewisse Immunreaktion der Wirtszelle hervorgerufen (Newman et al., 1995), allerdings sind diese Effekte zumeist in vivo beschrieben worden und haben für die Zellreinkultur kaum eine Bedeutung. Da keine Virusreplikation stattfindet, ist nicht von einer zytotoxischen Reaktion auszugehen. Eine onkogene Transformation der Zielzellen ist für den verwendeten E1- defizienten Serotyp 5 nicht bekannt. Da das virale Genom überwiegend episomal vorliegt und kaum in das Genom der Wirtszelle integriert (Fields, 1996), ist nicht von einer Veränderung zellulärer Gene im Sinne einer Mutation auszugehen. Durch das Andocken der Viren an die Zelloberfläche werden allerdings sencond messenger aktiviert, und es kommt zu einer Veränderung der Expressivität zellulärer Gene. Bei den in der Arbeit untersuchten Zielgenen handelt es sich aber um Zellzyklusregulatoren, die nicht durch eine Immunantwort beeinflusst werden.

Gesamtbewertung des adenoviralen Vektorsystems

Alle drei aufgestellten Bewertungskriterien werden durch die entwickelten Adenoviren hinreichend und gut erfüllt. Mit den erstellten Viren ist eine Untersuchung von zellulären Auswirkungen und Wechselwirkungen von β-catenin, ΔNp63α und TCF4 möglich. Die Veränderungen durch β-catenin können durch den Einsatz der S33Y- Mutante auch bei kleineren Effekten beobachtbar gemacht werden. Gemeinsam bieten die vier von mir erstellten Viren eine Vielzahl der Möglichkeiten, onkogene Wechselwirkungen zwischen den erwähnten Proteinen zu erforschen. Sie werden in der Arbeitsgruppe weiter verwendet.

Ausblick - Interaktion von β-catenin und ΔNp63α

Die zwei von mir erstmalig mit dem neuen System durchgeführten Experimente unterstützen möglicherweise die These, dass eine Interaktion von β-catenin und ΔNp63α stattfindet. Die Ergebnisse sollten allerdings sehr kritisch betrachtet werden, da die Experimente primär als Praxistest der Methode durchgeführt wurden, und die Ergebnisse nicht verifiziert sind.

Beim Experiment zur Expressionsverstärkung von intrinsischem und transgenem β-catenin durch ΔNp63α zeigt die β-actin-Färbung, dass die Ergebnisse aufgrund eines Auftragefehlers nicht verwertbar sind. Die Funktionalität der Viren wird allerdings bestätigt. Dies Experiment sollte sorgfältig wiederholt werden.

Das zweite Experiment zeigt, dass auch die β-catenin- abhängige Transkription von c-myc durch ΔNp63α verdoppelt wird. Für cyclin D1 konnte dies nicht gezeigt werden. Auch hier fehlt die vermutete Steigerung durch β-catenin S33Y. Eventuell ist bei dieser Mutante die Fähigkeit zur Interaktion mit ΔNp63α eingeschränkt. Insgesamt deuten die Ergebnisse darauf hin, dass ΔNp63α eine regulative Funktion auf β-catenin innehat. Jedoch ist durch die kleine Stichprobenmenge die Aussagekraft dieses Versuches eingeschränkt. Weitere Wiederholungen mit größeren Probenmengen sind nötig, um durch Berechnung von Mittelwert und Standardabweichung die Ergebnisse verlässlicher zu machen. Das pipettieren kleinster Volumina bei diesem Versuch ist eine große Fehlerquelle, die nur durch große Stichprobenmenge relativiert werden kann. Auch dieses Experiment muss wiederholt werden und durch weitere Versuche ergänzt werden.

Die beiden Experimente lassen die Frage nach dem Charakter der Interaktion von β-catenin und ΔNp63α noch offen, doch geht diese über die Zielsetzung dieser Arbeit hinaus.

Da das Modell des WNT- pathways, in dem β-catenin eingebunden ist, sehr komplex ist, wie Abbildung 5.1 zeigt, sind verschiedene Ebenen vorstellbar, auf denen ΔNp63α angreifen könnte.

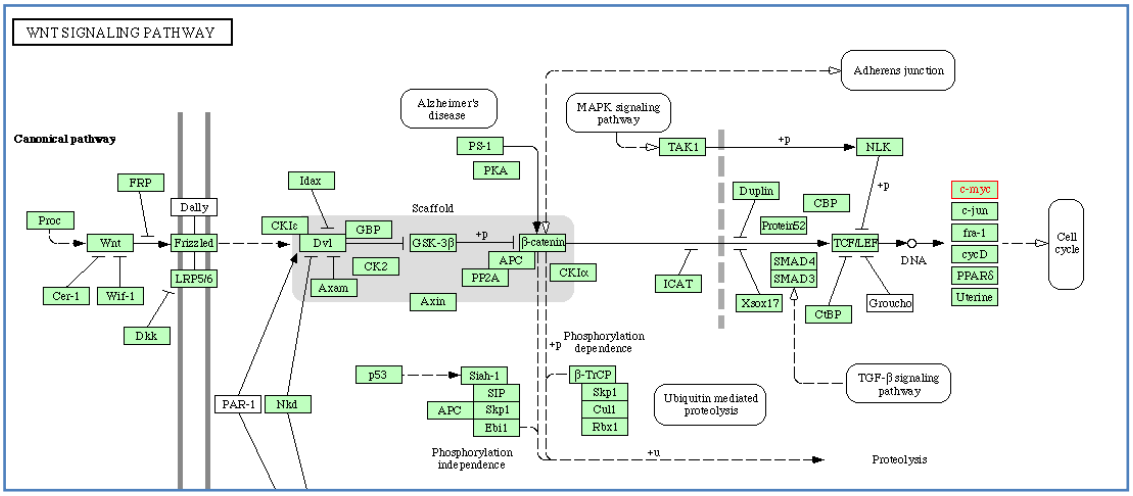

Abb. 5.1: WNT-Signalling pathway aus PubMed (http://www.genome.jp/dbget-bin/show_pathway?hsa04310+4609)

Möglich erscheint eine Inhibition von GSK3β, wie von (Patturajan et al., 2002) angenommen. Durch diese Inhibition käme es zu einer Akkumulation von β-catenin im Nukleus, da die GSK3- vermittelte Degradation durch Komplexierung mit ΔNp63α unterdrück würde. Die nukleäre Akkumulation von β-catenin in Anwesenheit von ΔNp63α konnte im Rahmen dieser Arbeit in der Immunfluoreszenzfärbung beobachtet werden.

Die beiden im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten Experimente verdeutlichen die vielfältigen Einsatzmöglichkeiten von adenoviralen Vektoren in der Analyse von Proteininteraktionen.

Ausblick- Verwendung des erstellten Vektorsystems

Die im zweiten Teil dieser Arbeit durchgeführten Experimente sind nur als erste Funktionsüberprüfung der Methode zu sehen. Sie sollten erweitert und überprüft werden. Weitere vorstellbare Fragestellungen, die mit Hilfe von Koinfektion zu beantworten wären, sind:

Ist eine Kolokalisation von β-catenin und ΔNp63α in der Zelle oder im Zellkern zu beobachten? (Kotransfektion und Immunfluoreszenzfärbung)

Ist die Trankription β-catenin- abhängiger Gene und der Einfluss durch ΔNp63α von TCF4 abhängig?

Diese Frage könnte durch einen ähnlichen Versuchsaufbau wie in Experiment 2 (qrt- PCR) beantwortet werden.

Hat die Steigerung der TCF4- vermittelten Transkriptionsaktivierung einen negativen Einfluss auf die Expression von Groucho- Faktoren („Antagonisten“ von β-catenin bei der TCF4- Bindung)? (Kotransfektion, qrt- PCR)

Bei aller wissenschaftlichen Neugier sollte man jedoch berücksichtigen, dass die beschriebene Kolokalisation von ΔNp63α und β-catenin nur in einigen Tumorarten beobachtet wurde (Reis-Filho, Simpson, Fulford, Martins, & Schmitt, 2003). Solange der genaue Mechanismus der Interaktion nicht geklärt ist, ist jedoch auch nicht genau abschätzbar, in welchen Krebsarten diese Interaktion stattfindet. Auch wenn die genaue Erforschung der Interaktion von β-catenin und ΔNp63 nur einem kleinen Patientenkollektiv Nutzen bringen kann, scheint im Zeitalter der Genomkartierung ein genaues Verständnis tumorigener Wechselwirkungen auf zellulärer Ebene zunehmend an Bedeutung zu gewinnen. Zwar ist es nicht absehbar, aber doch nicht vollkommen undenkbar, dass in Zukunft für jeden Patienten eine individuelle Gentherapie zur Verfügung steht. Somit hoffe ich, dass die von mir entwickelte Methode etwas zum Verständnis der zahlreichen ungeklärten zellulären Vorgänge beitragen kann.

Literaturverzeichnis

Aberle, H., Bauer, A., Stappert, J., Kispert, A., & Kemler, R. (1997). beta-catenin is a target for the ubiquitin-proteasome pathway. *Embo J, 16*(13), 3797-3804.

Adkins, S., & Burmeister, M. (1996). Visualization of DNA in agarose gels as migrating colored bands: applications for preparative gels and educational demonstrations. *Anal Biochem, 240*(1), 17-23.

Alemany, R., Balague, C., & Curiel, D. T. (2000). Replicative adenoviruses for cancer therapy. *Nat Biotechnol, 18*(7), 723-727.

Barker, N., Morin, P. J., & Clevers, H. (2000). The Yin-Yang of TCF/beta-catenin signaling. *Adv Cancer Res, 77*, 1-24.

Bergelson, J. M., Cunningham, J. A., Droguett, G., Kurt-Jones, E. A., Krithivas, A., Hong, J. S., Horwitz, M. S., Crowell, R. L., & Finberg, R. W. (1997). Isolation of a common receptor for Coxsackie B viruses and adenoviruses 2 and 5. *Science, 275*(5304), 1320-1323.

Brantjes, H., Roose, J., van De Wetering, M., & Clevers, H. (2001). All Tcf HMG box transcription factors interact with Groucho-related co-repressors. *Nucleic Acids Res, 29*(7), 1410-1419.

Chan, E. F. (2000). Pilomatricomas contain activating mutations in beta-catenin. *J Am Acad Dermatol, 43*(4), 701-702.

Chan, E. F., Gat, U., McNiff, J. M., & Fuchs, E. (1999). A common human skin tumour is caused by activating mutations in beta-catenin. *Nat Genet, 21*(4), 410-413.

Chomczynski, P., & Sacchi, N. (1987). Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Anal Biochem, 162*(1), 156-159.

De Ferrari, G. V., & Moon, R. T. (2006). The ups and downs of Wnt signaling in prevalent neurological disorders. *Oncogene, 25*(57), 7545-7553.

Fallaux, F. J., Kranenburg, O., Cramer, S. J., Houweling, A., Van Ormondt, H., Hoeben, R. C., & Van Der Eb, A. J. (1996). Characterization of 911: a new helper cell line for the titration and propagation of early region 1-deleted adenoviral vectors. *Hum Gene Ther, 7*(2), 215-222.

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 U S A, 84*(21), 7413-7417.

Fields. (1996). *Virology* (3rd ed.): Lippincott Williams & Wilkins.

Gerszten, R. E., Luscinskas, F. W., Ding, H. T., Dichek, D. A., Stoolman, L. M., Gimbrone, M. A., Jr., & Rosenzweig, A. (1996). Adhesion of memory lymphocytes to vascular cell adhesion molecule-1-transduced human vascular endothelial cells under simulated physiological flow conditions in vitro. *Circ Res, 79*(6), 1205-1215.

Giles, R. H., van Es, J. H., & Clevers, H. (2003). Caught up in a Wnt storm: Wnt signaling in cancer. *Biochim Biophys Acta, 1653*(1), 1-24.

Graham, F. L., Smiley, J., Russell, W. C., & Nairn, R. (1977). Characteristics of a human cell line transformed by DNA from human adenovirus type 5. *J Gen Virol, 36*(1), 59-74.

He, T. C., Sparks, A. B., Rago, C., Hermeking, H., Zawel, L., da Costa, L. T., Morin, P. J., Vogelstein, B., & Kinzler, K. W. (1998). Identification of c-MYC as a target of the APC pathway. *Science, 281*(5382), 1509-1512.

He, T. C., Zhou, S., da Costa, L. T., Yu, J., Kinzler, K. W., & Vogelstein, B. (1998). A simplified system for generating recombinant adenoviruses. *Proc Natl Acad Sci U S A, 95*(5), 2509-2514.

Higashi, N., Kojima, N., Miura, M., Imai, K., Sato, M., & Senoo, H. (2004). Cell-cell junctions between mammalian (human and rat) hepatic stellate cells. *Cell Tissue Res, 317*(1), 35-43.

Hilleman, M. R., & Werner, J. H. (1954). Recovery of new agent from patients with acute respiratory illness. *Proc Soc Exp Biol Med, 85*(1), 183-188.

Hinds, P. W., & Weinberg, R. A. (1994). Tumor suppressor genes. *Curr Opin Genet Dev, 4*(1), 135-141.

Hollstein, M., Rice, K., Greenblatt, M. S., Soussi, T., Fuchs, R., Sorlie, T., Hovig, E., Smith-Sorensen, B., Montesano, R., & Harris, C. C. (1994). Database of p53 gene somatic mutations in human tumors and cell lines. *Nucleic Acids Res, 22*(17), 3551-3555.

Ilyas, M., Tomlinson, I. P., Rowan, A., Pignatelli, M., & Bodmer, W. F. (1997). Beta-catenin mutations in cell lines established from human colorectal cancers. *Proc Natl Acad Sci U S A, 94*(19), 10330-10334.

Kaghad, M., Bonnet, H., Yang, A., Creancier, L., Biscan, J. C., Valent, A., Minty, A., Chalon, P., Lelias, J. M., Dumont, X., Ferrara, P., McKeon, F., & Caput, D. (1997). Monoallelically expressed gene related to p53 at 1p36, a region frequently deleted in neuroblastoma and other human cancers. *Cell, 90*(4), 809-819.

Knudson, A. G. (1993). Antioncogenes and human cancer. *Proc Natl Acad Sci U S A, 90*(23), 10914-10921.

Koch, P. E., Guo, Z. S., Kagawa, S., Gu, J., Roth, J. A., & Fang, B. (2001). Augmenting transgene expression from carcinoembryonic antigen (CEA) promoter via a GAL4 gene regulatory system. *Mol Ther, 3*(3), 278-283.

Laemmli, U. K. (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature, 227*(5259), 680-685.

Laurikkala, J., Mikkola, M. L., James, M., Tummers, M., Mills, A. A., & Thesleff, I. (2006). p63 regulates multiple signalling pathways required for ectodermal organogenesis and differentiation. *Development, 133*(8), 1553-1563.

Mills, A. A., Zheng, B., Wang, X. J., Vogel, H., Roop, D. R., & Bradley, A. (1999). p63 is a p53 homologue required for limb and epidermal morphogenesis. *Nature, 398*(6729), 708-713.

Nakamura, T., Hamada, F., Ishidate, T., Anai, K., Kawahara, K., Toyoshima, K., & Akiyama, T. (1998). Axin, an inhibitor of the Wnt signalling pathway, interacts with beta-catenin, GSK-3beta and APC and reduces the beta-catenin level. *Genes Cells, 3*(6), 395-403.

Newman, K. D., Dunn, P. F., Owens, J. W., Schulick, A. H., Virmani, R., Sukhova, G., Libby, P., & Dichek, D. A. (1995). Adenovirus-mediated gene transfer into normal rabbit arteries results in prolonged vascular cell activation, inflammation, and neointimal hyperplasia. *J Clin Invest, 96*(6), 2955-2965.

Nylander, K., Coates, P. J., & Hall, P. A. (2000). Characterization of the expression pattern of p63 alpha and delta Np63 alpha in benign and malignant oral epithelial lesions. *Int J Cancer, 87*(3), 368-372.

Patturajan, M., Nomoto, S., Sommer, M., Fomenkov, A., Hibi, K., Zangen, R., Poliak, N., Califano, J., Trink, B., Ratovitski, E., & Sidransky, D. (2002). DeltaNp63 induces beta-catenin nuclear accumulation and signaling. *Cancer Cell, 1*(4), 369-379.

Reis-Filho, J. S., Simpson, P. T., Fulford, L. G., Martins, A., & Schmitt, F. C. (2003). P63-driven nuclear accumulation of beta-catenin is not a frequent event in human neoplasms. *Pathol Res Pract, 199*(12), 785-793.

Rowe, W. P., Huebner, R. J., Gilmore, L. K., Parrott, R. H., & Ward, T. G. (1953). Isolation of a cytopathogenic agent from human adenoids undergoing spontaneous degeneration in tissue culture. *Proc Soc Exp Biol Med, 84*(3), 570-573.

Rubinfeld, B., Albert, I., Porfiri, E., Fiol, C., Munemitsu, S., & Polakis, P. (1996). Binding of GSK3beta to the APC-beta-catenin complex and regulation of complex assembly. *Science, 272*(5264), 1023-1026.

Saiki, R. K., Gelfand, D. H., Stoffel, S., Scharf, S. J., Higuchi, R., Horn, G. T., Mullis, K. B., & Erlich, H. A. (1988). Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. *Science, 239*(4839), 487-491.

Sambrook, J., Sugden, B., Keller, W., & Sharp, P. A. (1973). Transcription of simian virus 40. 3. Mapping of "early" and "late" species of RNA. *Proc Natl Acad Sci U S A, 70*(12), 3711-3715.

Sanger, F., Nicklen, S., & Coulson, A. R. (1977). DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc Natl Acad Sci U S A, 74*(12), 5463-5467.

Schmale, H., & Bamberger, C. (1997). A novel protein with strong homology to the tumor suppressor p53. *Oncogene, 15*(11), 1363-1367.

Sharp, P. A., Sugden, B., & Sambrook, J. (1973). Detection of two restriction endonuclease activities in Haemophilus parainfluenzae using analytical agarose--ethidium bromide electrophoresis. *Biochemistry, 12*(16), 3055-3063.

Shtutman, M., Zhurinsky, J., Simcha, I., Albanese, C., D'Amico, M., Pestell, R., & Ben-Ze'ev, A. (1999). The cyclin D1 gene is a target of the beta-catenin/LEF-1 pathway. *Proc Natl Acad Sci U S A, 96*(10), 5522-5527.

Tetsu, O., & McCormick, F. (1999). Beta-catenin regulates expression of cyclin D1 in colon carcinoma cells. *Nature, 398*(6726), 422-426.

Teuliere, J., Faraldo, M. M., Deugnier, M. A., Shtutman, M., Ben-Ze'ev, A., Thiery, J. P., & Glukhova, M. A. (2005). Targeted activation of beta-catenin signaling in basal mammary epithelial cells affects mammary development and leads to hyperplasia. *Development, 132*(2), 267-277.

Todd, R., & Wong, D. T. (1999). Oncogenes. *Anticancer Res, 19*(6A), 4729-4746.

Ueo, T., Kashima, K., Daa, T., Kondo, Y., Sasaki, A., & Yokoyama, S. (2005). Immunohistochemical analysis of morules in colonic neoplasms: morules are morphologically and qualitatively different from squamous metaplasia. *Pathobiology, 72*(5), 269-278.

Yang, A., Kaghad, M., Caput, D., & McKeon, F. (2002). On the shoulders of giants: p63, p73 and the rise of p53. *Trends Genet, 18*(2), 90-95.

Yang, A., Kaghad, M., Wang, Y., Gillett, E., Fleming, M. D., Dotsch, V., Andrews, N. C., Caput, D., & McKeon, F. (1998). p63, a p53 homolog at 3q27-29, encodes multiple products with transactivating, death-inducing, and dominant-negative activities. *Mol Cell, 2*(3), 305-316.

Yang, A., Schweitzer, R., Sun, D., Kaghad, M., Walker, N., Bronson, R. T., Tabin, C., Sharpe, A., Caput, D., Crum, C., & McKeon, F. (1999). p63 is essential for regenerative proliferation in limb, craniofacial and epithelial development. *Nature, 398*(6729), 714-718.

Lebenslauf

30.08. 1982	**geboren** als erstes von drei Kindern der Augenärzte Dr. Heike und Dr. Cesary J. Krüger
1988- 1992	**Besuch der Grundschule Bünde-Mitte**
1992- 2000	**Besuch des Gymnasiums am Markt in Bünde**
Sommer 1998	Vorzeitige Versetzung in die Jahrgangsstufe 12
Juni 2000	**Abitur** (Durchschnittsnote: 1,7) mit den Leistungskursen Englisch und Mathematik; Biologie als schriftlichem und Religion als mündlichem Prüfungsfach
August 2000	14tägiges **wissenschaftliches Praktikum** im Institut für biophysikalische Chemie der MH Hannover
Oktober 2000	**Aufnahme des Studiums der Humanmedizin in Marburg**
August 2002	Physikum
August 2003	1. Staatsexamen
September 2005	2. Staatsexamen
April 2006	Studienortswechsel: **Praktisches Jahr in Leipzig**
20.4.2007	3. Staatsexamen und **Abschluss des Medizinstudium, Gesamtnote: 2,33**
zurzeit	Fernstudium BWL für Mediziner Weiterbildung zur Augenärzin

Verzeichnis der akademischen Lehrer

Meine akademischen Lehrer waren Damen/ Herren (alphabetisch und ohne akademische Titel)

In Marburg: Aumüller, Baum, Bayer, Cetin, Czubayko, Daut, Dobbelstein, Eilers, Fritz, Gudermann, Kill, Klenk, Klose, Koolman, Krieg, Lill, Lohoff, Löffler, Müller, Röhm, Schäfer, Seitz, Voigt, Weihe

In Leipzig: Bühligen, Froster, Geyer, Gräfe, Heinritz, Josten, Kremers, Kujat, Lehnert, Metzger, Münsterer, Rothe, Rolle, Strenge, Till, Tosch, Weißer, Woller,

Danksagung

Mein Dank gilt allen Mitarbeitern des Instituts für Mikrobiologie der Philipps Universität Marburg, die zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben, insbesondere möchte ich aber danken:

Herrn Prof. Dr. Matthias Dobbelstein, Göttinger Zentrum für Molekulare Biowissenschaften,
für die Überlassung des Themas dieser Arbeit, für die Möglichkeit der freien wissenschaftlichen Entfaltung und nicht zu letzt für die Inspiration, die ich durch ihn erhielt.

Frau Dr. Constanze Möritz, Langen
für die gewissenhafte Anleitung und insbesondere für die Anfertigung und freundlichen Bereitstellung der Immunfluoreszenzen (Bilder 4.3, 4.5, 4.8, 4.12, 4.13).

Frau Dr. Elke Mühlberger, Institut für Virologie Marburg,
für die Übernahme der Betreuung dieser Arbeit

Meinen Eltern, *Dres. Heike und Cesary J. Krüger,* Bünde
für ihr Verständnis, ihr Vertrauen und ihre vielfältige Unterstützung, die es mir ermöglichte, mich auf diese Arbeit zu konzentrieren.

Meinem Partner *Lars Burghard,* Marburg
für die Aufmunterung und Motivation in Phasen der Anstrengung.