

9 ANHANG

9.1 Abkürzungsverzeichnis

Abl	<i>abelson murine leukemia virus</i>
ALL	<i>acute lymphoblastic leukemia</i>
APC	<i>adenomatosis polyposis coli</i>
APS	Ammoniumpersulfat
AS	Aminosäure
BCL9	<i>involved in B-cell non-Hodgkin's lymphomas</i>
Bcr	<i>breakpoint cluster region</i>
Brg1	<i>brahma-related gene 1</i>
BSA	<i>bovine serum albumin</i>
bp	<i>base pairs</i>
CBP	<i>CREB-binding protein</i>
CNK	<i>connector enhancer of Ksr</i>
CKI α/ϵ	<i>Casein kinase Iα/ϵ</i>
<i>C. elegans</i>	<i>Caenorhabditis elegans</i>
CLS	<i>cell lysis solubilizing</i>
CML	<i>chronic myelogenous leukemia</i>
CoIP	<i>co-immunoprecipitation</i>
CtBP	<i>C-terminal binding protein</i>
DH	<i>dbl homology domain</i>
BAI	<i>angiogenesis inhibitor</i>
Bcr	<i>breakpoint cluster region</i>
C-Terminus	<i>carboxyterminus</i>
Dbl	<i>diffuse B-cell lymphoma protein</i>
DES	<i>DNA elution solution</i>
<i>D. melanogaster</i>	<i>Drosophila melanogaster</i>
DNA	<i>deoxyribonucleic acid</i>
DH	<i>dbl homology domain</i>
dNTP	<i>deoxyribonucleotide triphosphate</i>
Dsh	<i>dishevelled</i>
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
Eph	<i>erythropoietin-producing hepatocarcinoma</i>

ErbB2	<i>human homologue to erythroblastose-virus</i>
Erbin	<i>ErbB2 receptor-interacting protein</i>
EDTA	<i>Ethylendiamineteraetic acid</i>
Ephrin	<i>EPH-related receptor tyrosine kinase</i>
EPH	<i>tyrosine-protein kinase receptor EPH.....</i>
FAP	<i>familial adenomatous polyposis</i>
FCS	<i>fetal calf serum</i>
FITC	Fluorescein isothiocyant
GAP	<i>GTPase activation protein function</i>
GABA	<i>gamma-aminobutyric acid</i>
-GLGF-	- Glycin, Leucin, Glycin, Phenylalanin -
GSK3-beta	<i>glycogen synthase kinase 3 beta</i>
HA	<i>hemagglutinin</i>
HCT116	<i>human colon tumor cell line 116</i>
hDlg	<i>human discs-large</i>
HEK293/293T	<i>human embryonic kidney cells 293/293T</i>
HER2	<i>human EGF receptor</i>
HBP1	<i>HMG-box repressor</i>
HMG	<i>high mobility group</i>
HPV	<i>human papilloma virus</i>
HTLV	<i>human T cell leukemia virus</i>
HTLV1-Tax	<i>human T cell leukemia virus <u>tax1</u></i>
Jab1	<i>Jun activation domain binding protein</i>
JAMM	<i>Jab1/MPN domain metalloenzyme</i>
kb	<i>kilobase</i>
kD	<i>kilo Dalton</i>
Kv4.1/4.2	<i>voltage-gated potassium channel 4.1/4.2</i>
LA-Mutante	Leuzin nach Alanin-Mutante
LAP-Proteine	<i>LRR and PDZ proteine</i>
Lef	<i>lymphoid enhancer binding factor</i>
LET	<i>homologous of the EGFR in C.elegans</i>
LRP	<i>lipoprotein receptor-related protein</i>
LRR	<i>leucine rich repeats</i>
M	<i>molare concentration</i>
MAGE	<i>melanoma associated antigen</i>
MAPK	<i>mitogen-activated protein kinase</i>
MCS	<i>multiple cloning site</i>
MMP	<i>matrix metalloproteinase</i>
MMTV	<i>mouse mammary tumour virus</i>

MPN	<i>Mpr1, Pad1 N-terminal</i>
Mpr 1	<i>proteasome regulatory subunit RPN1</i>
c-Myc	<i>oncogene of the MC29 avian myelocytomatosis virus</i>
N-Terminus	<i>aminoterminus</i>
NMDA	<i>N-methyl-D-aspartate</i>
nNOS	<i>neuronal nitric oxide synthase</i>
NOD/scid	<i>non-obese diabetic /skin xenograft core utilize combined severe immunodeficient</i>
NP-40	Nonidet P40
Pad1	<i>phenylalanyl acid decarboxylase ???</i>
PBS	<i>phosphate buffered saline</i>
PDZ	PSD-95/DLG/ZO-1
PH	<i>pleckstrin homology domain</i>
Pmel	<i>melanocyte protein</i>
PPS	<i>protein precipitating solution</i>
PSD-95	<i>postsynaptic density protein 95</i>
Rel	<i>human homologous to reticuloendotheliosis viral oncogen</i>
RT	Raumtemperatur
RTK	Rezeptortyrosinkinase
Ryk	<i>related to receptor tyrosine kinase</i>
SAP97	<i>synapse associated protein 97</i>
SDS	<i>sodium dodecyl sulfat</i>
SEW-M	<i>salt/ethanol wash solution</i>
siRNA	<i>silencing ribonucleinacid</i>
TEMED	N,N,N,N'-Tetramethylethylendiamin
Tcf	<i>T cell factor</i>
TRE	<i>Tcf response element</i>
beta-TrCP	<i>beta-transducin repeat-containing protein</i>
TLE	<i>transducin-like enhancer</i>
Tris	Tris (hydroxymethyl-)aminoethan
TRITC	Tetramethyl Rhodamin Isothiocyanat
VA-Mutante	Valin nach Alanin Mutante
Wnt	<i>wingless (drosophila), INT (mouse)</i>
wt	<i>wildtyp</i>
<i>X. laevis</i>	<i>Xenopus laevis</i>
Ψ	hydrophobe Aminosäure

9.2 Abbildungsverzeichnis

<i>Abb. 1.1: Darstellung einer PDZ-Domäne von PSD-95.</i>	1
<i>Abb. 1.2: Der Wnt-Signaltransduktionsweg.</i>	5
<i>Abb. 1.3: Proteindomänenstruktur von beta-Catenin.</i>	6
<i>Abb. 1.4: Schematische Darstellung des Wnt-Signaltransduktionsweges.</i>	9
<i>Abb. 1.5: Proteindomänenstruktur von Bcr.</i>	14
<i>Abb. 3.1: TOPflash/FOPflash: die Reporterplasmide des Luziferaseassays.</i>	33
<i>Abb. 3.2: Die Renilla-Luziferase im TOPflash/FOPflash-Luziferaseassay.</i>	34
<i>Abb. 3.3: Ablauf des Dual-Luziferaseassay.</i>	34
<i>Abb. 3.4: Hefe Zwei-Hybrid System.</i>	39
<i>Abb. 4.1: Sequenzvergleich der PDZ-Domänen von Erbin und Scribble-PDZ2.</i>	47
<i>Abb. 4.2: Sequenzvergleich von Erbin-PDZ und TIPI-PDZ.</i>	49
<i>Abb. 4.3: Sequenzvergleich Erbin-PDZ und hDlg-PDZ2.</i>	50
<i>Abb. 4.4: Sequenzvergleich Erbin-PDZ und PSD-95-PDZ2.</i>	51
<i>Abb. 4.5: Proteinsequenz von Jab1 mit markierter Jab1/MPN-Domäne.</i>	53
<i>Abb. 4.6: Proteinsequenz von c6.1A mit markierter Jab1/MPN-Domäne.</i>	53
<i>Abb. 4.7: Sequenzvergleich der Jab1/MPN-Domäne von Jab1 und c6.1A mit verschiedenen PDZ-Domänen.</i>	54
<i>Abb. 4.8: Westernblot zum Nachweis der Proteininteraktion zwischen ErbB2 und ErbinCT</i>	55
<i>Abb. 4.9: Westernblot zum Nachweis der Proteininteraktion zwischen Bcr und ErbinCT</i>	56
<i>Abb. 4.10: Westernblot zum Nachweis der Proteininteraktion zwischen APC und ErbinCT.</i>	57
<i>Abb. 4.11: Domänenstruktur vom LAP-Protein Erbin.</i>	59
<i>Abb. 4.12: Westernblot zum Nachweis der endogenen Proteininteraktion zwischen Erbin und beta-Catenin und zwischen Erbin und Bcr.</i>	60
<i>Abb. 4.13: Erbin Wildtyp inhibiert die Tcf-abhängige Genexpression im TOPflash/FOPflash-Luziferaseassay.</i>	62
<i>Abb. 4.14: ErbinCT aktiviert expressionsabhängig die Tcf-abhängige Genexpression im TOPflash/ FOPflash-Luziferaseassay.</i>	62
<i>Abb. 4.15: Immunfluoreszenz zum Nachweis der Lokalisation von Erbin, ErbinCT und beta-Catenin in HEK293-Zellen.</i>	63
<i>Abb. 4.16: Westernblot zum Nachweis von verkürzten Erbin-Proteinen.</i>	64
<i>Abb. 4.17: Immunfluoreszenz zum Nachweis der Kernlokalisation von ErbinCT in HEK293-Zellen in Abhängigkeit zur Proliferation.</i>	66

<i>Abb. 4.18: Westernblot zum Nachweis der endogenen Proteininteraktion zwischen Bcr und beta-Catenin.</i>	67
<i>Abb. 4.19: Westernblot zum Nachweis der notwendigen Bcr-Binderegion für den Bcr/beta-Catenin-Komplex.</i>	68
<i>Abb. 4.21: Charakterisierung von Bcr als Inhibitor der Tcf-abhängigen Genexpression im TOPflash/FOPflash-Luziferaseassay in HEK293-Zellen.</i>	69
<i>Abb. 4.20: Charakterisierung von Bcr als Inhibitor der Tcf-abhängigen Genexpression im TOPflash/FOPflash-Luziferaseassay in HCT116-Zellen.</i>	70
<i>Abb. 4.22: Westernblot zum Nachweis der notwendigen beta-Catenin-Binderegion für den Bcr/beta-Catenin-Komplex.</i>	71
<i>Abb. 4.23: Einfluß von Bcr auf den beta-Catenin/Tcf4-Komplex.</i>	72
<i>Abb. 4.24: Protein-Domänenstruktur von Bcr mit der neu definierten MTG (modulator of Tcf-dependent gene expression)-Domäne.</i>	73
<i>Abb. 4.25: Sequenzvergleich zwischen der neu definierten MTG-Domäne von Bcr und der zweiten Repressordomäne von N-CoR2.</i>	74
<i>Abb. 4.26: Immunfluoreszenz zum Nachweis der Lokalisation von transient überexprimiertem Bcr in HEK293-Zellen.</i>	76
<i>Abb. 4.27: Immunfluoreszenz zum Nachweis der Lokalisation von endogenen Bcr und beta-Catenin in HEK293-Zellen.</i>	76
<i>Abb. 4.28: Schematische Darstellung der verwendeten Bcr-Proteine.</i>	77
<i>Abb. 4.29: Westernblot zum Nachweis der Reduktion der c-Myc Expression durch Bcr-Proteine in HCT116-Zellen.</i>	78
<i>Abb. 4.30: Westernblot zum Nachweis der reduzierten Expression von Bcr in HEK293-Zellen durch siRNA.</i>	79
<i>Abb. 4.31: Westernblot zum Test einer eventuellen Interaktion zwischen beta-Catenin und Bcr-Abl.</i>	80
<i>Abb. 4.32: Westernblot zum Test der Expression von Tcf1.</i>	82
<i>Abb. 4.33: Westernblot zum Nachweis der endogenen Interaktion zwischen Tcf1 und Bcr.</i>	83
<i>Abb. 4.34: Westernblot zum Test der Interaktion zwischen Tcf4 und Bcr.</i>	83
<i>Abb. 4.35: Einfluß von Bcr Wildtyp und seines N-Terminus auf den beta-Catenin/Tcf1-Komplex.</i>	84
<i>Abb. 4.36: BcrΔNT und der beta-Catenin/Tcf1-Komplex.</i>	85
<i>Abb. 4.37.: Regulation des Tcf1/beta-Catenin-Komplexes durch Bcr in HEK293-Zellen.</i>	86
<i>Abb. 4.38: Regulation der Tcf1/Bcr-Komplexbildung durch IGF in HEK293T-Zellen.</i>	87
<i>Abb. 5.1: Protein C-Termini bzw. Wildtyp-Proteine im Test als Bindungspartner der PDZ-Domäne von Erbin.</i>	89

9.3 Tabellenverzeichnis

<i>Tabelle 1.1: Klassifizierung von PDZ-Proteinen</i>	2
<i>Tabelle 1.2: Beeinflussung der Expressionsmenge von Onkogenen durch den Wnt-Signaltransduktionsweg</i>	8
<i>Tabelle 1.3: Bcr - Gene, - RNA-Transkripte, - Proteine</i>	16
<i>Tabelle 3.1: Verwendete Hefestämme</i>	37
<i>Tabelle 3.2: Auxotrophe Hefemutanten</i>	38
<i>Tabelle 4.1: Verwendete Protein C-Termini in Hefe Zwei-Hybrid Versuchen</i>	45
<i>Tabelle 4.2: PDZ-Interaktionstests in Hefen</i>	48
<i>Tabelle 4.3: Sequenz vom pCR2.1-Klon 9</i>	58

9.4 Protokollverzeichnis

<i>Protokoll 3.1: Präparataufbereitung für die Immunfluoreszenz</i>	35
<i>Protokoll 3.2: BrdU-Proliferationstest</i>	36
<i>Protokoll 3.3: Allgemeine Arbeitsschritte während eines Heferversuches</i>	40
<i>Protokoll 3.4: LiAc-Transformation</i>	41
<i>Protokoll 3.5: Isolation von pDNA aus Hefen</i>	42
<i>Protokoll 3.6: Präparation der pDNS nach Isolierung aus Hefen zur Transformation in E.coli</i>	43

9.5 Eigene Veröffentlichungen

- **Poster**

- "**Zeisig R., Walther W., Ress A., and Fichtner I.:** High transfection potential in vitro and in vivo by lipoplexes with alkylphospholipids as a novel helper lipids"
21.05. - 24.5.2002, "Liposome Research Days Conference", Berlin

- "**Zeisig R., Ress A., Fichtner I., and Walther W.:** Lipoplexes with alkylphospholipid as new helper lipid for efficient *in vitro* and *in vivo* gene transfer in tumor therapy. Cancer Gene Therapy 2003 Apr;10(4):302-11"

- "Ress A., Walter W., Zeisig R.: Cationic DDAB and neutral DOPE ensure for efficient liposomal-mediated plasmid transfer into adherent cell lines"
in preparation

- "**Angelika Ress and Karin Moelling:** Bcr negatively regulates transcription of the wnt target gene myc by binding to beta-catenin "
Einreichetermin: Okt 2004

9.5.1 Laufende Projekte

- **Bcr: Multipler Inhibitor des Wnt-Signaltransduktionsweges**
Ress A., Mölling K.
- **Dualfunktion von Erbin im Wnt-Signaltransduktionsweg**
Ress A., Radziwill G., Mölling K.
- **Jab1 und c6.1A: Bindungspartner von Zielsequenzen für PDZ-Domänen**
Ress A., Radziwill G., Mölling K.

9.5.2 Patent

- **Patent**, Liposomen mit Alkylphospholipiden (in Arbeit)
Zeisig R., Ress A., Fichtner I.