

**Die Interferenz des
Tumorsuppressor-Homologen p63
mit dem kanonischen Wnt-Signalweg**

Dissertation
zur Erlangung des mathematisch-naturwissenschaftlichen Doktorgrades
„Doctor rerum naturalium“
der Georg-August-Universität zu Göttingen

vorgelegt von
Isabella Drewelus
aus Bielschowitz, Polen

Göttingen 2009

Referent: Prof. Dr. Ralf Ficner
Korreferent: Prof. Dr. Tomas Pieler

Tag der mündlichen Prüfung: 22. Januar 2010

Inhaltsverzeichnis

| | |
|--|------------|
| Inhaltsverzeichnis | I |
| Abkürzungsverzeichnis | VII |
| 1 Zusammenfassung / Abstract | 1 |
| 2 Einleitung | 3 |
| 2.1 Der Tumorsuppressor p53 | 3 |
| 2.2 Das Tumorsuppressorhomolog p63 und seine Isoformen | 5 |
| 2.2.1 Δ Np63 α in der Embryonalentwicklung..... | 8 |
| 2.2.2 Δ Np63 α in der Tumorprogression | 11 |
| 2.3 Die Wnt-Signalwege..... | 13 |
| 2.4 Der kanonische Wnt-Signalweg | 15 |
| 2.4.1 Das Schlüsselprotein β -Catenin und die TCF/LEF- Transkriptionsfaktoren | 17 |
| 2.4.2 Die Rolle des kanonischen Wnt-Signalwegs während der Embryonal- entwicklung, Gewebhomeostase und Hämatopoese..... | 19 |
| 2.4.3 Der kanonische Wnt-Signalweg in der Tumorigenese und –progression..... | 21 |
| 2.5 Überlappung der Expression und Aktivität von p63 und Komponenten des kanonischen Wnt-Signalwegs | 22 |
| 2.6 Bisherige Studien zur Interferenz von p63 mit dem Wnt-Signalweg | 24 |
| 2.7 Fragestellung | 26 |
| 3 Material | 27 |
| 3.1 Geräte | 27 |
| 3.2 Verbrauchsmaterialien | 28 |
| 3.3 Chemikalien | 29 |
| 3.4 Reaktionssysteme (Kits) | 31 |
| 3.5 Puffer und Lösungen..... | 31 |

| | | |
|----------|--|-----------|
| 3.6 | Nukleinsäuren | 33 |
| 3.6.1 | Nukleinsäuremarker..... | 33 |
| 3.6.2 | Vektoren und Konstrukte | 33 |
| 3.6.2.1 | Vektoren | 33 |
| 3.6.2.2 | Expressionskonstrukte | 34 |
| 3.6.2.3 | Reporterkonstrukte..... | 36 |
| 3.6.3 | Oligonukleotide..... | 37 |
| 3.6.3.1 | Sequenzieroligonukleotide | 37 |
| 3.6.3.2 | Oligonukleotide für die ortsspezifische Mutagenese und PCR-Klonierung..... | 37 |
| 3.6.3.3 | siRNA Oligonukleotide | 38 |
| 3.6.3.4 | RT-PCR Oligonukleotide | 38 |
| 3.7 | Proteine und Peptide..... | 39 |
| 3.7.1 | Proteinmarker | 39 |
| 3.7.2 | Rekombinante Peptide | 39 |
| 3.7.3 | Enzyme..... | 39 |
| 3.7.4 | Antikörper | 39 |
| 3.8 | Zellen | 40 |
| 3.8.1 | Prokaryotische Zellen | 40 |
| 3.8.2 | Eukaryotische Zellen | 40 |
| 3.9 | Medien und Lösungen für Bakterienkultur | 40 |
| 3.10 | Medien und Lösungen für Kultur eukaryotischer Zellen..... | 41 |
| 4 | Methoden | 42 |
| 4.1 | Zellbiologische Methoden | 42 |
| 4.1.1 | Arbeiten mit Bakterien | 42 |
| 4.1.1.1 | Herstellung chemisch kompetenter Zellen | 42 |
| 4.1.1.2 | Transformation chemisch kompetenter Zellen | 42 |
| 4.1.1.3 | Elektroporation zur Transformation elektrokompeter Zellen | 43 |
| 4.1.1.4 | Kultivierung und Selektion von Bakterien..... | 43 |
| 4.1.1.5 | Transformation und Expressionsinduktion der GST-getagten Proteine in <i>E.coli</i> | 43 |
| 4.1.2 | Arbeiten mit eukaryotischen Zellen..... | 44 |

| | | |
|-----------|---|----|
| 4.1.2.1 | Kultivierung von HEK-293-, NCI-H1299- und 5637-Zellen..... | 44 |
| 4.1.2.2 | Einfrieren und Auftauen von Zellen..... | 44 |
| 4.1.2.3 | Liposomen-vermittelte Transfektion mittels Lipofectamine™2000..... | 45 |
| 4.1.2.3.1 | Transiente Transfektion von eukaryotischen Zellen mit Plasmid-DNA..... | 45 |
| 4.1.2.3.2 | Transiente Transfektion von eukaryotischen Zellen mit siRNA..... | 46 |
| 4.1.2.4 | Herstellung von Wnt3a-konditioniertem Medium und die Kultivierung der dazu notwendigen Zellen..... | 46 |
| 4.2 | Arbeiten mit dem Organismus <i>Xenopus laevis</i> | 47 |
| 4.2.1 | <i>in vitro</i> Synthese von RNA..... | 47 |
| 4.2.1.1 | Linearisierung von „sense“ und „antisense“ Matrizen für die RNASynthese..... | 47 |
| 4.2.1.2 | <i>in vitro</i> Transkription von Monomethylguanosin-Cap-RNA zur Mikroinjektion in <i>Xenopus</i> Embryonen..... | 48 |
| 4.2.1.3 | Aufreinigung von RNA..... | 48 |
| 4.2.2 | Stimulation der Eiablage und Vorbereitungen zur Mikromanipulation..... | 48 |
| 4.2.3 | Mikroinjektion..... | 48 |
| 4.2.4 | Achsenduplikations-Assay..... | 49 |
| 4.2.4.1 | Dexamethason-Behandlung..... | 49 |
| 4.3 | Arbeiten mit Nukleinsäuren..... | 50 |
| 4.3.1 | Plasmidpräparation..... | 50 |
| 4.3.2 | Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren..... | 50 |
| 4.3.3 | Elektrophoretische Auftrennung von Nukleinsäuren..... | 51 |
| 4.3.3.1 | Analytische DNA-Agarosegele..... | 51 |
| 4.3.4 | Phenol/Chloroform-Extraktion..... | 51 |
| 4.3.5 | Ethanol-fällung..... | 52 |
| 4.3.6 | Behandlung von DNA mit Restriktionsendonukleasen..... | 52 |
| 4.3.6.1 | Analytische Behandlung von DNA mit Restriktionsendonukleasen..... | 52 |
| 4.3.6.2 | Präperative Behandlung von DNA mit Restriktionsendonukleasen..... | 52 |
| 4.3.7 | Ligation von DNA-Fragmenten..... | 53 |
| 4.3.8 | Amplifikation von DNA durch die Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR, polymerase chain reaction)..... | 54 |
| 4.3.9 | Ortsgerichtete Mutagenese (QuikChange™-Mutagenese)..... | 54 |

| | | |
|----------|--|-----------|
| 4.3.9.1 | Ortsgerichtete Mutagenese zur Herstellung des HA-mLEF1- ΔHMG-Konstrukts | 55 |
| 4.3.10 | PCR-Klonierung zur Herstellung der GST-getaggten ΔNp63α1-290 und 81-290 Konstrukts | 56 |
| 4.3.11 | Sequenzierung von DNA | 57 |
| 4.3.12 | Dual-Luciferase-Reporter-Test | 59 |
| 4.3.13 | RNA Isolation..... | 60 |
| 4.3.14 | Polymerase-Ketten-Reaktion zur reversen Transkription von RNA zu cDNA (RT-PCR) | 61 |
| 4.3.15 | Quantitative Polymerase-Ketten-Reaktion (qPCR)..... | 61 |
| 4.4 | Arbeiten mit Proteinen..... | 62 |
| 4.4.1 | Ernte von Zellen für eine anschließende SDS-Polyacrylamid- Gelelektrophorese (SDS-PAGE) | 62 |
| 4.4.2 | Auftrennung von Proteinen durch SDS-PAGE nach LAEMMLI | 63 |
| 4.4.3 | Western Blot (Nassblot) nach TOWBIN..... | 63 |
| 4.4.4 | Immunfärbung des Blots..... | 64 |
| 4.4.5 | Ko-Immunpräzipitation..... | 65 |
| 4.4.6 | GST-Pulldown..... | 66 |
| 5 | Ergebnisse | 67 |
| 5.1 | Der Einfluß einer Überexpression des Tumorsuppressorhomologs ΔNp63α auf die β-Catenin-TCF-vermittelte Transkription im kanonischen Wnt- Signalweg..... | 67 |
| 5.1.1 | Transiente Überexpression von ΔNp63α verstärkt die β-Catenin-TCF- vermittelte Aktivierung eines Reporters für den kanonischen Wnt-Signalweg in humanen Zelllinien..... | 67 |
| 5.1.2 | Ko-Expression von ΔNp63α steigert die LEF1-induzierte Doppelachsen-formation in <i>Xenopus laevis</i> Embryonen | 71 |
| 5.1.3 | Transiente Überexpression von ΔNp63α verstärkt die β-Catenin-TCF- vermittelte Reporteraktivierung auch in Zellen mit hohem endogenen ΔNp63α Proteinlevel..... | 73 |
| 5.2 | Der Effekt eines siRNA-vermittelten p63-Knockdowns auf die β-Catenin- TCF-vermittelte Transkription in humanen Zelllinien | 74 |

| | | |
|----------|--|------------|
| 5.2.1 | SiRNA Knockdown von Δ Np63 α verstärkt die β -Catenin-TCF-vermittelte Reporteraktivierung in humanen Zelllinien mit endogenem Δ Np63 α | 74 |
| 5.2.2 | Der Knockdown von p63 führt zur gesteigerten Transkription von β -Catenin-responsiven Genen..... | 76 |
| 5.2.3 | Die β -Catenin Proteinmengen und der Phosphorylierungsstatus werden durch den p63-Knockdown nicht beeinflusst | 80 |
| 5.3 | Δ Np63 α interagiert mit den TCF/LEF Transkriptionsfaktoren | 81 |
| 5.3.1 | Δ Np63 α interagiert mit allen TCF/LEF Transkriptionsfaktoren | 81 |
| 5.3.2 | Quantitative Analyse der LEF1- Δ Np63 α -Interaktion..... | 84 |
| 5.3.3 | Die HMG-Domäne innerhalb des LEF1-Proteins ist notwendig für die Interaktion mit Δ Np63 α | 85 |
| 5.3.4 | HA-LEF1 interagiert mit den AS 1-290 und AS 81-290 von Δ Np63 α | 88 |
| 5.4 | Δ Np63 α rekrutiert Repressoren (HDACs) an den TCF/LEF Transkriptionskomplex | 90 |
| 6 | Diskussion | 93 |
| 6.1 | Δ Np63 α im kanonischen Wnt-Signalweg: Aktivator oder Repressor? | 95 |
| 6.2 | Mögliche Regulationsmechanismen zur Steuerung der p63-Wirkung | 98 |
| 6.3 | Kontrolle der embryonalen Entwicklung durch die p63-Wnt-Signalweg-Interferenz? | 102 |
| 6.4 | Von der Tumorinitiation zur Tumorprogression..... | 103 |
| 7 | Anhang A: Untersuchungen zur Interferenz von p53 und ΔNp73α mit dem kanonischen Wnt-Signalweg..... | 105 |
| 7.1 | Einleitung – Das Tumorsuppressor-Homolog p73 und seine Isoformen..... | 105 |
| 7.2 | Fragestellung | 106 |
| 7.3 | Zusätzliches Material | 106 |
| 7.4 | Ergebnisse | 107 |
| 7.4.1 | Δ Np63 α , aber nicht p53 oder Δ Np73 α verstärkt die β -Catenin-TCF-vermittelte Transkription | 107 |
| 7.4.2 | Δ Np73 α interagiert mit LEF1 | 108 |

| | | |
|----------|---|------------|
| 7.5 | Diskussion..... | 110 |
| 8 | Anhang B: Auswirkungen von Mutationen des ΔNp63α-Proteins auf die Interferenz mit dem kanonischen Wnt-Signalweg..... | 112 |
| 8.1 | Einleitung – p63-Mutationen | 112 |
| 8.2 | Zusätzliches Material | 114 |
| 8.3 | Fragestellung | 114 |
| 8.4 | Ergebnisse | 115 |
| 8.4.1 | Unterschiede in der Interferenz von Δ Np63 α mit dem kanonischen Wnt-Signalweg bei AEC- und EEC-Mutanten | 115 |
| 8.5 | Diskussion..... | 117 |
| 9 | Literatur..... | 119 |
| | Danksagung..... | 139 |
| | Lebenslauf | 140 |

Abkürzungsverzeichnis

| | |
|-------------------|--|
| α | anti |
| abs. | absolut |
| Abt. | Abteilung |
| ADULT | Acro-dermato-ungual-lacrima-tooth |
| AEC | Ankyloblepharon Ectodermal dysplasia Clefing |
| APC | Adenomatous Polyposis Coli |
| APS | Ammoniumpersulfat |
| AS | Aminosäure |
| ATCC | American Type Culture Collection |
| ATP | Adenosintriphosphat |
| β - | beta- |
| β -Cat | β -Catenin |
| β -Gal | β -Galaktosidase |
| BSA | Rinderserumalbumin (Bovine Serum Albumin) |
| bzw. | beziehungsweise |
| c | centi |
| C- | Carboxy- |
| °C | Grad Celsius |
| cDNA | komplementäre DNA (complementary DNA) |
| CMV | Cytomegalievirus |
| CO ₂ | Kohlendioxid |
| d.h. | das heisst |
| dH ₂ O | destilliertes Wasser |
| Da | Dalton |
| DBD | DNA-Bindedomäne |
| Dex | Dexamethason |
| DMEM | Dulbecco's Modified Eagle Medium |
| DMSO | Dimethylsulfoxid |
| DNA | Desoxyribonukleinsäure |
| DNAse | Desoxyribonuklease |
| DOC | Desoxycholat |
| ds | doppelsträngig (double strand) |
| DSMZ | Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen |

| | |
|------------------|---|
| DTT | 1,4-Dithiothreitol |
| <i>E.coli</i> | <i>Escherichia coli</i> |
| EB | Elutionspuffer (elution buffer) |
| EDTA | Ethylendiamintetraacetat |
| EEC | Ectrodactyly Ectodermal dysplasia-Cleft lip/palate |
| EMT | Epithelial-Mesenchymalen Transition |
| <i>et al.</i> | <i>et altera</i> |
| F | Farad |
| FCS | Fötale Kälberserum |
| γ | gamma |
| g | Gramm |
| GFP | grünes Fluoreszenzprotein (green fluorescent protein) |
| GR | Glucocorticoidrezeptoren |
| GSK3β | Glykogen-Synthetase-Kinase 3β |
| GST | Glutathion-S-Transferasen |
| GZMB | Göttinger Zentrum für Molekulare Biowissenschaften |
| h | Stunde |
| H ₂ O | Wasser |
| HA | Haemagglutinin |
| HDAC | Histon-Deacetylase |
| HMG | High mobility group |
| IP | Immunpräzipitation |
| IPTG | Isopropyl-β-D-thiogalactopyranosid |
| k | Kilo |
| KM | Konditioniertes Medium |
| L | Liter |
| LB-Medium | Luria Bertani-Medium |
| LEF | Lymphoid enhancer factor |
| LMS | Limb-Mammary Syndrom |
| m | Meter, milli |
| M | Molar |
| MBS | (2,5-dioxopyrrolidin-1-yl) 3-(2,5-dioxopyrrol-1-yl)benzoate |
| min | Minute |
| MMP | Matrix-Metalloproteinase |
| M-MuLV | Moloney Murine Leukemia Virus |

| | |
|------------|--|
| mRNA | Messenger-RNA |
| μ | micro |
| n | nano |
| N- | Amino- |
| NLS | nukleäres Lokalisationssignal |
| NP-40 | Nondient P40 |
| NTP | Nukleosidtriphosphat |
| o.Z. | ohne Zusätze |
| OD | Optische Dichte, Oligomerisierungsdomäne |
| OH- | Hydroxy- |
| p | pico |
| P- | Phospho- |
| PAGE | Polyacrylamidgelelektrophorese |
| PBS | Phosphat-gepufferte Salinenlösung |
| PCR | Polymerase-Kettenreaktion (polymerase chain reaction) |
| <i>Pfu</i> | <i>Pyrococcus furiosus</i> |
| pH | negativer dekadischer Logarithmus der Protonen-Konzentration |
| qPCR | quantitative Polymerase-Kettenreaktion |
| PIPES | Piperazine-1,4-bis(2-ethanesulfonic acid) |
| PS | Post-SAM |
| r | rekombinant |
| RNA | Ribonukleinsäure |
| RNAse | Ribonuklease |
| RT | Raumtemperatur |
| RT-PCR | PCR zur reversen Transkription |
| RZPD | Deutsches Ressourcenzentrum für Genomforschung |
| S. | Seite |
| ss | einzelsträngig (single strand) |
| SAM | steriles-α-Motiv |
| SDS | Natriumdodecylsulfat |
| sek, s | Sekunde |
| Ser | Serin |
| SHFM | Split-Hand/Foot Malformation |
| siRNA | kleine interferierende RNA (small interfering RNA) |
| SUMO | kleine Ubiquitin-ähnliche Modifikation |

| | |
|--------------|---|
| TAE | Tris-Acetat-EDTA |
| <i>Taq</i> | <i>Thermus aquaticus</i> |
| TCF | T-Zell Faktor |
| TEMED | N,N,N',N'-Tetramethyldiamin |
| TEL | Translocation Ets leukemia |
| TFB | Transformationspuffer (transformation buffer) |
| TGF- β | Transforming Growth Factor- β |
| Thr | Threonin |
| TLE | Transducin-like-Enhancer of Split |
| TSA | Trichostatin A |
| Tris | Trishydroxymethylaminomethan |
| U | Unit als Einheit der Enzymaktivität |
| UpM | Umdrehungen pro Minute |
| ÜS | Überstand |
| UV | Ultra violett |
| V | Volt |
| v/v | Volumen pro Volumen (volume per volume) |
| w/v | Gewicht pro Volumen (weight per volume) |
| wt | wildtyp |
| z.B. | zum Beispiel |
| Ω | Ohm |

1 Zusammenfassung / Abstract

Das Tumorsuppressorhomolog p63 hat eine essentielle Rolle in der korrekten Entwicklung des mehrschichtigen Epithels, der Extremitätenknospen und der Hautanhangsgebilde, wie Haarfollikel, Zähne und Drüsen. Ebenfalls notwendig für die Entwicklung dieser Gewebe ist die regulierte Aktivität des kanonischen Wnt-Signalwegs. Beide Faktoren wurden des Weiteren mit der Onkogenese in Zusammenhang gebracht, wobei p63 hier im Verlauf der Tumorprogression häufig herunterreguliert wird, was den Krebszellen zu einem mesenchymalen und damit invasiveren Phänotyp verhilft. Eine Interferenz des p63-Proteins mit dem Wnt/ β -Catenin-Signalweg scheint daher plausibel und wurde bereits in Überexpressionsexperimenten untersucht. Es wurde vorgeschlagen, dass Δ Np63 α , die am häufigsten exprimierte p63-Isoform in epithelialem Gewebe, die β -Catenin-Menge und somit die kanonische Wnt-Aktivität durch die Inhibition der GSK3 β -Kinase positiv beeinflusst.

Im Rahmen dieser Arbeit wurde nach transienter Überexpression des Δ Np63 α -Proteins die verstärkte Aktivität eines Wnt-induzierbaren Reporters in humanen Zelllinien, sowie eine erhöhte Rate an Doppelachsenformationen in *Xenopus laevis*-Embryonen beobachtet. Der siRNA-vermittelte Knockdown des endogenen p63-Proteins in Zellen des Urothelkarzinoms führte jedoch ebenfalls zu einer verstärkten Expression des Reportergens, wie auch von Wnt-responsiven Genen, ohne einen detektierbaren Einfluss auf die β -Catenin Proteinmenge sowie den Phosphorylierungsstatus auszuüben. Durch Ko-Immünpräzipitation wurde eine Interaktion von Δ Np63 α mit Mitgliedern der TCF/LEF-Transkriptions-faktoren des kanonischen Wnt-Signalwegs nachgewiesen. Diese Beobachtungen sind vereinbar mit einem Modell, in welchem Δ Np63 α als Brückenprotein Transkriptionsrepressoren an die Promotoren Wnt-responsiver Gene rekrutiert. Auf diese Weise würde sowohl die Überexpression von Δ Np63 α als auch der Knockdown dieses Brückenproteins die funktionelle Nähe der Repressoren mit den Promotoren unterbinden und so zu einer verstärkten Transkription β -Catenin-responsiver Gene führen.

Die physiologische Funktion des Δ Np63 α im kanonischen Wnt-Signalweg liegt daher offenbar in der negativen Regulation der Wnt-Aktivität und der damit einhergehenden spezifischen Steuerung sowohl der Embryogenese als auch der Tumorprogression.

Drewelus I, Göpfert C, Hippel C, Dickmanns A, Damianitsch K, Pieler T and Dobbelstein M. p63 antagonizes Wnt-induced transcription. *Cell cycle*, in Druck.

Abstract

The tumor suppressor homologue p63 has an essential role in the proper development of squamous epithelia, limb buds and skin appendages, like hair follicles, teeth and glands. Another requirement for the development of these tissues is the regulated activity of the canonical Wnt signaling pathway. Both Wnt and p63 were implicated in oncogenesis, whereas p63 is usually down-regulated during tumor progression, providing the cells with a mesenchymal and therefore more invasive phenotype.

An interference of the p63 protein with the Wnt/ β -catenin pathway seems feasible and was investigated in overexpression studies before. It was suggested that Δ Np63 α , the predominant isoform of p63 in epithelia, has a positive effect on β -catenin levels through inhibition of GSK3 β .

In this report we show that, upon transient overexpression, Δ Np63 α indeed promotes Wnt-inducible reporter gene activity in human cells, as well as secondary axis formation in *Xenopus laevis* embryos. However, the siRNA-mediated knockdown of endogenous p63 in cells derived from a bladder carcinoma equally enhanced the expression of the reporter gene as well as Wnt-responsive genes. p63 knockdown did not detectably affect β -catenin protein levels or phosphorylation.

We observed physical interaction between Δ Np63 α and the members of the TCF/LEF family of Wnt-responsive transcription factors. Based on the observations a model was drawn, according to which Δ Np63 α functions as a bridging factor recruiting transcriptional repressors to promoters of Wnt-responsive genes. Thus, the overexpression of Δ Np63 α as well as the knockdown of this bridging protein both result in the separation of the repressors from the promoter regions and therefore lead to the enhancement of transcription of β -catenin-responsive genes.

The physiological function of Δ Np63 α in the canonical Wnt signaling pathway apparently consists in negative regulation of the Wnt activity, affecting embryogenesis as well as tumor progression.

Drewelus I, Göpfert C, Hippel C, Dickmanns A, Damianitsch K, Pieler T and Dobbstein M. p63 antagonizes Wnt-induced transcription. *Cell cycle*, in press.

2 Einleitung

2.1 Der Tumorsuppressor p53

Das humane *TP53*-Gen befindet sich auf Chromosom 17p13.1 und kodiert für ein Protein bestehend aus 393 Aminosäuren. Das p53-Protein ist ein Transkriptionsfaktor, dessen Aufgabe es ist, Kontrolle über die Proliferation der Zelle auszuüben und so einem unkontrollierten Wachstum, wie es im Verlauf der Tumorigenese der Fall ist, entgegenzuwirken (Kemp *et al.*, 1993). In zahlreichen Tiermodellen konnte gezeigt werden, dass der Funktionsverlust von p53 durch den Verlust oder eine Mutation des Gens zu einer gehäuften Entwicklung von spontanen und induzierten Tumoren führt (Donehower *et al.*, 1992; Jacks und Weinberg, 1994). Die Tatsache, dass in nahezu 50% aller malignen Tumoren des Menschen das *p53*-Gen eine Mutation aufweist (Levine, 1997), unterstreicht die Wichtigkeit der korrekten Funktion des Tumorsuppressors. In den übrigen Fällen liegt häufig eine Fehlfunktion wichtiger p53-Regulatoren wie Mdm2 oder p14^{ARF} vor (Danovi *et al.*, 2004; Kamijo *et al.*, 1998; Sherr und Weber, 2000). Mdm2, eine Ubiquitin-Ligase, reguliert hierbei die p53-Mengen, indem es das p53-Protein polyubiquitiniert und somit für den proteasomalen Abbau markiert. Das *Mdm2*-Gen ist selber p53-responsiv und bildet so einen negativen selbstregulierenden Rückkopplungsmechanismus (Wu *et al.*, 1993).

Konkret besteht eine p53-Funktion darin, als Antwort auf genotoxischen Stress und Hyperproliferation, über die Transkription verschiedener Zielgene einen Zellzyklusarrest einzuleiten. So bekommt die Zelle zunächst die Möglichkeit zur Reparatur entstandener DNA-Schäden. Bei zu starken DNA-Schäden oder dysregulierter Onkogen-Expression wird Apoptose induziert (Haupt *et al.*, 2003; Lowe *et al.*, 1993). Auf diese Weise bewahrt p53 die genomische Integrität und wird deshalb auch als Wächter des Genoms bezeichnet (Lane, 1992).

Die Aktivierung des Tumorsuppressors kann über verschiedene Signalwege erfolgen; zum einen über die Proteinkinasen ATM (ataxia–telangiectasia mutated) und CHK2 (Checkpoint-Kinase-2) nach DNA-Schäden durch ionisierende Strahlung (Doppelstrangbrüche) (Cheng *et al.*, 2009; Maya *et al.*, 2001) und zum anderen über die Proteinkinase ATR (ataxia–telangiectasia and Rad3-related) und CHK1 (Checkpoint-Kinase-1) beispielsweise nach UV-Strahlung oder Chemotherapeutika (Kapoor und Lozano, 1998; Tibbetts *et al.*, 1999). Beide Kinasen vermitteln den Abbau von Mdm2 und Mdm4 (Meulmeester *et al.*, 2005; Stommel und Wahl, 2004) und führen so zu einer Stabilisierung und Akkumulation von p53.

Als dritte, von DNA-Schäden unabhängige, Möglichkeit kann p53 durch p14^{ARF} stabilisiert werden (Lowe und Sherr, 2003; Sherr und Weber, 2000). Hierbei wird p14^{ARF} durch aktivierte Onkogene wie Ras oder Myc (Palmero *et al.*, 1998; Zindy *et al.*, 1998) induziert und inhibiert Mdm2 (Honda und Yasuda, 1999; Tao und Levine, 1999; Weber *et al.*, 1999), was ebenfalls eine p53-Akkumulation zur Folge hat.

Die Regulierung der p53-Aktivität ist abhängig von der Stärke der DNA-Schädigung und erfolgt über posttranslationale Modifikationen und damit einhergehende Konformationsänderungen (Brooks und Gu, 2003). Die Art der Modifikation ist hierbei vielfältig und reicht von Phosphorylierung über Acetylierung, Glykosylierung, Ribosylierung, Methylierung, Ubiquitylierung und SUMOylierung (Bode und Dong, 2004) zu NEDDylierung (Harper, 2004). Auch die Interaktion mit anderen Proteinen dient als mögliche Regulation der p53-Stabilität oder Aktivität [zur Übersicht (Prives und Hall, 1999)].

Das p53-Protein lässt sich in drei hochkonservierte Domänen unterteilen (Abbildung 1A): Die aminoternale Transaktivierungsdomäne (AS 1-42), die zentrale DNA-Bindungsdomäne (AS 102-292), sowie die carboxyterminale Oligomerisierungsdomäne (AS 324-355). Nach Tetramerisierung der p53-Moleküle über die Oligomerisierungsdomäne binden diese mit Hilfe der DNA-bindenden Domänen an spezifische Konsensussequenzen innerhalb p53-responsiver Promotoren. Die p53-Bindestelle ist hierbei: 5'-PuPuPuC(A/T)(A/T)GPyPyPy-N₍₀₋₁₃₎ – PuPuPuC(A/T)(A/T)GPyPyPy (Pu = Purin; Py = Pyrimidin; N = beliebiges Nukleotid). Die anschließende Bildung des basalen Transkriptionskomplexes erfolgt durch die Rekrutierung von zellulären Transkriptionsinitiationsfaktoren (Levine, 1997; McLure und Lee, 1998), wie zum Beispiel das TATA-Box-Bindeprotein (TBP) (Horikoshi *et al.*, 1995). Diese Faktoren binden an die transaktivierende Domäne des p53-Proteins und führen so zur Transkription der Zielgene (Levine, 1997). Beispiele für p53-responsive Gene sind *p21*, welches nach seiner Bindung an Cyclin-Kinase-Komplexe den Übergang von der G1- in die S-Phase inhibiert (Vogelstein *et al.*, 2000), oder Mediatoren der Apoptose wie *Bax*, *Noxa* und *Puma* (Nakano und Vousden, 2001; Vogelstein *et al.*, 2000).

2.2 Das Tumorsuppressorhomolog p63 und seine Isoformen

Neben dem Tumorsuppressorgen *TP53* existieren in Säugetierzellen zwei weitere homologe Gene, *TP63* und *TP73*, welche für Proteine kodieren, die eine starke Ähnlichkeit zu p53 in ihrer Proteinstruktur und Funktion aufweisen. Das humane *p73*-Gen wurde im Jahre 1997 auf Chromosom 1p36.3 entdeckt (Kaghad *et al.*, 1997; Schmale und Bamberger, 1997). Im Jahre 1998 folgte die Entdeckung des humanen *p63*-Gen (Synonyme: *p40*, *p51*, *p73L*, *AIS*, *CUSP*, *KET*) auf Chromosom 3q27-29 (Augustin *et al.*, 1998; Lee *et al.*, 1999; Osada, 1998; Senoo *et al.*, 1998; Trink *et al.*, 1998; Yang *et al.*, 1998).

Die starke Homologie auf Ebene der Aminosäuresequenz, wie auch der sich daraus ergebende Domänenaufbau aus der N-terminalen Transaktivierungsdomäne, der zentralen DNA-Bindedomäne und der C-terminalen Oligomerisierungsdomäne führte für p53, p63 und p73 zur Einordnung in eine gemeinsame Proteinfamilie (Kaghad *et al.*, 1997; Osada, 1998; Trink *et al.*, 1998; Yang *et al.*, 1998).

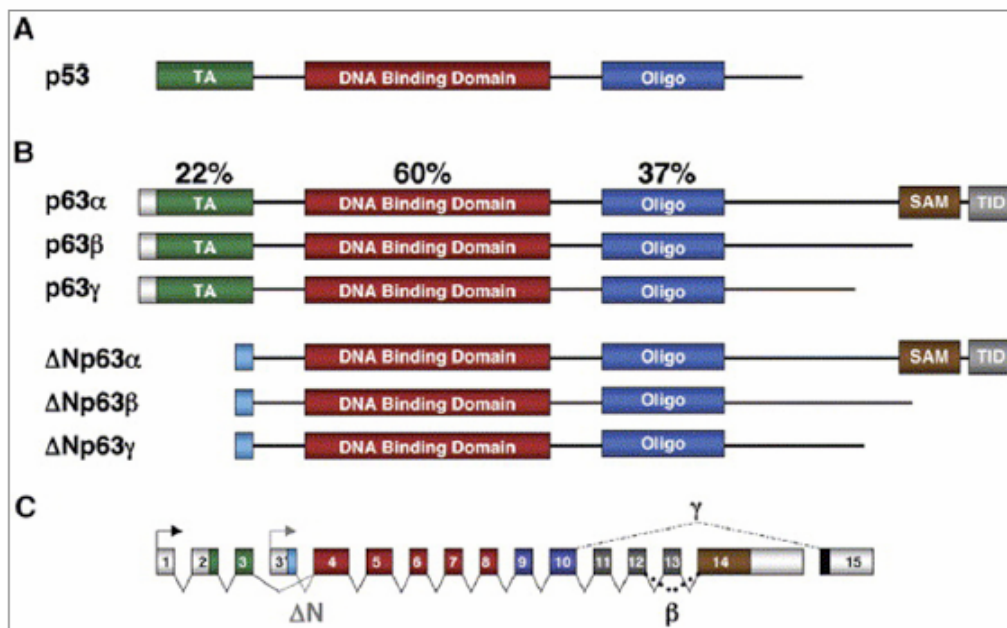


Abbildung 1: Schematische Darstellung der funktionellen Domänen von p53 und p63-Transkriptionsfaktoren (Barbieri und Pietenpol, 2006)

(A) Domänenverteilung im p53-Protein bestehend aus der N-terminalen Transaktivierungsdomäne (TA), der zentralen DNA-Bindedomäne sowie der C-terminalen Oligomerisierungsdomäne (Oligo). (B) Domänenstruktur der verschiedenen p63-Isoformen mit Angabe der prozentualen Sequenzidentität der einzelnen Domänen zwischen p63 und p53. Die α -Isoformen des p63-Proteins weisen noch zwei weitere C-terminale Domänen auf: das Sterile- α -Motiv (SAM), sowie die Transaktivierungs-Inhibitions-Domäne (TID). (C) Struktur des *p63*-Gens mit Darstellung der alternativen Promotoren und der differentiellen Spleissung.

Im Rahmen dieser Untersuchungen liegt der Fokus auf dem Tumorsuppressor-Homologen p63, der im Bereich der transaktivierenden Domäne zu 22% homolog zu p53 ist, innerhalb der DNA-Bindedomäne eine Homologie von 60% und innerhalb der Oligomerisierungsdomäne von 37% zu p53 aufweist.

Das p63-Gen wird, wie auch das p73-Gen, in unterschiedlichen Isoformen exprimiert, die einerseits als p53-Agonisten und andererseits als p53-Antagonisten fungieren können.

Diese Expression der für p63 sechs unterschiedlichen Varianten (siehe Abbildung 1B), kann mit der Genstruktur erklärt werden, die in Abbildung 1C dargestellt ist. Im aminoterminalen Bereich liegen zwei alternative Promotoren vor, die zur Expression von Proteinen mit unterschiedlichen Funktionen führen. Die Proteine, die p53-Funktionen nachahmen können, werden über den vorderen Promotor transkribiert und führen zu TAp63-Formen, die, wie p53, die Transaktivierungsdomäne beinhalten und über die sehr ähnliche DNA-Bindedomäne die p53-Konsensussequenzen im Promotorbereich p53-responsiver Gene binden und aktivieren können (Yang *et al.*, 1998).

Die Verwendung des internen Promotors führt zu N-terminal trunkeerten Isoformen, denen die Transaktivierungsdomäne fehlt. Diese Δ Np63-Isoformen haben eine dominant-negative Funktion gegenüber den TAp63-Proteinen sowie dem p53-Protein (Yang *et al.*, 1998).

Δ Np63-Isoformen können ebenfalls die p53-Konsensussequenzen binden und galten lange Zeit als Inhibitoren der p53-abhängigen Transkription, da davon ausgegangen wurde, dass sie keine Transkriptionsinitiationsfaktoren rekrutieren können. Zahlreiche Experimente zeigten jedoch immer wieder auch transaktivierendes Potential der Δ Np63-Isoformen auf (Dohn *et al.*, 2001; King *et al.*, 2003; Wu *et al.*, 2003). Hierfür könnte die Existenz weiterer Transaktivierungsdomänen verantwortlich sein. Neben der zu p53 homologen Transaktivierungsdomäne wurde im Bereich der Exons 11 und 12 eine weitere Aktivierungsdomäne identifiziert, welche bei Δ Np63 α - und β -Isoformen eine Promotoraktivierung vermittelt und in den TAp63-Varianten verstärkt (Ghioni *et al.*, 2002). Auch im Δ N-spezifischen Bereich der Δ Np63-Isoformen konnte eine prolinreiche Domäne nachgewiesen werden, welche transaktivierende Fähigkeiten besitzt und durch die Aktivierung von Zielgenen einen Zellzyklusarrest induzieren kann (Helton *et al.*, 2006).

Differentielles Spleissen im C-terminalen Bereich hinter der Oligomerisierungsdomäne führt zur Entstehung der weiteren Isoformen. Die α -Isoform beinhaltet dabei im C-Terminus ein Steriles- α -Motiv (SAM) (Thanos und Bowie, 1999), sowie im Post-SAM-Bereich die Transaktivierungs-Inhibitions-Domäne (TID) (Serber *et al.*, 2002). Die SAM-

Domäne wurde als Protein-Protein-Interaktionsdomäne beschrieben (Ponting, 1995; Schultz *et al.*, 1997) und ist Bestandteil vieler eukaryotischer Proteine bspw. in der Entwicklung oder Signaltransduktion.

Sie vermittelt die Interaktion zu anderen SAM-Domänen-Proteinen und sorgt auf diese Weise für die Ausbildung von Homo- und Heterooligomeren, kann aber auch mit Proteinen ohne SAM-Domäne und sogar mit RNA interagieren (Kim und Bowie, 2003). Bei den α -Isoformen der p63 und p73-Proteine erfolgt die Tetramerisierung jedoch über die Oligomerisierungs-domäne, nicht über die SAM-Domäne (Chi *et al.*, 1999; Cicero *et al.*, 2006), so dass vermutlich andere regulatorische Proteine an p63 α oder p73 α binden können. In diesem Zusammenhang wurde die SAM-Domäne auch als allgemeines Transkriptions-Repressions-Modul bezeichnet und wirkt über die Bindung von Repressoren oder Repressorkomplexen (Ghioni *et al.*, 2002).

Die Rolle der Transaktivierungs-Inhibitions-Domäne ist die Assoziation mit einem Bereich innerhalb der N-terminalen Transaktivierungsdomäne der TA-Isoformen, welche homolog zur Mdm2-Bindestelle im p53-Protein ist. Diese Interaktion führt zur Inhibition der transaktivierenden Funktion, da die Bindung von Ko-Faktoren verhindert wird (Serber *et al.*, 2002). Die p63 β -Isoformen sind im Vergleich zu den α -Isoformen C-terminal um die TID- und einen Großteil der SAM-Domäne verkürzt. In γ -Isoformen fehlen die Exons 11-14, während ein alternatives Exon 15 den C-Terminus des Proteins bildet.

Neben den oben beschriebenen Funktionen der verschiedenen p63-Proteine in der Regulation p53-responsiver Gene, wurde im Überexpressionssystem oder Knockdown-Hintergrund mit anschließender cDNA-Hybridisierung sowie in Chromatin-immunpräzipitationen eine Vielzahl an Genen reguliert vorgefunden, die p53-unabhängig transkribiert werden (Birkaya *et al.*, 2007; Blandino und Dobbelstein, 2004; Testoni *et al.*, 2006; Vigano *et al.*, 2006; Yang und McKeon, 2000). Diese umfassen besonders Gene, welche in die Zell-Adhäsion involviert sind, wie *PEDF*, ein Mitglied der Serin-Protease-Inhibitor-Familie (Sasaki *et al.*, 2005b) oder das Membran-assoziierte Protein EVPL (Osada *et al.*, 2005). Des Weiteren sind zahlreiche Gene identifiziert worden, die eine Rolle in der Entwicklung spielen, wie *JAG1*, ein Ligand des Notch-Rezeptors, oder *BMP7*, ein Mitglied der TGF β -Superfamilie (transforming growth factor- β) (Laurikkala *et al.*, 2006).

2.2.1 Δ Np63 α in der Embryonalentwicklung

Die Expression des *p63*-Gens konzentriert sich, im Gegensatz zur ubiquitären Expression von *p53*, hauptsächlich auf die basale Schicht des mehrschichtigen Plattenepithels, welche die epithelialen Stammzellen beherbergt. Hier ist es größtenteils die Δ Np63 α -Isoform (Liefer *et al.*, 2000; Nylander, 2002; Signoretti *et al.*, 2000; Yang *et al.*, 1998), die in hohen Mengen in epitheliale Gewebe wie der Epidermis, der Limbus cornea (siehe Abbildung 2A), Harnblase, Prostata (siehe Abbildung 2B), der Gebärmutter oder der Milchdrüse zu finden ist. In diesen Geweben konnte eine Korrelation zwischen einer hohen *p63*-Expression und dem Proliferationspotential dieser Stammzellen nachgewiesen werden, wodurch *p63* die Rolle als Stammzellmarker zugesprochen wurde (Pellegrini *et al.*, 2001).

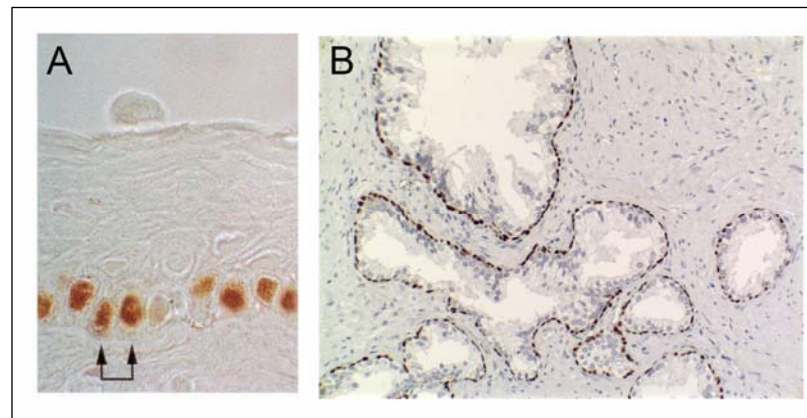


Abbildung 2: Immunhistofärbungen zur Expression von *p63* in epitheliale Gewebe

(A) Expression von *p63* (braune Färbung) in einer Biopsie des Limbus (Übergangszone zwischen Horn- und Lederhaut des Augapfels), welche die Stammzellen für Epithel und Endothel der Cornea beherbergt aus (Pellegrini *et al.*, 2001). (B) Positive *p63*-Färbung (braun) in den basalen Zellen der Prostata aus (Oudes *et al.*, 2006).

Die physiologische Bedeutung der Δ Np63 α -Expression in dieser Epithelschicht während der Embryonalentwicklung, wird durch Untersuchungen an *p63* ^{-/-} Mäusen verdeutlicht, welche von den zwei unabhängigen Arbeitsgruppen um Alea Mills und um Frank McKeon, 1999 eingeführt wurden. Beide Gruppen beschrieben einen ähnlichen Phänotyp, in welchem das Epithel einschichtig vorliegt und alle mehrschichtigen Plattenepithelien fehlen. Aufgrund der mangelnden Hautbarriere dehydrieren die Tiere schnell und sterben wenige Stunden nach der Geburt. Des Weiteren fehlt die Entwicklung von Hautanhangsgebilden, wie Haarfollikel, Zähnen und einer Vielzahl an Drüsen, z.B. Milchdrüsen, Speicheldrüsen und Tränendrüsen. Auch die Entwicklung der Extremitäten

sowie des Schädels ist gestört (siehe Abbildung 3). Die Mäuse weisen stark verstümmelte Gliedmaßen und Lippen-, Kiefer- und Gaumenspalten auf (Mills *et al.*, 1999; Yang *et al.*, 1999).

Trotz sehr ähnlicher Ergebnisse gehen die Interpretationen diese Befunde auseinander. Mills *et al.* erklärt ihre Beobachtung in p63 $-/-$ Mäusen mit einer frühen Blockierung der Festlegung zur Differenzierung des einfachen Ektoderms zu epidermalen Gewebe (Mills *et al.*, 1999). Yang *et al.* sieht die Funktion von p63 hingegen in der Erhaltung der basalen Stammzellpopulation durch Stammzellerneuerung, da sie in der Epidermis ihrer Mäuse sehr wohl Stellen mit differenzierten Zellen vorgefunden hat. Somit sieht sie nicht das Fehlen der Differenzierung sondern des proliferativen Potentials als Ursache für den Phänotyp der p63 $-/-$ Mäuse (Yang *et al.*, 1999).

Zur Klärung der Frage nach der genauen p63-Funktion stellten weitere Untersuchungen die Existenz der verschiedenen p63-Isoformen in den Vordergrund der Diskussion.

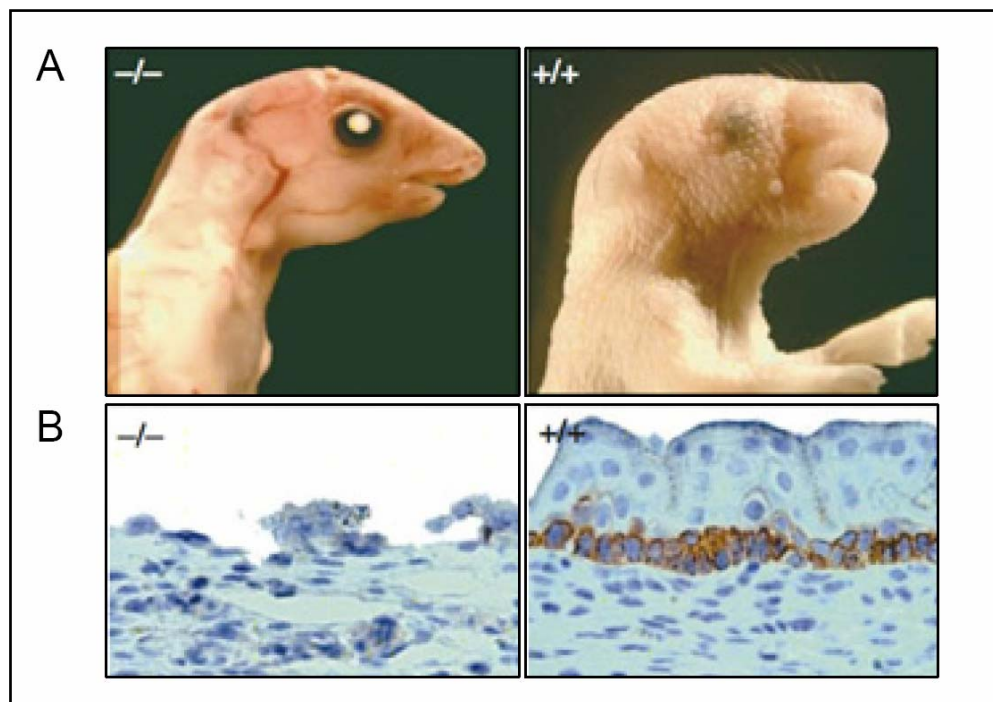


Abbildung 3: p63 $-/-$ versus p63 $+/+$ Maus.

(A) Maus im postnatalen Stadium P1. Bei p63 $-/-$ Mäusen sind unterentwickelte Backen, sowie fehlende Augenlider, Barthaare, Haut und Hautanhangsgebilde inklusive Tasthaare, Fellhaarfollikel und Haarschäfte zu verzeichnen, während die p63 $+/+$ -Mäuse einen normalen Phänotyp besitzen (B) Anti-Keratin 5-Färbung (Basalzellmarker) der Epidermis im Stadium E17. In p63 $-/-$ -Mäuse liegt ein undifferenziertes, einschichtiges Epithel vor, während die Epidermis der p63 $+/+$ Mäuse deutlich eine positive basale Keratin 5-Färbung und oberhalb dieser Schicht eine Stratifizierung aufweist aus (Yang *et al.*, 1999).

Koster et al. 2002 beschreibt in diesem Zusammenhang die frühere Expression der TAp63 Isoformen in allen Zellen des Oberflächen-Ektoderms ab dem Entwicklungsstadium E7,5, welches noch vor dem Einsetzen der Stratifizierung liegt. Die Expression der ΔN -Isoformen setzt erst der Stratifizierung nachgeschaltet, jedoch vor der Differenzierung im Stadium E9,5 ein (Byrne et al., 1994; Koster et al., 2004). In mehreren endodermalen Zelllinien ohne endogene p63-Expression wurde beobachtet, dass die Überexpression von TAp63, aber nicht $\Delta Np63$ zur Expression von Basalmarkern, wie Keratin 5 und 14 führt, welche die Festlegung zur Einleitung des Stratifizierungsprogramms signalisieren (Koster et al., 2004).

Auf diese Weise entstand ein Modell (Abbildung 4), in welchem TAp63 zur Festlegung des epithelialen Stratifizierungsprogramms notwendig ist, im weiteren Verlauf jedoch die terminale Differenzierung der Zellen inhibiert. Die Expression von $\Delta Np63$ zu diesem Zeitpunkt fördert einerseits das Proliferationspotential und sorgt so für den Erhalt des Stammzellpools, und andererseits blockiert es die Funktionen von TAp63 und induziert auf diese Weise die Entwicklung der embryonalen Epidermis (McKeon, 2004).

Neuere Untersuchungen in transgenen Mäusen mit p63-/- Hintergrund, die entweder mit TAp63- oder $\Delta Np63$ -Isoformen unter Kontrolle eines basalzellspezifischen Keratin 5-Promotors komplementiert wurden, zeigten unterschiedliche Funktionen der

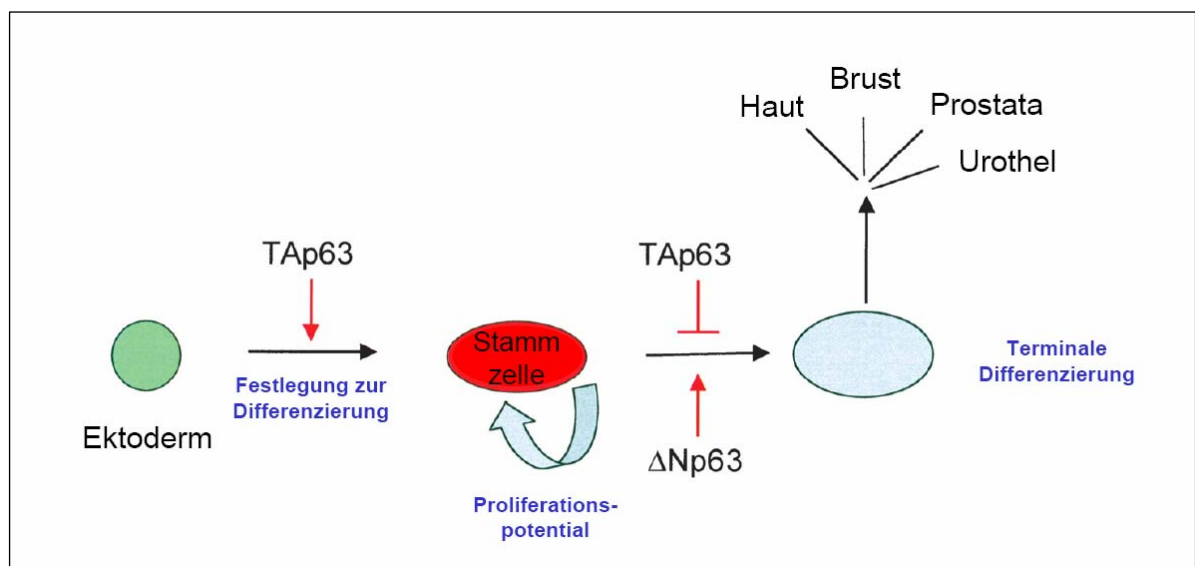


Abbildung 4: Modell zum Einfluss der p63-Isoformen (TA und ΔN) während der ektodermalen Differenzierung. Erläuterungen im Text. [aus (McKeon, 2004)]

verschiedenen Isoformen. Während $\Delta Np63$ -Proteine die Gene der basalen Schicht regulieren (*K14*), sind die TAp63-Formen an der Regulation der Marker der darüberliegenden Schichten beteiligt (*Ets-1*, *K1*, *Transglutaminasen*, *Involucrin*) (Candi *et al.*, 2006).

Die physiologische Regulation der p63-Isoformen ist demnach noch nicht gänzlich aufgeklärt und scheint sich als sehr fein eingestellter Mechanismus auszugeben, der nicht nur auf Ebene der Transkription, sondern auch durch miRNA gesteuert wird (Yi *et al.*, 2008).

2.2.2 $\Delta Np63\alpha$ in der Tumorprogression

Ein wichtige Funktion des Tumorsuppressors p53 ist die Regulierung von Zellzyklusarrest und Apoptose, welche, wenn nicht korrekt ausgeführt, zur Tumorentstehung führen kann. Schnell stellt sich da die Frage nach dem Einfluss von p63 in der Onkogenese. Während für die TAp63-Isoformen eine Induktion von Zellzyklusarrest wie auch der Apoptose durch die Aktivierung p53-responsiver Gene und somit eine tumorsupremierende Wirkung beobachtet wurde (Osada, 1998; Yang *et al.*, 1998), wurden für $\Delta Np63$ -Proteine entgegengesetzte Effekte verzeichnet (Yang *et al.*, 1998). Dies fand jedoch nur vor einem p53-positiven Hintergrund statt. Im p53-negativen Kontext konnten sowohl die TA- als auch die $\Delta Np63$ -Isoform Zellzyklusarrest und Apoptose durch Aktivierung von p53-Zielgenen einleiten und führten so zur Wachstumssuppression (Dohn *et al.*, 2001).

Eine Dysregulation von p63 (TA und/oder ΔN -Isoformen) auf Ebene von verstärkter Proteinexpression oder Gen-Amplifikation ist auch in vielen Epithelkarzinomen wie beispielsweise der Harnblase, des Brustgewebes aber auch der Prostata beobachtet worden (Choi *et al.*, 2002; Crook *et al.*, 2000; Hibi *et al.*, 2000; Hu *et al.*, 2002; Massion *et al.*, 2003; Park *et al.*, 2000; Tonon *et al.*, 2005; Yamaguchi *et al.*, 2000). *P63*-Mutationen sind in Tumoren jedoch nur selten zu finden, und bekannte *p63*-Mutationen, die mit humanen Syndromen assoziiert sind, lassen keine Prädisposition für Tumorerkrankungen erkennen (Hagiwara *et al.*, 1999; Moll, 2003; Osada, 1998).

Für das $\Delta Np63\alpha$ -Protein, sind widersprüchliche Daten bezüglich seiner Rolle in der Tumorprogression bekannt. Als Antagonist von p53 ist es ein potentielles Onkogen. Die Überexpression von $\Delta Np63\alpha$ in Rat-1a-Zellen verstärkt das Koloniewachstum der Zellen sowie das Wachstum im Mäuse-Xenograftsystem (Hibi *et al.*, 2000). Diese

Beobachtungen lassen den Schluss zu, dass es nicht nur das proliferative Potential der epithelialen Stammzellen, sondern auch der Tumorzellen steigert (Blandino und Dobbstein, 2004).

Auf der anderen Seite gibt es auch Ergebnisse, die zeigen, dass der Verlust von $\Delta Np63\alpha$ mit einer schlechteren Prognose für Tumorpatienten assoziiert ist. Eine Vielzahl verschiedener Tumore reduziert ihre $\Delta Np63\alpha$ -Menge im Verlauf der Tumorprogression im besonderen Zusammenhang mit der Ausbreitung von Metastasen. Untersuchungen von Blasenkarzinomen zeigten zwar in 50% der Fälle erhöhte Mengen an $\Delta Np63\alpha$ -Protein (Park *et al.*, 2000), bei genauerer Betrachtung wurde jedoch festgestellt, dass dieses nur für nicht-invasive, oberflächliche Tumore gültig war, während die invasivsten Tumore keine p63-Expression mehr aufwiesen (Koga *et al.*, 2003a; Koga *et al.*, 2003c; Urist *et al.*, 2002). Koga identifizierte in diesem Zusammenhang auch den Verlust von $\Delta Np63\alpha$ als Marker für eine schlechte Verlaufsprognose mit einer Signifikanz von $P=0,074$. Ähnliche Erkenntnisse wurde auch für Karzinome der Gebärmutter Schleimhaut (Stefansson *et al.*, 2006a), sowie für Karzinome des Ösophagus (Morita, 2005) und duktales Karzinome der Brust (Wang *et al.*, 2002) erzielt.

Auch im Zellkultursystem konnte eine verstärkte Zellmigration und -invasion nach p63-Knockdown in zahlreichen Plattenepithelkarzinom-Zelllinien, wie auch in der Keratinozyten-Zelllinie HaCaT und der A431-Zelllinie aus der Vulvaepidermis beobachtet werden (Barbieri *et al.*, 2006; Gu *et al.*, 2008; Higashikawa *et al.*, 2007). Hierbei wurde auch nach p63-Knockdown eine Vielzahl an Genen verändert reguliert vorgefunden, die in die Migration und Invasion involviert sind (Barbieri *et al.*, 2006).

Die Wirkung von $\Delta Np63\alpha$ in der Tumorprogression ist demnach Kontext-abhängig.

2.3 Die Wnt-Signalwege

Intrazelluläre Signalwege sind im Verlauf der Embryogenese unerlässliche Vorgänge zur zeitlichen und lokalen Koordination des Prozesses. Die Wnt-Signalwege sind beinahe in jedem Aspekt der embryonalen Entwicklung involviert und spielen darüber hinaus eine Rolle in der homeostatischen Gewebeerneuerung. Störungen dieser Signalwege gehen mit der Entstehung von Krankheiten sowie Tumoren einher (Logan und Nusse, 2004).

Die Signalmoleküle der Wnt-Signalwege sind Wnt-Proteine. Diese sekretierten Glykoproteine besitzen eine N-terminale, cysteinreiche Domäne mit einem für die Funktion essentiellen Palmiotylrest (Willert *et al.*, 2003). Als erstes von 19 verschiedenen *Wnt*-Genen in Säugetierzellen wurde *Wnt-1*, zuvor *Int-1* genannt, identifiziert, da in dessen Nähe die genomische Integration des Maus-Mammatumors Virus (MMTV) stattfindet (Nusse und Varmus, 1982). Es stellte sich heraus, dass das in *Drosophila* entdeckte *Wingless*-Gen (*wg*), welches während der Larvenentwicklung die Segmentationspolarität kontrolliert (Nüsslein-Volhard und Wieschaus, 1980), ein *Wnt-1* Homolog ist (Rijsewijk *et al.*, 1987). So entstand der heutige Name *Wnt-1* als eine Kombination aus *wg* und *Int-1*.

Die durch ihre Palmiotylmodifikation relativ schwer löslichen Wnt-Proteine fungieren als Morphogene mit weit reichender Wirkung (Logan und Nusse, 2004). Sie regulieren unter anderem Zellproliferation oder auch Zelldifferenzierung (Logan und Nusse, 2004), indem sie an transmembrane Frizzled (Fz)-Rezeptoren binden (Bhanot *et al.*, 1996). Daraufhin kooperieren die Frizzled-Proteine mit einem weiteren transmembranen Molekül LRP 5/6 (Low Density Lipoprotein (LDL) Receptor Related Protein) (Pinson *et al.*, 2000; Tamai *et al.*, 2000). Auf diese Weise wird das Signal ins Innere der Zelle auf das Dishevelled-Protein (DVL) übermittelt. Als Inhibitoren dieser Liganden-Rezeptor-Bindung dienen Dickkopf-Proteine (Dkk-1) (Glinka *et al.*, 1998), das WISE-Protein (Itasaki *et al.*, 2003) oder auch SOST (Li *et al.*, 2005; Semenov *et al.*, 2005), welche an LRP 5/6 binden und dieses inaktivieren. Auch das lösliche Frizzled-verwandte Protein sFRPs (soluble Frizzled related protein) wirkt inhibitorisch auf die Wnt-Signalwege, da es die Ligand-bindende CRD-Domäne der Frizzled-Rezeptoren nachahmt und die Wnt-Proteine somit abfängt (Hoang *et al.*, 1996).

Ausgehend von der Rezeptorbindung können abhängig von dem jeweiligen Wnt-Molekül drei verschiedene Wnt-Signalwegzweige aktiviert werden (siehe Abbildung 5). Die Spezifität der Wnt-Proteine wurde deutlich, als Untersuchungen an *Xenopus laevis*-Embryonen zeigten, dass die ventrale Expression der Wnt-Proteine XWnt1 und XWnt8

eine dorsale Achsenduplikation induzieren kann, während die Expression von XWnt4, XWnt5a und XWnt11 zu einer gestörten Konvergenz und Extension der Körperachse führt, ohne Zellidentitätsänderungen hervorzurufen (Glinka *et al.*, 1997; Moon *et al.*, 1993; Sokol *et al.*, 1991; Tada und Smith, 2000).

Einer der Wnt-Signalwege ist der nicht-kanonische planare Zellpolaritätssignalweg (PCP, planar cell polarity), der die Ausrichtung einzelner Zellen in einem einschichtigen Zellverband reguliert. (Abbildung 5A) (Klein und Mlodzik, 2005). Die Signaltransduktion erfolgt über das aktivierte Dishevelled, welches seinerseits über RhoA oder den Weg über Ras und die Jun N-terminale Kinase (JNK) das Aktin-Cytoskelett und die Mikrotubuli-Organisation moduliert (Habas *et al.*, 2003; Habas *et al.*, 2001; Tahinci und Symes, 2003).

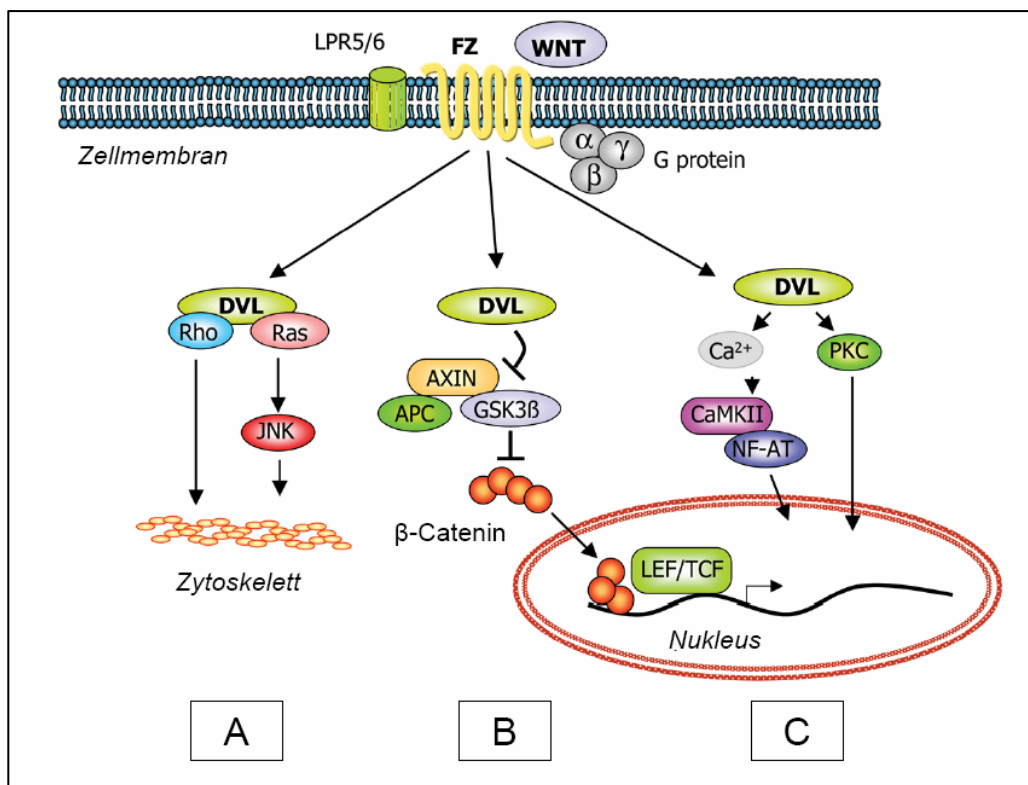


Abbildung 5: Schematische Darstellung der Wnt-Signalwege [aus (Klipp und Liebermeister, 2006)]

(A) Der Wnt/PCP-Signalweg moduliert über die Aktivierung von Rho und Ras das Aktin-Cytoskelett und JNK-responsive Gene. (B) Der kanonische Wnt-Signalweg aktiviert nach Stabilisierung des cytoplasmatischen β -Catenin responsive Gene durch Bindung des β -Catenin an TCF/LEF-Transkriptionsfaktoren. (C) Der Wnt/ Ca^{2+} Signalweg erhöht die intrazellulären Calciumkonzentration woraufhin die Proteinkinase C (PKC) oder die Calcium-Calmodulin-abhängige Proteinkinase II (CamKII) aktiviert werden und sowohl Zytoskelettveränderungen als auch die Aktivierung verschiedener Transkriptionsfaktoren bewirken.

Neben Frizzled vermitteln auch weitere Rezeptoren wie Rezeptortyrosinkinasen (RTKs) oder Paraxial Protocadherin (PAPC) die Signaltransduktion des planaren Zellpolaritätssignalwegs (Keeble *et al.*, 2006; Unterseher *et al.*, 2004). Beispiele für PCP-regulierte Vorgänge sind die Regulation der konvergenten Extensionsbewegung in der *Drosophila*-Entwicklung oder auch die Ausrichtung der Cilien im murinen Gehörgang [zur Übersicht (Seifert und Mlodzik, 2007)].

Der kanonische Wnt-Signalweg (Abbildung 5B) führt über die Stabilisierung des β -Catenin und dessen Bindung an TCF/LEF-Transkriptionsfaktoren zur Aktivierung zahlreicher Zielgene, welche in viele Prozesse der Embryonalentwicklung involviert sind (siehe Kapitel 2.4)

Die Aktivierung des wiederum nicht-kanonischen Wnt/ Ca^{2+} -Signalwegs (Abbildung 5C) führt über eine Umwandlung von cGMP zu GMP zu einer Inhibition der Proteinkinase G und somit zur Erhöhung der intrazellulären Calciumkonzentration (Kühl *et al.*, 2000). Diese bewirkt eine Aktivierung der Calcium-Calmodulin-abhängigen Proteinkinase II (CamKII), welche über den Transkriptionsfaktor NF-AT Zielgene aktiviert (Saneyoshi *et al.*, 2002), sowie der Proteinkinase C (PKC) (Kühl *et al.*, 2000; Sheldahl *et al.*, 2003), deren Aktivität sich auf das Aktin-Cytoskelett auswirkt.

Da es innerhalb der verschiedenen Signalwegszweige zahlreiche Überlappungen gibt, ist eine 100%ige Abgrenzung der einzelnen Signalwege nicht immer eindeutig möglich. Die Bindung gleicher Rezeptoren, welche sich höchstens in verschiedenen Ko-Rezeptoren unterscheidet, sowie der zunächst gleiche Weg über das Dishevelled-Protein, lassen viele Fragen nach der Spezifität der einzelnen Wnts offen.

2.4 Der kanonische Wnt-Signalweg

Die Spezifizierung der Zellidentität, sowie die Regulation von Zellproliferation, Differenzierung und Achsendetermination werden durch den kanonischen Wnt-Signalweg gesteuert.

Die Schlüsselproteine des kanonischen Wnt-Signalwegs sind β -Catenin sowie die Transkriptionsfaktoren der TCF/LEF-Familie (2.4.1). Das Wnt-Signal kontrolliert den Phosphorylierungsstatus des Dishevelled [zur Übersicht (Wallingford und Habas, 2005)]. Im inaktiven Zustand liegt Dishevelled unphosphoryliert vor und es kommt zur Ausbildung des β -Catenin-Destruktionskomplexes im Cytoplasma. Dieser besteht aus Axin, einem Gerüstprotein, welches mit allen weiteren Komplexkomponenten interagiert. Des Weiteren sind APC (Adenomatous Poliposis Coli), die Proteinphosphatase 2A (PP2A) sowie die

Glykogen-Synthase-Kinase3 α/β (GSK3 α/β) und Caseinkinase1 (CK1) Teil des Destruktions-komplexes. Dieser Komplex bindet das freie cytoplasmatische β -Catenin und die Kinasen GSK3 α/β und CK1 phosphorylieren sequentiell die hochkonservierten N-terminalen Serin/Thyrosin-Reste des β -Catenin. Diese Phosphorylierung führt zur Ubiquitinierung des Proteins durch β -TrCP (β -Transducing repeat containing protein), einer E3-Ubiquitin Ligase, und dem anschließenden proteasomalen Abbau (Aberle *et al.*, 1997). Die nukleären TCF/LEF-Transkriptionsfaktoren innerhalb der Wnt-reponsiven Promotoren bleiben so transkriptionell inaktiv.

Nach Bindung von Wnt-Signalmolekülen an Frizzled-Rezeptoren, der Involvierung des LRP 5/6-Rezeptors, sowie der Stimulation des für den kanonischen Wnt-Signalweg spezifischen Kremen 1 und -2 Ko-Rezeptors, wird der LRP 5/6-Rezeptor durch GSK3 β

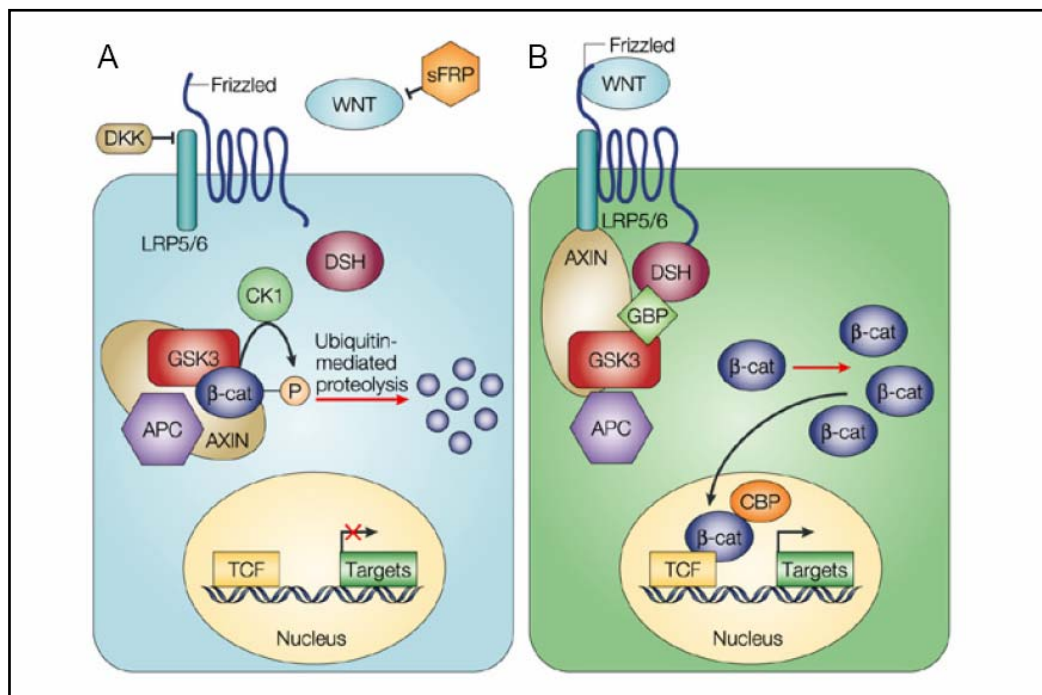


Abbildung 6: Schematische Darstellung des kanonischen Wnt-Signalwegs [aus (Moon *et al.*, 2004)]

Bei Abwesenheit von Wnt-Proteinen oder Blockierung der Bindung an Rezeptoren (A) wird β -Catenin im Cytoplasma durch den Destruktionskomplex (APC, Axin, GSK3 β und CK1) phosphoryliert und somit für den proteasomalen Abbau markiert. β -Catenin-responsive Gene werden nicht transkribiert. Wird der Signalweg aktiviert (B) liegt der Destruktionskomplex inaktiv vor und β -Catenin akkumuliert im Cytoplasma. Es tritt in den Zellkern ein, wo es mit TCF/LEF-Transkriptionsfaktoren interagiert und die Transkription der Zielgene einleitet. APC, Adenomatous polyposis coli; β -cat, β -catenin; CBP, CREB-Bindeprotein; CK, Caseinkinase; DKK, Dickkopf; DSH, Dishevelled; GBP, GSK3-Bindeprotein; GSK, Glycogen synthase Kinase; LRP, LDL-Rezeptor-verwandtes Protein; P, Phosphorylierung; sFRP, sekretiertes Frizzled-verwandtes Protein; TCF, T-Zell-Faktor.

und CK1 phosphoryliert (Davidson *et al.*, 2005). Der hyperphosphorylierte cytoplasmatische Teil des LRP 5/6 interagiert mit Axin (Davidson *et al.*, 2005; Zeng *et al.*, 2005) und führt so zur Auflösung des Destruktionskomplexes. Auch bindet im Zuge der Aktivierung Dishevelled an den Frizzled-Rezeptor und wird dort phosphoryliert. Diese Bindung rekrutiert den Destruktionskomplex an die Membran und ist ebenfalls für die Phosphorylierung des LRP 5/6 notwendig (Bilic *et al.*, 2007; Zeng *et al.*, 2008). Die Unterbindung des β -Catenin-Abbaus führt zu einer cytoplasmatischen Akkumulation (Lee *et al.*, 2003). Das β -Catenin transloziert daraufhin in den Nukleus, wo es mit den TCF/LEF-Faktoren interagiert und die Transkription zahlreicher häufig Zelltyp-spezifischer Zielgene wie z.B. *Axin2* (Jho *et al.*, 2002; Lustig *et al.*, 2002; Yan *et al.*, 2001), *MMP-7* (Brabletz *et al.*, 1999; Crawford *et al.*, 1999), *c-myc* (He *et al.*, 1998) oder *Cyclin D1* (Tetsu und McCormick, 1999) einleitet. Auch die Transkription vieler Wnt-Regulatoren, wie Frizzled, Axin2 und die TCF/LEF-Transkriptionsfaktoren werden durch β -Catenin kontrolliert, wodurch sich der Signalweg auf zahlreichen Ebenen selbst reguliert (Logan und Nusse, 2004).

2.4.1 Das Schlüsselprotein β -Catenin und die TCF/LEF-Transkriptionsfaktoren

Das Schlüsselprotein des kanonischen Wnt-Signalwegs ist β -Catenin, welches in der Zelle jedoch mehrere Funktionen ausübt. Der größte Anteil des zellulären β -Catenin assoziiert als Komponente der Adhäsionsverbindungen (Meigs *et al.*, 2001) mit der cytoplasmatischen Domäne von Cadherinen, wie dem E-Cadherin (Peifer *et al.*, 1992). Das ungebundene cytoplasmatische β -Catenin hingegen dient als Effektor des kanonischen Wnt-Signalweges und unterliegt im inaktiven Zustand im Anschluss an die N-terminale Phosphorylierung der ständigen Degradation durch den Destruktionskomplex (2.4) (Dajani *et al.*, 2001; Harwood, 2001).

Die 12 Armadillo-Wiederholungen im zentralen Bereich des β -Catenin vermitteln die Interaktion zu den meisten Interaktionspartnern, inklusive Axin, APC, E-Cadherin und den TCF/LEF-Faktoren (Aberle *et al.*, 1994; Behrens, 1998; Behrens *et al.*, 1996; Rubinfeld *et al.*, 1995; von Kries, 2000; Xing *et al.*, 2003). C-terminal binden Transkriptionsfaktoren, wie Hydrax (Mosimann *et al.*, 2006), CBP (Takemaru und Moon, 2000) oder der Chromatin-Remodeling-Faktor Brg-1 (Barker *et al.*, 2001) an β -Catenin (siehe Abbildung 7) [zur Übersicht (Barker *et al.*, 2000)].

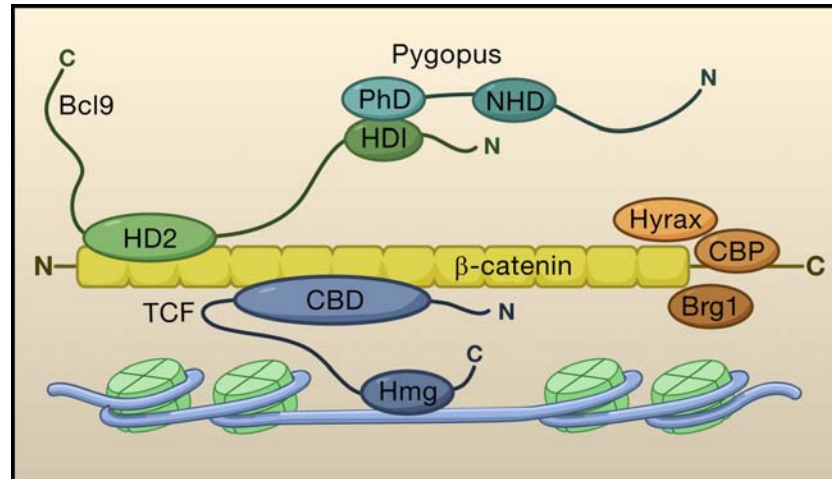


Abbildung 7: Der β -Catenin/TCF-Komplex [aus (Clevers, 2006)]

β -Catenin interagiert über seine 12 Armadillo-Wiederholungen mit TCF/LEF-Transkriptionsfaktoren und zahlreichen Ko-Faktoren wie BCL9 und dem daran bindenden Pygopus. C-Terminus bindet es weitere Ko-Faktoren wie Hyrax, CBP oder Brg1. BCL9, B-cell CLL/lymphoma 9; Brg1, brahma-related gene 1; C, Carboxy; CBD, Catenin Bindedomäne; CBP, CREB-binding protein; HD2, HD2-Domäne; HDI, HD1-Domäne; Hmg, High mobility group; N, Amino; NHD, N-terminal Homology Domain; Phd, plant homeodomain; TCF, T-Zell-Faktor

Im Anschluss an die Stabilisierung des β -Catenins transloziert es unabhängig von Kernlokalisierungssignalen in den Zellkern. Der exakte Mechanismus hierfür ist jedoch noch nicht vollständig aufgeklärt [zur Übersicht (Städli *et al.*, 2006)] und auch ein Rücktransport ins Cytoplasma via Axin oder APC wurde beobachtet (Cong und Varmus, 2004; Henderson, 2000; Rosin-Arbesfeld *et al.*, 2000). Innerhalb des Zellkerns verdrängt β -Catenin Ko-Repressoren der TCF/LEF-Transkriptionsfaktoren, indem es selber an die Faktoren bindet. Durch die zusätzliche Bindung von Ko-Faktoren, wie BCL9 (B-cell CLL/lymphoma 9) und dem damit assoziierenden Pygopus (Kramps *et al.*, 2002), sowie SWRCAP/SWR1 und dem CBP/p300 Chromatin-Remodeling-Komplex wird daraufhin die Transkription der Wnt-Zielgene aktiviert [zur Übersicht (Bienz und Clevers, 2003)].

Die TCF/LEF-Proteine sind die Transkriptionsfaktoren des Wnt/ β -Catenin-Signalwegs. Die Mitglieder dieser Familie (bei Säugetieren TCF-1, TCF-3, TCF-4 und LEF1) besitzen eine hochkonservierte HMG-Box (High Mobility Group), welche die DNA-Bindung an die Konsensussequenz 5' AGATCAAAGGG 3' innerhalb der Promotoren der Wnt-responsiven Zielgene vermittelt (Grosschedl *et al.*, 1994; Laudet *et al.*, 1993). Die architektonische Funktion der Faktoren führt daraufhin zu einer starken DNA-Konformationsänderung (Love *et al.*, 1995; van Beest *et al.*, 2000; van de Wetering *et al.*,

1991) und ermöglicht die Bindung weiterer Transkriptionskofaktoren (Bianchi und Beltrame, 1998; Giese *et al.*, 1991; Grosschedl *et al.*, 1994). Die ebenfalls hochkonservierte N-terminale Domäne der TCF/LEF-Faktoren dient der Assoziation mit β -Catenin (Graham *et al.*, 2000). In Abwesenheit von nukleärem β -Catenin sind Ko-Repressoren, wie Grouchos/TLE1, CBP (CREB-binding protein) und CtBP („C-terminal Binding Protein“) an die TCF/LEF-Proteine gebunden. Durch Ihre Interaktion an Histondeacetylase (HDACs) wird die Transkription der Wnt-Zielgene inhibiert (Cavallo *et al.*, 1998; Chen *et al.*, 1999). Auch Chromatin-Remodeling wird als Regulationsoption für die Transkription Wnt-induzierter Gene in Betracht gezogen (Collins und Treisman, 2000; Sawa *et al.*, 2000; Sharpe *et al.*, 2001). Liegt nun β -Catenin nach Aktivierung des Signalwegs im Zellkern vor, verdrängt es die Groucho/TLE-Repressoren von den TCF/LEF-Transkriptionsfaktoren (Daniels und Weis, 2005) und bildet durch die Rekrutierung von Ko-Faktoren einen Transkriptionskomplex, der die Transkription Wnt-responsiver Gene einleitet. Die Bindung des β -Catenin allein ist jedoch nicht ausreichend, um die Transkription zu aktivieren (Prieve und Waterman, 1999), hierfür ist noch die Assoziation weiterer Kofaktoren notwendig.

Die Expression der TCF/LEF-Faktoren wird unter anderem als positiver Rückkopplungsmechanismus durch den Wnt-Signalweg reguliert (Hovanes *et al.*, 2001; Roose und Clevers, 1999). Aber auch der Tumorsuppressor p53 kann regulatorisch in diese Expression eingreifen (Rother *et al.*, 2004). Extensives alternatives Spleissen, sowie die Verwendung eines internen Promotors im Fall von TCF-1 und LEF1 führen zu einer Vielzahl von TCF/LEF-Isoformen. Während die Funktion der Spleissvarianten bisher noch unklar ist, führt die Verwendung des alternativen Promotors zu Expression N-terminal truncierter Proteine, denen die β -Catenin-Bindungsdomäne fehlt (Hovanes *et al.*, 2001; Van de Wetering *et al.*, 1996). Auf diese Weise könnten sie eine dominant-negative Wirkung ausüben.

2.4.2 Die Rolle des kanonischen Wnt-Signalwegs während der Embryonalentwicklung, Gewebhomeostase und Hämatopoese

Die Determination der dorso-ventralen Körperachse ist in der frühen Entwicklungsphase ein Schritt von größter Bedeutung. Für die korrekte Achsendetermination in Wirbeltieren ist unter anderem die asymmetrische Aktivität des kanonischen Wnt-Signalwegs im befruchteten Ei essentiell. Die verstärkte dorsale Wnt/ β -Catenin-Aktivität in Verbindung mit der parallelen Aktivität des TGF β -Signalwegs am vegetativen Pol führt im Bereich der

Überlappung zur Ausbildung des Nieuwkoop-Zentrums in *Xenopus* (Funayama *et al.*, 1995; Heasman *et al.*, 1994; Larabell *et al.*, 1997). Daraus folgt die Bestimmung des Speemannorganisators, welcher die Kopfbildung induziert [zur Übersicht (Müller und Hassel, 2005)].

Die Erhaltung der apikalen ektodermalen Randleiste (AER), welche während der Extremitätenentwicklung die Bildung der Extremitätenknospen induziert, ist ebenfalls abhängig von der mesenchymalen Aktivität des kanonischen Wnt-Signalwegs in Mäusen und Hühnern (Hill *et al.*, 2006; Kawakami *et al.*, 2001; Ng *et al.*, 2002). Des Weiteren fördert die Wnt/ β -Catenin Aktivität die Entwicklung von Brustplakoden und Brustdrüsen (Boras-Granic *et al.*, 2006; Chu *et al.*, 2004), sowie Haarplakoden und die Ausbildung von Haarfollikeln während der Mausembryogenese (Huelsenken *et al.*, 2001). Hier ist es der Transkriptionsfaktor LEF1, welcher die Aktivierung des Wnt-Signalweges auf Ebene der Transkription vermittelt. LEF1 *-/-* Mäuse entwickeln keine Haarfollikel (van Genderen *et al.*, 1994), während in transgenen Mäuse die verstärkte LEF1-Expression, sowie transgene Expression von konstitutiv aktivem β -Catenin mit einer erhöhten Bildung von Haarfollikeln einhergeht (Gat *et al.*, 1998; Zhou *et al.*, 1995).

Aber auch nach Abschluss der embryonalen Entwicklung spielt der kanonische Wnt-Signalweg eine wichtige Rolle in der Erhaltung des Stammzellpools beispielsweise im Haarbalg zur Aktivierung des Wachstums neuer Haare nach abgeschlossenem Haarzyklus (Ito *et al.*, 2007; Stenn und Paus, 2001; Van Mater *et al.*, 2003) und während des Selbsterneuerungsprozesses von adultem Gewebe. Das Absorptionsepithel des Dünndarms sowie des Kolons besteht unter anderem aus Crypten, in welchen die Stammzellen zur Erneuerung des Epithels vorzufinden sind. Das proliferative Potential dieser Stammzellen wird mitunter vom kanonischen Wnt-Signalweg reguliert. Dies wird deutlich, betrachtet man neugeborene TCF4 *-/-* Mäuse. Das Dünndarmepithel der Villi in diesen Mäusen ist zwar unbeeinflusst, jedoch bilden sie keine Crypt-Vorläuferzellen aus (Korinek *et al.*, 1998). Die Inhibierung des Signalweges mit Hilfe von Dkk-1 führt in adulten Mäusen zu einem gänzlichen Verlust der Crypten, während die Überexpression von Wnt-Agonisten, bspw. R-Spondin-1 mit einer Hyperproliferation der intestinalen Crypten einhergeht (Kuhnert *et al.*, 2004; Pinto *et al.*, 2003).

Auch in der Hämatopoese wurde ein positiver Effekt des Wnt/ β -Catenin-Signalwegs auf die Erhaltung der Selbsterneuerung von hämatopoetischen Stammzellen beobachtet (Reya *et al.*, 2003), die Deletion von β -Catenin in Mäusen hatte jedoch keinen Einfluss auf das hämatopoetische System (Cobas *et al.*, 2004). Es scheint, als wäre der kanonische Wnt-Signalweg in vielen Bereichen der Entwicklung und der Erhaltung von Stammzellen involviert, die Existenz mehrerer Transkriptionsfaktoren und die damit verbundene

Komplexität im Hinblick auf Kompensationsmöglichkeiten machen jedoch Aussagen über die zuständigen Komponenten schwierig.

2.4.3 Der kanonische Wnt-Signalweg in der Tumorigenese und –progression

Die Entwicklung bestimmter Tumore konnte mit der Fehlregulierung des kanonischen Wnt-Signalwegs in dem jeweiligen Ursprungsgewebe in Verbindung gebracht werden [zur Übersicht (Logan und Nusse, 2004)]. Der erste Bezug zwischen dem kanonischen Wnt-Signalweg und der Tumorigenese kam mit der Entdeckung auf, dass das vererbliche Tumorsyndrom FAP (Familiäre adenomatöse Polyposis) mit einer Keimbahnmutation im *APC*-Gen korreliert (Kinzler *et al.*, 1991; Nishisho *et al.*, 1991). FAP-Patienten besitzen ein defektes *APC*-Allel und entwickeln als Folge dessen eine Vielzahl an Kolon-Adenomen oder Polypen. Polypen sind gutartige Auswüchse epithelialer Zellen, in denen das zweite *APC*-Allel inaktiviert wurde. Einige dieser Polypen entwickeln sich jedoch zu malignen Adenokarzinomen. Der Verlust beider *APC*-Allele zeigt das vereinzelt Auftreten kolorektaler Karzinome (Grodin, 1991; Nishisho *et al.*, 1991). Ursache hierfür ist, dass die mutationsbedingte Inaktivierung des APC-Proteins zu einer unsachgemäßen Stabilisierung des β -Catenins führt (Rubinfeld *et al.*, 1996), da dieses nicht mehr durch den Destruktionskomplex für den Abbau markiert wird und der Signalweg so konstitutiv aktiv ist. In den seltenen Fällen von kolorektalen Tumoren, in denen das APC-Protein intakt funktioniert, ist es entweder das *Axin2*-Gen, welches mutiert vorliegt (Liu *et al.*, 2000) oder *β -Catenin*, welches Punktmutationen trägt, die die N-terminalen Phosphorylierungsstellen des Proteins betreffen und so ebenfalls eine Stabilisierung des Proteins verursachen (Morin *et al.*, 1997). Dieser konstitutiv aktive Wnt-Signalweg, induziert ein genetisches Programm in den Stammzellen der Darmkrypten (van de Wetering *et al.*, 2002), um den Stammzellpool zu erhalten, und führt aus diesem Grund zu übermäßiger Zellproliferation. Diese den Wnt-Signalweg aktivierenden Mutationen sind aber nicht nur auf die Tumorigenese des Darmtrakts beschränkt, auch in Leberzellkarzinomen sind *Axin1*, sowie *Axin2*-Mutationen festgestellt worden (Laurent-Puig *et al.*, 2001; Satoh *et al.*, 2000; Taniguchi *et al.*, 2002), während die Entstehung von soliden Tumoren häufig mit *β -Catenin*-Mutationen einhergeht.

Bei der Entstehung unterschiedlicher Tumore der Haarfollikel sind ebenfalls *β -Catenin*-Mutationen involviert (Celso *et al.*, 2004; Chan *et al.*, 1999; Gat *et al.*, 1998) und eine übermäßige Aktivierung des kanonischen Wnt Signalwegs kann zu Tumoren der Brust führen (Imbert *et al.*, 2001; Michaelson und Leder, 2001). Aber auch die Inaktivierung des

kanonischen Wnt-Signalwegs kann mit Tumoren einhergehen. So liegen bei 1/3 der Talgdrüsen-Tumore LEF1-Mutationen vor, welche die Interaktion mit β -Catenin verhindern (Takeda *et al.*, 2006).

Neben diesen tumorinitiierenden Aspekten scheint der Wnt/ β -Catenin-Signalweg auch eine Rolle im Verlauf der Tumorprogression zu spielen, da gezeigt werden konnte, dass aktives Wnt-Signalling stark an der Zellmigration und -invasion beteiligt ist und die Epithelial zu Mesenchymal-Transition (EMT) auszulösen vermag (Eger *et al.*, 2000; Kim *et al.*, 2002).

2.5 Überlappung der Expression und Aktivität von p63 und Komponenten des kanonischen Wnt-Signalwegs

Die Expression des Tumorsuppressor-Homologen $\Delta Np63\alpha$ überlappt teilweise in der Expression der Wnt-Signalweg-Komponenten, wie auch der Aktivität des Signalwegs. Gerade während der Entwicklung wird dieses deutlich, wenn man den Phänotypen von p63 $-/-$ Mäusen mit dem der Lef1 $-/-$ Mäuse vergleicht. Sowohl p63 als auch der kanonische Wnt-Signalweg sind für die Ausbildung von Hautanhangsgebilden, wie Haarfollikeln (siehe Abbildung 8), Brustdrüsen und Zähnen aber auch für die Extremitätenentwicklung notwendig. Nach abgeschlossener Entwicklung spielen beide Faktoren eine Rolle in der Gewebhomeostase und vor allem Onkogenese. Tabelle 1 stellt eine Übersicht der überlappenden Funktionen dar.

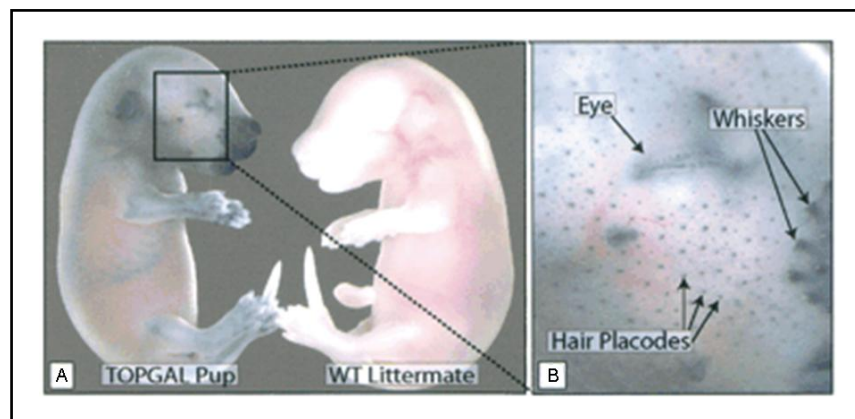


Abbildung 8: TOPGal-Maus

Aktivität des kanonischen Wnt-Signalwegs in der Haut eines Maus-Embryos. Während der embryonalen Entwicklung ist die Expression des TOPGAL-Reporters über die Aktivität der β -Galactosidase (blaue X-Gal-Färbung) als blaue Färbung zu sehen. Die blauen Punkte in A und B entsprechen den sich entwickelnden Haarfollikeln. [aus (Alonso und Fuchs, 2003)]

Tabelle 1: Übersicht der Überlappungen in p63- und Wnt-Signalweg-Expression und Aktivität

| Funktion in: | $\Delta Np63\alpha$ | kanonischer Wnt-Signalweg |
|---|--|--|
| Haut-entwicklung | <ul style="list-style-type: none"> • Reguliert die ektodermale Differenzierung (Koster <i>et al.</i>, 2002; Mills <i>et al.</i>, 1999; Yang <i>et al.</i>, 1999) • p63-/- Mäuse: kein mehrschichtiges Plattenepithel (Mills <i>et al.</i>, 1999; Yang <i>et al.</i>, 1999) | <ul style="list-style-type: none"> • Expression von β-Catenin und TCF/LEFs in dermalen Papilla und Matrixzellen (DasGupta und Fuchs, 1999; van Genderen <i>et al.</i>, 1994; Zhou <i>et al.</i>, 1995) • Konditionelle APC-KO-Mäuse: Defekte in zahlreichen Plattenepithelien (Kuraguchi <i>et al.</i>, 2006) |
| Extremitäten | <ul style="list-style-type: none"> • p63-/- Mäuse: Keine bzw. trunkeerte Extremitäten (Mills <i>et al.</i>, 1999; Yang <i>et al.</i>, 1999) | <ul style="list-style-type: none"> • Wnt-Aktivität in apikaler ektodermaler Randleiste und dorsalem Ektoderm für Extremitätenauswuchs (Hill <i>et al.</i>, 2006; Kawakami <i>et al.</i>, 2001) • Verlust oder Überaktivierung von β-Catenin: Trunkationen (Hill <i>et al.</i>, 2006) |
| Hautanhangsgebilde | | |
| Brustdrüsen | <ul style="list-style-type: none"> • p63-/- Mäuse: Keine Brustdrüsen (Mills <i>et al.</i>, 1999) • p63-Mutationen: Abnormale Brustdrüsen (Rinne <i>et al.</i>, 2007; Rinne <i>et al.</i>, 2006) | <ul style="list-style-type: none"> • Brustdrüsenknospen in TOPGal E10,5 (Chu <i>et al.</i>, 2004; DasGupta und Fuchs, 1999; Mikkola und Millar, 2006) • Lef1-/- Mäuse: Keine Brustdrüsen (van Genderen <i>et al.</i>, 1994) |
| Haarfollikel | <ul style="list-style-type: none"> • Expression von p63 in Haarplakoden (Laurikkala <i>et al.</i>, 2006) • p63-/- Mäuse: Keine Haare (Mills <i>et al.</i>, 1999; Yang <i>et al.</i>, 1999) • p63-Mutationen: Fehlende oder abnormale Körperbehaarung (Rinne <i>et al.</i>, 2007; Rinne <i>et al.</i>, 2006) | <ul style="list-style-type: none"> • Haarfollikel in TOPGal (DasGupta und Fuchs, 1999) • Nukleäres Lef1 und β-Catenin (Merrill <i>et al.</i>, 2001) • Lef1-/- Mäuse: Keine Haarfollikel (van Genderen <i>et al.</i>, 1994) • Inhibition nach Dkk1 (Andl <i>et al.</i>, 2002) |
| Zähne | <ul style="list-style-type: none"> • Expression während E11-E15 von Epithelium über Knospe bis Krone (Laurikkala <i>et al.</i>, 2006) | <ul style="list-style-type: none"> • Wnt-Expression in oralem/dentalem Epithel (Sarkar und Sharpe, 1999) • LEF1-Expression in dentalem Epithel (Sasaki <i>et al.</i>, 2005a) • Lef1-/- Mäuse: Zahnentwicklung initiiert, jedoch im Knospenstadium arettiert (van Genderen <i>et al.</i>, 1994) • Lef1-Überexpression: ektopische Zahnknospen (Zhou <i>et al.</i>, 1995) |
| Gewebe-homeostase | <ul style="list-style-type: none"> • Haut: Erhaltung des Stammzellpools, Regeneration (Koster und Roop, 2004) | <ul style="list-style-type: none"> • Haut: β-Catenin notwendig für Differenzierung der Hautstammzellen zu Keratinocyten (Huelsen <i>et al.</i>, 2001) • Haut: TCF-3 und -4 notwendig für Homeostase (Nguyen <i>et al.</i>, 2009) • Darm: Erhaltung des Stammzellpools in Krypten (Korinek <i>et al.</i>, 1998) • Hämatopoese: Erhaltung des Stammzellpools (Reya <i>et al.</i>, 2003) |
| Onkogenese | | |
| Zellmigration und -invasion | <ul style="list-style-type: none"> • Verstärkung nach p63-KD in Zelllinien (Barbieri <i>et al.</i>, 2006; Gu <i>et al.</i>, 2008; Higashikawa <i>et al.</i>, 2007) | <ul style="list-style-type: none"> • Verstärkung nach Aktivierung, fördert EMT (Eger <i>et al.</i>, 2000; Kim <i>et al.</i>, 2002) |
| Tumorinitiation und -progression nach Dysregulation | <ul style="list-style-type: none"> • Brust (Ribeiro-Silva <i>et al.</i>, 2003; Wang <i>et al.</i>, 2002) • Blase (Koga <i>et al.</i>, 2003a; Koga <i>et al.</i>, 2003c; Park <i>et al.</i>, 2000; Urist <i>et al.</i>, 2002) • Prostata (Signoretti <i>et al.</i>, 2000) • Plattenepithel (Gu <i>et al.</i>, 2008) | <ul style="list-style-type: none"> • Brust (Howe und Brown, 2004) • Darm (Kinzler <i>et al.</i>, 1991; Liu <i>et al.</i>, 2000; Morin <i>et al.</i>, 1997) • Haarfollikel (Celso <i>et al.</i>, 2004; Chan <i>et al.</i>, 1999; Gat <i>et al.</i>, 1998) • Hautkrebs (Bhatia und Spiegelman, 2005) |

2.6 Bisherige Studien zur Interferenz von p63 mit dem Wnt-Signalweg

Trotz zahlreicher überlappender Funktionsbereiche in der Entwicklung, wie auch der Tumorigenese, ist die Interferenz von p63 mit dem kanonischen Wnt-Signalweg nur in wenigen Studien untersucht worden. Die erste Veröffentlichung zur Funktion von $\Delta Np63\alpha$ im kanonischen Wnt-Signalweg stammt aus dem Jahr 2002 von Patturajan *et al.* Die Autoren beschrieben hier die inhibitorische Funktion von überexprimiertem $\Delta Np63\alpha$ auf die Aktivität der GSK3 β , die eine Stabilisierung des cytoplasmatischen β -Catenins und somit eine Steigerung der kanonischen Wnt-Aktivität zur Folge hat. Diese Inhibition der Kinaseaktivität wird in den Augen von Patteruajan durch die von ihm nachgewiesenen Interaktionen der N-terminalen Domäne von $\Delta Np63\alpha$ mit der B56 α -Untereinheit der Protein Phosphatase P2 (PP2A) und GSK3 β selber vermittelt. Auch eine endogene Interaktion mit β -Catenin wurde von den Autoren demonstriert, jedoch nicht weiter thematisiert (Patturajan *et al.*, 2002). Sich an diese Veröffentlichung anschließenden Untersuchungen von humanen Tumoren haben jedoch keine signifikante Korrelation von starker $\Delta Np63\alpha$ -Expression und der nukleären Lokalisation von β -Catenin aufgezeigt (Reis-Filho, 2003).

Dennoch wurde die umgekehrte Korrelation gezeigt, die besagt, dass reduzierte $\Delta Np63\alpha$ -Mengen im Zuge der Tumorprogression (Koga *et al.*, 2003a; Koga *et al.*, 2003c; Morita, 2005; Stefansson *et al.*, 2006a; Urist *et al.*, 2002; Wang *et al.*, 2002) mit reduzierten β -Catenin-Mengen einhergehen (Koga *et al.*, 2003c). Und auch im Verlauf der Entwicklung zeigt sich im ektodermalen Gewebe das gemeinsame Ausbleiben der p63 und β -Catenin-Expression (Laurikkala *et al.*, 2006).

Ein weiterer Aspekt ist die transaktivierende Wirkung von TAp63 β und $-\gamma$ auf die Transkription von WNT4 durch die direkte Bindung des WNT4-Promotors (Osada, 2006). Das eigentlich nicht-kanonische WNT4-Signalmolekül wurde bisher jedoch sowohl mit einer Aktivierung (Lyons *et al.*, 2004) als auch Inhibierung des Wnt/ β -Catenin-Signalwegs in Verbindung gebracht (Bernard *et al.*, 2008). Die Rolle von $\Delta Np63\alpha$ wurde in diesem Zusammenhang zwar nicht betrachtet, könnte jedoch in der antagonistischen Regulierung der TA-Isoformen liegen.

Weitere Untersuchungen wurden im Zuge der Dissertation von Constanze Möritz (2006) durchgeführt, in welcher postuliert wurde, dass $\Delta Np63\alpha$ im tertiären Komplex mit dem Transkriptionsfaktor TCF-4 und β -Catenin maßgeblich an der verstärkten Transaktivierung von β -Catenin-TCF-regulierter Transkription ist. Auch eine gesteigerte TCF-4-vermittelte

Relokalisation von β -Catenin wurde beschrieben, während ein Einfluss von $\Delta Np63\alpha$ auf die Akkumulation von β -Catenin hier nicht bestätigt werden konnte.

All diese Experimente wurden jedoch im Überexpressionssystem und auf Basis von Reporterexperimenten durchgeführt. Eine physiologische Funktion von $\Delta Np63\alpha$ im kanonischen Wnt-Signalweg mit besonderem Hinblick auf den molekularen Mechanismus und β -Catenin-responsive Gene ist daher nicht ausreichend untersucht worden, zumal die Studie von (Reis-Filho, 2003) die Diskrepanz der Überexpressionsexperimente und der *in vivo*-Situation verdeutlicht.

2.7 Fragestellung

Die p53-unabhängigen Funktionen des Tumorsuppressor-Homologen p63 sind vielfältig und gestalten sich abhängig von der jeweils exprimierten Isoform unterschiedlich. In der basalen Schicht des Plattenepithels ist $\Delta Np63\alpha$ die vorherrschende Isoform, welche maßgeblich an der Entwicklung der Haut und weiterer epithelialer Strukturen beteiligt ist. Im Rahmen der Tumorprogression konnte die inhibitorische Funktion von $\Delta Np63\alpha$ auf Zellmigration und -invasion gezeigt werden.

Einige der Gewebe mit hohen $\Delta Np63\alpha$ -Leveln weisen in ihrer Entwicklung eine Abhängigkeit vom kanonischen Wnt-Signalweg auf. Auch konnte eine gesteigerte Zellinvasion nach Aktivierung des Signalwegs nachgewiesen werden. Diese funktionellen wie auch die Expressionsregion betreffenden Überlappungen, deuten auf eine mögliche Interferenz von $\Delta Np63\alpha$ mit dem kanonischen Wnt-Signalweg hin.

Im Rahmen dieser Ausarbeitung sollte der Einfluss von $\Delta Np63\alpha$ auf den kanonischen Wnt-Signalweg untersucht werden, im besonderen Hinblick auf die Identifikation eines neuen Regulationsmechanismus des Signalwegs z.B. zur Erzielung von gewebespezifischen Aktivitätsunterschieden. Bisherige Studien von Patturajan *et al.*, 2002 und Möritz (2006) postulierten eine positive Wirkung von $\Delta Np63\alpha$ auf die β -Catenin-TCF-regulierte Transkription, wurden jedoch ausschließlich in einem Überexpressionssystem durchgeführt, das physiologische Bedingungen nur unzureichend reflektiert.

In einem Wnt-induzierbaren Zellkultursystem mit großen Mengen an endogenem $\Delta Np63\alpha$ sollte in Knockdown-Experimenten der Einfluss dieses Proteins auf β -Catenin-responsiven Gene analysiert und so in einen physiologischeren Kontext gestellt werden. Vor diesem Hintergrund sollte des Weiteren die Frage adressiert werden, welche Auswirkungen eine gleichzeitige Signalwegs-Aktivierung auf den $\Delta Np63\alpha$ -vermittelten Effekt hat. Zur Aufklärung des hierfür zugrunde liegenden Mechanismus wurde die bei Möritz (2006) beschriebene Interaktion zwischen $\Delta Np63\alpha$ und TCF-4 in Betracht gezogen und hinsichtlich der interagierenden Domänen näher charakterisiert.

Mit diesen Untersuchungen sollte ein Modell zur Klärung der Frage etabliert werden:

Hat $\Delta Np63\alpha$ einen regulierenden Einfluss auf die β -Catenin-TCF-vermittelte Transkription von Wnt-responsiver Gene, und welche Mechanismen liegen dem zugrunde?

3 Material

3.1 Geräte

| | |
|-------------------------------------|--|
| Bakterieninkubator | Memmert GmbH + Co. KG, Schwabach |
| Brutschrank „Hera Cell“ | Heraeus Instruments, Hanau |
| Elektrophoresekammer, horizontal | Harnischmacher Labortechnik, Kassel |
| Elektroporator GenePulser® II | Bio-Rad Laboratories GmbH, München |
| Entwickler-Maschine „Optimax 2010“ | Typon Röntgen-Film GmbH, Grünstadt |
| Flüssig-Stickstofftank LS4800 | LabSystems Taylor Wharton |
| Folien-Schweißgerät „Vacupack plus“ | Krupps GmbH, Solingen |
| Gefrierschränke –20°C | Liebherr Hausgeräte GmbH, Ochsenhausen |
| Gefrierschränke –80°C „Hera freeze“ | Heraeus Instruments, Hanau |
| Heizblock „Thermomixer 5436“ | Eppendorf GmbH, Hamburg |
| Kühlschrank | Liebherr Hausgeräte GmbH, Ochsenhausen |
| Kühlzentrifuge „Typ Megafuge 1.0 R“ | Heraeus Instruments, Hanau |
| Luminometer „Centro LB 960“ | Berthold Technologies, Bad Wildbad |
| Magnetrührer „MR 3001“ | Heidolph Inst. GmbH & Co.KG, Schwabach |
| Mikroskop Axiovert 40C | Carl Zeiss MicroImaging GmbH, Göttingen |
| Mikrowelle | Cinex |
| Netzwerkgerät „Power Pack P25T“ | Biometra GmbH, Göttingen |
| PCR Cycler „advanced Primus 25“ | Peqlab Biotechnologie GmbH, Erlangen |
| pH-Meter inoLab® Serie 720 | WTW GmbH, Weilheim |
| Pipetten (2,5µl, 100µl, 1000µl) | Eppendorf research, Hamburg |
| Pipettierhilfe XP | Drummond Scientific Co., Broomall, Pa. USA |
| Rotierer „34528“ | Schütt Labortechnik GmbH, Göttingen |
| Real-Time PCR System „Chromo 4“ | Bio-Rad Laboratories GmbH, München |
| Schüttler „PROMAX 2020“ | Heidolph Inst. GmbH & Co.KG, Schwabach |
| Schüttelinkubator | Infors HT, Bottmingen, S |

| | |
|-----------------------------------|--|
| Spektralphotometer NanoDrop™ 1000 | Peqlab Biotechnologie GmbH, Erlangen |
| Sterilbank "Hera safe" | Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA |
| Tischzentrifuge 5415R | Eppendorf research, Hamburg |
| UV-Schirm „Gel iX Imager“ | Intas Science Imaging Instr. GmbH, Göttingen |
| Vortex mixer | neolab GmbH, Heidelberg |
| Waage LE6238 | Sartorius GmbH, Göttingen |
| Wasserbad TW20 | JULABO Labortechnik GmbH, Seelbach |
| Western Blot Kammer | Bio-Rad Laboratories GmbH, München |
| X-Ray Kassetten 13x18cm | Rego Gollwitzer GmbH & Co. KG, Augsburg |
| Zählkammer Neubauer improved | Brand GmbH & Co. KG, Wertheim |

3.2 Verbrauchsmaterialien

| | |
|--|--------------------------------------|
| 9,6 cm ² /3,9 cm ² -Well – Zellkulturplatten | Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen |
| Elektroporationsküvetten „Gene Pulser“ | Bio-Rad Laboratories GmbH, München |
| Gel-Blotting-Paper GB002 (Whatman-Papier) | Schleicher & Schuell GmbH, Dassel |
| Kryoröhrchen CryoLine™ (1,8 ml) | Nunc GmbH & Co. KG, Wiesbaden |
| Latex Handschuhe Safeskin PFE | Kimberly-Clark Professional, Koblenz |
| OptiPlate™-96 | Perkin Elmer, Massachusetts, USA |
| PCR-Reaktionsgefäße 0,2 ml | SARSTEDT AG & Co., Nümbrecht |
| Pipettenspitzen (10 µl/ 200 µl/ 1000 µl) | MBP/ Greiner/ Sarstedt |
| Polypropylen-Röhrchen (15 ml/50 ml) | Greiner GmbH, Nürtingen |
| PROTRAN Nitrocellulose Transfermembran | Schleicher & Schuell GmbH, Dassel |
| Reaktionsgefäße (1,5 ml/2 ml) | Eppendorf research, Hamburg |
| Röntgenfilme Blaufilm RX 13x18 cm | Ernst Christiansen GmbH, Planegg |
| Schweißfolie | Krupps GmbH, Solingen |
| Spritzen „U-40 Insulin“ (26 Gauge) | B.Braun Petzold GmbH, Melsungen |
| Zellkulturschalen (10 cm) | Greiner GmbH, Nürtingen |
| Zellschaber (16 cm/25cm) | SARSTEDT AG & Co., Nümbrecht |

3.3 Chemikalien

| | |
|---|------------------------------------|
| 1,4-Dithiothreitol (DTT) | Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe |
| Agarose | Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe |
| Ammoniumpersulfat (APS) | Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe |
| Ammoniumsulfat ((NH ₄) ₂ PO ₄) | Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe |
| Bacto-Agar | Sigma-Aldrich GmbH, Seelze |
| Bovine Serum Albumin (BSA) | Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe |
| Bromphenolblau | Sigma-Aldrich GmbH, Seelze |
| Calciumchlorid (CaCl) | Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe |
| Chloroform | Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe |
| Complete (Proteaseinhibitor-Cocktail) | Roche Diagnostics GmbH, Penzberg |
| Desoxycholat (DOC) | AppliChem GmbH, Darmstadt |
| Dexamethason | Sigma-Aldrich GmbH, Seelze |
| Dimethylsulfoxid (DMSO) | AppliChem GmbH, Darmstadt |
| Dinatrium-hydrogen-phosphat (Na ₂ HPO ₄) | Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe |
| Essigsäure | Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe |
| Ethanol abs. | Merck KGaA, Darmstadt |
| Ethidiumbromid | Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe |
| Ethylendiamintetraacetat (EDTA) | Jena Bioscience GmbH, Jena |
| Ficoll | Sigma-Aldrich GmbH, Seelze |
| Glutathionen-beads | Sigma-Aldrich GmbH, Seelze |
| Glycerin | Sigma-Aldrich GmbH, Seelze |
| Glycin | Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe |
| Glykogen "Glyco Blue" | Sigma-Aldrich GmbH, Seelze |
| H ₂ O, RNase-frei | Ambion GmbH, Kaufungen |
| Hefeextrakt | Sigma-Aldrich GmbH, Seelze |
| HEPES | Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe |
| Isoamylalkohol | Bio-Rad Laboratories GmbH, München |

Material

| | |
|---|-------------------------------------|
| Isopropanol | Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe |
| Isopropyl- β -D-thiogalactopyranosid (IPTG) | AppliChem GmbH, Darmstadt |
| Kalium-dihydrogen-phosphat (KH_2PO_4) | Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe |
| Kaliumchlorid (KCl) | Sigma-Aldrich GmbH, Seelze |
| Magermilchpulver | Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, |
| Magnesiumchlorid (MgCl) | Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe |
| Manganchlorid (MnCl) | Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe |
| Methanol | Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe |
| N,N,N',N'-Tetramethylethylendiamin (TEMED) | Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe |
| Natriumacetat | Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe |
| Natriumchlorid (NaCl) | Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe |
| Natriumdodecylsulfat (SDS) | Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe |
| Nondient P40 (NP-40) | Sigma-Aldrich GmbH, Seelze |
| PIPES | Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe |
| Ponceau | Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe |
| Potassiumacetat (CH_3COOK) | Sigma-Aldrich GmbH, Seelze |
| Protein-A-Sepharose | Invitrogen GmbH, Karlsruhe |
| RNAse-freies Wasser | Promega GmbH, Mannheim |
| ROTI [®] -Phenol | Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe |
| Rotiphorese (30% Acrylamid-Lösung) | Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe |
| Rubidiumchlorid (RbCl) | AppliChem GmbH, Darmstadt |
| Sukrose | Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe |
| SYBR Green | Stratagene GmbH, Basel, A |
| Trasyol | AppliChem GmbH, Darmstadt |
| Trehalose | USB Corp., Cleveland, OH, USA |
| Trichostatin A (TSA) | Bayer Vital GmbH, Leverkusen |
| Trishydroxymethylaminomethan (Tris-Base) | Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe |
| Triton-X100 | Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe |

| | |
|----------|------------------------------------|
| TRIZOL | Invitrogen GmbH, Karlsruhe |
| Trypton | Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe |
| Tween-20 | Sigma-Aldrich GmbH, Seelze |

3.4 Reaktionssysteme (Kits)

| | |
|--|--------------------------------|
| Big Dye Terminator Kit | AB/Ambion, Austin, TX, USA |
| Dual-Luciferase [®] Reporter Assay System | Promega GmbH, Mannheim |
| Foto-Entwickler „Adevodur“ | OMNILAB GmbH & Co. KG, München |
| Foto-Fixierer „Adevodur“ | OMNILAB GmbH & Co. KG, München |
| Invisorb [®] Spin Plasmid Mini Two Kit | InViTek GmbH, Berlin |
| Illustra [™] RNA Spinmini Kit | GE Healthcare, München |
| Lipofectamine [™] 2000 | Invitrogen GmbH, Karlsruhe |
| mMESSAGE mMACHINE Kit | AB/Ambion, Austin, TX, USA |
| PureYield [™] Plasmid Maxiprep System | Promega GmbH, Mannheim |
| QIAquick [®] PCR Purification Kits | Qiagen GmbH, Hilden |
| RNeasy [®] Mini Kit | Qiagen GmbH, Hilden |
| SuperSignal [®] West Dura | Pierce, Rockford, IL, USA |
| SuperSignal [®] West Femto Maximum | Pierce, Rockford, IL, USA |

3.5 Puffer und Lösungen

Cysteinhydrochlorid-Lösung (2%ig): 2% (w/v) Cys-HCl in 0,1x MBSH, pH8.0

Dexamethason (1000x): 4 mg Dexamethason/ml in 100% Ethanol

DNA-Probenpuffer (6x): 40% Sukrose (w/v), 10% Glycerin (w/v) und
0,25% Bromphenolblau (w/v)

EB-Puffer: 10 mM Tris-HCl (pH 8.5)

GST-Pulldown Lysepuffer: 50 mM Tris pH 8.2, 50 mM NaCl, 1 mM DTT und
1 mM MgCl₂

Ko-Immunpräzipitationspuffer (Ko-IP-Puffer): 150 mM NaCl, 50 mM Tris-HCl
pH 7.5 und 0,5% NP40 (v/v)

Ko-Immunpräzipitations-Lysepuffer (Ko-IP-Lysepuffer): 50 ml Ko-IP-Puffer mit
1 Tablette Roche complete (Proteaseinhibitoren)

Laemmli-Puffer (6x): 0,35 M Tris-HCl pH 6.8, 30% Glycerin (v/v), 10% SDS (w/v),
9,3% 1,4-DTT (w/v) und 0,02% Bromphenolblau (w/v)

Laufpuffer für Proteingele (10x): 0,1% SDS, 25 mM Tris-Base und 192 mM Glycin

MBSH (5x) (modified Barth's solution): 440 mM NaCl, 12 mM NaHCO₃, 5 mM KCl,
50 mM Hepes, 4,1 mM MgSO₄, 2,05 mM CaCl₂ und 1,65 mM Ca(NO₃)₂

Mikro-Injektionspuffer: 1% (v/v) Ficoll in 1x MBSH

PBS (10x): 239,9 mM NaCl, 8,1 mM Na₂HPO₄, 2,7 mM KCl und 1,5 mM KH₂PO₄

PCR-Mastermix (2x): 75 mM Tris-HCl pH 8.8, 20 mM (NH₄)₂SO₄, 0,01% Tween-20,
3 mM MgCl₂, SYBR Green 1:80000, 0,2 mM dNTPs, 20 U/ml *Taq*-Polymerase,
0,25% TritonX-100, 0,3 M Trehalose und 0,3 µM Primer

RIPA-Puffer: 1,4% Trasylol (100000 KIE), 0,1% Triton X-100 (v/v), 0,1% DOC (v/v),
0,1% SDS (w/v), 9 mM NaCl, 2 mM Tris/HCl, pH 8.5 und 1 mM EDTA

TAE-Puffer (50x): 2 M Tris-Base, 1 M Essigsäure und 0,1 M EDTA

TFB-1-Puffer pH 5.8: 100 mM RbCl, 50 mM MnCl₂, 30 mM Potassiumacetat,
10 mM CaCl₂ und 15% Glycerol

TFB-2-Puffer pH 6.5: 75 mM CaCl₂, 10 mM PIPES, 10 mM RbCl und 15 % Glycerol

Western Blot Transferpuffer: 10% Western Salze (10x) (v/v), 15% Methanol (v/v) in
dH₂O

Western Salze (10x): 1,9 M Glycin, 250 mM Tris-HCl pH 8.3, 0,02% SDS (w/v) in
dH₂O

3.6 Nukleinsäuren

3.6.1 Nukleinsäuremarker

Gene Ruler™ DNA-Ladder Mix (0,5 mg DNA/ml)

GibcoBRL, Karlsruhe

3.6.2 Vektoren und Konstrukte

3.6.2.1 Vektoren

pCI-neo: Der Expressionsvektor für Säugetierzellen trägt einen humanen Cytomegalie-Virus (CMV) Enhancer/Promotor. Er eignet sich für sowohl die transiente als auch stabile cDNA-Expression, da er das Neomycin Phosphotransferasegen trägt, wodurch Säugetierzellen selektiert werden können.

pCS2+: Dieser Vektor eignet sich zur Expression von cDNA in eukaryotischen Zellen. Er enthält den starken Promotor simian CMV IE94, gefolgt von einem Polylinker und der SV40 Polyadenylierungsstelle. Der SP6 Promotor in der 5' untranslatierten Region der mRNA des sCMV Promotors ermöglicht die *in vitro* RNA Synthese von Sequenzen die in den Polylinker kloniert wurden. Konstruiert wurde der Vektor von David Turner und Ralph Rupp 1993, RZPD.

pCDNA3: Der von Invitrogen vertriebene Vektor enthält einen CMV Promotor und eignet sich für die cDNA Expression in eukaryotischen Zellen. Als bakterielle Resistenz dient Ampicillin, für die Selektion in Säugetierzellen besitzt er das Gen für eine Neomycinresistenz.

pGEX-6P1: Für die transiente, bakterielle Proteinexpression eignet sich dieser Vektor von Amersham. Er enthält einen tac-Promotor, wie auch ein N-terminales GST-Epitop zur Expression von GST-Fusionsproteinen. Als Selektionsgen dient eine Ampicillinresistenz.

3.6.2.2 Expressionskonstrukte

pCAGGS-GFP: Für dieses Expressionsplasmid wurde das BspHI-BsmI geschnittene und aufgefüllte Fragment von pGFP-C1mut, welches die Sequenz des mutierte *Aequora victoria* Grün-Fluoreszierenden Proteins (Ser65Thr) enthält, in die ebenfalls geschnittene und aufgefüllte XhoI-Schnittstelle des pCAGGS-Vektors kloniert. Dieses Konstrukt wird von BCCM/LMBP, Belgien vertrieben und wurde von K. Heyninck kloniert.

pCIneo- β -Catenin: Die cDNA Sequenz des humanen β -Catenin wurde über die XhoI und XbaI-Schnittstellen in den pCIneo Vektor kloniert. Das Konstrukt wurde von B. Vogelstein, Baltimore, USA erhalten und ist in (Morin *et al.*, 1997) beschrieben.

pCS2+/ Δ Np63 α : [Kloniert durch Y. Chen, GZMB, Abt. Entwicklungsbiochemie, unveröffentlicht] Dieses Konstrukt enthält murines Δ Np63 α im pCS2+ Vektor und wurde im Rahmen der *Xenopus* Achsenduplikationsexperimente verwendet. Nach Linearisierung mit NotI wurde CapRNA durch die SP6 Polymerase synthetisiert. [Auszug aus (Damianitsch, 2009), S. 31]

pCS2+-HA-mLEF1: Dieses Expressionskonstrukt enthält die cDNA Sequenz von murinem LEF1 welches in die multiple Klonierungsstelle des pCS2+-Vektors kloniert wurde. An den C-Terminus der LEF1 cDNA wurde die Sequenz für ein doppeltes Haemagglutinin-Epitop angefügt. Das Konstrukt wurde von Dr. Andreas Hecht, Freiburg erhalten.

pCS2+-HA-mLEF1 Δ HMG: Zur Herstellung der HMG-Deletionsmutante von HA-LEF1 wurde an dem Templat-Plasmid pCS2+-HA-mLEF1 eine ortgerichtete Mutagenese 4.3.9.1 mit dem Oligonukleotid LEF1-HMG_vor 5'- CAG GAG CCC AAA AGA CTA CAG GAG TCG AC -3' und dem dazu revers komplementären Primer durchgeführt.

pCS2+/LEF1-GR: [Die Klonierung der LEF1 cDNA in den pCS2+/GR Vektor wurde von Katharina Damianitsch (GZMB, Abt. Entwicklungsbiochemie) durchgeführt und in der Dissertation (Damianitsch, 2009) beschrieben.]

Murines LEF1 wurde mit den Oligonukleotiden LEF1-ClaI-vor (5'-CAT CGA TAT GCC CCA ACT TTC CGG AG-3') und LEF1-XhoI-rück (5'-GAC TCG AGG

ATG TAG GCA GCT GTC ATT C-3') aus pSP64T/LEF1 (Behrens *et al.*, 1996) amplifiziert, mit ClaI und XhoI verdaut und in den ebenfalls geschnittenen und dephosphorylierten pCS2+/GR Vektor kloniert. CapRNA wurde nach Linearisierung mit NotI durch die SP6 Polymerase synthetisiert. [Auszug aus (Damianitsch, 2009), S. 31]

pCS2+-HA-mTCF-1B: Dieses ebenfalls aus dem Labor von Dr. Andreas Hecht erhaltene Konstrukt enthält die cDNA Sequenz von murinem TCF-1B im pCS2+-Vektor. Auch hier schliesst sich an die cDNA ein doppeltes HA-Epitop an.

pCS2+-HA-mTCF-1E: Die cDNA Sequenz des murinen TCF1-E mit doppeltem HA-Epitop im pCS2+-Vektor; erhalten von Dr. Andreas Hecht.

pCS2+-HA-mTCF-3: Die cDNA Sequenz des murinen TCF-3 mit doppeltem HA-Epitop im pCS2+-Vektor; erhalten von Dr. Andreas Hecht.

pCS2+-HA-hTCF-4: Die cDNA Sequenz des humanen TCF-4 mit doppeltem HA-Epitop im pCS2+-Vektor; erhalten von Dr. Andreas Hecht.

pcDNA3-ΔNp63α: Dieses Konstrukt von Frank McKeon, Boston (USA) enthält die murine ΔNp63α cDNA Sequenz im pcDNA3-Vektor.

pGEX-6P1-ΔNp63aa1-290: [Durchgeführt von Antje Dickmanns, GZMB, Abt. Molekulare Onkologie] Murines ΔNp63 wurde mit den Oligonukleotiden ΔNp63_f1_BamHI (5'-CGC **GGA TCC** ATG CTG TAC CTG GAA AAC AAT GCC-3') und ΔNp63_r290_XhoI (5'-CCC **TCG AGT** CCG TGT GTA TTC TGA CGG AAA GG-3') aus pcDNA3-ΔNp63α amplifiziert, mit BamHI und XhoI verdaut und in den ebenfalls geschnittenen und dephosphorylierten pGEX-6P1 Vektor kloniert.

pGEX-6P1-ΔNp63aa81-290: [Durchgeführt von Antje Dickmanns, GZMB, Abt. Molekulare Onkologie] Für dieses Konstrukt wurde murines ΔNp63 mit den Oligonukleotiden ΔNp63_f81_BamHI (5'- CCG **GAT CCC** ACA GCT TCG ATG TGT CCT TCC AG -3') und ΔNp63_r290_XhoI (5'-CCC **TCG AGT** CCG TGT GTA TTC TGA CGG AAA GG-3') aus pcDNA3-ΔNp63α amplifiziert. Auch dieses Fragment wurde

BamHI und XhoI verdaut und in den ebenfalls geschnittenen und dephosphorylierten pGEX-6P1 Vektor kloniert.

3.6.2.3 Reporterkonstrukte

pGI3-OT (TOPFLASH): Zur Herstellung dieses Luziferase-Reporters für den kanonischen Wnt-Signalweg wurden 3 Kopien der TCF-4-Bindestelle (CCTTTGAT) vor das *Firefly*-Luziferase-Gen (XhoI-Schnittstelle) des pGI3-Basic-Vektors kloniert, (Shih *et al.*, 2000).

pGI3-OF (FOPFLASH): Wie pGI3-OT (TOPFLASH), jedoch mit mutierten TCF-4-Bindestellen (CCTTTGGC), (Shih *et al.*, 2000).

pRL-*tk* (Kontrollreporter): Promega GmbH, Mannheim. Dieser Kontrollreporter besitzt einen *Herpes Simplex Virus*-Thymidinkinase-Promotor für eine *Renilla*-Luziferase, gefolgt von einer SV40 Poly (A) Sequenz. Als Resistenzgen dient Ampicillin.

pTAluc-pSuperTOPflash: Kloniert von Ajamete Kaykas im Labor von R. Moon (Veeman *et al.*, 2003). Das Rückrad des Reporterkonstruktes ist pTA-luc (Clontech) mit einem minimal TA Viruspromotor vorgeschaltet vor ein *Firefly*-Luziferase-Gen. In die MluI Restriktionsschnittstelle wurden 8 Kopien der TCF/LEF Bindestelle (**AGATCAAAGGGGGTA**) kloniert. (**FETT** gedruckt ist die Bindestelle, *kursiv* gedruckt eine Spacersequenz, welche die Bindestellen voneinander trennt)

pTAluc-pSuperFOPflash: Kloniert von Ajamete Kaykas im Labor von R. Moon (Veeman *et al.*, 2003). Kontrollreporter zu pTAluc-pSuperTOPflash. In diesem *Firefly*-Luziferase-Reporter sind die TCF/LEF Bindestellen mutiert.

3.6.3 Oligonukleotide

Alle Oligonukleotide wurden von Metabion, synthetisiert und in einer Konzentration von 100 µM in ddH₂O bei -20°C gelagert.

3.6.3.1 Sequenzieroligonukleotide

Tabelle 2: Liste aller in dieser Arbeit verwendeten Sequenzieroligonukleotide

| Name | Sequenz in 5' → 3' Orientierung |
|-------------------|--|
| <i>CMV</i> | GGC GTG TAC GGT GGG AGG TC |
| <i>LEF1 nt525</i> | CAC CCG TCA CAC ATC CC |
| <i>Sp6</i> | CTC TAG CAT TTA GGT GAC AC |

3.6.3.2 Oligonukleotide für die ortsspezifische Mutagenese und PCR-Klonierung

Tabelle 3: Liste aller in dieser Arbeit verwendeten Oligonukleotide für PCR Klonierung

| Name | Sequenz in 5' → 3' Orientierung |
|---------------------------|---|
| <i>HA-LEF1ΔHMGvor</i> | CAG GAG CCC AAA AGA CTA CAG GAG TCG AC |
| <i>HA-LEF1ΔHMGrück</i> | GTC GAC TCC TGT AGT CTT TTG GGC TCC TG |
| <i>pCS2+LEF1-Clal-vor</i> | CAT CGA TAT GCC CCA ACT TTC CGG AG |
| <i>LEF1-XhoI-rück</i> | GAC TCG AGG ATG TAG GCA GCT GTC ATT C |
| <i>ΔNp63_f1_BamHI</i> | CGC GGA TCC ATG CTG TAC CTG GAA AAC AAT GCC |
| <i>ΔNp63_f81_BamHI</i> | CCG GAT CCC ACA GCT TCG ATG TGT CCT TCC AG |
| <i>ΔNp63_r290_XhoI</i> | CCC TCG AGT CCG TGT GTA TTC TGA CGG AAA GG |

3.6.3.3 siRNA Oligonukleotide

Tabelle 4: Liste aller in dieser Arbeit verwendeten siRNA Oligonukleotide

| Name | Sequenz in 5' → 3' Orientierung | Referenz |
|-------------------------|---------------------------------|------------------------------------|
| <i>Allstar negative</i> | - | Qiagen GmbH, Hilden |
| <i>β-Catenin</i> | AAA GCT GAT ATT GAT GGA CAG | (Verma <i>et al.</i> , 2003) |
| <i>p63_1</i> | AAC CAT GAG CTG AGC CGT GAA | (Lee <i>et al.</i> , 2006) |
| <i>p63_2</i> | AAC ACA CAT GGT ATC CAG ATG | (Thurfjell <i>et al.</i> , 2005) |
| <i>p63_3</i> | AAC AGC CAT GCC CAG TAT GTA | (Carroll <i>et al.</i> , 2006) |
| <i>p63_4</i> | AAG ACA GAG TGT GCT GGT ACC | (Higashikawa <i>et al.</i> , 2007) |
| <i>p63_5</i> | AAA GCA GCA AGT TTC GGA CAG | (Barbieri <i>et al.</i> , 2006) |

3.6.3.4 RT-PCR Oligonukleotide

Tabelle 5: Liste aller in dieser Arbeit verwendeten Oligonukleotide zur RT-PCR Analyse.

| Name | Sequenz in 5' → 3' Orientierung |
|----------------------------|---------------------------------|
| <i>random nonamer</i> | |
| oligo-dT | T23VN |
| <i>36B4</i> vorwärts | GAT TGG CTA CCC AAC TGT TG |
| <i>36B4</i> rückwärts | CAG GGG CAG CAG CCA CAA A |
| <i>Axin2</i> vorwärts | TCC CCA CCT TGA ATG AAG AA |
| <i>Axin2</i> rückwärts | TGG TGG CTG GTG CAA AGA |
| <i>MMP7</i> vorwärts | GAG GAG CTC ATG GGG ACT C |
| <i>MMP7</i> rückwärts | CCA TAG GTT GGA TAC ATC ACT GC |
| <i>LEF1</i> vorwärts | GAC GAG ATG ATC CCC TTC AA |
| <i>LEF1</i> rückwärts | CGG GAT GAT TTC AGA CTC GT |
| <i>p63</i> vorwärts | GGA AAA CAA TGC CCA GAC TC |
| <i>p63</i> rückwärts | GTG GAA TAC GTC CAG GTG GC |
| <i>β-Catenin</i> vorwärts | TAC CTC CCA AGT CCT GTA TGA |
| <i>β-Catenin</i> rückwärts | TGA GCA GCA TCA AAC TGT GTA G |

3.7 Proteine und Peptide

3.7.1 Proteinmarker

Protein-Größenstandard „Benchmark“ Invitrogen GmbH, Karlsruhe

3.7.2 Rekombinante Peptide

Rekombinantes Wnt3a (human) R&D Systems GmbH, Wiesbaden

3.7.3 Enzyme

M-MuLV reverse Transkriptase New England Biolabs GmbH, Frankfurt
*PfuUltra*TM High-Fidelity DNA-Polymerase bzw. Stratagene GmbH, Basel, A
*PfuTurbo*TM High-Fidelity DNA-Polymerase
 mit passendem Reaktionspuffer
 Restriktionsendonukleasen Fermentas GmbH, St. Leon-Rot
 RNase Inhibitor, rekombinant New England Biolabs GmbH, Frankfurt
 T4-Ligase Invitrogen GmbH, Karlsruhe
Taq-Polymerase Primetech LTD, Minsk, Weißrussland

3.7.4 Antikörper

Primärantikörper:

Tabelle 6: Liste aller in dieser Arbeit verwendeten Primärantikörper (Immunblot und IP)

| Name | Klon | Verdünnung | Herkunft | Hersteller |
|---------------------|------------|------------|------------------|----------------|
| α-β-Actin | AC-15 | 1:10000 | Maus monoklonal | Abcam |
| α-β-Catenin | E-5 | 1:1000 | Maus monoklonal | Santa Cruz |
| α-Phospho-β-Catenin | S33/37,T41 | 1:1000 | Maus monoklonal | Cell signaling |
| α-β-Galactosidase | - | IP: 1 µg | Maus monoklonal | Promega |
| α-GFP | - | 1:3000 | Maus monoklonal | Clontech |
| α-GST | - | 1:50000 | Ziege polyklonal | Amersham |
| α-HA-tag | HA.11 | 1:1000 | Maus monoklonal | Covance |
| α-p63 | 4A4 | 1:1000 | Maus monoklonal | Santa Cruz |

Sekundärantikörper:

Tabelle 7: Liste aller in dieser Arbeit verwendeten Sekundärantikörper

| Name | Verdünnung | Hersteller |
|---|------------|------------------------|
| Peroxidase-konjugiertes affiniPure F(ab') ₂ Fragment, Esel- α -Maus IgG (H+L) | 1:10000 | Jackson ImmunoResearch |
| Peroxidase-konjugiertes Esel- α -Ziege IgG | 1:50000 | Santa Cruz |

3.8 Zellen

3.8.1 Prokaryotische Zellen

Escherichia coli DH 10 B „Electromax“
Escherichia coli Rosetta 2; DE3

Invitrogen GmbH, Karlsruhe
 Novagen, Madison, WI, USA

3.8.2 Eukaryotische Zellen

Tabelle 8: Liste aller in dieser Arbeit verwendeten eukaryotischen Zelllinien

| Name | Ursprung | bezogen von |
|-------------------------|-----------------------------------|----------------|
| 5637 | humanes Blasenzellkarzinom | DSMZ |
| <i>NCI-H1299-Zellen</i> | humanes Großzellen-Lungenkarzinom | ATCC; CRL-5803 |
| <i>HEK-293</i> | humane embryonale Nierenzellen | ATCC; CRL-1573 |
| <i>L-Zellen</i> | murine Fibroblasten | ATCC, CRL-2648 |
| <i>Wnt3a-L-Zellen</i> | murine Fibroblasten | ATCC, CRL-2647 |

3.9 Medien und Lösungen für Bakterienkultur

Agar Sigma-Aldrich GmbH, Seelze
 Ampicillin [ad 200 μ g/ml] Sigma-Aldrich GmbH, Seelze
 Kanamycin [ad 25 μ g/ml] Sigma-Aldrich GmbH, Seelze

2YT-Medium: 1,6% Trypton (w/v), 1% Hefeextrakt (w/v) und 0,5% NaCl (w/v) in dH₂O

LB-Medium: 1% Trypton (w/v), 1% Hefeextrakt (w/v) und 0,5% NaCl (w/v) in dH₂O

LB-Agar: 15% Bacto-Agar (w/v) in LB-Medium

3.10 Medien und Lösungen für Kultur eukaryotischer Zellen

| | |
|--|------------------------------------|
| Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) | Invitrogen GmbH, Karlsruhe |
| RPMI 1640 mit HEPES ohne L-Glutamin | Invitrogen GmbH, Karlsruhe |
| Ciprofloxacin (Ciprobay®) | Bayer Vital GmbH, Leverkusen |
| Fötale Kälberserum (FCS, fetal calf serum) | Invitrogen GmbH, Karlsruhe |
| Geneticin | Invitrogen GmbH, Karlsruhe |
| L-Glutamin | Invitrogen GmbH, Karlsruhe |
| Penicillin/Streptomycin | Invitrogen GmbH, Karlsruhe |
| Tetracyclin | Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe |
| Trypsin/EDTA | Invitrogen GmbH, Karlsruhe |

DMEM (voll) und RPMI (voll) enthält: 10% FCS, 50 U/ml Penicillin, 50 µg/ml Streptomycin, 200 µM L-Glutamin, 10 µg/ml Ciprobay® und 2 µg/ml Tetracyclin

DMEM – Selektionsmedium: DMEM (voll) mit 500 µg/ml Geneticin

4 Methoden

4.1 Zellbiologische Methoden

4.1.1 Arbeiten mit Bakterien

Zur Vermehrung von Plasmiden für molekularbiologische Arbeiten wurde der Bakterienstamm *Escherichia coli* DH10BTM verwendet. Für die Proteinexpressionen im Rahmen der GST-Pulldowns kam der Bakterienstamm *Escherichia coli* Rosetta 2; DE3 zum Einsatz.

4.1.1.1 Herstellung chemisch kompetenter Zellen

E.coli-Zellen besitzen keine natürliche Transformationskompetenz und müssen zuvor durch physikalische oder chemische Methoden künstlich kompetent gemacht werden. Die kommerziell erhältlichen *E. coli*-Zellen ElectroMAXTM DH10BTM (Invitrogen) sind elektrokompetent, d.h. durch das Anlegen eines elektrischen Feldes, kommt es für wenige Millisekunden zu einer Poreninduktion in der Zellmembran, wodurch diese durchlässig für DNA wird. Dieser Bakterienstamm wurde verwendet, um chemisch kompetente Zellen herzustellen. Hierzu wurde eine Calciumchlorid-Behandlung nach HANAHAN (Sambrook, 2001) angewendet, welche sich wie folgt zusammenstellt:

E. coli Zellen ElectroMAXTM DH10BTM wurden auf einer Agarplatte ohne Antibiotikum ausplattiert und über Nacht bei 37°C im Brutschrank inkubiert. Am folgenden Tag wurden 5 ml LB-Medium mit einer der gewachsenen Kolonien inokuliert und wiederum über Nacht bei 37°C bebrütet. Mit diesen 5 ml Flüssigkultur wurden am nächsten Tag 500 ml LB-Medium angeimpft und bei 37°C bis zum Erreichen einer OD₆₀₀ von 0,6 auf dem Schüttler inkubiert. Die Zellen wurden für 10 min bei 3000 UpM (Umdrehungen pro Minute) und 4°C herunterzentrifugiert und der Überstand verworfen. Das Zellpellet wurde in 150 ml kaltem TFB-1-Puffer resuspendiert und für 5 min auf Eis gehalten. Es folgte ein weiterer Zentrifugationsschritt für 10 min bei 6000 UpM und 4°C. Das resultierende Pellet wurde vorsichtig in 5 ml TFB-2-Puffer resuspendiert und in 50 µl Aliquots auf -80°C gelagert.

4.1.1.2 Transformation chemisch kompetenter Zellen

Rekombinante Plasmide werden *in vivo* durch Replikation und Teilung transformierter Bakterienzellen vermehrt. Um das gewünschte Plasmidkonstrukt, das ein Antibiotikumsresistenzgen als Marker trägt, in die *E.coli* Zellen zu transformieren, wurden 100-500 ng der Plasmid-DNA zu 50 µl chemisch kompetenter *E. coli* DH10BTM (4.1.1.1)

gegeben. Die Bakterien wurden anschliessend 30 min lang auf Eis gehalten, gefolgt von einer 10-minütigen Inkubation bei 37°C. Nach weiteren 10 min auf Eis wurden 50 µl LB-Medium zu der Bakteriensuspension gegeben und bei 37°C schüttelnd (300 UpM) in einem Thermomixer für 30 min inkubiert. Im Anschluss wurden die Zellen auf einer selektiven Agarplatte bebrütet.

4.1.1.3 Elektroporation zur Transformation elektrokompetenter Zellen

Die Elektroporation ist eine effiziente Methode zum Einbringen von Plasmid-DNA in Bakterien. Da im Rahmen von ortsgerichteter Mutagenese (4.3.9) die Menge des Konstruktmaterials begrenzt war, wurde für diese Transformation die Elektroporation gewählt, welche in etwa 100x effizienter ist, als die chemische Variante. Hierbei wurden 0,3 µl DNA ($c < 10 \text{ ng}/\mu\text{l}$) zusammen mit 7 µl elektrokompetenter *E.coli* (ElektroMAX DH10B) in einem Reaktionsgefäß vermischt und dieser Ansatz wurde dann in eine Elektroporationsküvette (Plattenabstand 0,1 cm) überführt, so dass der Bakterientropfen beide Platten miteinander verbindet. Nun wurde für 5 ms ein elektrisches Feld angelegt (1,7 kV, 200 Ω, 25 µF). Nach erfolgreicher Transformation (Zeitkonstante $> 4,5 \text{ ms}$) wurden sofort 150 µl 2YT-Medium zugegeben und die Bakteriensuspension anschließend auf entsprechenden selektiven Agarplatten ausplattiert (4.1.1.4).

4.1.1.4 Kultivierung und Selektion von Bakterien

Die Kultivierung und Selektion der zur Transformation verwendeten Bakterien erfolgte zunächst auf selektiven Agarplatten aus LB-Medium mit dem spezifischen Antibiotikum, abhängig vom Antibiotikumresistenzgen des Plasmidvektors. Auf diese Weise wurden die Bakterien mit den gewünschten Plasmidklonen selektioniert. Die Agarplatten wurden über Nacht bei 37°C bebrütet. Anschließend wurde eine Flüssigkultur (3 ml antibiotikumhaltiges 2YT-Medium für analytische DNA-Präparationen bzw. 100 ml für präperative Ansätze) ebenfalls mit dem spezifischen Antibiotikum (Ampicillin [200 µg/ml] oder Kanamycin [25 µg/ml]) versetzt und mit einer der transformierten Bakterienkolonien inokuliert. Die Inkubation erfolgte über Nacht bei 37°C auf dem Schüttler.

4.1.1.5 Transformation und Expressionsinduktion der GST-getaggtten Proteine in *E.coli*

Nach chemischer Transformation (4.1.1.2) der GST-getaggtten Konstrukte (4.3.10) in den Bakterienstamm *Escherichia coli* Rosetta 2; DE3 wurden die Bakterien bei 37°C in LB-

Medium inkubiert. Zur Induktion der Proteinexpression wurden die Zellen bei einer OD_{600} von 0,6 bis 0,8 mit 0,1 mM Isopropyl- β -D-thiogalactopyranosid (IPTG) induziert und über Nacht bei 16°C weiter bebrütet. Die Bakterien wurden am nächsten Tag durch eine 15-minütige Zentrifugation bei 4800 UpM geerntet und mit dem GST-Pulldown-Lysepuffer aufgeschlossen.

4.1.2 Arbeiten mit eukaryotischen Zellen

Die Arbeiten an eukaryotischen Zellkulturen erfolgten unter der Sterilbank.

4.1.2.1 Kultivierung von HEK-293-, NCI-H1299- und 5637-Zellen

Zur Kultivierung von adhärennten Zelllinien wurden Zellkulturschalen verwendet, die bei einer konstanten Temperatur von 37°C, 95% relativer Luftfeuchtigkeit und einem CO_2 -Gehalt von 5% inkubiert wurden. Für HEK-293- und NCI-H1299-Zellen wurde DMEM (voll) - Medium verwendet; 5637-Zellen wurden in RPMI 1640 (voll) - Medium kultiviert. Zur Passage der Zelllinien wurde das Nährmedium entfernt und die Zellen mit 5 ml PBS gewaschen, um tote Zellen und zweiwertige Kationen zu entfernen. Zum Ablösen der Zellen erfolgte eine Inkubation mit Trypsin-EDTA (ca. 30 μ l/cm²). Dabei bindet der Chelatbildner EDTA die für die Zell-Zell-Adhäsion wichtigen Ca^{2+} - Ionen und die Protease Trypsin sorgt durch die Spaltung der Proteinbrücken zwischen den einzelnen Zellen und zum Gefäßboden für das Herauslösen der Zellen aus ihrem Verband. Die sich ablösenden Zellen wurden in frischem Vollmedium resuspendiert und das überschüssige Trypsin wurde durch die im FCS enthaltenen Protease-Inhibitoren inaktiviert.

Für die kontinuierliche Kultur werden Zellen abhängig von der Zelllinie und -dichte umgesetzt. HEK-293-, NCI-H1299- und 5637-Zellen wurden 1:10 passagiert; d.h., 1/10 der Suspension wurde in eine neue Kulturschale mit Vollmedium überführt. Für Transfektionsexperimente wurde eine definierte Anzahl von Zellen ausgesät, die zuvor mit Hilfe der Neubauer-Zählkammer bestimmt wurde.

4.1.2.2 Einfrieren und Auftauen von Zellen

Von den verwendeten Zelllinien wurden von einer frühen Passage mehrere Aliquots in flüssigem Stickstoff gelagert. Dazu wurden die Zellen mit Trypsin/EDTA-Lösung aus ihrem Verband gelöst und in Vollmedium resuspendiert. Im Anschluss wurden die Zellen bei 800 UpM und 4°C für 10 min zentrifugiert. Alle weiteren Schritte erfolgten auf Eis. Das Zellpellet wurde in einer auf Eis vorgekühlten Lösung aus 90% FCS und 10% DMSO

resuspendiert und in Kryoröhrchen aliquotiert. Diese wurden über Nacht bei -80°C langsam abgekühlt, bevor sie in flüssigen Stickstoff überführt und dort gelagert wurden. Für das Auftauen der Zellen wurde das Aliquot kurz bei 37°C angetaut, in vorgewärmtes Vollmedium in einer Zellkulturschale gegeben und bei 37°C , 95% relativer Luftfeuchtigkeit und 5% CO_2 inkubiert. Am folgenden Tag wurde das Kulturmedium gewechselt, um das noch enthaltene DMSO zu entfernen. Die weitere Kultivierung erfolgte wie unter (4.1.2.1) beschrieben.

4.1.2.3 Liposomen-vermittelte Transfektion mittels Lipofectamine™2000

Die Aufnahme von Plasmid-DNA und siRNA in die Zellen wurde mit Hilfe des Lipofectamine™ 2000-Reagenzes über Liposomen-vermittelte Transfektion erreicht (Felgner, 1987; Felgner, 1989). Hierbei bildet die DNA bzw. siRNA Komplexe mit artifiziellen Liposomen, die eine Verschmelzung mit der Plasmamembran vermitteln.

4.1.2.3.1 Transiente Transfektion von eukaryotischen Zellen mit Plasmid-DNA

Die Plasmid-DNA Transfektionen von HEK-293-, NCI-H1299- und 5637-Zellen wurden mit dem Lipofectamine™ 2000-Reagenz durchgeführt. Am Vortag wurde die entsprechende Anzahl an Zellen in Vollmedium ausgesät und über Nacht bei 37°C und 5% CO_2 inkubiert. Die Zellmenge variiert je nach Zelllinie und Transfektionsformat. Die genaue Zellzahl, sowie die DNA-Gesamtmenge, die bei Bedarf mit leerem Vektor aufgefüllt wurde, und die Lipofectamine™ 2000-Menge sind in Tabelle 9 aufgeführt.

Tabelle 9: DNA- und Lipofectamine™ 2000-Mengen für die transiente Transfektion von eukaryotischen Zellen

| | 12 Well Zellkulturplatte | 10cm ² -Zellkulturschale |
|------------------------------------|----------------------------|-------------------------------------|
| HEK-293 | - | $2 \cdot 10^6$ Zellen/Schale |
| NCI-H1299 | - | $2 \cdot 10^6$ Zellen/Schale |
| 5637 | $3 \cdot 10^5$ Zellen/Well | - |
| DNA in DMEM (o.Z.) | 1,2 µg in 100 µl DMEM | 20 µg in 1,4 ml DMEM |
| Lipofectamine™ 2000 in DMEM (o.Z.) | 4 µl in 100 µl DMEM | 50 µl in 1,4 ml DMEM |

Zur Transfektion wurde die Plasmid-DNA in ein Reaktionsgefäß mit DMEM ohne Zusätze pipettiert. In einem weiteren Gefäß wurde DMEM ohne Zusätze mit Lipofectamine™ 2000

versetzt, gemischt und 5 min bei Raumtemperatur (RT) inkubiert. Anschliessend wurden beide Ansätze zusammengeführt und 20 min bei RT inkubiert.

Die Transfektionsansätze wurden danach auf die Zellen in das vorhandene Kulturmedium gegeben und die Zellen je nach Bedarf 24-48 h im Brutschrank inkubiert. Nach 4 h wurde ein Mediumwechsel mit frischem Vollmedium vorgenommen, um der Zelltoxizität des Lipofectamine™ 2000-Reagenzes entgegenzuwirken.

4.1.2.3.2 Transiente Transfektion von eukaryotischen Zellen mit siRNA

Die Transfektion von siRNA in 5637-Zellen wurde ebenfalls mit dem Lipofectamine™ 2000-Reagenz durchgeführt. Hierbei wurde jedoch eine reverse Transfektion angewendet, da sich diese als effizienter herausgestellt hat. Für die reverse Transfektion wurden zunächst in einem Reaktionsgefäß 100 µl DMEM (o.Z.) mit 100 pmol siRNA versetzt. In einem weiteren Gefäß wurden 100 µl DMEM ohne Zusätze mit 2 µl Lipofectamine™ 2000 gemischt, und beide Ansätze 15 min bei RT inkubiert. Anschliessend wurden beide Ansätze zusammengeführt und erneut 15 min bei RT inkubiert. Diese Ansätze wurden in die jeweiligen Wells der 12 Well-Zellkulturplatte überführt und eine Zellsuspension mit $3 \cdot 10^5$ 5637-Zellen pro Well dazugegeben.

4.1.2.4 Herstellung von Wnt3a-konditioniertem Medium und die Kultivierung der dazu notwendigen Zellen

Zur Herstellung von Wnt3a-konditioniertem Medium wurden L-Zellen verwendet, die stabil mit einem Wnt3a-exprimierendem Konstrukt transfiziert wurden (Willert *et al.*, 2003). Als Selektionsgen trägt dieses Plasmid ein Neomycin-Resistenzgen. Diese Zellen wurden in DMEM (voll) mit 0,5 mg/ml Geneticin, einem Neomycinderivat, kultiviert, um ein Herauswerfen des gewünschten Gens zu verhindern. Als Kontrolle zum Wnt3a-konditioniertem Medium dient Medium, welches mit Hilfe von untransfizierten Zellen hergestellt wurde. Diese L-Zellen wurden ohne Selektion in DMEM (voll) kultiviert. Das Passagieren dieser beiden Zelllinien erfolgte wie unter 4.1.2.1 beschrieben mit einer Verdünnung von 1:10 alle 2-3 Tage. Für die Gewinnung des Wnt3a-konditionierten Mediums bzw. der Kontrollmediums wurden die Zellen aus einer konfluenten 10 cm-Zellkulturschalen 1:10 verdünnt und 10 ml des gewünschten Mediums (DMEM (voll) bzw. RPMI 1640 (voll)) ohne Geneticinzugabe für 4 Tage inkubiert. Das Medium wurde abgenommen und mit 4000 UpM für 10 min zentrifugiert, um nicht-adhärenente Zellen aus dem Medium zu entfernen. Der Überstand wurde in ein neues Gefäß überführt und bei 4°C gelagert. Zu den nun konfluenten L-Zellen wurden 10 ml frisches Medium gegeben

und weitere 3 Tage inkubiert. Das so gewonnene Medium wurde mit dem Ersten 1:1 gemischt und bei 4°C gelagert.

4.2 Arbeiten mit dem Organismus *Xenopus laevis*

[Die in dieser Arbeit beschriebenen Versuche am Modellorganismus *Xenopus laevis* wurden von Dr. Katharina Damianitsch (Göttingen, GZMB, Abt. Entwicklungsbiochemie, Prof. T. Pieler) durchgeführt. Die im Folgenden aufgeführten Methodenbeschreibungen sind Auszüge aus der Dissertation Damianitsch, 2008 in der diese Ergebnisse veröffentlicht wurden.]

Der afrikanische Krallenfrosch *Xenopus laevis* gehört zur Familie der zungenlosen Froschlurche (Pipidae) der Ordnung Anura. Pigmentierte und Albinofrösche wurden von der Firma Nasco (Ft. Atkinson, USA) erworben und gemäß den Tierschutzbestimmungen gehalten und behandelt. Die Bestimmung der Embryonalstadien erfolgte nach Nieuwkoop und Faber, 1967. [aus Damianitsch, 2008, Kap. 2.2.1, S. 22].

4.2.1 *in vitro* Synthese von RNA

Für die Durchführung des Achsenduplikationsassays wurde zunächst die *in vitro* Transkription der Monomethylguanosin-Cap-RNA zur Mikroinjektion vorbereitet. Die dazu benötigten Konstrukte sind pCS2+/ Δ Np63 α (kloniert durch Y.Chen, Göttingen, GZMB, Abt. Entwicklungsbiochemie, Prof. T.Pieler; unveröffentlicht) und pCS2+/LEF1-GR (kloniert durch K. Damianitsch, Göttingen, GZMB, Abt. Entwicklungsbiochemie, Prof. T.Pieler; Damianitsch, 2008) die vor der Transkription mit dem Restriktionsenzym NotI linearisiert wurden.

4.2.1.1 Linearisierung von „sense“ und „antisense“ Matrizen für die RNASynthese

10 μ g „Template“-DNA wurde in einem 50 μ l Ansatz mit 4 U des entsprechenden Restriktionsenzym sowie des mitgelieferten 10x Puffers (Fermentas) über Nacht bei 37°C inkubiert. [aus Damianitsch, 2008, Kapitel 3.2.5.3, S. 39].

4.2.1.2 *in vitro* Transkription von Monomethylguanosa-Cap-RNA zur Mikroinjektion in *Xenopus* Embryonen

Zur *in vitro* Transkription von CapRNA wurde das mMESSAGE mMACHINE Kit mit SP6 oder T7 RNA-Polymerasen (Ambion) verwendet. Das übliche Volumen eines Transkriptionsansatzes betrug 10 µl und die Reaktion erfolgte für 3 Stunden bei 37°C. Anschließend wurde die „Template“-DNA durch Zugabe von 1 µl RNase-freier DNase für 15 min bei 37°C verdaut. [aus Damianitsch, 2008, Kapitel 3.3.1.1, S. 41].

4.2.1.3 Aufreinigung von RNA

Die Aufreinigung der *in vitro* transkribierten RNA erfolgte mittels des RNeasy® Mini Kit (Qiagen GmbH) oder des illustra™ RNA Spinmini Kit (GE Healthcare) nach Herstellerangaben. [aus Damianitsch, 2008, Kapitel 3.3.2, S. 42]

4.2.2 Stimulation der Eiablage und Vorbereitungen zur Mikromanipulation

Xenopus Weibchen wurden am Vorabend des Injektionstages mit 800 bis 1000 U humanem Choriongonadotropin (HCG) injiziert und bei 16°C über Nacht inkubiert. Am Morgen des nächsten Tages war mit der Eiablage zu rechnen. (...)

Die *Xenopus* Weibchen wurden einmal pro Stunde am Rücken massiert und das Gelege in einer Petrischale aufgefangen. Testis-Lösung mit den in 1x MBSH unbeweglichen Spermien wurde in der Petrischale mit Wasser auf 0,1x MBSH verdünnt und die Oozyten damit befruchtet. Nach zehnminütiger Inkubation wurde das Gelege mit 0,1x MBSH überschichtet (Sive *et al.*, 2000). Um eine Mikromanipulation der Embryonen zu ermöglichen, wurde die Gallerhülle der Embryonen vor der ersten Zellteilung durch Behandlung mit 2%-iger Cysteinhydrochlorid-Lösung abgelöst. Die Embryonen wurden danach mehrfach mit 0,1x MBSH gespült. (...) [aus Damianitsch, 2008, Kapitel 3.5.1, S. 50]

4.2.3 Mikroinjektion

Die Glaskapillaren für die Mikroinjektion wurden an einem Nadelzieher gezogen (PN-30, Science Products) und die Mikroinjektion an einem Mikromanipulator (Pneumatic PicoPump PV 820, World Precision Instruments) durchgeführt. Das Injektionsvolumen betrug 4 nl/Blastomere und wurde anhand einer µM-Skala eingestellt. Für die Mikroinjektion wurden die Embryonen in Injektionspuffer überführt und nach der Injektion für

eine weitere Stunde darin inkubiert. Zur weiteren Kultivierung wurden die Embryonen in 0,1x MBSH überführt. [aus Damianitsch, 2008, Kapitel 3.5.3, S. 51]

4.2.4 Achsenduplikations-Assay

Die pigmentierten Embryonen wurden marginal bis vegetal in eine ventrale Blastomere im Vierzellstadium injiziert. Eine Auswertung der Injektion erfolgte zwischen Stadium 30 und 35, als die stark pigmentierte Anhaftdrüse sowie die Augenzwölfe deutlich zu erkennen waren. Dorsale Achsenduplikation führte entweder zur Induktion einer zweiten Körperachse mit vollständigen Kopfstrukturen oder zu einer zusätzlichen partiellen Achse bestehend aus Rumpfstrukturen. [aus Damianitsch, 2008, Kapitel 3.5.3.1, S. 51]

4.2.4.1 Dexamethason-Behandlung

Die Freisetzung der von „Heat Shock“ Proteinen komplexierten Glucocorticoid Receptor-fusionierten Proteine wurde durch Zugabe von 1x Dex / 0,1x MBSH induziert. Die Embryonen wurden während der Behandlung unter Lichtabschluß inkubiert. Für Achsenduplikationsexperimente mit LEF1-GR wurde Dexamethason spätestens im 16-Zell-Stadium zugegeben und die Induktion am nächsten Morgen abgebrochen. [aus Damianitsch, 2008, Kapitel 3.5.6.2, S. 53]

4.3 Arbeiten mit Nukleinsäuren

4.3.1 Plasmidpräparation

Zur präoperativen Isolation von Plasmid-DNA aus Bakterienzellen wurde das Pure Yield™ Plasmid Maxiprep System (Promega) laut Herstellerangaben verwendet. Zugrunde liegendes Prinzip ist die alkalische Lyse der Bakterienzellen, gefolgt von Reinigung der DNA über eine Silica-Säule. Eingesetzt wurden 100 ml einer über Nacht inkubierten Bakterienkultur. Die DNA wurde mit 500 µl EB-Puffer eluiert.

Zur Präparation von DNA im analytischen Maßstab ist es ausreichend, 3 ml einer Übernachtskultur einzusetzen. Für diese Isolationen wurde das mit dem gleichen Prinzip arbeitende Invisorb® Spin Plasmid Mini Two Kit (Invitek) verwendet.

4.3.2 Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren

Die Bestimmung der Nukleinsäurekonzentration von DNA- und RNA-Lösungen erfolgte mit Hilfe des Nanodrop™ ND-1000 (Peqlab) durch Messung der Absorption bei einer Wellenlänge von 260 nm. Bei dieser Wellenlänge sind Absorption und Nukleinsäurekonzentration der Lösung im linearen Bereich der Absorptionskurve direkt proportional. Zur Bestimmung der Reinheit der untersuchten Lösung wurde weiterhin die Absorption bei einer Wellenlänge von 280 nm gemessen und der Quotient aus $\text{Absorption}_{260}/\text{Absorption}_{280}$ betrachtet. Saubere Nukleinsäurelösungen zeigen einen Quotienten zwischen 1,8 und 2,0. Kontaminationen mit Proteinen zeigen einen niedrigeren, solche mit Phenol einen höheren Wert an.

Zur Messung wurden 2 µl der zu messenden DNA bzw. RNA-Lösung auf die Messoberfläche pipettiert.

Anhand folgender Formel konnte die Konzentration berechnet werden:

$$\text{Nukleinsäurekonzentration} = \text{Absorption}_{260} \times \text{Faktor}$$

Dabei gelten folgende Faktoren:

| | |
|---------------------|----------|
| ds DNA: | 50 µg/ml |
| ss DNA und RNA: | 40 µg/ml |
| ss Oligonukleotide: | 20 µg/ml |

4.3.3 Elektrophoretische Auftrennung von Nukleinsäuren

DNA und RNA werden unter nativen Bedingungen in Abhängigkeit ihrer Molekülgröße in einer Agarosegelmatrix elektrophoretisch aufgetrennt. Dem Prinzip der elektrophoretischen Auftrennung liegt der so genannte "Siebeffekt" zu Grunde, wobei größere Fragmente im Agarose-Gitter eine höhere Reibung erfahren und damit nicht so schnell wandern wie kleinere.

4.3.3.1 Analytische DNA-Agarosegele

Zur Herstellung eines Agarosegels wurde die Agarose durch Erhitzen in TAE-Puffer gelöst. Entsprechend der zu erwartenden Fragmentgröße wird die Agarose 0,8% bzw. 2%ig angesetzt. Das noch flüssige Agarosegel wird mit 0,1 µl/ml einer 1% Stammlösung von Ethidiumbromid versetzt und beim Gießen in den Gelschlitzen wird ein 12er-Kamm in das noch nicht erstarrte Gel eingesetzt. Aufgrund seiner planaren Struktur kann Ethidiumbromid in die DNA interkalieren und ermöglicht nach Anregung mit UV-Licht bei einer Wellenlänge von 254-366 nm anschliessend über seine Fluoreszenz (Lichtemission einer Wellenlänge von 590 nm) eine Detektion der DNA-Fragmente.

Für analytische Zwecke wurden 10 µl der jeweiligen Nukleinsäureproben mit der entsprechenden Menge des 6x DNA-Probenpuffers vermischt. Zur Analyse der Fragmentgröße wurde mit den Proben als Vergleich auch 1 µl eines geeigneten DNA-Längenstandards aufgetragen. Die Auftrennung erfolgte bei einer konstanten Spannung von 120 V in 1x TAE-Puffer gefolgt von der Auswertung unter UV-Licht mit dem UV-Schirm Gel iX Imager (Intas GmbH, Göttingen).

4.3.4 Phenol/Chloroform-Extraktion

Die Phenol/Chloroform-Extraktion dient der Trennung von Proteinen und Nukleinsäuren in wässrigen Lösungen. Dafür wurde die Lösung zunächst mit einem Volumen Phenol (pH 8.0) versetzt, gut gevortext und dann 1 min lang bei 13.000 UpM abzentrifugiert. Die so entstandene obere Phase wurde unter Vermeidung der Interphase in ein neues Reaktionsgefäß überführt und mit einem Volumen Chloroform-Isoamylalkohol-Gemisch (24:1, v/v) vermischt. Auch hier wurde ein Vortex-Schritt, gefolgt von einem Zentrifugationsschritt vorgenommen. Die in der gereinigten Lösung verbliebenen Nukleinsäuren (obere Phase) wurden anschließend in einer Ethanol-fällung (4.3.5) präzipitiert.

4.3.5 Ethanolfällung

Um Nukleinsäuren aus einer Lösung aufzureinigen oder anzukonzentrieren, kann durch die Ethanolfällung DNA oder RNA präzipitiert werden. Hierzu wurde zunächst 1 µl Glycogen (10mg/ml) als Trägermolekül zugegeben, an welches die DNA bzw. RNA bindet. Nach Zugabe von 1/10 Volumen 3 M Natriumacetat (pH 6.2) wurde die Lösung gut gemischt und anschließend wurden 2,5 Volumenteile eiskalten Ethanol abs. zugefügt. Daran schloss sich eine Zentrifugation für 15 min bei 10.000×g und 4°C an. Der Überstand wurde abgenommen und das Nukleinsäurepellet mit 70%igem kalten Ethanol gewaschen. Nach erneuter Zentrifugation (Bedingungen wie oben) und Abnahme des Überstandes wurde die DNA/RNA an der Luft getrocknet. Anschließend wurde das DNA bzw. RNA-Pellet in der gewünschten Menge EB-Puffer resuspendiert. Im Rahmen der RNA-Isolation waren dies 30 µl EB-Puffer.

4.3.6 Behandlung von DNA mit Restriktionsendonukleasen

Die Behandlung von DNA mit Restriktionsendonukleasen ist einerseits eine schnelle und einfache Methode zur Überprüfung von Plasmidkonstrukten beispielsweise nach der ortsgerichteten Mutagenese (4.3.9). Andererseits ist die Restriktion von Plasmidvektoren und PCR-Fragmenten ein wichtiger Schritt während der PCR-Klonierung zur Herstellung neuer Konstrukte (4.3.10).

4.3.6.1 Analytische Behandlung von DNA mit Restriktionsendonukleasen

Ein analytischer Ansatz (10 µl) dient der schnellen Überprüfung von Plasmiden. Der komplette Ansatz kann nach 2-stündiger Inkubation bei der für die Restriktionsendonuklease optimalen Temperatur und Zugabe von 2 µl DNA-Probenpuffer (6x) direkt im Agarosegel aufgetrennt werden.

| | | |
|----------------------|------|-----------------------------|
| Analytischer Ansatz: | 2 µl | Plasmid-DNA (≅ 1-2 µg DNA) |
| | 1 µl | 10x Reaktionspuffer |
| | 1 µl | Restriktionsendonuklease(n) |
| | 5 µl | dH ₂ O |

4.3.6.2 Präperative Behandlung von DNA mit Restriktionsendonukleasen

Im Rahmen der PCR-Klonierung zur Herstellung der GST-getaggten ΔNp63-Fragmente (4.3.10) wurden zunächst die gewünschten cDNA-Bereiche amplifiziert, um anschließend

über spezifische Restriktionsschnittstellen in den gewünschten Vektor kloniert zu werden. Hierfür wurden die Fragmente wie folgt mit den Restriktionsendonukleasen geschnitten.

| | | |
|-----------------------|------|--|
| Präoperativer Ansatz: | 2 µl | DNA (\cong 1-2 µg) (Plasmid bzw. PCR-Produkt) |
| | 1 µl | 10x Reaktionspuffer |
| | 1 µl | Restriktionsendonuklease(n) |
| | 5 µl | dH ₂ O |

Auch das Vektorkonstrukt wurde mit den jeweiligen Restriktionsnukleasen geschnitten, und zusätzlich mit einer alkalischen Phosphatase 1U CIAP (Calf Intestinal Alkaline Phosphatase) verdaut, um eine Religation der kompatiblen DNA-Enden zu verhindern.

Die Restriktionsendonukleasen wurden vom Hersteller mit geeignetem 10x Puffer und ggf. mit BSA geliefert, welches zur Stabilisierung der Enzyme dient. Die Kombination verschiedener Enzyme ist in der Regel möglich. Dabei verweist der Hersteller auf Tabellen, aus denen geeignete Bedingungen zu entnehmen sind. Besitzen die beiden Enzyme zwei verschiedene Temperaturoptima, oder unterscheiden sich die optimalen Puffer beider Enzyme zu stark, muss die Behandlung der DNA mit ihnen sequentiell erfolgen, wobei als Zwischenschritt eine Phenol/Chloroform-Extraktion (4.3.4) mit anschließender Ethanolfällung (4.3.5) von Nöten ist.

4.3.7 Ligation von DNA-Fragmenten

Durch Einsatz der T4 DNA Ligase (Fermentas) können DNA-Fragmente in Vektoren ligiert werden, wenn kompatible DNA-Enden vorliegen. DNA-Ligasen verknüpfen freie 5'-Phosphatgruppen mit 3'-OH-Gruppen von DNA-Molekülen durch die Bildung einer Phosphodiesterbindung unter Verbrauch von ATP. Dabei ist es vorteilhaft, das molare Verhältnis der verschiedenen DNA-Moleküle zugunsten des Inserts zu verschieben (z.B. 1:5).

| | | |
|---------|--------|-------------------------|
| Ansatz: | 3 µl | Insert-DNA (ca. 1,5 µg) |
| | 0,5 µl | Vektor-DNA (ca. 0,3 µg) |
| | 0,5 µl | ATP [100 µM] |
| | 0,5 µl | T4-DNA-Ligase |
| | 0,5 µl | 10x T4-Ligationspuffer |

Um nachträglich beim Auszählen der erhaltenen Kolonien das Verhältnis von religierten Vektoren zu ligierten Konstrukten abschätzen zu können, wurde parallel ein

Kontrollansatz mitgeführt, in dem lediglich die Insert-DNA durch dH₂O ersetzt war. Die Ansätze wurden über Nacht bei RT inkubiert.

4.3.8 Amplifikation von DNA durch die Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR, polymerase chain reaction)

Die PCR dient der spezifischen Amplifizierung von DNA-Sequenzen zwischen zwei Oligonukleotid-Fragmenten (Primern), die gegenläufig an komplementäre DNA-Stränge binden. Die Matrizen-DNA („template“) wird zunächst durch hohe Temperatur (95°C) in ihre Einzelstränge getrennt. Danach erfolgt bei geeigneter Temperatur die Anlagerung („annealing“) der Primer, woraufhin diese durch die eingesetzte DNA-Polymerase verlängert werden („elongation“). Als Matrize dient der an den Primer gebundene Komplementärstrang. Dieser Reaktionsablauf wird zyklisch mehrere Male wiederholt. Die jeweils neu synthetisierten DNA-Stränge können ihrerseits als Matrize dienen, so dass eine exponentielle Amplifizierung der DNA-Fragmente erfolgt.

Das Prinzip der PCR wurde im Rahmen dieser Dissertation für die ortsgerichtete Mutagenese (4.3.9) PCR-Klonierung (4.3.10), die RT-PCR (4.3.14) sowie die qPCR (4.3.15) verwendet.

4.3.9 Ortsgerichtete Mutagenese (QuikChange™-Mutagenese)

Die QuikChange™-Mutagenese erlaubt es, gezielt Punktmutationen, kurze Deletionen oder Insertionen in Plasmid-DNA einzubringen. Dies geschieht durch eine Polymerase-Kettenreaktion mit speziell konstruierten Primern, welche die gewünschte Mutation tragen, flankiert von 10-15 unveränderten Nukleotiden. Um eine spätere Vorabselektion mutierter Klone noch vor der unumgänglichen Sequenzierung (4.3.11) zu ermöglichen, wird versucht, eine stille Mutation einzuführen, die eine Restriktionsschnittstelle zusätzlich einbringt, oder entfernt. Als Templat dient das zu mutierende Plasmidkonstrukt. Da im Rahmen der ortsgerichteten Mutagenese das gesamte Konstrukt amplifiziert wird und man bis auf die gewünschte Mutation keine weiteren Mutationen in dem Konstrukt erhalten möchte, wird eine Polymerase mit hoher „Proofreading“-Aktivität (Korrekturlesen) empfohlen. Die *PfuUltra*™ ist eine solche High-fidelity (hohe Genauigkeit) DNA-Polymerase mit einer Fehlerrate von nur $4,6 \cdot 10^{-7}$ pro Basenpaar und Duplikation. Als Vergleich liegt die Fehlerrate einer *Taq*-DNA-Polymerase bei $8,0 \cdot 10^{-6}$.

| | | |
|-------------|---------------|---|
| PCR-Ansatz: | 5 μ l | 10x Reaktionspuffer |
| | 0,5 μ l | dNTP-Mix [je 20 mM] |
| | 1 μ l | Vorwärtsprimer [50 ng/ μ l] |
| | 1 μ l | Rückwärtsprimer [50 ng/ μ l] |
| | 1 μ l | dsDNA-Templat [75 ng] |
| | 1 μ l | <i>PfuUltra</i> TM Polymerase [2,5 U/ μ l] |
| | ad 50 μ l | dH ₂ O |

Die PCR erfolgte in PCR-Maschinen bei folgendem Programm:

| | | | | |
|-------------------|-------|------|---------------|---------------|
| Temperaturzyklen: | 95°C | 30 s | Denaturierung | |
| | 20x { | 95°C | 30 s | Denaturierung |
| | | 55°C | 1 min | Anlagerung |
| | | 68°C | 17 min* | Elongation |
| | | 4°C | ∞ | Reaktionsende |

* Die Länge des Elongationsschrittes ist von der Größe des zu mutierenden Plasmids abhängig (2 min/1kb).

Nach Beendigung des PCR-Programms wurde die DNA mit 2 μ l DpnI [10 U/ μ l] für 1 h bei 37°C verdaut. Diese Restriktionsendonuklease schneidet nur vollständig methylierte DNA, wie sie nach Präparation aus Bakterien (4.3.1) vorliegt. Da das Mutageneseprodukt hemimethyliert bzw. unmethyliert ist, wurde so das Verhältnis zwischen Ausgangsmaterial und Produkt zugunsten des mutierten Plasmids verschoben. Nach Ethanolfällung (4.3.5) erfolgte die Elektroporation (4.1.1.3) der DNA in Bakterien.

4.3.9.1 Ortsgerichtete Mutagenese zur Herstellung des HA-mLEF1- Δ HMG-Konstrukts

Zur Herstellung des HA-mLEF1- Δ HMG-Konstrukts wurde die Methode der ortsgerechten Mutagenese angewandt. Hierfür wurde das Oligonukleotid LEF1-HMG_vor 5'- CAG GAG CCC AAA AGA CTA CAG GAG TCG AC -3' bestellt, das 15 Nukleotide vor und 14 Nukleotide nach dem zu deletierenden Bereich die Templat-DNA bindet. Auf diese Weise werden die AS 295 bis 320 und somit die HMG-Domäne vollständig deletiert.

Als Rückwärts-Primer diene das zum Vorwärts-Primer komplementäres Oligonukleotid LEF1–HMG_rück 5'- GTC GAC TCC TGT AGT CTT TTG GGC TCC TG – 3'. Mit diesen Materialien wurde die ortgerichtete Mutagenese wie unter 4.3.9 durchgeführt.

Durch die Deletion wurde eine Restriktionsschnittstelle aus dem Konstrukt entfernt, so dass über einen Restriktionsverdau 4.3.6.1 mit den Endonukleasen SmaI und BamHI (SmaI ist die deletierte Restriktionsschnittstelle) vorab korrekt mutierte Klone selektiert und der Sequenzierung 4.3.11 unterzogen werden konnten.

4.3.10 PCR-Klonierung zur Herstellung der GST-getaggen Δ Np63 α 1-290 und 81-290 Konstrukts

[Die PCR-Klonierung der GST-getaggen Konstrukte wurde von Antje Dickmanns (Göttingen, GZMB, Abt. Molekulare Onkologie, Prof. M.Dobbelstein) durchgeführt]

Für die Charakterisierung der mit LEF1 interagierenden Domäne innerhalb des Δ Np63 α Proteins mittels GST-Pulldown wurden zwei Fragments von Δ Np63 α hinter das GST-Tag kloniert. Mit diesen Fusionsproteinen wurde *in vitro* die Interaktion der Aminosäuren 1-290 und 81-290 von Δ Np63 α mit dem Transkriptionsfaktor LEF1 untersucht. Mit den Oligonukleotiden Δ Np63_f1_BamHI (5'-CGC GGA TCC ATG CTG TAC CTG GAA AAC AAT GCC -3') und Δ Np63_r290_XhoI (5'- CCC TCG AGT CCG TGT GTA TTC TGA CGG AAA GG -3') wurde das AS 1-290 Fragment aus dem Expressionskonstrukt pcDNA3- Δ Np63 α mittels PCR (4.3.8) und der *PfuTurbo*TM DNA-Polymerase amplifiziert. Für das kürzere Fragment AS 81-290 wurden die Oligonukleotide Δ Np63_f81_BamHI (5'- CCG GAT CCC ACA GCT TCG ATG TGT CCT TCC AG-3') und Δ Np63_r290_XhoI (5'- CCC TCG AGT CCG TGT GTA TTC TGA CGG AAA GG -3') verwendet.

| | | |
|-------------|---------------|---|
| PCR-Ansatz: | 2,5 μ l | 10x Reaktionspuffer |
| | 2,5 μ l | DMSO |
| | 1 μ l | dNTP-Mix [je 20 mM] |
| | 1 μ l | Vorwärtsprimer [50 ng/ μ l] |
| | 1 μ l | Rückwärtsprimer [50 ng/ μ l] |
| | 0,5 μ l | dsDNA-Templat [75 ng] |
| | 0,5 μ l | <i>PfuTurbo</i> TM Polymerase [2,5 U/ μ l] |
| | ad 25 μ l | dH ₂ O |

Die PCR erfolgte in PCR-Maschinen bei folgendem Touchdown-Programm:

| | | | | |
|-------------------|---------------------|-------|---------------|---------------|
| Temperaturzyklen: | 95°C | 5 min | Denaturierung | |
| je 2x | 64°C/62°C/60°C/54°C | 95°C | 45 s | Denaturierung |
| | | 45 s | 45 s | Anlagerung |
| | | 72°C | 4 min | Elongation |
| | | 4°C | ∞ | Reaktionsende |

Die PCR-Produkte wurden mit den Qiaquick PCR Purification Kit (Qiagen) aufgereinigt und nach BamHI und XhoI Restriktionsverdau (4.3.6.2) in den ebenfalls geschnittenen und dephosphorylierten Vektor pGEX-6P1 mit der T4-Ligase ligiert (4.3.7).

4.3.11 Sequenzierung von DNA

Zur genaueren Überprüfung der QuikChange™-Mutanten, der neuen, durch PCR klonierten Konstrukte, wie auch einer Kontrolle aller zugesandter Plasmide, wurden Sequenzierungen nach dem Prinzip der Didesoxy-Kettenabbruch-Methode nach Sanger und Coulson (Sanger *et al.*, 1977) vorgenommen. Die Methode beruht auf der Verlängerung eines zum Matrizenstrang komplementären Oligonukleotids und Kettenabbrüchen der Synthesereaktion durch verschiedenfarbig fluoreszierende 2',3'-Didesoxynukleotid-5'-Triphosphate (ddNTP) im dNTP-Mix. Die als Folge entstehenden unterschiedlich langen DNA-Fragmente lassen sich nach ihrer Größe auftrennen. Der jeweils bei charakteristischer Wellenlänge licht-emittierende Fluoreszenzmarker ermöglicht eine Identifikation des jeweils endständigen Nukleotids.

Zur Analyse diente das Sequenziergerät ABI 3100 Automated Capillary DNA Sequencer (Applied Biosystems), das zur Fragmenttrennung und Basenidentifikation das Prinzip der Kapillarelektrophorese nutzt. Hierbei werden die einzelnen Kapillaren mit einer Gelmatrix befüllt, in die die individuellen Sequenzierproben separat zur elektrophoretischen Auftrennung injiziert werden. Während dieses Vorgangs detektiert das Gerät über vier Spektralkanäle kontinuierlich die Emission der unterschiedlichen Fluoreszenzfarbstoffe. Nach Verarbeitung dieser Rohdaten kann aus dem resultierenden Elektropherogramm die Nukleotidsequenz ermittelt werden.

Für die Didesoxy-Kettenabbruch-Methode wird eine PCR mit dem BigDye® Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit durchgeführt, welches alle nötigen Bestandteile des

Sequenzier-Mix (unter anderem Desoxynukleosidtriphosphate (dNTPs), fluoreszenzmarkierte Didesoxynukleosidtriphosphate (ddNTPs) und einem Sequenzierpuffer) enthält.

Die Bedingungen für Plasmide sind folgende.

PCR-Mix (10 μ l): 300 ng Templat, 8 pmol Sequenzierprimer, 1,5 μ l Sequenziermix und 1,5 μ l Sequenzierpuffer

| | | | |
|-------------------|------|----------|---------------|
| Temperaturzyklen: | 96°C | 2 min | Denaturierung |
| | 96°C | 10 s | Denaturierung |
| 25x | 55°C | 15 s | Anlagerung |
| | 60°C | 4 min | Elongation |
| | 4°C | ∞ | Reaktionsende |

Anschließend wurde eine Ethanolfällung (4.3.5) ohne Glykogen durchgeführt und das Nukleotidpellet in 15 μ l HiDi™-Formamid aufgenommen.

4.3.12 Dual-Luciferase-Reporter-Test

Um die Transkriptionsaktivierung durch spezifische Proteine in Säugerzellen zu untersuchen, wurden Luziferase-Reporter-Tests durchgeführt. Dabei wurde verglichen, ob die Ko-Expression bestimmter Proteine einen Einfluss auf die Transkriptionsaktivität eines spezifischen Promotors hat. Um mögliche Schwankungen in Zellzahl und Transfektionseffizienz auszuschließen, wurde das duale Reporterassaysystem von Promega angewandt. Dabei wurde die Aktivität der *Firefly*-Luziferase (*Photinus pyralis*, Glühwürmchen) des experimentellen Reporters und die Aktivität der *Renilla*-Luziferase (*Renilla reniformis*, Seeanamone) des Kontrollreporters pRI-*tk* gemessen.

Die Biolumineszenz der durch die *Firefly*-Luziferase bzw. die *Renilla*-Luziferase katalysierten Oxidationen von Luziferin zu Oxiluziferin bzw. Coelenterazin zu Coelenteramid wird mittels eines Luminometers bestimmt. Die Lumineszenzreaktionen auf Molekülebene sind in Abbildung 9 dargestellt.

Für die Messung wurden HEK-293-Zellen bzw. siRNA-transfizierte 5637-Zellen in 3,9 cm²-Wells mit 100.000 Zellen/Well ausgesät und am nächsten Tag mit Expressionskonstrukten und/oder einem Reporterplasmid transfiziert, welches das Gen für das Enzym *Firefly*-Luziferase unter der Kontrolle eines Promotors trägt, der die Aktivität des kanonischen Wnt-Signalwegs dokumentiert. Zur Normalisierung der Zellmenge und Transfektions-effizienz, wurde zusätzlich ein *Renilla*-Luziferase-Konstrukt mit einer konstitutiven Grundaktivität ko-transfiziert, welche unabhängig von der *Firefly*-Luziferaseaktivität gemessen werden kann.

Die Analyse der Luziferaseaktivitäten erfolgte 24 h nach Reporter-Transfektion. Dafür wurden das Medium abgenommen, die Zellen in 100 µl/Well 1x Passiv Lysis Buffer (PLB) (Promega; 1 Vol. 5x PLB in 4 Vol. H₂O gemischt) abgeschabt und für 15 min schüttelnd bei RT inkubiert. Bei dieser Methode bleiben die Zellkerne intakt. Nach erfolgter Lyse wurden die Zellkerne und Organellen durch Zentrifugation bei 15000×g und 4°C für 1 min vom Cytoplasma abgetrennt, welches anschließend im Reporter-Test eingesetzt werden konnte. Je 20 µl der Lysate wurden dazu in eine LumiNuncTM 96 MicroWellTM Platte gegeben und in einem Luminometer (Centro LB 960, Berthold Technologies, Wildbad) wurde zuerst die Chemolumineszenz der *Firefly*-Luziferase durch Zugabe von 100 µl des Luziferase Assay Substrates gelöst in Luziferase Assay Buffer gemessen. Durch Zugabe von 100 µl des Stop&Glo-Reagenzes wurde die Lumineszenz der *Firefly*-Luziferase beendet, die der *Renilla*-Luziferase induziert und ebenfalls gemessen.

Der Quotient aus *Firefly*- und *Renilla*-Luziferaseaktivität ergibt so den Wert für die relative Luziferaseaktivität, der mit den anderen Messwerten direkt verglichen werden kann.

Das restliche Lysat bestehend aus dem verbliebenen Cytoplasma sowie den pelletierten Zellkerne und Organellen kann für eine spätere Untersuchung der Proteinmengen mit 25 µl 6x Laemml-Puffer vermischt und 5 min bei 95°C aufgeköcht werden. Diese Proben können nun bei -20°C gelagert oder nach einer 10-minütigen Zentrifugation bei 14.000 UpM und 4°C im SDS-PAGE (4.4.2) aufgetrennt werden.

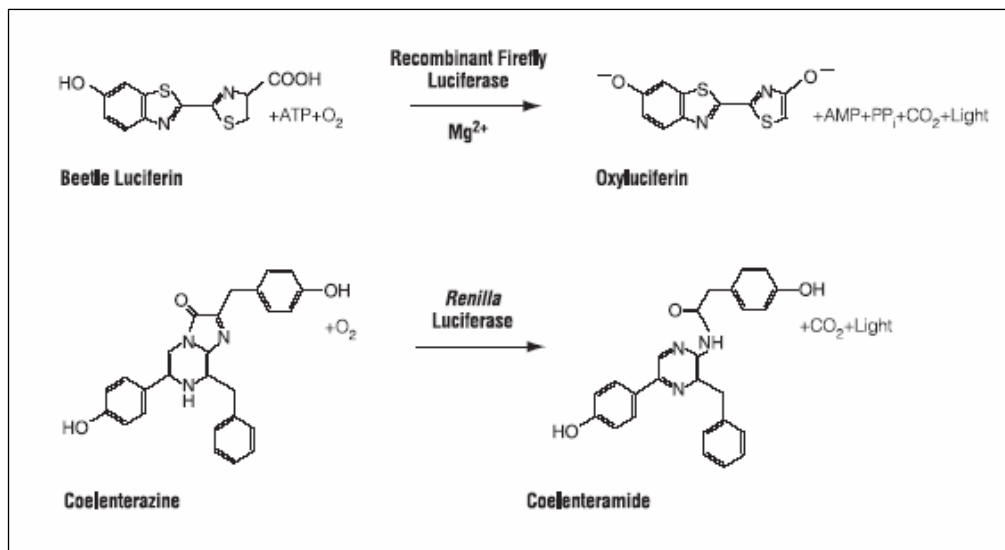


Abbildung 9: Biolumineszenzreaktionen, die durch die *Firefly*- und die *Renilla*-Luziferase katalysiert werden. *Firefly*-Luziferase kann in einer Mg²⁺, ATP und O₂-abhängigen Reaktion das Substrat Luziferin zu Oxyluziferin umsetzen. Hierbei entsteht CO₂ sowie eine Lichtemission. Durch die *Renilla*-Luziferase wird das Substrat Coelenterazin O₂-abhängig zu Coelenteramid und CO₂ umgesetzt, wobei ebenfalls eine Lichtemission eintritt. (aus dem Handbuch der Firma Promega zum Dual Luciferase® Reporter Assay System)

4.3.13 RNA Isolation

Die RNA Isolation ist der erste Schritt um die Transkriptionslevel verschiedener Gene quantitativ zu analysieren. Die totale RNA der zuvor ausgesäten und nach Bedarf transfizierten und/oder behandelten Zellen wurde mit der TRIZOL Methode (Invitrogen) extrahiert. Hierfür wurden pro 12-Well 500 µl TRIZOL Reagenz auf die Zellen gegeben und 5 min bei RT inkubiert. Während dieses Schrittes fand die Zellyse statt. Das Lysat wurde in ein 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt und mit 100 µl Chloroform versetzt. Kräftiges Schütteln für 15 sek folgte eine Inkubation von 3 min bei RT. Während der sich anschließenden 15 minütigen Zentrifugation bei 12.000xg und 4°C trennte sich die durchsichtige wässrige Phase von der Phenol-haltigen Phase.

Die wässrige Phase, die die RNA beinhaltete, wurde in ein neues Reaktionsgefäß überführt und mit 250 µl Isopropanol gemischt. Wieder wurde zunächst für 15 sek kräftig geschüttelt und anschließend 10 min bei RT inkubiert. In dieser Zeit wurde die RNA präzipitiert. Der darauf folgende Zentrifugationsschritt bei 12.000xg, 4°C für 10 min pelletierte die RNA. Der Überstand wurde verworfen und das RNA-Pellet mit 500 µl 75%igem Ethanol gewaschen. Nach der erneuten Zentrifugation bei 7.500xg, 4°C für 5 min wurde der Überstand verworfen und das RNA-Pellet an der Luft getrocknet. Resuspendiert wurde das Pellet in einem Volumen von 50 µl RNase-freiem Wasser. Um eine ideale Reinheit der RNA für die sich anschließende RT-PCR zu garantieren, wurde eine Ethanolfällung (4.3.5) durchgeführt.

4.3.14 Polymerase-Ketten-Reaktion zur reversen Transkription von RNA zu cDNA (RT-PCR)

Für die quantitative Analyse der mRNA-Mengen musste die isolierte RNA zunächst in cDNA umgeschrieben werden. Diese sogenannte reverse Transkription der RNA erfolgte mit Hilfe der M-MuLV Reversen Transkriptase (New England Biolabs). Hierfür wurde zunächst 1 µg der totalen RNA mit 2 µl eines Primermixes aus 50 µM oligo-dT (T23VN) und 15 µM random nonamer Primer und 4 µl 2,5 mM dNTPs (Promega) versetzt. Die Proben wurden mit RNase-freiem Wasser auf ein Volumen von 16 µl gebracht und für 5 min auf 70°C erwärmt. Anschließend wurden die Proben wieder abgekühlt und mit 2 µl 10x Reaktionspuffer, 10 U RNase Inhibitor (New England Biolabs) und 25 U M-MuLV Reverse Transkriptase (New England Biolabs) in einem totalen Volumen von 4 µl gemischt und 1 h bei 42°C inkubiert. Im nächsten Schritt folgte die Inaktivierung der Enzyme durch Erhitzen auf 95°C für 5 min. Die so entstandene cDNA wurde mit 30 µl RNase freiem Wasser auf ein Gesamtvolumen von 50 µl gebracht.

4.3.15 Quantitative Polymerase-Ketten-Reaktion (qPCR)

Die quantitative Analyse der mRNA erfolgte auf dem Chromo4 Real-Time PCR System (BioRad). Zu diesem Zweck wurde 1 µl der amplifizierten cDNA aus der RT-PCR (4.2.14) mit 24 µl PCR-Master-Mix gemischt. Die jeweiligen Primer sind vorwärts und rückwärts Oligonukleotide (siehe Tabelle), die an die cDNA binden und ein Produkt von etwas 150-300 Basenpaaren amplifizieren.

Das verwendete 2-Schritt Protokoll umfasste die folgenden Temperaturzyklen und eine sich anschließende Schmelzkurve von 45°C bis 95°C mit 0,5°C Schritten.

Methoden

| | | | | |
|-------------------|-------|-------|---------------|---------------------------|
| Temperaturzyklen: | 95°C | 2 min | Denaturierung | |
| | 39x { | 95°C | 15 s | Denaturierung |
| | | 60°C | 1 min | Anlagerung und Elongation |

Mit der finalen Schmelzkurve ließ sich die Spezifität der Primer bestimmen, da so kontrolliert werden konnte, ob das Signal von einem spezifischen oder unspezifischen Produkt, wie beispielsweise Primerdimern herrührt.

Alle Ergebnisse der quantitativen RT-PCR wurden mit der $\Delta\Delta C(t)$ -Methode (siehe Abbildung 10) ausgewertet und dabei zu den mRNA-Leveln des Housekeeping-Gens 36B4, dem säurehaltigen ribosomalen Phosphoprotein P0, normalisiert.

$$\text{rel. mRNA Menge} = \frac{(E_{\text{Zielgen}})^{\Delta C_t \text{ Zielgen (Kontrolle-Behandlung)}}}{(E_{\text{Referenzgen}})^{\Delta C_t \text{ Referenzgen (Kontrolle-Behandlung)}}$$

Abbildung 10: Formel zur Berechnung der relativen mRNA-Mengen ($\Delta\Delta C(t)$ -Methode)

4.4 Arbeiten mit Proteinen

4.4.1 Ernte von Zellen für eine anschließende SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)

Für die gelelektrophoretische Auftrennung von Proteinen wurden die jeweiligen Zellen im 12-Well zunächst ins vorhandene Medium abgeschabt und durch Zentrifugation für 5 min bei 200×g und 4°C pelletiert. Der Überstand wurde verworfen und das Zellsediment in 100 µl RIPA-Puffer lysiert. Nach Zugabe von 25 µl 6x Laemmli-Puffer wurden die Proben für 5 min bei 95°C aufgeköcht. Es schloss sich eine 15 minütige Inkubation bei 4°C auf dem Schüttler an, um die DNA zu scheren. Zuletzt erfolgte eine Zentrifugation für 10 min bei 15000×g und 4°C. Die Proben konnten daraufhin auf ein Polyacrylamidgel aufgetragen oder bei –20°C gelagert werden.

4.4.2 Auftrennung von Proteinen durch SDS-PAGE nach LAEMMLI

Im elektrischen Feld können Proteine entsprechend ihrer Ladung und Molekülgröße aufgetrennt werden. Unter den denaturierenden Bedingungen der SDS-PAGE, bei der die Eigenladung der Proteine durch das anionische Detergenz SDS überdeckt wird und somit die Proteine eine negative Ladung erhalten, werden diese entsprechend ihrer Molekulargröße aufgetrennt. Sekundär- und Tertiärstruktur sind durch die Auftrennung der Wasserstoffbrücken während des Aufkochens, wie auch durch Trennung der Schwefelbrücken durch den DTT-Anteil des 6x Laemmli-Puffers aufgebrochen (Laemmli, 1970).

Die Acrylamid-Gele bestanden aus einem 5%igen Sammelgel und einem 10%igen Trenngel mit einer Dicke von 1 mm. Die Auftrennung erfolgte in Laufpuffer für Proteingele bei 120 V und maximaler Stromstärke.

| | | |
|-----------------|---------|-----------------------------|
| Sammelgel (5%): | 6,8 ml | dH ₂ O |
| | 1,7 ml | 30% Acrylamid-Lösung |
| | 1,25 ml | 1 M Tris-Puffer (pH 6.8) |
| | 100 µl | 10% SDS (w/v) |
| | 100 µl | 10% Ammoniumpersulfat (w/v) |
| | 20 µl | TEMED |
| Trenngel (10%): | 7,9 ml | dH ₂ O |
| | 6,7 ml | 30% Acrylamid-Lösung |
| | 5,0 ml | 1,5 M Tris-Puffer (pH 8.8) |
| | 250 µl | 10% SDS (w/v) |
| | 125 µl | 10% Ammoniumpersulfat (w/v) |
| | 12,5 µl | TEMED |

4.4.3 Western Blot (Nassblot) nach TOWBIN

Proteine, die durch SDS-PAGE (4.3.2) aufgetrennt worden sind, können spezifisch durch Immunfärbung visualisiert werden. Dazu müssen sie zunächst aus dem Polyacrylamid-Gel auf eine Nitrozellulosemembran (Porengröße 0,45 µm) transferiert werden (Towbin *et al.*, 1979).

Aufbau:

Anoden-Seite

3 Schwämme

2 Lagen Whatman-Papier

Nitrozellulosemembran

Polyacrylamid-Gel

2 Lagen Whatman-Papier

3 Schwämme

Kathoden-Seite

Die Komponenten müssen ausreichend im Western-Blot-Transferpuffer getränkt sein. Beim Aufbau musste darauf geachtet werden, dass keine Luftblasen zwischen Gel und Nitrozellulose entstehen. Der Aufbau wurde in dem Blotmodul fixiert und in die Transferkammer eingesetzt. Der Transfer erfolgte 3 h bei 25 V und maximaler Stromstärke.

4.4.4 Immunfärbung des Blots

Die Membran wurde für 30 min in 5% Milchpulver (in PBS mit 0,1% Tween20) auf einem Schwenkbrett (90 UpM) inkubiert, um freie Proteinbindungsstellen abzusättigen. Danach wurde der proteinspezifische Primärantikörper ebenfalls in 5% Milchpulver verdünnt (je nach Antikörper siehe Tabelle 6) und mit der Nitrozellulosemembran über Nacht bei 4°C rollend im 50 ml Falcongefäß inkubiert. Es folgte dreimaliges kurzes Waschen in PBS/0,1% Tween20 und 15 min in Milch. Diese Waschschrte wurden noch einmal wiederholt und es erfolgte anschließend die Zugabe des in Milch verdünnten speziesspezifischen Zweitantikörpers, der an eine Peroxidase gekoppelt ist, und für eine Stunde bei RT auf dem Schwenkbrett inkubiert wurde. Oben angeführte Waschschrte wurden erneut durchgeführt und abschließend wurde noch einmal für 15 min mit PBS/0,1% Tween20 gewaschen.

Für die Detektion der Proteine wurde das ECL-Verfahren ("Enhanced Chemoluminescence") angewendet. Nach Mischen der Luminol/Enhancer-Lösung und Peroxidlösung des Supersignal West Dura- oder West Femto-Kits von Pierce wurde die Lösung auf die Membran getropft und 5 min inkubiert. Nach Entfernen der überschüssigen Lösung wurde die Membran in Polyethylen-Folie eingeschweißt. Die an den Zweitantikörper gekoppelte Peroxidase setzte das Substrat in einer enzymatischen Reaktion um, was schließlich zu einer Lichtreaktion führte. Das emittierte Licht wurde mit einem Röntgenfilm detektiert (Harlow und Lane, 1988).

4.4.5 Ko-Immunpräzipitation

Der Nachweis von Protein-Protein-Interaktionen kann über die Ko-Immunpräzipitation erfolgen. Hierbei werden Proteine und Proteinkomplexe mit Hilfe von spezifischen Antikörpern durch die Bildung von Antigen-Antikörper-Komplexen über Protein-A-Sepharose präzipitiert. Zu diesem Zweck musste die Protein-A-Sepharose zunächst äquilibriert werden. Hierzu wurden 500 mg der Sepharose in 8 ml Ko-IP-Puffer aufgenommen und in 1 h bei RT rotierend inkubiert. Die gequollene Sepharose wurde nach 3 Waschschritten mit 2 ml Ko-IP-Puffer in einem Volumen Ko-IP-Puffer aufgenommen und konnte in dieser Form für die Präzipitation eingesetzt werden.

Für die Ko-Immunpräzipitation wurden $2 \cdot 10^6$ NCI-H1299 oder HEK-293-Zellen in 10 cm^2 -Zellkulturschalen ausgesät und mit den gewünschten Expressionskonstrukten transfiziert (4.1.2.3.1). Nach einer 48-stündigen Inkubation, in der die Zellen die jeweiligen Proteine exprimierten, wurden die Zellen abgeschabt und in einem 15 ml Falcon 10 min bei 1000 UpM und 4°C abzentrifugiert. Um dem proteolytischen Abbau von Proteinen entgegenzuwirken, wurden alle folgenden Arbeitsschritte bei 4°C durchgeführt. Nach Absaugen des Mediums wurde das Zellpellet in 1 ml eiskaltem Ko-IP-Lysepuffer lysiert, in ein 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt und das Lysat zur Verbesserung des Aufschlusses 5 Mal durch eine Insulinspritze (26 Gauge) gezogen. Ein sich anschließender Zentrifugationsschritt von 15 min bei $10.000 \times g$ pelletierte die bei der Lyse entstandenen Zelltrümer, so dass der Überstand für den nun folgenden Vorreinigungsschritt eingesetzt werden konnte. Im Zuge dieser 1-stündigen Inkubation des Zelllysates mit $50 \mu\text{l}$ Protein-A-Sepharose bei 4°C auf dem Überkopfschüttler wurden alle unspezifischen Proteininteraktionen mit der Sepharose herausfiltriert (Präadsorption). Das Lysat wurde 3 min bei 2000 UpM zentrifugiert und $30 \mu\text{l}$ des Überstandes als Input-Kontrolle entnommen. Diese wurden mit $30 \mu\text{l}$ 6x Laemmli-Puffer vermischt, 5 min bei 95°C aufgekocht und konnten nun bis zur Durchführung der SDS-PAGE (4.4.2) bei -20°C gelagert werden. Das verbliebene Lysat wurde für die Präzipitation mit spezifischen Antikörpern wie auch dem unspezifischen Kontrollantikörper gleichmäßig aufgeteilt und mit jeweils $1 \mu\text{g}$ Antikörper 2 h bei 4°C auf dem Überkopfschüttler inkubiert. Im Anschluss erfolgte die Kopplung der Antigen-Antikörper-Komplexe an die Protein-A-Sepharose ($25 \mu\text{l}$) für 1 h bei 4°C auf dem Überkopfschüttler. Zur Aufreinigung der gebundenen Protein-Komplexe wurde die Sepharose sechs Mal mit $500 \mu\text{l}$ Ko-IP-Puffer gewaschen, wobei zwischen den Waschschritten jeweils ein Zentrifugationsschritt von 2 min bei 3000 Upm lag und der Überstand vorsichtig abgesaugt wurde. Nach dem letzten Waschschrift wurde

das Sepharosepellet in 25 µl 6x Laemmli-Puffer aufgenommen und 5 min bei 95°C aufgeköcht. Um die präzipitierten und ko-präzipitierten Proteine nachzuweisen, wurden die Proteine mittels SDS-PAGE aufgetrennt (4.4.2), über Western Blot auf eine Nitrozellulosemembran transferiert (4.4.3) und mit Antikörpern während der Immunfärbung detektiert (4.4.4).

4.4.6 GST-Pulldown

[Der GST-Pulldown wurde von Antje Dickmanns (Göttingen, GZMB, Abt. Molekulare Onkologie) durchgeführt]

Der GST-Pulldown wird verwendet um *in vitro* Interaktionen zwischen Proteinen nachzuweisen. Dabei wird die Affinität der Glutathion-S-Transferase (GST), welche als Protein-tag mit dem gewünschten Protein fusioniert wird, ausgenutzt, um eine Bindung an Glutathionen-Beads zu erreichen.

Die GST-getaggeted Fusionsproteine Δ Np63 AS 1-290 und AS 81-290 (4.3.10) wurden bakteriell in *E.coli* Rosetta 2; DE3 (Novagene) exprimiert (4.1.1.5). Zur Isolation der Proteine wurden die Bakterien bei 4800 UpM für 15 min abzentrifugiert und die Zellen mit dem GST-Pulldown-Lysepuffer aufgeschlossen. Nach zweimaliger Zentrifugation bei 13000 UpM für jeweils 20 min, um Zelltrümer zu pelletieren, wurde der Überstand für die Kopplung an Glutathionen-Beads verwendet. Die Mengen der GST-Fusionsproteine, wie auch GST alleine als Kontrolle wurden angeglichen und mit 30 µl vorgewaschenen (2x H₂O und 2x KoIP-Puffer) GST beads (Beads:Puffer – 1:2) 1 h inkubiert. Anschließend wurden die Beads vier Mal mit Ko-IP-Puffer gewaschen und zusammen mit den Zelllysaten von H1299-Zellen inkubiert, die 48 h zuvor mit den Expressionskonstrukten pCS2+-HA-mLEF1 oder HA-mLEF1 Δ -HMG transfiziert (4.3.9.1) und mit Ko-IP-Lysepuffer lysiert wurden.

Nach einer 2 stündigen Inkubation bei 4°C folgten 4 Waschschrte mit Ko-IP-Puffer. Zuletzt wurde die Beads in 6x Laemmli-Puffer aufgenommen, aufgeköcht und die gebundenen Protein mittels SDS-PAGE aufgetrennt (4.4.2), gefolgt von einer Immunblotanalyse (4.4.3; 4.4.4).

5 Ergebnisse

5.1 Der Einfluß einer Überexpression des Tumorsuppressorhomologs Δ Np63 α auf die β -Catenin-TCF-vermittelte Transkription im kanonischen Wnt-Signalweg

Δ Np63 α ist die vorwiegend exprimierte p63-Isoform in epithelialem Gewebe, wie Milchdrüsen, Extremitätsknospen, aber auch in Haarfollikeln (Laurikkala *et al.*, 2006; Mills *et al.*, 1999; Yang *et al.*, 1999). Das Expressionsmuster von Δ Np63 α überlappt teilweise mit Geweben, die starke kanonische Wnt-Aktivität aufweisen (Chu *et al.*, 2004; DasGupta und Fuchs, 1999). Daher ist eine mögliche Interferenz des Tumorsuppressorhomologs Δ Np63 α mit dem kanonischen Wnt-Signalweg in Betracht zu ziehen. Im Rahmen dieser Untersuchungen, sollte die beschriebene positive Funktion von Δ Np63 α auf den kanonischen Wnt-Signalweg weiterführend in einem physiologischeren Kontext untersucht werden.

5.1.1 Transiente Überexpression von Δ Np63 α verstärkt die β -Catenin-TCF-vermittelte Aktivierung eines Reporters für den kanonischen Wnt-Signalweg in humanen Zelllinien

Zur Untersuchung des Einflusses von Δ Np63 α auf die β -Catenin-TCF-vermittelte Transkriptionsaktivierung wurden Luziferase-Reporterassays durchgeführt. Hierfür wurden HEK-293 Zellen (humane embryonale Nierenzellen), welche einen intakten kanonischen Wnt-Signalweg aufweisen und nur eine geringe endogene Wnt-Aktivität besitzen (Brunori *et al.*, 2001; Morin *et al.*, 1997), mit Expressionskonstrukten für Δ Np63 α und β -Catenin transfiziert. Zusätzlich wurden Luziferase-Reporterkonstrukte ko-transfiziert, die eine Serie von TCF/LEF-Bindestellen im Promotorbereich des *Firefly*-Luziferasegens tragen. Für das superTOPflash-Konstrukt (pTA-luc-superTOPflash) mit einem TA-Minimalpromotor sind dies acht Bindestellen, für das TOPflash-Konstrukt (pGL3-OT) mit dem *c-fos*-Minimalpromotor drei. Als Kontrolle dienen die jeweiligen Luziferasereporter, bei denen die TCF/LEF-Bindestellen mutiert vorliegen (superFOPflash bzw. FOPflash (pGL3-OF)).

Im ersten Schritt wurde der Einfluss von überexprimiertem Δ Np63 α auf das durch β -Catenin-Überexpression sowie Wnt3a-Behandlung aktivierte superTOPflash/FOPflash-System untersucht.

Die in Abbildung 11A dargestellte Auswertung der normalisierten Luziferaseaktivitäten zeigt, dass die alleinige Überexpression von Δ Np63 α zu einer 50-fach gesteigerten

Reporteraktivität führt. Diese Transaktivierung kann aber im gleichen Ausmaß auch für den superFOPflash-Reporter gemessen werden. Während jedoch die Überexpression von β -Catenin den Reporter 10-fach verstärkt, führt die Kombination aus β -Catenin und Δ Np63 α zu einer über 600-fachen Aktivierung. Dieser kooperative Effekt wurde nicht für den mutierten Kontrollreporter superFOPflash festgestellt.

Die transaktivierende Wirkung von Δ Np63 α wird nicht nur nach β -Catenin-Überexpression sondern auch nach Aktivierung des kanonischen Wnt-Signalwegs durch den Liganden Wnt3a beobachtet. Die Wnt3a-Behandlung steigert die Reporteraktivität 13-fach und wird nach zusätzlicher Δ Np63 α -Überexpression auf das 42-fache weiter erhöht. Eine Kombination aus exogenem β -Catenin und Wnt3a-Behandlung (20-fache Aktivität) kann ebenfalls nochmal um ein 44-faches gesteigert werden, wenn Δ Np63 α koexprimiert wird. Exogenes Δ Np63 α kann die β -Catenin/TCF-vermittelte Aktivierung also im Reportersystem in HEK-293-Zellen verstärken. Diese Beobachtung ist in Übereinstimmung mit den bereits veröffentlichten Ergebnissen von Patturajan *et al.*, 2002, sowie Möritz, 2006.

Um den Mechanismus zu untersuchen, über den dieser Effekt vermittelt wird, wurden die Zelllysate hinsichtlich der β -Catenin-Proteinmenge analysiert (Abbildung 11B). Die Aktivierung des kanonischen Wnt-Signalwegs und die damit einhergehende Transkription β -Catenin-responsiver Gene beruht auf der Stabilisierung von β -Catenin durch Inhibition des β -Catenin-Abbaufunktion, der für die Phosphorylierung von β -Catenin verantwortlich ist und das Protein über diese Phosphorylierungen für den proteasomalen Abbau markiert. Nach Akkumulation des cytoplasmatischen β -Catenin, wird dieses in den Zellkern lokalisiert, assoziiert dort mit den Transkriptionsfaktoren der TCF/LEF-Familie und ermöglicht auf diese Weise die Transkription der Wnt-abhängigen Gene.

Somit ist eine erhöhte Menge an totalem β -Catenin-Protein, genauso wie eine reduzierte Menge an phosphoryliertem β -Catenin, ein Zeichen für den aktivierten Zustand des kanonischen Wnt-Signalwegs.

Die β -Actin-Färbung zeigt, dass vergleichbare Gesamtproteinmengen aufgetragen wurden, die p63-Färbung die starke Überexpression des Δ Np63 α in den jeweiligen Proben.

Während man, wie erwartet, einen deutlichen Anstieg des β -Catenin-Proteins nach Wnt3a-Behandlung erkennt, spiegelt sich ko-exprimiertes β -Catenin erst nach Wnt3a-Zugabe in den etwas erhöhten in den β -Catenin-Leveln wieder.

Die Auswirkungen von Δ Np63 α auf die β -Catenin-Akkumulation sind ebenfalls marginal. Ohne parallele Wnt3a-Behandlung erkennt man nur einen leichten Anstieg der β -Catenin-

Proteinmengen in den Proben, in denen $\Delta Np63\alpha$ transient überexprimiert wurde. Zusammen mit Wnt3a-Behandlung ist diese Steigerung nicht mehr detektierbar.

Vergleicht man die β -Catenin-Mengen der Proben, in denen nur $\Delta Np63\alpha$ und $\Delta Np63\alpha$ zusammen mit β -Catenin ko-exprimiert wurde, wird deutlich, dass die gesteigerte Reporteraktivität in Abbildung 11A nicht allein durch akkumuliertes β -Catenin zu erklären ist. Diese Annahme wird durch die Tatsache verstärkt, dass in den Wnt3a-behandelten Proben die Menge an β -Catenin höher ist als in den $\Delta Np63\alpha$ und β -Catenin transfizierten Zellen, die Transaktivierung jedoch um ein Vielfaches geringer ausfällt.

Dem von Patturajan *et al.*, 2002 beschriebene Einfluss von überexprimierten $\Delta Np63\alpha$ auf die β -Catenin-Proteinmenge kann folglich nicht gänzlich widersprochen werden, als einzige Erklärung für diese starke Transaktivierung kann es jedoch nicht dienen.

Der transaktivierende Effekt von $\Delta Np63\alpha$ auf die β -Catenin/TCF-vermittelte Transkription kann auch in Kombination mit LEF1-Überexpression gezeigt werden (Abbildung 11C). In diesem Ansatz wurde die Aktivität des kanonischen Wnt-Signalwegs mit dem pGI3-OT Reporterkonstrukt gemessen, was zu geringeren totalen Aktivierungen führt. Dennoch ist deutlich zu erkennen, dass die Reporteraktivität durch Überexpression von β -Catenin (5-fach) durch eine Ko-Expression von $\Delta Np63\alpha$ um den Faktor drei gesteigert werden kann (16-fach). In Verbindung mit LEF1 Überexpression sieht man in der Kombination mit $\Delta Np63\alpha$ eine Steigerung von 23- auf 101-fach.

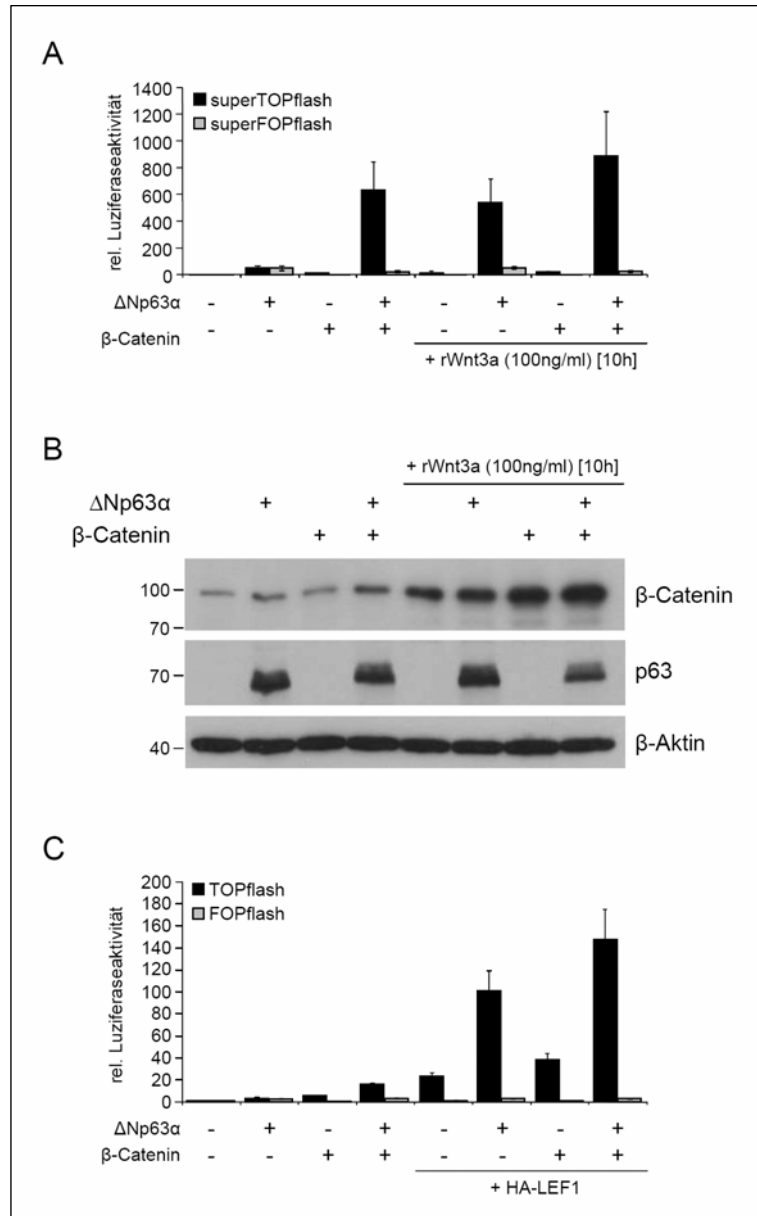


Abbildung 11: Transiente Δ Np63 α Überexpression verstärkt die β -Catenin-TCF/LEF-vermittelte Transkription im Luciferase-Reporterassay

(A) Die Überexpression von Δ Np63 α verstärkt die Aktivität des superTOPflash-Reporters nach Aktivierung des kanonischen Wnt Signalwegs. HEK-293 Zellen wurden mit den oben aufgeführten Expressionskonstrukten transfiziert. Die Menge der transfizierten Plasmide war folgende: pTA-luc-superTOPflash oder FOPflash 200 ng, pRL-*tk* 50 ng, pCneo- β -Catenin 160 ng, pcDNA3- Δ Np63 α 400 ng. Zusätzlich wurde für die Untersuchung des Einflusses von Wnt3a auf den Δ Np63 α -Effekt ein Teil der Zellen 18 h nach Transfektion mit 100 ng/ml rekombinatem Wnt3a Peptid für 10 h behandelt. Im Anschluss an diese Behandlung wurde die Expression der *Firefly*-Luciferase ermittelt und zur *Renilla*-Luciferaseaktivität normalisiert. Dargestellt sind die Mittelwerte aus drei unabhängigen Experimenten mit der jeweiligen Standardabweichung.

(B) Die Zelllysate des Luciferaseassays aus A wurden mittels SDS-PAGE und Immunblot hinsichtlich der Proteinexpression von β -Catenin (92 kDa), Δ Np63 α (70 kDa) und als Ladekontrolle β -Aktin (42 kDa) untersucht.

(C) Δ Np63 α steigert die TOPflash (pGL3-OT) Reporteraktivität durch HA-LEF1 Ko-Expression. HEK-293 Zellen wurden mit den oben aufgeführten Expressionskonstrukten transfiziert. Die DNA-Mengen entsprechen den unter A angegebenen mit dem Zusatz pCS2+-HA-mLEF1 64 ng.

5.1.2 Ko-Expression von $\Delta Np63\alpha$ steigert die LEF1-induzierte Doppelachsenformation in *Xenopus laevis* Embryonen

Zur Unterstützung der Ergebnisse aus den Luziferase-Reporterassays in humanen Zelllinien wurde das *Xenopus* Achsenduplikations-Experiment (4.2.4) herangezogen. Durchgeführt wurde dieser Versuch von Katharina Damianitsch (Göttingen, GZMB, Abt. Entwicklungsbiochemie, Prof. T. Pieler; Damianitsch, 2008)

Dieses System zur Untersuchung von Aktivatoren und Repressoren des kanonischen Wnt-Signalwegs beruht auf der Tatsache, dass die Ausprägung einer zweiten Körperachse während der Entwicklung von *Xenopus laevis* Embryonen von der Aktivität des kanonischen Wnt-Signalwegs abhängig ist (Sokol *et al.*, 1991). Molekular betrachtet ist die Überlappung des TGF- β -Signals am vegetativen Pol des *Xenopus*-Embryos mit der dorsalen Aktivierung des kanonischen Wnt-Signalwegs ausschlaggebend für die Entstehung des Nieuwkoop-Zentrums. Dieses bestimmt die dorso-ventrale Polarität der Blastula. Wird ventral die β -Catenin/TCF-vermittelte Transkription aktiviert, führt dies zur Ausbildung eines zweiten Nieuwkoop-Zentrums, das die Entwicklung einer sekundären Körperachse hervorruft. Auch der so induzierte zweite Spemann-Organisator, der während des späten Blastula bzw. frühen Gastrula-Stadiums des Embryos direkt oberhalb des Nieuwkoop-Zentrums entsteht, ist an der Entstehung dieser zweiten Körperachse beteiligt.

Da bereits in Zellkulturexperimenten ein synergistischer Effekt von $\Delta Np63\alpha$ und der β -Catenin/TCF-vermittelten Transkription gezeigt werden konnte, sollte dies durch das Achsenduplikations-Experiment in einem weiteren System bestätigt werden.

Das durch Dexamethasonbehandlung induzierbare LEF1-GR wurde in Form von mRNA in eine der zwei ventralen Blastomere in einer suboptimalen Dosis injiziert. Dies führte zu einer ektopischen Aktivierung des kanonischen Signalweges und somit in 23% aller injizierten Embryonen zur Ausbildung einer sekundären Körperachse (Abbildung 12A). Die ventrale Ko-Injektion von $\Delta Np63\alpha$ steigerte die Zahl der Achsenduplikationen signifikant ($p < 0,2$) auf 43%, jedoch nur in Verbindung mit aktiviertem LEF1. $\Delta Np63\alpha$ allein, oder in Kombination mit nicht aktiviertem LEF1 ist nicht in der Lage, die Ausbildung einer sekundären Körperachse zu induzieren. Aus diesen Ergebnissen schließen wir, dass die Überexpression von $\Delta Np63\alpha$ auch im Kontext der *Xenopus*-Achsendetermination zu einer Verstärkung des kanonischen Wnt-Signals führt.

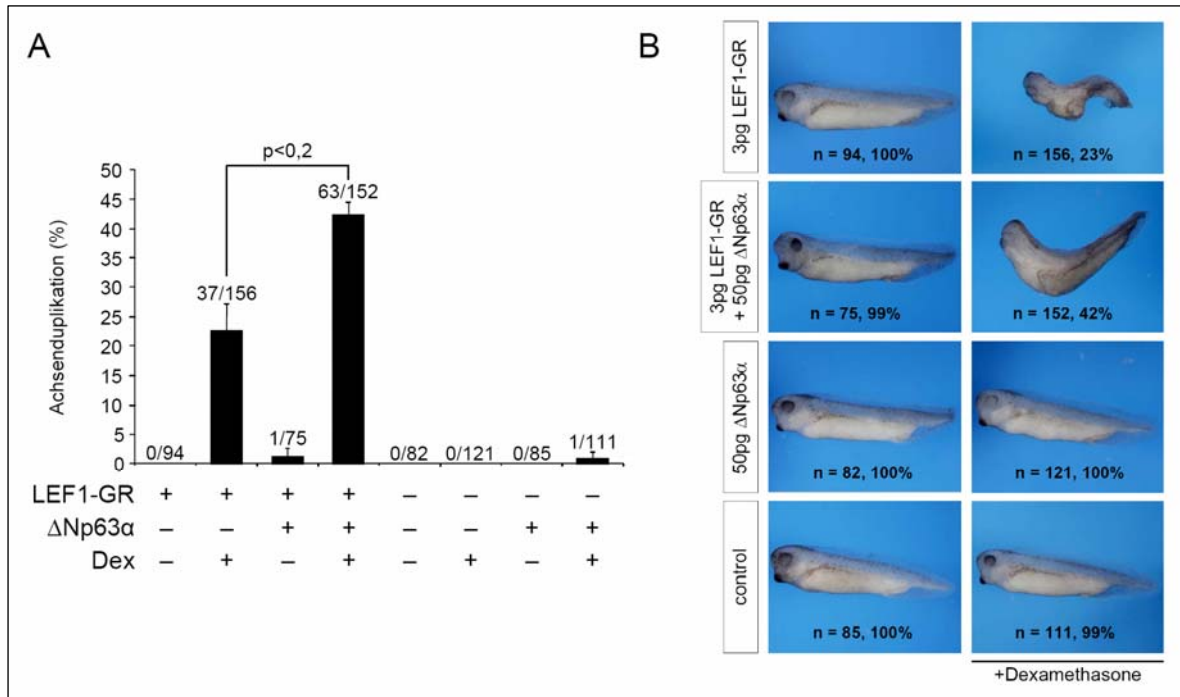


Abbildung 12: Δ Np63 α und LEF1 zeigen einen synergistischen Effekt auf die dorsale Achsenduplikation in *Xenopus laevis* Embryonen [aus Dissertation K. Damianitsch, 2008]

(A) Für den Achsenduplikationsassay wurden 3 pg LEF1-GR, 50 pg Δ Np63 α mRNA, oder eine Kombination beider mRNAs in eine der zwei ventralen Blastomere im 4-Zell-Stadium injiziert. Die LEF1-GR-vermittelte Achsenduplikation wurde mit Dexamethason im 16-Zell-Stadium induziert. Embryonen wurden hinsichtlich ihrer dorsalen Achsenduplikation während des frühen Schwanzknospen-Stadiums ausgewertet. Dargestellt ist der Mittelwert der Achsenduplikation in Prozent (%) aus drei unabhängigen Experimenten mit der jeweiligen Standardabweichung.

(B) Photos der *Xenopus laevis* Embryonen (Stadium 35) zur Dokumentation des unter A zusammengefassten Versuches.

5.1.3 Transiente Überexpression von Δ Np63 α verstärkt die β -Catenin-TCF-vermittelte Reporteraktivierung auch in Zellen mit hohem endogenem Δ Np63 α Proteinlevel

Die Luziferase-Reporterassays wurden in HEK-293-Zellen durchgeführt, die nicht detektierbare endogene p63-Mengen haben. Um den Einfluss von Δ Np63 α auf den kanonischen Wnt-Signalweg in einem physiologischeren Kontext zu untersuchen, wurden 5637-Zellen ausgewählt und der Reporterassays mit den gleichen Bedingungen wie in Abbildung 11A wiederholt. Die 5637-Zelllinie wurde aus einem Blasen-Karzinom etabliert und hat einen epithelialen Charakter mit dem damit verbundenen hohen Leveln an endogenem Δ Np63 α (Lee *et al.*, 2006). Als wichtige Besonderheit ist zu erwähnen, dass diese Zellen keine basale kanonische Wnt-Aktivität aufweisen, sich jedoch sehr gut durch β -Catenin-Überexpression oder Wnt3a-Behandlung aktivieren lassen (Thievessen *et al.*, 2003). Auch in Zellen, die bereits hohe Mengen an endogenem Δ Np63 α enthalten, führt die Überexpression von Δ Np63 α zu einer Transaktivierung des superTOPflash/FOPflash Systems (siehe Abbildung 13). Wie schon in HEK-293-Zellen gesehen, steigert exogenes Δ Np63 α die Aktivität des superTOPflash-Reporters (8-fach) im gleichen Ausmaß wie des superFOPflash-Reporters. Die β -Catenin-Überexpression aktiviert den superTOPflash-Reporter spezifisch (6-fach), zeigt aber in Kombination mit Δ Np63 α eine Steigerung auf das 156-fache.

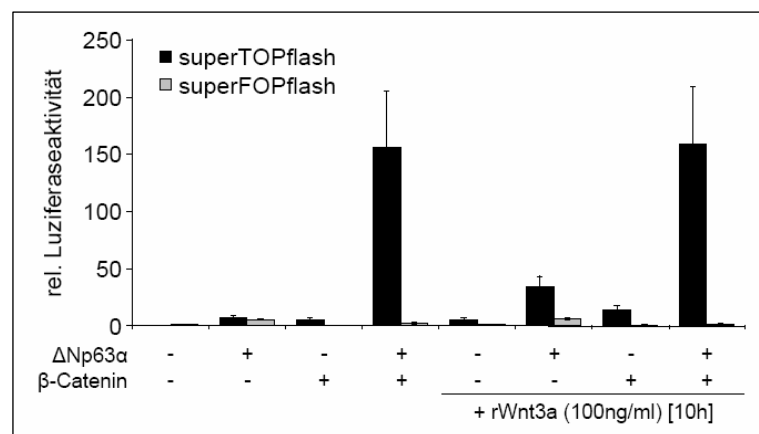


Abbildung 13: Transiente Δ Np63 α Überexpression in 5637-Zellen verstärkt die β -Catenin-LEF1-vermittelte Transkription im Luziferase-Reporterassay

Δ Np63 α verstärkt die superTOPflash Reporteraktivität durch den kanonischen Wnt-Signalweg. 5637-Zellen wurden transfiziert und bearbeitet wie in Abbildung 11A beschrieben.

Auch die Aktivierung des Signalwegs mit rekombinantem Wnt3a (5-fach) kann zusammen mit einer Δ Np63 α -Ko-Expression weiter gesteigert werden (35-fach). Während die Reporteraktivität nach β -Catenin-Expression durch eine Wnt3a-Behandlung verdreifacht werden kann, hat die Wnt3a-Behandlung keinen weiteren Anstieg der Reporteraktivität nach kombinierter β -Catenin/ Δ Np63 α -Überexpression bewirkt. Ein Effekt auf β -Catenin responsive Gene konnte in diesem Überexpressionssystem nicht ermittelt werden (Daten hier nicht gezeigt).

5.2 Der Effekt eines siRNA-vermittelten p63-Knockdowns auf die β -Catenin-TCF-vermittelte Transkription in humanen Zelllinien

Die beobachtete Transaktivierung der β -Catenin-TCF-vermittelten Transkription nach Δ Np63 α -Überexpression in 5637-Zellen zieht die Frage nach sich, ob ein Knockdown des endogenen Δ Np63 α in diesen Zellen, wie erwartet, zu einer Inhibition des kanonischen Wnt-Signalwegs führt. Wirkt Δ Np63 α als direkter positiver Kofaktor für die Wnt-abhängige Transkription, müsste das Entfernen von Δ Np63 α in 5637-Zellen nach Aktivierung des Signalwegs mit einer reduzierten Aktivität einhergehen. Diese Fragestellung wurde sowohl im Luziferase-Reportersystem als auch auf Basis der Transkription von β -Catenin-responsiven Genen untersucht.

5.2.1 SiRNA Knockdown von Δ Np63 α verstärkt die β -Catenin-TCF-vermittelte Reporteraktivierung in humanen Zelllinien mit endogenem Δ Np63 α

In 5637-Zellen, in denen zuvor gezeigt werden konnte, dass eine Δ Np63 α -Überexpression einen transaktivierenden Effekt auf das TOPflash/FOPflash Reportersystem hat, wurden Luziferase-Reporterassays in Abhängigkeit eines p63 Knockdowns durchgeführt. Da die parallele Transfektion von Plasmid-DNA und siRNA-Oligonukleotiden zu artifiziellen Nebeneffekten führen kann, wurde die siRNA-Transfektion 24 h vor der Transfektion der Reporterkonstrukte vorgenommen.

Neben der Kontroll-siRNA und einer p63 siRNA, welche in der die zentrale DNA-Bindedomäne des p63-Proteins kodierenden mRNA-Regionen bindet und somit den Knockdown aller 6 Isoformen vermittelt (Carroll *et al.*, 2006), wurde auch eine siRNA gegen β -Catenin eingesetzt (Verma *et al.*, 2003). Da, wie bereits oben beschrieben, 5637-Zellen keine basale kanonische Wnt-Aktivität aufweisen, wurde ein Teil der Zellen für diesen Versuch mit rekombinantem Wnt3a für 10 h behandelt. Betrachtet man die

relativen Luziferaseaktivitäten dieser Wnt3a-behandelten Proben, so sieht man deutlich, dass der Knockdown von β -Catenin die Expression der Luziferase fast vollständig unterbindet.

Der Knockdown des endogenen Δ Np63 α Proteins führt jedoch nicht zur Inhibition sondern ganz im Gegenteil zu einer 4-fachen Steigerung der Wnt3a-vermittelten Reporteraktivität im Vergleich zur Kontroll-siRNA (Abbildung 14). Dieses Resultat steht im kompletten Gegensatz zu dem erwarteten Effekt nach den vorherigen Ergebnissen aus Überexpressionsversuchen.

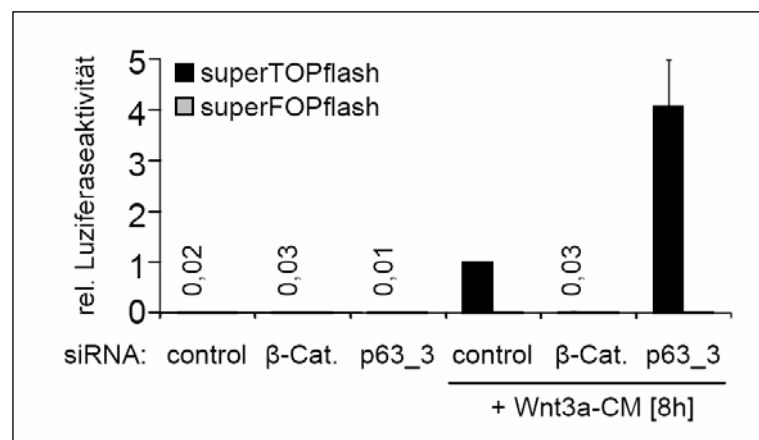


Abbildung 14: Der Knockdown von Δ Np63 α führt ebenfalls zu einer Verstärkung der β -Catenin-LEF1-vermittelte Transkription in 5637-Zellen ohne Einfluss auf β -Catenin Proteinlevel und Phosphorylierung

Knockdown von endogenem Δ Np63 α in 5637-Zellen verstärkt die superTOPflash Reporteraktivität durch den kanonischen Wnt-Signalweg. 5637-Zellen wurden revers mit den aufgeführten siRNAs (100 nM) transfiziert. Nach 24 h wurden im zweiten Transfektionsschritt die Luziferasereporter pTA-luc-superTOPflash oder FOPflash *Firefly* Luziferasereporter (1000 ng) und der *Renilla* Luziferasereporter pRL-*tk* (200 ng) transfiziert. Zusätzlich wurden die markierten Zellen 16 h später mit Wnt3a-konditioniertem Medium für 8 h behandelt. Dargestellt sind die Mittelwerte der normalisierten *Firefly*-Luziferaseaktivität aus drei unabhängigen Experimenten mit der jeweiligen Standardabweichung.

5.2.2 Der Knockdown von p63 führt zur gesteigerten Transkription von β -Catenin-responsiven Genen

Das Ergebnis aus dem p63-Knockdown Experiment im Rahmen von Luziferase-Reporterassays war unerwartet. Da jedoch eine Reporterexpression aufgrund der Plasmidstruktur anderen Regulationsmechanismen unterliegen kann, als es für die Expression responsiver Gene gültig ist, sollte untersucht werden, in wieweit auch β -Catenin-responsive Gene mit einer gesteigerten Transkriptionsaktivität auf den p63-Knockdown reagieren. Desweiteren wurde auch eine zusätzliche siRNA ausgewählt, um unspezifische Effekte auszuschließen. Zu diesem Zweck wurden zunächst die Knockdowneffizienzen verschiedener bereits veröffentlichter p63-siRNAs in 5637-Zellen ausgetestet. Alle 6 getesteten siRNAs binden entweder innerhalb oder kurz hinter der die zentrale DNA-Bindedomäne kodierende mRNA-Region und ermöglichen so den Knockdown aller p63-Isoformen, da dieser Bereich allen Isoformen gemeinsam ist. In Abbildung 15A sind die unterschiedlichen Bindungsstellen der siRNAs innerhalb der p63 mRNA dargestellt. Die 5637-Zellen wurden revers mit 100 nM einer Kontroll-siRNA sowie mit den fünf verschiedenen p63-siRNAs transfiziert und nach 48 h hinsichtlich ihrer p63-Proteinlevel untersucht (Abbildung 15B). Deutlich zu sehen ist, dass die Knockdown-Effizienzen der siRNAs p63_1, _3 und _4 am stärksten sind, während p63_2 und _5 die p63-Mengen schwächer reduzieren. Untersuchungen zur Spezifität der p63-siRNAs zeigen, dass weder die β -Catenin noch die p53-Proteinmengen durch die Behandlung mit den aufgeführten p63-siRNAs beeinflusst wurden. Vor diesem Hintergrund wurden die siRNAs p63_3 und p63_4 für die Untersuchung der β -Catenin responsiven Gene ausgewählt.

Als Wnt-abhängige Gene wurden *Axin2*, *MMP7* sowie *LEF1* analysiert.

Axin2 ist als stark responsives Wnt-abhängiges Gen bekannt (Jho *et al.*, 2002; Lustig *et al.*, 2002; Yan *et al.*, 2001) und fungiert wie sein Wnt-unabhängiges Ortholog Axin als negativer Regulator des kanonischen Wnt-Signalwegs, indem es an der Phosphorylierung und somit dem Abbau von β -Catenin beteiligt ist (Behrens, 1998; Ikeda *et al.*, 1998; Kishida *et al.*, 1999; Kishida *et al.*, 1998; Yamamoto *et al.*, 1998; Zeng *et al.*, 1997). Neben dieser Funktion wird postuliert, dass *Axin2* eine wichtige Rolle bei der Epithelial-Mesenchymalen Transition (EMT) spielt (Yook *et al.*, 2006). Hier reguliert es in Brustkrebszellen die Aktivität der nukleären GSK3 β -Kinase, welche für die Stabilität des Zink-Finger-Transkriptionsfaktors Snail1 – einem EMT-Induktor - verantwortlich ist. Diese

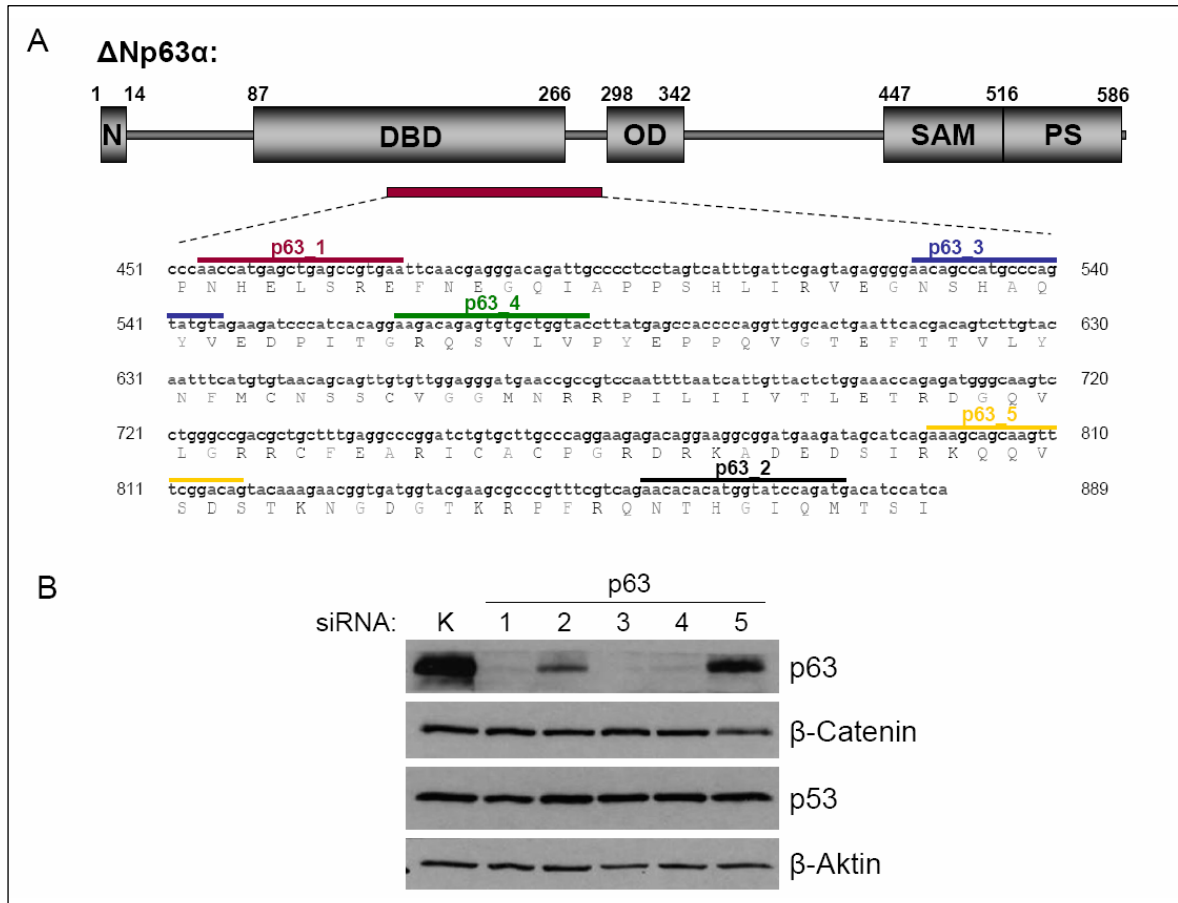


Abbildung 15: Auswahl einer zusätzlichen siRNAs für weitere p63-Knockdown-Experimente

(A) Alle 5 getesteten p63-siRNAs binden die mRNA innerhalb der DNA-Bindedomäne bzw. kurz dahinter und ermöglichen so den Knockdown aller p63-Isoformen. Dargestellt ist neben der Proteinstruktur auch der Bereich, in dem die verschiedenen siRNAs (roter Balken) binden und den Knockdown vermitteln. N: ΔN-spezifische Domäne, DBD: DNA-Bindedomäne, OD: Oligomerisierungsdomäne, SAM: Steriles-α-Motiv, PS: Post-SAM-Domäne.

(B) 5637-Zellen wurden revers mit den aufgeführten siRNAs (100 nM) transfiziert. Nach 48 h wurden die Zellen in RIPA geerntet. Die Proteine des Zelllysats wurden mittels SDS-PAGE und Immunblot hinsichtlich der Expression von ΔNp63α (70k Da), β-Catenin (92 kDa), p53 (55 kDa) und als Ladekontrolle β-Aktin (42k Da) untersucht.

Funktion unterstützt die beschriebene Bedeutung des kanonischen Wnt-Signalwegs während der Tumorprogression und -invasion.

Auch MMP7 spielt als Matrix-Metalloproteinase (MMP) eine Rolle in der Tumorprogression. Durch die über MMP-7-vermittelte proteolytische Spaltung der Substrate der extrazellulären Matrix fördert es die Invasion von Tumorzellen (Adachi *et al.*, 1999; Tan *et al.*, 2005). Neben dieser proteolytischen Funktion verstärkt MMP-7 die Tumorinvasion auch durch Aktivierung weiterer MMPs (Wang *et al.*, 2006; Wang *et al.*, 2005); wie auch durch die Abspaltung der E-Cadherin Ectodomäne und der daraus resultierenden Auflösung der Zell-Zell-Kontakte (Noe *et al.*, 2001). Die Responsivität von

MMP-7 zu β -Catenin wurde im Jahr 1999 von Brabletz *et al.* sowie Crawford *et al.* beschrieben.

LEF1 als Transkriptionsfaktor des kanonischen Wnt-Signalwegs gilt als positiver Regulator und wird ebenfalls Wnt-abhängig reguliert (Filali *et al.*, 2002; Hovanes *et al.*, 2001).

Um einen positiven oder negativen Einfluss von Δ Np63 α auf die responsiven Gene des kanonischen Wnt-Signalwegs zu untersuchen, musste in 5637-Zellen der Signalweg zuvor mit Wnt3a induziert werden. Hierfür wurde Wnt3a-konditioniertes Medium (4.1.2.4) verwendet. Die in Abbildung 16 dargestellten relativen mRNA-Level sind zu den mRNA-Mengen des Housekeeping-Gens 36B4 normalisiert.

In Übereinstimmung mit den bereits veröffentlichten Ergebnissen bewirkte die Wnt3a-Behandlung einen Anstieg der mRNA-Mengen für Axin2 (14-fach), MMP-7 (4-fach) und LEF1 (4-fach).

Der Knockdown von Δ Np63 α hat in Kombination mit einer Wnt3a-Behandlung einen weiteren Anstieg der Axin2 mRNA-Level zur Folge. Dieser liegt für beide p63-siRNAs im Rahmen von 6-12-fach, abhängig von der Knockdowneffizienz der jeweiligen siRNA.

Auch die Wnt3a-vermittelte Aktivierung der anderen untersuchten Gene MMP-7 und LEF1 wurde durch den p63-Knockdown weiter gesteigert, wenn auch nicht in dem Ausmaß, wie es für Axin2 zu beobachten war. Für MMP-7 stieg das mRNA Level auf das 1,8 bis 2,5-fache, für LEF1 wurde ein 1,4-facher Anstieg gegenüber der nur Wnt3a-behandelten Probe verzeichnet. Der Knockdown von Δ Np63 α durch die verwendeten siRNAs reduzierte die p63 mRNA-Level auf zwischen 20 und 40%, die geringe Variation der β -Catenin mRNA-Level ist ebenfalls dargestellt.

Diese Ergebnisse lassen die Vermutung zu, dass endogenes Δ Np63 α nicht als positiver Ko-Faktor, sondern als Repressor des kanonischen Wnt-Signalwegs fungiert.

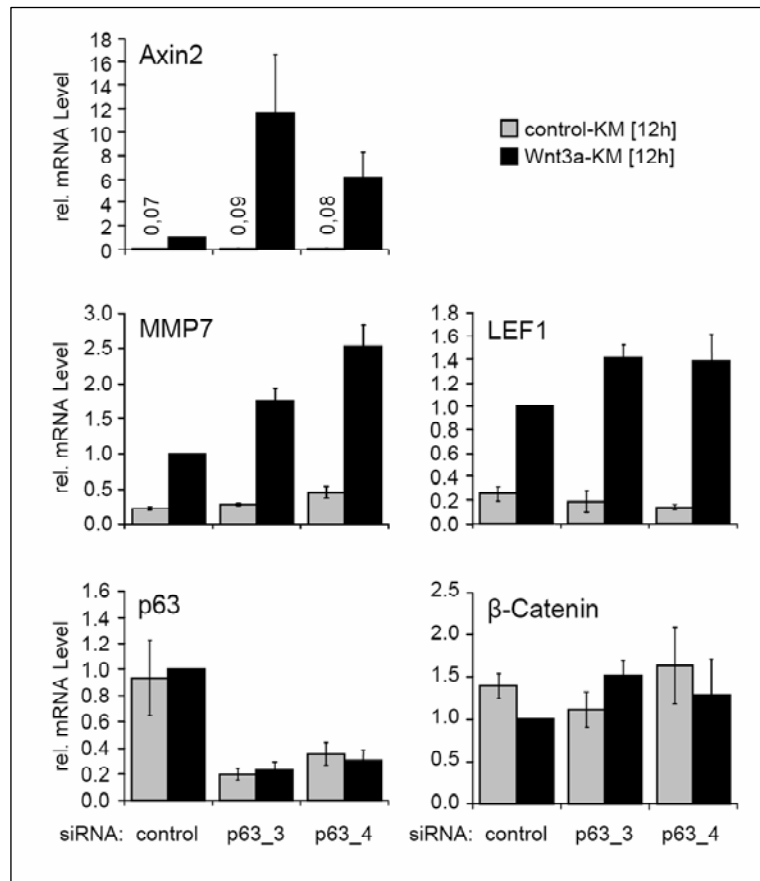


Abbildung 16: Der Knockdown von endogenem Δ Np63 α steigert die mRNA-Level von β -Catenin-responsiven Genen in der quantitativen PCR-Analyse

5637-Zellen wurden revers mit den aufgeführten siRNAs (100 nM) transfiziert und 36 h nach Transfektion mit Kontroll- oder Wnt3a-konditioniertem Medium für 12 h behandelt. Die quantitativ ausgewerteten mRNA Mengen der untersuchten Gene wurden zu den mRNA Leveln des Housekeeping-Gens 36B4 normalisiert. Dargestellt ist der Mittelwert aus drei unabhängigen Experimenten mit der jeweiligen Standardabweichung.

5.2.3 Die β -Catenin Proteinmengen und der Phosphorylierungsstatus werden durch den p63-Knockdown nicht beeinflusst

Im Rahmen von Überexpressionsversuchen wurde in Patturajan et al, 2002 die Rolle von Δ Np63 α im kanonischen Wnt-Signalweg in der Inhibition von GSK3 β , der daraus resultierenden Stabilisierung von β -Catenin und der damit verbundenen Aktivierung der Signalkaskade begründet. Dieser Stabilisierungseffekt wurde im kleinen Ausmaß auch im Kontext dieser Ausarbeitung (siehe 5.1.1) beobachtet. Da jedoch auch der Knockdown von Δ Np63 α zu einer Transaktivierung der β -Catenin-vermittelten Transkription führt, stellt sich die Frage, in wie weit reduzierte Δ Np63 α -Mengen ebenfalls einen Einfluss auf die Stabilisierung von β -Catenin haben. Zu diesem Zweck wurden 5637-Zellen mit siRNAs gegen p63 und β -Catenin transfiziert und für 0, 4 und 12 h mit Wnt3a-konditioniertem Medium behandelt (Abbildung 17). Die im Anschluss folgende Untersuchung der β -Catenin-Proteinmenge wie auch des Phosphorylierungsstatus zeigte, wie erwartet, dass die Wnt3a-Behandlung bereits nach 4 Stunden zu einem starken Abfall der β -Catenin-Phosphorylierung an den Positionen Ser33/37 und Thr41 führt; ein Anstieg der Gesamt- β -Catenin-Menge war nach 12 stündiger Wnt3a-Behandlung zu verzeichnen. Ein Einfluss des p63-Knockdowns auf die Stabilisierung von β -Catenin war trotz ausgeprägter Knockdowneffizienzen nicht zu verzeichnen. Dies lässt vermuten, dass der Mechanismus der Δ Np63 α -Knockdown-vermittelten Transaktivierung nicht über eine Regulation der GSK3 β -Aktivität funktioniert.

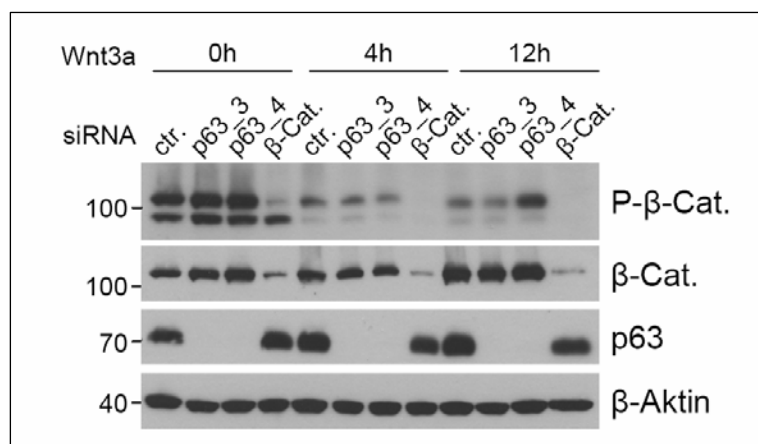


Abbildung 17: Knockdown von Δ Np63 α in 5637-Zellen hat keine Auswirkung auf β -Catenin Proteinlevel und Phosphorylierungsstatus.

5637-Zellen wurden revers mit den aufgeführten siRNAs (100 nM) transfiziert. Nach 24 h wurden die Zellen mit Wnt3a konditioniertem Medium behandelt und nach 0 h, 4 h und 12 h in RIPA geerntet. Die Proteine des Zelllysats wurden mittels SDS-PAGE und Immunblot hinsichtlich der Expression von Phospho- β -Catenin (92 kDa), β -Catenin (92 kDa), Δ Np63 α (70k Da) und als Ladekontrolle β -Aktin (42k Da) untersucht.

5.3 Δ Np63 α interagiert mit den TCF/LEF Transkriptionsfaktoren

Zur Klärung des Mechanismus, über den Δ Np63 α sowohl nach Überexpression als auch nach Knockdown positiv auf den kanonischen Wnt-Signalweg einwirkt, wurde überlegt, inwiefern eine Interaktion zwischen Δ Np63 α und einer der Komponenten des Signalwegs hier eine Rolle spielen könnte. Patturajan *et al.* konnten in nukleären Lysaten von HNSCC 013 Zellen (head and neck squamous cell carcinoma) eine Interaktion zwischen endogenem β -Catenin und endogenem Δ Np63 α nachweisen (Patturajan *et al.*, 2002). In ihrer Dissertation, 2007 konnte Dr. Constanze Möritz diese Interaktion nicht bestätigen, zeigte jedoch, dass TCF-4, ein Transkriptionsfaktor aus der TCF/LEF-Familie, mit Δ Np63 α interagieren kann. Diese Bindung von Δ Np63 α an TCF-4 interferierte nicht mit der β -Catenin-Assoziation an TCF-4, wie mit einer Ko-Immünpräzipitation gezeigt werden konnte. Dieses wurde zudem durch den Einsatz von N-terminal deletiertem TCF-4 (Δ NTCF-4) bestätigt. Die Deletionsmutante, der die ersten 30 Aminosäuren fehlen, ist nicht mehr in der Lage, mit β -Catenin zu interagieren (Korinek *et al.*, 1997). Sie zeigte aber weiterhin eine Bindung an Δ Np63 α , was unterschiedliche Interaktionsdomänen von β -Catenin und Δ Np63 α an TCF-4 nahe legt.

Ob diese Interaktion spezifisch nur mit dem Transkriptionsfaktor TCF-4 stattfindet, welche Domänen innerhalb dieser beiden Transkriptionsfaktoren diese Assoziation vermitteln, und ob diese Erkenntnisse einen Hinweis auf den Transaktivierungsmechanismus geben, sollte im Folgenden untersucht werden.

5.3.1 Δ Np63 α interagiert mit allen TCF/LEF Transkriptionsfaktoren

Neben dem bereits untersuchten TCF-4 wurden auch die anderen Mitglieder dieser Transkriptionsfaktorfamilie hinsichtlich ihrer Interaktion mit Δ Np63 α analysiert. Die Ko-Immünpräzipitation wurde von Cathrin Hippel (Göttingen, GZMB, Abt. Molekulare Onkologie) durchgeführt. H1299-Zellen wurden mit Expressionsplasmiden für HA-Epitop-getagtes TCF-1B, TCF-1E, LEF1, TCF-3 und TCF-4 zusammen mit Δ Np63 α transfiziert. Aufgrund unterschiedlicher Expressionsintensitäten wurden die DNA-Mengen für die einzelnen TCF/LEF-Faktoren so angepasst, dass vergleichbare Proteinmengen exprimiert wurden. Diese lagen bei:

TCF-1B (4) : TCF-1E (1) : LEF1 (6) : TCF-3 (1) : TCF-4 (5)

Auch ein Ansatz mit Δ Np63 α ohne Ko-Transfektion eines TCF/LEF-Transkriptionsfaktors wurde mit einbezogen, um die Spezifität der Präzipitationsmethode zu belegen. Zusätzlich wurde zur Kontrolle der Transfektionseffizienz das GFP-exprimierende Konstrukt in

einheitlicher Menge ko-transfiziert. Nach 48-stündiger Inkubation in der die Zellen die gewünschten Proteine exprimierten, wurden diese lysiert und nach Abnahme einer Input-Probe die HA-getaggten TCF/LEF-Proteine einschließlich ihrer Bindungspartner mit dem HA-Antikörper präzipitiert. Mit der gleichen Menge Lysat wurde auch eine Kontrollpräzipitation durchgeführt, in der ein unspezifischer Antikörper gegen das Protein β -Galaktosidase des Bakteriums *E.coli* eingesetzt wurde. Nach der Elution aller präzipitierten und kopräzipitierten Proteine, wurden diese sowie die Inputproben mittels SDS-PAGE aufgetrennt und über Immunfärbung mit spezifischen Antikörpern detektiert. Die Ergebnisse dieser Ko-Immünpräzipitation sind in Abbildung 18 dargestellt.

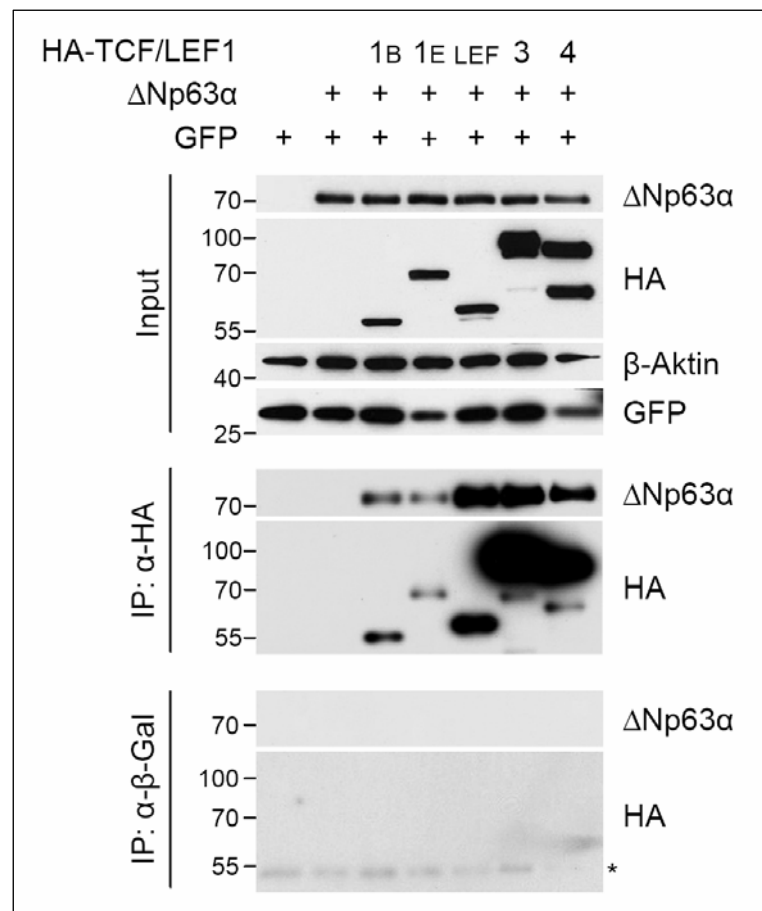


Abbildung 18: Δ Np63 α interagiert mit allen Transkriptionsfaktoren der TCF/LEF Familie im Ko-Immünpräzipitationsexperiment

5×10^5 NCI-H1299 Zellen pro Probe wurden mit Expressionkonstrukten für pCS2+-HA-getaggtm mTCF-1B (6,1 μ g), mTCF-1E (1,5 μ g), mLEF1 (9,2 μ g), mTCF-3 (1,5 μ g) oder hTCF-4 (7,6 μ g) transfiziert um vergleichbare Proteinmengen zu erhalten. Desweiteren wurde pcDNA3- Δ Np63 α (9,2 μ g) und pCAGGS-GFP (0,9 μ g) ko-transfiziert

Nach Durchführung der Präzipitation mit dem HA-Antikörper und als Kontrollpräzipitation mit dem β -Gal Antikörper wurden die Lysate mittels SDS-PAGE aufgetrennt und einer Immunblot Analyse hinsichtlich der präzipitierten und ko-präzipitierten Proteine unterzogen. Die β -Aktin-Färbung dient als Ladekontrolle, während die GFP-Färbung eine Kontrolle für vergleichbare Transfektionseffizienzen ist. Das Signal der mit Sternchen markierten Bande stammt von der schweren Kette des zur Präzipitation verwendeten Antikörpers.

Die Immunfärbungen der Inputproben zeigen eine gleichmäßige Expression des $\Delta Np63\alpha$ Proteins und die Expressionen der verschiedenen TCF/LEF-Transkriptionsfaktoren. Die Detektion mehrerer Banden für TCF-3 und TCF-4 rührt von Isoformen dieser Transkriptionsfaktoren her, die unterschiedliche Proteingrößen aufweisen (Shiina *et al.*, 2003). Desweiteren dient die β -Aktin-Färbung als Ladekontrolle und die Färbung des ko-exprimierten GFP zur Dokumentation der Transfektionseffizienz. Diese ist für TCF-1E und TCF-4 zwar reduziert, aber da die Expressionsmengen von $\Delta Np63\alpha$ diesem Effekt nicht folgen, liegt vermutlich keine generelle Transkriptionsrepression ko-transfizierter Plasmide nach TCF-1E und TCF-4 Transfektion vor.

Die Präzipitation der HA-getaggtten TCF/LEF-Proteine ist im mittleren Teil der Abbildung 18 (IP: α -HA) zu erkennen. Deutlich sieht man nach HA-Immunfärbung, dass alle TCF/LEF-Familienmitglieder erfolgreich präzipitiert wurden, die Mengen an präzipitiertem Protein sich jedoch stärker unterscheiden als noch in den Inputkontrollen. Unabhängig von diesen Unterschieden ist durch die Immunfärbung mit dem α -p63-Antikörper klar zu erkennen, dass $\Delta Np63\alpha$ zusammen mit jedem Mitglied der TCF/LEF-Familie spezifisch präzipitiert werden kann. Die Menge an kopräzipitiertem Protein unterscheidet sich jedoch stark von dem TCF/LEF Familienmitglied, mit welchem präzipitiert wurde, wobei diese Beobachtung nicht allein mit den Expressionsunterschieden der TCF/LEFs erklärt werden kann. Während geringere Mengen an TCF-1B und 1E auch geringere Mengen an $\Delta Np63\alpha$ kopräzipitieren, können TCF-3 und -4 in hohen Mengen präzipitiert werden und kopräzipitieren auch mehr $\Delta Np63\alpha$. LEF1 hingegen, welches deutlich schwächer präzipitiert wird als TCF-3 und -4, ist trotzdem in der Lage vergleichbare $\Delta Np63\alpha$ -Mengen zu kopräzipitieren. Diese Beobachtung könnte mit unterschiedlichen Aminosäuresequenzen der interagierenden Domänen erklärt werden.

Bei der Kontrollprobe ohne ko-exprimierte HA-TCF/LEF-Proteine hingegen wird kein $\Delta Np63\alpha$ -Signal detektiert. Auch die Kontrollpräzipitation mit dem Antikörper gegen β -Galaktosidase (unterer Bereich der Abbildung 18) zeigt, dass weder die HA-getaggtten TCF/LEFs noch das $\Delta Np63\alpha$ -Protein unspezifisch präzipitiert wird. Dies lässt die Schlussfolgerung zu, dass alle TCF/LEF-Transkriptionsfaktoren spezifisch einen Komplex mit $\Delta Np63\alpha$ ausbilden können, dieses aber mit unterschiedlichen Effizienzen stattfindet.

5.3.2 Quantitative Analyse der LEF1- Δ Np63 α -Interaktion

Die Interaktion von Δ Np63 α mit den Mitgliedern der TCF/LEF-Familie sollte quantitativ analysiert werden. Hierfür wurde der Transkriptionsfaktor LEF1 ausgewählt, da dieser abhängig von seiner eigenen Expression das stärkste Potential zur Komplexbildung mit Δ Np63 α gezeigt hat.

Hierfür wurden H1299-Zellen mit einer Kombination der Expressionskonstrukte für HA-LEF1 und Δ Np63 α transfiziert, eine Präzipitation mit einem Antikörper gegen das HA-Epitop, sowie eine β -Galaktosidase-Kontrollpräzipitation durchgeführt und die präzipitierten und kopräzipitierten Proteine im Immunoblot untersucht. Aufgetragen wurde neben 1% der Inputprobe auch 1% des Überstandes nach der Präzipitationsreaktion, sowie 10% und 100% des Präzipitats.

Eine Färbung der Membran mit dem α -HA-Antikörper zeigt, dass deutlich mehr als 10% des exprimierten HA-LEF1 aus dem Lysat gebunden werden konnten. Die Menge an kopräzipitierten Δ Np63 α liegt bei 1% des Gesamtproteins aus dem Lysat.

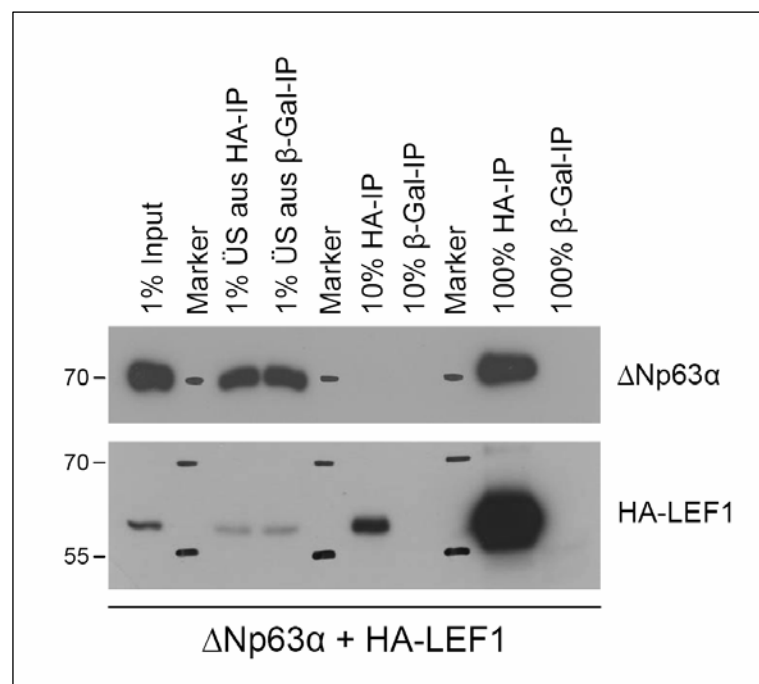


Abbildung 19: Quantitative Analyse der Ko-Immünpräzipitation

NCI-H1299-Zellen wurden mit Expressionskonstrukten für pCS2+-HA-mLEF1 (9,2 μ g) und pcDNA3- Δ Np63 α (9,2 μ g) transfiziert. Nach Präzipitation mit dem HA-Antikörper und dem β -Gal Antikörper wurden die Lysate mittels SDS-PAGE aufgetrennt und einer Immunoblot Analyse hinsichtlich der präzipitierten und ko-präzipitierten Proteine unterzogen. Aufgetragen wurde neben 1% Input auch 1% der Überstände nach der Präzipitationsreaktion, wie auch 10% und 100% des präzipitierten Materials.

5.3.3 Die HMG-Domäne innerhalb des LEF1-Proteins ist notwendig für die Interaktion mit Δ Np63 α

Sowohl Δ Np63 α als auch die TCF/LEF Proteine sind Transkriptionsfaktoren, die über eine Promotorbindung ihre Transkriptionsaktivierung vermitteln. Zur Ergründung des Mechanismus, über den eine Interaktion dieser Transkriptionsfaktoren einen Einfluss auf die Aktivität des kanonischen Wnt-Signalwegs hat, wäre es von Bedeutung, die interagierenden Domänen zu determinieren. In ihrer Dissertation konnte Constanze Möritz (Möritz, 2006) die β -Catenin-bindende Region innerhalb des TCF-4 Proteins als mögliche Interaktionsdomäne ausschließen, da das Δ NTCF-4 Konstrukt, in welchem die ersten 30 Aminosäuren deletiert sind, weiterhin mit Δ Np63 α einen Komplex ausgebildet hat. Da diese Domäne innerhalb der TCF/LEF Familie eine gewisse Homologie aufweist (siehe Abbildung 20) und gezeigt werden konnte, dass alle Mitglieder der TCF/LEF-Transkriptionsfaktoren mit Δ Np63 α interagieren (5.3.1), lässt dieses Ergebnis vermuten, dass die N-terminale β -Catenin-bindende Domäne (Behrens *et al.*, 1996; Huber *et al.*, 1996) nicht für die Ausbildung der Interaktion notwendig ist. Zum anderen wird dadurch deutlich, dass die TCF/LEF-Proteine parallel eine Bindung mit β -Catenin und Δ Np63 α ausbilden können. Möritz konnte auch diese Vermutung bestätigen, indem sie gezeigt hat, dass die Interaktion von TCF-4 mit β -Catenin nicht durch eine zusätzliche Ko-Expression von und damit verbundene Interaktion mit Δ Np63 α beeinflusst wird.

Als weitere stark konservierte Domäne innerhalb der TCF/LEF Familie existiert die HMG-Domäne. Diese „high mobility group“ ist für die Interaktion der Proteine mit dem Chromatin verantwortlich (Giese *et al.*, 1991; Grosschedl *et al.*, 1994).

Da die Aminosäurehomologie der HMG-Box innerhalb der humanen und murinen TCF/LEF-Proteine zwischen 94% und 99% liegt (siehe Abbildung 20A), wurde diese Domäne hinsichtlich ihrer Notwendigkeit für die Interaktion mit Δ Np63 α untersucht. Aus diesem Grund wurde die HMG-Domäne innerhalb des LEF1-Proteins mittels ortsgerechter Mutagenese deletiert. Die Deletion umfasste die Aminosäuren 295-320 und so ebenfalls das innerhalb der HMG-Domäne lokalisierte nukleäre Lokalisationssignal (NLS). Diese HA-LEF1 Δ HMG-Mutante wurde in der Ko-Immunpräzipitation bezüglich ihrer Fähigkeit Δ Np63 α zu binden analysiert.

Die in Abbildung 21 dargestellten Ergebnisse der Inputproben zeigen, dass die Δ Np63 α Expression gleichmäßig als alleinige Expression, sowie als Ko-Expression mit HA-LEF1 und HA-LEF1 Δ HMG stattgefunden hat.

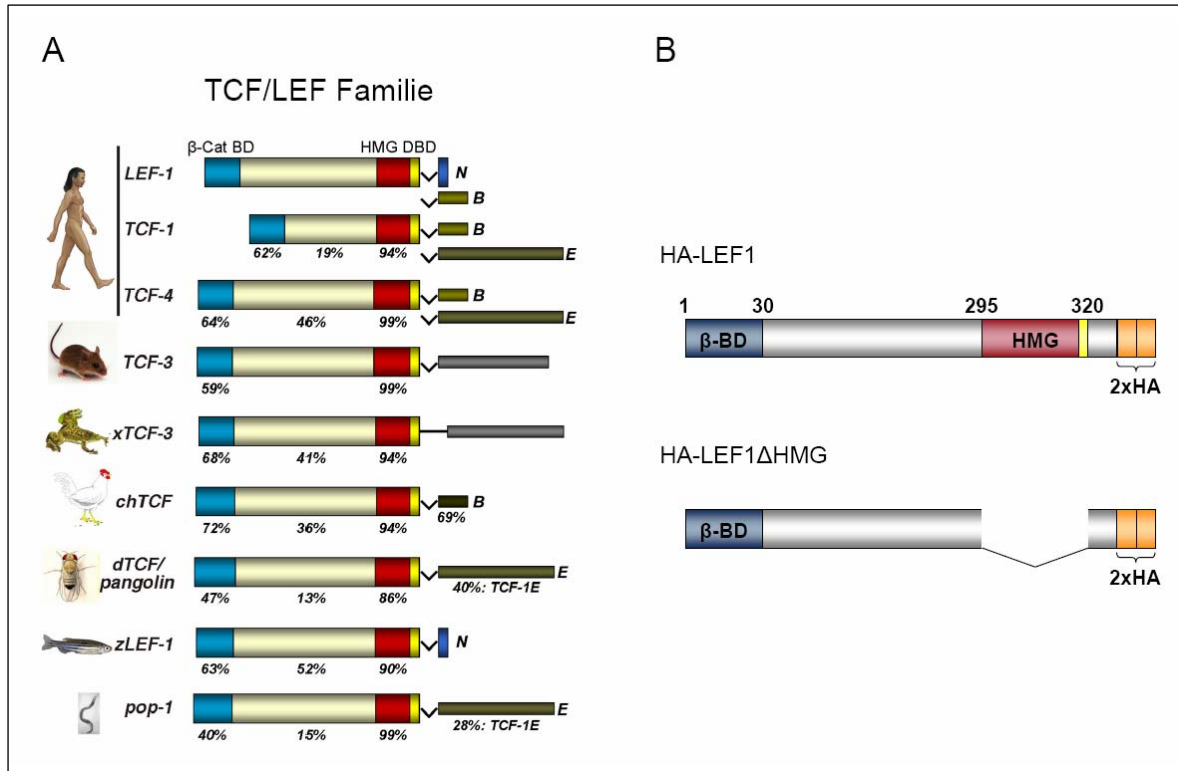


Abbildung 20: Die Familie der TCF/LEF-Transkriptionsfaktoren und ihre Domänenstruktur

(A) Die Domänenstruktur der Transkriptionsfaktoren der TCF/LEF-Familie. Dargestellt sind die Orthologen verschiedener Organismen, wie zum Beispiel homo sapiens, mus musculus, aber auch Drosophila melanogaster. Die hellblau markierte β -Catenin Bindedomäne (β -Cat BD) liegt N-Terminal und zeigt Homologien zum humanen LEF1 zwischen 40% und 72% auf. Die zentrale HMG-DNA-Bindedomäne (HMG DBD) ist rot dargestellt und liegt im Vergleich zu LEF1 bei 86% bis 99% Homologie. Der dazwischen liegende Bereich ist nicht so stark konserviert und ist zu 13-52% homolog. Gelb hervorgehoben ist das nukleäre Lokalisationssignal, welches als Teil der HMG-Domäne gilt. In C-terminalen Regionen sind die unterschiedlichen Spleissvarianten der einzelnen Proteine angedeutet. [angepasst von L.Waterman, homepage]. (B) Zur Herstellung der LEF1 Δ HMG Mutante wurden die HMG-Domäne einschließlich des NLS deletiert.

Die Mengen an HA-LEF1 voller Länge waren ohne und mit Δ Np63 α Ko-Transfektion vergleichbar, während die Level der HA-LEF1 Δ HMG-Mutante sich zumindest auf dem Inputgel betrachtet unterschieden. Hier hat die Ko-Expression von Δ Np63 α zu einem Anstieg der LEF1 Δ HMG-Menge geführt. Sowohl die β -Aktin als auch GFP-Kontroll-Färbung bestätigen Proteinladung und Transfektionseffizienz in vergleichbarem Rahmen. Die erfolgreiche Präzipitation der beiden LEF1-Konstrukte ist im mittleren Bereich der Abbildung 21 dargestellt, und zeigt dass das Protein mit voller Länge in geringerer Menge präzipitiert wurde, als die Deletionsmutante. Die Ko-Präzipitation des Δ Np63 α konnte jedoch nur für das wildtypische LEF1 Protein detektiert werden. Die LEF1 Δ HMG-Mutante

kann trotz höherer Präzipitation kein Δ Np63 α -Protein binden. Die Kontrollpräzipitation mit dem Antikörper gegen β -Galaktosidase zeigt die Spezifität des Experimentes auf. Dieses Ergebnis lässt die Schlußfolgerung zu, dass die HMG-Domäne des LEF1 Transkriptionsfaktors für die Ausbildung einer Interaktion mit Δ Np63 α zumindest notwendig ist. Ob es auch wirklich der Bereich der Interaktion ist, kann nur vermutet werden, da die Deletion einer solchen Domäne auch zu einer Konformationsänderung des restlichen Proteins führen kann. Da diese Domäne jedoch innerhalb der TCF/LEF-Familie einen hohen Grad der Konservierung aufweist, und die Interaktion für alle Mitglieder der TCF/LEF-Transkriptionsfaktoren bestätigt werden konnte, liegt es nahe, dass dies auch die interagierende Domäne für alle TCF/LEF-Proteine ist.

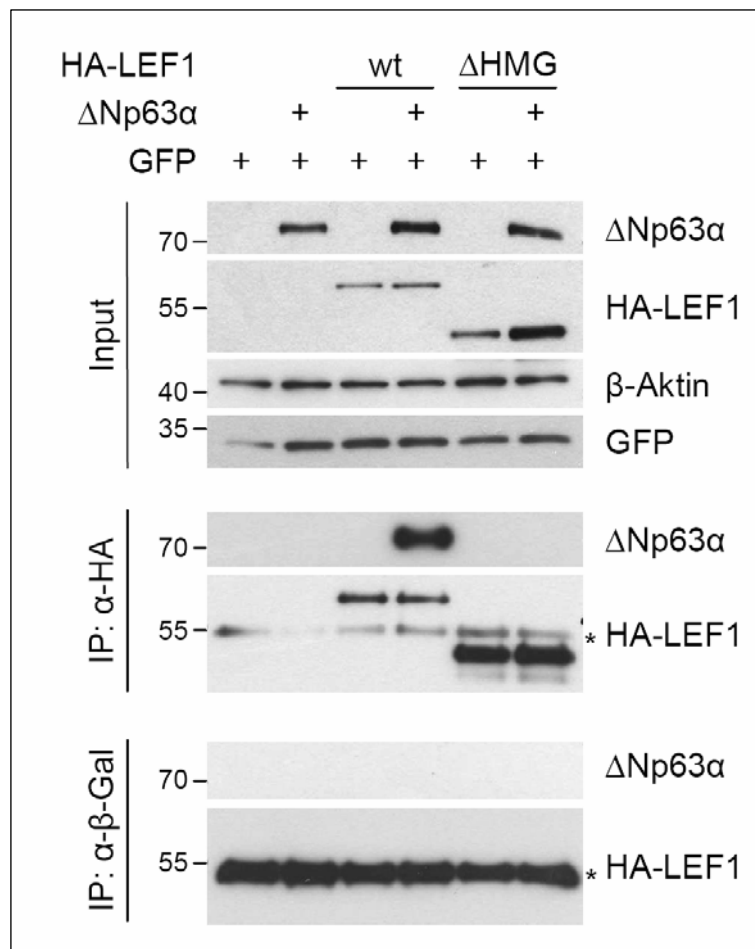


Abbildung 21: Die DNA-bindende HMG-Domäne innerhalb des LEF1-Proteins ist notwendig für die Interaktion mit Δ Np63 α

NCI-H1299-Zellen wurden, wie oben beschrieben, mit pcDNA3- Δ Np63 α und pCS2+-HA-mLEF1 oder pCS2+-HA-mLEF1 Δ HMG (je 9,2 μ g), sowie pCAGGS-GFP (0,9 μ g) transfiziert. Mit den Zellen wurde wie in Abbildung 18 beschrieben verfahren. Das Signal der mit Sternchen markierten Bande stammt von der schweren Kette des zur Präzipitation verwendeten Antikörpers.

Desweiteren muss noch in Betracht gezogen werden, dass das nukleäre Lokalisationssignal der TCF/LEF-Transkriptionsfaktoren innerhalb der HMG-Domäne zu finden sind (Prieve *et al.*, 1998). Dies legt die Fragestellung nah, ob die fehlende Interaktion zwischen Δ Np63 α und LEF1 durch unterschiedliche Lokalisationen der Proteine innerhalb der Zelle zu erklären ist. Diese Frage wird unter anderem im folgenden Kapitel behandelt.

5.3.4 HA-LEF1 interagiert mit den AS 1-290 und AS 81-290 von Δ Np63 α

Die DNA Bindedomäne der TCF/LEF-Transkriptionsfaktoren ist für die Assoziation an das Δ Np63 α -Protein notwendig. Welcher Bereich des Bindungspartners Δ Np63 α auf der anderen Seite die Ausbildung der Interaktion vermittelt, wurde im Folgenden untersucht.

Zur Auswahl standen die Δ N-spezifische Domäne, welche eine interne Transaktivierungsdomäne besitzt (Helton *et al.*, 2006), die zentrale DNA-Bindedomäne, die SAM-Domäne, bekannt als Bereich für Protein-Protein-Interaktionen (Ponting, 1995; Schultz *et al.*, 1997), sowie die Post-SAM-Domäne, welcher eine Funktion in der Transkriptioninhibition für TA-Isoformen zugesprochen wird (Serber *et al.*, 2002). Aufgrund von unterschiedlichem Expressionsverhalten der einzelnen klonierten GST- Δ Np63 α -Fragmente in Bakterien, wurde der Schwerpunkt dieser Untersuchung auf die DNA-Bindedomäne gelegt.

Die Untersuchung der DNA-Bindedomäne von Δ Np63 α als potentielle Interaktionsdomäne für die TCF/LEF-Proteine fand im Rahmen von GST-Pulldowns statt. Diese wurden durch Antje Dickmanns (Göttingen, GZMB, Abt. Molekulare Onkologie, Prof. M. Dobbelstein) durchgeführt. Verwendet wurden die unter 4.3.10 durch PCR-Klonierung hergestellten GST- Δ Np63 α -Fragmente GST- Δ Np63 1-290 und GST- Δ Np63 81-290. Die bakteriell exprimierten GST-Proteine sowie GST alleine zur Kontrolle wurden in vergleichbaren Mengen an Glutathionbeads gekoppelt und mit Zelllysaten inkubiert, welche zuvor mit den Expressionskonstrukten für HA-LEF1 und HA-LEF1 Δ HMG transfiziert wurden. Nach mehreren Waschschritten wurden die Bead-gekoppelten Proteine eluiert und mittels SDS-PAGE aufgetrennt. Zur Identifikation der Proteine, die an die GST-Fragmente gebunden haben, wurden Immunblotanalysen durchgeführt. In Abbildung 22 sind die Ergebnisse dieser Immunfärbungen dargestellt. Im unteren Bereich ist die α -GST-Färbung zu erkennen, welche die Ladung der Beads mit den GST-Proteinfragmenten und GST allein aufzeigt. Beide Δ Np63 α -Fragmente sind in vergleichbaren Mengen aufgetragen worden, während das unfusionierte GST zu einem geringeren Level geladen wurde.

Die Färbung der Membran mit α -HA-Antikörper zur Detektion der HA-LEF1-Proteine zeigt die Bindung des wildtypischen HA-LEF1-Proteins für sowohl das AS 1-290 als auch 81-290 Fragment des Δ Np63 α -Proteins, jedoch nicht an das unfusionierte GST-Protein zur Spezifitätskontrolle. Keine Bindung konnte in Bezug auf das HA-LEF1 Δ HMG-Protein detektiert werden, was die Ergebnisse aus 5.3.3 nicht nur bestätigt, sondern auch hinsichtlich der Lokalisationsfrage bekräftigt. Da die Zellyse der LEF1-exprimierenden Zellen sowohl die Zell- als auch die Kernmembran betraf, waren die Konditionen für beide Proteine (volle Länge und Δ HMG) während der Inkubation mit den Δ Np63 α -Fragmenten gleich.

Zusammenfassend kann die Aussage getroffen werden, dass die Aminosäuren 81-290 des Δ Np63 α -Proteins ausreichend sind, um mit dem HA-LEF1 Proteinen zu interagieren. Da diese Aminosäuren die DNA-Bindedomäne des Δ Np63 α abdecken, kann vermutet werden, dass die Interaktion von Δ Np63 α mit den TCF/LEF-Transkriptionsfaktoren über die jeweiligen DNA-Bindedomänen der Proteine stattfindet.

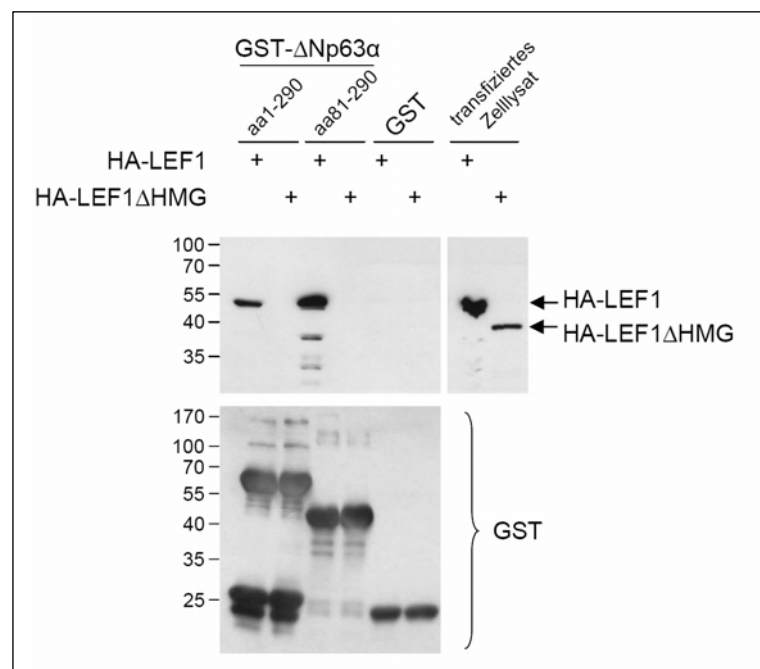


Abbildung 22: HA-LEF1 interagiert mit den AS 1-290 und AS 81-290 des bakteriell exprimierten Δ Np63 α im GST-Pulldown

Die Fragmente GST- Δ Np63 1-290, GST- Δ Np63 81-290, und nur GST wurden in E.coli exprimiert und an Glutathionbeads gebunden. Die Zellysate von pCS2+HA-mLEF1 oder HA-mLEF1 Δ HMG transfizierten H1299-Zellen wurden mit den bead-gebundenen GST-Konstrukten inkubiert. Die interagierenden Proteine wurden eluiert und über SDS-PAGE aufgetrennt. Mittels Immunblotanalyse wurden die Mengen der GST-Fusionsproteine (22-65 kDa), wie auch der daran gebundenen HA-LEF1 Protein (volle Länge, 50 kDa und Δ HMG, 40 kDa) untersucht.

5.4 Δ Np63 α rekrutiert Repressoren (HDACs) an den TCF/LEF Transkriptionskomplex

Die bisherigen Ergebnisse lassen vermuten, dass die Interaktion von endogenem Δ Np63 α mit Transkriptionsfaktoren der TCF/LEF-Familie zu einer Inhibition der β -Catenin/TCF-vermittelten Transkription führt. Zwei mögliche Regulationsmechanismen müssen in Betracht gezogen werden. Zum einen das Szenario, in dem das an TCF/LEF-Proteine assoziierte Δ Np63 α die Bindung der Transkriptionsfaktoren an ihre Promotorelemente und somit die Transkription der responsiven Gene unterbindet. Zur Untersuchung dieser Hypothese, müsste beantwortet werden, ob der Δ Np63 α -TCF/LEF-Komplex gemeinsam auf dem Chromatin im Promotorbereich der responsiven Gene sitzt. Dieses wäre mit Methoden wie der Chromatin-Immunpräzipitation (ChIP) oder dem Electrophoretic Mobility Shift Assay (EMSA) zwar möglich, gestaltet sich jedoch nicht immer als trivial, da die Ausbildung dieses Komplexes, wenn nicht in hohem Maße vorhanden, schnell in den nicht mehr detektierbaren Bereich fallen kann.

Zum anderen wäre die Regulation über Repressoren, welche durch die Bindung an Δ Np63 α in die Nähe von Promotoren gebracht werden, vorstellbar. Dieses Szenario würde sogar die Diskrepanz der Ergebnisse aus dem Überexpressionssystem und der Knockdownversuche erklären. Hierbei würde Δ Np63 α als Brückenfaktor fungieren, und eine erhöhte Menge des Brückenfaktors würde die gleiche Auswirkung haben wie eine Reduktion, nämlich weniger Repressoren am Transkriptionskomplex und somit eine gesteigerte Transkription.

Aus diesem Grund wurde der zweiten Mechanismus mit Analysen zur Transkription des Wnt-responsiven Gens *Axin2* in Abhängigkeit von Trichostatin A (TSA), einem Inhibitor der Histon-Deacetylasen (HDACs) vor einem p63-Knockdown Hintergrund untersucht.

HDACs sind in der Lage, die Acetylgruppen von acetylierten Lysinen am N-terminalen Histonende zu entfernen, wodurch dieses eine positive Ladung erhält und so eine stärkere Affinität des Histonendes zur negativ geladenen DNA ausbildet (siehe Abbildung 23). Dies führt zu einer Inhibition der Transkription (Brehm *et al.*, 1998). Daher sind HDACs häufig Komponenten von Repressorkomplexen (Kao *et al.*, 1998; Laherty *et al.*, 1997; Nagy *et al.*, 1997; Wen *et al.*, 2000). HDAC-Inhibitoren wie das Trichostatin A, ein antifugales Antibiotikum der Streptomyces-Bakterien, sind in der Lage, die Aktivität von Säugetier-HDACs zu inhibieren (Yoshida *et al.*, 1990). Der dadurch gesteigerte Grad an Histon-Acetylierung bewirkt eine Öffnung der Nukleosomstruktur und führt so zu einer höheren Transkription der Gene (Abbildung 23B).

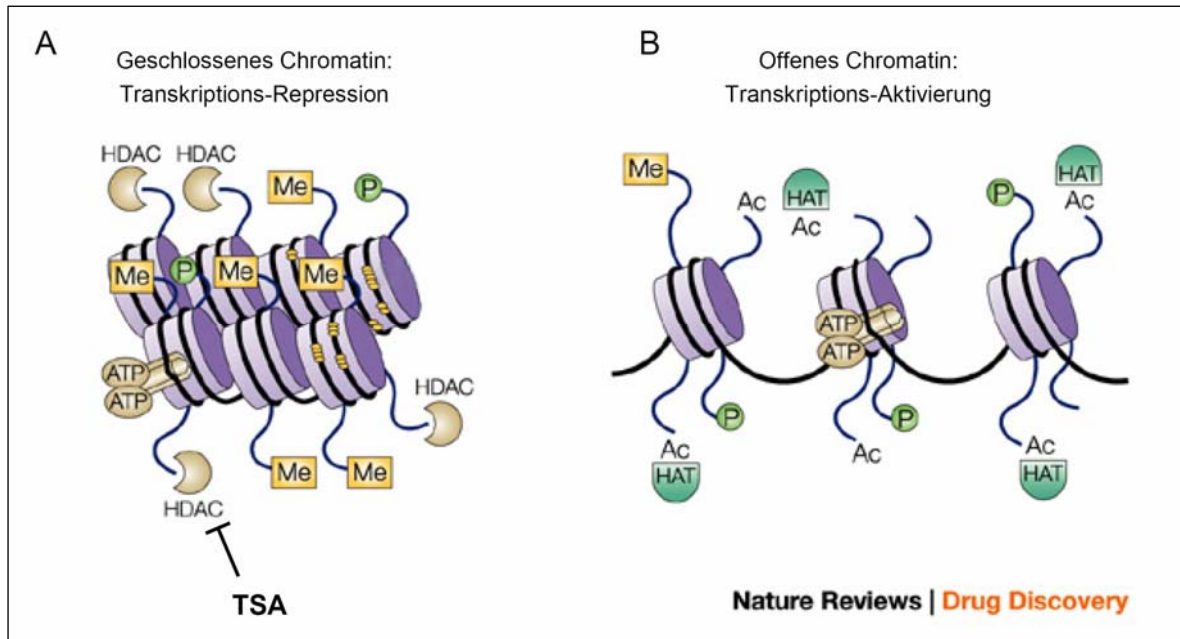


Abbildung 23: Nucleosomenstruktur

Nucleosomen bestehen aus DNA (dargestellt als schwarze Linie), welche um die Histon-Octamere (violett) gewickelt ist. Durch Post-Translationale Modifikationen wie Methylierung (Me), Phosphorylierung (P) oder Acetylierung (Ac) kann die übergeordnete Struktur der Nucleosome reguliert werden. Diese Modifikationen werden neben ATP-abhängigen Chromatin-Remodelling Komplexen von Histone-Acetyltransferasen (HATs) und Histone-Deacetyltransferasen (HDACs) reguliert. (A) Methylierung und Histone-Deacetylierung der DNA führt zur Ausbildung einer geschlossenen Chromatin-Konfiguration, was eine Transkriptions-Repression zur Folge hat. (B) Die Acetylierung und Demethylierung der DNA entspannt das Chromatin und ermöglicht so eine Transkriptions-Aktivierung. [modifiziert nach (Johnstone, 2002)]

Im Rahmen dieses Experimentes wurden 5637-Zellen mit Kontroll- oder zwei verschiedenen p63-siRNAs revers transfiziert. Nach einer Inkubation von 36 h wurden die Zellen in verschiedenen Kombinationen mit Wnt3a-konditioniertem Medium und Trichostatin A für 12 h behandelt. Die in Abbildung 24 dargestellten relativen mRNA-Level sind zu den mRNA-Mengen des Housekeeping-Gens 36B4 normalisiert und zur Wnt3a-behandelten Kontrollprobe relativiert.

Zu erkennen ist für die Axin2 mRNA-Mengen ein Anstieg der Kontroll-siRNA transfizierten Proben um ein 41-faches nach TSA-Behandlung. Auch in Kombination mit Wnt3a-Behandlung ist dieser Effekt zu beobachten. Während Wnt3a alleine die Axin2 mRNA-Level um ein 27-faches steigert, liegt der Anstieg bei zusätzlicher TSA-Behandlung bei 183-fach; eine etwa 7-fache Steigerung im Vergleich zu den rein Wnt3a-behandelten Zellen. Nach p63 Knockdown und in Abwesenheit von Wnt3a-konditioniertem Medium wird die Wirksamkeit von TSA ebenfalls deutlich. Für beide p63-siRNA-Ansätze ist ein Anstieg

auf das 20-fache nach 500 nM TSA zu verzeichnen. Betrachtet man nun jedoch die durch Wnt3a-stimulierten Zellen in Verbindung mit den verschiedenen p63-Knockdowns, so sieht man, dass die TSA-Behandlung die bereits erhöhten Axin2 mRNA-Mengen nicht weiter steigern kann. Hierfür gibt es zwei verschiedene Erklärungen. Möglich wäre, dass durch die Kombination aus p63-Knockdown und Wnt3a-Behandlung die Transkription des Axin2 Gens bereits auf höchstem Niveau stattfindet und deswegen nicht weiter gesteigert werden kann. Da die C(t)-Werte jedoch im Falle der höchsten Aktivierung bei etwa 24,5 liegen, kann davon ausgegangen werden, dass hier noch kein Limit erreicht wurde.

Daher ist die Erklärung wahrscheinlicher, in der Δ Np63 α als Brückenfaktor dient, der HDAC-Repressoren in die funktionelle Nähe von TCF/LEF-Faktoren bringt und so zu einer Inhibition der Transkription führt. Nach p63-Knockdown sind keine HDACs mehr in funktionsfähiger Nähe zum Transkriptionskomplex, was den Einsatz des HDAC-Inhibitors TSA ohne Auswirkungen lässt. Zur Dokumentation der Knockdowneffizienz wurden die mRNA-Mengen von p63 ebenfalls dargestellt. Durch den Einsatz der p63-siRNAs wurden die mRNA-Level für das endogene Δ Np63 α auf 7,5 – 18% reduziert.

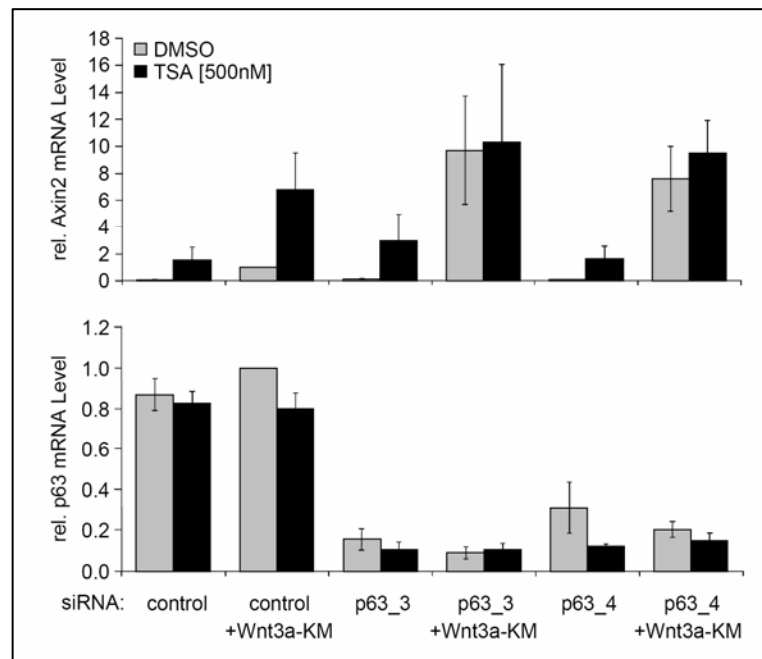


Abbildung 24: Der Einfluss von Trichostatin A auf die Wnt3a induzierten Axin2 mRNA Level und die Bedeutung von p63 in diesem System

Die Behandlung von 5637-Zellen mit dem HDAC-Inhibitor Trichostatin A (500 nM) erhöht die Wnt3a-induzierten Axin2 mRNA Level nur in Anwesenheit von endogenem Δ Np63 α . 5637-Zellen wurden revers mit den aufgeführten siRNAs (100 nM) transfiziert und 36 h später mit Wnt3a konditioniertem Medium und Trichostatin A (500 nM) für weitere 12 h behandelt. Anschließend folgte die mRNA Quantifizierung mittels qPCR, sowie die Normalisierung zum Housekeeping-Gen 36B4. Dargestellt ist der Mittelwert aus drei unabhängigen Experimenten mit der jeweiligen Standardabweichung.

6 Diskussion

Sowohl das Tumorsuppressorhomolog p63 als auch der kanonische Wnt-Signalweg spielen für die Regulation der Embryogenese eine unerlässliche Rolle. Beide Komponenten sind in Maus-Knockout-Modellen (p63^{-/-}, LEF1^{-/-}) untersucht worden und zeigten teilweise ähnliche Phänotypcharakteristika im Hinblick auf die Entwicklung der Haut, der Extremitäten und der Hautanhangsgebilde (Mills *et al.*, 1999; van Genderen *et al.*, 1994; Yang *et al.*, 1999). Diese überlappenden Funktionen, sowie die Involvierung von p63 und des Wnt/ β -Catenin-Signalwegs in der Tumorprogression führten uns zu der Fragestellung, inwieweit eine Interferenz des p63-Proteins mit dem kanonischen Wnt-Signalweg besteht. Bisherige Studien zeigten die positive Wirkung des Δ Np63 α -Proteins auf die β -Catenin-TCF-regulierte Transkription (Möritz, 2006; Patturajan *et al.*, 2002). Patturajan *et al.* begründet diesen Effekt mit einer Stabilisierung des cytoplasmatischen β -Catenins als Folge der Δ Np63 α -vermittelten Inhibition der GSK3 β -Aktivität. Möritz hingegen sieht die Ausbildung eines ternären Transkriptionskomplexes bestehend aus β -Catenin, TCF-4 und Δ Np63 α als Ursache für die von ihr gezeigte Transaktivierung der β -Catenin-TCF-regulierten Transkription im TOPflash/ FOPflash-System. In beiden Studien wurde das Δ Np63 α -Protein transient überexprimiert, so dass die Schlussfolgerungen auf nicht physiologischen Bedingungen basieren. Diese Tatsache, sowie die Begründung des Effekts mit zwei unterschiedlichen Mechanismen ließen eine Vielzahl an Fragen offen und zeigten die Notwendigkeit nach weiterführenden Experimenten auf.

Im Rahmen dieser Arbeit konnte für Δ Np63 α eine regulatorische Funktion auf die β -Catenin-vermittelte Transkription bestätigt werden. Wie schon bei Patteruajan *et al.* und Möritz beschrieben, wurde nach Überexpression des Δ Np63 α -Proteins die Aktivierung Wnt-abhängiger Luziferase-Reporter beobachtet. Dieser Effekt konnte auch im Doppelachsen-formations-Versuch auf die Wnt-vermittelte Regulation der Achsendetermination in *Xenopus*-Embryonen ausgeweitet werden (Kapitel 5.1.2). Zu diesem Entwicklungszeitpunkt findet jedoch keine physiologische Expression des p63-Gens in *Xenopus laevis* statt. Die einzige Expressionsform des *Xenopus*-p63 (Xp63), welches der humanen Δ Np63 γ -Isoform ähnelt, wird hauptsächlich während der Prämetamorphose (Stadium 44-48) in der larvalen Haut, im Epithel der Extremitätenknospen und im ektodermalen Gewebe der Schwanzflosse exprimiert (Tomimori *et al.*, 2004). Diese Diskrepanz ließ uns den Effekt von endogenem Δ Np63 α auf die Expression Wnt-responsiver Gene in Knockdown-Experimenten untersuchen. In der Blasenkrebs-Zelllinie 5637, welche einerseits durch ihren epithelialen Ursprung hohe

Mengen an endogenem $\Delta Np63\alpha$ besitzt und andererseits einen intakten und aktivierbaren kanonischen Wnt-Signalweg hat, wurde für das Luziferase-Reportersystem und drei verschiedene β -Catenin responsive Gene (*Axin2*, *MMP7* und *LEF1*) eine Transaktivierung nach p63-Knockdown verzeichnet. Dies spricht für eine reprimierende Wirkung von $\Delta Np63\alpha$ auf die Aktivität des kanonischen Wnt-Signalwegs. Während die Überexpression von $\Delta Np63\alpha$ zu einem leichten Anstieg der totalen β -Catenin-Mengen führte (Kapitel 5.1.1), wie es auch in Patteruajan *et al.* beschrieben wurde, konnte im Hinblick auf den Phosphorylierungsstatus, welcher maßgeblich die Verfügbarkeit von β -Catenin als Signalmolekül des kanonischen Wnt-Signalweg reguliert (Aberle *et al.*, 1997), kein Unterschied verzeichnet werden. Der Knockdown von p63 hat weder Einfluss auf die Gesamtmenge noch auch den Phosphorylierungsstatus des β -Catenins (Kapitel 5.2.3). Daher muss vermutet werden, dass der Effekt des $\Delta Np63\alpha$ über einen andersartigen Mechanismus als den Weg der β -Catenin-Akkumulation stattfindet.

Des Weiteren konnte in dieser Arbeit die Interaktion von $\Delta Np63\alpha$ mit allen humanen TCF/LEF-Transkriptionsfaktoren in der Ko-Immunpräzipitation und für LEF1 zusätzlich im GST-Pulldown nach Überexpression der beteiligten Proteine nachgewiesen werden (Kapitel 5.3). Auf diese Weise konnte die von Möritz beschriebene Interaktion von TCF4 und $\Delta Np63\alpha$ auf die weiteren TCF/LEF-Familienmitglieder ausgebaut werden (Möritz, 2006). Die Interaktion zweier verschiedener Transkriptionsfaktoren ist ein häufiges Ereignis zur Regulation bzw. Feinregulation der Transkription von Zielgenen [zur Übersicht (Walhout, 2006)]. Als Beispiel seien an dieser Stelle die Homeobox-Proteine genannt, welche mit GATA6 (Decker *et al.*, 2006), SOX3 (Dailey und Basilico, 2001) oder auch SRF (Ju *et al.*, 2006) interagieren und so auf die Transkription der Zielgene einwirken.

Die zur Interaktion notwendigen Proteindomänen konnten innerhalb beider Bindepartner auf die DNA-bindenden Bereiche der Faktoren eingeschränkt werden (Kapitel 5.3.3 und 5.3.4). Von Seiten der TCF/LEF-Faktoren muss jedoch noch genauer geklärt werden, ob die HMG-Domäne wirklich die Bindung ausübt, oder die Deletion dieser zu einer völlig veränderten Tertiärstruktur des Proteins führt, welche mit der Interaktion nicht mehr vereinbar ist. Unter physiologischen Bedingungen war der Nachweis der Interaktion nicht möglich, was durch die nur mäßige Sensitivität der verwendeten Antikörper begründet werden könnte.

6.1 Δ Np63 α im kanonischen Wnt-Signalweg: Aktivator oder Repressor?

Die Tendenzen, in die sich abhängig vom Versuchsansatz die Wirkung des Δ Np63 α auf den kanonischen Wnt-Signalweg ausdrückt, scheinen auf den ersten Blick paradox. Während die Überexpression des Tumorsuppressorhomologen einen transaktivierend Effekt aufweist, scheint nach Knockdown-Versuchen im Zellkultursystem das Δ Np63 α -Protein als Repressor zu fungieren. Die von Möritz aufgestellte Hypothese zur Transkriptionsaktivierung Wnt-responsiver Gene durch die zusätzlichen Transaktivierungs-domänen (Dohn *et al.*, 2001; Helton *et al.*, 2006) ist vor diesem Hintergrund nicht mehr haltbar, da der Knockdown des p63-Proteins zur Bestätigung der Hypothese mit einer verminderten Transkription der Zielgene einhergehen müsste.

Eine mögliche Erklärung für diese Beobachtung könnte das Auftreten des so genannten „Sqelching-Effekts“ sein, welcher für eine Vielzahl von Transkriptionsregulatoren, wie dem Gal4 in Hefe (Gill und Ptashne, 1988), wie auch Fos-Jun und AP1 in Säugetierzellen (Martin *et al.*, 1996) bereits gezeigt wurde. Der Sqelching-Effekt beruht auf der Tatsache, dass ein Faktor seine Wirkung auf ein System dadurch ausübt, zwei andere Faktoren durch eine physiologische Interaktion zu verbinden. Der starke Überschuss dieses Brückenproteins würde zur verminderten Ausbildung des ternären Komplexes führen, da sich hauptsächlich getrennte Komplexe ausbilden würden. Den gleichen Nettoeffekt hätte der Knockdown des Brückenproteins. In diesem Szenario wäre Δ Np63 α das brückenschlagende Glied, welches Repressoren oder Repressorkomplexe an die Transkriptionsfaktoren der TCF/LEF-Familie rekrutiert. Die transiente Überexpression von Δ Np63 α würde dazu führen, dass die fehlende Ausbildung des ternären Komplexes die Repressoren nicht an TCF/LEF herantitrieren kann, was zu einer gesteigerten Transkription führt (Abbildung 25B), wie in Reporterassays und *Xenopus*-Experimenten gezeigt wurde. Der Knockdown von endogenem p63 seinerseits würde ebenfalls die funktionelle Nähe der Repressoren zu den TCF/LEF-Transkriptionsfaktoren unterbinden und ginge ebenfalls mit einer gesteigerten Transkription einher (Abbildung 25C).

Da wir bereits zeigen konnten, dass die Interaktion auf Seiten des Δ Np63 α über die DNA-Bindedomäne ausgebildet wird (5.3.4), liegt die Vermutung nah, dass die Carboxyterminale SAM-Domäne der Bereich ist, welcher die reprimierenden Proteine bzw. Proteinkomplexe an die TCF/LEF-responsiven Promotoren herantitriert. Tatsächlich ist die SAM-Domäne auch als Repressordomäne beschrieben worden, die Repressoren wie Histon-Deacetylasen binden kann (Ghioni *et al.*, 2002).

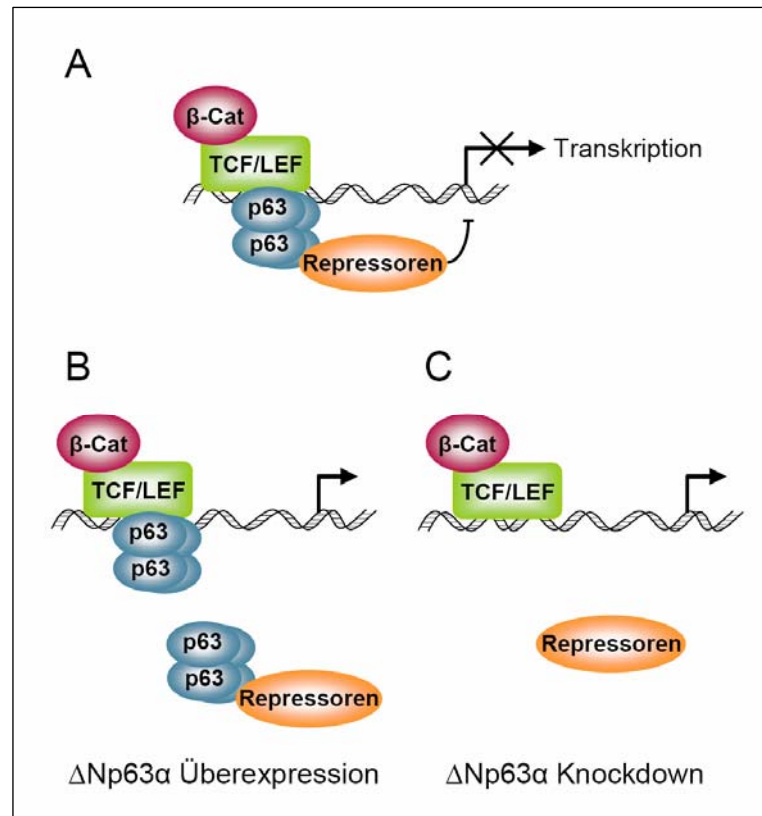


Abbildung 25: Modell zum Effekt von $\Delta Np63\alpha$ auf die kanonische Wnt-Aktivität.

(A) $\Delta Np63\alpha$ moduliert die Aktivität des kanonischen Wnt-Signalwegs über die Rekrutierung von Repressor-Komplexen an die TCF/LEF Transkriptionsfaktoren. Auf diese Weise wird die Aktivierung von β -Catenin responsiven Gene inhibiert.

(B) Überexpression von $\Delta Np63\alpha$ resultiert in einem Sequestering Effekt, der TCF/LEF von den Repressoren separiert. (C) Der Knockdown von $\Delta Np63\alpha$ reduziert das Brückenprotein zwischen TCF/LEF und den Repressoren, so dass der gleiche Netto-Effekt wie bei $\Delta Np63\alpha$ -Überexpression beobachtet werden kann.

Unterstützt wird dieses zusätzlich durch die Betrachtung der Syndrome von Hay-Wells Patienten, welche mit dem Fehlen der transkriptionellen Repression durch Mutationen in der p63 SAM-Domäne begründet werden (Westfall *et al.*, 2003). Eine Interaktion der Repressoren mit anderen Bereichen des p63-Proteins sollte jedoch nicht partout ausgeschlossen werden.

Die Identifikation des exakten Repressorproteins oder der Bestandteile des Repressorkomplexes erweist sich durch die Vielfalt der verschiedenen Möglichkeiten als schwierig. Durch die beschriebene Oligomerisierung von Proteinen, welche eine SAM-Domäne besitzen (Ramachander *et al.*, 2002; Slaughter *et al.*, 2008; Thanos *et al.*, 1999), liegt die Bindung der p63-SAM-Domäne an SAM-Domänen innerhalb von Repressorproteinen wie beispielsweise TEL (translocation Ets leukemia) nahe. TEL ist ein Transkriptionsrepressor

mit einer N-terminale SAM-Domäne und einer zentrale Domäne zur Rekrutierung von Ko-Repressoren wie mSin3A, SMRT und N-CoR. Diese Ko-Repressoren rekrutieren ihrerseits Histon-Deacetylasen und führen so zu einer verminderten Transkription der jeweiligen Gene (Chakrabarti und Nucifora, 1999; Fenrick *et al.*, 1999; Guidez *et al.*, 2000). Die Involvierung von Histon-Deacetylasen in unserem System, vermutlich in Zusammenhang mit einer solchen indirekten Bindung über weitere Ko-Repressoren, wird durch das Ergebnis aus Kapitel 5.4 unterstrichen. Hier konnte die Transkription des β -Catenin responsiven Gens *Axin2* vor dem Hintergrund einer Kombination aus p63-Knockdown und Wnt3a-Stimulation nicht weiter durch die Behandlung mit dem HDAC-Inhibitor Trichostatin A (TSA) gesteigert werden. Im Verlauf der Regulation des kanonischen Wnt-Signalwegs von einer Zielgen-Repression zu einer Zielgen-Aktivierung sind ebenfalls HDACs involviert. So wurde beschrieben, dass nach Aktivierung des Signalwegs die HDAC1–LEF1-Bindung zunächst unterbunden und die Aktivität des HDAC1 geblockt werden muss, bevor β -Catenin an LEF1 bindet, um transkriptionell aktiv zu sein (Billin *et al.*, 2000). Auch die Repression des Wnt-Signalwegs über Grouchos bzw. das humane Ortholog Transducin-like-Enhancer of Split (TLE), welche an TCF/LEF-Transkriptionsfaktoren binden, wird über die Aktivität von HDACs gesteuert (Arce *et al.*, 2009; Brantjes *et al.*, 2001). Die genaue Rolle des p63 auf diese HDAC-abhängige Regulation müsste jedoch über die Aufklärung des Repressorkomplexes beispielsweise durch Massenspektroskopie-Untersuchungen untersucht werden. Die direkte Interaktion von p63 mit HDAC-1 oder 2 konnte in unseren Experimenten nicht nachgewiesen werden (Daten nicht gezeigt).

Da die Interaktion über die zentrale DNA-Bindedomäne von p63 vermittelt wird, ist davon auszugehen, dass alle p63-Isoformen mit TCF/LEF interagieren. Zur weiteren Klärung des Mechanismus sollte daher nochmals die Wirkung der anderen p63-Isoformen betrachtet werden, welche sich aber durch die sehr geringen endogenen Expression der TA-Isoformen, wie auch der Δ Np63 β und γ -Isoform in humanen Zelllinien auch auf Überexpressions-versuche beschränken muss. Möritz hat bereits die Wirkung einiger Isoformen im Reportersystem untersucht. Für HEK-293-Zellen konnte beobachtet werden, dass Δ Np63 α der stärkste Aktivator nach Überexpression ist, während die TAp63 α , sowie β -Isoform kaum Einfluss auf das TOPflash-System gezeigt haben (Möritz, 2006). Vor dem Hintergrund der Repressor–Rekrutierung über die SAM-Domäne, wäre es möglich, dass sich im Falle dieser TA-Isoformen ein Gleichgewicht mit der Aktivator-Rekrutierung über die transaktivierende Domäne einstellt, so dass keine Wirkung über die andere dominiert. In H1299-Zellen war hingegen Δ Np63 β der stärkste Aktivator. Diese zelltypspezifischen

Unterschiede wurden von Möritz mit der differentiellen Expression der Transkriptionsfaktoren begründet, die sich anhängig von der Wahl der Zellsysteme schon häufig auf die p63-vermittelte Transaktivierung aufgewirkt haben (Ikawa *et al.*, 1999; Kato *et al.*, 1999; McGrath *et al.*, 2001; Shimada *et al.*, 1999). Da die β -Isoformen keine vollständige SAM-Domäne besitzen, könnte die starke Aktivierung durch $\Delta Np63\beta$ mit der fehlenden Repressorbindung an den C-Terminus der β -Isoformen begründet werden.

Berücksichtigt man die Option, dass die Repressoren doch über eine andere p63-Domäne rekrutiert werden, würde jedoch der Squelching Effekt zur Begründung der Beobachtung herangezogen werden können. Die Möglichkeit, der Repressor-Rekrutierung über die DNA-Bindedomäne, wird beispielsweise für bestimmte Mutationen (acro-dermato-ungual-lacrima-tooth; ADULT) des p63-Protein diskutiert, welche mit humanen Syndromen assoziiert sind. In diesem Zusammenhang trägt das *p63*-Gen eine Punktmutation innerhalb der DNA-Bindedomäne, wodurch die Chromatinbindung dieses Proteins jedoch nicht unterbunden wird. Da $\Delta Np63\gamma$, welches diese Mutation trägt, in der Lage ist, p63-responsive Gene zu transaktivieren, während das wildtypische Protein dieses Potential nicht hat, wird vermutet, dass dies über die nicht mehr existente Rekrutierung des Repressors vermittelt wird (Duijf *et al.*, 2002).

Im Rahmen unserer Knockdown-Experimente darf der Effekt von anderen parallel zu $\Delta Np63\alpha$ exprimierten Isoformen in 5637-Zellen nicht ausgeschlossen werden, die gleichzeitig mit dem p63 Knockdown reduziert werden.

6.2 Mögliche Regulationsmechanismen zur Steuerung der p63-Wirkung

Im Hinblick auf den physiologischen Zusammenhang stellt sich die Frage, ob die beobachtete Wirkung des $\Delta Np63\alpha$ -Proteins auf den kanonischen Wnt-Signalweg konstitutiv vorherrscht, oder ob sie nur unter bestimmten Bedingungen zur Geltung kommt. Für die Regulation dieses Effekts kommen zahlreiche Mechanismen in Frage, welche sich einerseits auf Ebene der Promotoren der Zielgene, auf die Interaktion von p63 mit TCF/LEF-Proteinen oder auf die Rekrutierung der Repressoren beziehen kann. Diese Möglichkeiten sollen im Folgenden erörtert werden.

Promotorspezifität der p63-TCF/LEF-Interaktion. Die von uns untersuchten β -Catenin responsive Gene *Axin2*, *MMP7* und *LEF1* haben in 5637-Zellen alle eine Aktivierung nach p63-Knockdown gezeigt (Kapitel 5.2.2). Daher ist von Interesse, ob alle Wnt-

responsiven Gene in ihrer Transkription von p63 reguliert werden oder ob eine spezifische Selektion stattfindet. Zur möglichen Spezifizierung bestände die Möglichkeit einer zusätzlichen Chromatininteraktion durch p63 in den Promotorbereichen β -Catenin-responsiver Gene. Diese Chromatinbindung könnte die Interaktion mit TCF/LEF-Faktoren erleichtern bzw. stabilisieren und auf diese Weise die Wirkung der Transkriptionsrepression verstärken. Solche Effekte sind bereits im Rahmen verschiedener Transkriptionsregulationen beobachtet worden. So wurde gezeigt, dass im Falle von Megakaryozyt-spezifischen Promotoren die Transkriptionsfaktoren Fli-1 (Friend leukemia virus integration 1) und GATA-1 miteinander nach Interaktion kooperieren (Eisbacher *et al.*, 2003). Für die Untersuchung dieses Regulationsmechanismus würde sich eine Micro-Array-Untersuchung anbieten, an die sich weitere Promotoranalysen anschließen. Auf diese Weise könnte genomweit betrachtet werden, welche Wnt-responsiven Gene auf einen p63-Knockdown antworten.

Posttranslationale Modifikationen der interagierenden Proteine. Posttranslationale Modifikationen werden innerhalb der Zelle zur Regulation der Proteinaktivität, der Protein-Stabilität aber auch der Interaktionsfähigkeit eingesetzt. Daher ist eine Regulation des Effekts von Δ Np63 α auf den kanonischen Wnt-Signalweg durch Verstärkung oder Inhibition der Interaktion durch posttranslationale Modifikationen eines oder beider Partner in Betracht zu ziehen. Auch die Assoziation der möglichen Repressorkomplexe an p63 könnte auf diese Art und Weise reguliert werden.

Auf Seiten des Tumorsuppressorhomologen p63 sind zahlreiche Serin bzw. Threonin-Phosphorylierungen bekannt, welche ähnliche Funktionen in allen Mitgliedern der p53-Familie haben. Exogenes TAp63 α und - γ werden als Folge von genotoxischem Stress wie bspw. UV oder γ -Bestrahlung phosphoryliert, was zu einer Stabilisierung des Proteins führt (Kato *et al.*, 2000; Okada *et al.*, 2002). Im Gegenteil dazu führt die ebenfalls auf genotoxischen Stress resultierende Phosphorylierung von Δ Np63 α zu einem beschleunigten Abbau (Westfall *et al.*, 2005). Zu den weiteren Modifikationen von p63-Proteinen gehört aber auch der Ubiquitin-ähnliche Modifikator SUMO-1 (Small Ubiquitin-like Modifier-1), der zum einen an das Lysin K549 (gültig für die TA-Isoform) innerhalb der SAM-Domäne, und zum anderen an das Lysin K637 (gültig für die TA-Isoform) innerhalb der Transaktivierungs-Inhibitionsdomäne angeknüpft werden kann (Watson und Irwin, 2006). Beide SUMOylierungen verstärken das transaktivierende Potential der TAp63 α Isoform, und das inhibierende Potential der Δ Np63 α -Isoformen. Die SUMOylierung von Δ Np63 α fördert den proteasomalen Abbau des Proteins, hat aber keinen Einfluss auf die intrazelluläre Lokalisation. Es wird vermutet, dass die veränderte SUMOylierung des p63

innerhalb von natürlich vorkommenden Mutationen mit an der Entstehung des Phänotyps des Spleiss-Hände und Füsse-Syndroms beteiligt ist (Huang *et al.*, 2004).

Auf Seiten der TCF/LEF-Proteine sind ebenfalls posttranslationale Modifikationen beobachtet worden. So sind im *Xenopus*-Ortholog von TCF-4 zwei Motive charakterisiert worden, welche durch eine optionale Phosphorylierung modifiziert werden, die sich auf die Ausbildung des XTCF-4- β -Catenin-DNA-Komplexes auswirkt (Pukrop *et al.*, 2001). Des Weiteren wird LEF1 ebenfalls durch SUMO-1 modifiziert, welches durch die PIASy-E3-Ligase kovalent an das Protein geknüpft wird (Sachdev *et al.*, 2001). Auf diese Weise wird LEF1 in die nukleären Bodies geschickt, was vermutlich die Repression der LEF1-Aktivität zur Folge hat.

Da die Transaktivierung nach Überexpression wie auch nach Knockdown abhängig von der Aktivität des kanonischen Wnt-Signalwegs ist, wäre es eine passende Hypothese zu behaupten, dass die Wirkung des p63 auf den kanonischen Wnt-Signalweg und somit auch die Ausbildung des TCF/LEF-p63 Komplexes von der Aktivität dieses Signalwegs abhängig ist. Untersuchungen haben jedoch gezeigt, dass die Interaktion nicht durch eine parallele Wnt3a-Behandlung oder auch TGF β -Behandlung beeinflusst wird (Daten nicht gezeigt). In wieweit andere Signalwege, wie zum Beispiel der STAT3-Signalweg (Signal transducer and activator of transcription 3), der Sonic-Hedghoge-Signalweg oder der Ras-Signalweg, die Ausbildung oder Stabilität der Interaktion beeinflussen, ist noch zu untersuchen.

Verfügbarkeit eines weiteren Brückenproteins im Falle einer indirekten Interaktion. Die Interaktion von Proteinen kann sowohl direkt als auch indirekt über Brückenproteine stattfinden. Durch den Einsatz des Zelllysates im GST-Pulldown kann nicht ausgeschlossen werden, dass die Interaktion zwischen Δ Np63 α und TCF/LEF indirekt stattfindet. Hierfür kämen verschiedene Proteine in Frage, die sowohl mit TCF/LEF-Faktoren als auch p63 interagieren. Möglich wäre, dass β -Catenin als ein solches Brückenprotein fungiert, da sowohl die Assoziation an TCF/LEF-Faktoren, wie auch an p63 (Patturajan *et al.*, 2002) bereits gezeigt wurde. In ihren Untersuchungen konnte Möritz jedoch zeigen, dass Δ NTCF-4, welches durch die Deletion der konservierten β -Catenin-Bindedomäne charakterisiert ist, weiterhin mit Δ Np63 α assoziieren kann. Daher scheidet β -Catenin als möglicher Mediator der Interaktion aus.

Weitere Kandidaten wären Smad-Proteine, da einerseits Smad-2, -3 und -4 mit TCF/LEF-Transkriptionsfaktoren (Labbé *et al.*, 2000; Letamendia *et al.*, 2001) und andererseits p63 mit Smads-2 bzw.-3 assoziieren kann (Adorno *et al.*, 2009). Genauere Analysen haben

ergeben, dass die Transaktivierungsdomäne von p63, wie auch von p53 (Cordenonsi *et al.*, 2007), mit dem MH1-Bereich, der α -spezifische C-Terminus mit MH2 innerhalb des Smad-3-Proteins interagiert. Smads sind Signalmoleküle des TGF β -Signalwegs, welche in einer Vielzahl zellulärer Prozesse im adulten Gewebe, wie Zellwachstum, Differenzierung, Zellhomeostase oder Apoptose, aber auch während der Embryonalentwicklung beteiligt sind. Ein weiterer Aspekt ist aber auch die Involvierung des TGF β -Signalwegs in die EMT (Epitheliale-zu-Mesenchymale-Transition) von Zellen und somit spielt dieser Signalweg eine wichtige Rolle im Verlauf der Metastasierung (Xu *et al.*, 2009; Xu *et al.*, 2003). Nach Aktivierung des Signalwegs binden Liganden der TGF β -Superfamilie an Typ2-Rezeptoren, welche in Folge Typ1-Rezeptoren rekrutieren und phosphorylieren. Die Typ1-Rezeptoren phosphorylieren R-Smads (Rezeptor-regulierte Smads), welche mit Ko-Smad4 interagieren und im Zellkern akkumulieren. Auf diese Weise erfüllen sie ihre Rolle als Transkriptionsfaktoren.

Sowohl die Interferenz des TGF β -Signalweges mit dem kanonischen Wnt-Signalweg gerade im Bereich der EMT (Xu *et al.*, 2009) und der Metastasierung (Letamendia *et al.*, 2001) als auch die Beteiligung von p63 bei der Ras/mutp53/TGF β -induzierten Metastasierung wurde in den Mittelpunkt vieler Untersuchungen gestellt (Adorno *et al.*, 2009; Marine und Berx, 2009). Letzteres soll seine Wirkung dadurch ausüben, dass die durch Smads-vermittelte Interaktion des p63 mit mutierten p53 die Funktionen von p63 antagonisiert. Zu diesen Funktionen gehören unter anderem die Transkription der Metastasierungssuppressoren Sharp-1 und Cyclin G2 (Adorno *et al.*, 2009).

Im Rahmen unserer Experimente konnte jedoch kein Einfluss einer Behandlung mit TGF β - oder dem TGF β -Inhibitor SB 431542 auf die Interaktion von LEF1 und Δ Np63 α gezeigt werden. Auch blieb die durch p63-Knockdown verstärkte Transkription von *Axin2* durch TGF β unbeeinflusst (Daten nicht gezeigt). Aus den bisherigen Daten ist daher die Involvierung des TGF β -Signalwegs und der Smad-Proteine im p63-regulierten kanonischen Wnt-Signalweg nicht ersichtlich. Zur Charakterisierung möglicher Brückenfaktoren müsste untersucht werden, welche Proteine sowohl mit TCF/LEF-Faktoren als auch dem p63-Protein interagieren. Kandidaten hierfür wären die Groucho-verwandten Repressoren des kanonischen Wnt-Signalwegs Grg (Groucho-verwandtes Gen) oder TLE (Transducin-like-Enhancer of Split) (Brantjes *et al.*, 2001) oder aber auch CREB/ATF (cAMP response element binding protein/activating transcription factor), PEBP2 α (Polyomavirus enhancer binding protein 2 α) oder Protein c-ets-1 (Giese *et al.*, 1991), die alle bekanntermaßen an TCF/LEF-Proteine binden.

Verfügbarkeit der Komponenten eines Repressorkomplexes. Als weitere Regulationsmöglichkeit neben der Menge und Verfügbarkeit der p63 und TCF/LEF-Proteine wäre es möglich auch die Verfügbarkeit der Komponenten des Repressorkomplexes zu steuern. Da die Identität der einzelnen Komponenten jedoch nicht aufgeklärt ist, könnte über diesen Regulationsmechanismus nur spekuliert werden.

6.3 Kontrolle der embryonalen Entwicklung durch die p63-Wnt-Signalweg-Interferenz?

Im Rahmen der embryonalen Entwicklung gibt es zahlreiche Strukturen, wie die Haut, inklusive aller Hautanhangsgebilde oder die Extremitäten, deren korrekte Ausbildung von sowohl p63 als auch dem kanonischen Wnt-Signalweg abhängig ist [zur Übersicht Kapitel 2.5]. Daher liegt die Hypothese nah, dass p63 als reprimierender Regulator des Wnt-Signalwegs die Entwicklung dieser Strukturen durch die zeitliche Aktivierung des kanonischen Wnt-Signalwegs steuert bzw. eine exzessive Wnt-Aktivität inhibiert. Letzteres würde verhindern, dass sich Zellen zum falschen Zeitpunkt aus dem Zellverband herauslösen oder zu stark migrieren. Ein solches Szenario hätte vielleicht zur Folge, dass sich kein mehrschichtiges Epithel korrekt ausbildet, wie es in p63 ^{-/-} Mäusen der Fall ist.

Obwohl unsere Untersuchungen zur Interferenz des p63 mit dem kanonischen Wnt-Signalweg in der *Xenopus*-Entwicklung zu dem gewählten Entwicklungsstadium nicht physiologisch sind, gibt es sehr wohl Ereignisse während der Entwicklung von *Xenopus*, die von sowohl p63 als auch dem kanonischen Wnt-Signalweg beeinflusst werden. Ein solcher Entwicklungsschritt ist die Mesoderminduktion, welche im *Xenopus*-Embryo zum Zeitpunkt der Blastula im Stadium 8,5-9,5 einsetzt. Der Zeitpunkt der stärksten Xp63-Expression umfasst zwar die Stadien 44-48 während der Prämetamorphose (Tomimori *et al.*, 2004), dennoch konnte in neusten Studien der Einfluss von p63 schon zu diesem frühen Zeitpunkt der Mesoderminduktion beobachtet werden.

So konnten Barton *et al.* zeigen, dass sowohl in humanen Keratinocyten als auch in *Xenopus* der Mesoderm-induzierende Faktor Activin A (Asashima *et al.*, 1990; Ruiz i Altaba und Melton, 1989; Smith *et al.*, 1990) durch Δ Np63 α bzw. Xp63 suppremiert wird. Die Überexpression von Xp63 antagonisiert die p53-abhängige Mesoderminduktion im *Xenopus*-Embryo, während der p63-Knockdown das Mesoderm induziert (Barton *et al.*, 2009).

Die Aktivität des Wnt/ β -Catenin-Signalwegs ist ebenfalls an der Mesoderminduktion beteiligt (Dunty *et al.*, 2008), und in diesem Entwicklungsschritt innerhalb der marginalen Zone aktiv (Schohl und Fagotto, 2003). Hier ist es die Aktivität von Wnt8 und Wnt3a, die die Transkription von *Brachyury* (*Xbra*) induziert (Arnold *et al.*, 2000; Yamaguchi *et al.*, 1999), welches für die Mesodermentwicklung unerlässlich ist (Herrmann *et al.*, 1990). Auch im weiteren Verlauf nimmt Wnt Einfluss auf die Mesodermentwicklung, indem es die Ausbildung des ventralen und lateralen Mesoderms fördert und die des Dorsalen unterbindet (Christian und Moon, 1993; Hamilton *et al.*, 2001; Hoppler *et al.*, 1996; Hoppler und Moon, 1998).

Aufgrund dieser Erkenntnisse und einigen Hinweise für eine Verbindung zwischen der Wnt-abhängigen Mesodermmregulation und Activin A (Sokol und Melton, 1992) besteht die Möglichkeit, dass die Wnt-abhängige Induktion von *Brachyury* und die somit eingeleitete Mesoderminduktion ein Prozess ist, der über p63 gesteuert wird und erst nach Antagonisierung des p63-Proteins beispielsweise durch Herunterregulation stattfinden kann.

6.4 Von der Tumorinitiation zur Tumorprogression

Im Bereich der Onkogenese stellt die Interferenz des Tumorsuppressorhomologen p63 mit dem kanonischen Wnt-Signalweg eine neuartige Regulationsmöglichkeit der Tumorprogression dar. Beide Komponenten werden, für sich genommen, im Hinblick auf die Tumorentstehung und –progression in Betracht gezogen, da die Dysregulation von sowohl p63 als auch des Wnt/ β -Catenin-Signalwegs zur Entwicklung von Tumoren führen kann (siehe Einleitung Kapitel 2.2.2 und 2.4.3).

p63, als Mitglied der p53-Tumorsuppressorfamilie, spielt hierbei die Rolle des Proteins, welches Tumorzellen einen Stammzellcharakter verleihen könnte (Blandino und Dobbelstein, 2004) und in Plattenepithelien für die Erhaltung des proliferativen Potentials sorgt (Koster und Roop, 2004). Beide Funktionen sind Charakteristika, die einer Tumorzelle dienlich sind, um ein unkontrolliertes Wachstum auszuüben. Auf der anderen Seite wurde inzwischen in mehreren Studien gezeigt, dass der Verlust des Δ Np63 α -Proteins die Zellmigration und –invasion fördert (Barbieri *et al.*, 2006) und verschiedene Tumore, wie der Blase (Koga *et al.*, 2003a; Koga *et al.*, 2003b; Urist *et al.*, 2002), der Gebärmutter-schleimhaut (Stefansson *et al.*, 2006b), des Ösophagus (Morita *et al.*, 2005) und der Brust (Wang *et al.*, 2002) im Verlauf der Tumorprogression auf dem Weg zur Metastasierung ihre Δ Np63 α -Mengen herunterregulieren.

Auch der Einfluss des kanonischen Wnt-Signalwegs auf die Onkogenese wurde häufig in den Mittelpunkt zahlreicher Untersuchungen gestellt. Zwei beschriebene Wnt-responsive Gene sind *c-myc* (He *et al.*, 1998) und *Cyclin D1* (Tetsu und McCormick, 1999). Während *c-myc* eine wichtige Rolle in der Zellproliferation einnimmt, ist die Funktion von *Cyclin D1* in der Zellzyklusregulierung angesiedelt. Inwieweit für *Cyclin D1* eine direkte Wnt-Responsivität gegeben ist, wurde jedoch in neueren Untersuchungen in Frage gestellt (Sansom *et al.*, 2005). Weitere Aspekte bestätigen die Rolle des kanonischen Wnt-Signalwegs in der Tumor-progression. So geht die Aktivierung des Wnt-Signalwegs mit einer Steigerung der Zellmigration und -invasion, sowie einer Verstärkung des EMT, der Epithelialen-zur-Mesenchymalen-Transition (Eger *et al.*, 2000; Kim *et al.*, 2002) einher. Dieses EMT-Ereignis ist im Rahmen der Metastasierung notwendig und umfasst eine Vielzahl von Protein-modifikationen, wie auch Transkriptionsprozessen, welche als Folge von externen Stimuli die Zellcharakteristika verändern. Dazu gehört die durch Cadherin, Occludin und Claudin, sowie Desmoplakin-vermittelte Reduktion der Zell-Zell-Adhärens, sowie die nukleäre Lokalisation des β -Catenins (Klymkowsky, 2005). Auch werden die F-Aktin-Fasern des Cytoskeletts durch ein Netzwerk von Stress-Fasern ersetzt, was die Ablösung einzelner Zellen aus dem Zellverbund ermöglicht und den Zellen, durch eine variable Form, die Bewegung erleichtert.

Würde p63 als Aktivator des kanonischen Wnt-Signalwegs fungieren, wie von Patteruajan und Möritz postuliert, würde man im Zusammenhang mit dem invasivem Wachstum und Metastasierung während der Tumorprogression eher eine erhöhte p63-Expression erwarten. In klinischen Studien wurde jedoch keine Korrelation hinsichtlich der p63-Expression und der Wnt-Aktivität festgestellt (Reis-Filho JS, 2003). Die von uns beobachtete Repression des kanonischen Wnt-Signalwegs durch endogenes Δ Np63 α hingegen unterstützt die bisherigen Beobachtungen im Verlauf der Tumorprogression und ermöglicht so eine Erklärung zu dieser noch nicht untersuchten Interferenz. In unserem Modell könnte zu einem frühen Zeitpunkt in der Tumorigenese p63 durch die Erhaltung des Stammzellcharakters und des Proliferationspotentials (Blandino und Dobbstein, 2004; Yang *et al.*, 1999) und/oder durch die Inhibition der pro-apoptotischen Effekte der transaktivierenden p73-Isoformen (DeYoung *et al.*, 2006; Rocco *et al.*, 2006) die Entstehung von Tumoren begünstigen. Zu späteren Zeitpunkten im Rahmen der Tumorprogression könnte diese Rolle vermutlich von anderen Mechanismen übernommen werden, so dass der Verlust von Δ Np63 α und der damit verbundene Aktivierung des kanonischen Wnt-Signalwegs zu einem Vorteil führt, indem es EMT, die Invasionsrate und damit auch die Metastasierung fördert.

7 Anhang A: Untersuchungen zur Interferenz von p53 und $\Delta Np73\alpha$ mit dem kanonischen Wnt-Signalweg

7.1 Einleitung – Das Tumorsuppressor-Homolog p73 und seine Isoformen

Die p53-Tumorsuppressor-Familie umfasst neben dem p53 und den p63-Proteinen (siehe Kapitel 2.1 und 2.2) ein weiteres Homolog welches als p73 bezeichnet wird. Wie die anderen Familienmitglieder, weist dieses eine Domänenstruktur bestehend aus Transaktivierungsdomäne, DNA-Bindedomäne und Oligomiersierungsdomäne auf.

Vergleichbar zu p63, existieren für p73 auch mehrere Isoformen (siehe Abbildung 26), welche einerseits durch den Gebrauch eines internen Promotors bzw. eines alternativen Startcodons entstehen (TA, ΔN und $\Delta N'$) und andererseits durch alternatives Spleissen sowohl N-terminal ($\Delta Ex2$, $\Delta Ex2/3$) als auch C-terminal (α , β , γ , δ , ϵ , ζ , η , η_1 , und φ) (Fillippovich *et al.*, 2001; Ishimoto *et al.*, 2002; Kaghad *et al.*, 1997; Stiewe *et al.*, 2002). Die C-terminal längste Isoform ist das p73 α -Protein, welches, wie p63, ebenfalls eine SAM-Domäne (Barrera *et al.*, 2003; Wang *et al.*, 2001), jedoch keine TID-Domäne, besitzt. TA-p73-Isoformen können p53-responsive Gene aktivieren (Fontemaggi *et al.*, 2002), während die Rolle der N-terminal tranktierten Proteine $\Delta Np73$ darin besteht, der Aktivität von p53 entgegenzuwirken (Pozniak *et al.*, 2000; Yang *et al.*, 2000). Reguliert wird die Trankription der TA-Isoformen unter anderem über E2F1 (Irwin *et al.*, 2000; Stiewe und Putzer, 2000), der Promotor der $\Delta Np73$ -Isoformen ist p53-responsiv

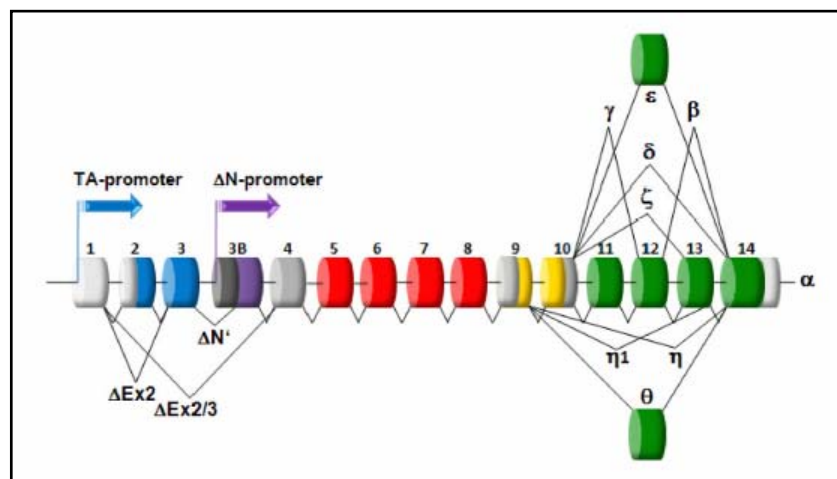


Abbildung 26: p73 Genstruktur [aus (Emmrich *et al.*, 2009)]

Struktur des p63-Gens mit Darstellung der alternativen Promotoren und der differentiellen Spleissung. Transaktivierungsdomäne (blau); Exon 3B-kodierende Sequenz (lila); DNA-Bindedomäne (rot); Oligomiersierungsdomäne (gelb); C-Terminus (grün).

(Grob *et al.*, 2001; Kartasheva *et al.*, 2002). Der Knockdown des *TP73*-Gens geht mit schwerwiegenden Defekten in der neuronalen Entwicklung wie auch der Homeostase einher. Die stärkste Expression des p73 Gens liegt im zentralen Nervensystem in Form der Δ Np73-Proteine (Yang *et al.*, 2000). p73-defiziente Mäuse zeigen Missbildungen des limbischen Telencephalons und weisen häufig einen Hydrocephalus auf. Die Dysfunktion des Jacobson-Organs, welches unter normalen Bedingungen große Mengen des p73-Proteins exprimiert, geht mit starken Einschränkungen der Pheromondetektion einher, was zu schweren Störungen des Sozialverhaltens führt.

Obwohl keine *p73*-Mutationen in Zusammenhang mit der Tumorenstehung oder -progression nachgewiesen werden konnten (Kovalev *et al.*, 1998; Yokomizo *et al.*, 1999), sind in einigen Tumorarten erhöhte p73-Proteinmengen aufgetreten; dazu gehört auch das Neuroblastom (Douc-Rasy *et al.*, 2002; Kovalev *et al.*, 1998), Tumore der Prostata (Yokomizo *et al.*, 1999), der Brust (Dominguez *et al.*, 2001; Zaika *et al.*, 1999) und des Ovars (Concin *et al.*, 2004)

7.2 Fragestellung

Aufgrund der hohen Aminosäure-Homologie der p53-Familienmitglieder, gerade im Bereich der mit TCF/LEF-interagierenden DNA-Bindedomäne, stellte sich die Frage nach der Wirkung von p53 und p73 auf den kanonischen Wnt-Signalweg.

Daher wurde die Wirkung der weiteren Mitglieder der p53-Familie, p53 und Δ Np73 α , auf die β -Catenin-TCF-vermittelte Transkription Wnt-responsiver Gene im Reporterassay untersucht. Auch wurde die Frage adressiert, ob Δ Np73 α , wie sein Homolog Δ Np63 α in der Lage ist, mit TCF/LEF-Transkriptionsfaktoren zu interagieren.

7.3 Zusätzliches Material

pcDNA3–p53: Die humane cDNA Sequenz für die Expression von p73 wurde in den pcDNA3-Vektor kloniert. Beschrieben in (Rodriguez *et al.*, 1999).

pcDNA3– Δ Np73 α : Die humane cDNA Sequenz für die Expression von Δ Np73 α wurde durch Natalia Kartasheva, Marburg, in den pcDNA3-Vektor kloniert und in (Kartasheva *et al.*, 2002) beschrieben.

7.4 Ergebnisse

7.4.1 Δ Np63 α , aber nicht p53 oder Δ Np73 α verstärkt die β -Catenin-TCF-vermittelte Transkription

Im Hinblick auf die Fragestellung wurde einerseits der Tumorsuppressor p53 und das zu Δ Np63 α strukturell ähnliche Δ Np73 α untersucht. Diese Proteine wurden neben der Positivkontrolle Δ Np63 α in HEK-293 Zellen überexprimiert und ihr Einfluss auf das TOPflash/FOPflash-System untersucht. Zur Aktivierung des kanonischen Wnt-Signalwegs wurde der Einfluss dieser drei p53-Familienmitglieder in Kombination mit einer β -Catenin Überexpression analysiert. Die Ergebnisse dieser Luziferase-Reporterassays sind in Abbildung 27 dargestellt.

Ohne Aktivierung des Wnt-Signalwegs sind Δ Np63 α und Δ Np73 α in der Lage, die Reporteraktivität des TOPflash-Konstruktes zu aktivieren. Während Δ Np63 α die Expression der Luziferase auf das Zweifache steigert, liegt die Aktivierungssteigerung für Δ Np73 α bei 5-fach. Auch hier wird jedoch wieder die FOPflash-Aktivität im gleichen Ausmaß hochreguliert. Nur p53 zeigt keine Auswirkung auf die Reporteraktivität des TOPflash- und FOPflash-Konstrukts. Interessant sind jedoch die Ergebnisse aus den Überexpressionen, die mit β -Catenin kombiniert wurden. Die β -Catenin-Expression alleine aktiviert den TOPflash-Reporter spezifisch auf das 7-fache. Wie bereits in Abbildung 11A und C beobachtet, zeigt β -Catenin in Verbindung mit Δ Np63 α -Überexpression eine deutlich höhere Reporteraktivität von 62-fach. Für Δ Np73 α wird dieser transaktivierende Effekt nicht beobachtet. Hier liegen, wie auch ohne β -Catenin Ko-Expression, die Aktivitäten sowohl des TOPflash- als auch FOPflash-Reporters bei etwa 5-fach. Und auch p53 zeigte, wie schon zuvor ohne β -Catenin, keine Steigerung der Reporterexpression. Ganz im Gegenteil, man sieht sogar, dass die p53-Überexpression sich inhibierend auf die durch β -Catenin induzierte Reporteraktivität auswirkt, indem der Wert vergleichbar mit dem Wert der Leervektor-transfizierten Zellen ist.

Folglich ist nur Δ Np63 α , nicht aber der Tumorsuppressor p53 oder das verwandte Δ Np73 α -Protein fähig, die β -Catenin-TCF-vermittelte Transkription zu verstärken.

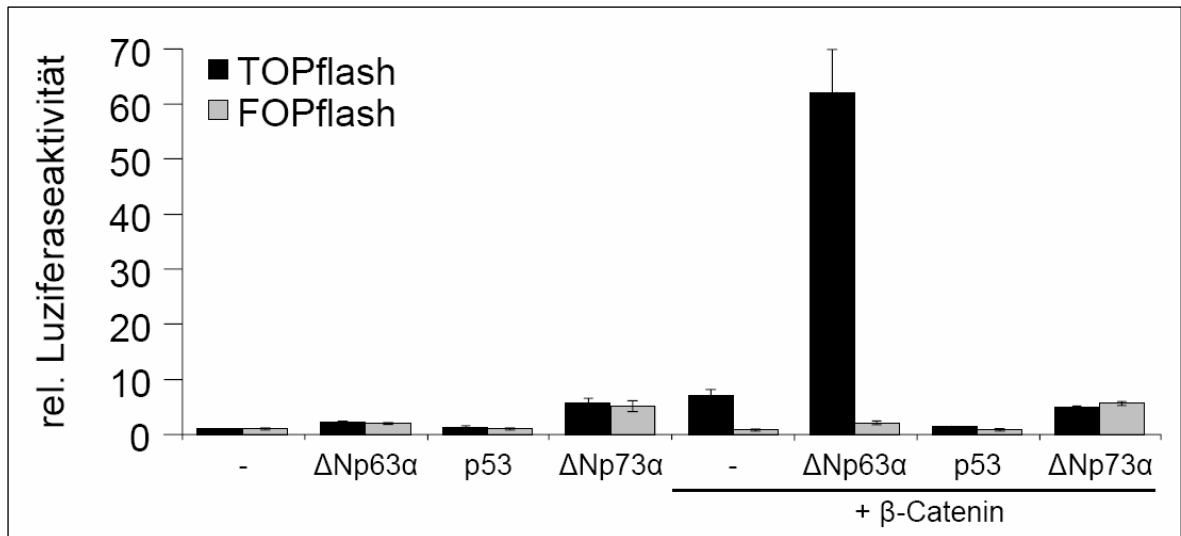


Abbildung 27: ΔNp63α, aber nicht p53 oder ΔNp73α verstärkt die β-Catenin-TCF-vermittelte Transkription

HEK-293 Zellen wurden mit den folgenden Expressions- und Reporterkonstrukten transfiziert: pGI3-OT (TOPflash) oder -OF (FOPflash) (200 ng), pRL-tk (50 ng), pCineo-β-Catenin (160 ng), pcDNA3-ΔNp63α, p53 und ΔNp73α (each 400 ng). 24 h nach Transfektion wurden die *Firefly*- und *Renilla*-Luziferaseaktivitäten ermittelt und *Firefly* zu *Renilla* normalisiert. Dargestellt sind die Mittelwerte aus drei unabhängigen Experimenten und die jeweilige Standardabweichung.

7.4.2 ΔNp73α interagiert mit LEF1

Die fehlende Transaktivierungsfähigkeit von ΔNp73α im TOPflash/FOPflash-Reportersystem nach Überexpression legt nahe, dass es trotz der strukturellen Homologien zu ΔNp63α dennoch Unterschiede zwischen diesen Proteinen geben muss, die diese verschiedenen Auswirkungen verursachen. Ausgehend von dem in Abbildung 25 beschriebenen Modell gäbe es hierfür zwei Ansatzpunkte. Der erste wäre die fehlende Ausbildung eines Komplexes mit den TCF/LEF-Transkriptionsfaktoren. Hierdurch würde die Überexpression nicht zu einem Anstieg der β-Catenin-TCF-vermittelten Transkription führen, wie es in Abbildung 27 gezeigt wird. Das zweite Szenario wäre, dass ΔNp73α im Gegensatz zu ΔNp63α nicht in der Lage ist, Repressorkomplexe wie HDACs an die Promotoren von Wnt-responsiven Genen zu titrieren, da es diese nicht bindet. Auch diese Möglichkeit würde dazu führen, dass die Überexpression von ΔNp73α zu keiner Auswirkung auf die β-Catenin-TCF-vermittelten Transkription führt, da sich kein Squelching-Effekt einstellt. Die Suche nach einem geeignetem System zur Untersuchung der zweiten Theorie würde sich als etwas schwierig gestalten, da eine siRNA-Transfektion in einer Wnt-responsiven Zelllinie mit hohem endogenem Level an ΔNp73α etabliert

werden müsste. Daher liegt die Analyse der ersten Fragestellung näher, welche mit einer Ko-Immünpräzipitation beantwortet werden kann.

Aus diesem Grund wurden NCI-H1299-Zellen mit Expressionskonstrukten für Δ Np73 α und LEF1 in einem 1:1 Verhältnis, sowie ein GFP-Konstrukt transfiziert und nach 48-stündiger Inkubation eine HA-Präzipitation einschließlich der Kontrollpräzipitation mit dem β -Galaktosidase-Antikörper durchgeführt. Nach der Elution aller präzipitierten und kopräzipitierten Proteine, wurden diese sowie die Inputproben mittels SDS-PAGE aufgetrennt und über Immunfärbung mit spezifischen Antikörpern detektiert. In Abbildung 28 sind die Ergebnisse dieses Versuches dargestellt.

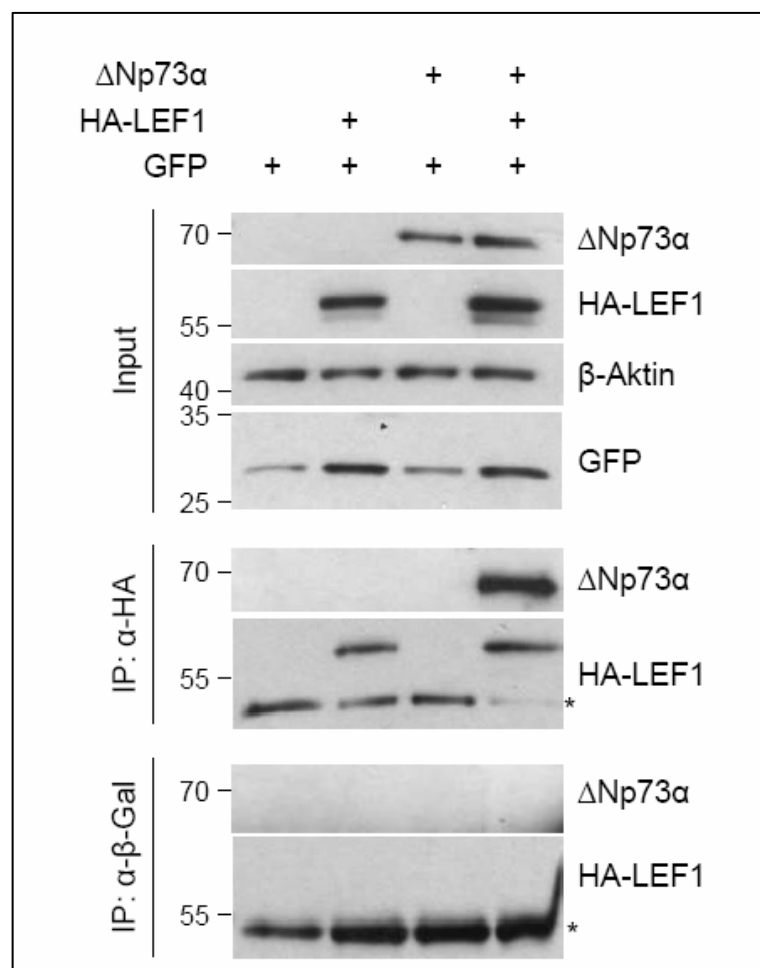


Abbildung 28: Δ Np73 α interagiert mit LEF1

H1299-Zellen wurden mit den Plasmiden pCS2+-HA-mLEF1 (9,2 μ g), pcDNA3- Δ Np73 α (9,2 μ g) und pCAGGS-GFP (0,9 μ g) transfiziert, und einer Ko-Immünpräzipitation wie in Abbildung 18 beschrieben unterzogen. Das Signal der mit Sternchen markierten Bande stammt von der schweren Kette des zur Präzipitation verwendeten Antikörpers.

Die jeweiligen Färbungen der Inputproben zeigen vergleichbare Mengen des $\Delta Np73\alpha$ -Proteins in den beiden letzten Proben, sowie vergleichbare HA-LEF1-Mengen in der zweiten und letzten Probe. Die α - β -Aktin-Färbung zeigt die gleichmäßige Beladung des Gels, während die α -GFP-Färbung die Transfektionseffizienzen wiedergibt. Hier ist zu bemerken, dass die beiden Proben mit transient transfiziertem HA-LEF1 erhöhte Mengen an GFP exprimieren im Vergleich zu den Proben ohne HA-LEF1 Ko-Expression. Die Präzipitation des HA-getaggtten LEF1 mit dem α -HA-Antikörper war erfolgreich und mengenmäßig im vergleichbaren Rahmen, wie im mittleren Teil der Abbildung 28 (IP: α -HA) zu sehen ist. Die Färbung mit einem α -p73 Antikörper (Ab-2; Oncogene; Verdünnung 1:1000) zeigt auf, dass $\Delta Np73\alpha$ erfolgreich und spezifisch mit HA-LEF1 kopräzipitiert werden konnte. Daher kann die Aussage getroffen werden, dass, obwohl keine Transaktivierung auf Wnt-responsive Reporter durch $\Delta Np73\alpha$ -Überexpression stattfindet, das Protein mit LEF1 und vermutlich auch mit den anderen Mitgliedern der TCF/LEF-Familie interagieren kann.

7.5 Diskussion

Die Untersuchung der ausgewählten Mitglieder der p53-Familie hinsichtlich ihres Potentials, die β -Catenin/TCF-vermittelte Transkription im Reportersystem zu transaktivieren, ergab keinen Effekt nach p53 oder $\Delta Np73\alpha$ -Überexpression. Im Hinblick auf die dennoch nachgewiesene Interaktion von $\Delta Np73\alpha$ mit LEF1, stellt sich die Frage nach dem Unterschied zu $\Delta Np63\alpha$, welches sowohl interagiert als auch transaktiviert. Wird die Interaktion von p73 mit TCF/LEF-Faktoren ebenfalls über die DNA-bindende Domäne vermittelt, wie es für $\Delta Np63\alpha$ gezeigt werden konnte (Kapitel 5.3.4), so liegt es nah, dass die Fähigkeit zur Rekrutierung von Repressorkomplexen den entscheidenden Unterschied ausmacht. Dies hätte zur Folge, dass $\Delta Np73\alpha$ im Gegensatz zu $\Delta Np63\alpha$ nicht als Brückenprotein zwischen TCF/LEF-Proteinen und Repressoren fungiert. Daraus ergibt sich Klärungsbedarf bezüglich des Bereichs, welcher mit Repressoren interagiert. Handelt es sich im Falle von $\Delta Np63\alpha$ tatsächlich um die SAM-Domäne als Interaktionsdomäne, muss untersucht werden, warum die SAM-Domäne des $\Delta Np73\alpha$ -Proteins zu dieser Bindung nicht befähigt ist. Weiterhin ist jedoch möglich, dass andere Proteinbereiche die Repressorassoziation vermitteln.

Die Interaktion von p73 mit den Transkriptionsfaktoren der TCF/LEF-Familie könnte zusätzlich den von Ueda *et al.* beobachteten Effekt erklären, bei dem TAp73 β in Saos-2-

Zellen einen β -Catenin/TCF-responsives Reporter gen transaktiviert und die durch β -Catenin induzierte Genexpression synergistisch verstärkt. Für beide Effekte wurde keine β -Catenin-Akkumulation als Folge der TAp73 β -Überexpression beobachtet. Die Δ Np73 β -Isoform zeigte in diesem Zusammenhang keinen Effekt auf die Reporter genexpression. Daher liegt die Erklärung nahe, dass TAp73 β nach Interaktion an TCF/LEF-Proteine Koaktivatoren über die Transaktivierungsdomäne rekrutiert (Ueda *et al.*, 2001).

Die Studie von Tomkova *et al.* hingegen konnte eine transaktivierende Wirkung von beiden Isoformen, TAp73 α und Δ Np73 α , auf die β -Catenin-TCF/LEF-vermittelte Transkription in gastrointestinalen Zellen zeigen. Die kombinierte Expression der TA- und Δ N-Isoform kooperierte sogar diesbezüglich. Für die Koexpression von TAp73 α und Δ Np73 α , sowie TAp73 β und Δ Np73 α konnte eine β -Catenin Akkumulation nachgewiesen werden, während Δ Np73 α allein keine Akkumulation bewirkte. Tomkova *et al.* begründen diese Beobachtungen mit der Fähigkeit von TAp73, sowohl Apoptose zu induzieren, wie auch die TCF-Aktivität zu induzieren. Die Inhibierung der apoptotischen Effekte durch Δ Np73, würden sich verstärkend auf die TAp73-vermittelte TCF-Transaktivierung auswirken (Tomkova *et al.*, 2004).

Zur Untersuchung der genauen Funktion von p73 im kanonischen Wnt-Signalweg auch im Hinblick auf die einzelnen p73-Isoformen wäre es wichtig physiologische Systeme heranzuziehen, welche unter natürlichen Bedingungen endogen p73-Proteine exprimieren. Hierbei bietet sich das Maussystem mit der p73-defizienten Maus an, welche im Gegensatz zu p63-defizienten Maus lebensfähig ist. p73-Knockout-Mäuse haben neurologische Defekte, wie auch chronische Infektionen und Entzündungen, besitzen aber keine Präferenz für spontane Tumore (Yang *et al.*, 2000). Mit Hilfe dieser Mäuse könnten verschiedene Gewebe hinsichtlich ihrer Wnt-Aktivität untersucht werden.

Was die Interferenz von p53 mit dem kanonischen Wnt-Signalweg anbetrifft, so wurden verschieden Wirkungen beobachtet. Einerseits ist dereguliertes β -Catenin in der Lage, p53 zu aktivieren (Damalas *et al.*, 1999). Andererseits kann aktiviertes p53 die β -Catenin-Mengen herunterregulieren (Sadot *et al.*, 2001), indem es einen Einfluss auf die Phosphorylierungsaktivität des Destruktionskomplexes auf β -Catenin ausübt (Levina *et al.*, 2004). Diese Effekte sind so für p63 und p73-Proteine nicht beschrieben worden. Daher basiert die Rolle von p53 im Wnt/ β -Catenin-Signalweg vermutlich auf einem anderen Mechanismus. Hier wäre es von Interesse, in weiteren Untersuchungen zwischen wildtypischem und mutiertem p53 zu unterscheiden.

8 Anhang B: Auswirkungen von Mutationen des Δ Np63 α -Proteins auf die Interferenz mit dem kanonischen Wnt-Signalweg

8.1 Einleitung – p63-Mutationen

Die Bedeutung des Tumorsuppressor-Homologs p63 im Verlauf der Embryogenese wird deutlich, betrachtet man humane Syndrome, die mit Mutationen des *p63*-Gens assoziiert sind. Eine Vielzahl an Mutationen ist bekannt, welche abhängig von der Proteindomäne, in welcher sie auftreten, in Gruppen zusammengefasst sind. Diese Gruppen ermöglichen die spezifische Untersuchung der funktionellen Domänen durch Betrachtung der Folgen einzelner Mutationen und der damit verbundenen Dysfunktionen. Abbildung 29 stellt einige dieser p63-Mutationen, die mit humanen Syndromen einhergehen, dar. Deutlich ist die Akkumulation der Mutationen innerhalb der DNA-Bindedomäne, sowie der SAM-Domäne.

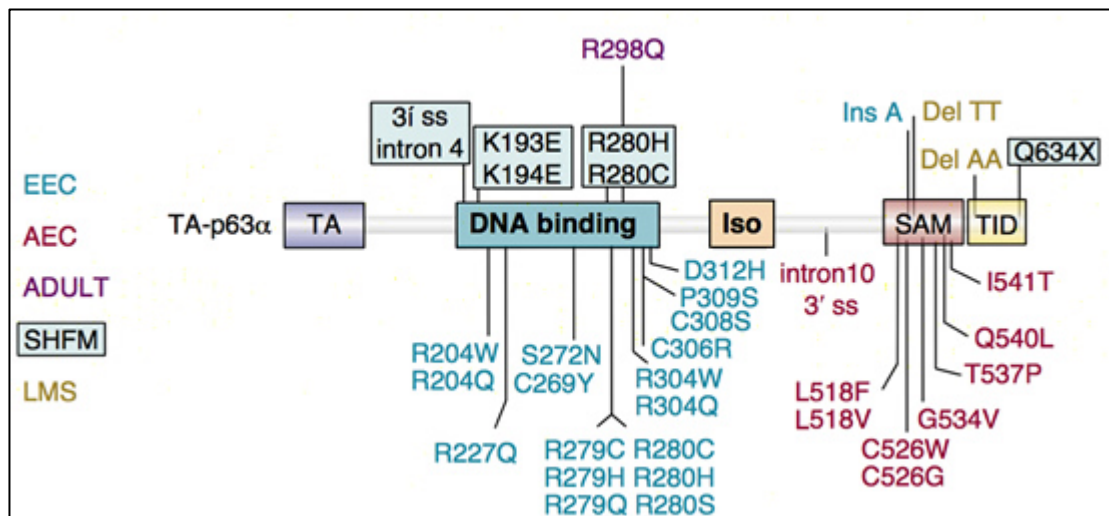


Abbildung 29: p63-Mutationen in humanen Syndromen.

Die p63 Mutationen, die mit verschiedenen humanen Syndromen assoziiert sind, sind links dargestellt. EEC, Ectrodactyly-Ectodermal Dysplasia-Clefting-Syndrom; AEC, Ankyloblepharon-Ectodermal Dysplasia-Clefting-Syndrom, ADULT, Acro-Dermato-Ungual-Lacrimal-Tooth-Syndrom; SHFM, Split Hand/Foot-Malformation; LMS, Limb-Mammary-Syndrom. Die p63-Domänen: TA, Transaktivierungs-domäne; DNA-Bindedomäne; Iso, Tetramerisierungsdomäne; SAM, sterile- α -Motiv und TID, Transaktivierungs-Inhibitions-Domäne. [aus (van Bokhoven und McKeon, 2002)]

Das EEC-Syndrom (auch Ectrodactyly-Ectodermal Dysplasia-Clefting-Syndrom) wurde im Jahre 1999 von Celli *et al.* als eine autosomal-dominante Erkrankung charakterisiert und auf eine Region innerhalb des Chromosoms 3q27 kartiert (Celli *et al.*, 1999). Die Mutationen dieser Gruppe liegen gänzlich innerhalb der DNA-bindenden Domäne des p63-Proteins und wirken sich so auf die Protein-Chromatin-Interaktion aus. Das Erscheinungsbild ist ein angeborenes Fehlen von Fingern und Zehen und/oder Lippen-Kiefer-Gaumenspalten. Auch treten Anomalien der Haut, Haare, Augenlider und Nägel auf.

Mutationen der AEC-Gruppe (Ankyloblepharon-Ectodermal Dysplasia-Clefting) befinden sich innerhalb der SAM-Domäne, wodurch die Defekte mit gestörten Interaktionen zu anderen Proteinen erklärt werden können (McGrath *et al.*, 2001). Das AEC-Syndrom, auch Hay-Wells-Syndrom genannt, ist ebenfalls autosomal dominant und weist veränderte Kopfbehaarung auch im Zusammenhang mit einer chronischen Dermatitis, fehlende Wimpern und missgebildete Nägel und Zähne auf. Desweiteren treten häufig Lippen-Gaumen-Spalten auf und die Augenlider sind verkürzt und zusammengewachsen.

Das ADULT-Syndrom (Acro-Dermato-Ungual-Lacrima-Tooth) ist eine Missense-Mutation in der p63-DNA-Bindedomäne, welche unter anderem durch Ektrodaktylie, exzessives Freckling (Pigmentveränderung) und Hypodontie charakterisiert ist (Amiel *et al.*, 2001).

Auch die Gruppe der SHFM-Syndrome (Split-Hand/Foot Malformation) zeigt Mutationen innerhalb der DNA-Bindedomäne, bzw. auch der TID auf. Die Betroffenen weisen Spalthände und -füße auf (Ilanakiev *et al.*, 2000).

Die Syndrome des LMS (Limb-Mammary Syndrom) werden durch eine Frameshift-Mutationen der Transaktivierungs-Inhibitions-Domäne im p63-Protein verursacht. Betroffene Patienten leiden an Spalthänden und -füßen, sowie dem Fehlen von Brustwarzen (van Bokhoven *et al.*, 2001).

Die Ähnlichkeit der Syndrome, trotz der unterschiedlichen Regionen in denen die Mutation auftritt, hebt die Bedeutung der p63-Proteine und ihrer korrekten Funktion während der embryonalen Entwicklung hervor.

8.2 Zusätzliches Material

pcDNA3–myc- Δ Np63 α : Die myc-getaggte Version der murinen Δ Np63 α cDNA im pcDNA3-Vektor wurde von Hans van Bokhoven, Nijmegen (Niederlande) bezogen.

pcDNA3–myc- Δ Np63 α C251R: Diese Expressionskonstrukt enthält die cDNA des myc-getaggten murinen Δ Np63 α , welches jedoch an der Aminosäure 251 eine Substitutionsmutation von einem Cystein zu einem Arginin hin trägt. Das Plasmid stammt von Hans van Bokhoven, Nijmegen (Niederlande) und wurde in (Celli *et al.*, 1999) beschrieben.

pcDNA3–myc- Δ Np63 α L459F: Auch dieses Plasmid von Hans van Bokhoven, Nijmegen (Niederlande) enthält myc-getaggtes murines Δ Np63 α mit der Substitutionsmutation Leucin 459 Phenylalanin. Beschrieben in (McGrath *et al.*, 2001).

8.3 Fragestellung

Sowohl die AEC als auch die EEC Mutationen des *p63*-Gens sind mit humanen pathogenen Syndromen assoziiert. Diese weisen auf Störungen in der Hautentwicklung und der fehlerhaften Ausbildung der meisten Hautanhangsgebilde, wie Hände/Füße, Haare, Zähne und Nägel, hin (Celli *et al.*, 1999; McGrath *et al.*, 2001). Inwieweit diese Fehlentwicklungen der Betroffenen eine Konsequenz der gestörten Interferenz des p63 mit dem kanonischen Wnt-Signalweg sind, soll im Folgenden untersucht werden. Hierfür wird das Transaktivierungspotential zweier auserwählter Mutationen, sowie die Interaktion zu TCF/LEF-Transkriptionsfaktoren im Vergleich zum wildtypischen Protein untersucht.

8.4 Ergebnisse

8.4.1 Unterschiede in der Interferenz von Δ Np63 α mit dem kanonischen Wnt-Signalweg bei AEC- und EEC-Mutanten

Die Untersuchung dieser p63-Mutanten konnte aufgrund fehlender Zelllinien mit physiologischer Expression der Mutanten nur im Überexpressionssystem durchgeführt werden. Als Repräsentant der AEC-Mutationen, welche die SAM-Domäne betreffen, wurde die Δ Np63 α L459F-Mutante ausgewählt. Dies entspricht im TAp63-Protein der L518F-Mutation. Innerhalb der EEC-Mutationen (Mutationen in der DNA-Bindedomäne) wurde die Δ Np63 α C251R-Mutante herangezogen, welche der TAp63 α C306R entspricht. Zunächst wurde das Transaktivierungspotential im Vergleich zum Wildtyp im TOPflash/FOPflash-System untersucht. Wie auch schon in vorherigen Experimenten wurden HEK-293-Zellen verwendet und der Wnt-Signalweg durch die Ko-Transfektion von β -Catenin aktiviert.

Die Abbildung 30A zeigt die Ergebnisse des Luziferase-Reporterassays.

Das wildtypische Δ Np63 α zeigt, wie gewohnt, eine Aktivierung des TOPflash-, wie auch des FOPflash-Reporters (3-fach). In Verbindung mit einer β -Catenin Ko-Expression steigt die Luziferaseaktivität des TOPflash-Konstrukts auf ein 16-faches. Dies ist etwa 3-fach mehr als der Ansatz ohne Δ Np63 α . Ein vergleichbarer Effekt, sowohl ohne als auch mit der Signalwegs-Aktivierung durch β -Catenin, ist mit der Δ Np63 α L459F-Mutante erzielt worden. Die Δ Np63 α C251R-Mutante hingegen zeigt kein transaktivierendes Potential auf. Ohne β -Catenin Ko-Expression liegt keine Aktivierung des TOPflash- und FOPflash-Reporters vor, die Werte liegen im Bereich der Leervektor-Kontrolle. Auch mit einer parallelen β -Catenin-Expression wird kein Aktivierungseffekt beobachtet. Es scheint sogar, als würde die EEC-Mutante die Aktivierung durch β -Catenin hemmen, da hier die relativen Werte niedriger ausfallen (3-fach), als in dem Ansatz mit Leervektor-Transfektion (6-fach).

In der Ko-Immunpräzipitation wurden beide Mutanten hinsichtlich ihrer Fähigkeit zur LEF1-Interaktion untersucht. Im Rahmen dieses Experiments wurden NCI-H1299-Zellen mit Expressionskonstrukten für Δ Np63 α wildtyp, L459F oder C251R und HA-LEF1 in einem 1:1 Verhältnis, sowie ein GFP-Konstrukt transfiziert. Nach 48-stündiger Inkubation wurden eine HA-Präzipitation sowie die Kontrollpräzipitation mit dem β -Galaktosidase-Antikörper durchgeführt. Präzipitierte und kopräzipitierte Proteine wurden, wie auch die

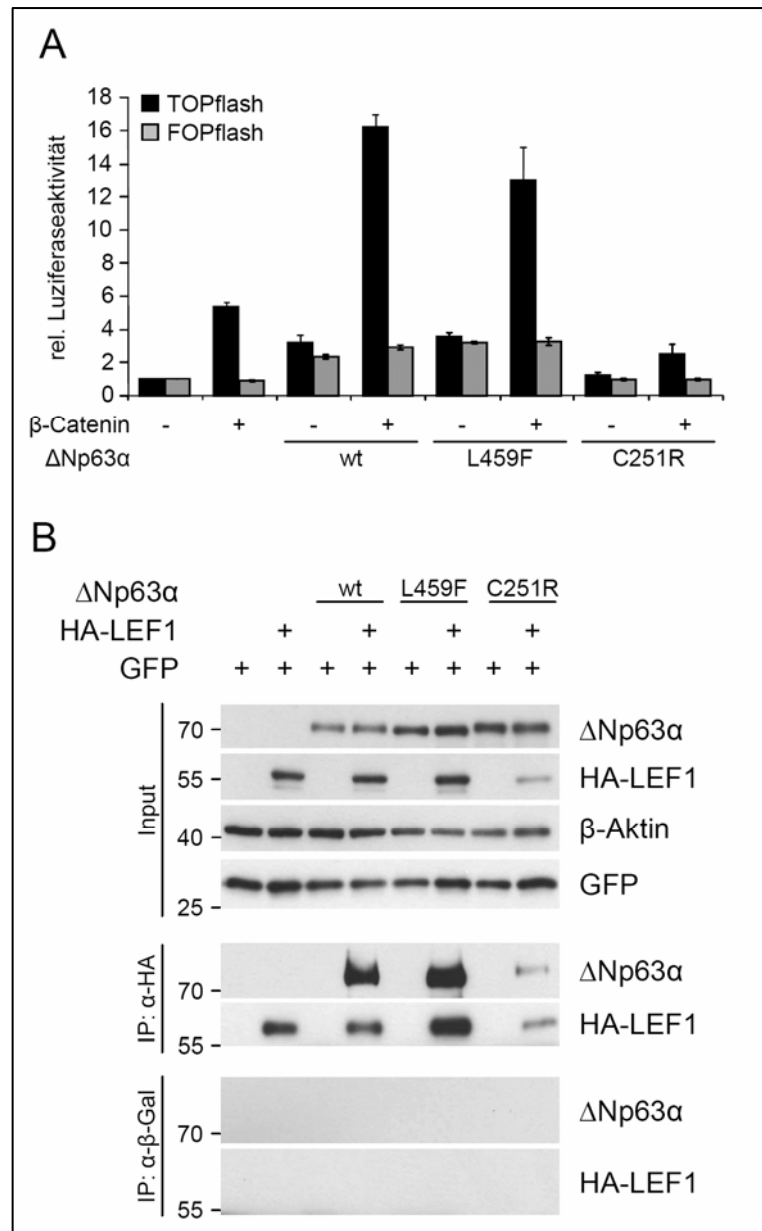


Abbildung 30: Die AEC (L459F) und EEC (C251R) Mutanten von ΔNp63α verstärken die β-Catenin-TCF-vermittelte Transkription unterschiedlich stark, obwohl beide mit HA-LEF1 interagieren

(A) ΔNp63αL459F transaktiviert den TOPflash Reporter vergleichbar stark wie der ΔNp63α wildtyp, während die C251R-Mutante keine gesteigert Reporteraktivität bei Ko-Expression von β-Catenin zeigt. HEK-293 Zellen wurden mit den angegebenen Konstrukten mit den folgenden Plasmidmengen transfiziert: pGI3-OT (TOPflash) oder -OF (FOPflash) 200 ng, pRL-*tk* 50 ng, pCneo-β-Catenin 160 ng, pcDNA3-ΔNp63α (wt/L459F/C251R) 400 ng. *Firefly*-Luziferaseaktivitäten wurden ermittelt und zu den *Renilla*-Luziferaseaktivitäten normalisiert dargestellt; Mittelwerte aus drei unabhängigen Experimenten mit Standardabweichung.

(B) Beide ΔNp63α Mutanten interagieren mit HA-LEF1. H1299 Zellen wurden mit den Expressionsplasmiden für HA-LEF1 und myc-ΔNp63α wt, L459F und C251R (je 9,2 μg) und pCAGGS-GFP (0,9 μg) transfiziert. Es folgte eine HA-Epitop-Immunpräzipitation mit anschließender Immunblot-Analyse wie in Abbildung 18 beschrieben.

Inputproben, mittels SDS-PAGE aufgetrennt und über Immunfärbung mit spezifischen Antikörpern detektiert.

Die Färbungen der Inputproben (Abbildung 30B, Input) zeigen die leicht unterschiedlichen Mengen der verschiedenen Δ Np63 α -Varianten, sowie die Mengen des HA-LEF1-Proteins.

Deutlich zu sehen ist, dass bei Ko-Expression mit der Δ Np63 α C251R-Mutante das HA-LEF1-Level stark reduziert vorliegt. Die α - β -Aktin-Färbung zeigt die gleichmäßige Ladekontrolle, die α -GFP-Färbung die Transfektionseffizienzen.

Die Präzipitation des HA-getaggen LEF1 mit dem α -HA-Antikörper spiegelt die bereits beobachteten Mengen des Inputs wieder, mit einem deutlich schwächeren Signal im Falle der Δ Np63 α C251R-Ko-Expression (Abbildung 30B (IP: α -HA)). Die Färbung der HA-Präzipitation mit einem Antikörper gegen das kopräzipitierte Δ Np63 α zeigt auf, dass neben dem wildtypischen Δ Np63 α oder beide Mutanten erfolgreich und spezifisch mit HA-LEF1 kopräzipitiert wurden. Die schwächere Kopräzipitation der Δ Np63 α C251R-Mutante ist vermutlich mit der schwächeren Expression des HA-LEF1 in diesem Ansatz zu begründen.

Zusammenfassend ist der Effekt der AEC-Mutante (Δ Np63 α L459F) dem des wildtypischen Proteins sehr ähnlich, während die EEC-Mutante (Δ Np63 α C251R) trotz des unveränderten Interaktionspotentials zu LEF1 nicht mehr in der Lage ist das TOPflash/FOPflash-System zu transaktivieren.

8.5 Diskussion

Der Einfluss der p63 AEC (Δ Np63 α L459F), wie auch der EEC-Mutante (Δ Np63 α C251R) auf den kanonischen Wnt-Signalweg gibt Hinweise zur genaueren Aufklärung des zu Grunde liegenden Mechanismus. Im Hinblick auf die Interaktion von Δ Np63 α mit den TCF/LEF-Transkriptionsfaktoren wird deutlich, dass die Interaktion zwar über die DNA-Bindedomäne des p63-Proteins vermittelt wird (Kapitel 5.3.4), eine Mutation innerhalb der DNA-Bindedomäne (EEC) sich auf diese Interaktion jedoch nicht auswirkt. Da die Δ Np63 α C251R-Mutante keine DNA-Bindekapazität vermutlich aufgrund einer strukturellen Deformation besitzt (Celli *et al.*, 1999), kann daraus geschlossen werden, dass die Bindung des p63 an Chromatin nicht ausschlaggebend für die Ausbildung der Interaktion ist. Auch die Existenz einer Mutation innerhalb der SAM-Domäne (AEC, Δ Np63 α L459F) hat keinen Einfluss auf die Bindung der TCF/LEF-Transkriptionsfaktoren.

Während also die Mutationen in den verschiedenen Proteindomänen von p63 keine Auswirkungen auf die Interaktion zu TCF/LEF-Proteinen haben, sind Unterschiede im Transaktivierungspotential eines Wnt-responsiven Reporters zu verzeichnen. Die AEC-Mutante ($\Delta Np63\alpha L459F$) verhält sich ähnlich dem wildtypischen Protein und verstärkt die β -Catenin-vermittelte Transkription. Hingegen ist für die EEC-Mutante ($\Delta Np63\alpha C251R$), welche eine Aminosäuresubstitution innerhalb der DNA-Bindedomäne trägt, keine Transaktivierung nach Ko-Expression zu beobachten. Da dieses Protein weiterhin an TCF/LEF-Proteine bindet, könnte dieser Effekt damit erklärt werden, dass die Repressoren vielleicht doch über die DNA-Bindedomäne rekrutiert werden.

9 Literatur

- Aberle H, Bauer A, Stappert J, Kispert A und Kemler R. (1997). Beta-catenin is a target for the ubiquitin-proteasome pathway. *EMBO J.*, **16**, 3797.
- Aberle H, Butz S, Stappert J, Weissig H, Kemler R und Hoschuetzky H. (1994). Assembly of the cadherin-catenin complex in vitro with recombinant proteins. *J Cell Sci*, **107**, 3655-3663.
- Adachi Y, Yamamoto H, Itoh F, Hinoda Y, Okada Y und Imai K. (1999). Contribution of matrilysin (MMP-7) to the metastatic pathway of human colorectal cancers. *Gut*, **45**, 252-258.
- Adorno M, Cordenonsi M, Montagner M, Dupont S, Wong C, Hann B, Solari A, Bobisse S, Rondina M, Guzzardo V, Parenti A, Rosato A, Bicciato S, Balmain A und Piccolo S. (2009). A Mutant-p53/Smad complex opposes p63 to empower TGFbeta-induced metastasis. *Cell*, **137**, 87-98.
- Alonso L und Fuchs E. (2003). Stem cells in the skin: waste not, Wnt not. *Genes & Development*, **17**, 1189-1200.
- Amiel J, Bougeard G, Francannet C, Raclin V, Munnich A, Lyonnet S und Frebourg T. (2001). TP63 gene mutation in ADULT syndrome. *Eur J Hum Genet*, **9**, 642-645.
- Andl T, Reddy S, Gaddapara T und Millar S. (2002). WNT signals are required for the initiation of hair follicle development. *Dev Cell*, **2**, 643-653.
- Arce L, Pate K und Waterman M. (2009). Groucho binds two conserved regions of LEF-1 for HDAC-dependent repression. *BMC Cancer*, **9**, 159.
- Arnold S, Stappert J, Bauer A, Kispert A, Herrmann B und Kemler R. (2000). Brachyury is a target gene of the Wnt/beta-catenin signaling pathway. *Mech Dev*, **91**, 249-258.
- Asashima M, Nakano H, Shimada K, Kinoshita K, Ishii K, Shibai H und Ueno N. (1990). Mesodermal induction in early amphibian embryos by activin A (erythroid differentiation factor). *Roux's Arch Dev Biol*, **198**, 330-335.
- Augustin M, Bamberger C, Paul D und Schmale H. (1998). Cloning and chromosomal mapping of the human p53-related KET gene to chromosome 3q27 and its murine homolog Ket to mouse chromosome 16. *Mamm Genome*, **9**, 899-902.
- Barbieri CE und Pietenpol JA. (2006). p63 and epithelial biology. *Exp Cell Res*, **312**, 695 - 706.
- Barbieri CE, Tang LJ, Brown KA und Pietenpol JA. (2006). Loss of p63 leads to increased cell migration and up-regulation of genes involved in invasion and metastasis. *Cancer Res*, **66**, 7589 - 7597.
- Barker N, Hurlstone A, Musisi H, Miles A, Bienz M und Clevers H. (2001). The chromatin remodelling factor Brg-1 interacts with beta-catenin to promote target gene activation. *EMBO J*, **20**, 4935-4943.
- Barker N, Morin P und Clevers H. (2000). The Yin-Yang of TCF/beta-catenin signaling. *Adv Cancer Res*, **77**, 1-24.
- Barrera FN, Poveda JA, González-Ros JM und Neira JL. (2003). Binding of the C-terminal Sterile α Motif (SAM) Domain of Human p73 to Lipid Membranes. *Journal of Biological Chemistry*, **278**, 46878-46885.
- Barton C, Tahinci E, Barbieri C, Johnson K, Hanson A, Jernigan K, Chen T, Lee E und Pietenpol J. (2009). DeltaNp63 antagonizes p53 to regulate mesoderm induction in *Xenopus laevis*. *Dev Biol*, **329**, 130-139.
- Behrens J, Jerchow, BA, Würtele, M, Grimm, J, Asbrand, C, Wirtz, R, Kühl, M, Wedlich, D, Birchmeier, W. (1998). Functional interaction of an axin homolog, conductin, with beta-catenin, APC, and GSK3beta. *Science*, **280**, 596-599.
- Behrens J, von Kries J, Kühl M, Bruhn L, Wedlich D, Grosschedl R und Birchmeier W. (1996). Functional interaction of β -catenin with the transcription factor LEF-1. *Nature*, **382**, 638 - 642.

- Bernard P, Fleming A, Lacombe A, Harley VR und Vilain E. (2008). Wnt4 inhibits beta-catenin/TCF signalling by redirecting beta-catenin to the cell membrane. *Biology of the Cell*, **100**, 167-177.
- Bhanot P, Brink M, Harryman Samos C, Hsieh JC und Wang YS. (1996). A new member of the frizzled family from *Drosophila* functions as a Wingless receptor. *Nature*, **382**, 225.
- Bhatia N und Spiegelman V. (2005). Activation of Wnt/beta-catenin/Tcf signaling in mouse skin carcinogenesis. *Mol Carcinog*, **42**, 213-221.
- Bianchi M und Beltrame M. (1998). Flexing DNA: HMG-box proteins and their partners. *Am J Hum Genet*, **63**, 1573-1577.
- Bienz M und Clevers H. (2003). Armadillo/[beta]-catenin signals in the nucleus - proof beyond a reasonable doubt? *Nat Cell Biol*, **5**, 179-182.
- Bilic J, Huang Y, Davidson G, Zimmermann T, Cruciat C, Bienz M und Niehrs C. (2007). Wnt induces LRP6 signalosomes and promotes dishevelled-dependent LRP6 phosphorylation. *Science*, **316**, 1619-1622.
- Billin AN, Thirlwell H und Ayer DE. (2000). beta-Catenin-Histone Deacetylase Interactions Regulate the Transition of LEF1 from a Transcriptional Repressor to an Activator. *Mol. Cell. Biol.*, **20**, 6882-6890.
- Birkaya B, Ortt K und Sinha S. (2007). Novel in vivo targets of DeltaNp63 in keratinocytes identified by a modified chromatin immunoprecipitation approach. *BMC Molecular Biology*, **8**, 43.
- Blandino G und Dobbstein M. (2004). p73 and p63: why do we still need them? *Cell Cycle*, **3**, 886-894.
- Bode AM und Dong Z. (2004). Post-translational modification of p53 in tumorigenesis. *Nat Rev Cancer*, **4**, 793-805.
- Boras-Granic K, Chang H, Grosschedl R und Hamel P. (2006). Lef1 is required for the transition of Wnt signaling from mesenchymal to epithelial cells in the mouse embryonic mammary gland. *Dev Biol*, **295**, 219-231.
- Brabletz T, Jung A, Dag S, Hlubek F und Kirchner T. (1999). beta-Catenin Regulates the Expression of the Matrix Metalloproteinase-7 in Human Colorectal Cancer. *Am J Pathol*, **155**, 1033-1038.
- Brantjes H, Roose J, van de Wetering M und Clevers H. (2001). All Tcf HMG box transcription factors interact with Groucho-related co-repressors. *Nucl. Acids Res.*, **29**, 1410-1419.
- Brehm A, Miska EA, McCance DJ, Reid JL, Bannister AJ und Kouzarides T. (1998). Retinoblastoma protein recruits histone deacetylase to repress transcription. *Nature*, **391**, 597-601.
- Brooks C und Gu W. (2003). Ubiquitination, phosphorylation and acetylation: the molecular basis for p53 regulation *Current Opinion in Cell Biology*, **15**, 164-171.
- Brunori M, Malerba M, Kashiwazaki H und Iggo R. (2001). Replicating Adenoviruses That Target Tumors with Constitutive Activation of the wnt Signaling Pathway. *J. Virol.*, **75**, 2857-2865.
- Byrne C, Tainsky M und Fuchs E. (1994). Programming gene expression in developing epidermis. *Development*, **120**, 2369-2383.
- Candi E, Rufini A, Terrinoni A, Dinsdale D, Ranalli M, Paradisi A, De Laurenzi V, Spagnoli LG, Catani MV, Ramadan S, Knight RA und Melino G. (2006). Differential roles of p63 isoforms in epidermal development: selective genetic complementation in p63 null mice. *Cell Death Differ*, **13**, 1037-1047.
- Carroll DK, Carroll JS, Leong C-O, Cheng F, Brown M, Mills AA, Brugge JS und Ellisen LW. (2006). p63 regulates an adhesion programme and cell survival in epithelial cells. *Nat Cell Biol*, **8**, 551-561.
- Cavallo R, Cox R, Moline M, Roose J und Polevoy G. (1998). *Drosophila* TCF and Groucho interact to repress wingless signaling activity. *Nature*, **395**, 604.

- Celli J, Duijf P, Hamel BCJ, Bamshad M, Kramer B, Smits APT, Newbury-Ecob R, Hennekam RCM, Van Buggenhout G, van Haeringen A, Woods CG, van Essen AJ, de Waal R, Vriend G, Haber DA, Yang A, McKeon F, Brunner HG und van Bokhoven H. (1999). Heterozygous Germline Mutations in the p53 Homolog p63 Are the Cause of EEC Syndrome. *Cell*, **99**, 143-153.
- Celso CL, Prowse DM und Watt FM. (2004). Transient activation of beta-catenin signalling in adult mouse epidermis is sufficient to induce new hair follicles but continuous activation is required to maintain hair follicle tumours. *Development*, **131**, 1787-1799.
- Chakrabarti S und Nucifora G. (1999). The leukemia-associated gene TEL encodes a transcription repressor which associates with SMRT and mSin3A. *Biochem Biophys Res Commun*, **264**, 871-877.
- Chan E, Gat U, McNiff JM und Fuchs E. (1999). A common human skin tumour is caused by activating mutations in [beta]-catenin. *Nat Genet*, **21**, 410-413.
- Chen G, Fernandez J, Mische S und Courey AJ. (1999). A functional interaction between the histone deacetylase Rpd3 and the corepressor groucho in Drosophila development. *Genes Dev.*, **13**, 2218.
- Cheng Q, Chen L, Li Z, Lane WS und Chen J. (2009). ATM activates p53 by regulating MDM2 oligomerization and E3 processivity. *EMBO J*, **advance online publication**.
- Chi S-W, Ayed A und Arrowsmith CH. (1999). Solution structure of a conserved C-terminal domain of p73 with structural homology to the SAM domain. *EMBO J*, **18**, 4438-4445.
- Choi H, Batsakis J, Zhan F, Sturgis E, Luna M und El-Naggar A. (2002). Differential expression of p53 gene family members p63 and p73 in head and neck squamous tumorigenesis. *Human pathology*, **33**, 158-164.
- Christian J und Moon R. (1993). Interactions between *Xwnt-8* and Spemann organizer signaling pathways generate dorsoventral pattern in the embryonic mesoderm of *Xenopus*. *Genes Dev*, **7**, 13-28.
- Chu EY, Hens J, Andl T, Kairo A, Yamaguchi TP, Brisken C, Glick A, Wysolmerski JJ und Millar SE. (2004). Canonical WNT signaling promotes mammary placode development and is essential for initiation of mammary gland morphogenesis. *Development*, **131**, 4819-4829.
- Cicero DO, Falconi M, Candi E, Mele S, Cadot B, Di Venere A, Rufini S, Melino G und Desideri A. (2006). NMR structure of the p63 SAM domain and dynamical properties of G534V and T537P pathological mutants, identified in the AEC syndrome. *Cell Biochem Biophys*, **44**, 475-489.
- Clevers H. (2006). Wnt/beta-catenin signaling in development and disease. *Cell*, **127**, 469-480.
- Cobas M, Wilson A, Ernst B, Mancini SJC, MacDonald HR, Kemler R und Radtke F. (2004). beta-Catenin Is Dispensable for Hematopoiesis and Lymphopoiesis. *J. Exp. Med.*, **199**, 221-229.
- Collins RT und Treisman JE. (2000). Osa-containing Brahma chromatin remodeling complexes are required for the repression of Wingless target genes. *Genes & Development*, **14**, 3140-3152.
- Concin N, Becker K, Slade N, Erster S, Mueller-Holzner E, Ulmer H, Daxenbichler G, Zeimet A, Zeillinger R, Marth C und Moll UM. (2004). Transdominant Δ TAp73 Isoforms Are Frequently Up-regulated in Ovarian Cancer. Evidence for Their Role as Epigenetic p53 Inhibitors in Vivo. *Cancer Res*, **64**, 2449-2460.
- Cong F und Varmus H. (2004). Nuclear-cytoplasmic shuttling of Axin regulates subcellular localization of β -catenin. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **101**, 2882-2887.

- Cordenonsi M, Montagner M, Adorno M, Zacchigna L, Martello G, Mamidi A, Soligo S, Dupont S und Piccolo S. (2007). Integration of TGF-beta and Ras/MAPK signaling through p53 phosphorylation. *Science*, **315**, 840-843.
- Crawford H, Fingleton B, Rudolph-Owen L, Goss K, Rubinfeld B, Polakis P und Matrisian L. (1999). The metalloproteinase matrilysin is a target of beta-catenin transactivation in intestinal tumors. *Oncogene*, **18**, 2883-2891.
- Crook T, Nicholls J, Brooks L, O'Nions J und Allday M. (2000). High level expression of deltaN-p63: a mechanism for the inactivation of p53 in undifferentiated nasopharyngeal carcinoma (NPC)? *Oncogene*, **19**, 3439-3444.
- Dailey L und Basilico C. (2001). Coevolution of HMG domains and homeodomains and the generation of transcriptional regulation by Sox/POU complexes. *J Cell Physiol*, **186**, 315-328.
- Dajani R, Fraser E, Roe S, Young N, Good V, Dale T und Pearl L. (2001). Crystal structure of glycogen synthase kinase 3 beta: structural basis for phosphate-primed substrate specificity and autoinhibition. *Cell*, **105**, 721-732.
- Damalas A, Ben-Ze'ev A, Simcha I, Shtutman M, Leal JFM, Zhurinsky J, Geiger B und Oren M. (1999). Excess beta-catenin promotes accumulation of transcriptionally active p53. *EMBO J*, **18**, 3054-3063.
- Damianitsch K. (2009). Die Funktion des Wnt Antagonisten XsFRP5 während der frühembryonalen Musterbildung des Entoderms in *Xenopus laevis*.
- Daniels D und Weis W. (2005). Beta-catenin directly displaces Groucho/TLE repressors from Tcf/Lef in Wnt-mediated transcription activation. *Nat Struct Mol Biol*, **12**, 364-371.
- Danovi D, Meulmeester E, Pasini D, Migliorini D, Capra M, Frenk R, de Graaf P, Francoz S, Gasparini P, Gobbi A, Helin K, Pelicci PG, Jochemsen AG und Marine J-C. (2004). Amplification of Mdmx (or Mdm4) Directly Contributes to Tumor Formation by Inhibiting p53 Tumor Suppressor Activity. *Mol. Cell. Biol.*, **24**, 5835-5843.
- DasGupta R und Fuchs E. (1999). Multiple roles for activated LEF/TCF transcription complexes during hair follicle development and differentiation. *Development*, **126**, 4557-4568.
- Davidson G, Wu W, Shen J, Bilic J, Fenger U, Stanek P, Glinka A und Niehrs C. (2005). Casein kinase 1 [gamma] couples Wnt receptor activation to cytoplasmic signal transduction. *Nature*, **438**, 867-872.
- Decker K, Goldman D, Grash C und Sussel L. (2006). Gata6 is an important regulator of mouse pancreas development. *Dev Biol*, **298**, 415-429.
- DeYoung MP, Johannessen CM, Leong CO, Faquin W, Rocco JW und Ellisen LW. (2006). Tumor-specific p73 up-regulation mediates p63 dependence in squamous cell carcinoma. *Cancer Res*, **66**, 9362-8.
- Dohn M, Zhang S und Chen X. (2001). p63alpha and DeltaNp63alpha can induce cell cycle arrest and apoptosis and differentially regulate p53 target genes. *Oncogene*, **20**, 3193-3205.
- Dominguez G, Silva J, Silva J, Garcia J, Sanchez A, Navarro A, Gallego I, Provencio M, España P und Bonilla F. (2001). Wild type p73 overexpression and high-grade malignancy in breast cancer. *Breast Cancer Res Treat*, **66**, 183-190.
- Donehower LA, Harvey M, Slagle BL, McArthur MJ, Montgomery CA, Butel JS und Bradley. (1992). Mice deficient for p53 are developmentally normal but susceptible to spontaneous tumours. *Nature*, **356**, 215-221.
- Douc-Rasy S, Barrois M, Echeynne M, Kaghad M, Blanc E, Raguenez G, Goldschneider D, Terrier-Lacombe M-J, Hartmann O, Moll U, Caput D und Benard J. (2002). ΔNp73α Accumulates in Human Neuroblastic Tumors. *Am J Pathol*, **160**, 631-639.
- Duijf PHG, Vanmolkot KRJ, Propping P, Friedl W, Krieger E, McKeon F, Dotsch V, Brunner HG und van Bokhoven H. (2002). Gain-of-function mutation in ADULT syndrome reveals the presence of a second transactivation domain in p63. *Hum. Mol. Genet.*, **11**, 799-804.

- Dunty WC, Jr., Biris KK, Chalamalasetty RB, Taketo MM, Lewandoski M und Yamaguchi TP. (2008). Wnt3a/ -catenin signaling controls posterior body development by coordinating mesoderm formation and segmentation. *Development*, **135**, 85-94.
- Eger A, Stockinger A, Schaffhauser B, Beug H und Foisner R. (2000). Epithelial Mesenchymal Transition by c-Fos Estrogen Receptor Activation Involves Nuclear Translocation of beta-Catenin and Upregulation of beta-Catenin/Lymphoid Enhancer Binding Factor-1 Transcriptional Activity. *J. Cell Biol.*, **148**, 173-188.
- Eisbacher M, Holmes ML, Newton A, Hogg PJ, Khachigian LM, Crossley M und Chong BH. (2003). Protein-Protein Interaction between Fli-1 and GATA-1 Mediates Synergistic Expression of Megakaryocyte-Specific Genes through Cooperative DNA Binding. *Mol. Cell. Biol.*, **23**, 3427-3441.
- Emmrich S, Wang W, John K, Li W und Putzer B. (2009). Antisense gapmers selectively suppress individual oncogenic p73 splice isoforms and inhibit tumor growth in vivo. *Molecular Cancer*, **8**, 61.
- Felgner P, Gadek, TR, Holm, M, Roman, R, Chan, HW, Wenz, M, Northrop, JP, Ringold, GM, Danielsen, M. (1987). Lipofection: a highly efficient, lipid-mediated DNA-transfection procedure. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **84**, 7413-7417.
- Felgner P, Ringold, GM. (1989). Cationic liposome-mediated transfection. *Nature*, **337**, 387-388.
- Fenrick R, Amann JM, Lutterbach B, Wang L, Westendorf JJ, Downing JR und Hiebert SW. (1999). Both TEL and AML-1 Contribute Repression Domains to the t(12;21) Fusion Protein. *Mol. Cell. Biol.*, **19**, 6566-6574.
- Filali M, Cheng N, Abbott D, Leontiev V und Engelhardt JF. (2002). Wnt-3A/beta-Catenin Signaling Induces Transcription from the LEF-1 Promoter. *Journal of Biological Chemistry*, **277**, 33398-33410.
- Fillippovich I, Sorokina N, Gatei M, Haupt Y, Hobson K, Moallem E, Spring K, Mould M, McGuckin M, Lavin M und Khanna K. (2001). Transactivation-deficient p73alpha (p73Deltaexon2) inhibits apoptosis and competes with p53. *Oncogene*, **20**, 514-522.
- Fontemaggi G, Kela I, Amariglio N, Rechavi G, Krishnamurthy J, Strano S, Sacchi A, Givol D und Blandino G. (2002). Identification of Direct p73 Target Genes Combining DNA Microarray and Chromatin Immunoprecipitation Analyses. *Journal of Biological Chemistry*, **277**, 43359-43368.
- Funayama N, Fagotto F, McCrean P und Gumbiner BM. (1995). Embryonic axis induction by the armadillo repeat domain of beta- catenin: evidence for intracellular signaling. *J. Cell Biol.*, **128**, 959-968.
- Gat U, DasGupta R, Degenstein L und Fuchs E. (1998). De Novo hair follicle morphogenesis and hair tumors in mice expressing a truncated beta-catenin in skin. *Cell*, **95**, 605-614.
- Ghioni P, Bolognese F, Duijf PHG, van Bokhoven H, Mantovani R und Guerrini L. (2002). Complex Transcriptional Effects of p63 Isoforms: Identification of Novel Activation and Repression Domains. *Mol. Cell. Biol.*, **22**, 8659-8668.
- Giese K, Amsterdam A und Grosschedl R. (1991). DNA-binding properties of the HMG domain of the lymphoid-specific transcriptional regulator LEF-1. *Genes & Development*, **5**, 2567-2578.
- Gill G und Ptashne M. (1988). Negative effect of the transcriptional activator GAL4. *Nature*, **334**, 721-724.
- Glinka A, Wu W, Delius H, Monaghan AP, Blumenstock C und Niehrs C. (1998). Dickkopf-1 is a member of a new family of secreted proteins and functions in head induction. *Nature*, **391**, 357.
- Glinka A, Wu W, Onichtchouk D, Blumenstock C und Niehrs C. (1997). Head induction by simultaneous repression of Bmp and Wnt signalling in Xenopus. *Nature*, **389**, 517-519.

- Graham T, Weaver C, Mao F, Kimelman D und Xu W. (2000). Crystal structure of a beta-catenin/Tcf complex. *Cell*, **103**, 885-896.
- Grob T, Novak U, Maisse C, Barcaroli D, Lüthi A, Pirnia F, Hügli B, Graber H, De Laurenzi V, Fey M, Melino G und Tobler A. (2001). Human delta Np73 regulates a dominant negative feedback loop for TAp73 and p53. *Cell Death Differ*, **8**, 1213-1223.
- Groden J, Thliveris A, Samowitz W, Carlson M, Gelbert L, Albertsen H, Joslyn G, Stevens J, Spirio L, Robertson M, et al. (1991). Identification and characterization of the familial adenomatous polyposis coli gene. *Cell*, **66**, 589-600.
- Grosschedl R, Giese K und Pagel J. (1994). HMG domain proteins: architectural elements in the assembly of nucleoprotein structures. *Trends Genet*, **10**, 94-100.
- Gu X, Coates P, Boldrup L und Nylander K. (2008). p63 contributes to cell invasion and migration in squamous cell carcinoma of the head and neck. *Cancer letters*, **263**, 26-34.
- Guidez F, Petrie K, Ford AM, Lu H, Bennett CA, MacGregor A, Hannemann J, Ito Y, Ghysdael J, Greaves M, Wiedemann LM und Zelent A. (2000). Recruitment of the nuclear receptor corepressor N-CoR by the TEL moiety of the childhood leukemia-associated TEL-AML1 oncoprotein. *Blood*, **96**, 2557-2561.
- Habas R, Dawid IB und He X. (2003). Coactivation of Rac and Rho by Wnt/Frizzled signaling is required for vertebrate gastrulation. *Genes & Development*, **17**, 295-309.
- Habas R, Kato Y und He X. (2001). Wnt/Frizzled Activation of Rho Regulates Vertebrate Gastrulation and Requires a Novel Formin Homology Protein Daam1 *Cell*, **107**, 843-854.
- Hagiwara K, McMenamin MG, Miura K und Harris CC. (1999). Mutational Analysis of the p63/p73L/p51/p40/CUSP/KET Gene in Human Cancer Cell Lines Using Intronic Primers. *Cancer Res*, **59**, 4165-4169.
- Hamilton FS, Wheeler GN und Hoppler S. (2001). Difference in XTcf-3 dependency accounts for change in response to beta-catenin-mediated Wnt signalling in *Xenopus blastula*. *Development*, **128**, 2063-2073.
- Harlow E und Lane D. (1988). *Antibodies - A Laboratory Manual*. Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York.
- Harper J. (2004). Neddylation of the Guardian *Cell*, **118**, 2-4.
- Harwood A. (2001). Regulation of GSK-3: a cellular multiprocessor. *Cell*, **105**, 821-824.
- Haupt S, Berger M, Goldberg Z und Haupt Y. (2003). Apoptosis - the p53 network. *J Cell Sci*, **116**, 4077-4085.
- He TC, Sparks AB, Rago C, Hermeking H und Zawel L. (1998). Identification of c-MYC as a target of the APC pathway. *Science*, **281**, 1509.
- Heasman J, Crawford A, Goldstone K, Garner-Hamrick P, Gumbiner B, McCrea P, Kintner C, Noro C und Wylie C. (1994). Overexpression of cadherins and underexpression of beta-catenin inhibit dorsal mesoderm induction in early *Xenopus* embryos. *Cell*, **79**, 791-803.
- Helton ES, Zhu J und Chen X. (2006). The unique NH2-terminally deleted (DeltaN) residues, the PXXP motif, and the PPXY motif are required for the transcriptional activity of the DeltaN variant of p63. *J Biol Chem*, **281**, 2533 - 2542.
- Henderson BR. (2000). Nuclear-cytoplasmic shuttling of APC regulates beta-catenin subcellular localization and turnover. *Nat Cell Biol*, **2**, 653-660.
- Herrmann BG, Labeit S, Poustka A, King TR und Lehrach H. (1990). Cloning of the T gene required in mesoderm formation in the mouse. *Nature*, **343**, 617-622.
- Hibi K, Trink B, Patturajan M, Westra WH, Caballero OL, Hill DE, Ratovitski EA, Jen J und Sidransky D. (2000). AIS is an oncogene amplified in squamous cell carcinoma. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **97**, 5462-5467.

- Higashikawa K, Yoneda S, Tobiume K, Taki M, Shigeishi H und Kamata N. (2007). Snail-Induced Down-Regulation of DeltaNp63alpha Acquires Invasive Phenotype of Human Squamous Cell Carcinoma. *Cancer Res*, **67**, 9207-9213.
- Hill TP, Taketo MM, Birchmeier W und Hartmann C. (2006). Multiple roles of mesenchymal beta-catenin during murine limb patterning. *Development*, **133**, 1219-1229.
- Hoang B, Moos M, Vukicevic S und Luyten FP. (1996). Primary structure and tissue distribution of FRZB, a novel protein related to Drosophila frizzled, suggest a role in skeletal morphogenesis. *J. Biol. Chem.*, **271**, 26131.
- Honda R und Yasuda H. (1999). Association of p19ARF with Mdm2 inhibits ubiquitin ligase activity of Mdm2 for tumor suppressor p53. *EMBO J*, **18**, 22-27.
- Hoppler S, Brown JD und Moon RT. (1996). Expression of a dominant-negative Wnt blocks induction of MyoD in Xenopus embryos. *Genes & Development*, **10**, 2805-2817.
- Hoppler S und Moon R. (1998). BMP-2/-4 and Wnt-8 cooperatively pattern the Xenopus mesoderm. *Mech Dev*, **71**, 119-129.
- Horikoshi N, Usheva A, Chen J, Levine AJ, Weinmann R und Shenk T. (1995). Two domains of p53 interact with the TATA-binding protein, and the adenovirus 13S E1A protein disrupts the association, relieving p53-mediated transcriptional repression. *Mol. Cell. Biol.*, **15**, 227-234.
- Hovanes K, Li TW, Munguia JE, Truong T und Milovanovic T. (2001). Beta-catenin-sensitive isoforms of lymphoid enhancer factor-1 are selectively expressed in colon cancer. *Nat. Genet.*, **28**, 53.
- Howe L und Brown A. (2004). Wnt signaling and breast cancer. *Cancer Biol Ther*, **3**, 36-41.
- Hu H, Xia SH, Li AD, Xu X, Cai Y, Han YL, Wei F, Chen BS, Huang XP, Han YS, Zhang JW, Zhang X, Wu M und Wang MR. (2002). Elevated expression of p63 protein in human esophageal squamous cell carcinomas. *Int J Cancer*, **102**, 580-583.
- Huang Y, Wu G, Guo Z, Osada M, Fomenkov T, Park H, Trink B, Sidransky D, Fomenkov A und Ratovitski E. (2004). Altered sumoylation of p63alpha contributes to the split-hand/foot malformation phenotype. *Cell Cycle*, **3**, 1587-1596.
- Huber O, Korn R, McLaughlin J, Ohsugi M, Herrmann BG und Kemler R. (1996). Nuclear localization of beta-catenin by interaction with transcription factor LEF-1. *Mechanisms of Development*, **59**, 3-10.
- Huelsken J, Vogel R, Erdmann B, Cotsarelis G und Birchmeier W. (2001). beta-Catenin controls hair follicle morphogenesis and stem cell differentiation in the skin. *Cell*, **105**, 533-545.
- Ianakev P, Kilpatrick M, Toudjarska I, Basel D, Bighton P und Tsipouras P. (2000). Split-hand/split-foot malformation is caused by mutations in the p63 gene on 3q27. *Am J Hum Genet*, **67**, 59-66.
- Ikawa S, Nakagawara A und Ikawa Y. (1999). p53 family genes: structural comparison, expression and mutation. *Cell Death Differ*, **6**, 1154-1161.
- Ikeda S, Kishida S, Yamamoto H, Murai H, Koyama S und Kikuchi A. (1998). Axin, a negative regulator of the Wnt signaling pathway, forms a complex with GSK-3beta and beta-catenin and promotes GSK-3beta-dependent phosphorylation of beta-catenin. *EMBO J*, **17**, 1371-1384.
- Imbert A, Eelkema R, Jordan S, Feiner H und Cowin P. (2001). Delta N89 beta-catenin induces precocious development, differentiation, and neoplasia in mammary gland. *J Cell Biol*, **153**, 555-568.
- Irwin M, Marin MC, Phillips AC, Seelan RS, Smith DI, Liu W, Flores ER, Tsai KY, Jacks T, Vousden KH und Kaelin Jr WG. (2000). Role for the p53 homologue p73 in E2F-1-induced apoptosis. *Nature*, **407**, 645-648.

- Ishimoto O, Kawahara C, Enjo K, Obinata M, Nukiwa T und Ikawa S. (2002). Possible Oncogenic Potential of DeltaNp73: A Newly Identified Isoform of Human p73. *Cancer Res*, **62**, 636-641.
- Itasaki N, Jones CM, Mercurio S, Rowe A, Domingos PM, Smith JC und Krumlauf R. (2003). Wise, a context-dependent activator and inhibitor of Wnt signalling. *Development*, **130**, 4295-4305.
- Ito M, Yang Z, Andl T, Cui C, Kim N, Millar SE und Cotsarelis G. (2007). Wnt-dependent de novo hair follicle regeneration in adult mouse skin after wounding. *Nature*, **447**, 316-320.
- Jacks T, Remington, L., Williams, B.O., Schmitt, E.M., Halachmi, S., Bronson, R.T. and Weinberg RA. (1994). Tumor spectrum analysis in p53-mutant mice. *Curr Biol*, **4**, 1-7.
- Jho E-h, Zhang T, Domon C, Joo C-K, Freund J-N und Costantini F. (2002). Wnt/beta-Catenin/Tcf Signaling Induces the Transcription of Axin2, a Negative Regulator of the Signaling Pathway. *Mol. Cell. Biol.*, **22**, 1172-1183.
- Johnstone R. (2002). Histone-deacetylase inhibitors: novel drugs for the treatment of cancer. *Nat Rev Drug Discov*, **1**, 287-299.
- Ju J, Maeng J, Zemedkun M, Ahronovitz N, Mack J, Ferretti J, Gelmann E und Gruschus J. (2006). Physical and functional interactions between the prostate suppressor homeoprotein NKX3.1 and serum response factor. *J Mol Biol*, **360**, 989-999.
- Kaghad M, Bonnet H, Yang A, Creancier L, Biscan J, Valent A, Minty A, Chalon P, Lelias J, Dumont X, Ferrara P, McKeon F und Caput D. (1997). Monoallelically Expressed Gene Related to p53 at 1p36, a Region Frequently Deleted in Neuroblastoma and Other Human Cancers *Cell*, **90**, 809-819.
- Kamijo T, Weber JD, Zambetti G, Zindy F, Roussel MF und Sherr CJ. (1998). Functional and physical interactions of the ARF tumor suppressor with p53 and Mdm2. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **95**, 8292-8297.
- Kao H-Y, Ordentlich P, Koyano-Nakagawa N, Tang Z, Downes M, Kintner CR, Evans RM und Kadesch T. (1998). A histone deacetylase corepressor complex regulates the Notch signal transduction pathway. *Genes & Development*, **12**, 2269-2277.
- Kapoor M und Lozano G. (1998). Functional activation of p53 via phosphorylation following DNA damage by UV but not gamma radiation. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **95**, 2834-2837.
- Kartasheva N, Contente A, Lenz-Stöppler C, Roth J und M D. (2002). p53 induces the expression of its antagonist p73ΔN, establishing an autoregulatory feedback loop. *Oncogene*, **21**, 4715-4727.
- Kato S, Shimada A, Osada M, Ikawa S, Obinata M, Nakagawara A, Kanamaru R und Ishioka C. (1999). Effects of p51/p63 Missense Mutations on Transcriptional Activities of p53 Downstream Gene Promoters. *Cancer Res*, **59**, 5908-5911.
- Katoh I, Aisaki K, Kurata S, Ikawa S und Ikawa Y. (2000). p51A (TAp63gamma), a p53 homolog, accumulates in response to DNA damage for cell regulation. *Oncogene*, **19**, 3126-3130.
- Kawakami Y, Capdevila J, Büscher D, Itoh T, Rodríguez-Esteban C und Izpisua-Belmonte J. (2001). WNT signals control FGF-dependent limb initiation and AER induction in the chick embryo. *Cell*, **104**, 891-900.
- Keeble TR, Halford MM, Seaman C, Kee N, Macheda M, Anderson RB, Stacker SA und Cooper HM. (2006). The Wnt Receptor Ryk Is Required for Wnt5a-Mediated Axon Guidance on the Contralateral Side of the Corpus Callosum. *J. Neurosci.*, **26**, 5840-5848.
- Kemp CJ, Donehower LA, Bradley A und Balmain A. (1993). Reduction of p53 gene dosage does not increase initiation or promotion but enhances malignant progression of chemically induced skin tumors *Cell*, **74**, 813-822.

- Kim CA und Bowie JU. (2003). SAM domains: uniform structure, diversity of function. *Trends Biochem Sci*, **28**, 625-628.
- Kim K, Lu Z und Hay ED. (2002). DIRECT EVIDENCE FOR A ROLE OF beta-CATENIN/LEF-1 SIGNALING PATHWAY IN INDUCTION OF EMT. *Cell Biology International*, **26**, 463-476.
- King KE, Ponnampertuma RM, Yamashita T, Tokino T, Lee LA, Young MF und Weinberg WC. (2003). deltaNp63alpha functions as both a positive and a negative transcriptional regulator and blocks in vitro differentiation of murine keratinocytes. *Oncogene*, **22**, 3635 - 3644.
- Kinzler KW, Nilbert MC, Su LK, Vogelstein B und Bryan TM. (1991). Identification of FAP locus genes from chromosome 5q21. *Science*, **253**, 661.
- Kishida M, Koyama S, Kishida S, Matsubara K, Nakashima S, Higano K, Takada R, Takada S und Kikuchi A. (1999). Axin prevents Wnt-3a-induced accumulation of beta-catenin. *Oncogene*, **18**, 979-985.
- Kishida S, Yamamoto H, Ikeda S, Kishida M, Sakamoto I, Koyama S und Kikuchi A. (1998). Axin, a Negative Regulator of the Wnt Signaling Pathway, Directly Interacts with Adenomatous Polyposis Coli and Regulates the Stabilization of β^2 -Catenin. *Journal of Biological Chemistry*, **273**, 10823-10826.
- Klein TJ und Mlodzik M. (2005). PLANAR CELL POLARIZATION: An Emerging Model Points in the Right Direction. *Annual Review of Cell and Developmental Biology*, **21**, 155-176.
- Klipp E und Liebermeister W. (2006). Mathematical modeling of intracellular signaling pathways. *BMC Neurosci*, **7**, S10.
- Klymkowsky M. (2005). beta-catenin and its regulatory network. *Hum Pathol*, **36**, 225-227.
- Koga F, Kawakami S, Fujii Y, Saito K, Ohtsuka Y, Iwai A, Ando N, Takizawa T, Kageyama Y und Kihara K. (2003a). Impaired p63 Expression Associates with Poor Prognosis and Uroplakin III Expression in Invasive Urothelial Carcinoma of the Bladder. *Clin Cancer Res*, **9**, 5501-5507.
- Koga F, Kawakami S, Kumagai J, Takizawa T, Ando N, Arai G, Kageyama Y und Kihara K. (2003b). Impaired Delta Np63 expression associates with reduced beta-catenin and aggressive phenotypes of urothelial neoplasms. *Br J Cancer*, **88**, 740-7.
- Koga F, Kawakami S, Kumagai J, Takizawa T, Ando N, Arai G, Kageyama Y und Kihara K. (2003c). Impaired DeltaNp63 expression associates with reduced beta-catenin and aggressive phenotypes of urothelial neoplasms. *Br J Cancer*, **88**, 740-747.
- Korinek V, Barker N, Moerer P, van Donselaar E und Huls G. (1998). Depletion of epithelial stem-cell compartments in the small intestine of mice lacking Tcf-4. *Nat. Genet.*, **19**, 379.
- Korinek V, Barker N, Morin P, van Wichen D, de Weger R, Kinzler K, Vogelstein B und Clevers H. (1997). Constitutive transcriptional activation by a beta-catenin-Tcf complex in APC-/- colon carcinoma. *Science*, **275**, 1784-1787.
- Koster M, Huntzinger K und Roop D. (2002). Epidermal differentiation: transgenic/knockout mouse models reveal genes involved in stem cell fate decisions and commitment to differentiation. *J Invest Dermatol Symp Proc*, **7**, 41-45.
- Koster MI, Kim S, Mills AA, DeMayo FJ und Roop DR. (2004). p63 is the molecular switch for initiation of an epithelial stratification program. *Genes & Development*, **18**, 126-131.
- Koster MI und Roop DR. (2004). Transgenic mouse models provide new insights into the role of p63 in epidermal development. *Cell Cycle*, **3**, 411 - 413.
- Kovalev S, Marchenko N, Swendeman S, LaQuaglia M und Moll UM. (1998). Expression level, allelic origin, and mutation analysis of the p73 gene in neuroblastoma tumors and cell lines. *Cell Growth Differ*, **9**, 897-903.

- Kramps T, Peter O, Brunner E, Nellen D und Froesch B. (2002). Wnt/wingless signaling requires BCL9/legless-mediated recruitment of pygopus to the nuclear beta-catenin-TCF complex. *Cell*, **109**, 47.
- Kühl M, Sheldahl L, Park M, Miller J und Moon R. (2000). The Wnt/Ca²⁺ pathway: a new vertebrate Wnt signaling pathway takes shape. *Trends Genet.*, **16**, 279-283.
- Kuhnert F, Davis CR, Wang HT, Chu P und Lee M. (2004). Essential requirement for Wnt signaling in proliferation of adult small intestine and colon revealed by adenoviral expression of Dickkopf-1. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **101**, 266.
- Kuraguchi M, Wang X-P, Bronson RT, Rothenberg R, Ohene-Baah NY, Lund JJ, Kucherlapati M, Maas RL und Kucherlapati R. (2006). Adenomatous Polyposis Coli (APC) Is Required for Normal Development of Skin and Thymus. *PLoS Genet*, **2**, e146.
- Labbé E, Letamendia A und Attisano L. (2000). Association of Smads with lymphoid enhancer binding factor 1/T cell-specific factor mediates cooperative signaling by the transforming growth factor- β and Wnt pathways. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **97**, 8358-8363.
- Laemmli U. (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, **227**, 680-685.
- Laherty C, Yang W, Sun J, Davie J, Seto E und Eisenman R. (1997). Histone deacetylases associated with the mSin3 corepressor mediate mad transcriptional repression. *Cell*, **89**, 349-356.
- Lane DP. (1992). p53, guardian of the genome. *Nature*, **358**, 15-16.
- Larabell C, Torres M, Rowning B, Yost C, Miller J, Wu M, Kimelman D und Moon R. (1997). Establishment of the dorso-ventral axis in *Xenopus* embryos is presaged by early asymmetries in beta-catenin that are modulated by the Wnt signaling pathway. *J Cell Biol*, **136**, 1123-1136.
- Laudet V, Stehelin D und Clevers H. (1993). Ancestry and diversity of the HMG box superfamily. *Nucl. Acids Res.*, **21**, 2493-2501.
- Laurent-Puig P, Legoix P, Bluteau O, Belghiti J, Franco D, Binot F, Monges G, Thomas G, Bioulac-Sage P und J. Z-R. (2001). Genetic alterations associated with hepatocellular carcinomas define distinct pathways of hepatocarcinogenesis. *Gastroenterology*, **120**, 1763-1773.
- Laurikkala J, Mikkola ML, James M, Tummers M, Mills AA und Thesleff I. (2006). p63 regulates multiple signalling pathways required for ectodermal organogenesis and differentiation. *Development*, **133**, 1553-1563.
- Lee E, Salic A, KrÄ¼ger R, Heinrich R und Kirschner MW. (2003). The Roles of APC and Axin Derived from Experimental and Theoretical Analysis of the Wnt Pathway. *PLoS Biol*, **1**, e10.
- Lee H-o, Lee J-H, Choi E, Seol JY, Yun Y und Lee H. (2006). A dominant negative form of p63 inhibits apoptosis in a p53-independent manner. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, **344**, 166-172.
- Lee LA, Walsh P, Prater CA, Su L-J, Marchbank A, Egbert TB, Dellavalle RP, Targoff IN, Kaufman KM, Chorzelski TP und Jablonska S. (1999). Characterization of an Autoantigen Associated With Chronic Ulcerative StomatitisThe CUSP Autoantigen is a Member of the p53 Family1. **113**, 146-151.
- Letamendia A, Labbe E und Attisano L. (2001). Transcriptional Regulation by Smads: Crosstalk between the TGF-beta and Wnt Pathways. *J Bone Joint Surg Am*, **83**, S31-39.
- Levina E, Oren M und Ben-Ze'ev A. (2004). Downregulation of beta-catenin by p53 involves changes in the rate of beta-catenin phosphorylation and Axin dynamics. *Oncogene*, **23**, 4444-4453.
- Levine AJ. (1997). p53, the cellular gatekeeper for growth and division. *Cell*, **88** 323-331.

- Li X, Zhang Y, Kang H, Liu W, Liu P, Zhang J, Harris SE und Wu D. (2005). Sclerostin Binds to LRP5/6 and Antagonizes Canonical Wnt Signaling. *Journal of Biological Chemistry*, **280**, 19883-19887.
- Liefer KM, Koster MI, Wang X-J, Yang A, McKeon F und Roop DR. (2000). Down-Regulation of p63 Is Required for Epidermal UV-B-induced Apoptosis. *Cancer Res*, **60**, 4016-4020.
- Liu W, Dong X, Mai M, Seelan R, Taniguchi K, Krishnadath K, Halling K, Cunningham J, Boardman L, Qian C, Christensen E, Schmidt S, Roche P, Smith D und Thibodeau S. (2000). Mutations in AXIN2 cause colorectal cancer with defective mismatch repair by activating beta-catenin/TCF signalling. *Nature Genetics*, **26**, 146-147.
- Logan CY und Nusse R. (2004). THE WNT SIGNALING PATHWAY IN DEVELOPMENT AND DISEASE. *Annual Review of Cell and Developmental Biology*, **20**, 781-810.
- Love J, Li X, Case D, Giese K, Grosschedl R und Wright P. (1995). Structural basis for DNA bending by the architectural transcription factor LEF-1. *Nature*, **376**, 791-795.
- Lowe S, Schmitt E, Smith S, Osborne B und Jacks T. (1993). p53 is required for radiation-induced apoptosis in mouse thymocytes. *Nature*, **362**, 847-849.
- Lowe S und Sherr C. (2003). Tumor suppression by Ink4a-Arf: progress and puzzles *Curr Opin Genet Dev*, **13**, 77-83.
- Lustig B, Jerchow B, Sachs M, Weiler S, Pietsch T, Karsten U, van de Wetering M, Clevers H, Schlag PM, Birchmeier W und Behrens J. (2002). Negative Feedback Loop of Wnt Signaling through Upregulation of Conductin/Axin2 in Colorectal and Liver Tumors. *Mol. Cell. Biol.*, **22**, 1184-1193.
- Lyons J, Mueller U, Ji H, Everett C, Fang X, Hsieh J, Barth A und McCrea P. (2004). Wnt-4 activates the canonical beta-catenin-mediated Wnt pathway and binds Frizzled-6 CRD: functional implications of Wnt/beta-catenin activity in kidney epithelial cells. *Exp Cell Res*, **298**, 369-387.
- Marine J und Berx G. (2009). Transforming growth factor-beta and mutant p53 conspire to induce metastasis by antagonizing p63: a (ternary) complex affair. *Breast Cancer Res*, **11**, 304.
- Martin ML, Lieberman PM und Curran T. (1996). Fos-Jun dimerization promotes interaction of the basic region with TFIIE-34 and TFIIIF. *Mol. Cell. Biol.*, **16**, 2110-2118.
- Massion PP, Taflan PM, Jamshedur Rahman SM, Yildiz P, Shyr Y, Edgerton ME, Westfall MD, Roberts JR, Pietenpol JA, Carbone DP und Gonzalez AL. (2003). Significance of p63 Amplification and Overexpression in Lung Cancer Development and Prognosis. *Cancer Res*, **63**, 7113-7121.
- Maya R, Balass M, Kim S-T, Shkedy D, Leal J-FM, Shifman O, Moas M, Buschmann T, Ronai Ze, Shiloh Y, Kastan MB, Katzir E und Oren M. (2001). ATM-dependent phosphorylation of Mdm2 on serine 395: role in p53 activation by DNA damage. *Genes & Development*, **15**, 1067-1077.
- McGrath JA, Duijf PHG, Doetsch V, Irvine AD, Waal Rd, Vanmolkot KRJ, Wessagowit V, Kelly A, Atherton DJ, Griffiths WAD, Orlov SJ, van Haeringen A, Ausems MGEM, Yang A, McKeon F, Bamshad MA, Brunner HG, Hamel BCJ und van Bokhoven H. (2001). Hay-Wells syndrome is caused by heterozygous missense mutations in the SAM domain of p63. *Hum. Mol. Genet.*, **10**, 221-229.
- McKeon F. (2004). p63 and the epithelial stem cell: more than status quo? *Genes & Development*, **18**, 465-469.
- McLure KG und Lee PWK. (1998). How p53 binds DNA as a tetramer. *EMBO J*, **17**, 3342-3350.
- Meigs TE, Fields TA, McKee DD und Casey PJ. (2001). Interaction of Gα12 and Gα13 with the cytoplasmic domain of cadherin provides a mechanism for β-catenin release. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **98**, 519-524.

- Merrill BJ, Gat U, DasGupta R und Fuchs E. (2001). Tcf3 and Lef1 regulate lineage differentiation of multipotent stem cells in skin. *Genes & Development*, **15**, 1688-1705.
- Meulmeester E, Maurice MM, Boutell C, Teunisse AFAS, Ovaa H, Abraham TE, Dirks RW und Jochemsen AG. (2005). Loss of HAUSP-Mediated Deubiquitination Contributes to DNA Damage-Induced Destabilization of Hdmx and Hdm2 *Molecular Cell*, **18**, 565-576.
- Michaelson J und Leder P. (2001). beta-catenin is a downstream effector of Wnt-mediated tumorigenesis in the mammary gland. *Oncogene*, **20**, 5093-5099.
- Mikkola M und Millar S. (2006). The mammary bud as a skin appendage: unique and shared aspects of development. *J Mammary Gland Biol Neoplasia*, **11**, 187-203.
- Mills AA, Zheng B, Wang XJ, Vogel H, Roop DR und Bradley A. (1999). p63 is a p53 homologue required for limb and epidermal morphogenesis. *Nature*, **398**, 708 - 713.
- Moll UM. (2003). The Role of p63 and p73 in Tumor Formation and Progression: Coming of Age Toward Clinical Usefulness: Commentary re: F. Koga et al., Impaired p63 Expression Associates with Poor Prognosis and Uroplakin III Expression in Invasive Urothelial Carcinoma of the Bladder. *Clin. Cancer Res.*, 9: 5501-5507, 2003, and P. Puig et al., p73 Expression in Human Normal and Tumor Tissues: Loss of p73{alpha} Expression Is Associated with Tumor Progression in Bladder Cancer. *Clin. Cancer Res.*, 9: 5642-5651, 2003. *Clin Cancer Res*, **9**, 5437-5441.
- Moon RT, Campbell RM, Christian JL, McGrew LL, Shih J und Fraser S. (1993). Xwnt-5A: a maternal Wnt that affects morphogenetic movements after overexpression in embryos of *Xenopus laevis*. *Development*, **119**, 97-111.
- Moon RT, Kohn AD, Ferrari GVD und Kaykas A. (2004). WNT and [beta]-catenin signalling: diseases and therapies. *Nat Rev Genet*, **5**, 691-701.
- Morin PJ, Sparks AB, Korinek V, Barker N, Clevers H, Vogelstein B und Kinzler KW. (1997). Activation of beta -Catenin-Tcf Signaling in Colon Cancer by Mutations in beta -Catenin or APC. *Science*, **275**, 1787-1790.
- Morita M, Uramoto H, Nakata S, Ono K, Sugaya M, Yoshimatsu T, Oyama T, Hanagiri T, Sugio K und Yasumoto K. (2005). Expression of deltaNp63 in squamous cell carcinoma of the esophagus. *Anticancer Res*, **25**, 3533-9.
- Morita M, Uramoto, H, Nakata, S, Ono, K, Sugaya, M, Yoshimatsu, T, Oyama, T, Hanagiri, T, Sugio, K, Yasumoto, K. (2005). Expression of deltaNp63 in squamous cell carcinoma of the esophagus. *Anticancer Res* **25**, 3533-3539.
- Möritz C. (2006). Das Tumorsuppressor-Homologe p63 als Modulator des Wnt-Signalweges.
- Mosimann C, Hausmann G und Basler K. (2006). Parafibromin/Hyrax activates Wnt/Wg target gene transcription by direct association with beta-catenin/Armadillo. *Cell*, **125**, 327-341.
- Müller W und Hassel M. (2005). Entwicklungsbiologie und Reproduktionsbiologie von Mensch und Tieren, Induktion von Köpfen und Rümpfen im Wirbeltierembryo mit transplantiertem Organisationsgewebe. *Springer-Lehrbuch*, **4**.
- Nagy L, Kao H, Chakravarti D, Lin R, Hassig C, Ayer D, Schreiber S und Evans R. (1997). Nuclear receptor repression mediated by a complex containing SMRT, mSin3A, and histone deacetylase. *Cell*, **89**, 373-380.
- Nakano K und Vousden K. (2001). PUMA, a Novel Proapoptotic Gene, Is Induced by p53 *Molecular Cell*, **7**, 683-694.
- Ng JK, Kawakami Y, Buscher D, Raya A, Itoh T, Koth CM, Esteban CR, Rodriguez-Leon J, Garrity DM, Fishman MC und Belmonte JCI. (2002). The limb identity gene Tbx5 promotes limb initiation by interacting with Wnt2b and Fgf10. *Development*, **129**, 5161-5170.

- Nguyen DX, Chiang AC, Zhang XHF, Kim JY, Kris MG, Ladanyi M, Gerald WL und Massagué J. (2009). WNT/TCF Signaling through LEF1 and HOXB9 Mediates Lung Adenocarcinoma Metastasis. *Cell*, **138**, 51-62.
- Nishisho I, Nakamura Y, Miyoshi Y, Miki Y und Ando H. (1991). Mutations of chromosome 5q21 genes in FAP and colorectal cancer patients. *Science*, **253**, 665.
- Noe V, Fingleton B, Jacobs K, Crawford HC, Vermeulen S, Steelant W, Bruyneel E, Matrisian LM und Mareel M. (2001). Release of an invasion promoter E-cadherin fragment by matrilysin and stromelysin-1. *J Cell Sci*, **114**, 111-118.
- Nusse R und Varmus H. (1982). Many tumors induced by the mouse mammary tumor virus contain a provirus integrated in the same region of the host genome. *Cell*, **31**, 99-109.
- Nüsslein-Volhard C und Wieschaus E. (1980). Mutations affecting segment number and polarity in *Drosophila*. *Nature*, **287**, 795-801.
- Nylander K, Vojtesek, B, Nenutil, R, Lindgren, B, Roos, G, Zhanxiang, W, Sjöström, B, Dahlqvist, Å, Coates, PJ. (2002). Differential expression of p63 isoforms in normal tissues and neoplastic cells. *The Journal of Pathology*, **198**, 417-427.
- Okada Y, Osada M, Kurata S, Sato S, Aisaki K, Kageyama Y, Kihara K, Ikawa Y und Katoh I. (2002). p53 gene family p51(p63)-encoded, secondary transactivator p51B(TAp63alpha) occurs without forming an immunoprecipitable complex with MDM2, but responds to genotoxic stress by accumulation. *Exp Cell Res*, **276**, 194-200.
- Osada M, Ohba, M., Kawahara, C., Ishioka, C., Kanamaru, R., Katoh, I., Ikawa, Y., Nimura, Y., Nakagawara, A., Obinata, M. and Ikawa, S. (1998). Cloning and functional analysis of human p51, which structurally and functionally resembles p53. *Nat Med*, **4**, 839-843.
- Osada M, Park HL, Nagakawa Y, Yamashita K, Fomenkov A, Kim MS, Wu G, Nomoto S, Trink B und Sidransky D. (2005). Differential recognition of response elements determines target gene specificity for p53 and p63. *Mol Cell Biol*, **25**, 6077 - 6089.
- Osada M, Park, HL, Nagakawa, Y, Begum, S, Yamashita, K, Wu, G, Kim, MS, Trink, B, Sidransky, D. (2006). A novel response element confers p63- and p73-specific activation of the WNT4 promoter. *Biochem Biophys Res Commun*, **339**, 1120-1128.
- Oudes A, Campbell D, Sorensen C, Walashek L, True L und Liu A. (2006). Transcriptomes of human prostate cells. *BMC Genomics*, **7**, 92.
- Palmero I, Pantoja C und Serrano M. (1998). p19ARF links the tumour suppressor p53 to Ras. *Nature*, **395**, 125-126.
- Park B-J, Lee S-J, Kim JI, Lee S-J, Lee C-H, Chang S-G, Park J-H und Chi S-G. (2000). Frequent Alteration of p63 Expression in Human Primary Bladder Carcinomas. *Cancer Res*, **60**, 3370-3374.
- Patturajan M, Nomoto S, Sommer M, Fomenkov A, Hibi K, Zangen R, Poliak N, Califano J, Trink B, Ratovitski E und Sidransky D. (2002). [Delta]Np63 induces [beta]-catenin nuclear accumulation and signaling. *Cancer Cell*, **1**, 369-379.
- Peifer M, McCrea PD, Green KJ, Wieschaus E und Gumbiner BM. (1992). The vertebrate adhesive junction proteins beta-catenin and plakoglobin and the *Drosophila* segment polarity gene armadillo form a multigene family with similar properties. *J. Cell Biol.*, **118**, 681-691.
- Pellegrini G, Dellambra E, Golisano O, Martinelli E, Fantozzi I, Bondanza S, Ponzin D, McKeon F und De Luca M. (2001). p63 identifies keratinocyte stem cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **98**, 3156-3161.
- Pinson KI, Brennan J, Monkley S, Avery BJ und Skarnes WC. (2000). An LDL-receptor-related protein mediates Wnt signalling in mice. *Nature*, **407**, 535.
- Pinto D, Gregorieff A, Begthel H und Clevers H. (2003). Canonical Wnt signals are essential for homeostasis of the intestinal epithelium. *Genes Dev.*, **17**, 1709.

- Ponting C. (1995). SAM: A novel motif in yeast sterile and drosophila polyhomeotic proteins. *Protein Science*, **4**, 1928-1930.
- Pozniak CD, Radinovic S, Yang A, McKeon F, Kaplan DR und Miller FD. (2000). An Anti-Apoptotic Role for the p53 Family Member, p73, During Developmental Neuron Death. *Science*, **289**, 304-306.
- Prieve MG, Guttridge KL, Munguia J und Waterman ML. (1998). Differential Importin-alpha Recognition and Nuclear Transport by Nuclear Localization Signals within the High-Mobility-Group DNA Binding Domains of Lymphoid Enhancer Factor 1 and T-Cell Factor 1. *Mol. Cell. Biol.*, **18**, 4819-4832.
- Prieve MG und Waterman ML. (1999). Nuclear Localization and Formation of beta - Catenin-Lymphoid Enhancer Factor 1 Complexes Are Not Sufficient for Activation of Gene Expression. *Mol. Cell. Biol.*, **19**, 4503-4515.
- Prives C und Hall P. (1999). The p53 pathway. *J Pathol*, **187**, 112-126.
- Pukrop T, Gradl D, Henningfeld KA, Knäuper W, Wedlich D und Kühl M. (2001). Identification of Two Regulatory Elements within the High Mobility Group Box Transcription Factor XTTCF-4. *Journal of Biological Chemistry*, **276**, 8968-8978.
- Ramachander R, Kim CA, Phillips ML, Mackereth CD, Thanos CD, McIntosh LP und Bowie JU. (2002). Oligomerization-dependent Association of the SAM Domains from *Schizosaccharomyces pombe* Byr2 and Ste4. *Journal of Biological Chemistry*, **277**, 39585-39593.
- Reis-Filho JS, Simpson, P.T., Fulford, L.G., Martins, A. and Schmitt, F.C. (2003). P63-driven nuclear accumulation of beta-catenin is not a frequent event in human neoplasms. *Pathology, research and practice*, **199(12)**, 785-93.
- Reis-Filho JS SP, Fulford LG, Martins A, Schmitt FC. (2003). P63-driven nuclear accumulation of beta-catenin is not a frequent event in human neoplasms. *Pathology, research and practice*, **199(12)**, 785-93.
- Reya T, Duncan AW, Ailles L, Domen J, Scherer DC, Willert K, Hintz L, Nusse R und Weissman IL. (2003). A role for Wnt signalling in self-renewal of haematopoietic stem cells. *Nature*, **423**, 409-414.
- Ribeiro-Silva A, Zambelli Ramalho L, Britto Garcia S und Zucoloto S. (2003). The relationship between p63 and p53 expression in normal and neoplastic breast tissue. *Arch Pathol Lab Med*, **127**, 336-340.
- Rijsewijk F, Schuermann M, Wagenaar E, Parren P, Weigel D und Nusse R. (1987). The *Drosophila* homolog of the mouse mammary oncogene int-1 is identical to the segment polarity gene wingless. *Cell*, **50**, 649-657.
- Rinne T, Brunner H und van Bokhoven H. (2007). p63-associated disorders. *Cell Cycle*, **6**, 262-268.
- Rinne T, Spadoni E, Kjaer KW, Danesino C, Larizza D, Kock M, Huoponen K, Savontaus M-L, Aaltonen M, Duijf P, Brunner HG, Penttinen M und van Bokhoven H. (2006). Delineation of the ADULT syndrome phenotype due to arginine 298 mutations of the p63 gene. *Eur J Hum Genet*, **14**, 904-910.
- Rocco J, Leong C, Kuperwasser N, DeYoung M und Ellisen L. (2006). p63 mediates survival in squamous cell carcinoma by suppression of p73-dependent apoptosis. *Cancer Cell*, **9**, 45-56.
- Rodriguez MS, Desterro JMP, Lain S, Midgley CA, Lane DP und Hay RT. (1999). SUMO-1 modification activates the transcriptional response of p53. *EMBO J*, **18**, 6455-6461.
- Roose J und Clevers H. (1999). TCF transcription factors: molecular switches in carcinogenesis. *Biochim Biophys Acta*, **1424**, M23-37.
- Rosin-Arbesfeld R, Townsley F und Bienz M. (2000). The APC tumour suppressor has a nuclear export function. *Nature*, **406**, 1009-1012.
- Rother K, John C, Spiesbach K, Haugwitz U, Tschop K, Wasner M, Klein-Hitpass L, Moroy T, Mossner J und Engeland K. (2004). Identification of Tcf-4 as a transcriptional target of p53 signalling. *Oncogene*, **23**, 3376-3384.

- Rubinfeld B, Albert I, Porfiri E, Fiol C, Munemitsu S und Polakis P. (1996). Binding of GSK3beta to the APC-beta-catenin complex and regulation of complex assembly. *Science*, **272**, 1023-1026.
- Rubinfeld B, Souza B, Albert I, Munemitsu S und Polakis P. (1995). The APC Protein and E-cadherin Form Similar but Independent Complexes with -Catenin, -Catenin, and Plakoglobin. *Journal of Biological Chemistry*, **270**, 5549-5555.
- Ruiz i Altaba A und Melton D. (1989). Interaction between peptide growth factors and homeobox genes in the establishment of anterior-posterior polarity in frog embryos. *Nature*, **341**, 33-38.
- Sachdev S, Bruhn L, Sieber H, Pichler A, Melchior F und Grosschedl R. (2001). PIASy, a nuclear matrix-associated SUMO E3 ligase, represses LEF1 activity by sequestration into nuclear bodies. *Genes & Dev.*, **15**, 3088-3103.
- Sadot E, Geiger B, Oren M und Ben-Ze'ev A. (2001). Down-Regulation of beta-Catenin by Activated p53. *Mol. Cell. Biol.*, **21**, 6768-6781.
- Sambrook J, Russel, D.W. (2001). Molecular Cloning: A Laboratory Manual. *Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York*.
- Saneyoshi T, Kume S, Amasaki Y und Mikoshiba K. (2002). The Wnt/calcium pathway activates NF-AT and promotes ventral cell fate in Xenopus embryos. *Nature*, **417**, 295-299.
- Sanger F, Nicklen S und Coulson A. (1977). DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **74**, 5463-5467.
- Sansom OJ, Reed KR, van de Wetering M, Muncan V, Winton DJ, Clevers H und Clarke AR. (2005). Cyclin D1 Is Not an Immediate Target of β^2 -Catenin following Apc Loss in the Intestine. *Journal of Biological Chemistry*, **280**, 28463-28467.
- Sarkar L und Sharpe P. (1999). Expression of Wnt signalling pathway genes during tooth development. *Mech Dev*, **85**, 197-200.
- Sasaki T, Ito Y, Xu X, Han J, Bringas PJ, Maeda T, Slavkin H, Grosschedl R und Chai Y. (2005a). LEF1 is a critical epithelial survival factor during tooth morphogenesis. *Dev Biol*, **278**, 130-143.
- Sasaki Y, Naishiro Y, Oshima Y, Imai K, Nakamura Y und Tokino T. (2005b). Identification of pigment epithelium-derived factor as a direct target of the p53 family member genes. *Oncogene*, **24**, 5131-5136.
- Satoh S, Daigo Y, Furukawa Y, Kato T, Miwa N, Nishiwaki T, Kawasoe T, Ishiguro H, Fujita M, Tokino T, Sasaki Y, Imaoka S, Murata M, Shimano T, Yamaoka Y und Nakamura Y. (2000). AXIN1 mutations in hepatocellular carcinomas, and growth suppression in cancer cells by virus-mediated transfer of AXIN1. *Nat Genet*, **24**, 245-250.
- Sawa H, Kouike H und Okano H. (2000). Components of the SWI/SNF complex are required for asymmetric cell division in *C. elegans*. *Mol Cell*, **6**, 617-624.
- Schmale H und Bamberger C. (1997). A novel protein with strong homology to the tumor suppressor p53 *Oncogene*, **15**, 1363-1367.
- Schohl A und Fagotto F. (2003). A role for maternal beta-catenin in early mesoderm induction in Xenopus. *EMBO J*, **22**, 3303-3313.
- Schultz J, Ponting C, Hofmann K und Bork P. (1997). SAM as a protein interaction domain involved in developmental regulation. *Protein Science*, **6**, 249-253.
- Seifert JR und Mlodzik M. (2007). Frizzled/PCP signalling: a conserved mechanism regulating cell polarity and directed motility. *Nat Rev Genet*, **8**, 126-138.
- Semenov M, Tamai K und He X. (2005). SOST Is a Ligand for LRP5/LRP6 and a Wnt Signaling Inhibitor. *Journal of Biological Chemistry*, **280**, 26770-26775.
- Senoo M, Seki N, Ohira M, Sugano S, Watanabe M, Inuzuka S, Okamoto T, Tachibana M, Tanaka T, Shinkai Y und Kato H. (1998). A second p53-related protein, p73L, with high homology to p73. *Biochem Biophys Res Commun*, **248**, 603-607.
- Serber Z, Lai HC, Yang A, Ou HD, Sigal MS, Kelly AE, Darimont BD, Duijff PHG, van Bokhoven H, McKeon F und Dotsch V. (2002). A C-Terminal Inhibitory Domain

- Controls the Activity of p63 by an Intramolecular Mechanism. *Mol. Cell. Biol.*, **22**, 8601-8611.
- Sharpe C, Lawrence N und Martinez Arias A. (2001). Wnt signalling: a theme with nuclear variations. *Bioessays*, **23**, 311-318.
- Sheldahl LC, Slusarski DC, Pandur P, Miller JR, Kuhl M und Moon RT. (2003). Dishevelled activates Ca²⁺ flux, PKC, and CamKII in vertebrate embryos. *J. Cell Biol.*, **161**, 769-777.
- Sherr CJ und Weber JD. (2000). The ARF/p53 pathway. *Curr Opin Genet Dev*, **10**, 94-99.
- Shih I-M, Yu J, He T-C, Vogelstein B und Kinzler KW. (2000). The beta-Catenin Binding Domain of Adenomatous Polyposis Coli Is Sufficient for Tumor Suppression. *Cancer Res*, **60**, 1671-1676.
- Shiina H, Igawa M, Breault J, Ribeiro-Filho L, Pookot D, Urakami S, Terashima M, Deguchi M, Yamanaka M, Shirai M, Kaneuchi M, Kane CJ und R D. (2003). The human T-cell factor-4 gene splicing isoforms, Wnt signal pathway, and apoptosis in renal cell carcinoma. *Clin Cancer Res*. 2003 Jun;9(6):2121-32, **9**, 2121-2132.
- Shimada A, Kato S, Enjo K, Osada M, Ikawa Y, Kohno K, Obinata M, Kanamaru R, Ikawa S und Ishioka C. (1999). The Transcriptional Activities of p53 and Its Homologue p51/p63: Similarities and Differences. *Cancer Res*, **59**, 2781-2786.
- Signoretto S, Waltregny D, Dilks J, Isaac B, Lin D, Garraway L, Yang A, Montironi R, McKeon F und Loda M. (2000). p63 Is a Prostate Basal Cell Marker and Is Required for Prostate Development. *Am J Pathol*, **157**, 1769-1775.
- Sive HJ, Grainger RM und Harland RM. (2000). Early Development of *Xenopus laevis* - A Laboratory Manual. Cold Spring Harbor, New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- Slaughter BD, Huff JM, Wiegand W, Schwartz JW und Li R. (2008). SAM Domain-Based Protein Oligomerization Observed by Live-Cell Fluorescence Fluctuation Spectroscopy. *PLoS ONE*, **3**, e1931.
- Smith J, Price B, Van Niramun K und Huylebroeck D. (1990). Identification of a potent mesoderm inducing factor as a homologue of activin A. *Nature*, **345**, 729-731.
- Sokol S, Christian J, Moon R und Melton D. (1991). Injected Wnt RNA induces a complete body axis in *Xenopus* embryos. *Cell*, **67**, 741-752.
- Sokol S und Melton D. (1992). Interaction of Wnt and activin in dorsal mesoderm induction in *Xenopus*. *Dev Biol*, **154**, 348-355.
- Städeli R, Hoffmans R und Basler K. (2006). Transcription under the control of nuclear Arm/beta-catenin. *Curr Biol*, **16**, 378-85.
- Stefansson I, Salvesen H und Akslen L. (2006a). Loss of p63 and cytokeratin 5/6 expression is associated with more aggressive tumors in endometrial carcinoma patients. *International Journal of Cancer*, **118**, 1227-1233.
- Stefansson IM, Salvesen HB und Akslen LA. (2006b). Loss of p63 and cytokeratin 5/6 expression is associated with more aggressive tumors in endometrial carcinoma patients. *Int J Cancer*, **118**, 1227-33.
- Stenn KS und Paus R. (2001). Controls of Hair Follicle Cycling. *Physiol. Rev.*, **81**, 449-494.
- Stiewe T und Putzer BM. (2000). Role of the p53-homologue p73 in E2F1-induced apoptosis. *Nat Genet*, **26**, 464-469.
- Stiewe T, Theseling CC und Pützer BM. (2002). Transactivation-deficient DeltaTA-p73 Inhibits p53 by Direct Competition for DNA Binding. *Journal of Biological Chemistry*, **277**, 14177-14185.
- Stommel JM und Wahl GM. (2004). Accelerated MDM2 auto-degradation induced by DNA-damage kinases is required for p53 activation. *EMBO J*, **23**, 1547-1556.
- Tada M und Smith JC. (2000). Xwnt11 is a target of *Xenopus* Brachyury: regulation of gastrulation movements via Dishevelled, but not through the canonical Wnt pathway. *Development*, **127**, 2227-2238.

- Tahinci E und Symes K. (2003). Distinct functions of Rho and Rac are required for convergent extension during *Xenopus* gastrulation. *Dev Biol*, **259**, 318-335.
- Takeda H, Lyle S, Lazar AJF, Zouboulis CC, Smyth I und Watt FM. (2006). Human sebaceous tumors harbor inactivating mutations in LEF1. *Nat Med*, **12**, 395-397.
- Takemaru KI und Moon RT. (2000). The transcriptional coactivator CBP interacts with beta-catenin to activate gene expression. *J. Cell Biol.*, **149**, 249.
- Tamai K, Semenov M, Kato Y, Spokony R und Liu C. (2000). LDL-receptor-related proteins in Wnt signal transduction. *Nature*, **407**, 530.
- Tan X, Egami H, Abe M, Nozawa F, Hirota M und Ogawa M. (2005). Involvement of MMP-7 in invasion of pancreatic cancer cells through activation of the EGFR mediated MEK-ERK signal transduction pathway. *J Clin Pathol*, **58**, 1242-1248.
- Taniguchi K, Roberts LR, Aderca IN, Dong X, Qian C, Murphy LM, Nagorney DM, Burgart LJ, Roche PC, Smith DI, Ross JA und W L. (2002). Mutational spectrum of beta-catenin, AXIN1, and AXIN2 in hepatocellular carcinomas and hepatoblastomas. *Oncogene*, **21**, 4863-4871.
- Tao W und Levine AJ. (1999). P19ARF stabilizes p53 by blocking nucleo-cytoplasmic shuttling of Mdm2. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **96**, 6937-6941.
- Testoni B, Borrelli S, Tenedini E, Alotto D, Castagnoli C, Piccolo S, Tagliafico E, Ferrari S, Vigano MA und Mantovani R. (2006). Identification of new p63 targets in human keratinocytes. *Cell Cycle*, **5**, 2805 - 2811.
- Tetsu O und McCormick F. (1999). Beta-catenin regulates expression of cyclin D1 in colon carcinoma cells. *Nature*, **398**, 422.
- Thanos C und Bowie J. (1999). p53 Family members p63 and p73 are SAM domain-containing proteins. *Protein Science*, **8**, 1708-1710.
- Thanos CD, Goodwill KE und Bowie JU. (1999). Oligomeric Structure of the Human EphB2 Receptor SAM Domain. *Science*, **283**, 833-836.
- Thievensen I, Seifert HH, Swiatkowski S, Florl AR und Schulz WA. (2003). E-cadherin involved in inactivation of WNT/beta-catenin signalling in urothelial carcinoma and normal urothelial cells. *Br J Cancer*, **88**, 1932-1938.
- Thurfjell N, Coates P, Vojtesek B, Benham-Motlagh P, Eisold M und Nylander K. (2005). Endogenous p63 acts as a survival factor for tumour cells of SCCHN origin. *Int J Mol Med*, **16**, 1065-1070.
- Tibbetts RS, Brumbaugh KM, Williams JM, Sarkaria JN, Cliby WA, Shieh S-Y, Taya Y, Prives C und Abraham RT. (1999). A role for ATR in the DNA damage-induced phosphorylation of p53. *Genes & Development*, **13**, 152-157.
- Tomimori Y, Katoh I, Kurata S, Okuyama T, Kamiyama R und Ikawa Y. (2004). Evolutionarily conserved expression pattern and trans-regulating activity of *Xenopus* p51/p63. *Biochem Biophys Res Commun*, **313**, 230-236.
- Tomkova K, Belkhir A, El-Rifai W und Zaika AI. (2004). p73 Isoforms Can Induce T-Cell Factor-Dependent Transcription in Gastrointestinal Cells. *Cancer Res*, **64**, 6390-6393.
- Tonon G, Wong K-K, Maulik G, Brennan C, Feng B, Zhang Y, Khatry DB, Protopopov A, You MJ, Aguirre AJ, Martin ES, Yang Z, Ji H, Chin L und DePinho RA. (2005). High-resolution genomic profiles of human lung cancer. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **102**, 9625-9630.
- Towbin H, Staehelin T und Gordon J. (1979). Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **76**, 4350-4354.
- Trink B, Okami K, Wu L, Sriuranpong V, Jen J und Sidransky D. (1998). A new human p53 homologue. *Nat Med*, **4**, 747-748.
- Ueda Y, Hijikata M, Takagi S, Takada R, Takada S, Chiba T und Shimotohno K. (2001). p73beta, a variant of p73, enhances Wnt/beta-catenin signaling in Saos-2 cells. *Biochem Biophys Res Commun*, **283**, 327-333.

- Unterseher F, Hefele JA, Giehl K, De Robertis EM, Wedlich D und Schambony A. (2004). Paraxial protocadherin coordinates cell polarity during convergent extension via Rho A and JNK. *EMBO J*, **23**, 3259-3269.
- Urist MJ, Di Como CJ, Lu M-L, Charytonowicz E, Verbel D, Crum CP, Ince TA, McKeon FD und Cordon-Cardo C. (2002). Loss of p63 Expression Is Associated with Tumor Progression in Bladder Cancer. *Am J Pathol*, **161**, 1199-1206.
- van Beest M, Dooijes D, van de Wetering M, Kjaerulff S, Bonvin A, Nielsen O und Clevers H. (2000). Sequence-specific High Mobility Group Box Factors Recognize 10-12-Base Pair Minor Groove Motifs. *Journal of Biological Chemistry*, **275**, 27266-27273.
- van Bokhoven H, Hamel B, Bamshad M, Sangiorgi E, Gurrieri F, Duijf P, Vanmolkot K, van Beusekom E, van Beersum S, Celli J, Merx G, Tenconi R, Fryns J, Verloes A, Newbury-Ecob R, Raas-Rotschild A, Majewski F, Beemer F, Janecke A, Chitayat D, Crisponi G, Kayserili H, Yates J, Neri G und Brunner H. (2001). p63 Gene mutations in eec syndrome, limb-mammary syndrome, and isolated split hand-split foot malformation suggest a genotype-phenotype correlation. *Am J Hum Genet*, **69**, 481-492.
- van Bokhoven H und McKeon F. (2002). Mutations in the p53 homolog p63: allele-specific developmental syndromes in humans. *Trends Mol Med*, **8**, 133-139.
- Van de Wetering M, Castrop J, Korinek V und Clevers H. (1996). Extensive alternative splicing and dual promoter usage generate Tcf-1 protein isoforms with differential transcription control properties. *Mol. Cell. Biol.*, **16**, 745-752.
- van de Wetering M, Oosterwegel M, Dooijes D und Clevers H. (1991). Identification and cloning of TCF-1, a T lymphocyte-specific transcription factor containing a sequence-specific HMG box. *EMBO J*, **10**, 123-132.
- van de Wetering M, Sancho E, Verweij C, de Lau W, Oving I, Hurlstone A, van der Horn K, Battle E, Coudreuse D, Haramis A, Tjon-Pon-Fong M, Moerer P, van den Born M, Soete G, Pals S, Eilers M, Medema R und Clevers H. (2002). The beta-catenin/TCF-4 complex imposes a crypt progenitor phenotype on colorectal cancer cells. *Cell*, **111**, 241-250.
- van Genderen C, Okamura RM, Farinas I, Quo RG und Parslow TG. (1994). Development of several organs that require inductive epithelial-mesenchymal interactions is impaired in LEF-1-deficient mice. *Genes Dev.*, **8**, 2691.
- Van Mater D, Kolligs FT, Dlugosz AA und Fearon ER. (2003). Transient activation of beta-catenin signaling in cutaneous keratinocytes is sufficient to trigger the active growth phase of the hair cycle in mice. *Genes & Development*, **17**, 1219-1224.
- Veeman MT, Slusarski DC, Kaykas A, Louie SH und Moon RT. (2003). Zebrafish Prickle, a Modulator of Noncanonical Wnt/Fz Signaling, Regulates Gastrulation Movements. *Current Biology*, **13**, 680-685.
- Verma UN, Surabhi RM, Schmaltieg A, Becerra C und Gaynor RB. (2003). Small Interfering RNAs Directed against beta-Catenin Inhibit the in Vitro and in Vivo Growth of Colon Cancer Cells. *Clin Cancer Res*, **9**, 1291-1300.
- Vigano MA, Lamartine J, Testoni B, Merico D, Alotto D, Castagnoli C, Robert A, Candi E, Melino G, Gidrol X und Mantovani R. (2006). New p63 targets in keratinocytes identified by a genome-wide approach. *Embo J*, **25**, 5105 - 5116.
- Vogelstein B, Lane D und Levine AJ. (2000). Surfing the p53 network. *Nature*, **408**, 307-310.
- von Kries J, Winbeck, G, Asbrand, C, Schwarz-Romond, T, Sochnikova, N, Dell'Oro, A, Behrens, J, Birchmeier, W. (2000). Hot spots in beta-catenin for interactions with LEF-1, conductin and APC. *Nat Struct Biol*, **7**, 800-807.
- Walhout AJM. (2006). Unraveling transcription regulatory networks by protein-DNA and protein-protein interaction mapping. *Genome Research*, **16**, 1445-1454.

- Wallingford JB und Habas R. (2005). The developmental biology of Dishevelled: an enigmatic protein governing cell fate and cell polarity. *Development*, **132**, 4421-4436.
- Wang F, Reierstad S und Fishman D. (2006). Matrilysin over-expression in MCF-7 cells enhances cellular invasiveness and pro-gelatinase activation. *Cancer letters*, **236**, 292-301.
- Wang F, So J, Reierstad S und Fishman D. (2005). Matrilysin (MMP-7) promotes invasion of ovarian cancer cells by activation of progelatinase. *Int J Cancer*, **114**, 19-31.
- Wang W, Bycroft M, Foster N, Buckle A, Fersht A und Chen Y. (2001). Structure of the C-terminal sterile alpha-motif (SAM) domain of human p73 alpha. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr*, **57**, 545-551.
- Wang X, Mori I, Tang W, Nakamura M, Nakamura Y, Sato M, Sakurai T und Kakudo K. (2002). P63 expression in normal, hyperplastic and malignant breast tissues. *Breast Cancer*, **9**, 216-219.
- Watson I und Irwin M. (2006). Ubiquitin and ubiquitin-like modifications of the p53 family. *Neoplasia*, **8**, 655-666.
- Weber JD, Taylor LJ, Roussel MF, Sherr CJ und Bar-Sagi D. (1999). Nucleolar Arf sequesters Mdm2 and activates p53. *Nat Cell Biol*, **1**, 20-26.
- Wen Y-D, Perissi V, Staszewski LM, Yang W-M, Kronen A, Glass CK, Rosenfeld MG und Seto E. (2000). The histone deacetylase-3 complex contains nuclear receptor corepressors. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **97**, 7202-7207.
- Westfall M, Joyner A, Barbieri C, Livingstone M und Pieterpol J. (2005). Ultraviolet radiation induces phosphorylation and ubiquitin-mediated degradation of DeltaNp63alpha. *Cell Cycle*, **4**, 710-716.
- Westfall MD, Mays DJ, Sniezek JC und Pieterpol JA. (2003). The DeltaNp63alpha phosphoprotein binds the p21 and 14-3-3 sigma promoters in vivo and has transcriptional repressor activity that is reduced by Hay-Wells syndrome-derived mutations. *Mol Cell Biol*, **23**, 2264 - 2276.
- Willert K, Brown JD, Danenberg E, Duncan AW, Weissman IL, Reya T, Yates JR und Nusse R. (2003). Wnt proteins are lipid-modified and can act as stem cell growth factors. *Nature*, **423**, 448-452.
- Wu G, Nomoto S, Hoque MO, Dracheva T, Osada M, Lee C-CR, Dong SM, Guo Z, Benoit N, Cohen Y, Rechthand P, Califano J, Moon C-s, Ratovitski E, Jen J, Sidransky D und Trink B. (2003). DeltaNp63alpha and TAp63alpha Regulate Transcription of Genes with Distinct Biological Functions in Cancer and Development. *Cancer Res*, **63**, 2351-2357.
- Wu X, Bayle JH, Olson D und Levine AJ. (1993). The p53-mdm-2 autoregulatory feedback loop. *Genes & Development*, **7**, 1126-1132.
- Xing Y, Clements WK, Kimelman D und Xu W. (2003). Crystal structure of a beta-catenin/axin complex suggests a mechanism for the beta-catenin destruction complex. *Genes Dev.*, **17**, 2753.
- Xu J, Lamouille S und Derynck R. (2009). TGF-beta-induced epithelial to mesenchymal transition. *Cell Res*, **19**, 156-172.
- Xu Z, Shen MX, Ma DZ, Wang LY und Zha XL. (2003). TGF-beta1 -promoted epithelial-to-mesenchymal transformation and cell adhesion contribute to TGF-beta1 -enhanced cell migration in SMMC-7721 cells. *Cell Res*, **13**, 343-350.
- Yamaguchi K, Wu L, Caballero O, Hibi K, Trink B, Resto V, Cairns P, Okami K, Koch W, Sidransky D und Jen J. (2000). Frequent gain of the p40/p51/p63 gene locus in primary head and neck squamous cell carcinoma. *International Journal of Cancer*, **86**, 684-689.
- Yamaguchi TP, Takada S, Yoshikawa Y, Wu N und McMahon AP. (1999). T (Brachyury) is a direct target of Wnt3a during paraxial mesoderm specification. *Genes & Development*, **13**, 3185-3190.

- Yamamoto H, Kishida S, Uochi T, Ikeda S, Koyama S, Asashima M und Kikuchi A. (1998). Axil, a Member of the Axin Family, Interacts with Both Glycogen Synthase Kinase 3beta and beta -Catenin and Inhibits Axis Formation of Xenopus Embryos. *Mol. Cell. Biol.*, **18**, 2867-2875.
- Yan D, Wiesmann M, Rohan M, Chan V, Jefferson AB, Guo L, Sakamoto D, Caothien RH, Fuller JH, Reinhard C, Garcia PD, Randazzo FM, Escobedo J, Fantl WJ und Williams LT. (2001). Elevated expression of axin2 and hnkd mRNA provides evidence that Wnt/ β -catenin signaling is activated in human colon tumors. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **98**, 14973-14978.
- Yang A, Kaghad M, Wang Y, Gillett E, Fleming MD, Dotsch V, Andrews NC, Caput D und McKeon F. (1998). p63, a p53 homolog at 3q27-29, encodes multiple products with transactivating, death-inducing, and dominant-negative activities. *Mol Cell*, **2**, 305 - 316.
- Yang A und McKeon F. (2000). p63 and p73: p53 mimics, menaces and more. *Nat Rev Mol Cell Biol*, **1**, 199-207.
- Yang A, Schweitzer R, Sun D, Kaghad M, Walker N, Bronson RT, Tabin C, Sharpe A, Caput D, Crum C und McKeon F. (1999). p63 is essential for regenerative proliferation in limb, craniofacial and epithelial development. *Nature*, **398**, 714 - 718.
- Yang A, Walker N, Bronson R, Kaghad M, Oosterwegel M, Bonnin J, Vagner C, Bonnet H, Dikkes P, Sharpe A, McKeon F und Caput D. (2000). p73-deficient mice have neurological, pheromonal and inflammatory defects but lack spontaneous tumours. *Nature*, **404**, 99-103.
- Yi R, Poy MN, Stoffel M und Fuchs E. (2008). A skin microRNA promotes differentiation by repressing 'stemness'. *Nature*, **452**, 225-229.
- Yokomizo A, Mai M, Bostwick D, Tindall D, Qian J, Cheng L, Jenkins R, Smith D und Liu W. (1999). Mutation and expression analysis of the p73 gene in prostate cancer. *Prostate*, **39**, 94-100.
- Yook JI, Li X-Y, Ota I, Hu C, Kim HS, Kim NH, Cha SY, Ryu JK, Choi YJ, Kim J, Fearon ER und Weiss SJ. (2006). A Wnt-Axin2-GSK3beta cascade regulates Snail1 activity in breast cancer cells. *Nat Cell Biol*, **8**, 1398-1406.
- Yoshida M, Kijima M, Akita M und Beppu T. (1990). Potent and specific inhibition of mammalian histone deacetylase both in vivo and in vitro by trichostatin A. *Journal of Biological Chemistry*, **265**, 17174-17179.
- Zaika AI, Kovalev S, Marchenko ND und Moll UM. (1999). Overexpression of the Wild Type p73 Gene in Breast Cancer Tissues and Cell Lines. *Cancer Res*, **59**, 3257-3263.
- Zeng L, Fagotto F, Zhang T, Hsu W, Vasicek T, Perry Wr, Lee J, Tilghman S, Gumbiner B und Costantini F. (1997). The mouse Fused locus encodes Axin, an inhibitor of the Wnt signaling pathway that regulates embryonic axis formation. *Cell*, **90**, 181-192.
- Zeng X, Huang H, Tamai K, Zhang X, Harada Y, Yokota C, Almeida K, Wang J, Doble B, Woodgett J, Wynshaw-Boris A, Hsieh J-C und He X. (2008). Initiation of Wnt signaling: control of Wnt coreceptor Lrp6 phosphorylation/activation via frizzled, dishevelled and axin functions. *Development*, **135**, 367-375.
- Zeng X, Tamai K, Doble B, Li S, Huang H, Habas R, Okamura H, Woodgett J und He X. (2005). A dual-kinase mechanism for Wnt co-receptor phosphorylation and activation. *Nature*, **438**, 873-877.
- Zhou P, Byrne C, Jacobs J und Fuchs E. (1995). Lymphoid enhancer factor 1 directs hair follicle patterning and epithelial cell fate. *Genes & Development*, **9**, 700-713.
- Zindy F, Eischen CM, Randle DH, Kamijo T, Cleveland JL, Sherr CJ und Roussel MF. (1998). Myc signaling via the ARF tumor suppressor regulates p53-dependent apoptosis and immortalization. *Genes & Development*, **12**, 2424-2433.

Danksagung

Mein herzlicher Dank gilt Prof. Dr. med. Matthias Dobbstein für die intensive Unterstützung sowie hervorragende wissenschaftliche Betreuung während meiner Promotion.

Für die freundliche Übernahme des Referats, sowie Korreferats danke ich Prof. Ralf Ficner und Prof. Tomas Pieler.

Des Weiteren danke ich allen Mitgliedern der Forschergruppe FOR942, besonders Katharina Damianitsch und Karen Linnemannstöns für viele inspirierende und angenehme Gespräche in wissenschaftlicher sowie privater Runde.

Den aktuellen, wie auch den ehemaligen Mitgliedern der Abteilung Molekulare Onkologie danke ich für die angenehme Arbeitsatmosphäre und gegenseitige Hilfsbereitschaft. Gerade Cathrin Hippel, Antje Dickmanns und Christoph Schultes, die damals in unserer Abteilung mit mir in noch leeren Labor-Räumen angefangen haben, möchte ich für die schöne gemeinsame Zeit danken. Auch danke ich Ulrike Beyer, Monika Bug, Konstantina Marinoglou, Judith Pirngruber und Tanja Prenzel. Ihr alle seid nicht nur Kolleginnen gewesen, sondern seid Freunde geworden.

Ganz besonders danke ich meinen Eltern und meinem Freund, die mich während meiner Promotion auf vielfältige Weise unterstützt haben.

Lebenslauf

■ Persönliche Daten

| | |
|-------------------|--|
| Name | Isabella Drewelus |
| Anschrift | Nelkenwinkel 25, 37081 Göttingen |
| Geburtsdatum/-ort | 10.12.1980 in Bielschowitz (Oberschlesien) |
| Familienstand | ledig |

■ Schulausbildung und Studium

| | |
|-------------------|---|
| seit 10/2005 | Dissertation an der Georg-August Universität Göttingen am Göttinger Zentrum für Molekulare Biowissenschaften in der Abteilung Molekulare Onkologie Titel: „Die Interferenz des Tumorsuppressor-Homologen p63 mit dem kanonischen Wnt-Signalweg“ (Teilprojekt der DFG-FOR942) |
| 11/2004 – 08/2005 | Diplomarbeit am Institut für Virologie der Phillips-Universität Marburg (Note: 1,0) Titel: „Die ISGylierung des Tumorsuppressors p53 und seines Homologs p63“ |
| 10/2000 – 10/2004 | Studium der Biologie an der Phillips-Universität in Marburg, Abschluss: Diplom (Note: 1,2) Schwerpunkte: Virologie, Genetik und Mikrobiologie |
| 08/1997 - 04/2000 | Allgemeine Hochschulreife (Note: 2,1) am Carl-Duisberg Gymnasium in Wuppertal |
| 08/1991 – 07/1997 | Märkisches Gymnasium in Schwelm |
| 08/1988 – 07/1991 | Kath. Grundschule Windthorststrasse in Wuppertal |
| 09/1987 – 07/1988 | Städt. Gemeinschaftsgrundschule Hesselberg in Wuppertal |

Göttingen, den 03. Dezember 2009

Isabella Drewelus