

Untersuchungen zur Nucleolin- abhängigen Genregulation in hämatopoetischen Zellen

Inaugural-Dissertation

zur Erlangung des Doktorgrades
der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät
der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

vorgelegt von

Sven Reister
aus Essen

Düsseldorf, Januar 2015

aus der Klinik für Kinder-Onkologie, -Hämatologie und Klinische Immunologie
der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

Gedruckt mit der Genehmigung der
Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät der
Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

Referent: Prof. Dr. Arndt Borkhardt

Koreferent: Prof. Dr Holger Gohlke

Tag der mündlichen Prüfung:

I. Inhaltsverzeichnis

I.	Inhaltsverzeichnis	I
II.	Tabellenverzeichnis	IV
III.	Abbildungsverzeichnis	V
IV.	Abkürzungsverzeichnis	VII
1.	Einleitung	1
1.1	Leukämien im Kindesalter	1
1.1.1	Die Leukämie im Kindesalter	1
1.1.2	Die akute lymphatische Leukämie	1
1.1.3	Die akute myeloische Leukämie	2
1.2	Nucleolin	3
1.2.1	Entdeckung, Struktur und Funktion von Nucleolin	3
1.2.2	Die Rolle von Nucleolin bei der Tumorgenese	5
1.3	CD133	6
1.3.1	Struktur und Vorkommen	6
1.3.2	Regulation	7
1.4	Der Wnt Signalweg	8
1.4.1	Nicht-kanonische Signalwege	8
1.4.2	Der kanonische Wnt Signalweg	9
1.4.3	Rezeptoren des Wnt Signalweges	9
1.4.4	Liganden des Wnt Signalweges	10
1.4.5	Inhibitoren des Wnt Signalweges	11
1.4.6	Ein genauerer Blick auf die Intrazelluläre Signalkaskade	12
1.4.7	Störungen im Wnt Signalweg und Tumorentstehung	14
1.4.8	Der kanonische Wnt Signalweg in der Hämatopoese und bei Leukämien	15
1.4.9	Der Wnt Signalweg als Therapieziel	17
2	Ziel der Arbeit	19
3	Material und Methoden	20
3.1	Chemikalien und Puffer	20
3.2	Verwendete Plasmide	20
3.2.1	Expressionsplasmide	20
3.2.2	shRNA-Konstrukte	21
3.2.3	Reporterplasmide	21
3.3	Herstellung chemisch kompetenter Bakterien	22
3.4	Transformation von E.coli	22
3.5	Plasmidisolation	22
3.6	Restriktionsverdau	23
3.7	Agarose Gelelektrophorese	23
3.8	Gelelution von DNA Fragmenten aus TAE-Agarosegelen	23
3.9	Polymerasekettenreaktion	23
3.10	Gerichtete Mutagenese von DNA Fragmenten	24
3.10.1	Mutagenese mittels Overlap Extension PCR	24
3.10.2	Site directed Mutagenesis	24
3.11	Ligation von DNA Fragmenten	25
3.12	Colony PCR	26
3.13	Sequenzierung von DNA Fragmenten	26
3.14	Herstellung von rekombinanten GST Fusionsproteinen	27
3.15	Herstellung von DNA Doppelstrangsonden	28

3.16	Radioaktive Markierung von DNA Doppelstrangsonden.....	28
3.17	Electrophoretic mobility shift Assay.....	28
3.18	Crosslinken von DNA und Proteinen sowie Fragmentierung.....	29
3.19	Chromatin Immunpräzipitation.....	29
3.20	Isolation von genomischer DNA.....	30
3.21	Isolation von gesamt RNA.....	30
3.22	Synthese von copyDNA.....	30
3.23	Durchführung einer Sybr Green basierten quantitativen PCR.....	30
3.24	Passagieren von Zelllinien.....	31
3.25	Kryokonservierung von Zelllinien.....	31
3.26	Verwendete Zelllinien.....	31
3.27	Kultur der verwendeten Zelllinien.....	33
3.28	Herstellung von konditioniertem 5637-Kulturüberstand.....	33
3.29	Hitzeinaktivierung von rekombinanten Wnt-Liganden.....	34
3.30	Nukleofektion leukämischer Zelllinien.....	34
3.31	Herstellung Pseudo-lentiviraler Partikel.....	34
3.32	Transduktion von Mutz-2 Zellen.....	35
3.33	Analyse von Oberflächenantigenen mittels Durchflusszytometrie.....	36
3.34	Messung der Reporteraktivität mittels Luciferase-System.....	36
3.35	Herstellung von Gesamtzell-Lysaten.....	37
3.36	Western Blot.....	37
3.37	ELISA.....	37
3.38	Statistik.....	38
4	Ergebnisse.....	39
4.1	Einfluss von Nucleolin auf die CD133 Expression.....	39
4.1.1	Quantitative Analyse der Expression von CD133 Isoformen in verschiedenen Geweben.....	39
4.1.1	Isoformanalyse von CD133 nach Nucleolin Überexpression.....	40
4.1.2	Chromatin Immunpräzipitation von Nucleolin und Analyse von CD133 Promotorsequenzen.....	41
4.1.3	Analyse der Nucleolin abhängigen CD133 P1 Aktivierung.....	44
4.1.4	Analyse der Nucleolin Bindemotive im Hinblick auf die Aktivierung des CD133-P1 Promotors durch Nucleolin.....	46
4.1.5	Untersuchung eines Nucleolin Bindemotives mittels EMSA.....	47
4.2	Untersuchung des Einflusses von Nucleolin auf den kanonischen WNT Signalweg in Mutz-2 Zellen.....	49
4.2.1	Bestimmung der Konzentration von Wnt3a, Wnt5a und Wnt10b in 5637-Kulturüberstand.....	49
4.2.2	Einfluss von FZD8-FC auf den Wnt-Signalweg in Mutz-2 Zellen.....	49
4.2.3	Einfluss rekombinanter Wnt Liganden auf die Expression von Wnt-Zielgenen in Mutz-2 Zellen.....	51
4.2.4	Einfluss von Nucleolin-Überexpression auf die Aktivierung eines Wnt-Reporters.....	53
4.2.5	Untersuchung der TCF-Reporteraktivierung nach Nucleolin-shRNA Knockdown.....	56
4.2.6	Analyse von Proteinen der Wnt Signalkaskade nach Nucleolin shRNA Knockdown.....	58
4.2.7	Einfluss von kanonischen Wnt Liganden nach Nucleolin Überexpression.....	61
4.2.8	Einfluss von Nucleolin bei FZD8- Gabe.....	67
4.3	Untersuchung der TCF7L2 Genregulation.....	70
4.3.1	Untersuchung der TCF7L2 Promotoraktivierung durch Wnt Liganden.....	70

4.3.2	Analyse der Bindung von Nucleolin an den TCF7L2 Promotor mittels ChIP...	71
4.3.3	Untersuchung der Bindung von Nucleolin an Zielsequenzen des TCF7L2 Promotors	73
4.3.4	Analyse der TCF7L2 Promotoraktivierung mittels Luciferaseassay	75
4.3.5	Einfluss der Deletion von Nucleolin Bindemotiven auf die Promotoraktivierung 77	
5	Diskussion	79
5.1	Nucleolin bindet den CD133 P1 Promotor in hämatopoetischen Zellen.....	79
5.2	Nucleolin bindet und aktiviert den CD133P1 Promotor über spezifische Bindesequenzen.....	80
5.3	Die Implikation von Nucleolin im kanonischen Wnt Signalweg	81
5.4	Nucleolin ist essentiell für den Wnt vermittelten Signalweg	83
5.5	Nucleolin bindet den TCF7L2-Promotor über spezifische Bindemotive	85
5.6	Mögliche weitere Implikationen von Nucleolin in den Wnt Signalweg	86
5.7	Fazit	87
5.8	Ausblick.....	89
6	Zusammenfassung	90
7	Summary	91
8	Danksagung	92
9	Erklärung	107
10	Literaturliste	92
11	Anhang	109
11.1	Verwendete Geräte.....	109
11.2	Für die Arbeit verwendete Kits.....	109
11.3	Verwendete Enzyme	110
11.4	Antikörperliste	110
11.5	Verwendete Plasmide.....	111
11.5.1	Verwendete Plasmide für Reporteragenassays	111
11.5.2	Verwendete Plasmide für die Herstellung lentiviraler Partikel	111
11.6	Verwendete Software und Datenbanken.....	111
11.7	Verwendete DNA Oligonukleotide.....	112
11.7.1	Analyse von Genexpression mittels qRT-PCR	112
11.7.2	Primer für Reporter copy Number Analyse.....	112
11.8	Verwendete E.coli Stämme.....	112
11.9	Puffer und molekularbiologische Medien.....	113

II. Tabellenverzeichnis

Tab. 1 Vergleich der Sequenzkonservierung humaner und muriner RNA Erkennungsmotive (Anhand der Proteinsequenzen für humanes (NP_005372) und murines (NP_035010.3) Nucleolin	4
Tab. 2 Gewebe und Zelltypen, die CD133 exprimieren	7
Tab. 3 Effekt von Mutationen im Wnt Signalweg und daraus resultierende Tumortypen	15
Tab. 4 Präklinische Ansätze zur Wnt gerichteten Therapie	18
Tab. 5 Pipettierschema für eine PCR	24
Tab. 6 Temperaturprotokoll für eine PCR	24
Tab. 7 Pipettierschema für eine Sanger-Sequenzierung.....	26
Tab. 8 Temperaturprotokoll der Fluoreszenzmarkierung mit Didesoxynukleotiden.....	26
Tab. 9 Pipettierschema für die radioaktive Markierung von Doppelstrang DNA mit ³² P-γATP	28
Tab. 10 Pipettierschema für eine EMSA-Reaktion	29
Tab. 11 Pipettierschema für Sybr Green basierte qPCR-Reaktionen.....	30
Tab. 12 Temperaturschema für eine 3-Schritt qPCR	31
Tab. 13 Verwendete Zelllinien.....	31
Tab. 14 Pipettierschema für die Herstellung pseudo-lentiviraler Partikel der 2. und 3. Generation	35

III. Abbildungsverzeichnis

Abb. 1 Schematische Darstellung des humanen Nucleolin Proteins (verändert nach Hanakahi <i>et al.</i> , 1997).....	3
Abb. 2 Schematische Darstellung des humanen CD133 Proteins in der Zellmembran (verändert nach Irollo und Pirozzi, 2013)	6
Abb. 3 Struktur des LRP6 Rezeptors (verändert nach Bao <i>et al.</i> , 2012)	10
Abb. 4 Schematische Darstellung des kanonischen Wnt Signalweges	14
Abb. 5 Schematische Darstellung der pCDH-NCL T2A Lngfr Expressionskassette	20
Abb. 6 Schematische Darstellung der Overlap Extension und site directed Mutagenese.....	25
Abb. 8 Analyse der Expression von CD133 und CD34 in Mutz-2 und SEM mittels FACS...	32
Abb. 9 Expressionsanalyse unterschiedlicher CD133 Isoformen	40
Abb. 10 Einfluss von Nucleolin auf die Expression von CD133 Isoformen in transduzierten Mutz-2 Zellen.....	41
Abb. 11 Einfluss von Nucleolin auf die Expression von CD133 Isoformen in transduzierten SEM Zellen	41
Abb. 12 Chromatin Immunpräzipitation des CD133 P1- und P2-Promotors in Mutz-2 und SEM Zellen	42
Abb. 13 Chromatin Immunpräzipitation des CD133 P1- und P2 Promotors in primären CD34 ⁺ HPZs.....	43
Abb. 14 CD133 Reporter Aktivierung durch Nucleolin aber nicht durch ΔN in Mutz-2 Zellen	44
Abb. 15 Dosisabhängige Aktivierung des CD133 Reporters durch Nucleolin in Mutz-2	45
Abb. 16 Analyse der Nucleolin CD133 Reporteraktivierung nach Deletion von Bindemotiven in Mutz-2	46
Abb. 17 Analyse der Nucleolin CD133 Reporteraktivierung nach Deletion von Bindemotiven in SEM.....	47
Abb. 19 Einfluss von FZD8-FC auf die Expression von Wnt Zielgenen in Mutz-2 Zellen	50
Abb. 20 Einfluss von kanonischen Wnt Liganden auf die Expression von Wnt-Zielgenen in Mutz-2 Zellen.....	52
Abb. 21 Einfluss von Wnt5a auf die Aktivierung des kanonischen Wnt Signalweges in Mutz-2 Zellen.....	53
Abb. 22 Analyse der Wnt Reporteraktivierung mittels Luciferase-Reporterassays	54
Abb. 23 Analyse der Wnt Reporteraktivierung nach Nukleofektion mit ansteigenden Nucleolinmengen	55
Abb. 24 Analyse des kanonischen Wnt Signalweges nach shRNA vermitteltem Nucleolin Knockdown	57
Abb. 25 Western Blot Analysen nach Nucleolin Knockdown und Wnt3a-Behandlung	58
Abb. 26 qRT Analysen nach Nucleolin shRNA Knockdown und Behandlung mit Wnt3a.....	59
Abb. 27 qRT Analyse von Wnt Inhibitoren in Mutz-2 shRNA Zellen mittels qRT-PCR.....	60
Abb. 28 Western-Blot Analysen in Mutz-2 Zellen nach Transduktion und Wnt3a-Behandlung	62
Abb. 29 qRT Analysen in Mutz-2 Zellen nach Nucleolin-Transduktion und Wnt3a Behandlung.....	64
Abb. 30 Western-Blot Analysen in Mutz-2 Zellen nach Nucleolin-Transduktion und Wnt10b-Behandlung.....	65
Abb. 31 qRT-Analysen in Mutz-2 Zellen nach Nuucleolin-Überexpression und Wnt10b-Behandlung.....	66
Abb. 32 Einfluss von FZD8-FC auf Nucleolin transduzierte Mutz-2 Zellen.....	68

Abb. 33 Einfluss von FZD8-FC auf Nucleolin transduzierte Mutz-2 Zellen und Analyse mittels qRT-PCR.....	69
Abb. 34 Einfluss von Wnt3a und Wnt5a auf die TCF7L2 Promotoraktivität.....	70
Abb. 35 ChIP Analysen des TCF7L2 Lokus in CD34+ Zellen und Mutz-2 Zellen	73
Abb. 36 Untersuchung der Bindung von Nucleolin an Motive des TCF7L2 Promotors.....	74
Abb. 37 Analyse der TCF7L2 Reporteraktivierung in Mutz-2	75
Abb. 38 Einfluss der Nucleolin Menge auf die TCF7L2 Promotoraktivierung.....	76
Abb. 39 Analyse des TCF7L2 Reporters mit Deletionen putativer Nucleolin Bindemotive in Mutz-2 Zellen.....	78

IV Abkürzungsverzeichnis

A	Adenosin
A	Ampere
ABC	Actives β -Catenin
ALL	Akute lymphatische Leukämie
AML	Akute myeloische Leukämie
Amp	Ampicillin
APS	Ammoniumperoxodisulfat
ATP	Adenosintriphosphat
bp	Basenpaar
BSA	Bovines Serumalbumin
cDNA	copyDNA
C	Cytosin
CD	Cluster of Differentiation
ChIP	Chromatin-Immunpräzipitation
ci	Curie
CpG	Cytosin-Guanosin-Dinukleotid
CRT	β -Catenin related transcription
CTD	Cystein reiche Domäne
DMEM	Dulbecco's modified eagles medium
DNA	Desoxyribonukleinsäure (<i>deoxyribonucleic acid</i>)
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EMSA	Electrophoretic mobility shift assay
ELISA	Enzyme linked immunosorbent assay
FKS	Fötales Kälberserum
G	Guanosin
GST	Glutathion-S-Transferase
Hrp	Meerrettichperoxidase (horseradish-peroxidase)
HSZ	Hämatopoetische Stammzelle
IMDM	Iscoves modified Dulbeccos medium
Kana	Kanamycin
Neo	Neomycin
NLS	Nukleäre Lokalisationssequenz
mRNA	messenger RNA
m	Milli
ng	Nanogram
M	Molar
nt	Nukleotid
PBS	Phosphate buffered saline
PCR	Polymerasekettenreaktion
Puro	Puromycin
pH	<i>potentia Hydrogenii</i>
pM	Picomolar
PNK	Polynukleotidkinase
qPCR	quantitative Polymerasekettenreaktion
q-RT-PCR	quantitative reverse Transkriptase-Polymerasekettenreaktion
REM	RNA Erkennungsmotiv
RIPA	Radioimmunpräzipitations-Assay
RNA	Ribonucleinsäure (<i>ribonucleic acid</i>)

SDS	Natriumdodecylsulfat
shRNA	short hairpin-RNA
SN	Überstand (<i>supernatant</i>)
TMB	3,3', 5,5-Tetramethylbenzidine
T	Thymin
TAE	Tris-Essigsäure-EDTA
TBE	Tris-Borsäure-EDTA
Temed	Tetramethylethyldiamin
Tris	<i>Tris</i> (hydroxymethyl)-aminomethan
UTR	Untranslatierte Region
ÜN	Über Nacht
V	Volt
SOB	Super optimal broth
UV	Ultraviolett
μ	Micro

Abkürzungsverzeichnis viel verwendeter Gene

EGFR	Epidermal growth factor receptor
AKT1	v-akt murine thymoma viral oncogene homolog 1
APC	Adenomatosis polyposis coli
BCL-2	B-cell lymphoma 2
CCND1	Cyclin D1
CTNNB1	β-Catenin
DKK1	Dickkopf Homolog 1
DKK2	Dickkopf Homolog 2
DKK3	Dickkopf Homolog 3
DVL	Disheveled
GSK3β	Glutamin Synthase Kinase 3beta
HDAC6	Histon Deacetylase 6
MSX1	Msh homeobox 1
NCL	Nucleolin
HIF2α	Hypoxia inducible factor 2 alpha
LNGFR	low affinity nerve growth factor receptor
TGFβ	Transforming Growth factor beta
TCF4	Transcription factor 4
TCF7L2	Transcription factor 7-like 2
LEF	Lymphoid enhancer factor
FZD	Frizzled
LRP	Low Density Lipoprotein Receptor-related Protein 1
Wnt	Wingless int
sFRP	secreted frizzled receptor protein
WIF	Wnt inhibitory factor

1. Einleitung

1.1 Leukämien im Kindesalter

1.1.1 Die Leukämie im Kindesalter

Unter einer Leukämie versteht man eine neoplastische Erkrankung des hämatopoetischen Systems, bei der es zu einer unkontrollierten Proliferation nicht differenzierter Zellen (Blasten) kommt. Die Leukämie ist die häufigste Tumorerkrankung im Kindes- und Jugendalter. So sind 35% der jährlich knapp 18.000 Tumordiagnosen leukämischer Art und zeigen in den meisten Fällen einen akuten Phänotyp (Kinderkrebsdatenbank, Stand 2011). Die Einteilung der Leukämie in Subtypen erfolgt anhand der Morphologie der Blasten, der Expression von bestimmten Oberflächenmarkern sowie klinischen Faktoren. Die zwei häufigsten Formen sind die akute lymphatische Leukämie (ALL), zu welcher ca. 85% der diagnostizierten Leukämien gehören, und die akute myeloische Leukämie (AML), welche eine Inzidenz von ca. 15% hat. ALLs bezeichnen Leukämien, welche die lymphatische Zellreihe betreffen und AMLs Leukämien, welche die myeloische Zellreihe betreffen.

1.1.2 Die akute lymphatische Leukämie

Die akute lymphatische Leukämie umfasst akute Leukämien, bei denen es zu einer klonalen Expansion von Zellen mit B- oder T-Zell-Phänotyp kommt. Ursache ist meist eine transformierende Mutation welche proliferativ wirkt und gleichzeitig die Differenzierung unterdrückt. Durch den Wachstumsvorteil verdrängt die Leukämie die normale Hämatopoese und kann unbehandelt innerhalb weniger Monate zum Tode führen. Der Behandlungserfolg bei pädiatrischen ALLs ist relativ hoch, sodass 80% der Erkrankten fünf Jahre nach Behandlung frei von Rezidiven sind.

Auslöser der ALL ist häufig eine transformierende Mutation in lymphatischen Progenitoren. So können beispielsweise Mutationen in Genen der Hämatopoese (beispielsweise *RUNX1*, *GATA3* oder *ETV6*), oder des Ras/ Raf Signalweges (beispielsweise *NRAS*, *KRAS* oder *FLT3*; Pui *et al.*, 2012) auftreten. Hinzu kommen numerische Aberrationen (Veränderung der Chromosomenzahlen wie hypo- oder hyperdiploide Karyotypen, Trisomien der Chromosomen 4, 10 oder 17) und strukturelle Aberrationen (Translokationen, Inversionen, Deletionen). Strukturelle Aberrationen aufgrund von chromosomalen Translokationen können zu onkogenen Fusionsgenen führen, beispielsweise *BCR-ABL*, *TEL-AML* oder *TCF3-PBX1* (Carroll *et al.*, 2003).

1.1.3 Die akute myeloische Leukämie

Unter dem Begriff AML ist eine heterogene Entität von neoplastischen Erkrankungen zusammengefasst, die die myeloide Zellreihe betreffen. Die AML tritt vor allem bei jüngeren Kindern auf. Während vor 20 Jahren keine spezifischen Therapieregimente für die AML vorhanden waren und dadurch die Erkrankung kaum erfolgreich behandelbar war, so gibt es inzwischen sehr spezifisch auf den Subtyp der Leukämie abgestimmte Behandlungsmethoden, wodurch ca. 70% der Patienten nach Behandlung keine Blasten mehr im Blut aufweisen. Jedoch treten bei diesem Tumortyp im Gegensatz zur ALL in ca. 50% der Fälle Rezidive auf (Rubnitz, 2012).

Die Entstehung einer AML beruht ebenfalls auf einem transformierenden Ereignis, oftmals einer Mutation im Stammzellkompartiment des Knochenmarks oder Progenitoren der myeloiden Reihe. Durch diese onkogene Transformation kommt es zu einer erhöhten Proliferation der Zelle mit gestörter Differenzierung. Die Auslöser für eine AML sind vielfältig und umfassen Umweltfaktoren (ionisierende Strahlung, aromatische Substanzen, Pestizide), mutagene Agenzien (Zytostatika, beispielsweise Topoisomerase Inhibitoren) oder genetische Ursachen. So besteht bei Kindern mit Trisomie 21 ein 15 fach erhöhtes Risiko für eine akute megakaryozytische Leukämie (Rosner und Lee, 1972). Daneben erhöhen Grunderkrankungen, welche die DNA Reparatur und die Zellzykluskontrolle betreffen, die Inzidenz. Beispiele dafür sind das Li-Fraumeni Syndrom (Verlust von P53; Anensen *et al.*, 2006) oder die Fanconi-Anämie, wo die *DNA-Mismatch*-Reparatur gestört ist (Auerbach und Allen, 1991). Weiterhin sind chromosomale Translokationen zu beobachten, welche zu Fusionsgenen führen. Beispiele dafür sind die Fusionsgene *AML1/ETO* oder *PML/RAR* (Müller-Tiedow *et al.*, 2004).

Der Einfluss von stammzellassozierten Signalwegen und der gesteigerten Expression von antiapoptotischen Faktoren wurde in letzter Zeit immer deutlicher (Staal und Langerak, 2008; Wang *et al.*, 2010, Beghini *et al.*, 2012). So wurde gezeigt, dass der Faktor Nucleolin in Leukämien verstärkt exprimiert wird und aufgrund seiner antiapoptotischen und proliferativen Eigenschaften das Wachstum der Leukämie begünstigt (Gattoni-Celli *et al.*, 2009; Otake *et al.*, 2007).

1.2 Nucleolin

1.2.1 Entdeckung, Struktur und Funktion von Nucleolin

Nucleolin ist ein nukleoläres, hochkonserviertes und abundantes Phosphoprotein, welches erstmals von Orrick *et al.* als C23 beschrieben wurde (Orrick *et al.* 1973). In ruhenden Zellen wird es kaum exprimiert, wohingegen es bei proliferierenden Zellen einen Anteil von bis zu 5% am gesamten nukleären Protein erreichen kann (Lapeyre *et al.*, 1987). Die Sequenz und die daraus resultierende Proteinstruktur von Nucleolin wurde erstmals anhand von Hamsterzellen bestimmt und vergleichbare Studien mit Homologen anderer Spezies zeigten eine hohe Konservierung des Proteins (Bourbon *et al.*, 1988; Srivastava *et al.*, 1990).

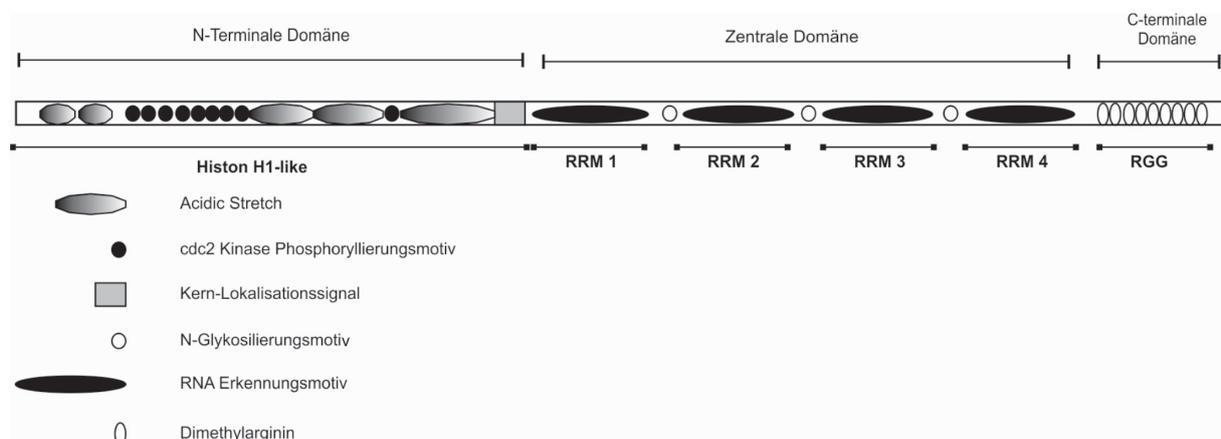


Abb. 1 Schematische Darstellung des humanen Nucleolin Proteins (verändert nach Hanakahi *et al.*, 1997)

Nucleolin hat drei große Strukturbereiche, eine N-terminale Domäne, welche dem Histon H1 gleicht, eine zentrale Domäne mit 4 RNA Erkennungsmotiven und eine C-terminale Domäne (Abb. 1). Die N-terminale Domäne besteht aus Sequenzen saurer Aminosäuren getrennt durch basische Octapeptid-Sequenzen welche Vergleichbar mit der Struktur des Histons H1 sind (Erard *et al.* 1990) und wird durch verschiedene Kinasen z.B. Casein Kinase II oder cdc2 phosphoryliert (Caizergues-Ferrer *et al.*, 1987; Belenguer *et al.*, 1989). Die zentrale Domäne enthält 4 RNA Erkennungsmotive (REM) und mehrere Zielsequenzen für N-Glykosilierung des Proteins. Die REM-Sequenzen sind hoch konservierte Motive, die in verschiedenen RNA assoziierten Proteinen vorkommen und die die Spezifität der RNA Bindung vermitteln (Ginistry *et al.*, 1999). Die Sequenzen der vier Domänen untereinander unterschieden sich stark, während innerhalb verschiedener Spezies die einzelnen Domänen konserviert vorliegen. Dies zeigt sich bei einem Sequenzalignment von humanen und murinen Bindedomänen (Tab. 1).

Tab. 1 Vergleich der Sequenzkonservierung humaner und muriner RNA Erkennungsmotive (Anhand der Proteinsequenzen für humanes (NP_005372) und murines (NP_035010.3) Nucleolin

	hRRM1	hRRM2	hRRM3	hRRM4	mRRM1	mRRM2	mRRM3	mRRM4
hRRM1		20,7	10,96	28,36	85,14	25,68	9,46	17,57
hRRM2			41,1	34,33	12,16	81,33	40	28
hRRM3				38,81	10,96	45,21	90,41	23,23
hRRM4					20,9	40,3	35,82	77,61
mRRM1						20,27	10,81	18,92
mRRM2							40	30,67
mRRM3								20,78
mRRM4								

Zudem wurde gezeigt, dass die einzelnen Domänen fast funktionslos sind und erst eine Kombination mehrerer Domänen eine effiziente Bindung von Nukleinsäuren ermöglicht.

Der C-Terminus des Proteins zeichnet sich durch starke Methylierung von Argininen aus (Lischwe *et al.*, 1982). Diese Domäne ermöglicht die DNA Bindung des Proteins und sorgt für die nukleoläre Lokalisation (Heine *et al.*, 1993).

Nucleolin ist sehr aktiv in sich stark teilenden Zellen, wie Tumor- oder Stamm- und Progenitorzellen, verglichen mit ruhenden Zellen (Johansson *et al.*, 2010). Das Protein ist vornehmlich in den fibrillären Kompartimenten des Nucleolus lokalisiert, jedoch auch im Nukleoplasma, Cytoplasma und der Zellmembran (Tajrishi *et al.*, 2011). Im Nucleolus liegt eine Funktion in der Regulation der pre-rRNA Transkription (Cong *et al.* 2012). Es gibt jedoch noch weitere Implikationen des Proteins im Zellzyklus, in der Regulation anderer Proteine oder in der direkten Bindung an Promotorsequenzen und dadurch deren Regulation. So wurde beispielsweise gezeigt, dass Nucleolin spezifische Bindesequenzen im humanen CD34 Promotor erkennen und binden kann und somit zu einer erhöhten Transkription führt (Grinstein *et al.*, 2007). Weiterhin wurde nachgewiesen, dass Nucleolin spezifische telomerische Sequenzen binden kann (Khurts *et al.*, 2004). Neben der Bindung der Telomer-DNA kann Nucleolin Protein-Wechselwirkungen mit der humanen Telomerase-reverse Transkriptase (hTert) ausbilden und somit zu einer erhöhten Aktivität des Komplexes führen. Nucleolin kann ebenso durch seine dem Histon H1 stark ähnelnde Struktur Chromatinstrukturen modulieren (Erard *et al.* 1988). So wurde gezeigt, dass der Verlust von Nucleolin zu einer verstärkten Kondensation von Chromatin führen kann (Caizergues-Ferrer *et al.* 1987., Belenguer *et al.*, 1990). Weiterhin wurde mithilfe von Knockdown Experimenten gezeigt, dass die Abwesenheit von Nucleolin zu einer Deorganisation der Nucleoli führt und somit in einer fehlerhaften Ausbildung der Mitosespindel resultiert (Ma *et al.*, 2007). Dadurch

kam es neben einer erhöhten Replikationsdauer zu mehr chromosomalen Aberrationen, sowie einer höheren Apoptoserate (Ugrinova *et al.*, 2007).

1.2.2 Die Rolle von Nucleolin bei der Tumorgenese

Neben der Transkription der pre-rRNA ist Nucleolin wichtig für die Prozessierung verschiedener mRNAs wichtiger regulatorischer Proteine. So sorgt eine Überexpression von Nucleolin für einen Anstieg von BCL-2, einem stark antiapoptotischen Faktor (Grinstein *et al.*, 2007). Durch die Bindung der 5'-UTR der P53 mRNA und daraus resultierender Inhibition der Translation kann Nucleolin zudem wichtige Kontrollmechanismen der Zelle stören und eine unkontrollierte Proliferation begünstigen (Takagi *et al.*, 2005). Weiterhin wurde von Grinstein *et al.* gezeigt, dass Nucleolin die Transkription der Elemente E6 und E7 des HPV18 Virus in Zervikalkarzinomzellen aktivieren kann (Grinstein *et al.*, 2002). Somit wurde in dieser Arbeit erstmals das onkogene Potential dieses Proteins gezeigt.

Nucleolin bindet weiterhin Akt1-oder Cyclin1-mRNA was die Translation dieser Proteine erhöht und so einen anti-apoptotischen und pro-proliferativen Effekt erzeugt (Abdelmohsen *et al.*, 2011). Auf gleiche Weise bindet das Protein die 3'-UTR der Matrix-Metalloproteinase 9 (MMP9), und erhöht die Translation, wodurch eine Invasion der Tumorzellen begünstigt werden kann (Fähling *et al.*, 2005). Wiederum begünstigend für Tumorzellen wirkt die Assoziation von Nucleolin mit hTert und der Zielsequenz an den Telomeren, da so die proliferative Seneszenz umgangen werden kann (Khurts S *et al.*, 2004).

Aufgrund dieser Vielzahl an Tumor-begünstigenden Eigenschaften und der Tatsache, dass in Tumoren Nucleolin vermehrt membranständig vorkommt, wird das Protein als lohnendes Ziel für anti-Tumor Therapien angesehen. So wurde ein gegen Nucleolin gerichtetes Aptamer entwickelt, welches die Aktivierung von Zielgenen wie BCL-2 drastisch reduziert (Soundararajan *et al.*, 2008).

1.3 CD133

1.3.1 Struktur und Vorkommen

CD133 oder auch Prominin-1 genannt wird von dem Gen *PROM1* kodiert und bildet zusammen mit Prominin-2 die Familie der 5-Transmembrandomänen enthaltenden Proteine. Die Erstbeschreibung dieses Proteins wurde von Yin *et al.* mithilfe eines Antikörpers gegen das Epitop AC133 durchgeführt, und die genauere Charakterisierung inklusive Sequenzaufklärung folgte im Laufe des gleichen Jahres (Yin *et al.*, 1997; Miraglia *et al.*, 1997). Es konnte eine Expression auf CD34⁺ Zellen des Knochenmarks und der fötalen Leber, sowie Retinoblastomzellen festgestellt werden. Das humane Gen *PROM1* ist auf Chromosom 4p15 lokalisiert und kodiert für 16 Isoformen, die durch fünf verschiedene Promotoren reguliert werden (Shmelkov *et al.*, 2003). Die Expression dieser Isoformen ist gewebespezifisch und angereichert in Stamm-/Progenitorzellkompartimenten. Das translatierte Protein ist stark glykosyliert und akkumuliert in Protrusionen, kleinen Ausstülpungen der Zellmembran die eine polarisierte Zelle ausbildet und die der Migration dienen können (Corbeil *et al.*, 2013). Aufgrund der fünf Membrandurchgänge hat sich ein Modell der Proteinstruktur durchgesetzt, dass einen extrazellulären N-Terminus zeigt, einen zytoplasmatischen C-Terminus und zwei große extrazelluläre Schleifen, die jeweils vier Motive enthalten die N-glykosyliert vorliegen können (Abb. 2).

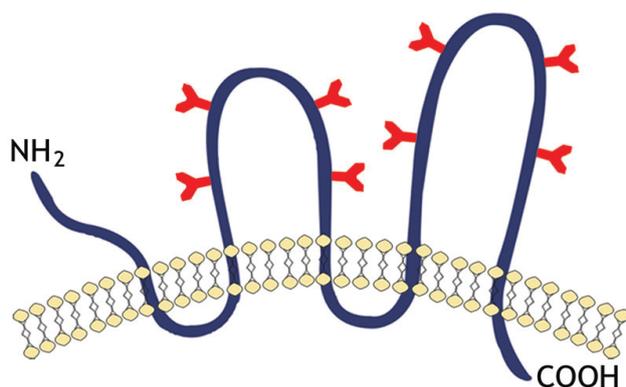


Abb. 2 Schematische Darstellung des humanen CD133 Proteins in der Zellmembran (verändert nach Irollo und Pirozzi, 2013)

Die Abbildung zeigt die zwei Großen und zwei kleinen Schleifen die durch die fünf Transmembrandomänen des CD133 Proteins in der Zellmembran entstehen. In den großen Schleifen befinden sich jeweils zwei Glykosylierungsmotive.

Neuere Untersuchungen zeigen die Präsenz von CD133 in sehr vielen Geweben, meistens angereichert in Zellen die Differenzierungs- und Proliferationspotential aufweisen. So sind im

Knochenmark sowohl die mesenchymalen als auch die hämatopoetischen Stammzellen positiv für CD133. In Tab. 2 sind verschiedene Gewebe und die darin enthaltenen CD133 positiven Zelltypen aufgelistet. In peripheren Geweben wie dem Blut sind CD133⁺ Zellen normalerweise nicht oder nur in sehr geringen Frequenzen vertreten. Erst im Falle eines regenerativen Prozesses, kommt es zu einer vermehrten Zahl positiver Zellen im Blut (Gehling et al, 2005). Weiterhin wird die Expression von CD133 genutzt, um Tumorzellen mit Stammzellcharakter zu identifizieren (Wu und Wu, 2008). So werden CD133⁺ Zellen in vielen Tumortypen gefunden, beispielsweise in Tumoren des Colon, der Prostata und Leukämien (Corbeil *et al.*, 2000, Patrawala *et al.*, 2006 Horn *et al.*, 1999).

Tab. 2 Gewebe und Zelltypen, die CD133 exprimieren

Organ	Zelltyp	Referenz
Pankreas	pankreatische Sternzellen	Kordes <i>et al.</i> , 2008
Leber	Hepatische Sternzellen	Kordes <i>et al.</i> , 2009
Gehirn	Neuronale Vorläuferzellen	Uchida <i>et al.</i> , 2000
Auge	Retina-Vorläuferzellen	Immervoll <i>et al.</i> , 2008
Darm	Darmcrypten	Immervoll <i>et al.</i> , 2008
Haut	Haarfollikel	Driskell <i>et al.</i> , 2011
Niere	proximale Epithelzellen	Corbeil <i>et al.</i> , 2014
Testis	--	Fargeras <i>et al.</i> , 2004
Knochenmark	hämatopoetische Stammzellen	Yin <i>et al.</i> , 1997
	Mesenchymale Stammzellen	Tondeau <i>et al.</i> , 2005
Fötus	Embryonale Stammzellen	Jaksch <i>et al.</i> , 2008
Fötus	Fötale Leber	Yin <i>et al.</i> , 1997
Fötus	Neuralröhre	Corbeil <i>et al.</i> , 2000

1.3.2 Regulation

Die Regulation der CD133 Expression erfolgt auf mehreren Ebenen. So verfügt das Gen über 5 verschiedene Promotoren, die gewebespezifisch aktiviert werden können und die Expression von 16 Isoformen steuern (Shmelkov *et al.*, 2003). In hämatopoetischen Zellen wird beispielsweise die Isoform 1A exprimiert. In der Promotorsequenz liegen zwei große CpG Inseln, die eine Regulation über DNA-Methylierung ermöglichen (Weidner *et al.*, 2013; Tabu *et al.*, 2008; Reister *et al.*, 2011), wodurch die Expression in differenzierten Zellen reguliert wird. Weitere epigenetische Regulation erfolgt durch den Einfluss der microRNA 142-3p, die nicht nur die Expression von CD133 verringert, sondern die Frequenz von hämatopoetischen Stammzellen reduziert (Lee *et al.*, 2014; Lu *et al.*, 2013).

Neben der epigenetischen Regulation ist das CD133 Gen Ziel mehrerer Signalwege. So enthält der beispielsweise putative TCF/LEF Erkennungsmotive, die auf eine Regulation durch den kanonischen Wnt Signalweg ermöglichen können (Kordes *et al.*, 2007; Katoh *et*

al.; 2006). Daneben kann die Stabilität des Proteins durch Interaktion mit der Histon Deacetylase 6 reguliert werden (Mak *et al.*, 2013).

Weiterhin zeigen Rountree und Kollegen, dass der *Transforming Growth Factor β 1* (TGF β 1) über die Smad abhängige Repression von DNA-Methyltransferasen die Expression von CD133 durch die Inhibition von *de novo* DNA Methyltransferasen induzieren kann (Rountree *et al.*, 2010). Diese Beobachtung ist insofern interessant, als dass TGF- β Stammzellen in einem undifferenzierten Zustand bewahrt (Batard *et al.*, 2000).

Weiterhin wird angenommen, dass CD133 präferentiell unter hypoxischen Bedingungen exprimiert wird, welche in der Stammzellnische oder innerhalb solider Tumoren herrschen. So wurde gezeigt, dass in drei verschiedenen Lungenkarzinom-Zelllinien die Expression von CD133 unter hypoxischen Bedingungen zunahm (Iida *et al.*, 2012). Weiterhin zeigten Donovan *et al.*, dass eine Reduktion der O₂-Konzentration die Expression von CD133 und HIF2 α erhöhte und dies über die Aktivierung des CD133P1 Promotors durch HIF2 α erfolgt (Donovan *et al.*, 2012).

1.4 Der Wnt Signalweg

1.4.1 Nicht-kanonische Signalwege

Es gibt zwei nicht-kanonische, also nicht β -Catenin abhängige Wnt Signalwege. Das ist zum einen der Ca²⁺ abhängige Signalweg und zum anderen der planar-Zellpolaritäts Wnt-Signalweg. Bei dem Calcium abhängigen Signalweg kommt es nach der Bindung eines Wnt-Liganden an den Frizzled Rezeptor zur Aktivierung von c-Jun-Kinasen (JNK) sowie der Phospholipase C, was zu einer Erhöhung der Ca²⁺-Konzentration im Zytoplasma führt. Die Steigerung der Ca²⁺ Konzentration wiederum aktiviert die Protein Kinase C (PKC), sowie die *Calmodulin dependent kinase* (CaMK). Als Folge wird die Serin-Phosphatase Calcineurin aktiviert welche *Nuclear factor of active T-cell* (NFAT)- Transkriptionsfaktoren aktiviert. Diese können dadurch in den Zellkern translozieren und dort Zielgene aktivieren. So wirkt dieser Signalweg beispielsweise inhibitorisch auf den kanonischen Wnt-Signalweg (Nemeth *et al.*, 2007).

Der Planar-Zellpolaritäts-Wnt Signalweg übermittelt das Ligandensignal durch kleine G-Proteine der Rho-Rock Familie. Kommt es zu einer Ligandenbindung am Rezeptor so wird das Protein Ras Homolog A (RhoA) parallel zu Rac-Proteinen rekrutiert. RhoA führt nun durch die Aktivierung von Rock zu einer Änderung des Zytoskeletts, wohingegen Rac über die JNK zu einer Transkription von Zielgenen führt (Antara, 2011).

1.4.2 Der kanonische Wnt Signalweg

Bei dem kanonischen Wnt Signalweg wird als Signalmediator das Protein β -Catenin (CTNNB1), ein Homolog des *D.melanogaster* Proteins Armadillo, verwendet. Dieses Protein ist in der Zelle ubiquitär im Zytoskelett verbaut, liegt es jedoch als freies Molekül vor, kann es in den Nukleus translozieren und zusammen mit TCF/LEF Faktoren die Expression von Zielgenen aktivieren.

1.4.3 Rezeptoren des Wnt Signalweges

Für die Erkennung und Bindung von Wnt Liganden sind immer zwei Rezeptoren nötig, die ein Heterodimer bilden. Rezeptoren der *Frizzled* (FZD) Familie stellen den Primärrezeptor dar. Namensgebend ist der infolge eines Verlustes dieser Rezeptoren bei *Drosophila melanogaster* auftretende Phänotyp, welcher in einem Defekt der Haarorganisation sowie verkleinerten Flügeln resultiert (Adler *et al.*, 1990). Es zeigte sich später, dass diese Phänomene auf die Störungen des Wnt Signalweges zurückzuführen waren. Die FZD Proteine sind G-Protein gekoppelte 7 Transmembrangang-Rezeptoren und tragen eine 70-120 Aminosäuren lange Cystein reiche Domäne (CRD), welche der Erkennung und Bindung von kanonischen Wnt Liganden dient (Janda *et al.*, 2012). Diese Domäne liegt vor der ersten Transmembrandomäne und wird durch Disulfidbrücken dreidimensional modelliert. Neben der Wnt bindenden Domäne gibt es mehrere G-Protein assoziierte Domänen, wodurch die Hypothese aufkam, dass der Rezeptor ebenfalls mittels kleiner G-Protein Liganden aktiviert werden kann. Die unterschiedlichen Frizzled-Rezeptoren zeigen aufgrund ihrer variablen CRDs unterschiedlich ausgeprägte Affinitäten zu verschiedenen Wnt Liganden (Gong *et al.*, 2010). Frizzled 8 (FZD8) beispielsweise zeigt die höchste Affinität für Wnt3a, gefolgt von Wnt10b, einem weiteren kanonischen Liganden (Bourhis *et al.*, 2010). Für Wnt5a, einen nicht kanonischen Liganden, ist die Affinität deutlich reduziert.

Zur Weiterleitung des Signals wird neben dem Primärrezeptor noch ein Ko-Rezeptor benötigt. Diesen stellen die Single Pass Transmembranproteine der *LDL receptor related protein* Familie (LRP) dar. LRP5 und LRP6 sind beides ca. 1200 Aminosäuren große Proteine, die 70% Homologie aufweisen. Beide Rezeptoren tragen β -Propeller EGF-like repeats in der extrazellulären Domäne. Dabei dient die LRP6P3/4 Domäne als Bindestelle für Wnt3a und DKK1. Wnt10b wird über die Domänen P1 und P2 gebunden, welche ebenfalls eine Zielstruktur von DKK1 darstellen (Abb. 3). Diese spezifischen Affinitätsuntersuchungen wurden mittels rekombinanter Varianten der Bindestellen und Antikörpern, die gegen diese

gerichtet waren, gezeigt (Bao *et al.*, 2012). Werden einzelne Domänen mutiert, so verliert das Protein je nach mutierter Position die Bindeaffinität für Wnt3a, Wnt10b oder Dkk1. Werden nicht nur Punktmutationen eingeführt, sondern komplette Propeller Domänen deletiert, so wird die Biogenese des Rezeptors gestört. Neben der Störung der Biogenese kann das Fehlen der *Paternally expressed gene 1* (PEG1) moderierten Glykosylierung die Positionierung in der Zellmembran verhindern (Bao *et al.*, 2012).

Kommt es nun dazu, dass ein Wnt Ligand an die intakten Rezeptoren bindet, so folgt eine Trimerisierung, da FZD8 und LRP6 unterschiedliche Domänen des Liganden binden. Die Stöchiometrie dieser Komplexe ist bisher nicht geklärt, weshalb man momentan von einer 1:1:1 Verhältnis ausgeht. Durch diese Trimerisierung wird eine Kaskade von Phosphorylierungen ausgelöst, welche in einer Rekrutierung und Phosphorylierung des Rezeptors durch die Casein Kinase I resultiert. Durch diese Modifikation wird Dishevelled an den Rezeptor rekrutiert und anschließend ebenfalls phosphoryliert.

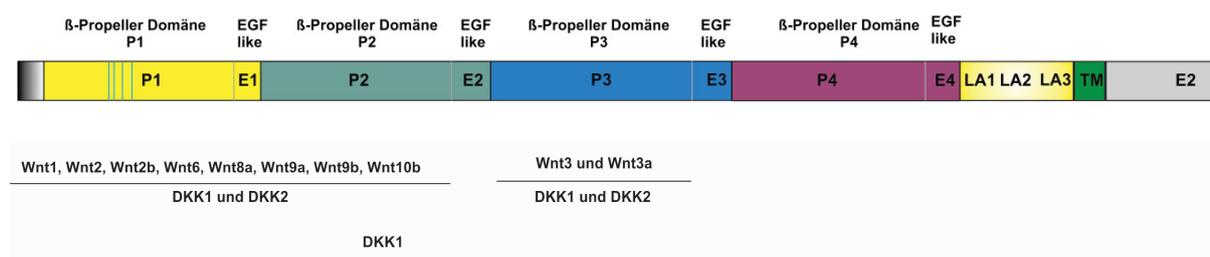


Abb. 3 Struktur des LRP6 Rezeptors (verändert nach Bao *et al.*, 2012)

Der Rezeptor besteht aus einer kleinen C-terminalen zytosplasmatischen Domäne und einer großen extrazellulären Domäne die aus 4 Subdomänen aufgebaut ist. Diese sind zwar strukturell ähnlich haben, jedoch aufgrund ihrer Proteinsequenzen unterschiedliche Ligandenaffinitäten.

1.4.4 Liganden des Wnt Signalweges

Bei den Liganden des kanonischen Wnt Signalweges handelt es sich um eine Familie von homologen Lipoproteinen. Es gibt insgesamt 19 Wnt Liganden, welche am ersten Cysteinrest, der hoch konserviert ist, palmitoyliert vorliegen. Die Lipid-Gruppe erhöht die Hydrophobität des Liganden, was die Bindung an Membranen und die Interaktion mit den Frizzled Rezeptorproteinen verbessert. Die Palmitoylierung erfolgt direkt nach der Translation durch das Enzym Procupine, woraufhin das Protein durch den Proteinkomplex Wntless(Wls)/Eveness interrupted (Evi)/Mom-3 sekretiert wird. Inhibiert man die Palmitoylierung durch Acetyltransferasen, so liegt der Ligand funktionslos vor. Neben der Lipid-Modifikation zeigen neuere Arbeiten die Brisanz von Disulfidbrücken und der daraus resultierenden Faltung des Proteins. Werden beispielsweise einzelne der 24 Cystein Reste

deletiert, so wird dadurch die Aktivität des Liganden herabgesetzt und weiterhin kann dieser mutierte Ligand den Effekt von Wildtyp-Protein aufheben (MacDonald *et al.*, 2014). Es wurde gezeigt, dass dies zum einen durch eine fehlerhafte Sekretion und zum anderen durch eine Veränderung der Proteinstruktur erklärbar ist.

1.4.5 Inhibitoren des Wnt Signalweges

Die Funktionsweise von Wnt Inhibitoren ermöglicht die Unterteilung in zwei Gruppen. Die Proteine der ersten Gruppe binden an die Wnt Rezeptoren und verhindern so die Bindung der Liganden. Zu dieser Gruppe gehören beispielsweise die Dickkopf- Proteine Dkk1, Dkk2, Dkk3 und Dkk4. Diese Proteine binden direkt an den LRP5 oder LRP6 Ko-Rezeptor, wodurch die Liganden vermittelte Dimerisierung unterbunden wird und es nicht zur Weiterleitung der Signale kommt (Niehrs, 2006). Dickkopfproteine sind hoch konservierte sekretierte Proteine, welche sich jedoch untereinander strukturell unterscheiden. So wurde kürzlich gezeigt, dass verschiedene DKKs am LRP6 Rezeptor an unterschiedlichen Positionen binden und so inhibierend wirken (Bao *et al.*, 2012).

Der am besten untersuchte Vertreter dieser Klasse ist DKK1. Da DKK1 einen Tumorsuppressor darstellt, liegt der genomische Locus in Tumoren häufig hypermethyliert vor. Beispiele dafür sind das multiple Myelom oder Lungenkarzinome (Kocemba *et al.*, 2012, Na *et al.*, 2012). In Mausmodellen wurde gezeigt, dass eine konstitutive Expression von DKK1 in Osteoblastenzellen zu einer gestörten Hämatopoese führt (Flemming *et al.*, 2008). Der Inhibitor DKK3 wird ebenfalls in Tumoren durch DNA Hypermethylierung ausgeschaltet (Veek *et al.*, 2009). Dabei wurde diese Regulation besonders häufig bei aggressiven Mamma-Karzinomen gefunden.

Die zweite Gruppe bindet im Gegensatz zur ersten Gruppe nicht an die Rezeptoren sondern direkt an die Liganden, sodass diese nicht in der Lage sind den Rezeptor zu binden. Beispiele dafür sind sekretierte Frizzled Rezeptoren. Diese Moleküle haben wie die membranständigen homologen Proteine Cystein reiche Domänen, wodurch der Ligand gebunden wird. Dadurch fangen die sekretierten Moleküle den Liganden ab, bevor er die Zelloberfläche erreichen kann. Es gibt insgesamt 5 verschiedene sFRP-Homologe, wobei durch gezielte Knockouts einzelner Vertreter deren Redundanz gezeigt wurde (Cruciat und Niers, 2013). Neben der sFRP-Familie gibt es noch den Wnt inhibitory Factor (WIF). Dieser ebenfalls sekretierte Faktor hat eine Wnt-bindende Domäne im N-terminalen Bereich, gefolgt von mehreren EGF-like Repeats, weswegen vermutet wird, dass dieses Protein die Feinregulation von ineinander

übergehenden Liganden Gradienten leistet (Surmann-Schmitt *et al.*, 2009). Des Weiteren wurde gezeigt, dass WIF1 in Tumoren, hier im Falle der akuten promyelocytischen Leukämie, durch Promotor Hypermethylierung inhibiert wird, was den Tumor immens begünstigt und eine schlechte Prognose für den Patienten bedeutet (Chim *et al.*, 2006).

1.4.6 Ein genauerer Blick auf die Intrazelluläre Signalkaskade

So lange keine Wnt Liganden den Rezeptor gebunden haben ist der kanonischen Wnt Signalweg inaktiv. Um dafür zu sorgen, dass es nicht zu einer Signalweiterleitung in Abwesenheit der Liganden kommt gibt es in den Zellen den Scaffold-Protein Komplex. Dieser Multiproteinkomplex sorgt dafür, dass β -Catenin nicht in den Nukleus translozieren kann. Dazu wird β -Catenin von den Proteinen Axin2 und Adenomatöses Poliposis Coli (APC) über C-terminale Domänen komplexiert und somit immobilisiert (Abb. 4A). Es kommt zu einer Phosphorylierung durch die Casein Kinase I am Serin 45. Diese Modifikation markiert das Protein nun für die folgende Phosphorylierung durch die GSK3 β an Serin 33, 37 und Threonin 47. Durch die Modifikation der Serine 33 und 37 kann β -Catenin nun durch die E3 Ubiquitin-Ligase β -TRCP1 erkannt und ubiquitiniert werden. Infolge dessen wird das β -Catenin Molekül der Degradation im Proteasom zugeführt.

Kommt es nun zu einer Ligandenbindung durch die Rezeptoren des kanonischen Wnt Signalweges, so wird das Dishevelled Protein durch Phosphorylierung aktiviert, bindet an Axin2 und rekrutiert weiterhin die Kinase Akt1. Diese phosphoryliert das Serin9 der GSK3 β und inaktiviert dadurch das Protein. β -Catenin wird nun nicht phosphoryliert und kann in den Kern translozieren (Abb. 4B). Dort komplexiert es mit Proteinen der TCF/LEF Familie und aktiviert so deren DNA Bindedomänen was letztendlich zur Transkription von Zielgenen führt.

Wurde nun durch die Ligandenbindung Dishevelled phosphoryliert, so ändert sich die Struktur und Affinität des Proteins und es bindet nun präferentiell Axin-Proteine, wodurch dieser Negativ Regulator des Signalweges an die Zellmembran rekrutiert wird (Nordermeer *et al.*, 1994). Als Folge dessen werden die verbleibenden Komponenten des Signalweges, welche eine Affinität zu Axin aufweisen ebenfalls in diesen Bereichen immobilisiert. Dies führt dazu, dass GSK3 β nicht mehr in der Lage ist CTNNB1 zu phosphorylieren, welches unphosphoryliert in den Kern translozieren kann. Da CTNNB1 keine Nukleäre Lokalisations- (NLS) Sequenz trägt wird angenommen, dass es mit anderen Proteinen komplexiert und so in den Kern transportiert wird. Suh und Gumbiner zeigten, dass es sich dabei wohl nicht um FG-

reiche Nukleoporine handelt, es aber ein aktiver Prozess sein muss, da er temperaturabhängig ist (Suh *et al.*, 2003). Sharma *et al.* zeigten 2012, dass es sich um einen anderen Typ von Nukleoporinen handelt, der mit Armadillo Repeats des CTNNB1 interagiert und über diese Repeats je nach subzellulärer Lokalisation und Bindung durch andere Protein der Import aber auch der Export aus dem Nukleus reguliert wird (Sharma *et al.*, 2012).

Die Aktivierung von Wnt abhängigen Zielgenen kann aber nicht allein durch CTNNB1 geleistet werden, sondern es bedarf einer Gruppe von Transkriptionsfaktoren. Das sind zum einen Proteine der *T-cell specific factor* (TCF)-Familie und zum anderen *lymphoid enhancer factor* (LEF, Behrens *et al.*, 1996). Diese beiden Genfamilien sind hoch konserviert und die Expression der einzelnen Vertreter ist gewebe- und zellspezifisch. Im nicht aktiven Zustand des Signalweges sind die Faktoren durch das Groucho Protein komplexiert und können so nicht transaktivierend wirken (Cavallo *et al.*, 1998). Histon-Deacetylasen sorgen dafür, dass die Zielchromatin-Struktur kondensiert vorliegt (Chen *et al.*, 1999). Wird der Signalweg aktiviert, kommt es zu einer nukleären Akkumulation von CTNNB1, wodurch Groucho vom TCF/LEF Komplex verdrängt wird (Nusse, 1999). Dadurch kann der Komplex nun an Zielsequenzen binden und diese aktivieren.

Unter den Wnt Zielgenen befinden sich mehrere Faktoren, die über eine negative Rückkopplung die Aktivität des Signalwegs regulieren. So wird beispielsweise Axin2 als klassisches Wnt Zielgen gesehen, da es TCF/LEF abhängig transkribiert wird und anschließend die Signalweiterleitung inhibieren kann (Yan *et al.*, 2001 und Lustig *et al.*, 2002).

Neben der Regulation über Axin2 gibt es eine Rückkopplung über die Expression N-Terminal trunkierter Formen von TCF4 und LEF1, welche die Zielstrukturen binden jedoch nicht transaktivieren. Somit kann der Signalweg inhibiert werden, obwohl die Liganden vorhanden sind und die Signalkaskade bis zur Transaktivierungsebene funktionell aktiv ist (Vakic und Lemke, 2011).

In β -Catenin defizienten Zellen konnte gezeigt werden, dass das Homolog γ -Catenin ebenfalls als Signalvermittler dienen kann (Maeda *et al.*, 2009), jedoch die Zielgene deutlich schwächer aktiviert als β -Catenin. So gibt es Vermutungen, dass γ -Catenin inhibitorisch wirken kann, da es aufgrund der *Armadillo repeats* Bindemotive erkennt und bindet, jedoch nicht stark aktiviert. Weiterhin gibt es neben der Möglichkeit β -Catenin durch Phosphorylierung zu stabilisieren, aktivierende Modifikationen. So sorgen Phosphorylierungen am Ser552 und Ser675 durch Protein Kinase A oder AKT1 für eine forcierte Translokation in den Zellkern wo β -Catenin infolge dessen akkumuliert (Fang *et al.*, 2007).

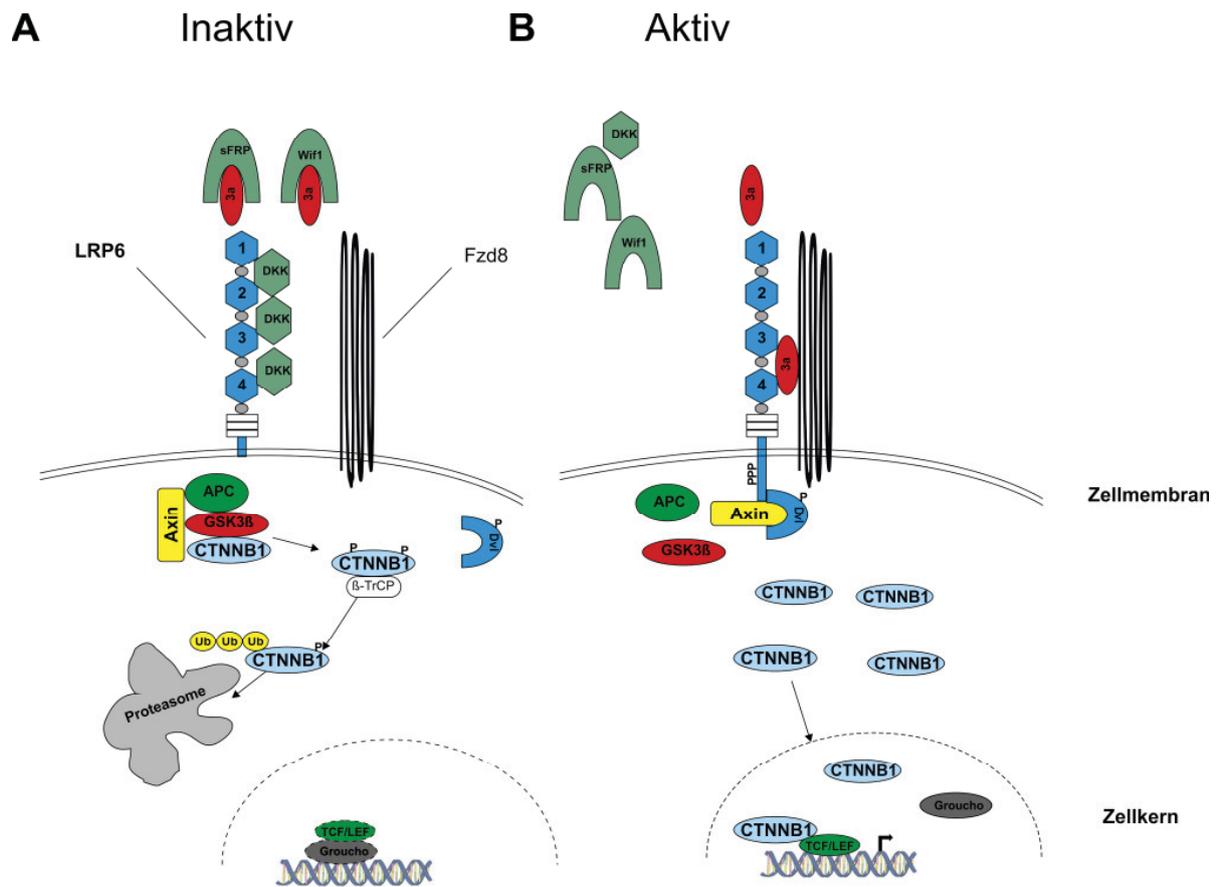


Abb. 4 Schematische Darstellung des kanonischen Wnt Signalweges

Der kanonische Signalweg ist ein Mehrkomponentensignalweg und durch die Präsenz des Scaffold-Komplexes inaktiv (A). Sobald ein Ligand die Rezeptoren FZD und LRP bindet kommt es zur Trimerisierung und anschließender Phosphorylierungskaskade (B). In der Folge wird der Scaffold Komplex gelöst, CTNNB1 transloziert in den Kern und aktiviert zusammen mit TCF/LEF Transkriptionsfaktoren die Expression von Wnt abhängigen Zielgenen.

1.4.7 Störungen im Wnt Signalweg und Tumorentstehung

Der Wnt Signalweg enthält viele Komponenten von denen einige redundant sind, die meisten jedoch nicht. Mutationen die die nicht redundanten Komponenten betreffen können so einen starken Einfluss haben und sich negativ auf den Organismus auswirken.

Ein klassisches Beispiel für eine Erbkrankheit mit Wnt Einfluss ist das Adenomatöse Poliposis Coli. Bei dieser Darmerkrankung kommt es zur Vererbung einer Mutation des APC Genes, wodurch ein Allel des Gens inaktiv ist. Kommt es nun durch chemische Einflüsse oder Fehler bei der Zellteilung zu einer Mutation im zweiten Allel bei Zellen der Darmcrypten, so wird APC inaktiviert und die Komponente fehlt im β-Catenin Degradationskomplex. Dies resultiert in einem unkontrolliert aktiven Wnt Signalweg. Im Folgenden kommt es zur Entwicklung von Adenomen und im weiteren Verlauf zu Darmtumoren. Neben Darmtumoren kann die Inaktivierung von APC zu Medulloblastomen führen, welche im Falle des Turcot-

Syndromes durch eine zusätzliche Mutation der DNA Reparaturgene MLH1 und PMS2 charakterisiert sind (Hamilton *et al.*, 1995). Neben der Mutation des APC-Gens sind bei Darmtumoren Punktmutationen des β -Catenins beschrieben, welche zum Austausch einzelner Aminosäuren führen. Ein Beispiel dafür ist der Austausch vom Serin 33 zu Tyrosin (Kolligs *et al.*, 1999). Das Serin wird normalerweise durch den Degradationskomplex phosphoryliert und β -Catenin daraufhin der Degradation zugeführt. Infolge des Aminosäureaustausches ist dies nicht mehr möglich und der Signalweg ist dadurch konstitutiv aktiv. Neben APC und CTNNB1 können weitere Komponenten des Signalweges betroffen sein. So kommt es in Hepatozellulären Karzinomen zu inaktivierenden Mutationen von Axin1, welche dazu führen, dass β -Catenin nicht im Degradationskomplex gehalten wird und der *Feedback Loop*, welcher normalerweise über Axin1 und Axin2 den Signalweg reguliert, nicht greift. Des Weiteren wurde innerhalb einer Kohorte von Hepatozellulären Karzinomen bei 95% der Patienten eine Hypermethylierung von sFRP1 gefunden, einem sekretierten Antagonisten.

In Tab. 3 sind diese und weitere mit Tumoren assoziierte Gene und deren Veränderungen dargestellt.

Tab. 3 Effekt von Mutationen im Wnt Signalweg und daraus resultierende Tumortypen

Gen	Tumortypen	Veränderung	Referenz
Wnt2	Lungen-Ca	Aktivierung	Bravo <i>et al.</i> , 2013
Wnt10b	Mamma-Ca	Aktivierung	Wend <i>et al.</i> , 2013
Wnt7b	Urothel-Ca	Deaktivierung	Bui <i>et al.</i> , 1998
WIF-1	Ösophagus-Ca	Deaktivierung	Yang <i>et al.</i> , 2012
Wnt5a	Melanom	Aktivierung	Weeratana <i>et al.</i> , 2002
LRP5	Osteosarkom	Deaktivierung	Hoang <i>et al.</i> , 2004
sFRP1	Colon-Ca	Deaktivierung	Suzuki <i>et al.</i> , 2004
CTNNB1	Colon Ca	Aktivierung	Polakis, 2012
APC	Colon Ca	Deaktivierung	Nishido <i>et al.</i> , 1991
Axin-1	Hepatozellulärer-Ca	Deaktivierung	Satoh <i>et al.</i> , 2000
DKK3	ALL	Deaktivierung	Roman-Gomez <i>et al.</i> , 2004
TCF7L2	Mamma-Ca	Dereguliert	Connor <i>et al.</i> , 2012

1.4.8 Der kanonische Wnt Signalweg in der Hämatopoese und bei Leukämien

Schon seit geraumer Zeit beschäftigt sich die Wissenschaft mit der Untersuchung von stammzellosoziierten Signalwegen die für das Mikromilieu der hämatopoetischen Nische und damit für die Hämatopoese von Bedeutung sind.

Welche Rolle der kanonische Wnt Signalweg hierbei spielt, wurde unter anderem von Flemming et al anhand eines Modells mit konstitutiver DKK1 Expression in Osteoblasten untersucht (Flemming *et al.*, 2008). Dabei zeigte sich, dass die Anzahl ruhender Stammzellen drastisch reduziert wurde. Weiterhin zeigten Austin *et al.* in frühen Arbeiten, dass nicht-kanonisches Wnt5a zu einer verstärkten Proliferation dieser Stammzellen führte (Austin *et al.*, 1997). Analysen der Differenzierungsfähigkeit und der Zellproliferation durch Wnt10b zeigten, dass es mehr undifferenzierte Kolonien in Kokultorexperimenten mit Liganden-exprimierenden *Feederzellen* gab als bei Wnt5a Gabe (Van den Berg *et al.*, 1998). Somit wurde gezeigt, dass der kanonische Signalweg die Zellen ruhend und undifferenziert hält, der nicht-kanonische hingegen die Zellen aktiviert und zur Proliferation anregt. In Experimenten wo beide Liganden präsent waren, zeigte sich, dass der kanonische durch Wnt10b aktivierte Signalweg die Wirkung von Wnt5a aufhob. Zudem wird die Expression von Wnt10b während der Regeneration des Knochenmarks induziert und begünstigt die Regeneration (Congdon *et al.*, 2008). Des Weiteren konnte gezeigt werden, dass die Transduktion von murinen hämatopoetischen Stammzellen (HSZ) mit CTNNB1 die Proliferations- und Rekonstitutionskapazität von hämatopoetischen Stammzellen steigert (Reya *et al.*, 2003).

Maus-Experimente mit konstitutiver Überexpression von CTNNB1 in HSZ zeigten, dass es zu einer Anreicherung von Lin⁻Sca⁺Kit⁺ (LSK)-Zellen kommt, die den Stammzellpool repräsentieren, und dass ein Wegfall der CTNNB1 Expression die Rekonstitution des Knochenmarks beeinträchtigt (Kim *et al.*, 1999; Lento *et al.*, 2014). Neuere Arbeiten zeigen jedoch, dass eine reine Überexpression von CTNNB1 die Zellen in die Apoptose drängt, jedoch bei Knockout von *PTEN* die Überexpression zu einer undifferenzierten Proliferation moderiert durch ID2 führt (Perry *et al.*, 2011) Es zeigte sich, dass die Aktivität des kanonischen Signalwegs in einem bestimmten Gleichgewicht stehen muss, um eine normale Hämatopoese zu ermöglichen (Luis *et al.*, 2012). Leukämische Zellen zeigen häufig Veränderungen im kanonischen Wnt Signalling, die die Weitergabe der Signale begünstigen. So zeigte sich, dass DKK1 in chronisch lymphatischen Leukämien signifikant verringert war (Pamuk *et al.*, 2014).

Verschiedene leukämische Zelllinien zeigen im Gegensatz zu CD34⁺ HPZ eine endogene Wnt10b Expression, die möglicherweise dazu führt, dass diese Zellen ohne die Unterstützung der Stammzellnische proliferieren und so zirkulieren können. Weiterhin wurde bei B-Zell ALL gezeigt, dass die Behandlung von Patientenzellen mit Wnt3a antiapoptotisch wirkt (Khan *et al.*, 2007). Zudem wurde in akuten lymphatischen Leukämien gezeigt, dass der Wnt Signalweg aktiv und antiapoptotisch ist und die Behandlung der Zellen mit Catenin-

abhängiger-Transkription (CRT)-Inhibitoren die Chemosensitivität der Zellen erhöht (Dandekar *et al.*, 2014). Der Mechanismus beruht dabei wohl auf der Wnt abhängigen Expression des Birc Proteins, welches antiapoptotisch wirkt. Die Kokultur von HL60-Zellen, einer humanen promyelozytären-Leukämie Zelllinie, mit Wnt5a exprimierenden mesenchymalen Stammzellen wirkte Proliferations-hemmend und begünstigte die terminale Differenzierung der Zellen durch Inhibition des kanonischen Wnt Signalweges (Shen *et al.*, 2014).

Eine Studie mit pädiatrischen T-ALL Patienten zeigte durchweg eine gesteigerte CTNNB1 Expression, zudem wurde eine neue Mutation in einem Patienten gefunden, die den Signalweg konstitutiv aktiviert (Ng *et al.*, 2014). Somit ist CTNNB1 in Leukämien ebenfalls durch Mutationen fehlreguliert. Zudem wurde gezeigt, dass die Expression bestimmter Signalwegskomponenten wie TCF7L2 hochreguliert ist. Letztlich wurde in AML Zellen aus Patienten gezeigt, dass diese den Stammzellmarker CD133 exprimieren und über einen aktiven Wnt Signalweg verfügen, welcher normalerweise nur während der Rekonstitution oder Regeneration des Knochenmarks aktiv ist (Berghini *et al.*, 2012).

Diese Erkenntnisse zeigen, dass sowohl die nicht veränderten CD34⁺-HPZ als auch Leukämiezellen auf den kanonischen Wnt Signalweg angewiesen sind.

1.4.9 Der Wnt Signalweg als Therapieziel

Aufgrund der gesteigerten Anzahl an Publikationen die besagen, dass die Reaktivierung von Antagonisten negativ auf Tumormodelle wirkt, kam die Idee auf, dieses als therapeutisches Ziel zu verwenden. So führte die Gabe von demethylierenden Agenzien zu einer Reaktivierung von sFRP1 und resultiert in einer gesteigerten Apoptose (Valencia *et al.*, 2009). Neben der indirekten Einflussnahme durch Demethylierung wurde gezeigt, dass man durch die Gabe von rekombinanten Frizzled Rezeptoren die Aktivität des Wnt Signalweges drastisch reduzieren konnte, sofern es sich um Liganden abhängige Zelltypen handelt (De Almeida *et al.*, 2007). Es wurde daher vermehrt nach Substanzen gesucht, die den Signalweg inhibieren konnten, unabhängig vom Mutationsstatus. So führt die Gabe von nicht-steroidalen antiinflammatorischen Substanzen wie Indomethacin oder Diclofenac zu einer Reduktion von β -Catenin durch Modulation der TCF-abhängigen Transkription. Daher war die Gabe dieser Substanzen auch bei mutierten Varianten wie der durch S33Y Austausch stabilisierten Variante bei SW480 Zellen wirksam. In Tab. 4 sind einige präklinische Ansätze für die Wnt gerichtete Tumorthherapie dargestellt. Diese zeigt, dass die Therapieansätze basierend auf der

gerichteten Beeinflussung des Wnt Signalweges weit gefächert sind und bei einer Vielzahl verschiedener Tumore eingesetzt werden könnten.

Tab. 4 Präklinische Ansätze zur Wnt gerichteten Therapie

Inhibitor	Zielstruktur	Modell	Tumortyp	Referenz
Salinomycin	Lrp5/6	<i>In vivo</i> Tumorwachstum	Colorectal, Brust	Shan, 2009 Gupta, 2009
Quercetin/Resveratrol	β -Catenin-TCF-Transkriptionskomplex	<i>In vivo</i> Tumorwachstum	Colorectal, Zervikal	Park, 2005 Fu, 2014
JW55	Tankryrase-Inhibitor	<i>In vivo</i> Tumorwachstum	Colorectal	Waalder, 2012
LGK974	Porcupin-Inhibitor	<i>In vivo</i> Tumorwachstum	Brust, Kopf-Hals	Liu, 2013
FJ9	Dishevelled Inhibitor	<i>In vivo</i> Tumorwachstum	Melanom Lunge	Fujii, 2007
Wnt1-Antikörper	Wnt1	<i>In vivo</i> Tumorwachstum	Lunge Colorectal	Rhee, 2002 He, 2004
Wnt10b-Antikörper	Wnt10b	<i>In vitro</i> Zellwachstum	Kopf-Hals	Rhee, 2002
OMP-18R5	Fzd1,2,5,7 und 8	<i>In vivo</i> Tumorwachstum	Colorectal Pankreas	Gurney, 2012
FZD8CRD-FZ	Wnt Liganden	<i>In vivo</i> Tumorwachstum	Brust Teratoma	De Almeida, 2007

2 Ziel der Arbeit

Die Untersuchung stammzellassoziierter Signalwege in der Leukämogenese und deren Regulation gewinnen in den letzten Jahren immer mehr an Bedeutung. So zeigt sich, dass Signalwege durch Fusionprodukte von chromosomalen Translokationen aktiviert werden oder durch andere Mechanismen ein proliferativer Vorteil entsteht.

In der hier vorliegenden Arbeit soll am Modell der AML Zelllinie Mutz-2 der Einfluss des kanonischen Wnt Signalweges auf diese Zellen und des Weiteren der Einfluss des Proteins Nucleolin auf die Aktivität des Wnt Signalweges untersucht werden. Dazu soll zuerst die Frage adressiert werden ob der **kanonische Wnt Signalweg in Mutz-2 Zellen aktiv ist**. Neben dem Einfluss dieses Signalweges durch seine Liganden auf die Zelle soll der **mögliche Einfluss von Nucleolin auf den kanonischen Wnt Signalweg** untersucht werden. Dazu werden Zellsysteme der Überexpression oder des shRNA vermittelten Knockdowns von Nucleolin mit gleichzeitiger Gabe von rekombinanten Wnt Liganden verwendet. Als weiterer Punkt stellt sich die Frage ob **Nucleolin unabhängig von Wnt Liganden den Signalweg aktiviert**.

Neben dem allgemeinen Einfluss von Nucleolin auf diesen Signalweg bestand die Frage nach den möglichen **Zielgenen von Nucleolin im kanonischen Wnt Signalweg**. Dazu wurden Gene untersucht, deren Expression sich in Abhängigkeit von Nucleolin ändert, und diese weiter analysiert. Die Interaktion von Nucleolin mit Promotorsequenzen eines Zielgens sollte mittels Chromatin Immunpräzipitationen in primären CD34⁺ sowie Mutz-2 Zellen untersucht werden und die aktivierenden Effekte von Nucleolin auf den Promotor durch Reporterassays bestimmt werden. Mögliche Nucleolin Bindemotive der Promotorregion sollten mittels *Electrophoretic mobility shift assay* oder selektiver Deletion in Reporterkonstrukten und anschließendem Luciferase-Assay analysiert werden.

Neben dem Einfluss auf die Regulation des Wnt Signalweges soll die **Modulation der CD133 Expression durch Nucleolin** untersucht werden. Dieser Faktor wird von hämatopoetischen Stamm und Progenitorzellen exprimiert, die verstärkt Nucleolin exprimieren verglichen mit differenzierten Zelltypen. Dazu soll der Expressionsunterschied von Gesamt-CD133 und der **Einfluss von Nucleolin auf die Isoformen CD133 1A und CD133 1B** analysiert werden. Daneben soll die molekulare Regulation über Promotorbindung durch Nucleolin in Mutz-2 und SEM Zellen sowie primären CD34⁺ Zellen betrachtet werden. Letztlich soll untersucht werden ob die **Bindung und Aktivierung des CD133 P1 Promotor über Nucleolin-spezifische Bindemotive** benötigt und ob eine selektive Deletion dieser die Aktivierung verhindert.

3 Material und Methoden

3.1 Chemikalien und Puffer

Alle für diese Arbeit verwendeten Chemikalien wurden soweit nicht anders angegeben von den Firmen VWR (Darmstadt) oder Carl Roth (Karlsruhe) in der höchsten erhältlichen Reinheit bezogen. Im Anhang findet sich eine Tabelle der verwendeten Puffer, sowie der verwendeten Chemikalien und molekularbiologischen Kits (vgl. 12)

3.2 Verwendete Plasmide

Alle für die Arbeit verwendeten Plasmide sind im Anhang aufgelistet (vgl. 12.5). Nachfolgend eine kurze Übersicht der verwendeten Plasmidsysteme und Expressionskassetten.

3.2.1 Expressionsplasmide

Die verwendeten Expressionsplasmide für Nucleolin basieren auf dem lentiviralen pCDH-EF1 α -T2A- Δ LNGFR Konstrukt (System Bioscience; Abb. 5) oder dem pCMVTag2B Plasmid (Clontech). Die exogene Expression des trunkierten Δ Lngfr Rezeptors auf der Zelloberfläche wurde benutzt, um durchflusszytometrisch die transduzierten Zellen nachzuweisen und weiterhin mit MACS-Partikeln gegen Δ Lngfr die transduzierten Zellen anzureichern. Weiterhin kodieren die Plasmide für Nucleolin mit N-terminalem FLAG-Tag. Dieser erlaubt die Detektion des exogenen Proteins. Die Variante Nucleolin- Δ N stellt eine Deletionsmutante da, bei der die Aminosäuren 1-278 deletiert wurden. Der Vorteil dieser Plasmide liegt in der Translation beider Proteine von einer mRNA, da so alle Δ Lngfr positiven Zellen auch das Transgen exprimieren müssen.



Abb. 5 Schematische Darstellung der pCDH-NCL T2A Lngfr Expressionskassette

3.2.2 shRNA-Konstrukte

Für den lentiviral vermittelten shRNA Knockdown wurde das pLentiX1 Puro Konstrukt verwendet (Campeau *et al.*, 2010). Dieses Konstrukt exprimiert die shRNA unter der Kontrolle des H1 Promotors und gleichzeitig das Resistenzgen Puromycinacetyltransferase welches eine Resistenz gegen das Antibiotikum Puromycin vermittelt, sodass transduzierte Zellen mithilfe des Antibiotikums selektioniert werden konnten. Da es sich um ein Gateway-Konstrukt handelt wurde zuerst ein „Entry“ Plasmid generiert, welches die shRNA unter Kontrolle des H1 Promotors trägt. Der Vorteil dieses Systems liegt darin, dass man das erstellte „Entry“ Plasmid in eine Reihe von Destinationsvektoren je nach Anwendungswunsch rekombinieren kann. Diese Kasette war von Erkennungssequenzen für die LR Rekombinase flankiert, sodass diese enzymatisch in den pLentiX1 Puro Destinationsvektor rekombiniert werden konnte.

3.2.3 Reporterplasmide

Für die Reportergerassays wurden verschiedene Plasmidsysteme verwendet

1. pGL3

Das Plasmid pGL3 CD133 enthält die Sequenz des CD133 Promotors (Basenpaare -1100/+10 in Relation zum ATG) und den SV40 Enhancer, welcher die Expression des Luciferase Gens regulieren. Das Kontrollplasmid enthält keine Promotorsequenz

2. pGL4.10

Das Plasmid pGL4-TCF7L2 basiert auf dem pGL4.10 Plasmid (Promega, Mannheim) und enthält die Promotorsequenz des humanen TCF7L2 Gens (Basenpaare -1280/+26 in Relation zum ATG) welche die Expression einer genetisch optimierten Luciferase steuert.

3. pGreenFire Reporter

Das pGreenFireTCFRE Plasmid (System Bioscience, Mountain View USA) enthält einen minimalen Cytomegalovirus immediate Early Promotor (CMV) auf den vier TCF/LEF Erkennungssequenzen folgen. Darüber wird die Expression der Reportergene Grün fluoreszierendes Protein (GFP) und Luciferase reguliert, wobei beide durch eine T2A Sequenz getrennt sind, sodass es eine mRNA Sequenz gibt, die für zwei getrennte Proteine kodiert. Daneben enthält das Plasmid eine Geneticin-Resistenzkasette unter Kontrolle des konstitutiv aktiven EF1 α Promotors. Diese erlaubt die Selektion transduzierter Zellen mittels Selektionsdruck.

3.3 Herstellung chemisch kompetenter Bakterien

Für die Herstellung chemisch-kompetenter Bakterien wurde das Protokoll von Sambrook und Russell verwendet (Sambrook *et al.*, 2000). Dazu wurde eine Über-Nacht Kultur mit LB-Medium auf eine OD₆₀₀ von 0,1 eingestellt und bei Erreichen einer OD₆₀₀ von 0,5-0,6 abzentrifugiert (5000 g, 4°C, 20'). Anschließend wurde das Pellet in 1/3 des Startvolumens Puffer RF1 resuspendiert und 90' bei 4°C inkubiert. Nach erneuter Zentrifugation wurde das Pellet in 1/12,5 des Ausgangsvolumens RF2 resuspendiert und die Zellsuspension aliquotiert. Die chemisch-kompetenten Bakterien wurden bis zur weiteren Verwendung bei -80°C gelagert.

3.4 Transformation von *E.coli*

Zur Transformation eines Plasmides oder einer Ligation wurde die chemische Transformation mittels Hitzeschock verwendet (Hanahan, 1983). Dazu wurde die entsprechende DNA in einem Reaktionsgefäß auf Eis vorgelegt, mit den kompetenten Bakterien gemischt und 30' auf Eis inkubiert. Nach einem anschließenden Hitzeshock (42°C, 30'') wurden die Transformationen mit *super optimal broth* (SOB)-Medium versetzt und inkubiert (37°C, 180 rpm, 60'). Anschließend wurde die Bakteriensuspension auf LB-Agarplatten mit geeignetem Selektionsdruck (100 µg/ml Ampicillin oder 50 µg/ml Kanamycin) ausgebracht und die Platten invertiert bei 37°C inkubiert.

3.5 Plasmidisolierung

Für die Isolation kleiner Plasmidmengen wurden 2 ml einer ÜN-Kultur bei 15.000 g zentrifugiert und die enthaltene Plasmid-DNA mithilfe des Plasmid DNA Mini Kits (5Prime, Hamburg) isoliert. Das Kit beruht auf dem Prinzip einer enzymatischen Lyse mit gleichzeitiger Denaturierung störender Proteine und Entfernung der genomischen DNA.

Zur Isolation größerer Plasmidmengen und zur Verbesserung der Plasmidreinheit wurde das „Nucleobond Xtra Maxi Kit“ (Macherey Nagel, Düren) verwendet. Das Kit beruht auf dem Prinzip der alkalischen Lyse und anschließender Renaturierung von Plasmid DNA jedoch nicht genomischer DNA unter neutralen Bedingungen. Für die Aufreinigung endotoxinfreier Plasmid-DNA wurde das „Endotoxin Free Plasmid Maxi Kit“ (Qiagen, Hilden) den Herstellerangaben folgend verwendet.

Nach der Isolation wurde die Konzentration der Plasmide UV-photometrisch bestimmt. Die isolierte Plasmid-DNA wurde bei -20°C gelagert.

3.6 Restriktionsverdau

Zur Linearisierung sowie für die Konstruktion neuer Vektoren wurde Plasmid-DNA oder PCR-Produkte mithilfe von Restriktionsendonukleasen verdaut. Für den Verdau wurde standardmäßig 1 µg Plasmid-DNA oder PCR Produkt mit 10 Units pro verwendetem Enzym und den passenden Puffern in einem Gesamtvolumen von 30 µl für 60 Minuten bei 37°C inkubiert.

3.7 Agarose Gelelektrophorese

Zur Größenauftrennung von DNA-Fragmenten nach Restriktionsverdau oder Amplifikation mittels PCR wurde die Agarose-Gelelektrophorese verwendet. Dazu wurden Agarosegele entsprechender Konzentration in 1x TAE unter Zusatz von 80 ng/ml Ethidiumbromid verwendet. Die Proben wurde nach versetzen mit DNA Probenpuffer zusammen mit einem DNA Größenstandard elektrophoretisch aufgetrennt und anschließend mittels UV-Transilluminator dokumentiert.

3.8 Gelelution von DNA Fragmenten aus TAE-Agarosegelen

Zur Isolation von PCR-Produkten oder Plasmid Fragmenten aus einem TAE-Agarosegel wurde die entsprechende Bande unter UV_{365nm} Exposition ausgeschnitten, ausgewogen und mithilfe des „Qiaquick Gel Extraction Kits“ (Qiagen, Hilden) aufgereinigt

3.9 Polymerasekettenreaktion

Zur Amplifikation spezifischer DNA Sequenzen von Plasmiden wurde die Polymerasekettenreaktion (PCR) angewandt. Dabei wurde für Klonierungen oder Mutagenesen die Phusion Polymerase verwendet, da dieses Enzym eine 5'→3' Exonukleaseaktivität aufweist und somit die Fehlerrate durch PCR Amplifikation minimiert wird. Für Colony-PCR Ansätze wurde die Taq-Polymerase verwendet. Im Folgenden sind ein allgemeines Pipettierschema sowie ein Temperaturprotokoll dargelegt.

Tab. 5 Pipettierschema für eine PCR

Reagenz	Menge	Endkonzentration
Template	500ng	10 ng/μl
Primer forward	250pmol	500nM
Primer reverse	250pmol	500nM
2X PCR Master Mix	25 μl	1x
H2O	ad 50 μl	

Tab. 6 Temperaturprotokoll für eine PCR

Temperatur	Zeit	Zweck	Wiederholung
97°C	45"	Initiale Denaturierung	
97°C	7"	Denaturierung	35x
55-67°C	30-90"	Annealing	
72°C	90"	Elongation	
72°C	42"	Finale Elongation	

3.10 Gerichtete Mutagenese von DNA Fragmenten

3.10.1 Mutagenese mittels Overlap Extension PCR

Für die Deletion kurzer DNA-Sequenzen aus einem Fragment wurde die Mutagenese mittels Overlap Extension basierend auf der Arbeit von Ho *et al.* verwendet (Ho *et al.* 1989). Das Vorgehen ist in Abb. 6A-C schematisch dargestellt.

Für die Mutagenese verwendet man im ersten Schritt zwei getrennte PCR-Reaktionen, wobei bei beiden jeweils ein Primer die Mutation trägt und über der zu mutierenden Sequenz liegt und sowohl 5' als auch 3' der zu mutierenden Sequenz über mindestens 25 bp homolog ist. Dadurch erzeugt man zwei PCR Produkte, die beide die mutierte Sequenz enthalten. Nach der PCR werden die Fragmente aus dem Agarosegel aufgereinigt und zusammen als Template für eine 3. PCR verwendet, bei der nun nur noch die beiden flankierenden Primer verwendet werden. Dadurch kommt es zu einer Verlängerung der beiden Fragmente durch die Polymerase und man erhält das Produkt in seiner vollen Länge, welches nun die Modifikation enthält. Dieses Produkt kann nun aus dem Gel aufgereinigt werden.

3.10.2 Site directed Mutagenesis

In Fällen wo aufgrund repetitiver DNA Sequenzen eine Mutagenese mittels Overlap Extension nicht möglich war, wurde das „Quick change site directed mutagenesis Kit“ (Agilent, Waldbronn) nach Herstellerangaben verwendet. Das Protokoll beruht auf dem Prinzip, dass der forward und reverse primer komplementär sind und in beiden das entsprechende Motiv deletiert ist (Abb. 6D-F). Wird nun eine PCR mit den Primern und dem als Vorlage dienenden Plasmid durchgeführt, so kommt es zu einer zirkulären Amplifikation

des kompletten Plasmides inklusive der einzuführenden Mutation. Nach Beendigung der PCR wird der Reaktionsmix mit *DpnI* verdaut, da die PCR amplifizierte DNA unmethyliert ist und das Enzym so nur die Dam-methylierte Ausgangs-DNA verdaut. Somit verbleibt nur das mutierte Plasmid intakt, welches dann transformiert werden kann. Der Nachteil der Methode liegt jedoch darin, dass das gesamte Plasmid amplifiziert wird und dadurch die Wahrscheinlichkeit PCR-bedingter Mutationen steigt. Aus diesem Grund wurde das mutierte Insert aus einem positiven Klon mittels Restriktionsendonukleasen herausgeschnitten und anschließend in ein Plasmid-Rückgrat ligiert, welches nicht amplifiziert wurde.

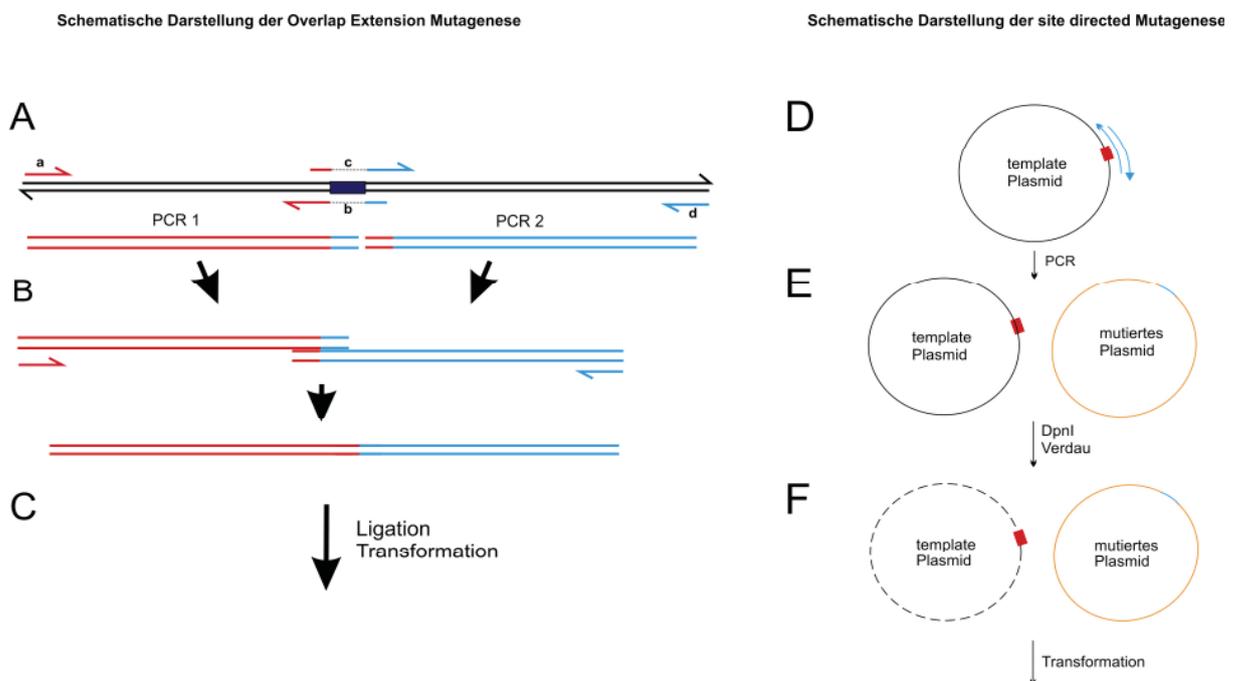


Abb. 6 Schematische Darstellung der Overlap Extension und site directed Mutagenese

A) Es werden zwei getrennte PCRs durchgeführt, wobei jeweils ein Primer das zu mutierende Motiv enthält. Die entstandene Fragmente wurden aus einem Agarosegel aufgereinigt und **B)** als Template zusammen mit den Primern **a** und **d** für eine dritte PCR eingesetzt. Das Produkt (**C**) enthält nun das mutierte Motiv. **D)** Bei der site directed mutagenesis amplifiziert die Polymerase zirkulär das gesamte Plasmid, wobei die Primer komplementär sind und die zu mutierende Sequenz tragen. Das amplifizierte Plasmid enthält nun das mutierte Motiv und dient als Vorlage für die weiteren Amplifikationen. Durch den *DpnI* Verdau (**E**) wird nun das methylierte Ausgangsplasmid verdaut und es bleibt nur das mutierte Plasmid für die Transformation (**F**).

3.11 Ligation von DNA Fragmenten

Um bei einer Klonierung DNA-Fragmente in entsprechend geschnittene Vektoren einzubringen wurde das auf der viralen T4 DNA Ligase beruhende „*Rapid DNA Ligation Kit*“ (Roche, Penzberg) verwendet. Dabei wurden Insert und Plasmid-Rückgrat im Verhältnis 3:1 eingesetzt und die Ligation nach Herstellerprotokoll auf Eis pipettiert. Anschließend wurde

die Reaktion für 7 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert und 7 µl der Reaktion in chemisch kompetente *E.coli* Stamm DH10ß transformiert.

3.12 Colony PCR

Zur schnellen Analyse von Kolonien nach Transformation ligierter Konstrukte wurde die „Colony-PCR“ verwendet (Hofman und Brian, 1991). Dazu wird eine Kolonie in 10 µl H₂O resuspendiert und die verwendete Pipettenspitze zur Anzucht des Klons in 2 ml LB-Medium mit Selektionsdruck überführt. Die in Wasser resuspendierte Kolonie wurde 10 Minuten bei 95°C aufgeschlossen, abzentrifugiert und 5 µl des Überstandes für eine PCR mit Primern spezifisch für das korrekt ligierte Produkt unter den in Abschnitt 3.9 dargestellten Bedingungen eingesetzt.

3.13 Sequenzierung von DNA Fragmenten

Zur Sequenzvalidierung bei Klonierungen oder PCR-Produkten wurden die zu untersuchenden DNA Fragmente mittels „Big Dye Terminator Sequencing Kits v3.1“ (Applied Biosystems, Darmstadt) basierend auf der Didesoxynukleotid-Abbruchsequenzierung nach Sanger analysiert (Sanger *et al.*, 1971). Dabei wurde 100 ng Plasmid oder 20 ng eines aufgereinigten PCR Fragmentes in dem nachfolgend dargestellten Reaktionsmix (Tab. 7) vorbereitet und anschließend mit dem in Tab. 8 dargestellten Temperaturprotokoll prozessiert.

Tab. 7 Pipettierschema für eine Sanger-Sequenzierung

Reaktionskomponente	Menge
Template DNA	20-100 ng
Primer	100 pmol
Big Dye Terminator Sequencing Mix v3.1	3 µl

Tab. 8 Temperaturprotokoll der Fluoreszenzmarkierung mit Didesoxynukleotiden

Temperatur	Dauer	
96°C	60"	
96°C	10"	
50°C	5"	25x Wiederholungen
60°C	4'	

Die entstandenen Fluorophor markierten DNA-Fragmente wurden anschließend mithilfe des „DyeEx2.0 Spin Kits“ (Qiagen, Hilden) aufgereinigt und die eluierte markierte ssDNA in Formamid stabilisiert. Die Analyse erfolgte im Anschluss auf einem ABI 3130 Kapillar-Sequenziergerät.

3.14 Herstellung von rekombinanten GST Fusionsproteinen

Zur Herstellung von rekombinatem Nucleolin-Glutathion-S-Transferase (NCL-GST) Fusionsprotein wie auch dem Glutathion-S-Transferase (GST)-Protein, wurde das entsprechende pGEX2T Plasmid in *E.coli* BL21 DE3 transformiert. Dabei wurde nur das C-terminale Fragment von Nucleolin exprimiert, da der N-Terminus in *E.coli* nicht exprimierbar ist. Aus einer Über-Nacht Kultur eines positiven Klons wurde am folgenden Morgen die Kultur auf OD₆₀₀ 0,1 (LB-Medium mit 0,1% Glukose) eingestellt und unter Schütteln inkubiert. Bei einer OD₆₀₀ 0,5 wurde die Kultur mit 0,8 mM Isopropyl-beta-D-thiogalactopyranosid (IPTG) für 2 Stunden bei 30°C induziert. Durch Zugabe der Substanz wird die Expression des unter Kontrolle des Lac-Operons stehenden Transgens induziert. Anschließend wurden die Kulturen bei 5000 g pelletiert, 2x mit STE-Puffer (vgl 12.9) gewaschen und schockgefroren. Zur Lyse wurde das Pellet in einer entsprechenden Menge STE Puffer resuspendiert, sonifiziert und anschließend mit 200 µl GST Sepharose versetzt. Nach erfolgter Inkubation (2h, 4°C) wurden die Ansätze 5x mit STE Puffer gewaschen und anschließend die Proteine durch Zugabe des Elutionspuffers eluiert.

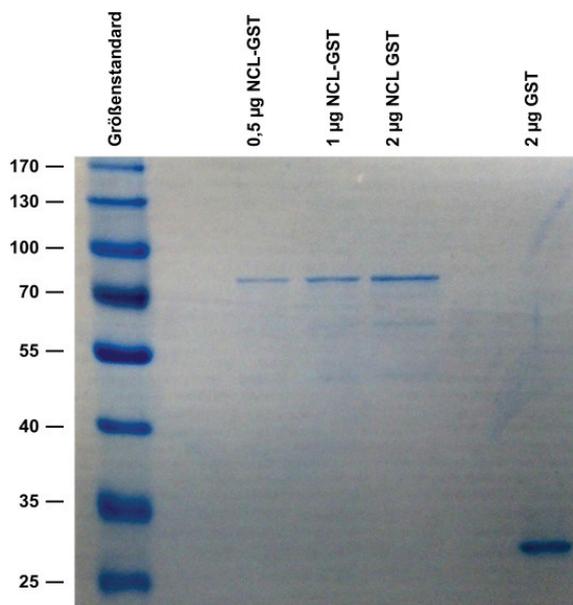


Abb. 7 Coomassie Färbung des aufgereinigten GST-NCL

Aufsteigende Mengen des rekombinanten Proteins wurden zusammen mit GST in einem SDS-Acrylamidgel elektrophoretisch aufgetrennt und anschließend mit kolloidalem Coomassie gefärbt

Die Expression im großen Maßstab wie auch die Aufreinigung dieser Kulturen wurde als Auftragsarbeit von der Firma Invigate (Jena) durchgeführt. Die Reinheit des vorliegenden Nucleolin-GST Fusionsproteins wurde mittels kolloidaler Coomassie Färbung ermittelt und lag bei ca. 80% (Abb. 7).

3.15 Herstellung von DNA Doppelstrangsonden

Zur Herstellung von DNA Doppelstrangsonden wurden jeweils 50 pmol zweier komplementärer ca. 35 bp langer DNA Einzelstränge in 50 µl DNA Hybridisierungspuffer (siehe Anhang) vermischt, anschließend für 10 Minuten bei 95°C im Heizblock denaturiert und langsam im ausgeschalteten Heizblock abgekühlt. Der so entstandene Doppelstrang konnte nun für die radioaktive Markierung eingesetzt werden.

3.16 Radioaktive Markierung von DNA Doppelstrangsonden

Die Markierung der DNA Doppelstrangsonden wurde mithilfe einer T4 Polynukleotidkinase (T4-PNK) und ³²P-γATP als Substrat durchgeführt. Dazu wurde der in Tab. 9 dargestellte Reaktionsmix pipettiert und für 30 Minuten bei 37°C inkubiert. Im Anschluss wurde nicht inkorporiertes ATP mithilfe der Biorad P-30 Säulen entfernt.

Tab. 9 Pipettierschema für die radioaktive Markierung von Doppelstrang DNA mit ³²P-γATP

Reaktionskomponente	Volumen	Endkonzentration
Doppelstrangoligo	1 µl	15 nM
10x T4-PNK Puffer	5 µl	1x
³² P-γATP	2 µmol	40 mM
T4-PNK	2 µl	0,25 U/ µl
H ₂ O	ad 50 µl	

3.17 Electrophoretic mobility shift Assay

Zum Nachweis der Bindung von rekombinantem Nucleolin an putative DNA- Bindemotive wurde die Interaktion mittels einem „*Electrophoretic mobility shift Assay*“ untersucht (Garner und Revzin; 1981). Dieser Nachweis beruht auf der Retention einer radioaktiv markierten Sonde durch ein zugegebenes Protein oder Kernextrakt. Im vorliegenden Fall wurde dazu rekombinantes GST-NCL (Aminosäuren 288-709 von Nucleolin) oder als Kontrolle rekombinantes GST Protein verwendet. Die Ansätze wurden nach folgendem Schema pipettiert (Tab. 10), wobei poly(dI-dC) einen unspezifischen Kompetitor darstellt, und 30 Minuten auf Eis inkubiert. Im Anschluss wurden die Proben direkt auf ein natives 4%iges Acrylamidgel aufgetragen und bei 200V separiert. Nach erfolgter elektrophoretischer Auftrennung wurde das Gel getrocknet und das Signal mittels Phosphoimager visualisiert.

Tab. 10 Pipettierschema für eine EMSA-Reaktion

Reaktionskomponente	Volumen	Endkonzentration
Radioaktive Sonde	5 µl	0,1 nM
10x EMSA Puffer	2,5 µl	1x
poly(dIdC)	2,5 µl	40 ng/ µl
GST-Protein	2,5 µl	500nM
Kompetitor-Oligo	2,5 µl	5-10 nM
H ₂ O	10 µl	

3.18 Crosslinken von DNA und Proteinen sowie Fragmentierung

Für die Durchführung von Chromatin-Immunpräzipitationen wurden Mutz-2, SEM oder CD 34⁺-HPZ in 5 ml/ $1 \cdot 10^7$ Zellen warmem DMEM ohne Zusätze resuspendiert und durch Zugabe von 1% Methanol-freiem Formaldehyd für 10 Minuten gecrosslinked. Durch Zugabe von 125 mM Glycin pH 7,5 wurden etwaige verbliebene Aldehydgruppen abgefangen und nach zweimaligem Waschen mit PBS die Pellets in 1 ml SDS-Lysepuffer/ $2 \cdot 10^7$ Zellen lysiert. Die entstandenen Lysate wurden 1:1 mit ChIP Verdünnungspuffer versetzt, in 12x24 Covaris Sonifizierungsröhrchen (Covaris Inc, Brighton, Vereinigtes Königreich) überführt und das enthaltene Chromatin im Anschluss bei 4°C mithilfe eines gerichteten Sonicators vom Typ Covaris-S auf eine Größe von 500-1000 bp fragmentiert (2% Leistung, Intensität 3, 200 Zyklen, 10'). Die bei 20.000 g geklärten Lysate wurden im Anschluss erneut mit dem gleichen Volumen ChIP-Verdünnungspuffer aliquotiert und ein Teil als Input-Probe verwahrt.

3.19 Chromatin Immunpräzipitation

Für die Chromatin-Immunpräzipitation (ChIP) wurden pro Ansatz 30 µl µMACS-Protein-G-Beads (Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach) nach Herstellerangaben vorbereitet und die Präzipitation dem Herstellerprotokoll folgend durchgeführt. Anschließend wurden je 1 ml des Lysates entweder mit je 1,5 µg Nucleolin-Antikörper, 1,5 µg Nucleolin-Antikörper blockiert mit dem Immunisierungspeptid (30 facher Überschuss Peptid, 30', 4°C), oder 1,5 µg Kontroll-Antikörper versetzt. Eine weitere Kontrolle enthielt keinen Antikörper. Nach 60' Inkubation wurden die Protein-G-Beads zugegeben und erneut für 60' inkubiert. Das Waschen, Eluieren und enzymatische Verdauen der Beads entsprach dem Protokoll des Herstellers. Im Anschluss an den Proteinase K Verdau wurden die Präzipitate sowie die Input-Probe mithilfe des „NucleoSpin Gel and PCR Clean-up Kits“ (Macherey Nagel, Düren) dem Protokoll für SDS haltige Proben folgend aufgereinigt. Das Präzipitat wie auch die Input-Kontrolle wurden mittels qPCR und Primern, spezifisch für die zu Promotorsequenzen wie auch Kontrollregionen, analysiert.

3.20 Isolation von genomischer DNA

Für die Isolation genomischer DNA wurde das „DNeasy Blood and Tissue Mini Kit“ (Qiagen, Hilden) nach Protokoll des Herstellers verwendet. Die DNA Konzentration wurde im Anschluss UV-photometrisch mittels Nanodrop-Photometer bestimmt und die genomische DNA bei 4°C gelagert.

3.21 Isolation von gesamt RNA

Für die Isolation von Gesamt-RNA aus Zellpellets wurde je nach Zellzahl das „RNeasy Mini- oder RNeasy Micro Kit“ (Qiagen, Hilden) den Herstellerangaben entsprechend verwendet. Es wurde jeweils der optionale DNase Verdau der Proben durchgeführt um eine Kontamination mit genomischer DNA auszuschließen. Die gewonnene RNA wurde im Anschluss UV-photometrisch eingemessen und bei -80°C gelagert.

3.22 Synthese von copyDNA

Für Expressionsanalysen mittels qRT-PCR Reaktion wurden gleiche Mengen der gewonnenen RNA mithilfe des „Quantitect Reverse Transcription Kit“ (Qiagen, Hilden) zu copyDNA (cDNA) umgeschrieben. Für die Synthese wurde das Herstellerprotokoll befolgt.

3.23 Durchführung einer Sybr Green basierten quantitativen PCR

Zur Quantifizierung von Genexpression oder der Anreicherung von Zielregionen bei ChIP Analysen wurde eine auf dem DNA interkalierenden Farbstoff SYBR Green I basierende quantitative Real Time PCR mit anschließender Schmelzkurve verwendet. Dabei wurde das folgende Pipettierschema verwendet (Tab. 11). Die verwendeten Primer sind im Anhang aufgelistet (12.7)

Tab. 11 Pipettierschema für Sybr Green basierte qPCR-Reaktionen

Reagenz	Menge	Endkonzentration
Template	10 ng cDNA oder 10 ng gDNA oder 2 µl ChIP Probe	
Primer forward	10pmol	250 pM
Primer reverse	10pmol	250 pM
Sybr Green Master Mix	12,5 µl	
H2O	ad 25 µl	

Die Reaktionen wurden dann in einem Real Time PCR Gerät mit folgendem Temperaturprotokoll durchgeführt (Tab. 12). Nach erfolgter PCR wurden die Werte mithilfe der $\Delta\Delta C^T$ Methode verglichen und so die Expressionsunterschiede berechnet (Pfaffl, 2001).

Tab. 12 Temperaturschema für eine 3-Schritt qPCR

Temperatur	Dauer	Zweck	Wiederholung
95°C	10'	Initiale Denaturierung	
95°C	15"	Denaturierung	
55-62°C	30-60"	Annealing	
72°C	30-90"	Elongation	
Schmelzkurve		Spezifitätsnachweis	

3.24 Passagieren von Zelllinien

Zur Passagierung adhärenter Zelllinien wurde das Medium aspiriert, die Zellen einmalig mit PBS gewaschen und dann mit Trypsin/EDTA Lösung inkubiert. Sobald die Zellen abgelöst waren wurde die Reaktion durch Zugabe von Kulturmedium mit FCS abgestoppt und die Zellsuspension bei 400 g pelletiert. Das Zellpellet wurde in Medium resuspendiert und wieder in Kultur genommen oder für Kryokonservierungen verwendet. Pellets zur Gewinnung von Protein, DNA oder RNA wurden mit PBS gewaschen, erneut pelletiert und schockgefroren. Zur Passage und Herstellung von Pellets bei Suspensionszelllinien wurden diese bei 150 g pelletiert und dann analog zu den adhärenen Zellpellets weiterverarbeitet.

3.25 Kryokonservierung von Zelllinien

Zur Lagerung vitaler Zellen wurde das Zellpellet mit Kryomedium (70% Medium, 20% FCS, 10% DMSO) auf eine Zelldichte $5 \cdot 10^6$ /ml eingestellt und anschließend jeweils in 1 ml Portionen in Kryoröhrchen aliquotiert. Diese wurden anschließend in Nunc-Einfrierkontainern mit einer Temperatur Sinkrate von ca. 1°C/Minute bei -80°C eingefroren, und nach 24h in die Lagerung bei -196° in der Gasphase von flüssigem Stickstoff überführt.

3.26 Verwendete Zelllinien

Tab. 13 Verwendete Zelllinien

Name	Ref-Nr	Ursprung	Referenz
Hek293	ACC-305	embryonale Niere	Graham, 1977
Hek293T	ACC635	embryonale Niere	Rio et al., 1985
5637	ACC-35	Urothelkarzinom	Fogh, 1978
SEM	ACC-546	Pre-B-ALL	Greil et al, 1994
Mutz-2	ACC-271	AML FabM2	Hu et al, 1996; Drexler et al. 1997

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurden die in Tab. 13 aufgelisteten Zelllinien verwendet: Bei der Zelllinie Hek-293 handelt es sich um eine embryonale Nierenzelllinie humanen Ursprungs, welche aufgrund ihrer einfachen Transfizierbarkeit zum Testen hergestellter Plasmide verwendet wurde. Die Zelllinie Hek-293T, welche stabil mit dem Large-T Antigen des SV40 Virus transfiziert ist (Rio *et al.*, 1985), eignet sich aufgrund der produzierten hohen Virustiter zur Herstellung pseudolentiviraler Partikel (Miyoshi *et al.*, 1985).

Die Urothelkarzinomzelllinie 5637 exprimiert eine Vielzahl von Wachstumsfaktoren, die in den Medienüberstand abgegeben werden. Der Überstand mit den darin enthaltenen Wachstumsfaktoren war notwendig für die Kultur der Zelllinie Mutz-2 (Kashoek, 1991; Quentmeier *et al.*; 1997; Drexler *et al.*, 1997).

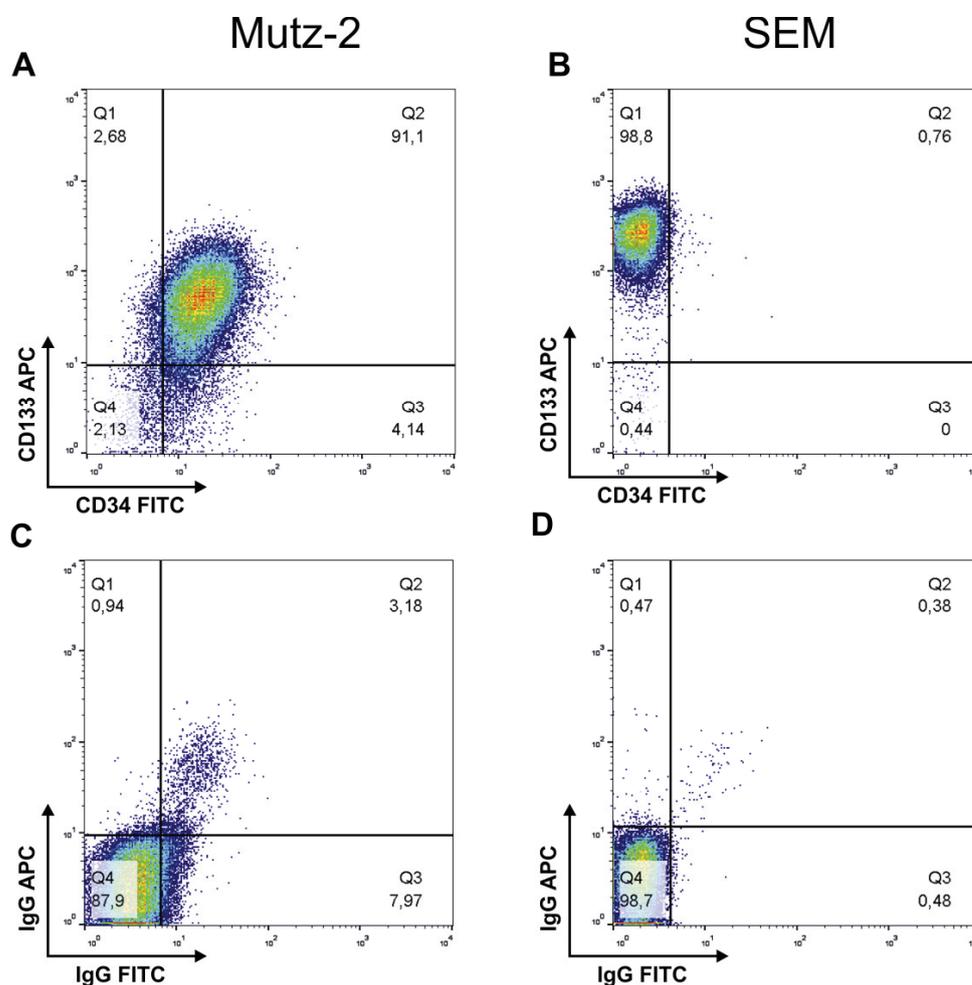


Abb. 8 Analyse der Expression von CD133 und CD34 in Mutz-2 und SEM mittels FACS

Mutz-2 und SEM Zellen wurden für die Untersuchung der Oberflächenmarker CD133 und CD34 mit den Antikörpern CD34-FITC und CD133-APC gefärbt (A und B), sowie in einem separaten Ansatz mit den zugehörigen nicht gerichteten Isotypkontrollen (C und D). Die Färbung wurde auf einem FACS-Calibur-Durchflusssyztometer analysiert.

Bei der Zelllinie Mutz-2 handelt es sich um ein Derivat einer akuten myeloischen Leukämie der Subklasse FabM2. Die Zelllinie wurde aufgrund der Expression von CD34 und CD133

und ihrem stark den hämatopoetischen Stammzellen ähnelnden Phänotyp gewählt. So sind 90% der Zellen positiv für CD34 und CD133 (

Abb. 8A) Die Zelllinie SEM ist eine Pre-B-Zell Leukämie-Abgeleitete Zelllinie, welche stark CD133 positiv ist, jedoch nicht den Stammzellmarker CD34 exprimiert (

Abb. 8B).

Neben den oben genannten Zelllinien wurden primäre humane hämatopoetische Stammzellen verwendet, welche von Spendern stammten. Die Zellen wurden nach G-CSF Mobilisation aus Blutapheresaten über die Expression des Oberflächenmarkers CD34 aufgereinigt. Die Zellproben wurden freundlicherweise durch Herrn Prof. Meisel zur Verfügung gestellt.

3.27 Kultur der verwendeten Zelllinien

Alle oben genannten Zelllinien wurden bei 37°C und 5% CO₂ in einer gesättigten Wasserdampfatmosphäre kultiviert. Bei 70% Konfluenz wurden die Zellen passagiert. Hek 293 und Hek 293T wurden mit Dulbeccos modified Eagle's Medium (DMEM) unter Zusatz von 10% fötalem Kälberserum (FKS), 100 U/ml Penicillin, 100 µg/ml Streptomycin sowie 1 mM Glutamax kultiviert. 5637 Zellen wurden unter gleichen Bedingungen jedoch in RPMI kultiviert. SEM Zellen wurden in Iscoves modified Dulbeccos Medium (IMDM) mit oben genannten Zusätzen sowie zusätzlich 2 mM Glutamin kultiviert. Die Zelllinie Mutz-2 wurde in Minimal Essential Medium unter Zusatz von Ribo- und Desoxyribonukleosiden, 1 mM Natriumpyruvat, 1mM L-Glutamin, 25% 5637-konditioniertem Kulturüberstand, 20% FKS sowie 100 U/ml Penicillin und 100 µg/ml Streptomycin kultiviert.

Bei allen Zelllinien wurden möglichst frühe Passagen verwendet und diese in regelmäßigen Abständen auf Mycoplasmenkontamination überprüft (PCR basierter Nachweis, Minerva, Berlin).

3.28 Herstellung von konditioniertem 5637-Kulturüberstand

Als Medienzusatz für die Kultur von Mutz-2 Zellen wurde Zellkulturüberstand der Zelllinie 5637 verwendet, da dieser mit Cytokinen und Wachstumsfaktoren angereichert ist (Kaashoek *et al.*, 1991). Dazu wurden 5637 Zellen passagiert und mit 50% Dichte ausgelegt. Nach 96 h wurde der konditionierte Zellkulturüberstand abgenommen und sterilfiltriert (0,45 µm Zellulosenitratmembran). Das Filtrat wurde im Anschluss entweder direkt verwendet oder bei -20°C gelagert.

3.29 Hitzeinaktivierung von rekombinanten Wnt-Liganden

Zur Inaktivierung von Wnt Liganden wurden diese auf eine Konzentration von 50 ng/ μ l (in PBS mit 0,1% bovines Serumalbumin, 0,22 μ m sterilfiltriert) verdünnt und 10' bei 90°C inaktiviert.

3.30 Nukleofektion leukämischer Zelllinien

Zur Analyse von Reporteraktivierungen durch Nucleolin wurde ein Gemisch von Reporter und Expressionsvektor mittels Amaxa Cell Line Nucleofector (Lonza, Köln) in Mutz-2 oder SEM Zellen eingebracht. Das Verfahren beruht auf Elektroporation und ermöglicht so eine schnelle Transkription der Transgene. Für die Nukleofektion wurden pro Probe $2 \cdot 10^6$ Zellen bei 90 g pelletiert und in 100 μ l „Cell Line Nucleofector Puffer V“ mit Supplement resuspendiert und 3 μ g Plasmidgemisch zugegeben. Anschließend wurden die Zellen in eine Nukleofektions-Küvette überführt, mit dem Programm X-001 elektroporiert und danach mit 500 μ l warmem Kulturmedium versetzt. Dieses Gemisch wurde in ein 12 Well überführt worin schon 1 ml Kulturmedium enthalten war, und in einen CO₂-Inkubator überführt. Nach 24 Stunden wurden die Proben analysiert.

3.31 Herstellung Pseudo-lentiviraler Partikel

Hämatopoetische Zellen sind sehr schwer mittels lipophiler Reagenzien zu transfizieren. Es wurde aber gezeigt, dass die pseudo-lentivirale Transduktion gute Ergebnisse liefert, weshalb dieses Verfahren in der vorliegenden Arbeit verwendet wurde (Naldini *et al.*, 1996).

Zur Herstellung pseudoviraler Partikel wurden Hek-293T Zellen mit der Polyethylenimin Methode transfiziert (Reed *et al.*, 1996). Dabei wurde ein Gemisch von lentiviralen Expressions-, Helfer und Verpackungsplasmiden verwendet. In Tab. 14 sind die Pipettierschemata für eine Transfektion von 2nd Generation und 3rd Generation Verpackungssystemen dargelegt (Miyoshi *et al.*, 1985 und Naldini *et al.*, 1996; Dull *et al.*, 1998). Das Plasmidgemisch wurde mit 2 ml DMEM ohne Zusätze vermischt. Anschließend wurden weitere 2 ml DMEM mit 90 μ l Polyethylenimin-Lösung (1 μ g/ μ l in PBS) zugefügt und für 15 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Im Folgenden wurde die Mischung mit 6 ml DMEM mit 15% FCS versetzt, das Medium von einer 70% konfluenten 15cm Schale mit

Hek293T aspiriert und der Transfektionsmix zugefügt. Nach 24 Stunden wurde das Medium ersetzt und weitere 24 Stunden später der infektiöse Kulturüberstand geerntet. Dieser wurde anschließend durch eine 0,45 µm Zellulosenitratmembran filtriert und dann zur Erhöhung des Virustiters durch Zentrifugation aufkonzentriert (20.000 g, 120', 4°C).

Tab. 14 Pipettierschema für die Herstellung pseudo-lentiviraler Partikel der 2. und 3. Generation

2nd Generation	Funktion	Menge	3rd Generation	Funktion	Menge
pCMVR8.74	Verpackungsplasmid	12 µg	p125	Verpackungsplasmid	14 µg
pMD2.G	VSV-G Hüllplasmid	12 µg	p126	Verpackungsplasmid	5,3 µg
pLenti X1	shRNAExpressionsplasmid	12 µg	p127	Hüllplasmid	3,5 µg
			pCDH-T2A LNGFR	Expressionsplasmid	14 µg

3.32 Transduktion von Mutz-2 Zellen

Für die Transduktion von Mutz-2 Zellen wurden zunächst 6-Well Zellkulturplatten mit dem vom humanen Fibronectin abgeleiteten Protein RetroNectin beschichtet (Clontech, Saint-Germain-en-Laye, Frankreich; 5 µg/cm² in 750 µl Gesamtvolumen; Inkubation bei 37°C für 90 Minuten). Dieses Protein hat sowohl Virus bindende Domänen als auch Eigenschaften extrazellulärer Matrix die dazu führen, dass hämatopoetische Zellen Pseudopilli ausbilden und so adhären. Durch die so erhöhte räumliche Nähe steigert sich die Transduktionseffizienz deutlich (Moritz *et al.*, 1996; Hanenberg *et al.*, 1997). Nun wurden Mutz-2 Zellen pelletiert und mit einer Dichte von $3 \cdot 10^7$ Zellen pro Well und ml ausgebracht. Hinzugefügt wurden 2 ml konzentrierter Virusüberstand, sowie der kationische Zusatz Hexadimethrinbromid (6µg/ml), welcher wiederum die Transduktion begünstigt (Davies *et al.*, 2004). Anschließend wurden die Platten für 90 Minuten bei 1000 g „spin-okuliert“. Durch die Zentrifugation soll das Cytoskelett leicht destabilisiert, sowie mehr virale Partikel auf die Zelloberfläche gebracht werden, was die Transduktionseffizienz steigert (O'Doherty, 2000 und Millington, 2006). Anschließend wurden die Zellen für 16 Stunden kultiviert und dann das Medium erneuert. Nach 72 Stunden wurde die Effizienz der Transduktion bei LNGFR-Konstrukten bestimmt oder im Falle der pLenti-shRNA oder pGreenFire Konstrukte die Zellen selektioniert. Dazu wurden dem Medium 0,25 µg/ml Puromycin für die pLenti-shRNA Vektoren oder 600 µg/ml G418 für die pGreenFire Vektoren zugefügt. Das Kulturmedium

wurde zweimal wöchentlich erneuert und die Zellen zwei Wochen nach Beginn der Selektion analysiert.

3.33 Analyse von Oberflächenantigenen mittels Durchflusszytometrie

Die Messung von Oberflächenantigenen ist eine verbreitete Methode zur Charakterisierung verschiedenster hämatopoetischer Zellen. Dazu wurden $2,5-5 \cdot 10^6$ Zellen aus der Kultur entnommen, einmalig mit PBS gewaschen und in 50 μ l PBS mit 1% FCS resuspendiert. Dieser Suspension wurden 2 μ l Antikörperkonjugat zugesetzt und bei 4°C für 15 Minuten im Dunkeln inkubiert. Anschließend wurden die Proben gewaschen und mithilfe des FACS Calibur Durchflusszytometers analysiert. Die verwendeten Antikörper sind in Abschnitt 12.4 aufgelistet.

3.34 Messung der Reporteraktivität mittels Luciferase-System

Zur Untersuchung der Promotor- oder Signalwegsaktivität und des Einflusses von Nucleolin darauf wurden Luciferase basierte Reportersysteme verwendet. Die Analyse beruht auf einem System, bei dem das Luciferasegen unter die Kontrolle des zu untersuchenden Promotors gestellt wird (Gould und Subramani, 1988). Wird der Promotor durch endogene oder exogene Faktoren aktiviert, so wird das Reporter gen translatiert. In einem anschließenden Assay wird das Substrat Luciferin durch das Enzym katalytisch zu Oxyluciferin umgewandelt, wobei Licht emittiert wird. Die verwendeten Reporterplasmide sind unter 12.5.1 zusammengestellt. Zur Bestimmung der Reporteraktivität wurden transduzierte oder nukleofizierte Zellen pelletiert, mit PBS gewaschen und anschließend für 15 Minuten mit 150 μ l Lysepuffer des „High sensitivity Reporter Gene Assays“ (Roche, Penzberg) auf Eis lysiert. Die mittels Zentrifugation geklärten Lysate (20.000 g, 15') wurden nun in 50 μ l Portionen in einer weißen 96-Well Platte vorgelegt, mit Luciferase-Substratlösung versetzt und in einem Luminoscan Platten-Luminometer (Thermo- Fisher Scientific, Schwerte) gemessen. Anschließend wurde mit einem Aliquot der Lysate eine Bradford Proteinbestimmung (Bradford, 1976) in Triplikaten in einem Tecan Plattenphotometer (Tecan, Crailsheim) durchgeführt und die Luciferase-Aktivität auf die Proteinkonzentration der Lysate normalisiert.

3.35 Herstellung von Gesamtzell-Lysaten

Zur Herstellung von Gesamtzell-Lysaten wurde der RIPA-Lysepuffer verwendet (Alcaraz *et al.*, 1990). Dazu wurde das Zellpellet mit 1 ml Lysepuffer pro $1 \cdot 10^7$ Zellen versetzt, durch Pipettieren resuspendiert und für 15 Minuten auf Eis inkubiert. Anschließend wurde das Lysat durch Zentrifugation bei 18.000 g für 15 Minuten geklärt und die Proteinkonzentration des Überstandes mittels Bradford-Nachweis bestimmt. Die Lysate wurden dann mit 5x SDS-Ladepuffer versetzt und 5 Minuten bei 95°C denaturiert. Bis zur weiteren Verwendung wurden die Proben bei -20°C gelagert.

3.36 Western Blot

Zur Auftrennung von Proteinlysaten wurde das diskontinuierliche Tris-Glycin Puffersystem nach Lämmli verwendet (Lämmli, 1970). Dieses System beruht darauf, dass durch den neutralen pH Wert von 6,8 die Proben gesammelt werden und dann durch den basischen pH Wert im Trenngel die Proteine der Größe nach aufgetrennt werden. Die Proben wurden zusammen mit Protein-Größenstandard geladen und anschließend die Gelelektrophorese bei 20 mA/ Gel durchgeführt. Nach der Auftrennung wurde das Gel auf eine Nitrozellulosemembran geblottet und der Transfer durch eine reversible Proteinfärbung nach Ponceau überprüft. Die entfärbte Membran wurde anschließend mit einer bovinen Seralbuminlösung (10% in TBS-T) abgesättigt. Als nächstes wurde die Membran mit den entsprechenden spezifischen Antikörpern unter Zugabe von bovinem Seralbumin (5% in TBS-T) über Nacht inkubiert und am folgenden Tag nach mehrmaligem Waschen mit TBS-T mit dem Detektionsantikörper inkubiert. Als Detektionsantikörper wurden gegen die Fc-Bereiche des Primärantikörpers gerichtete Meerrettich-Peroxidase-Konjugate verwendet, sodass man mithilfe des „*ECL Chemiluminescent detection Kits*“ (GE-Healthcare, München) die Antikörperbindung durch ein LAS-3000 Lumineszenz-Detektionssystem (GE-Healthcare, München) nachweisen konnte.

3.37 ELISA

Zur Detektion von sekretierten Wnt Liganden im 5637-Überstand wurde dieser mithilfe von *enzyme linked immunosorbent assays* (ELISA) spezifisch für Wnt3a, Wnt5a oder Wnt10b (Shanghai Crystal Day Biotec, Shanghai China) untersucht. Dazu wurden 40 µl filtrierter 5637-Überstand oder eine Standardreihe mit bekannten Konzentrationen der zu untersuchenden Liganden in Protein bindende 8-Well Streifen vorgelegt. Anschließend

wurden 10 μ l Wnt-Biotin Detektionsantikörper, sowie 50 μ l eines Streptavidin-Hrp-Konjugates zugegeben, gemischt und bei 37°C für 60' inkubiert. Anschließend wurden die Gefäße 6-mal mit dem beiliegenden Waschpuffer gewaschen und das Chromogen 3,3',5,5-Tetramethylbenzidine (TMB) zugegeben, welches durch die Meerrettichperoxidase des Detektionsantikörpers oxidiert wird, was zu einem blauen Farbumschlag führte. Nach 10 Minuten wurde die Reaktion durch Zugabe von 150 mM Schwefelsäure abgestoppt, wodurch es aufgrund der pH Verschiebung zu einem Farbumschlag ins Gelbe kommt und die Intensität dann photometrisch bei 450nm ausgelesen wurde. Anschließend wurde mithilfe der Standardreihe die Ligandenkonzentration in den 5637-Proben berechnet.

3.38 Statistik

Alle Experimente wurden wenigstens dreifach und unabhängig voneinander repliziert. Bei Luciferasemessungen und qPCR Ergebnissen wurde der Mittelwert von mindestens 3 Messwerten mit der Standardabweichung dargestellt.

4 Ergebnisse

4.1 Einfluss von Nucleolin auf die CD133 Expression

4.1.1 Quantitative Analyse der Expression von CD133 Isoformen in verschiedenen Geweben

Die Arbeit von Shmelkov *et al.* zeigte, dass die Expression von CD133 Isoformen gewebespezifisch ist (Shmelkov *et al.*, 2003). Aufgrund der verwendeten Methode konnte jedoch nicht ausgeschlossen werden, dass auch andere Isoformen schwach exprimiert vorlagen. Zur Untersuchung der relativen Expression von CD133 sowie dem spezifischen Nachweis der Isoformen CD133 1A und 1B wurde RNA aus verschiedenen Zelllinien und Geweben verwendet (Clontech, Saint-Germain-en-Laye, Frankreich sowie Agilent, Waldheim), revers transkribiert und mittels qRT-PCR analysiert. Die Expression wurde gegen das Kontrollgen β -Aktin normalisiert. In Proben die hämatopoetischen Progenitoren enthielten, dominierte die Expression der Isoform 1A (Abb. 9C). Mononukleäre Zellen aus Knochenmark oder Nabelschnurblut wiesen eine deutlich stärkere Expression von CD133 1A im Vergleich zu 1B auf. Komplettes Knochenmark oder auch Proben der fötalen Leber hingegen zeigten eine stärkere Expression der Isoform 1B (Abb. 9A). Die Proben aus Hirngewebe wiesen die stärkste CD133 1B Expression der untersuchten Primärproben auf. Die Zelllinien Mutz-2 und Caco-2 zeigten im Vergleich zu den Primärproben eine deutlich höhere relative CD133 Expression (Abb. 9B), wobei Mutz-2 Zellen fast ausschließlich die Isoform 1A exprimieren, wohingegen in Caco-2 Zellen beide Isoformen deutlich exprimiert wurden (ersichtlich anhand des Quotienten Abb. 9D).

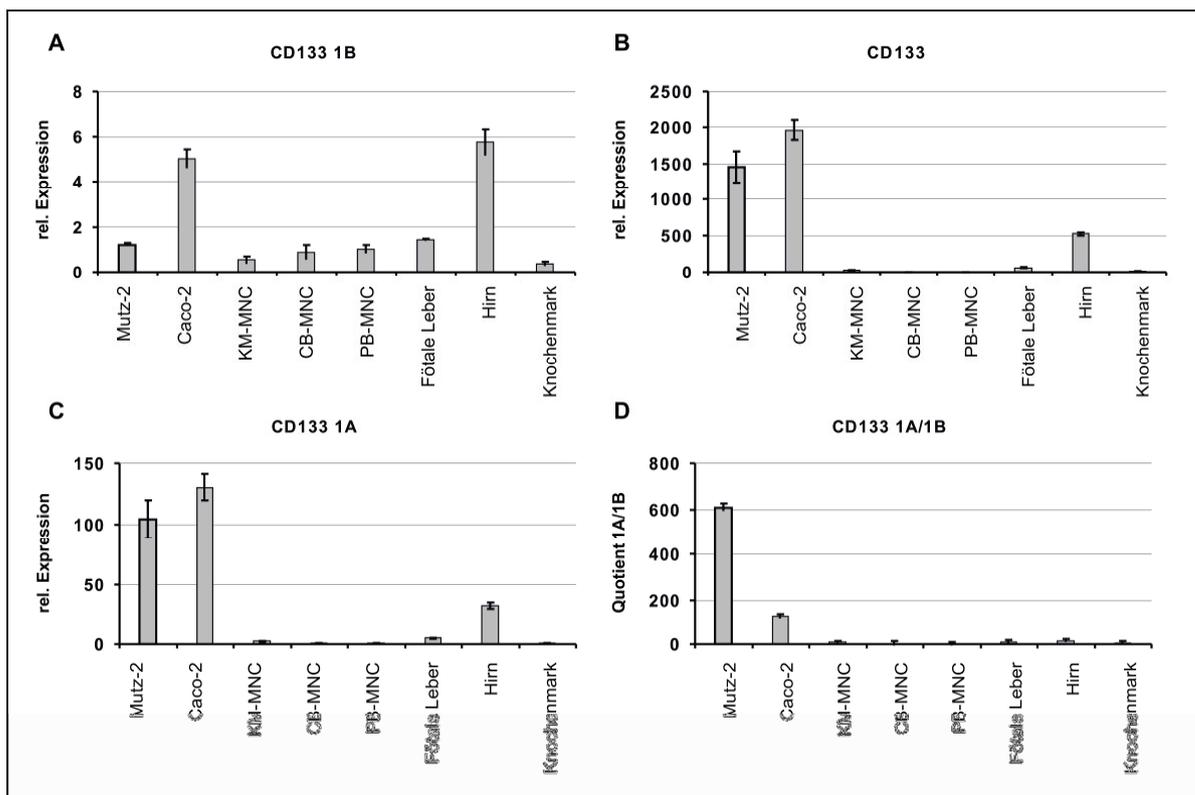


Abb. 9 Expressionsanalyse unterschiedlicher CD133 Isoformen

Für die Analyse wurde gesamt RNA aus unterschiedlichen Zell- und Gewebetypen isoliert, revers transkribiert und mittels Isoform-spezifischer Primer durch eine qRT-PCR analysiert und auf die Expression von β -Aktin normalisiert. **A)** Zeigt die Analyse der Isoform 1B, **B)** die Analyse mit Primern, die alle Isoformen detektieren. **C)** zeigt die relative Expression der Isoform 1A und **D)** den Quotienten aus Isoform 1A und 1B. Alle Werte sind mit Standardabweichung dargestellt. n=3

4.1.1 Isoformanalyse von CD133 nach Nucleolin Überexpression

Um die Frage zu klären, ob eine Steigerung der Nucleolin-Expression einen Einfluss auf die CD133 Expression hat, wurden Mutz-2 Zellen lentiviral mit pCDH-Empty-Lngfr, pCDH-NCL-Lngfr oder pCDH-NCL- Δ N-Lngfr transduziert. Diese Vektoren kodieren für Gesamtlänge-Nucleolin oder eine Mutante, bei der die ersten 288 Aminosäuren deletiert sind (Nucleolin- Δ N). Mithilfe des ebenfalls eingebrachten endogen nicht exprimierten Rezeptors Δ Lngfr wurden transduzierte Zellen mittels Zellen MACS-Technologie auf mehr als 90% angereichert. Die Herstellung dieser Zellen wurde von Herrn Sanil Bhatia durchgeführt und isolierte Gesamt-RNA zur Verfügung gestellt. Die daraus erstellte cDNA wurde mit Primern spezifisch für CD133 sowie dessen Isoformen CD133 1A und CD133 1B analysiert und die jeweilige Expression auf β -Aktin normalisiert. Die isolierte RNA wurde von Herrn Bhatia zur Verfügung gestellt.

In Nucleolin transduzierten Zellen gab es einen ca. 6-fachen Anstieg der Gesamtmenge an CD133 mRNA Kopien, während die Transduktion mit Nucleolin- Δ N keinen Anstieg der CD133 Expression bewirkte (Abb. 10). Dieser Anstieg an CD133 Kopien beruhte auf der

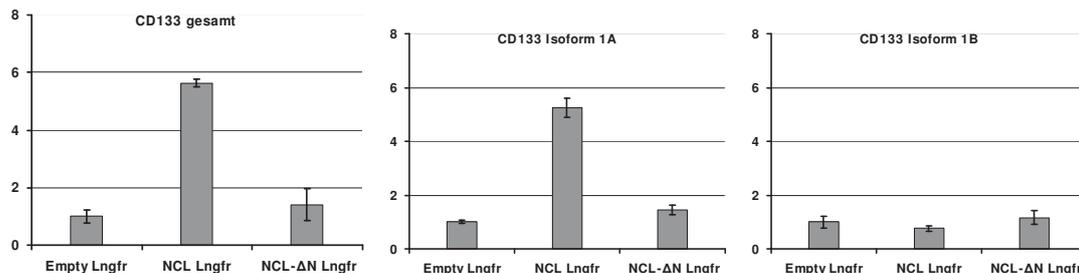


Abb. 10 Einfluss von Nucleolin auf die Expression von CD133 Isoformen in transduzierten Mutz-2 Zellen
Mutz-2 wurden lentiviral mit pCDH Empty/NCL/NCL-ΔN-T2A-Lngfr Konstrukten transduziert und über die Expression von ΔLngfr angereichert. Die isolierte RNA wurde revers transkribiert und mit Primern spezifisch für CD133 oder für die Isoformen CD133 1A oder CD133 1B analysiert. Die Expression wurde gegen β -Aktin normalisiert. n=3

Änderung von CD133-1A Transkripten während die Isoform 1B keine gesteigerte Expression in Nucleolin transduzierten Zellen zeigte.

Zur Validierung dieser Ergebnisse wurde das Experiment mit SEM Zellen wiederholt (Abb. 11). Auch hier konnte in den mit Nucleolin transduzierten Zellen eine gesteigerte Expression von CD133 festgestellt werden, vergleichbar mit dem Anstieg der Isoform 1A.

Zusammengefasst konnte in zwei hämatopoetischen Zelllinien, einer AML und einer ALL-Abgeleiteten, eine Nucleolin vermittelte Steigerung der CD133 Expression nachgewiesen werden, die auf einem Anstieg der Isoform CD133 1A nicht jedoch 1B beruhte.

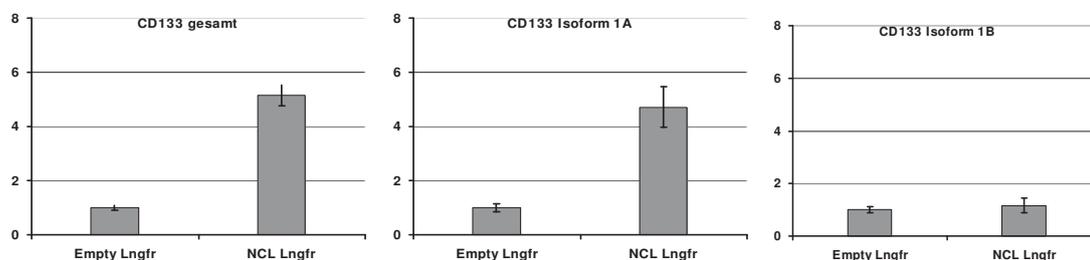


Abb. 11 Einfluss von Nucleolin auf die Expression von CD133 Isoformen in transduzierten SEM Zellen
SEM wurden lentiviral mit pCDH Empty- oder NCL-T2A-Lngfr Konstrukten transduziert und über die Expression von ΔLngfr angereichert. Die isolierte RNA wurde Revers transkribiert und mit Primern spezifisch für CD133 oder für die Isoformen CD133 1A oder CD133 1B analysiert. Die Expression wurde gegen β -Aktin normalisiert. n=3

4.1.2 Chromatin Immunpräzipitation von Nucleolin und Analyse von CD133 Promotorsequenzen

Um einen Einfluss von Nucleolin auf die Aktivierung des CD133 Promotors zu untersuchen, wurden Chromatin Immunpräzipitationen mit Mutz-2, SEM sowie primären CD34⁺-Zellen durchgeführt. Als Kontrollen wurden Proben verwendet, bei denen der Nucleolin Antikörper durch Zugabe des Immunisierungspeptids geblockt wurde wodurch die Nucleolin Spezifität verloren geht. Weiterhin wurden Proben mit einem gegen den EGF-Rezeptor gerichteten

Antikörper oder Beads ohne Antikörper zur Abschätzung des nicht Nucleolin spezifischen Hintergrundes verwendet. Nach erfolgter Präzipitation wurde eine spezifische Sequenz sowohl des CD133 P1- als auch des CD133 P2 Promotors amplifiziert. Anschließend wurde die relative Anreicherung in Relation zur Probe mit Kontrollantikörper (EGFR) berechnet.

Bei Mutz-2 Zellen zeigte sich eine 60 fache relative Anreicherung des Promotors CD133 P1 durch Nucleolin-Präzipitation verglichen mit den Kontrollen (Abb. 12A). Wurde der Antikörper vorher mit dem Immunisierungspeptid abgesättigt so konnte keine Anreicherung festgestellt werden, was die Spezifität der Bindung bestätigt. Die elektrophoretische Auftrennung der Amplifikate bestätigte das Ergebnis (Abb. 12B). Die CD133 P2 Promotorsequenz hingegen konnte weder mit Nucleolin spezifischen Antikörpern noch mit den Kontrollansätzen präzipitiert werden und eine Auftragung der PCR Produkte auf einem Agarosegel bestätigte, dass es außer bei der Input-Probe kein Amplifikat gab.

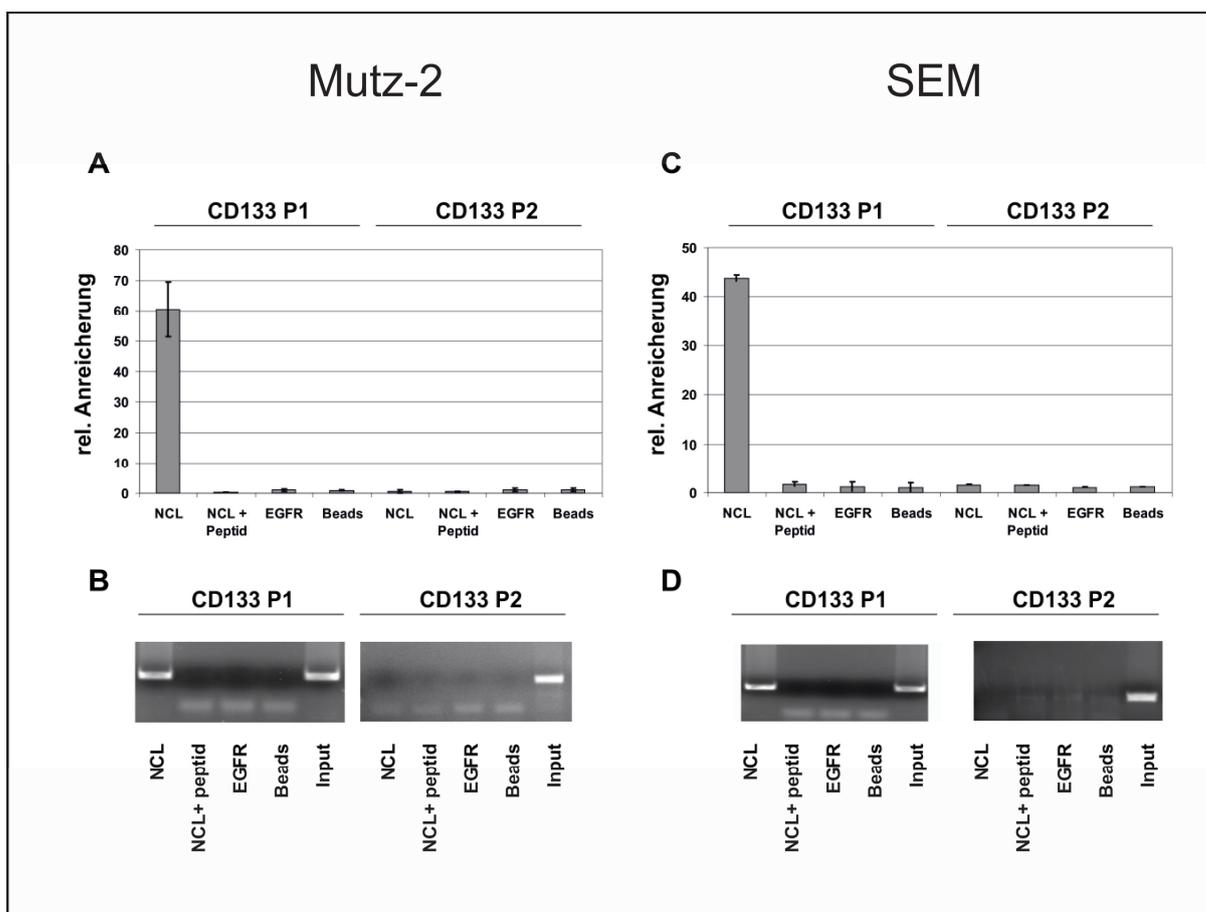


Abb. 12 Chromatin Immunpräzipitation des CD133 P1- und P2-Promotors in Mutz-2 und SEM Zellen

Für die Präzipitation wurden Mutz-2 Zellen mittels Formaldehyd gecrosslinked und das Chromatin geschert. Anschließend wurde dieses mit Antikörpern gegen Nucleolin, einem geblockten Nucleolin Antikörper, einem EGFR-Antikörper als nicht Nucleolin gerichtete Kontrolle oder nur den magnetischen Beads inkubiert und die präzipitierte DNA für qPCRs gegen den CD133 P1 oder P2 Promotor eingesetzt. **A)** Relative Anreicherung gegen die Kontrollantikörper Probe bei Mutz-2 Zellen und **B)** das Agarosegel der entsprechenden Proben. **C)** und **D)** zeigen die entsprechenden Ergebnisse für SEM Zellen. Alle Werte wurden mit Standardabweichung dargestellt. n=4

Ein vergleichbares Experiment mit SEM-Zellen zeigte eine 42 fache relative Anreicherung des P1-Promotors durch Nucleolin-Präzipitation und keine in den Kontrollproben (Abb. 12C), welche durch die Agarosebilder bestätigt wurde (Abb. 12D). Die Amplifikation des P2-Promotors hingegen offenbarte wiederum keine Anreicherung durch den Nucleolin Antikörper.

Als nächstes wurde das Chromatin von primären CD34⁺-Zellen untersucht. Die Präzipitation mit Nucleolin Antikörper zeigte eine 20 fache relative Anreicherung des CD133 P1 Promotors, die in den Kontrollproben nicht erkennbar war (Abb. 13A). Das korrespondierende Agarosegel der Amplifikate zeigte nur bei der Inputprobe sowie dem Nucleolin-Präzipitat ein Fragment der entsprechenden Größe (Abb. 13B). Der CD133 P2 Promotor wurde, wie bereits bei den beiden Zelllinien gezeigt, nicht durch Nucleolin präzipitiert. Bei den Proben der CD133 P2 Amplifikation war nur bei der Input-Spur ein Amplifikat erkennbar (Abb. 13B).

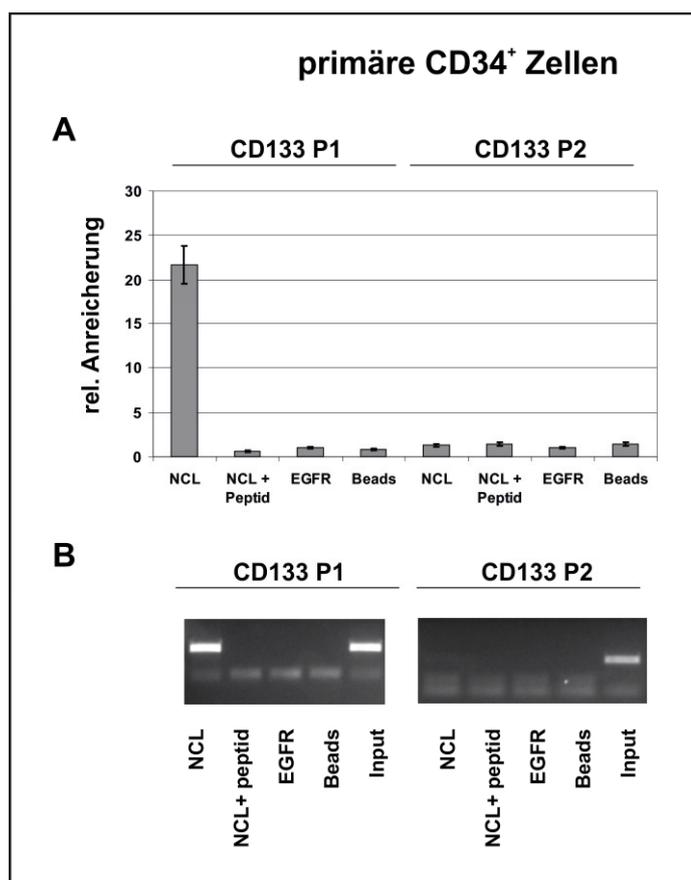


Abb. 13 Chromatin Immunpräzipitation des CD133 P1- und P2 Promotors in primären CD34⁺ HPZs
Für die Präzipitation wurden CD34⁺ HPZ mittels Formaldehyd gecrosslinked und das Chromatin geschert. Anschließend wurde dieses mit Antikörpern gegen Nucleolin, einem geblockten Nucleolin Antikörper, einem EGF-Rezeptor Antikörper oder nur den magnetischen Beads inkubiert und anschließend die präzipitierte DNA für qPCRs gegen den CD133 P1 oder P2 Promotor eingesetzt. **A)** Relative Anreicherung normalisiert auf die EGFR Probe in Mutz-2 Zellen und **B)** das Agarosegel der entsprechenden Proben. Die Zellen wurden von Herrn Sanil Bhatia zur Verfügung gestellt. n=3

Zusammengefasst ergeben die Untersuchungen, dass Nucleolin den CD133 P1-, jedoch nicht den CD133 P2- Promotor bindet. Die Bindung ist spezifisch, da eine Preinkubation des Antikörpers mit dem Immunisierungspeptid die Anreicherung aufhebt.

4.1.3 Analyse der Nucleolin abhängigen CD133 P1 Aktivierung

Zur Klärung des Einflusses von Nucleolin auf den CD133 P1 Promotor wurden Luciferase-experimente durchgeführt. Der Assay basiert auf dem Ansatz, dass ein zu untersuchender Promotor als regulatives Element vor das Luciferasegen kloniert wird und die Aktivität anhand der resultierenden Chemolumineszenz bestimmt wird. Wird der Promotor durch endogene oder exogen eingebrachte Faktoren aktiviert, so kommt es zur signalabhängigen Expression der Luciferase welche dann das zugegebene Substrat umsetzt. Bei dieser Reaktion entsteht Chemolumineszenz. Als Kontrolle für die Spezifität der Aktivierung über die Promotorsequenz wurde der Reporter ohne diese verwendet. Die Chemolumineszenz wurde im Anschluss auf den Proteingehalt normalisiert. Diese Konstrukte wurden zusammen mit pCMV Nucleolin Expressionsplasmiden in Mutz-2 oder SEM Zellen nukleofiziert. Die Nukleofektion des pCMV Leervektors diente der Erfassung der Promotoraktivität durch endogene Faktoren.

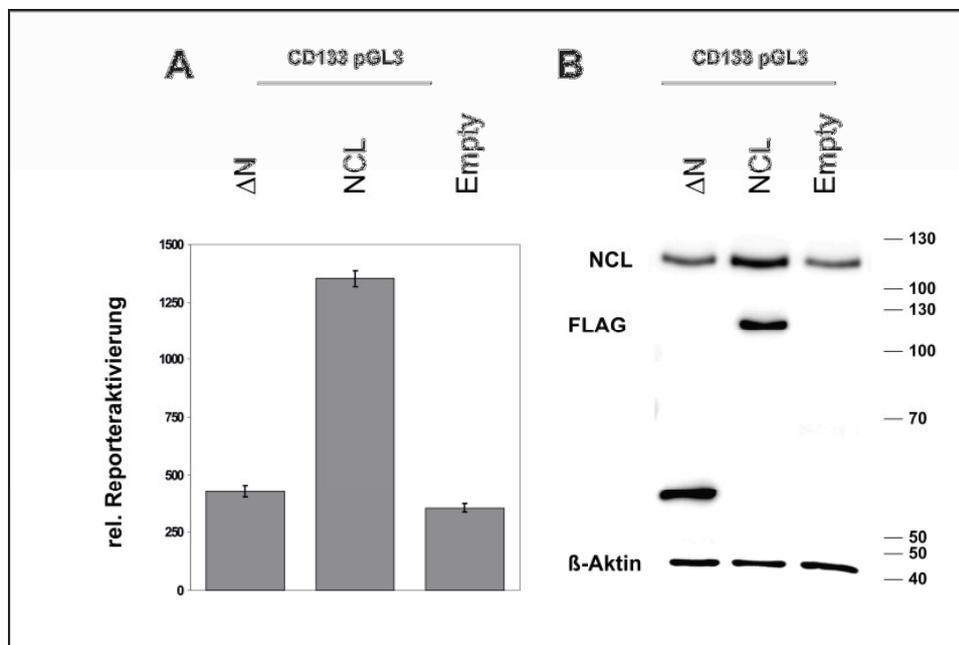


Abb. 14 CD133 Reporter Aktivierung durch Nucleolin aber nicht durch ΔN in Mutz-2 Zellen

Mutz-2 Zellen wurden mit einem pGL3 oder pGL3-CD133 sowie Nucleolin Expressionskonstrukten nukleofiziert und anschließend die Luciferaseaktivität bestimmt. Alle Werte sind auf das Ergebnis der pGL3-Proben normalisiert welcher auf 100% gesetzt wurde (A). Weiterhin wurde die Expression des exogenen sowie des gesamt-Nucleolins als Nukleofektionskontrolle durchgeführt (B). n=4

Abb. 14A zeigt, dass der Reporter in Mutz-2 Zellen durch endogene Faktoren aktiviert wird, da die Leervektor-nukleofizierten Proben stärker als die pGL3 Kontrolle sind. Die

Nukleofektion von Nucleolin führt zu einer dreifachen Steigerung dieses Signals, Nucleolin- Δ N hingegen führt zu keiner signifikanten Steigerung. Western Blots der analysierten Proben zeigen, dass es in den mit Nucleolin nukleofizierten Proben zu einem Anstieg des detektierten Nucleolins kommt und dass das Transgen mittels Flag-Blot nachweisbar ist. Bei der Nucleolin- Δ N Probe war das Flag-Fusionsprotein detektierbar, es führte jedoch wie erwartet nicht zu einem Anstieg des Volllänge Nucleolin, da Δ N deutlich kleiner ist (siehe Abb. 14B). Die Nukleofektion ansteigender Mengen an Nucleolin-Expressionsplasmid zeigte, dass die Aktivierung des Reporters dosisabhängig ist (Abb. 15). So steigt die relative Reporteraktivität parallel zur detektierten Nucleolin-Proteinmenge an. Der β -Aktin Blot zeigt ein gleichmäßiges Beladen der Proben, sodass die Unterschiede auf die Nukleofektion und nicht auf Unterschiede in der Gesamtproteinmenge zurückzuführen sind.

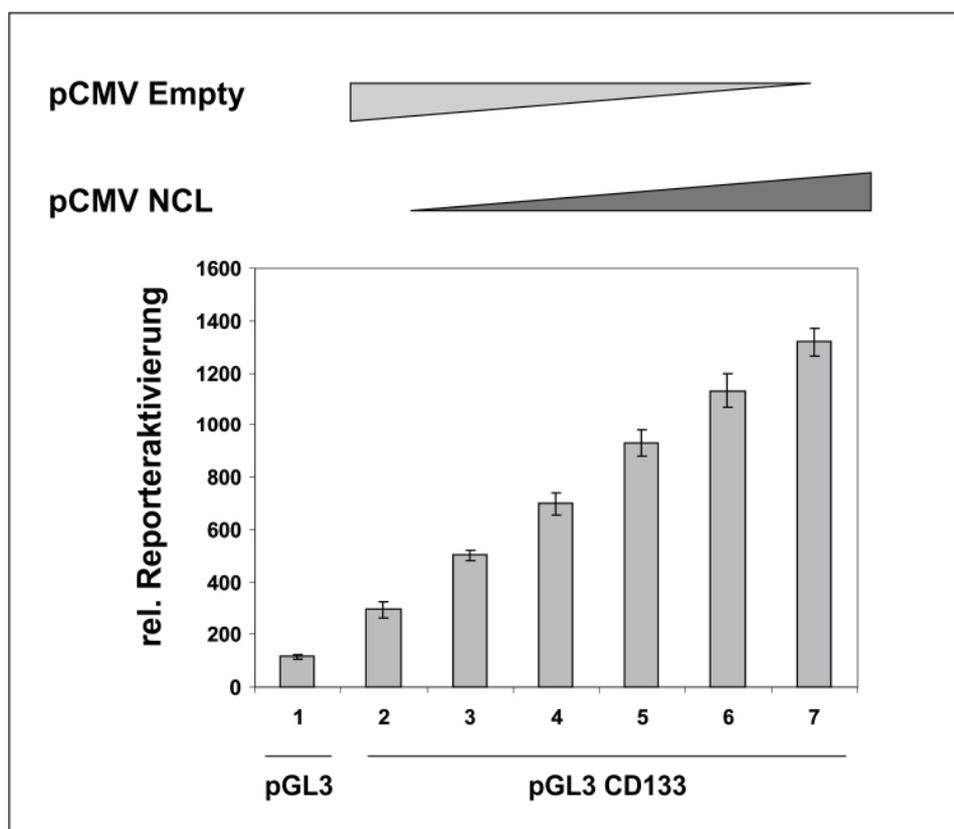


Abb. 15 Dosisabhängige Aktivierung des CD133 Reporters durch Nucleolin in Mutz-2

Mutz-2 Zellen wurden mit pGL3 (#1) oder pGL3 CD133 (Proben #2-7) sowie ansteigenden Mengen an Nucleolin-Expressionsplasmiden nukleofiziert #3-7). Die Zellen wurden nach 24h geerntet und die Aktivität des Luciferas-Reportersystems bestimmt. Der Wert für die pGL3 Probe wurde auf als 100 definiert und die anderen Proben in Relation dazu gesetzt. n=4

4.1.4 Analyse der Nucleolin Bindemotive im Hinblick auf die Aktivierung des CD133-P1 Promotors durch Nucleolin

Nucleolin ist in der Lage DNA über spezifische Bindemotive zu erkennen und so Promotoren zu aktivieren (Grinstein *et al.*, 2007). Eine Analyse des CD133 P1-Promotors resultierte in drei putativen Nucleolin Bindemotiven. Diese 5 bp umfassenden Bindemotive wurden selektiv im CD133 P1 Luciferase-Reporter deletiert und diese Konstrukte anschließend für Luciferase Reporteranalysen in Mutz-2 und SEM Zellen verwendet. Die Deletion von zwei der drei Bindemotive in jeglicher Kombination führte in Mutz-2 Zellen zu einer deutlichen Reduktion der Reporteraktivität (Abb. 16). So war die gemessene Aktivität vergleichbar mit der pGL3 Probe ohne Promotorsequenz. Zudem zeigte sich eine Aufhebung der Nucleolin abhängigen Aktivierung des CD133-Reporters.

In der Zelllinie SEM konnte dieselbe Beobachtung gemacht werden, was den Einfluss der Bindemotive weiter bestätigt (Abb. 17). Zusammengefasst zeigen die hier vorliegenden Reporteranalysen, dass der CD133 P1 Promotor in Mutz-2 Zellen durch endogene Faktoren aktiv vorliegt. Die Nukleofektion von Nucleolin jedoch nicht Nucleolin- ΔN führt zu einer weiteren Steigerung dieser Aktivität. Spezifische Nucleolin Bindemotive sind für eine Aktivierung essentiell und die Deletion derer verhindert die Aktivierung sowohl durch endogene Faktoren als auch durch Nukleofektion von Nucleolin.

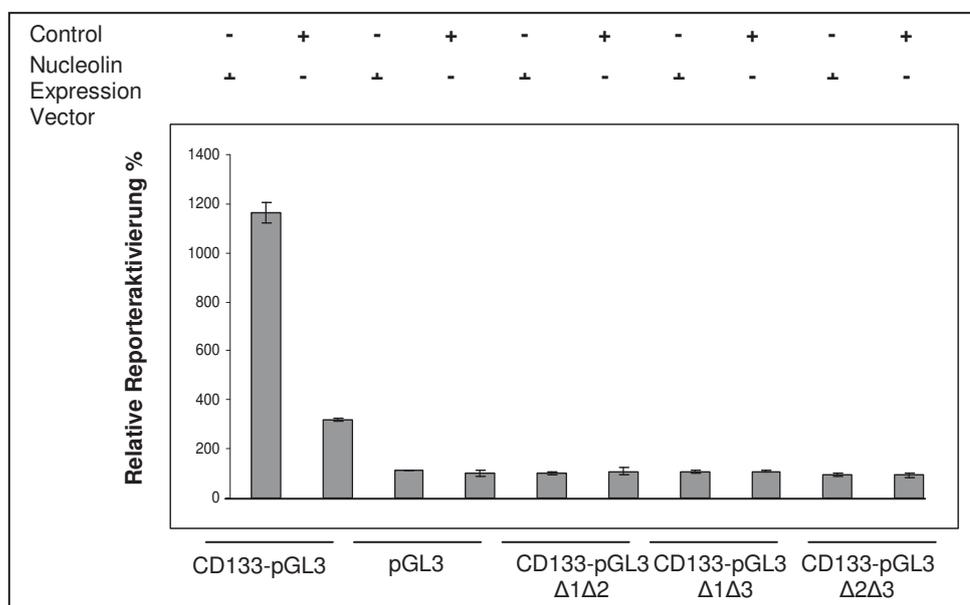


Abb. 16 Analyse der Nucleolin CD133 Reporteraktivierung nach Deletion von Bindemotiven in Mutz-2
pGL3 oder pGL3-CD133 Reporter sowie Derivate mit deletierten Nucleolin Bindemotiven wurden zusammen mit den angegebenen Expressionskonstrukten in Mutz-2 nukleofiziert und die Reporteraktivität nach 24h mittels Luminometer bestimmt. Die Luciferaseaktivität wurde auf den Proteingehalt der Probe normalisiert. n=4

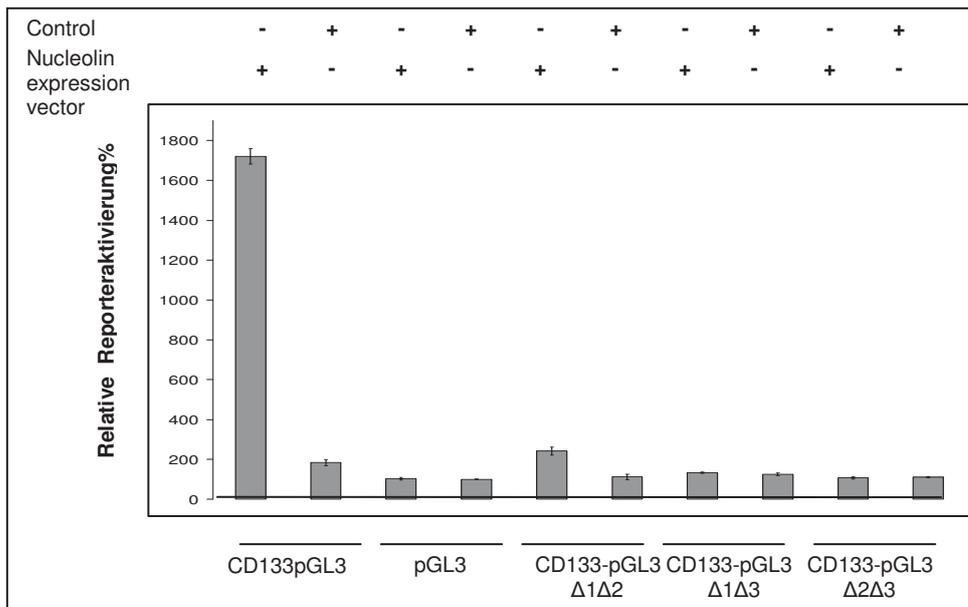


Abb. 17 Analyse der Nucleolin CD133 Reporteraktivierung nach Deletion von Bindemotiven in SEM

CD133 Reporter sowie Derivate mit deletierten Nucleolin Bindemotiven wurden zusammen mit den angegebenen Expressionskonstrukten in SEM nukleofiziert und die Reporteraktivität nach 24h mittels Luminometer bestimmt. Die Luciferaseaktivität wurde auf den Proteingehalt der Probe normalisiert. n=4

4.1.5 Untersuchung eines Nucleolin Bindemotives mittels EMSA

Zur weiteren Untersuchung der Spezifität der Bindung von Nucleolin an Bindemotive im CD133 Promotor wurde exemplarisch das Bindemotiv CD133-3 für EMSA Analysen verwendet. Dazu wurden rekombinantes GST-Nucleolin Protein (Aminosäuren 288-709) oder GST Protein mit einer radioaktiv markierten DNA Doppelstrangsonde des Bindemotivs unter Zugabe von unspezifischer DNA inkubiert und auf einem nativen Polyacrylamidgel aufgetrennt und autoradiographiert. Da der N-Terminus von Nucleolin in *E.coli* nicht exprimiert wird, wurde diese Deletionsmutante verwendet, welche jedoch alle Nukleinsäure bindenden Motive enthält. Bei Ansätzen mit Kompetition wurde ein Überschuss an nicht radioaktiv markierter Doppelstrangsonde mit oder ohne Bindemotiv zugesetzt.

Die Autoradiographie des EMSAs zeigte, dass es in der Probe mit Nucleolin-GST zur Bildung eines radioaktiv detektierbaren retardierten Komplexes kam (Abb. 18). Die Zugabe von GST-Protein hingegen führte nicht zur Bildung eines retardierten radioaktiven Komplexes. Um auszuschließen, dass es sich um eine unspezifische Bindung des Nucleolin-GST Proteins handelt, wurde die Reaktion mit nicht radioaktiv-markierten Fragmenten kompetitiert, welche dem Oligo mit oder ohne Bindemotiv entsprachen. Dabei zeigte sich wiederum in der Probe mit Nucleolin-GST Protein eine Bindung an die markierte Sonde. Durch Zugabe eines Überschusses des nicht radioaktiv markierten Oligos wurde dieses präferentiell häufiger durch Nucleolin gebunden und das radioaktive Signal des Komplexes

verschwand. Bei Zugabe des gleichen Überschusses an Oligo ohne Nucleolin Bindemotiv wurde der radioaktive Komplex nicht beeinflusst. Dies bedeutet, dass die Interaktion von Nucleolin mit der DNA auf dem Bindemotiv beruht und diese Bindung spezifisch war. Selbst ein 100-facher Überschuss an Oligo ohne Bindemotiv konnte diese Bindung nicht beeinflussen.

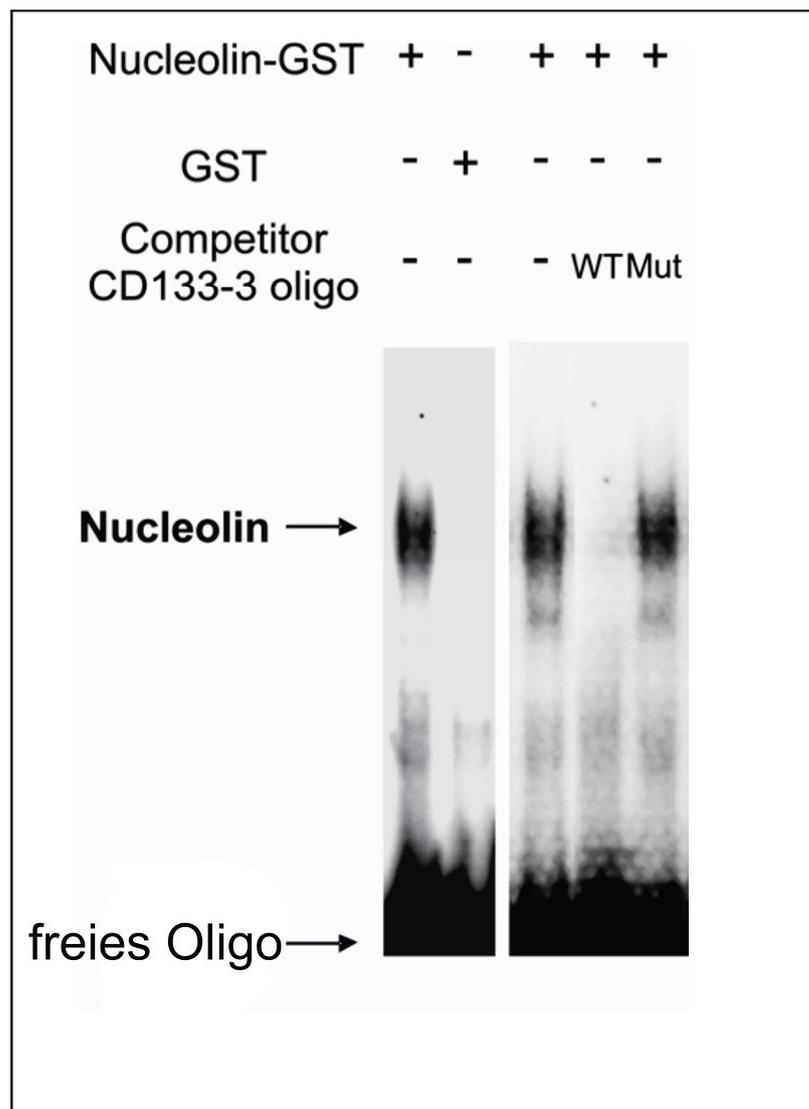


Abb. 18 Nachweis der CD133-3 Bindung durch NCL mittels Emsa

Rekombinantes Nucleolin wurde zusammen mit einem radioaktiv-markierten DNA Oligo inkubiert, welches die CD133-3-Bindesequenz enthielt. In weiteren Proben wurde die Reaktion durch einen 100 fachen Überschuss an nicht radioaktiv-markiertem Kompetitor-Oligo oder einer Variante mit deletierter Bindestelle inkubiert. Nach elektrophoretischer Auftrennung und Trocknung wurde das Gel autoradiographiert

4.2 Untersuchung des Einflusses von Nucleolin auf den kanonischen WNT Signalweg in Mutz-2 Zellen

4.2.1 Bestimmung der Konzentration von Wnt3a, Wnt5a und Wnt10b in 5637-Kulturüberstand

Die Kultur der Zelllinie Mutz-2 benötigt den Zusatz des konditionierten Medienüberstandes der Zelllinie 5637. Dieser enthält neben vielen Wachstumsfaktoren wahrscheinlich auch Liganden für Signalwege. Um zu klären, ob der Überstand die kanonischen Wnt-Liganden Wnt3a und Wnt10b, sowie den nichtkanonischen Liganden Wnt5a enthält, wurden ELISAs gegen diese durchgeführt. Dazu wurde der Überstand der Zelllinie 5637 geerntet und für ELISAs eingesetzt. Anhand einer Standardreihe bekannter Konzentration wurde der Gehalt der Liganden im Überstand bestimmt. Dabei zeigte sich, dass alle drei Liganden durch 5637 Zellen gebildet und in den Kulturüberstand abgegeben werden. Die Konzentrationen betragen dabei für Wnt3a im Mittel 4 ng/ml (3,1 ng/ml-5,2 ng/ml; n=4), bei Wnt5a waren es 4,8 ng/ml (3,7 ng/ml-6,2 ng/ml; n=4) und die höchste Konzentration wurde bei Wnt 10b mit 6,4 ng/ml (4,9 ng/ml-9,1 ng/ml; n=4) detektiert. Somit enthielt das Kulturmedium der Mutz-2 Zellen funktionelle kanonische und nicht- kanonische Wnt Liganden.

4.2.2 Einfluss von FZD8-FC auf den Wnt-Signalweg in Mutz-2 Zellen

Zur Überprüfung, ob die im zugegebenen 5637-Überstand enthaltenen Liganden den Wnt-Signalweg in Mutz-2 Zellen beeinflussen, wurde den Kulturen das rekombinante lösliche Frizzled8-FC (FZD8-FC) Protein zugefügt. Für dieses Molekül wurde gezeigt, dass es effektiv die ligandenabhängige Aktivierung des kanonischen Wnt-Signalweges unterdrücken kann (De Almeida, 2007). Die Zellen wurden zunächst für 48 h ohne Zugabe von 5637-Überstand kultiviert um eine minimale Aktivität des Signalwegs zu erreichen. Daraufhin wurde den Zellen 25% 5637-Überstand und unterschiedliche Konzentrationen an FZD8-FC zugesetzt. Als Kontrolle diente ein Ansatz dem nur 5637-Überstand aber kein FZD8-FC zugesetzt wurde. Nach 24 h wurden die Zellen geerntet und für Expressionsanalysen mittels qRT-PCR sowie Western Blot verwendet. Dabei wurde die Expression der Zielgene CyclinD1 (CCND1), *Transcription Factor 7 like2* (TCF7L2) sowie β -Catenin (CTNNB1) angeschaut. Weiterhin wurde die Veränderung von Nucleolin untersucht und alle Messungen in Relation zu β -Aktin normalisiert.

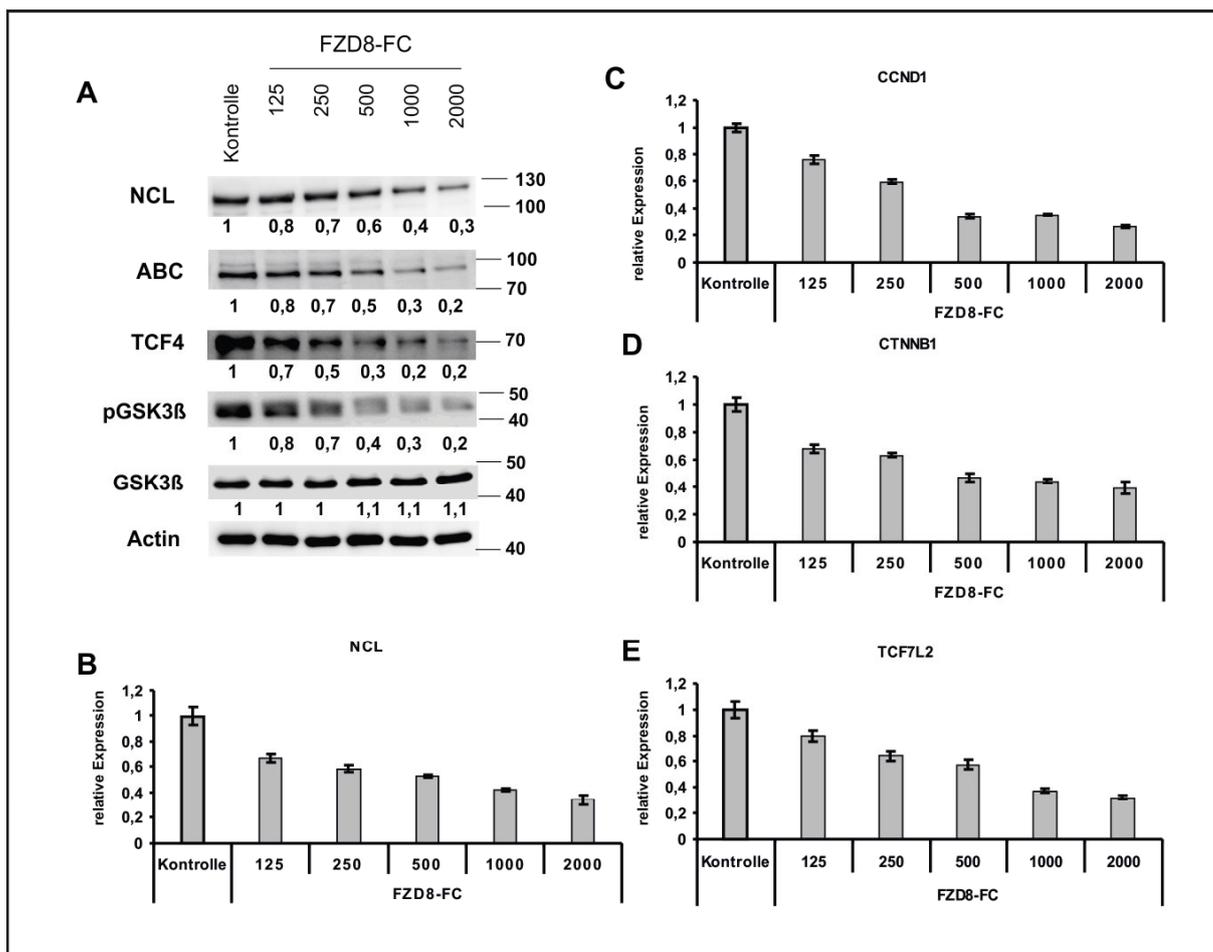


Abb. 19 Einfluss von FZD8-FC auf die Expression von Wnt Zielgenen in Mutz-2 Zellen

Mutz-2 Zellen wurden 48h ohne 5637-Überstand kultiviert, dann wurden 25% Überstand und die angegebenen Mengen FZD8-FC (in ng/ml) zugegeben. Nach 24 h wurden die Zellen geerntet. **A)** Western Blot Analyse für Nucleolin und die Komponenten des Signalweges wie aktives β -Catenin (ABC), TCF4 sowie totale und pSer9 GSK3 β . Als Beladungskontrolle wurde β -Aktin gewählt. Die Banden wurden densitometrisch ausgewertet und in Relation zur Kontrollprobe gesetzt. **(B-E).** Zusätzlich wurden qRT Analysen von *Nucleolin* (**B**) und den Wnt Zielgenen *CCND1* (**C**), *CTNNB1* (**D**) und *TCF7L2* (**E**) durchgeführt. n=5

Mittels Western Blot wurde die Expression des durch TCF7L2 kodierten Proteins TCF4, von Nucleolin sowie Aktives β -Catenin (ABC) als Signalübermittler des Signalweges untersucht (Abb. 19A). Die Expression von GSK und die Untersuchung der am Serin9 phosphorylierten (pGSK3 β) und dadurch inaktivierten Form sollte weiterführend die Aktivierung auf Proteinebene klären.

Die Behandlung mit FZD8-FC führte zu einer deutlichen dosisabhängigen Reduktion der mRNA Kopien von Wnt Zielgenen. So kam es zu einer Reduktion von *CTNNB1* und *TCF7L2*, zweier Moleküle die direkt in das Signalling involviert sind und gleichzeitig Zielmoleküle des Signalweges darstellen (Abb. 19 D, E). Zudem nahm die Anzahl der mRNA Transkripte von *NCL* und *CCND1* dosisabhängig ab (Abb. 19 B, C).

Die Untersuchung derselben Proben auf Änderungen der Proteinexpression von kanonischen Zielgenen und Mediatoren zeigte ebenfalls eine deutliche dosisabhängige Reduktion des

aktiven β -Catenin (ABC) und von TCF4, beides wichtige Faktoren in der Signalweiterleitung des kanonischen Wnt Signalweges (Abb. 19A). Weiterhin zeigte sich, dass es zu einer Abnahme der pGSK3 β Ser9 kam, die Gesamtmenge an GSK3 β sich jedoch nicht veränderte. Diese Phosphorylierung hat einen inaktivierenden Einfluss auf die Kinase und begünstigt somit den kanonischen Wnt Signalweg. Letztlich zeigte sich analog zur mRNA auch auf Proteinebene eine deutliche Reduktion von Nucleolin. Zusammengefasst zeigen die Analysen der Expression Wnt abhängiger Gene in Mutz-2 Zellen, dass der 5637-Überstand funktionelle Wnt Liganden enthält und die Depletion derer zu einer deutlichen Reduktion der Aktivität des kanonischen Signalwegs in diesen Zellen führt.

4.2.3 Einfluss rekombinanter Wnt Liganden auf die Expression von Wnt-Zielgenen in Mutz-2 Zellen

Zur Klärung, ob die Aktivierung des Signalweges auf den kanonischen Liganden Wnt3a und Wnt10b oder dem nicht-kanonischen Wnt5a beruht, wurden Mutz-2 Zellen 24h mit rekombinanten Liganden behandelt und anschließend für Expressionsanalysen geerntet. Die genannten Liganden wurden gewählt, da diese den jeweiligen Signalweg in idealer Weise aktivieren. Dabei zeigte sich in diesen Zellen eine Aktivierung des kanonischen Signalwegs durch Wnt3a und Wnt10b in Abhängigkeit von der Ligandenmenge. So zeigte der Western Blot einen Anstieg von ABC und TCF4 (Abb. 20A). Die vermehrte Phosphorylierung der GSK3 β am Serin 9 deutete ebenfalls auf einen stärker aktiven Signalweg hin. Ebenso konnte ein Anstieg der Nucleolin Proteinmenge detektiert werden. Es zeigte sich zudem, dass die Aktivierung durch den Liganden Wnt10b etwas schwächer ausfiel als durch Wnt3a (siehe Resultate der Densitometrie).

Expressionsanalysen mittels qRT-PCR zeigten ebenfalls, dass Wnt3a und Wnt10b beide die Expression von kanonischen Wnt Zielgenen aktivieren (Abb. 20C-E). Die Expression von *Nucleolin* stieg ebenfalls parallel zur Proteinexpression dosisabhängig durch die Liganden an (Abb. 20 B). Analog zu den Analysen auf Proteinebene zeigte die qRT anhand der größeren Expressionsunterschiede, dass Wnt3a den Signalweg stärker aktiviert hatte als Wnt10b.

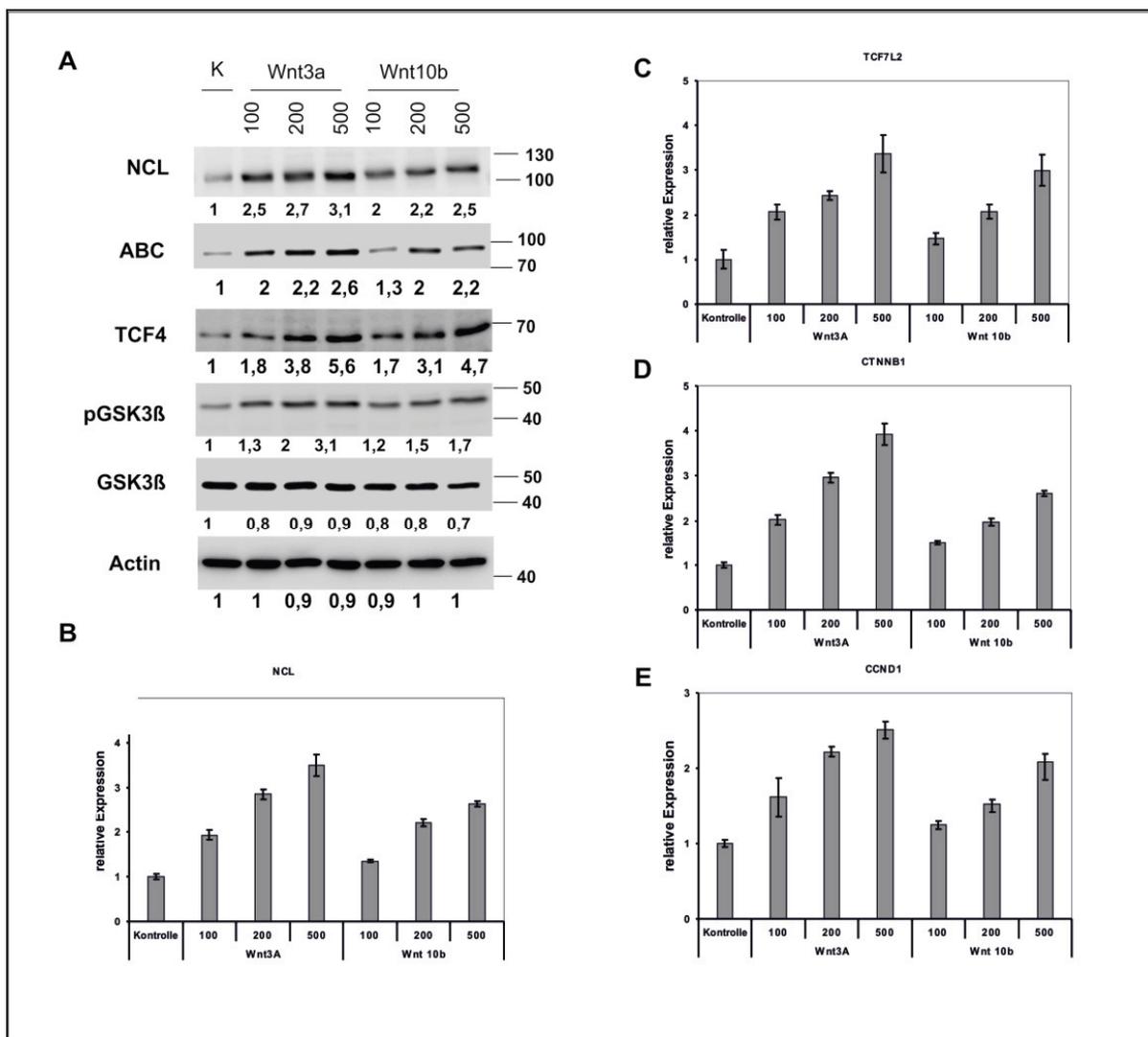


Abb. 20 Einfluss von kanonischen Wnt Liganden auf die Expression von Wnt-Zielgenen in Mutz-2 Zellen
 Mutz-2 Zellen wurden für 24 h mit den angegebenen Konzentrationen an Wnt3a und Wnt10b (ng/ml Ligand) behandelt und anschließend mittels Western Blot (A) gegen Nucleolin, ABC, TCF pGSK3β sowie GSK3β analysiert. β-Aktin diente als Ladekontrolle. Die Werte unter den Banden geben die relative densitometrische Dichte an. Weiterhin wurden die Expressionsunterschiede von *Nucleolin*, *CCND1*, *CTNNB1* und *TCF7L2* mittels qRT-PCR bestimmt und auf β-Aktin normalisiert (B-E). n=4

Durch den nicht-kanonischen Liganden Wnt5a hingegen kam es zu keinem Anstieg der pGSK3β-Menge (Abb. 21 A). Dieses führte dann im Resultat nicht zu einem Anstieg des aktiven β-Catenins und auch TCF4 änderte sich nicht. Zu guter Letzt konnte auch keine Änderung der Nucleolin Proteinmenge detektiert werden. Auf Transkriptionsebene konnte durch die Zugabe von Wnt5a kein Effekt auf die mRNA Kopienzahl von Nucleolin oder den kanonischen Zielgenen gefunden werden (Abb. 21 B-E). Dies zeigte, dass in Mutz-2 Zellen die Liganden Wnt3a und Wnt10b in der Lage sind den kanonischen Wnt Signalweg zu aktivieren und die Transkription von Zielgenen dosisabhängig zu steigern. Der nicht-kanonische Ligand Wnt5a hingegen war erwartungsgemäß nicht in der Lage diesen Signalweg zu stimulieren.

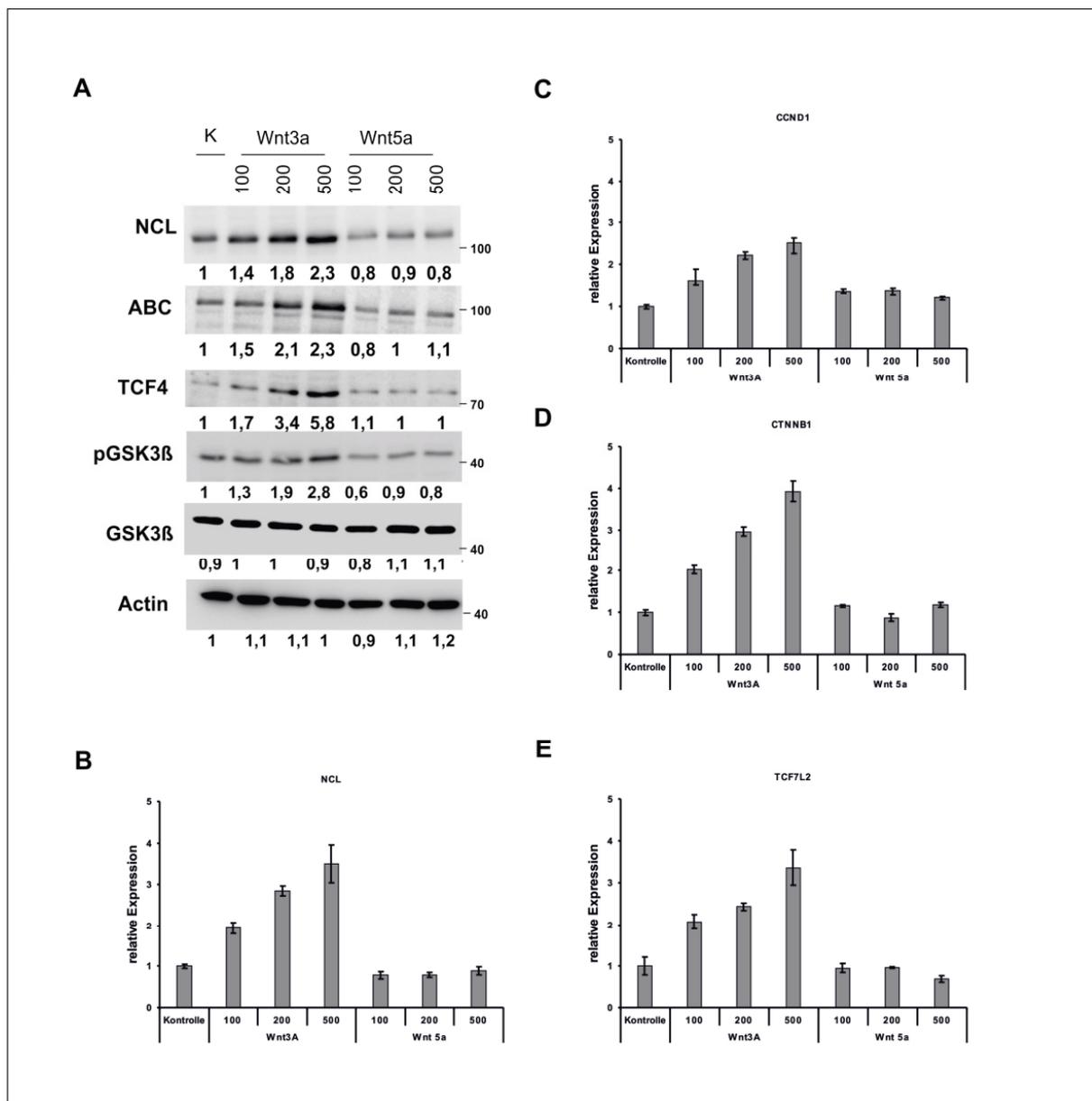


Abb. 21 Einfluss von Wnt5a auf die Aktivierung des kanonischen Wnt Signalweges in Mutz-2 Zellen
Mutz-2 Zellen wurden für 24 h mit den angegebenen Konzentrationen an Wnt 3a und Wnt5a (ng/ml Ligand) behandelt und anschließend mittels Western Blot (A) gegen Nucleolin, ABC, TCF pGSK3β sowie GSK3β analysiert. β-Aktin diente als Ladekontrolle. Die Zahlen geben die relativen densitometrischen Werte der jeweiligen Probe an. Weiterhin wurden die Expressionsunterschiede von *Nucleolin*, *CCND1*, *CTNNB1* und *TCF7L2* mittels qRT-PCR bestimmt und auf β-Aktin normalisiert (B-E). n=4

4.2.4 Einfluss von Nucleolin-Überexpression auf die Aktivierung eines Wnt-Reporters

Zur Untersuchung des Einflusses von Nucleolin auf die Aktivierung des kanonischen Wnt Signalweges wurden Mutz-2 Zellen mit einem Wnt Reporter (TCF RE, Barolo 2007) oder dem zugehörigen Kontrollplasmid lentiviral transduziert und selektioniert. Das Prinzip des Reporters beruht auf TCF spezifischen Bindemotiven, die vor einem Minimalpromotor im Reportersystem liegen, und durch eine Bindung durch den TCF/LEF Transkriptionskomplex

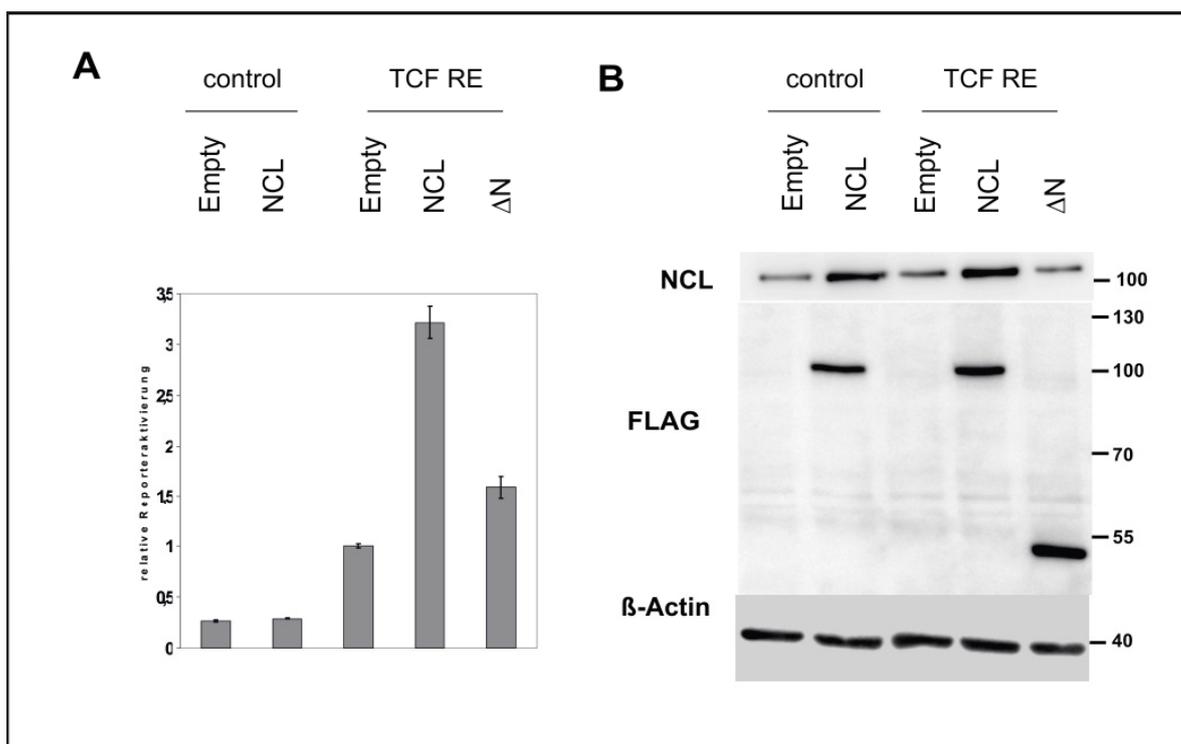


Abb. 22 Analyse der Wnt Reporteraktivierung mittels Luciferase-Reporterassays

Mutz-2 Zellen stabil transduziert mit den Reporterkonstrukten pGreenFire TCF RE oder pGreen Fire Control wurden mit verschiedenen Nucleolin Expressionskonstrukten nukleofiziert und die Luciferaseaktivität nach 24h gemessen (A). Der Luciferasewert der TCF RE/Empty Probe wurde auf 1 gesetzt. Mittels Western Blot wurden die exogenen Flag- Nucleolin- Proteine detektiert, wie auch die gesamte Nucleolin Menge. β -Aktin diente als Ladekontrolle (B). n=4

die Expression der Luciferase induzieren. Diese stabilen Zelllinien wurden anschließend mit Nucleolin oder Nucleolin- Δ N Expressionsplasmid nukleofiziert. Als Kontrolle dienten mit einem Empty-Expressionsplasmid nukleofizierte Zellen, da diese die endogene Aktivität zeigen.

Wie in Abb. 22 dargestellt zeigte sich, dass zum einen der kanonische Wnt Signalweg in den untersuchten Mutz-2 Zellen durch endogene Faktoren aktiv vorliegt. Die Nukleofektion von Nucleolin steigerte die Aktivität des Wnt-Reporters zusätzlich (Abb. 22A), die Nukleofektion von Nucleolin- Δ N hingegen aktivierte den Reporter deutlich schwächer als Nucleolin. Western Blot-Analysen zeigten dass die Nucleolin Nukleofektion in der Kontrollreporter- und der Wnt-Reporterpopulation zu einem deutlichen Anstieg der Proteinmenge führte (Abb. 22B). Der Western Blot gegen das FLAG Epitop zeigte die deutliche Expression der transgenen Nucleolin und Nucleolin- Δ N. Dieses Experiment lieferte einen ersten Hinweis darauf, dass Nucleolin die Aktivität des Signalweges modulieren kann und dass die Aktivierung abhängig vom N-Terminus des Proteins ist.

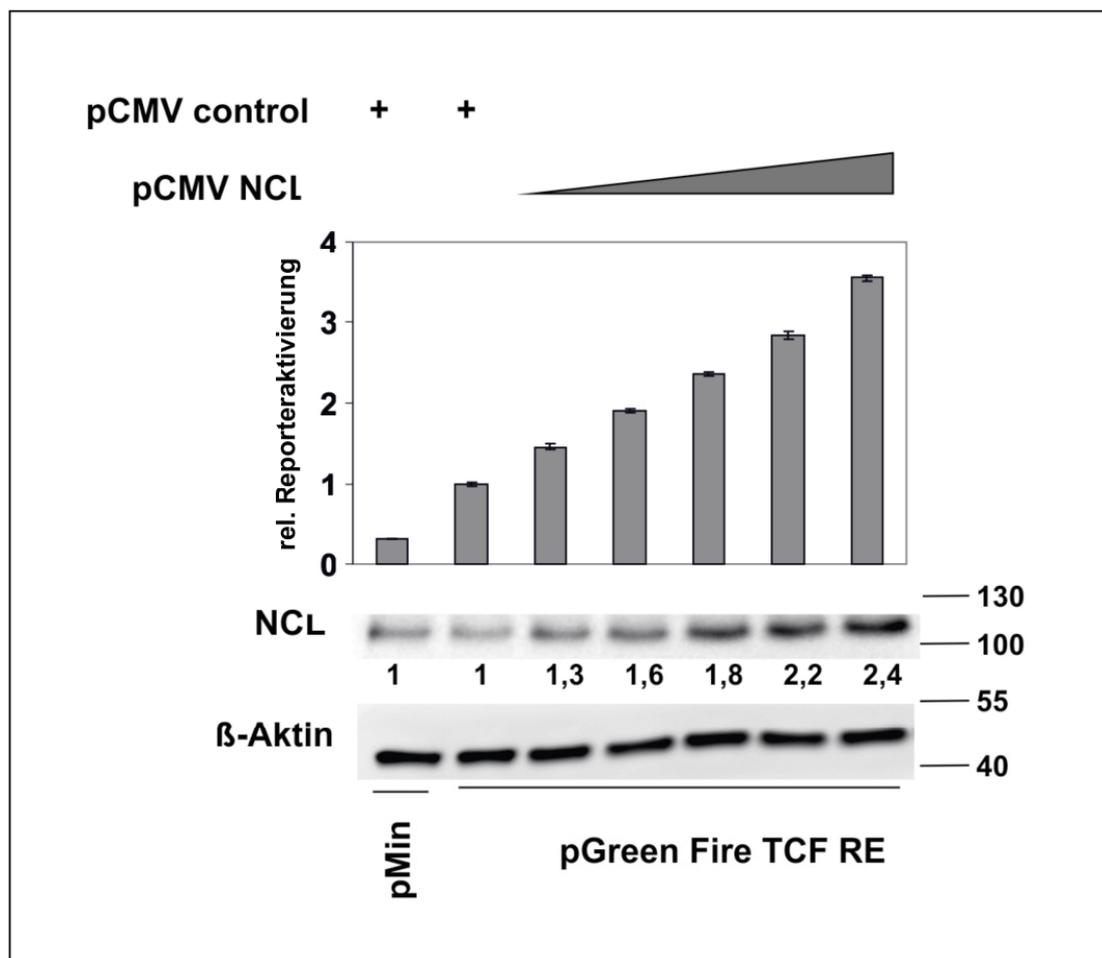


Abb. 23 Analyse der Wnt Reporteraktivierung nach Nucleofektion mit ansteigenden Nucleolinmengen
Mutz-2 Zellen stabil transduziert mit den Reporterkonstrukten pGreenFire TCF RE oder pGreen Fire Control wurden mit ansteigenden Mengen des Nucleolin Expressionsplasmides (0, 0,2µg, 0,4µg, 0,6µg, 0,8µg, 1µg und 1,2µg) nukleofiziert und die Aktivierung des Reporters nach 24h bestimmt. Zellen die hingegen stabil mit dem Kontrollvektor ohne TCF Bindemotive transduziert wurden (pGreenFire-control) dienten als Kontrolle. Weiterhin wurde die Nucleolin Proteinexpression mittels Western Blot bestimmt und die Bandenstärke densitometrisch ausgewertet. Als Ladekontrolle diente β-Aktin. n=4

Die Nucleofektion ansteigender Mengen des Nucleolin-Expressionsplasmides in TCF-RE transduzierte Zellen sollte zeigen, ob die Aktivierung dosisabhängig ist und somit allein von der Änderung der Nucleolin-Proteinmenge in der Zelle abhängt. Dazu wurden Mutz-2 Zellen mit ansteigenden Mengen des Nucleolin Expressionsplasmides nukleofiziert und nach 24h für Luciferase und Western Blot Analysen geerntet.

Die Analyse der Reporteraktivität zeigte einen linearen Zusammenhang von Plasmidmenge zu Reportersignal (Abb. 23). Da parallel dazu auch die Nucleolin Proteinmenge stieg, gibt dieses Ergebnis einen klaren Hinweis darauf, dass es sich um eine direkte und auch dosisabhängige Aktivierung handelt.

Zusammengefasst zeigen diese beiden Experimente eine aktivierende Wirkung von Nucleolin auf den kanonischen Wnt Signalweg. Diese Wirkung ist jedoch nur durch das Wildtypprotein und nicht durch Nucleolin-ΔN gegeben. Von dieser Beobachtung ausgehend wurde die Frage

gestellt ob eine Reduktion der Nucleolin Menge in der Zelle analog zu den vorherigen Ergebnissen zu einer Reduktion der Signalwegsaktivität führt.

4.2.5 Untersuchung der TCF-Reporteraktivierung nach Nucleolin-shRNA Knockdown

In dem vorliegenden Experiment wurde der Wnt Signalweg nach shRNA vermitteltem Knockdown von Nucleolin untersucht. Dazu wurden Mutz-2 Zellen lentiviral mit shRNA Konstrukten gegen Nucleolin (shNCL1 und shNCL2), einer nicht gegen Nucleolin gerichteten shRNA (nicht gerichtete shRNA) oder dem Leervektor transduziert. Zur Untersuchung des Einflusses auf die Aktivierung des kanonischen Wnt Signalweges wurde parallel das pGreenFire TCF oder das pGreenFire control Reporterplasmid transduziert und die Zellen im Anschluss selektioniert. Um zu untersuchen, ob Nucleolin einen Einfluss auf die ligandenabhängige Aktivierung des Wnt-Signalweges hat, wurden die selektionierten Zellen im Anschluss mit unterschiedlichen Konzentrationen von Wnt3a kultiviert. Die Zugabe von hitzeinaktiviertem Wnt3a (Wnt3aHi) diente als Spezifitätskontrolle für den Effekt durch den Liganden. Es wurde jeweils die shRNA Gruppe mit Wnt Reporter gegen die mit gleichen shRNA-Konstrukten transduzierte Kontroll-Reporter Gruppe normalisiert. Zur Kontrolle des shRNA basierten Knockdowns von Nucleolin und der Änderung von Komponenten des kanonischen Wnt-Signalweges wurden Western Blot Analysen durchgeführt.

Um auszuschließen, dass Artefakte aufgrund unterschiedlicher Reporterengenkopien auftreten, wurde die Zahl dieser in den unterschiedlichen Populationen mittels qPCR analysiert. In allen Populationen zeigte sich nach Normalisierung auf das Referenzgen *36B4* eine vergleichbare Kopienzahl für das Reporterkonstrukt. In nicht pGreen Fire Reporter transduzierten Mutz-2 Zellen war *36B4* vergleichbar nachweisbar, jedoch die Resistenzkassette nicht detektierbar.

Die Messung der Reporteraktivität zeigte, dass bei der Leervektorpopulation ein 1,7 facher Anstieg der Reporteraktivität durch 100 ng/ml Wnt3a erreicht wurde und eine 2,2 fache Steigerung durch 200 ng/ml Wnt3a (Abb. 24). Die Zellen, die mit einer nicht Nucleolin gerichteten shRNA transduziert wurden führten zu vergleichbaren Ergebnissen. Die Gabe des hitzeinaktivierten Liganden führte zu keiner Steigerung der Signalintensität.

Die shNCL1 und shNCL2 Populationen zeigten nur 10% der Reporteraktivität der unbehandelten Kontrollpopulationen und es gab keine messbaren Unterschiede durch Wnt3a Behandlung. Somit zeigte dieses Ergebnis, dass der TCF-Reporter ohne Anwesenheit von Nucleolin deutlich weniger endogene Aktivität aufwies und nicht durch Zugabe von rekombinantem Wnt3a aktivierbar war.

Zur weiteren Abklärung dieser Erkenntnis und zur Überprüfung des Nucleolin-Knockdowns wurden Aliquots der analysierten Populationen auf Änderungen in der Proteinexpression untersucht. Dabei wurde ersichtlich, dass die shRNA vermittelten Nucleolin Knockdowns sehr effizient waren und weniger als 10% des normal vorhandenen Nucleolin-Proteins detektierbar war. Die Analyse von ABC zeigte, dass dieses in den shNucleolin Populationen ebenfalls drastisch reduziert war. Für beide Proteine zeigte sich aber eine Wnt3a-abhängige Expressionssteigerung in den Kontrollpopulationen, jedoch nicht durch Gabe des hitzeinaktivierten Liganden.

Zusammengefasst zeigte sich, dass der shRNA basierte Nucleolin Knockdown zu einer wesentlichen Reduktion der Wnt Reporteraktivität führte und in diesen Zellen keine Steigerung der Aktivität durch Wnt3a Zugabe stattfand.

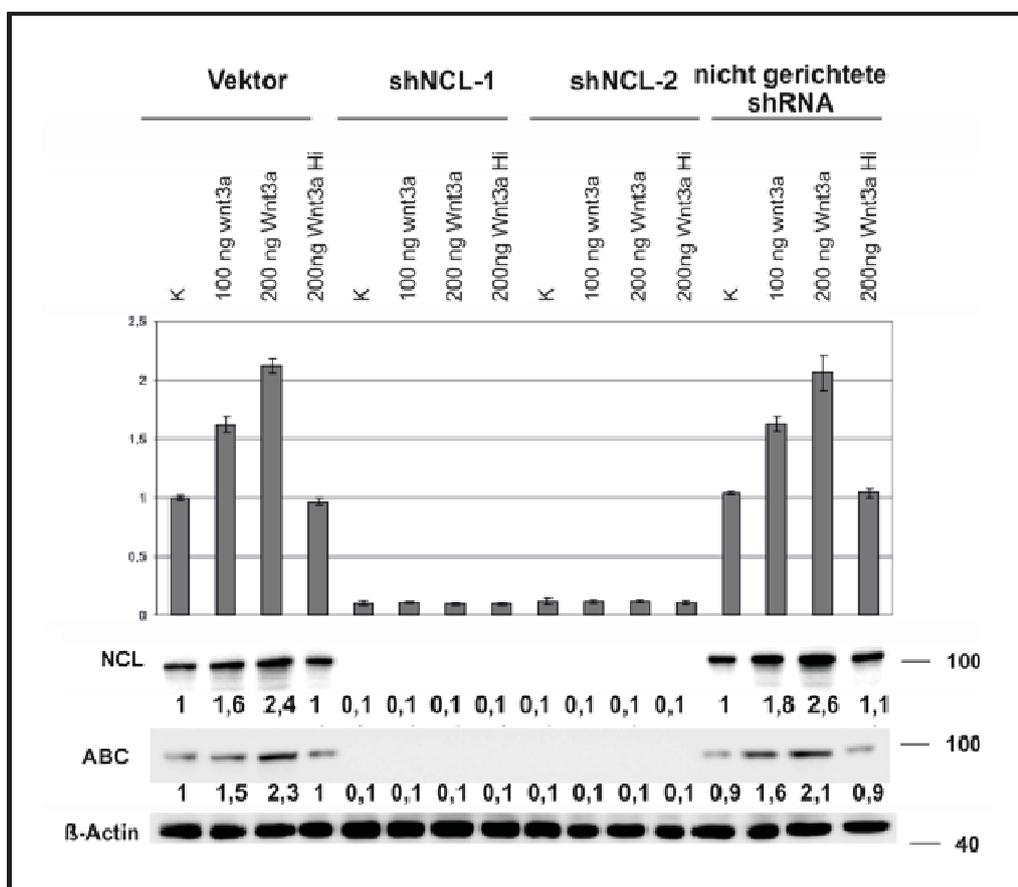


Abb. 24 Analyse des kanonischen Wnt Signalweges nach shRNA vermitteltem Nucleolin Knockdown

Für die Untersuchung der Wnt Reporteraktivierung nach shRNA vermitteltem Nucleolin Knockdown wurden Mutz-2 pGreenFire TCF oder Mutz-2 pGreenFire control Zellen mit shRNA Lentiviren transduziert und selektioniert. Anschließend wurden die Zellen nach Wnt3a Behandlung auf die Aktivität der Reporterkonstrukte analysiert und der Quotient aus der Aktivität der beiden Reporter gebildet. Diese Quotienten wurden auf die Leervektor-kontrolle ohne Wnt3a Behandlung normiert. Zur Kontrolle des shRNA Knockdowns wurden Western Blots gegen Nucleolin sowie die Proteine ABC und β -Aktin durchgeführt. n=4

4.2.6 Analyse von Proteinen der Wnt Signalkaskade nach Nucleolin shRNA Knockdown

Zur weiteren Untersuchung des Einflusses von Nucleolin auf die Zielgene und Komponenten des kanonischen Wnt Signalweges wurden wiederum Mutz-2 Zellen mit Nucleolin shRNA Partikeln transduziert, diesmal jedoch nicht mit den Reporterkonstrukten um eventuelle Artefakte durch die Selektion zu minimieren. Die anschließende Untersuchung der Proben auf Änderungen in der Proteinexpression zeigte, dass Nucleolin auf Proteinebene nach shRNA Knockdown bei shNCL1 und shNCL2 Proben kaum detektierbar war, **verglichen** zu den Kontrollproben (Abb. 25).

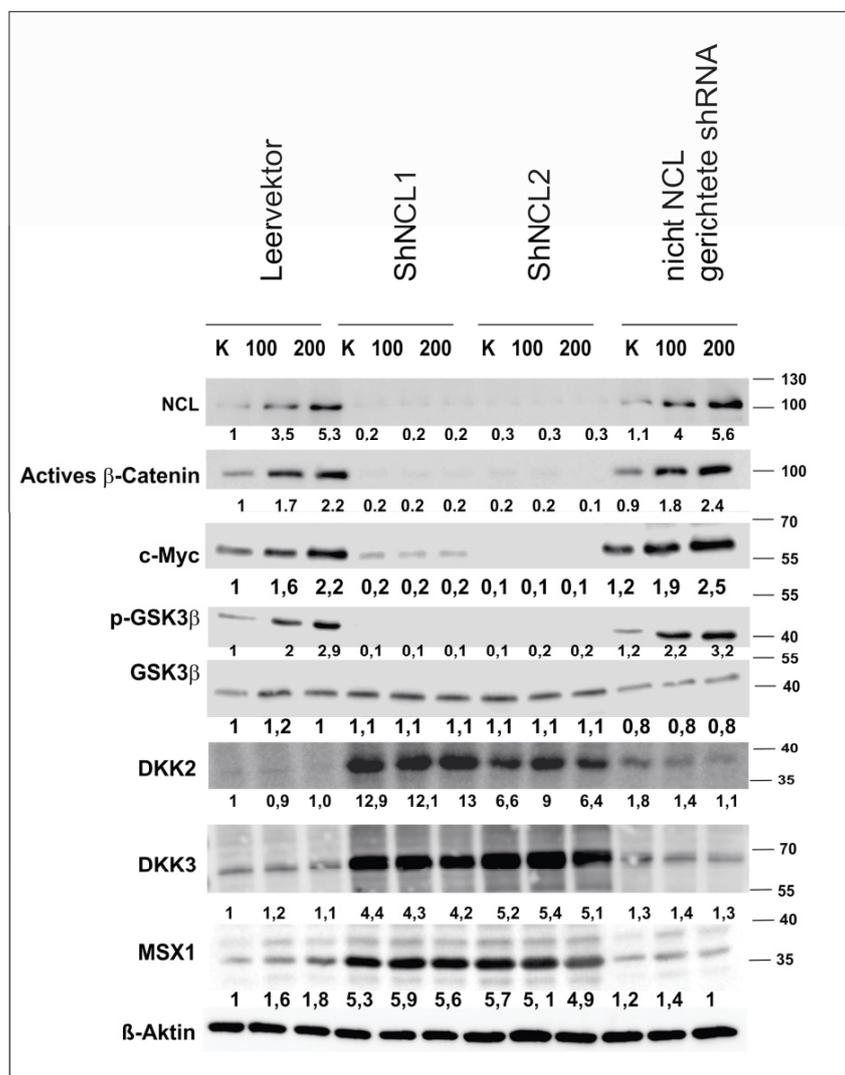


Abb. 25 Western Blot Analysen nach Nucleolin Knockdown und Wnt3a-Behandlung

Mutz-2 Zellen wurden lentiviral mit shRNA Partikeln gegen Nucleolin oder Kontrollpartikeln transduziert, mit Puromycin selektiert und anschließend für Expressionsanalysen auf Proteinebene verwendet. Dazu wurden die Zellen mit den angegebenen Menge Wnt3a (ng/ ml Medium) behandelt und nach 24h geerntet. Die Analysen wurden mit spezifischen Antikörpern durchgeführt und die relative Expressionsstärke mittels Densitometrie bestimmt. n=3

Die Analyse von Komponenten des Wnt Signalweges zeigte, dass durch den Wegfall von Nucleolin die GSK3 β -Menge unverändert war, jedoch kaum noch in der am Ser9 phosphorylierten und damit inaktiven Form vorlag. Dies resultierte im Rückgang von aktivem β -Catenin in shNCL1- und shNCL2-Proben. Die Wnt3a abhängige Zunahme von aktivem Catenin und pGSK3 β war nur bei den Kontrollgruppen sichtbar. Letztendlich wurde c-Myc als Vertreter der direkten Zielgene untersucht. Nach Nucleolin Knockdown war das Protein kaum nachweisbar, wohingegen in den Kontrollpopulationen die Proteinmenge Wnt3a-dosisabhängig anstieg.

Die Analyse der inhibitorisch wirkenden Dickkopfproteine DKK2 und DKK3 zeigte eine deutliche stärkere Expression nach shRNA Knockdown von Nucleolin. Gleiches galt für den putativen Regulator dieser beiden MSX1 welcher ebenfalls nach Nucleolin knockdown induziert wurde.

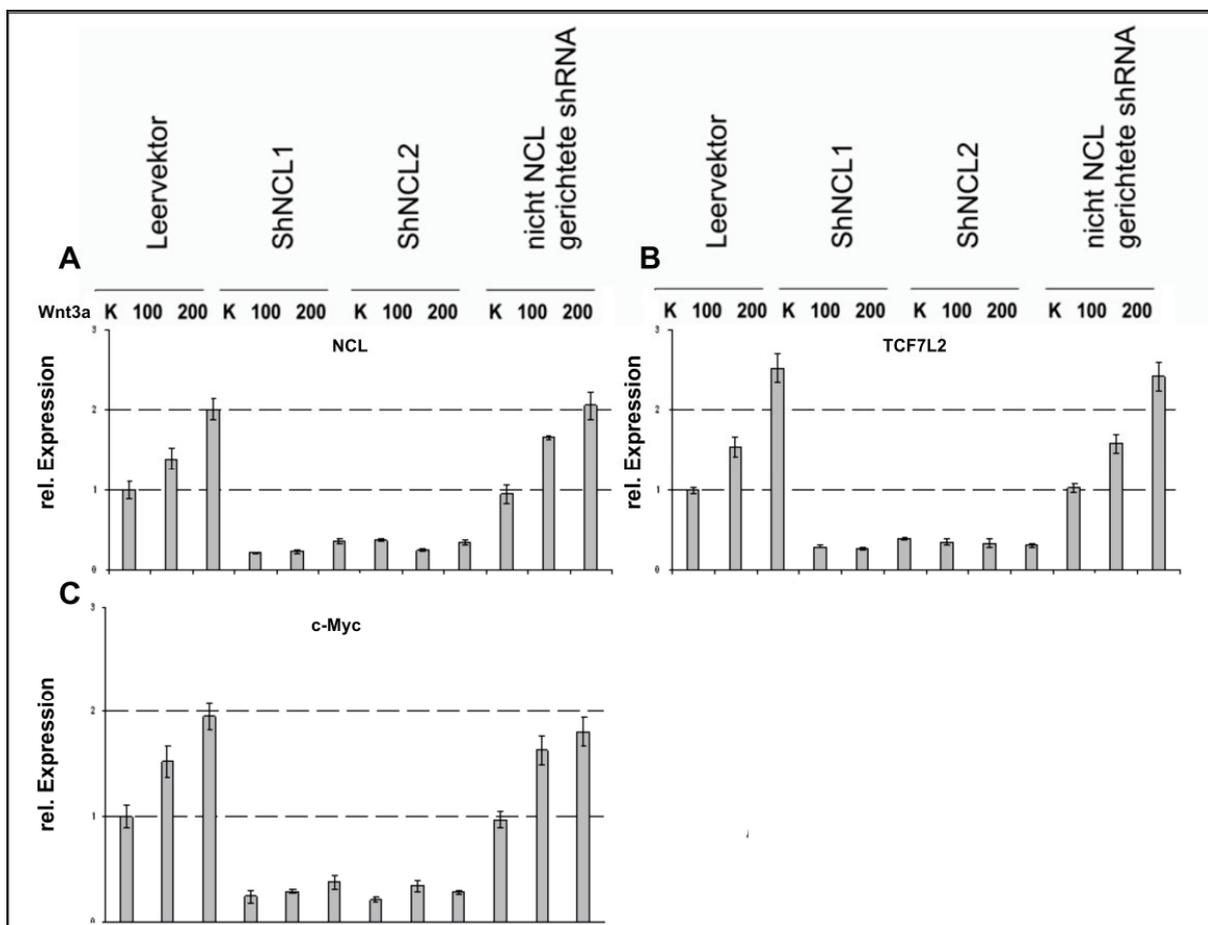


Abb. 26 qRT Analysen nach Nucleolin shRNA Knockdown und Behandlung mit Wnt3a

Mutz-2 Zellen wurden mit shRNA Konstrukten gegen Nucleolin sowie Kontrollen transduziert, selektiert und anschließend 24h mit den angegebenen Mengen Wnt3a (ng/ ml Ligand) behandelt. Gesamt-RNA wurde isoliert, revers transkribiert und mittels qRT-PCR auf die Expression von *NCL*, *TCF7L2*, und *c-Myc* (A-C) untersucht. n=3

Die Analyse der Nucleolin mRNA Transkripte zeigte nach erfolgreicher shRNA Transduktion und Selektion eine deutliche Reduktion sowohl in der shNCL1 als auch in der shNCL2-Population (

Abb. 26A). Die nicht gegen Nucleolin gerichtete shRNA hingegen zeigte keine Reduktion. Die Gabe von Wnt3a führte in den Kontrollgruppen zu einem dosisabhängigen Anstieg der mRNA Expression, in den shNCL1 und shNCL2 Proben hingegen nicht.

Die Untersuchung des Nucleolin shRNA Knockdowns auf Wnt Zielgene zeigte, dass beispielsweise die Expression der Gene *TCF7L2* und *c-Myc* in shNCL1 und shNCL2 Zellen deutlich reduziert war. Außerdem gab es im Gegensatz zu den Kontrollpopulationen keinen Wnt3a abhängigen Expressionsanstieg der Zielgene (Abb. 26B-D).

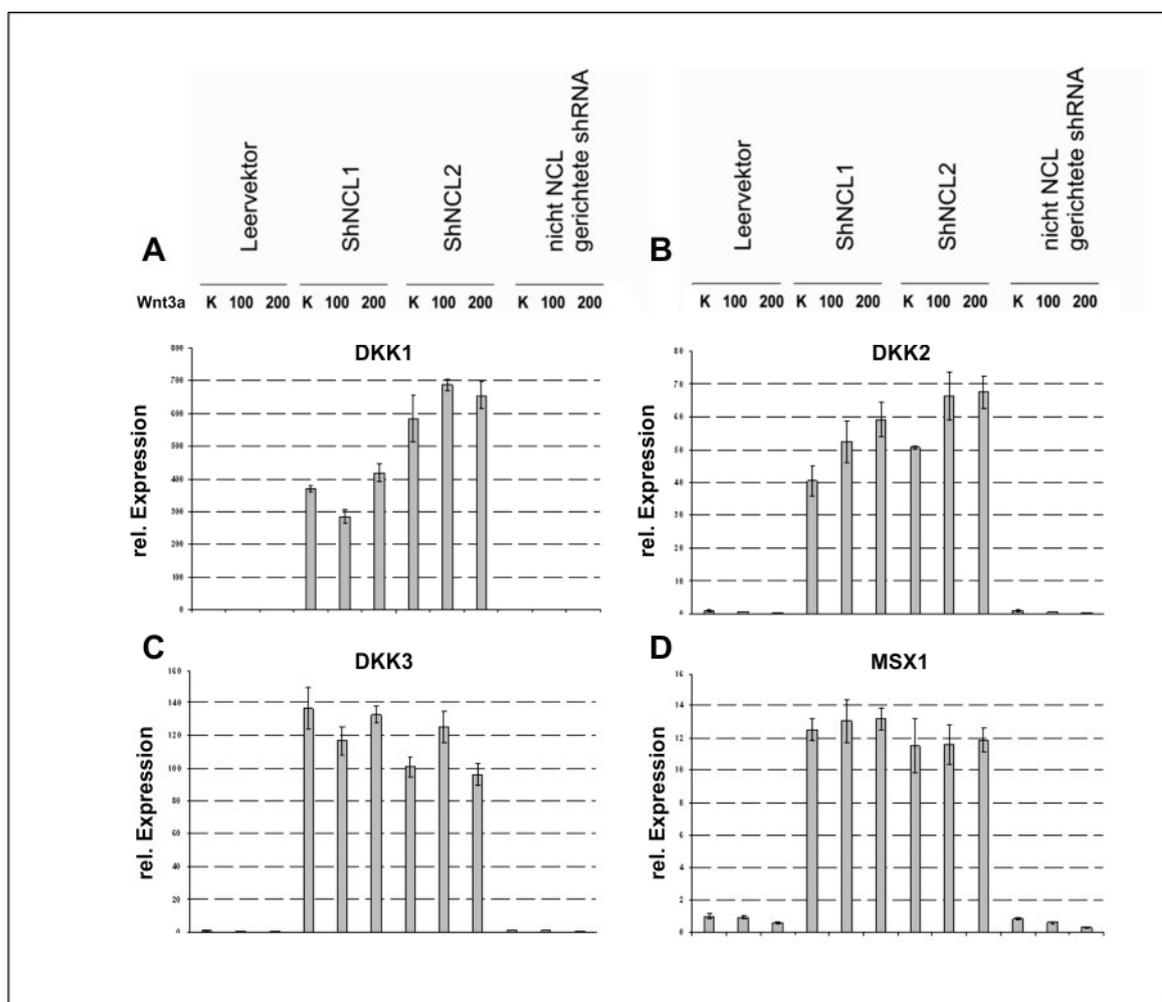


Abb. 27 qRT Analyse von Wnt Inhibitoren in Mutz-2 shRNA Zellen mittels qRT-PCR

Mutz-2 Zellen wurden mit shRNA Konstrukten gegen Nucleolin sowie Kontrollen transduziert, selektioniert und anschließend 24h mit den angegebenen Mengen Wnt3a behandelt. Gesamt-RNA wurde isoliert und mittels qRT-PCR auf die Expression von A) *DKK1*, B) *DKK2*, C) *DKK3* und D) *MSX1* in Relation zu β -Aktin untersucht. n=3

Die Untersuchung von drei Vertretern der inhibitorisch auf den Signalweg wirkenden Dickkopf-Proteinfamilie *DKK1*, *DKK2* und *DKK3* zeigte nach Nucleolin Knockdown einen deutlichen Anstieg der Transkripte (Abb. 27A-C). Diese drei Vertreter der direkten Inhibitoren des Wnt Signalweges sollten laut Literatur durch den Faktor *MSX1* regulierbar sein, ein Homeoboxprotein welches in der Embryogenese repressorisch wirkt (Revet *et al.*, 2010). Die Expression von *MSX1* war in den shNCL1- und shNCL2- transduzierten Proben deutlich gesteigert (Abb. 27D). Da diese Veränderung einen gleichen Verlauf wie bei den untersuchten DKKs zeigte, deutete dies darauf hin, dass der Knockdown von Nucleolin in einer Expressionssteigerung von *MSX1* resultierte und daher die DKK-Gene *DKK1*, *DKK2* und *DKK3* induziert wurden. Daraus ergab sich nun die weiterführende Frage, ob die Expression der DKK-Proteine allein für die Reduktion der Expression von Wnt Zielgenen verantwortlich war.

Zusammengefasst wurde gezeigt, dass der lentiviral-vermittelte shRNA Knockdown von Nucleolin sehr effizient war und dieser den kanonischen Wnt Signalweg beeinflusst. So stiegen die klassischen Zielgene und Signalwegskomponenten nach Wnt3a Gabe in den Kontrollgruppen an, jedoch nicht bei Nucleolin Knockdown. Die Expression der Inhibitoren *DKK1*, *DKK2*, *DKK3* sowie dem putativen Regulator *MSX1* wurde durch die Abwesenheit von Nucleolin deutlich erhöht.

Da Nucleolin anscheinend für die Wnt abhängige Aktivierung benötigt wird, stellte sich die Frage ob eine Überexpression mit gleichzeitiger Gabe von Wnt Liganden das Signal potenziert.

4.2.7 Einfluss von kanonischen Wnt Liganden nach Nucleolin Überexpression

Zur Analyse der Wnt Reporteraktivierung bei Nucleolin Überexpression in Kombination mit der Gabe von Wnt-Liganden wurden Mutz-2-pGreenFire-TCF oder Mutz-pGreenFire control-Zellen, mit pCDH-NCL-T2A- Δ Lngfr, dem NCL- Δ N-Expressionskonstrukt oder dem Leervektor transduziert. Die Zellen wurden im Anschluss für 24 Stunden mit rekombinanten Wnt Liganden behandelt. Dabei wurde zum einen rekombinantes Wnt3a eingesetzt und in einem zweiten Ansatz rekombinantes Wnt10b. Beide verwendeten Liganden aktivieren den kanonischen Signalweg. Als Kontrolle dafür, dass die Effekte auf dem funktionellen Liganden beruhen wurde derselbe Ligand in seiner hitzeinaktivierten Form verwendet.

Im Falle der pCDH-T2A- Δ Lngfr transduzierten Zellen führte die Wnt3a Zugabe zu einer dosisabhängigen Zunahme der Reporteraktivität, jedoch nicht durch Gabe des hitzeinaktivierten Liganden (Abb. 28). Die Zellen, die mit pCDH-NCL-T2A- Δ Lngfr transduziert

wurden, zeigten auch ohne Ligandengabe eine deutlich stärkere Reporteraktivierung als die Leervektor transduzierten Zellen. Zudem fiel die Wnt vermittelte Zunahme der Reportaktivität geringer aus. Bei pCDH-NCL- Δ N-T2A- Δ Lngfr transduzierten Zellen zeigte sich keine Aktivierung durch das Transgen verglichen mit dem Leervektor. Weiterhin war zu erkennen, dass die Nucleolin- Δ N transduzierten Zellen nicht mehr durch Wnt3a aktivierbar waren.

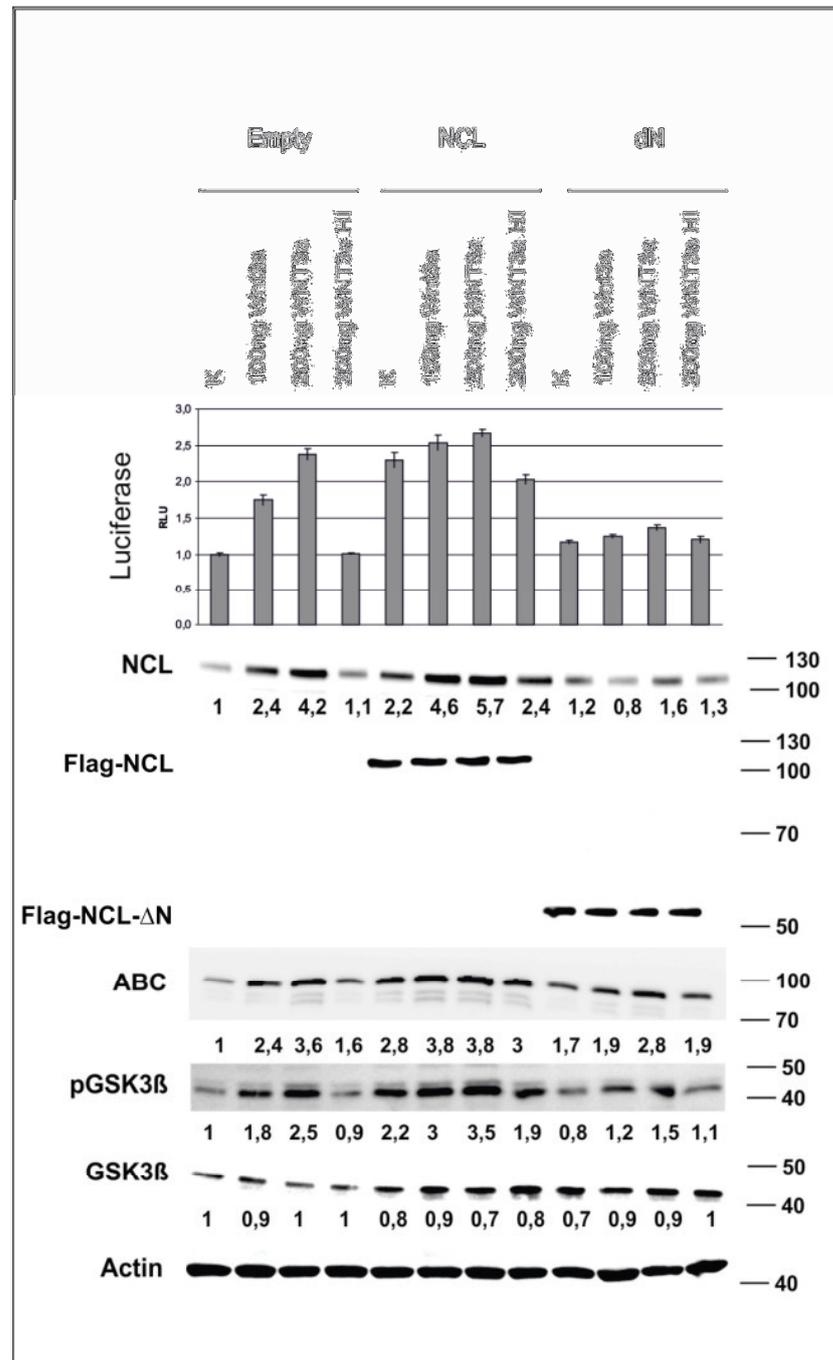


Abb. 28 Western-Blot Analysen in Mutz-2 Zellen nach Transduktion und Wnt3a-Behandlung Mutz-2-Zellen stabil transduziert mit pGreenFire TCF RE oder pGreenFire control wurden lentiviral mit pCDH-T2A- Δ Lngfr Konstrukten transduziert, die für Nucleolin, Nucleolin- Δ N oder nur Lngfr kodierten, und nach 96h mit den angezeigten Mengen Wnt3a behandelt. 24h später wurde die Reporteraktivität bestimmt, wobei der

Quotient der Kontrollpopulation und der TCF-RE Zellen dargestellt ist. Weiterhin wurden Western Blots mit Antikörpern gegen Nucleolin, ABC, pGSK3 β und GSK3 β verwendet. Die Detektion des Flag Epitops diente dem Nachweis des exogenen Proteins und β -Aktin wurde als Ladekontrolle verwendet. n=3

Die Proteinanalyse von Leervektor transduzierten Zellen zeigte einen Wnt3a abhängigen Anstieg von Nucleolin und aktivem β -Catenin, jedoch nicht durch Zugabe des hitzeinaktivierten Liganden. Zudem kam es zu einer dosisabhängig verstärkten Phosphorylierung der GSK3 β am Ser9. Bei den Nucleolin transduzierten Proben war wie erwartet schon ohne Wnt3a-Zugabe eine stärkere Nucleolin Expression detektierbar. Weiterhin gab es mehr aktives β -Catenin und wiederum mehr p-GSK3 β . Die Zugabe des Liganden hatte nach Nucleolin Transduktion deutlich weniger Effekt auf besagte Faktoren. Bei den Δ N transduzierten Zellen war der Anstieg von Nucleolin und aktivem β -Catenin deutlich geringer als bei den mit Leervektor transduzierten Zellen (Siehe Densitometrie). Der Blot gegen das FLAG-Epitop diente als Transduktionskontrolle und zeigte eine gleichmäßige Expression des Transgens. Die Analyse der Expressionsveränderungen auf mRNA Ebene zeigte wiederum eine Wnt3a abhängige Transkriptzunahme für Nucleolin in Leervektor transduzierten Zellen (Abb. 29). Die untersuchten kanonischen Zielgene verhielten sich vergleichbar, sodass bei allen eine dosisabhängige Zunahme der Expression erkennbar war. Wie die Western Blot Analyse zeigte auch die **Transkriptanalyse** bei Nucleolin transduzierten Zellen eine deutliche Steigerung an Nucleolin Kopien. **Ebenso konnte eine Steigerung in der Kopienzahl auch bei den untersuchten kanonischen Zielgenen beobachtet werden.** Die additive Wirkung durch Wnt3a fiel bei Nucleolin transduzierten Zellen deutlich geringer aus. Die Nucleolin- Δ N transduzierten Zellen zeigten keine durch das Transgen ausgelöste Expressionsänderungen der untersuchten Gene.

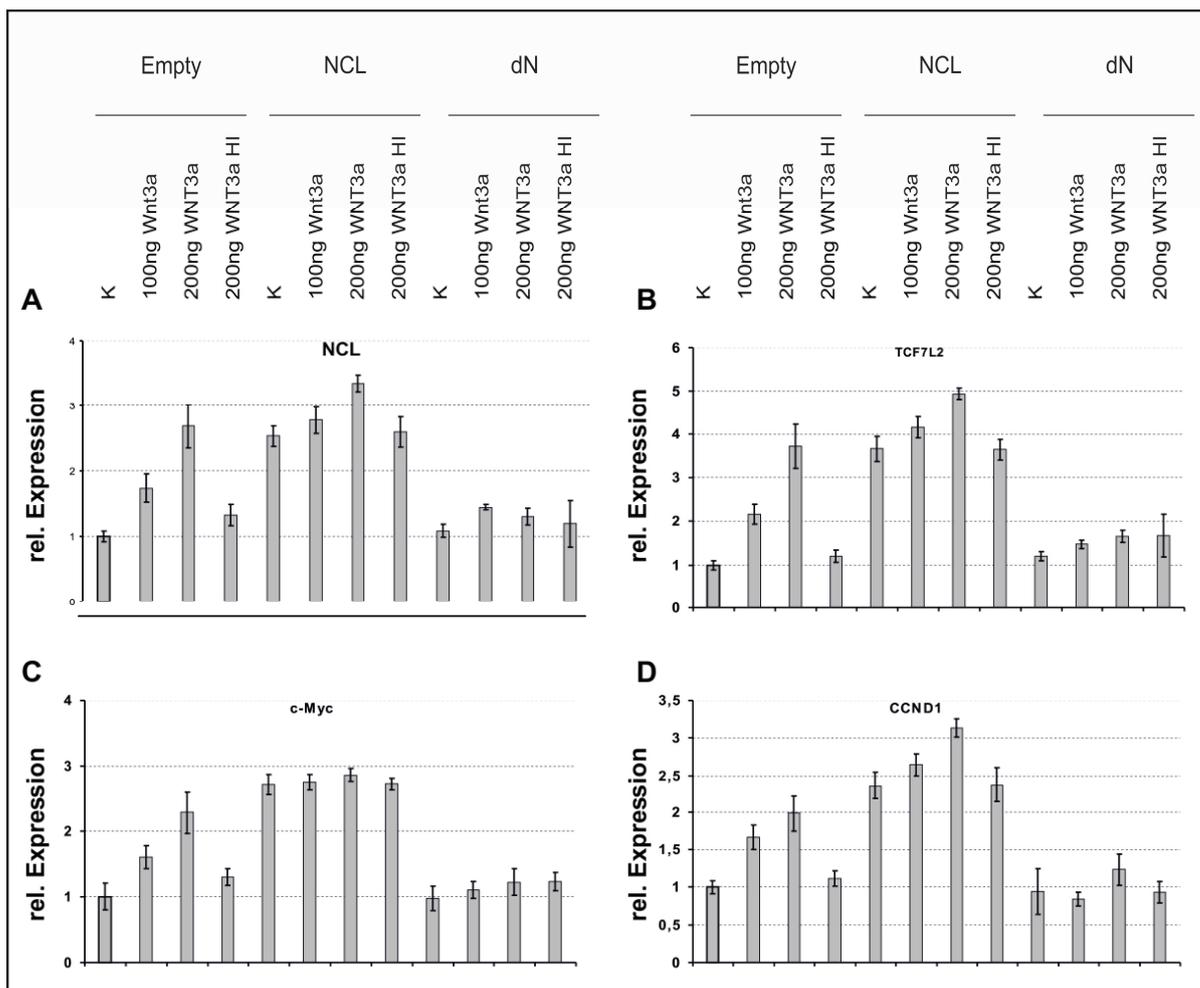


Abb. 29 qRT Analysen in Mutz-2 Zellen nach Nucleolin-Transduktion und Wnt3a Behandlung

Mutz-2-Zellen stabil transduziert mit pGreenFire TCF RE oder pGreenFire control wurden lentiviral mit pCDH-T2A- Δ Lngfr Konstrukten transduziert, die für Nucleolin, Nucleolin- Δ N oder nur Lngfr kodierten, und nach 96h mit den angezeigten Mengen Wnt3a behandelt. Anschließend wurde RNA isoliert und auf die Expression von *NCL*, *c-Myc*, *TCF7L2* und *CCND1* (A-D) untersucht. Die Expressionswerte wurden auf β -Aktin normalisiert. n=3

Zur Analyse der Wnt10b abhängigen Regulation der Genexpression wurden Zellen auf gleiche Weise behandelt und für 24h mit Wnt10b kultiviert. Bei den pCDH-Empty-T2A- Δ Lngfr transduzierten Zellen zeigte sich eine dosisabhängige Aktivierung des Wnt Reporters durch die Gabe von Wnt10b, jedoch nicht durch den hitzeinaktivierten Liganden (Abb. 30). Die mit Nucleolin transduzierten Zellen zeigten ohne Ligandenbehandlung eine deutlich stärkere Reporteraktivität verglichen mit der Leervektorkontrolle. Die Zugabe von Wnt10b führte zu einer leichten Steigerung der Signalstärke. In Nucleolin- Δ N transduzierten Zellen zeigte sich kaum eine Steigerung der Aktivierung des Reporters durch das Transgen verglichen mit der Leervektorkontrolle. Ein Anstieg der Reporteraktivität durch Wnt10b-Gabe war ebenfalls nicht detektierbar. Insgesamt zeigte der Luciferase Reporterassay

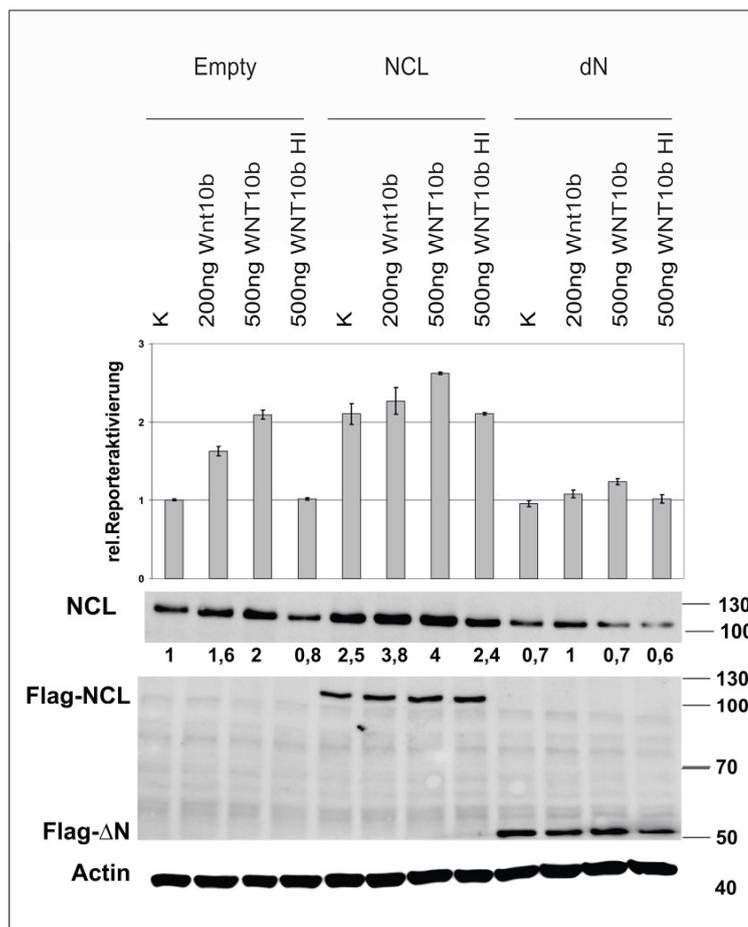


Abb. 30 Western-Blot Analysen in Mutz-2 Zellen nach Nucleolin-Transduktion und Wnt10b-Behandlung
Mutz-2-Zellen stabil transduziert mit pGreenFire TCF RE oder pGreenFire control wurden lentiviral mit pCDH-T2A- Δ Lngfr Konstrukten transduziert, die für Nucleolin, Nucleolin- Δ N oder nur Lngfr kodierten, und nach 96h mit den angezeigten Mengen Wnt10b behandelt. 24h später wurde die Reporteraktivität bestimmt, wobei der Quotient der Kontrollpopulation und der TCF-RE Zellen dargestellt ist. Die Detektion des Flag Epitops diente dem Nachweis des exogenen Proteins und der Nachweis von Nucleolin mittels Western Blot der Erfassung der Gesamt-Proteinmenge. β -Aktin wurde als Ladekontrolle verwendet. n=3

vergleichbare Tendenzen zur Behandlung mit Wnt3a (Abb. 28). Es zeigte sich aber, dass die Aktivierung des Reporters durch Wnt10b etwas schwächer ausfällt als bei Wnt3a. Der hitzeinaktivierte Ligand hatte keinen Effekt auf die Reporteraktivität.

Die Untersuchung der Proteinexpression mittels Western Blot zeigte, dass es ligandenabhängig zu einem Anstieg von Nucleolin in den Leervektor transduzierten Zellen kam, jedoch nicht im Fall der NCL- Δ N transduzierten Zellen. Bei den Nucleolin transduzierten Zellen war der Anstieg durch Zugabe von Wnt10b schwächer.

Anhand der Detektion des Flag-Tags mittels Antikörper zeigte sich, dass die Expression des Transgens bei Nucleolin und Δ N Zellen in allen untersuchten Populationen vergleichbar war.

Die Behandlung der Zellen mit Wnt10b führte wie bei Wnt3a zu einem dosisabhängigen Anstieg der mRNA Transkripte von *NCL*, *TCF7L2*, *CCND1* und *c-Myc* (Abb. 31). Die Zugabe der hitzeinaktivierten Liganden zeigte keinen Effekt. Bei den Nucleolin- Δ N

transduzierten Zellen gab es erneut kaum einen Effekt durch die Transduktion des Transgenes und ebenfalls keine Änderung der Expressionen durch Zugabe von Wnt10b. Die Transduktion mit pCDH-T2A-Nucleolin hingegen zeigte wieder wie erwartet eine deutliche Steigerung der Expression von Nucleolin, welche durch Zugabe von Wnt10b kaum weiter zunahm. Die Expression der Zielgene *TCF7L2*, *c-Myc* und *CCND1* wurde ebenfalls deutlich gesteigert (Abb. 31). Bei allen Faktoren zeigte sich nur eine weitere leichte Wnt10b abhängige Expressionssteigerung. Die Behandlung mit dem hitzeinaktivierten Liganden hatte keinen Einfluss auf die Expression der Zielgene.

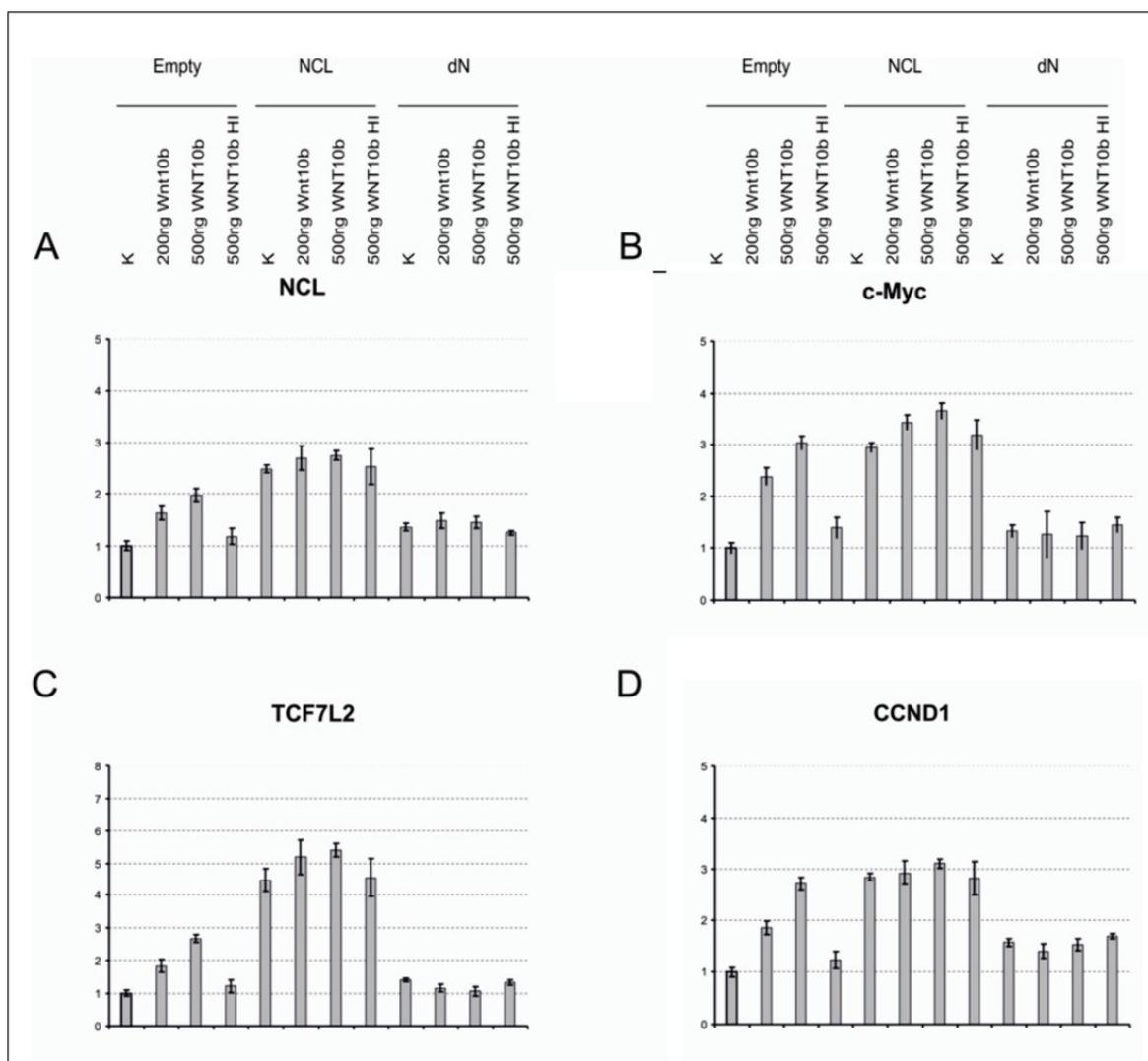


Abb. 31 qRT-Analysen in Mutz-2 Zellen nach Nucleolin-Überexpression und Wnt10b-Behandlung
Mutz-2-Zellen stabil transduziert mit pGreenFire TCF RE oder pGreenFire control wurden lentiviral mit pCDH-T2A- Δ Lngfr Konstrukten transduziert, die für Nucleolin, Nucleolin- Δ N oder nur Lngfr kodierte, und nach 96h mit den angezeigten Mengen Wnt10b behandelt. Anschließend wurde RNA isoliert und auf die Expression von *NCL*, *c-Myc*, *TCF7L2* und *CCND1* (A-D) untersucht. Die Expressionswerte wurden auf β -Aktin normalisiert. n=3

Zusammenfassend zeigten beide Experimente, dass Nucleolin einen aktivierenden Effekt auf den kanonischen Wnt Signalweg hat und dass der additive Effekt durch Gabe der Wnt Liganden deutlich schwächer ist als in Leervektor transduzierten Zellen.

Um weiterführend die Frage zu klären, ob die Überexpression von Nucleolin in Abwesenheit kanonischen Liganden den Wnt Reporter aktivieren kann wurde das rekombinante FZD8-FC Protein verwendet.

4.2.8 Einfluss von Nucleolin bei FZD8- Gabe

Zur Untersuchung des Effektes von Nucleolin auf Mutz-2 Zellen bei gleichzeitiger Gabe von FZD8-FC wurden pGreen Fire TCF Reporter Mutz-2 Zellen oder die zugehörigen Reporter-Kontrollzellen mit pCDH-Expressionsplasmiden (T2A-Empty/NCL/NCL- Δ N- Δ Lngfr) transduziert. Die Zellen wurden daraufhin für 48h ohne konditionierten Überstand der Zelllinie 5637 kultiviert um die Wnt-Aktivität auf ein Basallevel zu bringen. Anschließend wurden 25% 5637-Überstand und die angegebenen Mengen FZD8-FC zugegeben und die Zellen nach 24h analysiert. Es wurde der Quotient aus der Aktivität der Wnt Reporter-Zelllinie und der Kontrollzelllinie gebildet und dieser auf die Leervektorkontrolle normalisiert. Es zeigte sich, dass in den Leervektor transduzierten Zellen die Luciferase-Reporteraktivität durch die Zugabe von FZD8-FC reduziert wurde und bei Behandlung mit 1000 ng FZD8-FC auf 40% der Kontrolle sank (Abb. 32). Die Zugabe von 2000 ng FZD8-FC hatte keine weitere Reduktion zu Folge. Die Transduktion mit Nucleolin zeigte einen ca. 2,5 fachen Signalanstieg gegenüber den Leervektorzellen. Durch die Zugabe von FZD8-FC wurde die Aktivität des Reporters kaum reduziert. Die mit Nucleolin- Δ N transduzierten Zellen verhielten sich ähnlich wie die Leervektorkontrolle.

Die Analyse der Proteinexpressionen von ABC und TCF4 zeigte in pCDH-Empty-Zellpopulationen eine Abnahme der Proteinmenge abhängig von FZD8-FC (Abb. 32). Weiterhin nahm die Phosphorylierung der GSK3 β ab, wodurch das Enzym verstärkt aktiv vorlag. Die Nucleolin Proteinmenge nahm bei Zugabe von rekombinantem FZD8-FC dosisabhängig ab. Durch die Zugabe von 2000 ng FZD8-FC erzielte man keine weitere Reduktion der Proteinexpression. Bei den pCDH-NCL- Δ N transduzierten Zellen zeigte sich ein vergleichbarer Verlauf wie bei den Leervektor-transduzierten Zellen. Dieses Ergebnis passte zu den Reporteranalysen. Die pCDH-NCL transduzierten Zellen hingegen zeigten eine Verdopplung der Signalstärke für Nucleolin, ABC, pGSK3 β Ser9 und TCF4. Weiterhin änderte sich die Proteinmenge der besagten Proteine durch die Behandlung mit FZD8-FC

kaum. Die Expression der GSK3 β war unverändert und vergleichbar mit der Leervektorkontrolle und Δ N-Nucleolin transduzierten Zellen.

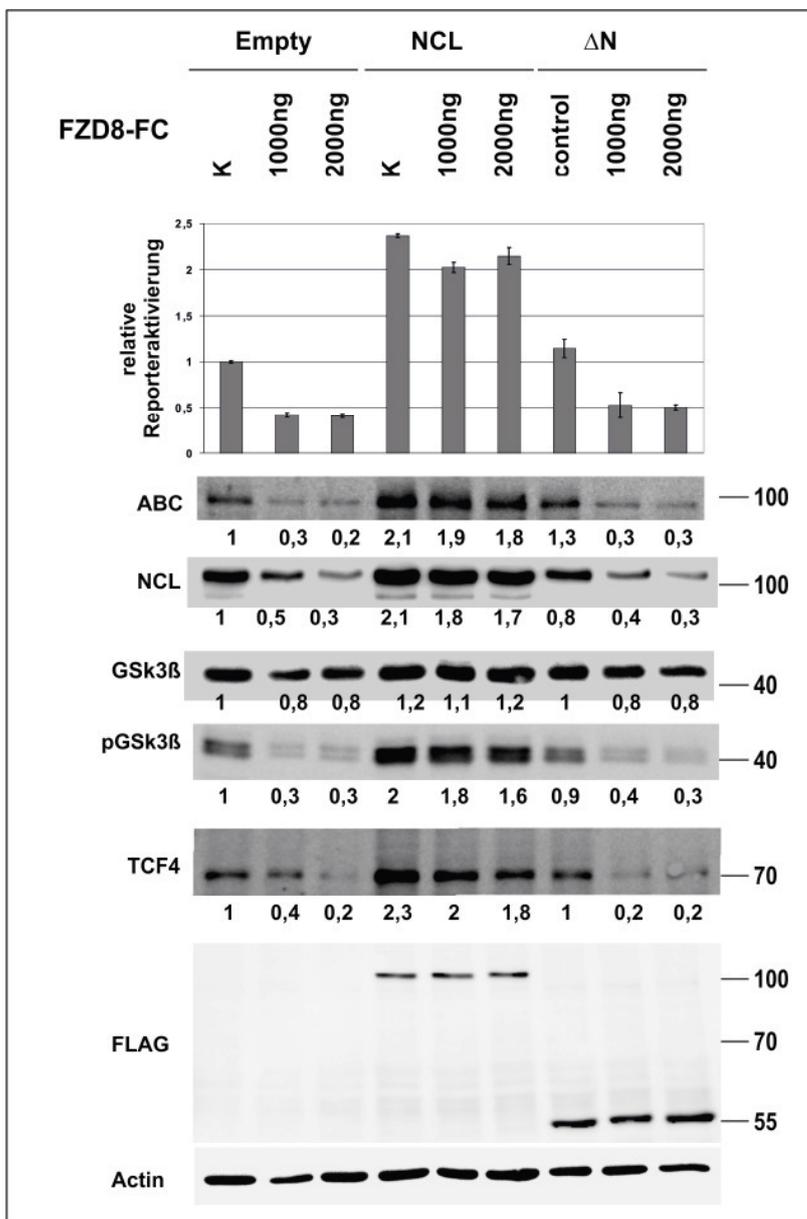


Abb. 32 Einfluss von FZD8-FC auf Nucleolin transduzierte Mutz-2 Zellen

Mutz-2-Zellen stabil transduziert mit pGreenFire TCF RE oder pGreenFire control wurden lentiviral mit pCDH-T2A- Δ Lngfr Konstrukten transduziert, die für Nucleolin, Nucleolin- Δ N oder nur Lngfr kodierten. Nach einer 48h Kultivierung ohne 5637-Überstand wurden 25% desselben und die angegebenen Mengen FZD8-FC für 24h zugegeben. Anschließend wurde die Reporterogenaktivität analysiert und der Quotient in Relation zur pGreen control Population gebildet. Weiterhin wurde die Änderung der Proteinexpression von aktivem β -Catenin (ABC), Nucleolin, GSK3 β , pGSK3 β und TCF4 analysiert. Der Western Blot gegen das FLAG-Epitop diente dem Nachweis des exogen eingebrachten Proteins. Als Ladekontrolle wurde β -Aktin analysiert. Die Bandenstärke wurde densitometrisch ausgewertet und die relativen Werte dargestellt. n=3

Auf Transkriptebene zeigte sich, dass FZD8-FC die Expression von *TCF7L2*, *c-Myc* und *CCND1* dosisabhängig in Empty-Zellen reduzierte (Abb. 33). Gleiches galt für die Expression von Nucleolin.

Die Nucleolin- Δ N transduzierten Zellen zeigten ebenfalls diesen Verlauf. Die Nucleolin transduzierten Proben hingegen zeigten eine deutlich stärkere Expression der genannten Faktoren verglichen mit den pCDH-Empty- oder Nucleolin- Δ N- Kontrollzellen und es kam auch nicht zu einer schwächeren Reduktion der Transkripte durch FZD8-FC.

Diese Ergebnisse bestätigten, dass Nucleolin unabhängig von kanonischen Wnt Liganden agieren und den Signalweg aktivieren kann. Nucleolin- Δ N hingegen konnte den Signalweg nicht aktivieren.

Aufgrund dieser Erkenntnisse stellte sich nun die Frage, wie und an welchen Punkten Nucleolin in den Signalweg eingreift und diesen reguliert. Als mögliches Ziel der Nucleolin abhängigen Regulation des Signalweges wurde das Gen TCF7L2 gewählt.

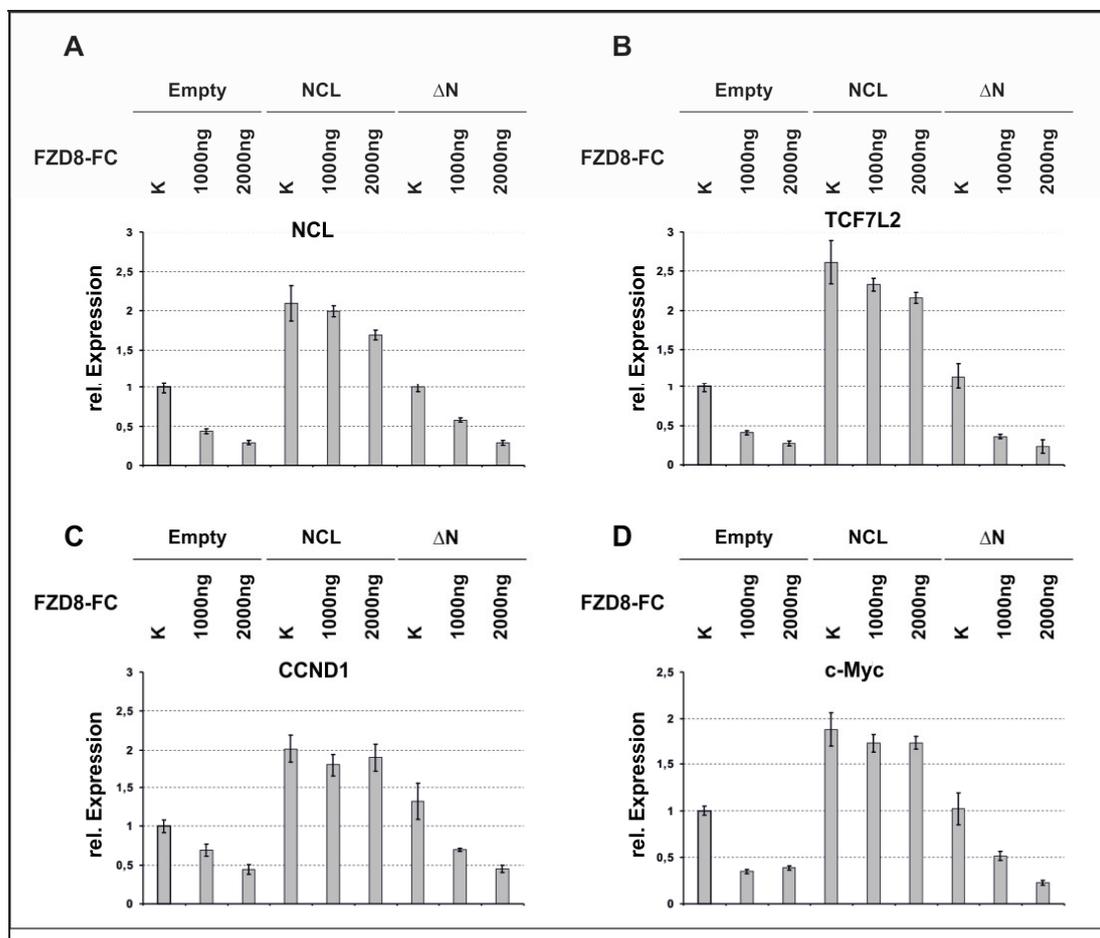


Abb. 33 Einfluss von FZD8-FC auf Nucleolin transduzierte Mutz-2 Zellen und Analyse mittels qRT-PCR
Mutz-2 Green TCF oder pGreen control wurden mit Nucleolin Expressionsplasmiden transduziert und nach einer 48h Kultur ohne 5637-Überstand mit 25% desselben und den angegebenen Mengen FZD8-FC für 24h behandelt. Anschließend wurde die mRNA Expression von *NCL*, *TCF7L2*, *CCND1* und *c-Myc* (A-D) analysiert und auf β -Aktin normalisiert. n=3

4.3 Untersuchung der TCF7L2 Genregulation

4.3.1 Untersuchung der TCF7L2 Promotoraktivierung durch Wnt Liganden

Um zu überprüfen ob die in vorherigen Experimenten gefundene Zunahme von TCF4 auf eine Wnt abhängigen Promotoraktivierung beruht (Abb. 21), wurde der TCF7L2 Promotor in ein Luciferase-Reporterkonstrukt kloniert, dieses in Mutz-2 Zellen nukleofiziert und mit ansteigenden Mengen Wnt3a sowie der höchsten äquivalenten Menge Wnt5a behandelt. Nach 24h wurden die Zellen für die Analyse mittels Luciferase-Assay und Western Blot geerntet.

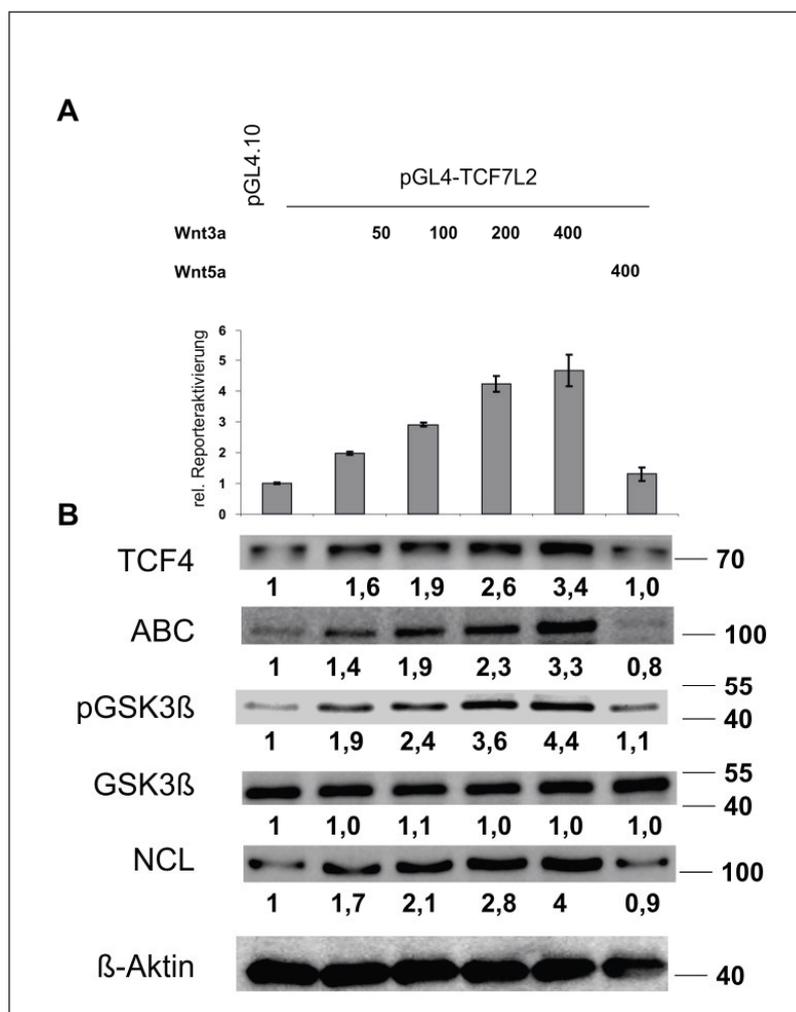


Abb. 34 Einfluss von Wnt3a und Wnt5a auf die TCF7L2 Promotoraktivität

Mutz-2 Zellen wurden mit dem pGL4 Leervektor oder dem pGL4-TCF7L2-Reporter nukleofiziert und für 24 h mit den angegebenen Mengen Wnt3a oder Wnt5a behandelt. Anschließend wurde die Reporteraktivität mittels Luciferasemessung bestimmt und Western Blot Analysen von Komponenten des Wnt Signalweges durchgeführt. n=4

Dabei zeigte sich, dass der TCF7L2 Promotor dosisabhängig durch Wnt3a aktiviert wurde

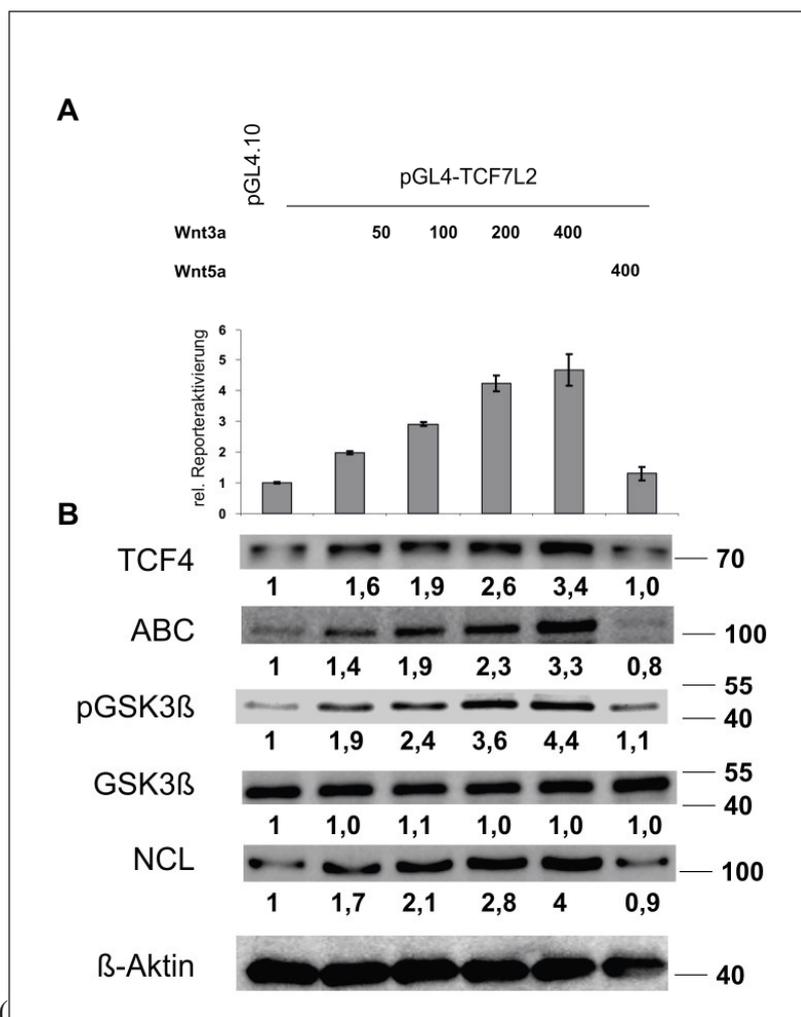


Abb. 34A). Die Zugabe von Wnt5a in der höchsten verwendeten Konzentration hatte keinen Einfluss auf die Reporteraktivität. Die durchgeführten Kontrollen mittels Western Blot (Abb. 34B) waren vergleichbar zu vorherigen Ergebnissen (Abb. 21). So wurde der Signalweg durch Wnt3a jedoch nicht durch Wnt5a Gabe aktiviert.

Somit zeigten diese Ergebnisse, dass das TCF7L2 Promotor-Reporterkonstrukt in gleicher Weise wie der nur auf TCF Bindemotiven beruhende Wnt-Reporter und vergleichbar zu dem TCF4 Protein aktiviert wurde. Zur weiteren Untersuchung der Interaktion von Nucleolin mit diesem Promotor wurden ChIP Experimente durchgeführt.

4.3.2 Analyse der Bindung von Nucleolin an den TCF7L2 Promotor mittels ChIP

Da Nucleolin in den vorhergegangenen Experimenten den kanonischen Wnt Signalweg unabhängig von der Zugabe von Liganden Aktivierung die die Expression von TCF7L2 gesteigert hatte (Abb. 29), wurde nun der Einfluss auf den Promotor von TCF7L2 untersucht.

Dieser enthält zwei putative Nucleolin Bindemotive weshalb eine direkte Bindung von Nucleolin an den Promotor möglich ist. Zur Überprüfung ob Nucleolin den TCF7L2-Promotor in nicht manipulierten Zellen bindet, wurden ChIP Analysen durchgeführt. Dazu wurde Formalin fixiertes Chromatin von primären CD34⁺ Zellen, sowie von Mutz-2 Zellen für die Präzipitation mit Nucleolin Antikörper eingesetzt. Als Kontrollen wurden zum einen der Antikörper nach Preinkubation mit dem Immunisierungspeptid verwendet, und zum anderen Ansätze mit einem nicht-Nucleolin (EGFR) gerichteten Kontrollantikörper und Beads ohne Antikörper. Die Präzipitate und die Input Probe wurden für qPCRs gegen eine Sequenz des TCF7L2 Promotors und eine im Intron 3 befindliche Kontrollsequenz verwendet. Die Anreicherung wurde in Relation zu der Probe mit nicht Nucleolin gerichtetem (EGFR)-Antikörper berechnet.

Die Präzipitation des Chromatins von primären CD34⁺ Zellen zeigte eine deutliche Anreicherung der TCF7L2-Promotorsequenz bei den Proben mit Nucleolin Antikörper (Abb. 35A). Bei Proben wo der Antikörper vor der Präzipitation mit dem Immunisierungspeptid blockiert wurde (NCL+ Peptid) kam es zu keiner Präzipitation der Promotorsequenz. Gleiches galt für die Proben mit nicht Nucleolin spezifischem Antikörper oder Beads ohne Antikörper. Die elektrophoretische Auftrennung bestätigte die Ergebnisse der qPCR (Abb. 35B). Die Amplifikation der Kontrollsequenz zeigte keine Anreicherung und das Agarosegel zeigte nur bei der Input-Probe ein Produkt.

Für Mutz-2 Zellen zeigte die Analyse ebenfalls eine deutliche Anreicherung der Promotorsequenz durch den Nucleolin Antikörper, wohingegen die Kontrollen diese Anreicherung nicht zeigten (Abb. 35C-D).

Die Ergebnisse ließen darauf schließen, dass Nucleolin den TCF7L2 Promotor selber bindet. Aufgrund der vorhandenen Bindemotive und der Ergebnisse der ChIP Analysen resultierte die Frage, ob NCL ohne Kofaktoren in der Lage Die Bindemotive des TCF7L2-Promotors zu binden. Dazu wurden EMSA-Analysen mit rekombinantem GST-Nucleolin²⁸⁸⁻⁷⁰⁹ durchgeführt.

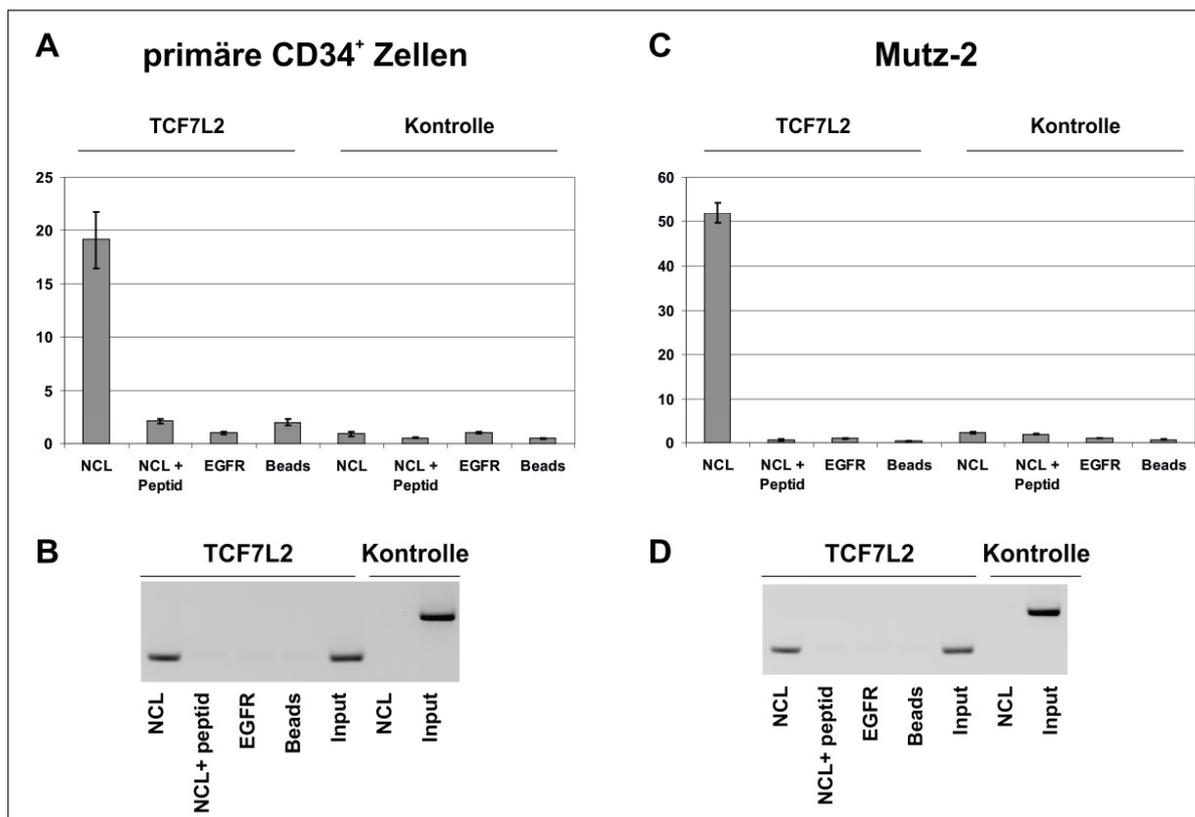


Abb. 35 ChIP Analysen des TCF7L2 Lokus in CD34⁺ Zellen und Mutz-2 Zellen

CD34⁺ HPZ und Mutz-2 Zellen wurden mit 1% Formalin gecrosslinked, das Chromatin mittels Ultraschall fragmentiert und die Proben für Immunpräzipitationen mit Nucleolin Antikörpern oder den genannten Kontrollproben verwendet. **A**) Relative Anreicherung bezogen auf die EGFR Probe in CD34⁺ Zellen dargestellt mit Standardabweichung **B**) zugehöriges Agarosegel der Amplifikate **C**) Relative Anreicherung bezogen auf die EGFR Probe für Mutz-2 Zellen dargestellt mit Standardabweichung **D**) Agarosegel der Amplifikate. Die CD34⁺HPZ wurden von Herrn Sanil Bhatia zur Verfügung gestellt. n=3

4.3.3 Untersuchung der Bindung von Nucleolin an Zielsequenzen des TCF7L2 Promotors

Zur Untersuchung, ob die Bindung von Nucleolin über die im Promotor enthaltenen putativen Bindemotive vermittelt wird, wurden DNA-Oligonukleotide dieser Motive für Gelshift-Assays eingesetzt. Dazu wurde rekombinantes GST-Nucleolin²⁸⁸⁻⁷⁰⁹- oder GST-Protein verwendet. Diese wurden zusammen mit radioaktiv markierten Doppelstrangsonden der Bindemotive Binding Site A (BSA) und Binding Site B (BSB) unter Zusatz unspezifischer DNA Fragmente inkubiert und im Anschluss über ein natives Acrylamidgel aufgetrennt. Die Auswertung erfolgte mittels Autoradiographie. Eine Doppelstrangsonde des TCF/LEF Bindemotivs der Wnt Reporterkonstrukte wurde als Kontrolle auf unspezifische DNA Bindung verwendet, da diese durch Nucleolin nicht gebunden werden sollte.

Die ausgewertete Autoradiographie zeigte, dass Nucleolin-GST sowohl an das Bindemotiv BSA als auch BSB des TCF7L2 Promotors bindet, die GST Kontrolle hingegen nicht (Abb. 36). Die Probe mit einem dreifachen TCF-Erkennungsmotiv (TCF) wurde als Spezifitätskontrolle verwendet, da dieses Motiv nur durch TCF-Faktoren jedoch nicht durch

Nucleolin gebunden werden sollte. Wie erwartet zeigte sich keine Komplexbildung, was wiederum für die Spezifität der Bindung an BSA und BSB sprach.

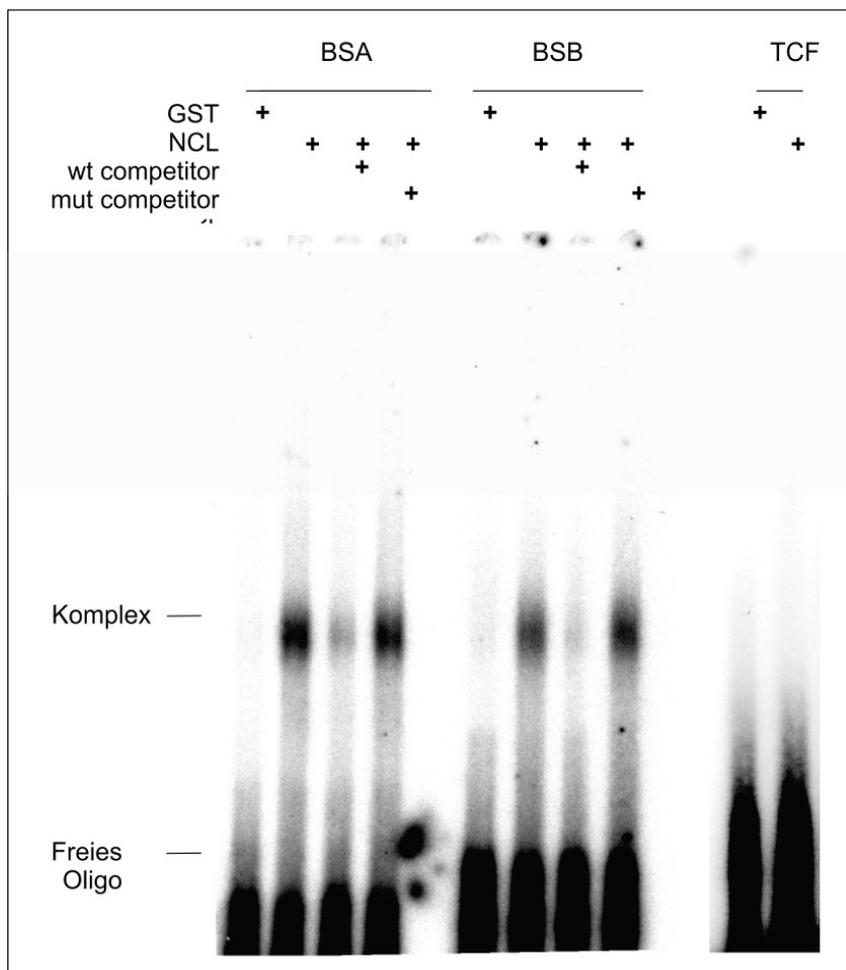


Abb. 36 Untersuchung der Bindung von Nucleolin an Motive des TCF7L2 Promotors

Zur Analyse der Bindung von Nucleolin an die Sequenzmotive wurden doppelsträngige radioaktive Oligos mit den putativen Bindemotiven BSA und BSB sowie als Negativkontrolle eine dreimalig wiederholte TCF-Bindesequenz (TCF) für Bindungsreaktionen mit rekombinantem GST-Nucleolin²⁸⁸⁻⁷⁰⁹- oder GST-Protein eingesetzt. Zur weiteren Kontrolle der Spezifität der Bindung wurden die Reaktionen mit einem Überschuss nicht radioaktiv markierter Sonden mit (= wt competitor) und ohne Bindemotiv (= mut competitor) kompetitiert. Nach erfolgter Inkubation und Auftrennung auf einem nativen Acrylamidgel wurde das Gel getrocknet und autoradiographiert.

Durch Zugabe eines Überschusses nicht-radioaktiver Doppelstrangsonden mit und ohne Nucleolin Bindemotiv wurde die Spezifität der Bindung bestätigt, da die Sonden mit Bindemotiv durch kompetitive Bindung die radioaktiv-markierten Sonden verdrängten. Die Kompetitoren ohne Bindemotiv konnte die Komplexbildung nicht beeinflussen.

Somit zeigen die Ergebnisse des dargestellten EMSAs, dass die Bindung von Nucleolin über die Motive BSA und BSB vermittelt wird und diese Bindung sequenzspezifisch ist, da man das Signal nicht durch einen Überschuss des Oligos ohne Bindemotiv abschwächen konnte.

4.3.4 Analyse der TCF7L2 Promotoraktivierung mittels Luciferase-Assay

Zur weiteren Charakterisierung der Nucleolin-abhängigen Aktivierung wurde der TCF7L2-Luciferasereporter zusammen mit pCMV-Empty/NCL/NCL- Δ N Expressionskonstrukten in

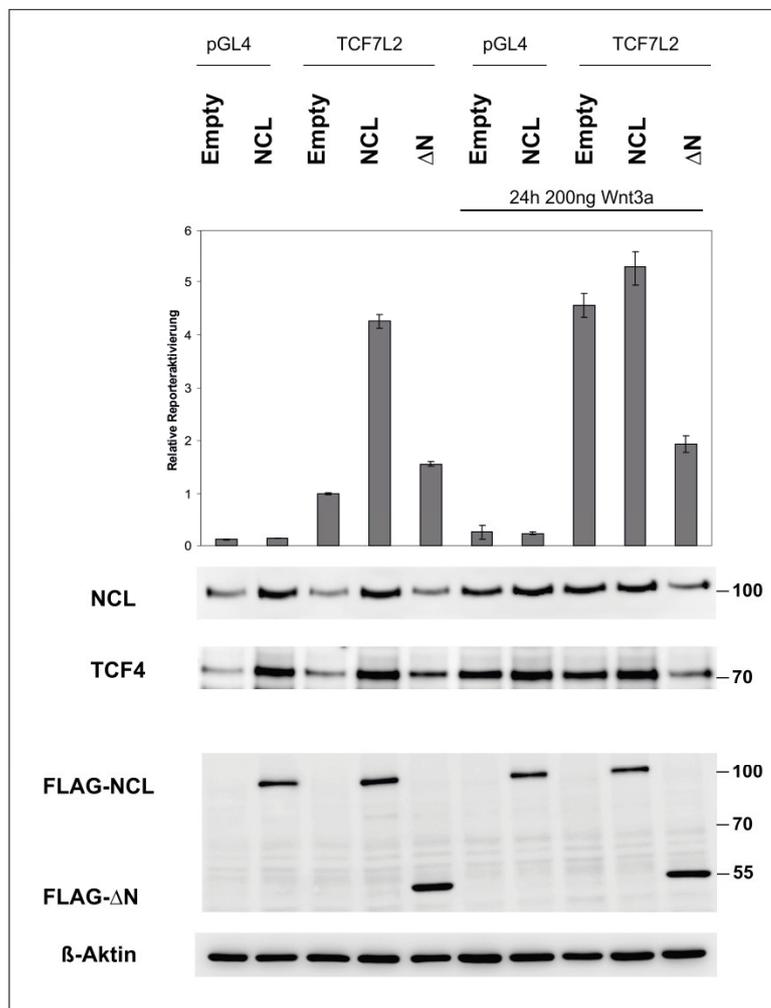


Abb. 37 Analyse der TCF7L2 Reporteraktivierung in Mutz-2

Mutz-2 Zellen wurden mit TCF7L2 Reporter- und Nucleolin Expressionskonstrukten nukleofiziert, zum Teil mit Wnt3a behandelt und nach 24h die Reporteraktivität bestimmt. Weiterhin wurde die Expression des Flag-Transgens sowie des endogenen Nucleolins und TCF4 mittels Western Blot bestimmt. β -Aktin diente als Ladekontrolle. n=4

Mutz-2 Zellen nukleofiziert. Dabei diente der Expressionsleervektor der Erfassung der Aktivierung durch endogene Faktoren und der pGL4.10 Reporter der Abschätzung der Basalaktivität des Reporters. Es zeigte sich, dass in Mutz-2 Zellen der TCF7L2 Reporter schon alleine durch endogene Faktoren aktiviert wurde, da das Signal des pGL4-TCF7L2 Reporters ohne Nukleofektion von Nucleolin deutlich höher war als bei dem pGL4.10 Kontrollreporter (Abb. 37). Die Nukleofektion von Nucleolin steigerte das Signal nochmals deutlich verglichen mit Empty-nukleofizierten Zellen. Die Expression von Nucleolin- Δ N hingegen hatte keinen aktivierenden Effekt auf den Reporter. Zur Untersuchung, ob Nucleolin einen synergistischen Effekt auf die Zugabe von rekombinantem Wnt3a hat wurde ein

gleiches Probenet mit Wnt3a behandelt (200ng/ ml, 24h). Durch die Gabe von Wnt3a alleine kam es schon zu einer Aktivierung des Reporters. Eine zusätzliche Nukleofektion von Nucleolin zeigte keinen additiven Effekt. Das Nucleolin- Δ N Transgen hingegen war trotz starker Expression nicht in der Lage den Reporter zu aktivieren. Die Expression von exogenem Nucleolin in den pGL4 Kontrollpopulationen hatte keinen Einfluss auf die

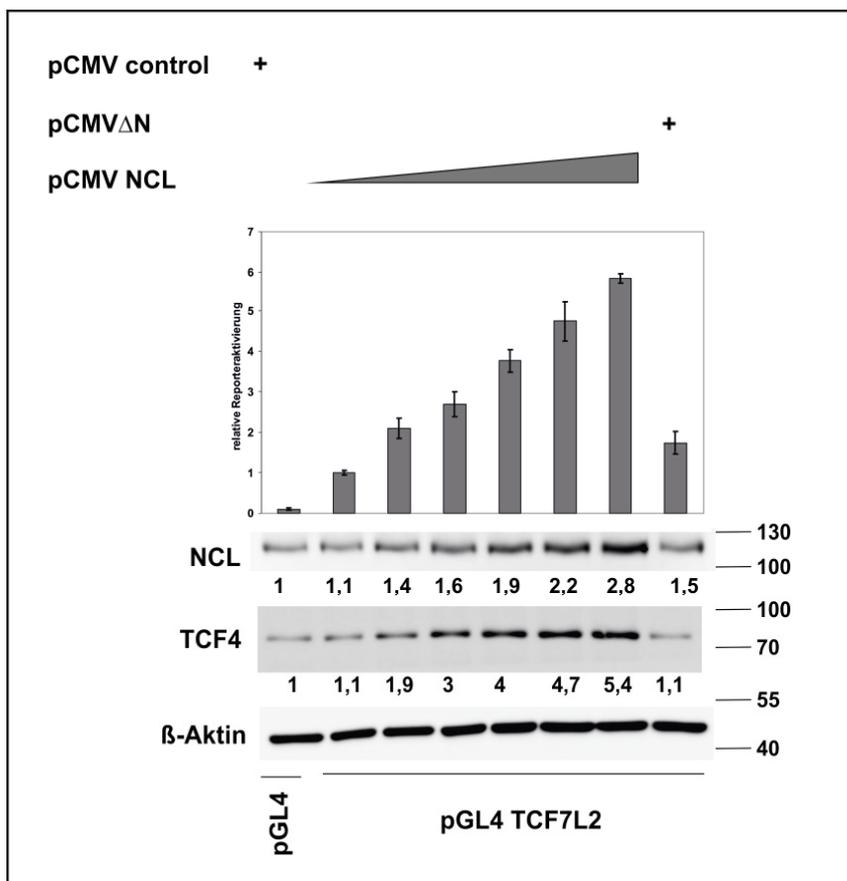


Abb. 38 Einfluss der Nucleolin Menge auf die TCF7L2 Promotoraktivierung

Mutz-2 Zellen wurden mit TCF7L2 Reporterplasmiden sowie ansteigenden Mengen Nucleolin Expressionskonstrukt (0µg, 0,2µg, 0,4µg, 0,6µg, 0,8µg, 1µg und 1,2µg pro Ansatz) nukleofiziert. Anschließend wurde die Reporteraktivität bestimmt und auf den Proteingehalt der Probe normalisiert. Weiterhin wurde die Expression von Nucleolin und TCF4 mittels Western Blot bestimmt. n=4

Aktivierung der Reporteraktivität. Die Expression von TCF4 wurde analog zur Reporteraktivierung durch das Transgen Nucleolin gesteigert.

In einem zweiten Experiment wurde untersucht, ob die Aktivierung des Promotors durch Nucleolin allein von der Proteinmenge abhängt. Dazu wurden die Zellen mit einer ansteigenden Menge an Nucleolin Expressionsplasmid und dem TCF7L2 Reporter oder pGL4.10 nukleofiziert. Nach 24 h wurde die Reporteraktivität, sowie der aus der Transfektion resultierende Nucleolin Gehalt analysiert.

Die Analyse der Luciferase-Reporteraktivität zeigte eine dosisabhängige Steigerung des Signals, was für eine Nucleolin-abhängige Aktivierung spricht (Abb. 38). Der aus den

gleichen Proben erstellte Western Blot zeigte ebenfalls eine Zunahme von Nucleolin Protein in den Zellen in Relation zur nukleofizierten Proteinmenge. Die Analyse des vom TCF7L2 regulierten Proteins TCF4 zeigte, dass dieses parallel zu Nucleolin zunahm. Dies zeigte, dass Nucleolin nicht nur den Luciferase-Reporter dosisabhängig aktiviert, sondern dadurch auch die Expression des Proteins erhöhte.

Somit zeigten die vorliegenden Ergebnisse, dass Nucleolin den TCF7L2 Promotor nicht nur binden, sondern auch aktivieren konnte. Da im Promotor putative Bindemotive vorhanden waren die von Nucleolin in EMSA Analysen gebunden wurden (vgl. 4.3.3), sollte durch selektive Deletion dieser deren Rolle für die Nucleolin vermittelte Aktivierung untersucht werden.

4.3.5 Einfluss der Deletion von Nucleolin Bindemotiven auf die Promotoraktivierung

Zur Analyse der Bedeutung der putativen Nucleolin Bindemotive für die Aktivierung des Reporters, wurden diese mittels Overlap-Extension-Mutagenese selektiv aus der Sequenz des TCF7L2 Reporters entfernt und die so entstandenen Einzel- und Doppelmутanten mit Nucleolin Expressionsplasmiden in Mutz-2 nukleofiziert. Zur Untersuchung, ob eine Aktivierung des Promotors über Wnt3a noch möglich war, wurde ein paralleler Ansatz mit Zugabe von Wnt3a durchgeführt.

Dabei zeigte sich, dass die Deletion der Bindestelle BSA oder BSB die endogene Aktivität des Reporters deutlich reduzierte, jedoch die Aktivität nicht komplett verschwand (Abb. 39). Ebenso waren diese Reporter mit Einzeldelation durch Nucleolin kaum aktivierbar. Die Deletion beider Bindestellen im TCF7L2 Reporter führte zu einer weiteren Reduktion der Aktivität durch endogene Faktoren. Ebenso war dieses Konstrukt nicht mehr durch Nucleolin aktivierbar.

In parallel durchgeführten Ansätzen, die für 24 Stunden mit 200 ng/ml Wnt3a behandelt wurden zeigte sich, dass ohne Nukleofektion von Nucleolin die Aktivität des Reporters deutlich gesteigert war. Durch Überexpression von Nucleolin wurde die Aktivität nur wenig verstärkt. Die Aktivität der Einzeldelationsmutanten war ebenfalls höher als bei der Probe ohne Wnt3a. Es zeigte sich jedoch, dass die Aktivierung durch Wnt3a deutlich schwächer war als im Reporter mit Wildtyp-Sequenz. Die Zugabe von Nucleolin konnte in beiden mutierten Reportern die Aktivität kaum steigern. Die Doppelmутante (Δ BSA+B) wurde ebenfalls durch Wnt3a aktiviert, jedoch scheint es, dass der Promotor ohne die Bindung von Nucleolin auch durch den Liganden nicht effizient aktiviert werden kann.

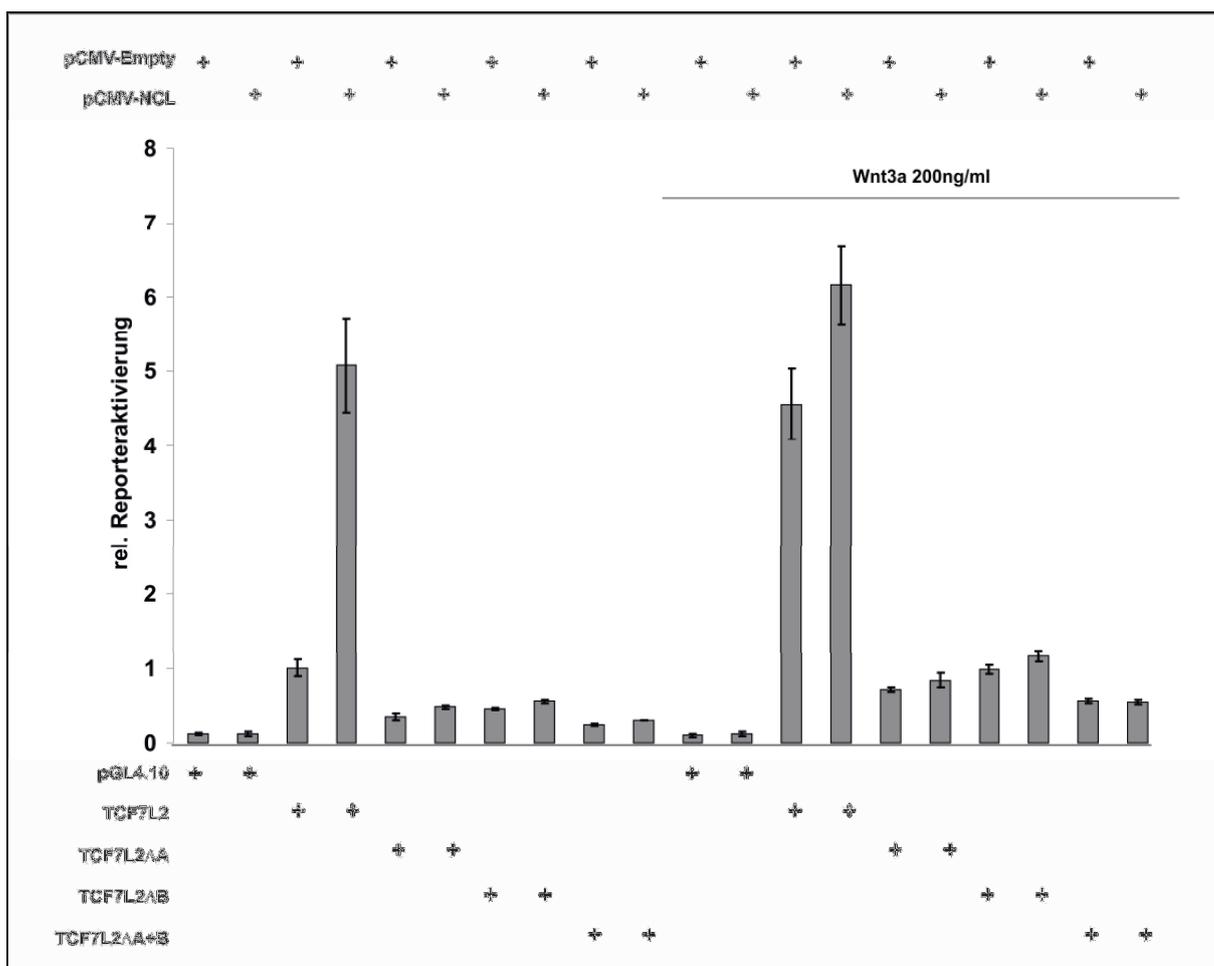


Abb. 39 Analyse des TCF7L2 Reporters mit Deletionen putativer Nucleolin Bindemotive in Mutz-2 Zellen
 Putative Nucleolin Bindemotive wurden mittels Overlap-extension- Mutagenese deletiert und die Konstrukte zusammen mit Nucleolin in Mutz-2 Zellen nukleofiziert. Ein gleicher Ansatz wurde 24 h mit der angegebenen Wnt3a-Menge behandelt. Anschließend wurden die Zellen geerntet und für Luciferase basierte Reporterassays verwendet (n=4).

Zusammengefasst zeigten die Ergebnisse, dass die Aktivierung des TCF7L2-Promotors durch Nucleolin über die putativen Bindemotive BSA und BSB realisiert wird. Eine Deletion dieser Motive führte dazu, dass die Aktivierung des Reporters durch endogene Faktoren deutlich geringer ausfiel und exogenes Nucleolin den Promotor kaum aktivieren konnte. Eine Deletion beider Motive führte zum kompletten Verlust der Aktivierung durch Nucleolin und auch die Aktivierung durch endogene Faktoren geht verloren. Die Zugabe von Wnt3a aktivierte den Promotor unabhängig von Nucleolin, jedoch sorgte die Deletion der Bindemotive dafür, dass die Wnt3a abhängige Signalkaskade den Promotor nicht mehr so effizient aktivierte wie bei einem nicht mutierten Konstrukt.

5 Diskussion

Die vorliegende Doktorarbeit über die Rolle von Nucleolin in leukämischen Zelllinien und primären CD34⁺ Zellen befasst sich zum einen mit der Rolle von Nucleolin bei der Regulation der Isoform CD1331A und zum anderen dem möglichen Einfluss von Nucleolin auf den kanonischen Wnt Signalweg.

5.1 *Nucleolin bindet den CD133 P1 Promotor in hämatopoetischen Zellen*

Das Protein Nucleolin ist in hämatopoetischen Stamm- und Progenitorzellen angereichert und kann über Bindung spezifischer DNA Motive Zielgene direkt aktivieren. Für den Stammzellmarker CD34 wurde gezeigt, dass es eine Nucleolin abhängige Regulation über Bindemotive in der Promotorsequenz gibt und dass eine Deletion dieser Motive die Nucleolin abhängige Aktivierung aufhebt (Grinstein *et al.*, 2007).

Neben CD34 kann CD133 als weiterer Marker solcher Zellen angesehen werden. Die Arbeit von Shmelkov und Kollegen zeigte, dass es verschiedene Isoformen von CD133 gibt, die gewebespezifisch durch alternative Promotoren reguliert werden (Shmelkov *et al.*, 2003). In hämatopoetischen Zellen kommt es präferentiell zur Expression der Isoform 1A, die vom CD133P1 Promotor reguliert wird. Eine Untersuchung der CD133 P1-Promotorsequenz zeigte, dass auch in diesem Nucleolin-Bindemotive vorhanden sind. Um nun zu untersuchen ob Nucleolin die Expression von CD133 in ähnlicher Weise wie im Falle von CD34 beeinflussen kann, wurde Nucleolin in Mutz-2 und SEM Zellen überexprimiert. Sowohl für die AML-abgeleitete Zelllinie Mutz-2 als auch für die ALL-abgeleitete Zelllinie SEM ist bekannt, dass sie CD133 exprimieren. Untersucht wurde in diesen Systemen die Isoform CD1331A, deren Promotor putative Bindemotive für Nucleolin enthält, sowie die Isoform CD1331B, deren Promotor nicht über solche Sequenzen verfügt.

Die Überexpression von Nucleolin in den beiden untersuchten Zelllinien führte zu einer deutlichen Zunahme der CD133 Expression, wobei die Isoform 1A den Großteil der Transkriptzunahme ausmachte (Abb. 10 und Abb. 11). Zur Untersuchung ob das gesamte Protein für die Aktivierung des Promotors benötigt wird, wurde die N-terminale Deletionsmutante Nucleolin-ΔN verwendet. Dieser fehlt die putative transaktivierende Domäne des N-Terminus. Die Transduktion der Nucleolin-ΔN Mutante führte zu keiner Zunahme der Transkriptmengen von CD133. Die folgende Untersuchung der Promotorbindung durch Nucleolin mittels CHIP in Mutz-2, SEM und primären CD34⁺ Zellen ergab, dass Nucleolin

den CD133 P1 Promotor direkt bindet (Abb. 12 und Abb. 13). Da es weder in der Kontrolle mit blockiertem Nucleolin Antikörper, noch in der Präzipitation mit unspezifischem Antikörper zu einer Amplifikation der Zielsequenz kam, kann diese Bindung als spezifisch durch Nucleolin angesehen werden. Der CD133 P2 Promotor hingegen, welcher die Isoform 1B reguliert, wurde in keinem der verwendeten Zellsysteme durch Nucleolin Präzipitation angereichert. Diese Ergebnisse zeigen, dass Nucleolin die Expression der Isoform CD1331A jedoch nicht 1B reguliert und eine direkte Promotorbindung nachweisbar war.

5.2 Nucleolin bindet und aktiviert den CD133P1 Promotor über spezifische Bindesequenzen

Da die Aktivierung des Promotors sowie die Bindung durch Nucleolin gezeigt werden konnte, sollte untersucht werden, ob es sich um eine direkte Aktivierung handelt. Reporterexperimente, bei denen die Luciferaseaktivität unter Kontrolle des CD133 P1 Promotors stand, zeigten, dass Nucleolin jedoch nicht Nucleolin- Δ N den Reporter aktivieren konnte und dieser Effekt dosisabhängig war (Abb. 14 und Abb. 15). Die Deletion von jeweils zwei der Bindemotive im CD133 P1 Reporterkonstrukt führte zu einem kompletten Verlust der Nucleolin abhängigen Promotoraktivierung, sowohl durch endogenes Protein als auch im Falle einer Überexpression (Abb. 16 und Abb. 17).

Diese Ergebnisse zeigen, zusammen mit den Ergebnissen der ChIP, dass Nucleolin den CD133 P1 Promotor über spezifische DNA-Motive bindet und die Transkription des Gens positiv reguliert. Die Bindungsanalysen mittels kompetitiven EMSA zeigten die Bindung an das radioaktive Doppelstrangmotiv, wobei die Zugabe des nicht radioaktiv markierten Oligos mit Bindemotiv das radioaktive Signal drastisch abschwächte (Abb. 18). Da rekombinantes Volllänge- Nucleolin nicht in Bakterien exprimierbar ist wurde die Nucleolin- Δ N²⁸⁸⁻⁷⁰⁹ Variante für diese Experimente verwendet. Das Experiment zeigt somit, dass Nucleolin ohne die Anwesenheit weiterer Faktoren Bindemotive des CD133 P1 Promotors binden kann, und das im N-Terminus die transaktivierende Domäne liegt, da das trunkierte Protein die Sequenz im EMSA binden, jedoch nicht im Reporterassay aktivieren kann. Zusammengefasst zeigen die Ergebnisse, dass Nucleolin den CD133 P1 Promotor direkt und ohne die Notwendigkeit anderer Proteine bindet und durch spezifische Bindemotive aktiviert. Dabei benötigt man für die Aktivierung die gesamte Proteinsequenz, wohingegen die Bindung der DNA Motive durch die N-terminale Mutante möglich war.

5.3 Die Implikation von Nucleolin im kanonischen Wnt Signalweg

Neben der verstärkten Expression von Nucleolin in primären CD34⁺- und leukämischen Zellen verglichen mit CD34⁻ Zellen des peripheren Blutes wurde gezeigt, dass der kanonische Wnt Signalweg für diese Zellen essentiell ist und den undifferenzierten Phänotyp begünstigt (Ko *et al.*, 2011; Ysebaert *et al.*, 2006). So ist die starke Aktivierung des kanonischen Wnt Signalweges wichtig für die Leukämogenese und Fusionsproteine, entstanden durch Translokationen, können diesen Signalweg stimulieren (Müller-Tiedow *et al.*, 2004). Im zweiten Teil dieser Arbeit sollte ein möglicher Zusammenhang zwischen Nucleolin und dem kanonischen Wnt-Signalweg analysiert werden.

Der kanonische Wnt-Signalweg ist ein wichtiger Regulator für die Aufrechterhaltung eines undifferenzierten Phänotyps in hämatopoetischen Stammzellen (Reya *et al.*, 2003). Bei diesem Signalweg bindet ein sekretierter Ligand, beispielsweise Wnt3a oder Wnt10b an das Rezeptorpaar Frizzled/LRP, wodurch als Resultat der Signalmediator β -Catenin in den Nukleus migriert und zusammen mit TCF/LEF Transkriptionsfaktoren die Expression von Zielgenen wie c-Myc, CyclinD1 oder TCF4 reguliert. Diese Gene tragen alle TCF/LEF Bindemotive in ihren Promotorsequenzen und sind klassische direkte Zielgene des Wnt Signalweges (He *et al.*, 1998; Schmidt-Ott *et al.*, 2007; Rother *et al.*, 2004).

So lange kein Ligand an das Rezeptorpaar gebunden hat, wird β -Catenin durch den Scaffold Komplex degradiert (siehe Abb. 4). Dies geschieht durch Bindung an Axin2 und APC und anschließende Phosphorylierung durch GSK3 β . Die Aktivität von GSK3 β wiederum wird durch eine Phosphorylierung am Ser9 reguliert.

Die AML-Zelllinie Mutz-2 benötigt zur Kultivierung die Zugabe von konditioniertem Zellkulturüberstand der Urothelkarzinomzelllinie 5637. Dieser enthält viele verschiedene Zytokine und Mitogene (Quentmeier *et al.*, 1997). In dieser Arbeit durchgeführte Analysen zeigten, dass ebenfalls deutlich messbare Konzentrationen der Wnt-Liganden Wnt3a, Wnt5a und Wnt10b im Überstand vorhanden waren (Vgl. 4.2.3). Die Zugabe von rekombinantem FZD8-FC Protein, einem eigentlich membranständigen Rezeptor der Wnt-Liganden, verhinderte durch Bindung der Liganden eine Aktivierung des Wnt-Signalweges (Abb. 19). Dabei war dieser Effekt abhängig von der Dosis des zugegebenen Proteins. Je weniger freier Ligand vorlag, desto geringer war die Aktivierung des Signalweges. So sank das Signal des aktiven β -Catenins deutlich, wie auch das TCF4-Signal. Gleichzeitig verringerte sich die Phosphorylierung der GSK3 β , wodurch diese vermehrt aktiv vorlag (Cross *et al.*, 1995). Dies deutet auf einen aktiven *Scaffold Komplex* hin, wodurch CTNNB1-Moleküle in der Zelle phosphoryliert und nach anschließender Ubiquitinierung abgebaut wurden. Das Signal für

Nucleolin-Protein sank ebenfalls dosisabhängig, was darauf hindeutete, dass der Wnt Signalweg dieses Protein beeinflusst. Die Analyse der Expression auf mRNA Ebene zeigte vergleichbare Tendenzen wie auf Proteinebene. So gab es eine dosisabhängige Reduktion der *CTNNB1*, *TCF7L2* und *NCL* Transkripte (Abb. 19B-E). Mehrere Studien der letzten Jahre konnten zeigen, dass die Zugabe von FZD8-FC oder vergleichbar agierender Agenzien über die Inhibition des kanonischen Wnt Signalweges zu einem verringerten Tumorwachstum führt und dass die Tumore so durch eine systemische Gabe gezielt zu behandeln sind (De Almeida *et al.*, 2008). Weiterhin wurde gezeigt, dass die Affinität des FZD8-FC für Wnt3a bei 3,6 nM liegt und damit 15 fach höher ist als für Wnt5a (50,4 nM; Bourhis *et al.*, 2010). Somit zeigt dieses Experiment, dass der kanonische Wnt Signalweg in Mutz-2 Zellen auf die Präsenz kanonischer Wnt Liganden angewiesen ist. Die mögliche Rolle des nicht-kanonischen Wnt5a konnte dabei nicht geklärt werden. In einem weiterführenden Experiment wurden Mutz-2 Zellen, die transgenes Nucleolin oder Nucleolin-ΔN exprimierten, mit FZD8-FC behandelt, um zu sehen ob eine Überexpression von Nucleolin einen Einfluss auf die Aktivität des Signalweges in Mutz-2 Zellen hat. Es zeigte sich, dass eine Überexpression von Nucleolin die FZD8-FC vermittelte Inaktivierung des Signalweges verhindern konnte (siehe Abb. 32). Dies war ein klarer Hinweis darauf, dass Nucleolin den Signalweg stimulieren kann und dieses *downstream* der Rezeptoraktivierung geschieht.

Neben der Depletion der Liganden durch rekombinantes FZD8-FC wurde untersucht, ob die Zugabe der rekombinanten Liganden einen additiven Effekt zum 5637-Überstand aufweist (vgl. 4.2.3). Die Zugabe der beiden kanonischen Wnt Liganden Wnt3a und Wnt10b führte dabei zu einer dosisabhängigen Steigerung der Expression von kanonischen Wnt Zielgenen, sowohl auf mRNA- als auch auf Proteinebene (Abb. 20). Der Effekt durch Wnt3a war dabei ausgeprägter als der durch Wnt10b, was für Unterschiede in den Aktivierungspotentialen der beiden Liganden spricht. Laut Literatur aktiviert Wnt10b neben klassischen Wnt Zielgenen regulative Komponenten anderer Signalwege, wozu Wnt3a nicht in der Lage ist. Somit zeigt sich, dass beide Liganden zwar den gleichen Signalweg ansteuern, aber doch eine unterschiedliche Antwort erzeugen (Mödder *et al.*, 2011).

Der Ligand Wnt5a zeigte erwartungsgemäß keinen direkten Einfluss auf die Expression von Komponenten oder Zielgenen des kanonischen Wnt Signalweges (Abb. 21). Neuere Arbeiten zeigen dass die Zugabe von Wnt5a den kanonischen Wnt-Signalweg so konditioniert, dass dieser auf nachfolgende Gaben von kanonischen Liganden besser reagieren kann (Okamoto *et al.*, 2014). Dieses Phänomen wurde in der vorliegenden Arbeit jedoch nicht untersucht. Man kann jedoch annehmen, dass die Präsenz beider Familien von Liganden im 5637-Überstand

für die undifferenzierte Kultur benötigt wird. Verschiedene Arbeiten zeigen, dass es bei der Differenzierung hämatopoetischer Stammzellen eher um ein Gleichgewicht der kanonischen und nicht-kanonischen Liganden geht, da Wnt5a beispielsweise proliferativ und differenzierend wirkt, Wnt10b hingegen den Stammzellcharakter bewahrt und die Proliferation durch den Faktor nicht stimuliert wird (Austin *et al.*, 1997; Van den Berg *et al.*, 1998). Die Aktivität des kanonischen Signalweges kann zudem abhängig von dem zellulären Kontext die Differenzierung von Stammzellen inhibieren oder die Proliferation von Progenitoren begünstigen (Reya *et al.*, 2003.; Congdon *et al.*, 2008).

Somit zeigen diese Ergebnisse, dass Nucleolin ein Zielgen des kanonischen Wnt-Signalweges darstellt und mit dem Wnt-Signalweg in Zusammenhang gebracht werden kann.

5.4 Nucleolin ist essentiell für den Wnt vermittelten Signalweg

Zur Adressierung der Frage, in wieweit sich die Signalweitergabe im kanonischen Wnt Signalweg nach Wegfall von Nucleolin ändert, wurden Mutz-2 Zellen lentiviral mit Nucleolin-shRNA-Konstrukten oder entsprechenden Kontrollkonstrukten transduziert, selektioniert und die Zellen mit unterschiedlichen Mengen Wnt3a behandelt. Im Anschluss wurden durch Western Blot Analysen Signalwegs-Komponenten und Zielgene untersucht, wie auch die Expression von Zielgenen mittels qRT-PCR bestimmt.

Die Expression der Wnt assoziierten Proteine CTNNB1, aktives β -Catenin (ABC) sowie c-Myc sank ebenfalls stark in den shNCL1 oder shNCL2 Zellen ab (Abb. 25). Die Expression des Enzyms GSK3 β hingegen war in allen untersuchten Ansätzen gleich, wobei die Phosphorylierung in Abhängigkeit der Wnt3a-Menge nur in den Kontrollgruppen zunahm. Allgemein war der Gehalt an pGSK3 β in shNCL1 und shNCL2 Zellen deutlich reduziert. Im Gegensatz zu den Kontrollgruppen gab es nach Nucleolin shRNA Knockdown keine Wnt3a abhängige Expressionszunahme von Nucleolin oder Wnt-Zielgenen.

Diese Ergebnisse deuten darauf hin, dass die Signalkaskade durch den Nucleolin Knockdown sehr früh unterbrochen wird, wofür die hohe Expression von GSK3 β und die Abwesenheit der phosphorylierten Form verantwortlich sein könnte.

Weiterhin zeigte die Untersuchung der Dickkopfproteine, einer Gruppe von sekretierten Wnt Inhibitoren, dass deren Expression auf Transkriptions- als auch auf Translationsebene in Abwesenheit von Nucleolin drastisch zunahm (siehe Abb. 25 und Abb. 27). Die Regulation dieser Faktoren durch MSX1 wurde bereits beschrieben (Revet *et al.*, 2010). Die Analyse von MSX1 wies eine Induktion nach shRNA Knockdown von Nucleolin auf. Somit zeigte sich bei diesem Experiment, dass nach Reduktion von Nucleolin die Inhibitoren DKK1, DKK2 und

DKK3 induziert wurden, und diese Induktion wahrscheinlich durch MSX1 moderiert wurde. Ein vergleichbar durchgeführtes Experiment in Mutz-2 Zellen, die stabil ein TCF/LEF-Bindemotiv basiertes Wnt-Reporterkonstrukt trugen (Mutz-pGreen Fire TCF RE), zeigte, dass nach Nucleolin Knockdown die TCF-abhängige Reporteraktivierung abnahm (Abb. 24). Ebenso kam es nicht zu einer Wnt3a abhängigen Steigerung des Signals, welche in den Kontrollgruppen ersichtlich war. Die Zugabe von hitzeinaktiviertem Liganden führte in diesem Experiment zu keiner Steigerung, wodurch die Spezifität der Aktivierung durch den nativen Liganden bekräftigt wurde.

Zusammengefasst kann man sagen, dass NCL in Mutz-2 Zellen an der ligandenabhängigen Aktivierung des Signalweges beteiligt. Zellen, die durch shRNA-Knockdown reduzierte Nucleolin Mengen aufwiesen, zeigten keine Aktivierung durch den Liganden und generell eine deutlich reduzierte Aktivität des Signalweges.

Experimente, in denen die Nucleolin Expression durch Nukleofektion gesteigert wurde, zeigten eine dosisabhängig gesteigerte Aktivierung des TCF-RE-Wnt Reporters, jedoch nicht durch Nucleolin- Δ N (siehe Abb. 22 und Abb. 23). In einem weiteren Experiment, wo Mutz-2 Wnt-Reporterzellen mit pCDH-Leervektor, NCL oder NCL- Δ N Expressionskonstrukten transduziert und anschließend mit Wnt Liganden behandelt worden waren, zeigte sich eine dosisabhängige Aktivierung des Wnt Signalweges durch Wnt3a und Wnt10b (siehe Abb. 28 und Abb. 30). Die Zugabe der höchsten Konzentration an hitzeinaktiviertem Liganden hatte wiederum keinen aktivatorischen Effekt auf das System. Zellen, die mit Nucleolin Expressionskonstrukt transduziert worden waren, zeigten eine deutlich erhöhte Reporteraktivität verglichen mit den Leervektor transduzierten Kontrollen, die durch die Gabe von Wnt3a oder Wnt10b kaum mehr gesteigert wurde. Die Transduktion von Nucleolin- Δ N hingegen führte nicht zu einer verstärkten Aktivierung und auch die Aktivierbarkeit durch Wnt3a oder Wnt10b ging größtenteils verloren. Die Untersuchungen der Änderung auf Proteinebene zeigten ebenfalls eine Wnt abhängige Induktion der Zielgene in Leervektor transduzierten Zellen und eine *per se* deutlich höhere Aktivität in Nucleolin transduzierten Zellen. So wurde die ABC-Menge durch die Gabe der Liganden gesteigert, gleiches galt für die phosphorylierte Form, jedoch nicht Gesamt-GSK3 β . Die Steigerung der Proteinmengen durch Wnt Liganden in Nucleolin transduzierten Zellen fiel wiederum schwächer aus. Diese Ergebnisse ließen darauf schließen, dass Nucleolin den Signalweg ähnlich wie ein Ligand aktivieren kann. Damit ist gemeint, dass es durch die Transduktion von Nucleolin zu einer Aktivierung des Signalweges und dessen Zielgenen kommt, die mit der Aktivierung durch die Gabe von rekombinantem Wnt3a oder Wnt10b vergleichbar ist. Dieses Ergebnis passt zu der

Beobachtung, dass Nucleolin die depletiven Effekte von FZD8-FC kompensieren kann (Abb. 32). Zudem scheint es in den Zellen eine Sättigung der Aktivierung zu geben, da durch die zusätzliche Gabe der Wnt Liganden in Nucleolin transduzierten Zellen keine Steigerung der Aktivität zu erreichen war.

In der letzten Zeit wurden mehrere Ergebnisse publiziert, die eine vom kanonischen Signalweg unabhängige Transkription der Zielgene beschreiben. So konnten Qiang *et al.* zeigen, dass die Behandlung von Zellen mit Bortezomib, einem Proteasom-Inhibitor welcher als Zytostatikum verwendet wird, in den untersuchten Zelllinien die Expression von Wnt Zielgenen induzierte. Dabei war diese Aktivierung nicht von CTNNB1 abhängig, da diese nicht durch die Transfektion der dominant negativen Formen von TCF1 und TCF4 unterbunden werden konnte, welche effektiv die CTNNB1 vermittelte Zielgenaktivierung inhibieren (Qiang *et al.*, 2009). Eine weitere Studie konnte das Protein *activating transcription factor 2* (ATF2) als Wnt unabhängigen Aktivator des kanonischen Signalweges in Leukämiezellen charakterisieren. So wurde gezeigt, dass ein shRNA vermittelter Knockdown von CTNNB1 oder γ -Catenin, den beiden kanonischen Signalmediatoren, nicht zu einer Abschwächung des Wnt Reportersignales in den untersuchten Zellsystemen führte (Grumolato *et al.*, 2013). Vielmehr führte die Überexpression von TCF1 allein zu einer deutlichen Aktivierung des Reporters. Somit wurde gezeigt, dass es eine Kooperation von TCF1 und ATF2 gab, die zu einer gesteigerten Aktivität des Reporters führte ohne jedoch den CTNNB1 abhängigen kanonischen Wnt Signalweg zu benötigen.

Neben der Aktivierung des Signalweges durch Nucleolin konnte in dieser Arbeit gezeigt werden, dass die Menge an Nucleolin durch die Zugabe von Wnt3a sowohl auf mRNA Ebene als auch auf Proteinebene anstieg. Dieser Effekt wurde bisher nicht beschrieben und könnte einen unbekanntem regulatorischen Weg von Nucleolin darstellen.

Zusammengefasst zeigt sich, dass der kanonische Wnt Signalweg in Mutz-2 Zellen aktiv ist und Nucleolin für die Aufrechterhaltung eines intakten Wnt Signalweges eine Rolle spielt.

5.5 Nucleolin bindet den TCF7L2-Promotor über spezifische Bindemotive

Da Nucleolin den Signalweg dosisabhängig zu aktivieren scheint wurde angenommen, dass dies über eine direkte Zielgenaktivierung vermittelt wird. Die Analyse des TCF7L2 Promotors zeigte, dass es zwei Nucleolin Bindemotive gibt und ebenfalls TCF/LEF Bindesequenzen vorhanden waren. In Nucleolin transduzierten Zellen kam es zu einem Anstieg der TCF7L2 Expression, sowie des kodierten Proteins TCF4. ChIP Analysen von

Mutz-2 Zellen und primären CD34⁺-HPZ wurden durchgeführt, welche eine deutliche Anreicherung des TCF7L2 Promotors durch den Nucleolin Antikörper zeigten (vgl. Abb. 35). Die Interaktion von Nucleolin mit den gefundenen Sequenzmotiven im TCF7L2 Promotor wurde dann im Anschluss durch kompetitive EMSA-Analysen bestätigt (vgl. Abb. 36). Die Verwendung eines Überschusses an nicht- radioaktivem Oligo mit und ohne Bindemotiv zeigte deutlich, dass das Bindemotiv für die DNA Bindung essentiell ist und es sich um eine spezifische Sequenzabhängige Bindung handelt. Zur weiteren Analyse wurde die TCF7L2 Promotorregion in ein Luciferase basiertes Reporterkonstrukt kloniert und dieses zusammen mit Nucleolin oder Nucleolin-ΔN Expressionsvektoren in Mutz-2 Zellen nukleofiziert. Es kam zu einer dosisabhängigen Aktivierung des Reporters durch Nucleolin, jedoch nicht durch Nucleolin-ΔN (vgl. Abb. 37). Neben der Aktivierung des Reporters durch Nucleolin, konnte dieser auch durch Zugabe von Wnt3a aktiviert werden, was durch die im Promotor vorhandenen TCF/LEF Bindemotive zu erklären ist. Die zugehörigen Western Blot Analysen zeigten einen Anstieg von TCF4 auf Proteinlevel. Die Nucleolin-ΔN nukleofizierten Zellen zeigten wiederum keinen Anstieg auf Proteinebene, weder durch Nucleolin-ΔN noch durch die zusätzliche Behandlung mit Wnt3a. Nach selektiver Deletion der Bindemotive in dem TCF7L2 Reporterkonstrukt war der Reporter nicht mehr durch Nucleolin aktivierbar. Weiterhin waren diese mutierten Reporterplasmide weniger durch Wnt3a aktivierbar (vgl. Abb. 39). Somit zeigte dieses Experiment, dass die Aktivierung des Promotors durch Nucleolin über die gefundenen Bindemotive realisiert wird.

Neben der direkten Bindung von Nucleolin an den TCF7L2 Promotor könnte Nucleolin zusätzlich durch die Inhibition von P53 den Promotor beeinflussen. Es wurde für den TCF7L2 Promotor gezeigt, dass dieser dosisabhängig durch P53 inhibiert wird (Rother *et al.*, 2004). Nucleolin jedoch kann die 5'-UTR der P53 mRNA binden und so die Stabilität verringern (Takagi *et al.*, 2005; Chen *et al.*, 2012). Somit wären die P53 Proteinlevel reduziert und die Inhibition durch den Faktor wäre abgeschwächt.

5.6 Mögliche weitere Implikationen von Nucleolin in den Wnt Signalweg

Da TCF4 ein Transkriptionsfaktor des Wnt Signalweges ist und Nucleolin, wie auch schon für SOX-Proteine gezeigt die Transkription von TCF7L2 regulieren kann (Segusa *et al.*, 2005 und 2012), könnte Nucleolin über die Aktivierung des Promotors den Signalweg positiv regulieren. Es wurde jedoch gezeigt, dass TCF4 allein nicht in der Lage ist einen TCF/LEF Reporter zu aktivieren (Kolligs *et al.*, 1999). Für den Fall, dass der kanonischen Wnt

Signalweg in Zellen schon aktiv vorliegt und es nur zu einer Verstärkung des Effektes kommt wurde ein solches Konzept bisher jedoch nicht untersucht. Daraus ergibt sich ein hypothetisches Modell, wie Nucleolin den Wnt Signalweg modulieren kann und wie Nucleolin durch den Signalweg beeinflusst wird. Aufgrund der direkten Aktivierung des TCF7L2 Promotors kommt es zu einer erhöhten TCF4 Proteinmenge in der Zelle. Durch diese Akkumulation wird LEF1 präferentiell im Nukleus retardiert, so dass beide Komponenten des TCF/LEF Komplexes vorliegen. Zusätzlich könnte durch Beeinflussung des PI3K/AKT Signalweges die Phosphorylierung von GSK3 β verstärkt werden, sodass der CTNNB1-Degradationskomplex inaktiv vorliegen könnte. Somit wird das neu gebildete CTNNB1 nicht degradiert und kann in aktiver Form im Nukleus akkumulieren. Dies führt zu einer erhöhten TCF/LEF abhängigen Transkription von Zielgenen, beispielsweise *CCND1* und *c-Myc*. Letzteres kann über E-Box Sequenzen im regulatorischen Bereich des Nucleolin-Promotors die Expression steigern, wodurch die erhöhten Nucleolin-Level infolge eines aktiven Wnt Signalweges erklärt werden können (Greasley *et al.*, 2000). Zusammengenommen würde dies eine rezeptorunabhängige Stimulation des Signalweges implizieren.

5.7 Fazit

Die Genregulation in leukämischen Zellen ist in weiten Bereichen nicht ausreichend verstanden. In dieser Arbeit wurde ein Aspekt der Nucleolin abhängigen Genregulation in leukämischen Zellen untersucht. So zeigt sich, dass Nucleolin den kanonischen Wnt Signalweg relativ unabhängig von kanonischen Liganden in der AML-abgeleiteten Zelllinie Mutz-2 aktivieren kann. Nach shRNA basiertem Nucleolin-Knockdown war die Aktivität des Signalweges reduziert und durch Zugabe von rekombinantem Wnt3a nicht effizient aktivierbar.

Die Promotorsequenz von TCF7L2, einem positiven Regulator des Signalweges, enthält Nucleolin Bindemotive und war in Mutz-2 und primären CD34⁺ Zellen durch Nucleolin spezifische Antikörper präzipitierbar. Eine Überexpression von Nucleolin zeigte die Aktivierung eines TCF7L2 Reporterkonstruktes über die Nucleolin Bindemotive. EMSA Experimente bestätigten die Bindung von Nucleolin an diese Bindemotive in Abwesenheit von Kofaktoren.

Neben der direkten Aktivierung durch Promotorinteraktion, führte eine gesteigerte Expression von Nucleolin zur Modulation bestimmter Signalwegskomponenten, wie beispielsweise der gesteigerten Phosphorylierung der GSK3 β . In diesem Fall kann nur gemutmaßt werden, dass

die Regulation über die Steigerung der PI3K/AKT-Aktivität durch Nucleolin erfolgt (Bhatia *et al.*, submitted).

Die vorliegende Arbeit untersuchte weiterhin den Einfluss von Nucleolin auf die Regulation von CD133 und im Speziellen der Isoform CD133 1A in leukämischen Zelllinien und primären CD34⁺ Zellen. So wurde gezeigt, dass Nucleolin den CD133 P1-Promotor bindet und über spezifische Bindemotive aktivieren kann. Die Bindung konnte mittels ChIP Analysen in den Zelllinien SEM und Mutz-2, welche beide *per se* CD133 exprimieren, und in primären CD34⁺ Zellen nachgewiesen werden. Zusätzlich wurde die Spezifität dieser Bindung mittels kompetitiven EMSA Analysen der Bindemotive validiert. Experimente mit einem CD133 P1-Luciferasereporter zeigten zudem eine dosisabhängige Reporteraktivierung durch Nucleolin, welche nach Deletion der Bindemotive aufgehoben wurde. Da bekannt ist, dass das CD133 Gen über fünf Promotoren verfügt, ist noch nicht geklärt, ob die weiteren Promotoren eine Abhängigkeit von Nucleolin aufweisen könnten.

Zusammengefasst gibt diese Arbeit einen neuen Einblick in die Rolle von Nucleolin als Transkriptionsfaktor, der über spezifische DNA-Motive die Promotoren stammzellosoziierter Gene binden und diese dadurch aktivieren kann. Erstmals wird die Rolle von Nucleolin im Hinblick auf den kanonischen Wnt Signalweg beleuchtet und gezeigt, dass ein Ausschalten des Faktors den Signalweg drastisch einschränkt.

Diese Arbeit liefert erstmals einen Zusammenhang zwischen Nucleolin und der Regulation von Komponenten des kanonischen Wnt Signalweges, sowie bei der Transkription des Gens CD133 in hämatopoetischen Zellen.

5.8 Ausblick

Die Erkenntnisse über einen Zusammenhang zwischen Nucleolin und dem kanonischen Wnt-Signalweges sowie der Transkription von CD133 werfen neue Fragen auf. So wurde gezeigt, dass ein shRNA Knockdown von CD133 den kanonischen Wnt Signalweg inhibiert (Mak *et al.*, 2012). Das resultiert in der Frage, ob Nucleolin über die Aktivierung von TCF7L2 und den Effekt auf GSK3 β genug Einfluss hätte, um die Inhibition des Signalweges im Hinblick auf die Expression seiner Zielgenen zu kompensieren. Zudem zeigt die Arbeit von Abdelmohsen *et al.*, dass Nucleolin an die 3'-UTRs verschiedener anderer Faktoren bindet und so deren Translation moduliert (Abdelmohsen *et al.*, 2011). Ebenso könnte Nucleolin durch die Interaktion mit TCF-Proteinen die Aktivierung von Zielgenen Catenin-unabhängig durchführen, wie es für ATF-2 gezeigt wurde (Grumolato *et al.*, 2013). Aus diesem Grund wäre es von Interesse zu sehen, ob Wnt-assoziierte Proteine mit Nucleolin komplexieren.

Da es verschiedene Interaktionspunkte zwischen dem Wnt- und dem Notch-Signalweg (Mödder *et al.*, 2011). Aus diesem Grund wäre es interessant zu untersuchen, ob Nucleolin vielleicht sogar direkt einen Einfluss auf Notch haben könnte.

Neben dem Einfluss auf den Wnt-Signalweg wurde in dieser Arbeit gezeigt, dass Nucleolin die Transkription von CD133 steigert. Eine Erhöhung der intrazellulären CD133 Proteinmenge könnte aufgrund der membranständigen Lokalisation in den Protrusionen einen Einfluss auf die Polarisierung der Zelle haben.

Für CD133 sind neben den beiden Promotoren CD133 P1 und P2 noch drei weitere bekannt, die in dieser Arbeit nicht betrachtet wurden, da in hämatopoetischen Zellen die CD133P1 regulierte Isoform 1A dominiert. Es wäre jedoch von Interesse zu sehen, ob die anderen Promotoren ebenfalls Bindemotive enthalten und falls vorhanden die Expression dieser Isoformen in anderen Zellsystemen von Nucleolin abhängig ist. So werden beispielsweise in der Zelllinie Caco-2 neben der Isoform CD133 1A auch die Isoformen 1B und 1E exprimiert, welche über die Promotoren CD133 P2 und CD133 P5 reguliert werden (Tabu *et al.*, 2010).

Somit könnte diese Zelllinie als Modell für die Untersuchung des Einflusses von Nucleolin auf den Promotor P5 dienen. Auch könnte man versuchen die Aktivität des kanonischen Signalweges auf die Nucleolin-Expression zu untersuchen.

6 Zusammenfassung

Nucleolin ist ein multifunktionales Protein, welches in proliferierenden sowie in Tumorzellen verstärkt exprimiert wird. In dieser Arbeit wurden Aspekte der Nucleolin abhängigen Genregulation in leukämischen Zellen untersucht. Lentivirale Überexpression von Nucleolin in den leukämischen Zelllinien Mutz-2 und SEM führte zu einer Zunahme der CD133 Expression, wobei die durch den Promotor P1 regulierte Isoform 1A jedoch nicht die durch den Promotor P2 regulierte Isoform 1B zunahm. Chromatin Immunpräzipitationen mit Nucleolin-Antikörper in den genannten Zelllinien sowie in primären CD34⁺ hämatopoetischen Progenitorzellen resultierten in einer deutlichen Anreicherung des CD133 P1 Promotors. Die Analyse der Promotorsequenz zeigte drei putative Nucleolin Bindemotive, von denen Eines mittels kompetitivem *electrophoretic mobility shift Assays* (EMSA) validiert wurde. Reporterassays des CD133P1 Promotors in Mutz-2 und SEM Zellen wiesen eine dosisabhängige Aktivierung durch Nucleolin auf. Eine selektive Deletion der im CD133 P1 Promotor enthaltenen Bindemotive verhinderte die Nucleolin abhängige Aktivierung und zeigte so die Spezifität der Aktivierung über die Motive.

Des Weiteren wurde ein möglicher Zusammenhang von Nucleolin und dem kanonischen Wnt-Signalweg, einem wichtigen Regulator der Stammzellhomöostase, in der AML-abgeleiteten Zelllinie Mutz-2 untersucht. Es zeigte sich, dass Nucleolin unabhängig von Wnt-Liganden den Signalweg aktivieren und die Expression von TCF4 beeinflussen kann. Die Aktivierung von TCF7L2, dem Gen welches für TCF4 kodiert, durch Nucleolin erfolgt über spezifische Bindemotive im Promotor. CHIP Analysen belegten die Anreicherung des Promotors durch Nucleolin in Mutz-2 und primären CD34⁺ Zellen. Die Aktivierung des Promotors durch Nucleolin war dosisabhängig und eine Deletion der Bindemotive hob diese auf. Zusätzlich wurde die direkte Interaktion von Nucleolin mit den putativen Bindemotiven durch EMSA-Analysen validiert und die Spezifität mittels Konkurrenz der Bindungen aufgezeigt.

Zusammengefasst beschreibt die hier vorliegende Arbeit erstmalig einen Nucleolin abhängigen Regulationsmechanismus der CD133 Isoform 1A in hämatopoetischen Zellen, welcher über die direkte Promotorbindung und Aktivierung abläuft. Weiterhin wurde erstmalig ein Zusammenhang zwischen Nucleolin und dem kanonischen Wnt Signalweg aufgezeigt. Davon ausgehend wurde die Nucleolin abhängige Regulation der TCF7L2 Promotoraktivität durch spezifische Bindemotive aufgezeigt.

7 Summary

The present work investigated selective aspects of nucleolin-dependent gene regulation in leukemia-derived cells. In Mutz-2 an acute myeloid leukemia-derived cell line and SEM an acute lymphoid leukemia derived model, overexpression of nucleolin significantly increased transcription of the CD133 isoform 1A. This isoform is controlled by CD133P1 promoter and chromatin immunoprecipitations (ChIP) revealed a substantial enrichment with nucleolin, whereas isoform 1B regulating promoter CD133P2 was not bound. Luciferase based reporter assays revealed a dose dependent activation by nucleolin and not the N terminal truncated form NCL- Δ N. Pair wise deletion of binding motifs abolished the activatory effect of nucleolin. Furthermore the specificity of binding was proven by competitive Electrophoretic mobility shift assay (EMSA).

Beside the role of nucleolin regarding regulation of CD133 isoform expression the implication of nucleolin in canonical Wnt signalling was investigated. It was observed that nucleolin was able to further activate Wnt signalling in the cell line Mutz-2 relatively independent of canonical ligands. A shRNA based knockdown of nucleolin led to a substantial reduction of endogenous Wnt signalling and no Wnt3a ligand-based increase was detectable in contrast to control cells where Wnt3a increased signalling. Overexpression of nucleolin activated the canonical Wnt pathway in Mutz-2 cells as monitored by TCF response element based reporter assays and increased expression of Wnt target genes like *c-Myc*, *TCF7L2* or *CCND1*.

Furthermore *TCF7L2* was identified as a direct nucleolin target gene and binding of the *TCF7L2* promoter was confirmed by ChIP. Furthermore this promoter was used for Luciferase based reporter assays and showed a dose dependent activation by nucleolin but not by Δ N. After selective deletion of the binding motifs the reporter was not activated by nucleolin. The binding specificity of these motifs was further validated by competitive EMSA the binding motifs.

Taken together this work could give more evidence to the role of NCL in leukemic cell's gene regulation. The thesis revealed that nucleolin binds and activates the CD133 P1- and not CD133 P2 promoter via specific binding motifs and deletion thereof abolishes this activation. Further more a possible implication of nucleolin within the canonical Wnt signalling pathway was demonstrated. The transcription factor *TCF7L2* was found as a direct target gene of nucleolin and is regulated via nucleolin by direct promoter binding and activation

8 Literaturliste

- Abdelmohsen K, Tominaga K, Srikantan S, *Et al.*, (2011)
Enhanced translation by Nucleolin via G-rich elements in coding and non-coding regions of target mRNAs
Nucl. Acids Res. (2011) 39 (19): 8513-8530
- Adler PN, Vinson C, Park WJ *et al.*, (1990)
Molecular structure of frizzled, a *Drosophila* tissue polarity gene.
Genetics.1990 Oct; 126(2):401-16.
- Alcaraz C, De Diego M, Pastor MJ, *et al.* (1990)
Comparison of a radioimmunoprecipitation assay to immunoblotting and ELISA for detection of antibody to African swine fever virus.
J. Vet. Diagn. Invest. 2 (3): 191–6
- Anensen N, Skavland J, Stapnes C, *et al.*, (2006)
Acute myelogenous leukemia in a patient with Li-Fraumeni syndrome treated with valproic acid, theophyllamine and all-trans retinoic acid: a case report.
Leukemia 2006 Apr;20(4):734-6.
- Antara D, (2011)
Wnt/Ca²⁺ signaling pathway: a brief overview
Acta Biochim Biophys Sin (2011) 43 (10)
- Auerbach AD und Allen RG (1991)
Leukemia and preleukemia in Fanconi anemia patients. A review of the literature and report of the International Fanconi Anemia Registry.
Cancer Genet Cytogenet. 1991 Jan;51(1):1-12.
- Austin T, Solar G, Ziegler F *et al.* (1997)
A role for the Wnt gene family in hematopoiesis: expansion of multilineage progenitor cells. Blood 89, 3624-35
- Bao J, Zheng JJ, Wu D (2012)
The structural basis of DKK-mediated inhibition of Wnt/LRP signaling.
Sci Signal. 2012 May 15;5(224).
- Barolo S (2006)
Transgenic Wnt/TCF pathway reporters: all you need is Lef?
Oncogene. 2006 Dec 4;25(57):7505-11.
- Batard P, Monier MN, Fortunel N, *et al.*, (2000)
TGF-(beta)1 maintains hematopoietic immaturity by a reversible negative control of cell cycle and induces CD34 antigen up-modulation.
J Cell Sci. 2000 Feb;113 (Pt 3):383-90.
- Beghini A, Corlazzoli F, Del Giacco L, *et al.*, (2012)
Regeneration-associated Wnt signaling is activated in long-term reconstituting AC133bright acute myeloid leukemia cells.
Neoplasia. 2012 Dec;14(12):1236-48.
- Behrens J, von Kries JP, Kuhl M, *et al.*, (1996)
Functional interaction of β -catenin with the transcription factor LEF-1.
Nature 382: 638–642
- Belenguer P, Caizerguess-Ferrer M, Labbé JC *et al*
Mitosis specific phosphorylation of Nucleolin by p34^{cdc2} protein kinase
Molecular and cellular biology 1990;Vol.10 No 7

- Bhatia S, Reister S, Mahotka C, *et al.*, (2014)
Control of AC133/CD133 and impact on human hematopoietic progenitor cells through nucleolin
Leukemia, submitted Dezember 2014
- Bradford MM (1976)
A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilising the principle of protein-dye binding
Anal Biochem 7, 248-54
- Bravo DT, Yang YL, Kuchenbecker K, *et al.*, (2013)
Frizzled-8 receptor is activated by the Wnt-2 ligand in non-small cell lung cancer
BMC Cancer 2013, 13:316
- Bourbon HM, Lapeyre B und Amalric F
Structure of mouse nucleolin gene
J.Mol.Biol (1988) 200, 627-638
- Bourhis E, Tam C, Franke Y, *et al.*, (2010)
Reconstitution of a Frizzled8·Wnt3a·LRP6 Signalling Complex Reveals Multiple Wnt and Dkk1 Binding Sites on LRP6
J Biol Chem. Mar 19, 2010; 285(12): 9172–9179
Volume 43(10) 931-941
- Brandon C, Eisenberg LM und Eisenberg CA (2000)
Wnt signaling modulates the diversification of hematopoietic cells.
Blood 96, 4132-41
- Bui TD, T. O'Brien TO, Crew J, *et al.*, (1998)
High expression of Wnt7b in human superficial bladder cancer vs invasive bladder cancer.
Br J Cancer. 1998; 77(2): 319–324.
- Caizerguea-Ferrer M, Belenguer P, Lapeyre F *et al.*
Phosphorylation of nucleolin by a nucleolar type NII protein kinase
Biochemistry 1987; 26:7876-7883
- Campeau E, Ruhl VE, Rodier F, *et al.*, (2010)
A Versatile Viral System for Expression and Depletion of Proteins in Mammalian Cells
PLoS ONE 4(8): e6529. doi:10.1371
- Carroll WL, Bhojwani D, Min DJ, *et al.*, (2003)
Pediatric acute lymphoblastic leukemia.
Hematology Am Soc Hematol Educ Program. 2003:102-31.
- Cavallo RA, Cox RT, Moline MM, *et al.*, (1998)
Drosophila Tcf and Groucho interact to repress Wingless signalling activity.
Nature. 1998 Oct 8;395(6702):604-8.
- Cawthon RM (2002)
Telomere measurement by quantitative PCR.
Nucleic Acids Res. 2002 May 15;30(10):e47.
- Chen G, Fernandez J, Mische S, *et al.*, (1999).
A functional interaction between the histone deacetylase Rpd3 and the corepressor groucho in Drosophila development.
Genes Dev. 1999 Sep 1;13(17):2218-30.
- Chen J, Guo K und Kastan MB (2012)
Interactions of nucleolin and ribosomal protein L26 (RPL26) in translational control of human p53 mRNA.
J Biol Chem 2012 May 11;287(20):16467-76.

- Chim CS, Fung TK, Wong KF, *et al.*, (2006)
Infrequent Wnt inhibitory factor-1 (Wif-1) methylation in chronic lymphocytic leukemia.
Leuk Res. 2006 Sep;30(9):1135-9.
- Chuang KA, Lieu CH, Tsai WJ, *Et al* (2010)
Evaluation of anti-Wnt/ β -catenin signaling agents by pGL4-TOP transfected stable cells with a luciferase reporter system
Braz J Med Biol Res, October 2010,
- Corbeil D, Röper K, Hellwig A, *et al.* (2000)
The human AC133 hematopoietic stem cell antigen is also expressed in epithelial cells and targeted to plasma membrane protrusions.
J Biol Chem 275: 5512-5520.
- Corbeil D, Marzesco AM, Wilsch-Bräuninger M, *et al.*, (2010)
The intriguing links between prominin-1 (CD133), cholesterol-based membrane microdomains, remodeling of apical plasma membrane protrusions, extracellular membrane particles, and (neuro)epithelial cell differentiation.
FEBS Lett. 2010 May 3;584(9):1659-64.
- Cong R, Das S, Ugrinova I, *et al.*, (2012)
Interaction of nucleolin with ribosomal RNA genes and its role in RNA polymerase I transcription.
Nucleic Acids Res. 2012 Oct;40(19):9441-54.
- Congdon KL, Voermans C, Ferguson EC, *et al.*, (2008)
Activation of Wnt signaling in hematopoietic regeneration.
Stem Cells. 2008 May;26(5):1202-10.
- Connor AE, Baumgartner RN, Baumgartner KB
Associations between TCF7L2 polymorphisms and risk of breast cancer among Hispanic and non-Hispanic white women: the Breast Cancer Health Disparities Study.
Breast Cancer Res Treat. 2012 Nov;136(2):593-602.
- Cross DAE, Alessi DR, Cohen P, *et al.*, (1995)
Inhibition of glycogen synthase kinase-3 by insulin mediated by protein kinase B
Nature 378, 785 - 789 (28 December 1995)
- Cruciat CM und Niehrs C (2013)
Secreted and Transmembrane Wnt Inhibitors and Activators
Cold Spring Harb Perspect Biol. 2013 Mar 1;5(3)
- Dandekar S, Romanos-Sirakis E, Pais F, *et al.*, (2014)
Wnt Inhibition Leads to Improved Chemosensitivity in Pediatric Acute Lymphoblastic Leukemia
Br J Haematol. Oct 2014; 167(1): 87–99
- Davis HE, Rosinski M, Morgan JR, *et al.* (2004).
Charged Polymers Modulate Retrovirus Transduction via Membrane Charge Neutralization and Virus Aggregation.
Biophysical Journal 86 (2): 1234–42
- DeAlmeida VI, Li M, Ernst JA *et al* (2007)
The Soluble Wnt Receptor Frizzled8CRD-hFc Inhibits the Growth of Teratocarcinomas In vivo
Cancer Res June 1, 2007 67
- Donovan LK, Potter NE, Warr T, *et al.*, (2012)
Pediatric Glioblastoma: Biologic Behavior Is Determined by Oxygen Tension-Modulated CD133 Expression but Not Accompanied by Underlying Molecular Profiles.
Transl Oncol 2012; 5: 141-54.

- Drexler, H. G., Zaborski, M., Quentmeier, H. (1997)
Cytokine response profiles of human myeloid factor-dependent leukemia cell lines
Leukemia, U.K 11 (5): 701-708 .
- Driskell RR,, ClavelC, Rendl M, *et al.*(2011)
Hair follicle dermal papilla cells at a glance
Journal of Cell Science 124 (8)
- Dull T Zufferey, R, Kelly, M, *et al.*, (1998)
A Third- Generation Lentivirus Vector with a Conditional Packaging System.
J. Virol. 1998 72(11):
8463-8472.
- Erard MS, Belenguer M Caizergues-Ferrer M *et al.*
A major nucleolar protein, nucleolin, induces chromatin decondensation by binding to
histon H1
Eur.J.Biocem, 1988; 175, 525-530
- Fähling M, Steege A, Perlewitz A, *et al.*, (2005)
Role of nucleolin in posttranscriptional control of MMP-9 expression.
Biochim Biophys Acta. 2005;1731:32–40
- Fang D, Hawke D, Zheng Y, *et al.*, (2007)
Phosphorylation of beta-catenin by AKT promotes beta-catenin transcriptional
activity.
J Biol Chem. 2007 Apr 13;282(15):11221-9
- Fargeas CA, Joester A, Missol-Kolka E, *et al.*, (2004)
Identification of novel Prominin-1/CD133 splice variants with alternative C-termini
and their expression in epididymis and testis.
Journal of Cell Science 117, 4301-11
- Fleming HE, Janzen V, Lo Celso C, *et al.*, (2008)
Wnt signaling in the niche enforces hematopoietic stem cell quiescence and is
necessary to preserve self-renewal in vivo
Cell Stem Cell. Mar 6, 2008; 2(3): 274–283.
- Fogh, J. (1978).
Cultivation, characterization, and identification of human tumor cells with emphasis
on kidney, testis, and bladder tumors.
National Cancer Institute monograph (49): 5-9
- Fu Y, Chang H., Peng X., *et al.* (2014).
Resveratrol inhibits breastcancer stem-like cells and induces autophagy via
suppressing Wnt/beta-catenin signaling pathway.
PLoS One 9 (7): e102535
- Fujii N, You L, Xu Z., *et al.* (2007).
An antagonist of dishevelled protein–protein interaction suppresses beta-catenin-
dependent tumor cell growth. *Cancer Res* 67, 573–579.
- Garner MM, Revzin A (1981)
A gel electrophoresis method for quantifying the binding of proteins to specific DNA
regions: application to components of the Escherichia coli lactose operon regulatory
system.
Nucleic Acids Res. 9, Nr. 13, July 1981, S. 3047–60
- Gehling UM, Willems M, Dandri M, *et al.* (2005)
Partial hepatectomy induces mobilization of a unique population of hematopoietic
progenitor cells in human healthy liver donors.
Journal of Hepatology 43, 845-53

- Ginisty H, Sicard H, Roger B *et al.*
Structure and functions of nucleolin
Journal of cell science, 1999; 112,761-772
- Gong Y, Bourhis E, Chiu C, *et al.* (2010)
Wnt Isoform-Specific Interactions with Coreceptor Specify Inhibition or Potentiation of Signaling by LRP6 Antibodies.
PLoS ONE 5(9): e12682.
- Gould SJ und Subramani S (1988)
Firefly luciferase as a tool in molecular and cell biology.
Anal Biochem. 1988 Nov 15;175(1):5-13.
- Graham, F. L., Smiley, J., Russell, W. C., *et al.* (1977).
Characteristics of a human cell line transformed by DNA from human adenovirus type 5.
The Journal of general virology 36 (1): 59-74 .
- Greasley PJ, Bonnard C und Amati B (2000)
Myc induces the nucleolin and BN51 genes: possible implications in ribosome biogenesis
Nucleic Acids Research, 2000, Vol. 28, No. 2
- Greil, J., Gramatzki, M., Burger, R., *et al.* (1994).
The acute lymphoblastic leukaemia cell line SEM with t(4;11) chromosomal rearrangement is biphenotypic and responsive to interleukin-7.
British journal of haematology 86 (2): 275-283 .
- Grinstein E, Du Y, Santourlidis S, *et al.* (2007)
Nucleolin regulates gene expression in CD34-positive hematopoietic cells.
J Biol Chem. 2007 Apr 27;282(17):12439-49.
- Grinstein E, Wernet P und Snijders PJF (2002)
Nucleolin as Activator of Human Papillomavirus Type 18 Oncogene Transcription in Cervical Cancer
J Exp Med. 2002 Oct 21;196(8):1067-78
- Grinstein E, Shan Y und Karawajew L (2006)
Cell Cycle-controlled Interaction of Nucleolin with the Retinoblastoma Protein and Cancerous Cell Transformation
JBC, 2006; 281, 22223-22235
- Grumolato L, Liu G, Haremake T, *et al.*, (2013)
 β -Catenin-independent activation of TCF1/LEF1 in human hematopoietic tumor cells through interaction with ATF2 transcription factors.
PLoS Genet. 2013;9(8):
- Gupta, PB, Onder, TT, Jiang, G, *et al.* (2009).
Identification of selective inhibitors of cancer stem cells by high-throughput screening.
Cell 138, 645–659.
- Gurney, A, Axelrod F, Bond CJ, *et al.* (2012).
Wnt pathway inhibition via the targeting of Frizzled receptors results in decreased growth and tumorigenicity of human tumors.
Proc Natl Acad Sci U S A 109, 11717–11722.
- Hamilton SR, Liu Bo, Parsons RE, *et al.*, (1995)
The molecular basis of Turcot's Syndrome
N Eng J Med 1995; 332:839-847
- Hanahan D (1983)
Studies on transformation of *Escherichia coli* with plasmids
J. Mol. Biol (1983); 166

- Hanakahi LA, Dempsey LA und Ming JL
Nucleolin is one component of the B cell-specific transcription factor and switch region binding protein, LR1
PNAS 1997; Vol94 pp.3605-3610
- Hanenberg H, Hashino K, Konishi H, *et al.*, (1997)
Optimization of fibronectin-assisted retroviral gene transfer into human CD34+ hematopoietic cells.
Hum Gene Ther. 1997 Dec 10;8(18):2193-206.
- He B, You L, Uematsu K, *et al.* (2004).
A monoclonal antibody against Wnt-1 induces apoptosis in human cancer cells.
Neoplasia 6,7–14.
- He TC, Sparks AB, Rago C, *et al.* (1998)
Identification of c-MYC as a target of the APC pathway.
Science 1998; 281: 1509–12
- Heine MA, Rankin ML und DiMario PJ, (1993)
The Gly/Arg-rich (GAR) domain of Xenopus nucleolin facilitates in vitro nucleic acid binding and in vivo nucleolar localization.
Mol Biol Cell. Nov 1993; 4(11): 1189–1204.
- Ho SN, Hunt HD, Horton RM, *et al.*, (1989)
Site-directed mutagenesis by overlap extension using the polymerase chain reaction.
Gene. 1989 Apr 15;77(1):51-9.
- Hoang BH, Kubo T, Healey JH, *et al.*, (2004)
Expression of LDL receptor-related protein 5 (LRP5) as a novel marker for disease progression in high-grade osteosarcoma.
Int J Cancer 2004 Mar;109(1):106-11.
- Hofmann MA, Brian DA (1991)
Sequencing PCR DNA amplified directly from a bacterial colony.
Biotechniques. 1991 Jul;11(1):30-1.
- Horn PA, Tesch H, Staib P *et al.* (1999)
Expression of AC133, a Novel Hematopoietic Precursor Antigen, on Acute Myeloid Leukemia Cells
February 15, 1999; Blood: 93 (4)
- Hu, Z. B., Ma, W., Zaborski, M., MacLeod, R *et al.* (1996)
Establishment and characterization of two novel cytokine-responsive acute myeloid and monocytic leukemia cell lines, MUTZ-2 and MUTZ-3
Leukemia , U.K 10 (6): 1025-1040 .
- Iida H, Suzuki M, Goitsuka R, *et al* (2012).
Hypoxia induces CD133 expression in human lung cancer cells by up-regulation of OCT3/4 and SOX2.
Int J Oncol 2012; 40: 71-9
- Immervoll H, Hoem D, Sakariassen P *et al.*, (2008)
Expression of the "stem cell marker" CD133 in pancreas and pancreatic ductal adenocarcinomas
BMC Cancer 2008, 8:48
- Irollo E, Pirozzi G (2013)
CD133: to be or not to be, is this the real question?
Am J Transl Res. 2013 Sep 25;5(6):563-81.
- Jaksch M, Munera J, Bajpai R, *et al.*
Cell cycle-dependent variation of a CD133 epitope in human embryonic stem cell, colon cancer, and melanoma cell lines.
Cancer Res. 2008;68:7882–6.

- Janda CY, Waghray D, Levin AM, *et al.*, (2012)
Structural basis of Wnt recognition by Frizzled.
Science. 2012 Jul 6;337(6090):59-64.
- Johansson H, Svensson F, Runnberg R *et al.*
Phosphorylated Nucleolin Interacts with Translationally Controlled Tumor Protein during Mitosis and with Oct4 during Interphase in ES Cells
PlosOne 2010; Volume 5 , issue 10
- Kaashoek, J. G., Mout, R., Falkenburg, J. H., *et al.* (1991).
Cytokine production by the bladder carcinoma cell line 5637: rapid analysis of mRNA expression levels using a cDNA-PCR procedure.
Lymphokine and cytokine research 10 (3): 231-235
- Katoh, Y., & Katoh, M. (2007).
Comparative genomics on PROM1 gene encoding stem cell marker CD133.
International Journal of Molecular Medicine, 19(6), 967-970.
- Khan NI, Bradstock KF und Bendall JB (2007)
Activation of Wnt/beta-catenin pathway mediates growth and survival in B-cell progenitor acute lymphoblastic leukaemia.
Br J Haematol. 2007 Aug;138(3):338-48..
- Khurts S, Masutomi K, Delgermaa L, *et al.*, (2004)
Nucleolin interacts with telomerase
J Biol Chem. 2004 Dec 3;279(49):51508-15.
- Kim JA, Kang YJ, Park G, *et al.*, (1999)
Identification of a Stroma-Mediated Wnt/ β -Catenin Signal Promoting Self-Renewal of Hematopoietic Stem Cells in the Stem Cell Niche
STEM CELLS Volume 27, Issue 6, pages 1318–1329, June 2009
- Ko KH, Holmes T, Palladinetti P, *et al.*, (2011)
GSK-3 β inhibition promotes engraftment of ex vivo-expanded hematopoietic stem cells and modulates gene expression.
Stem Cells. 2011 (1):108-18.
- Kocemba KA, Groen RWJ, van Andel H, *et al.* (2012)
Transcriptional Silencing of the Wnt-Antagonist DKK1 by Promotor Methylation Is Associated with Enhanced Wnt Signaling in Advanced Multiple Myeloma.
PLoS ONE 7(2): e30359
- Kolligs FT, Hu G, Dang CV, *et al.*, (1999)
Neoplastic transformation of RK3E by mutant beta-catenin requires deregulation of Tcf/Lef transcription but not activation of c-myc expression.
Mol Cell Biol. 1999 Aug;19(8):5696-706.
- Kordes C, Sawitza I, Müller-Marbach A, *et al.* (2007)
CD133+ hepatic stellate cells are progenitor cells.
Biochemical and Biophysical Research Communications 352,410 17
- Kordes C, Sawitza I, Häussinger D (2008)
Canonical Wnt signaling maintains the quiescent stage of hepatic stellate cells.
Biochemical and Biophysical Research Communication 367, 116-23
- Kordes C, Sawitza I, Häussinger D (2009)
Hepatic and pancreatic stellate cells in focus.
Biological Chemistry. 390, 1003-12
- Korinek V, Barker N, Morin PJ, *et al.*, (1997)
Constitutive transcriptional activation by a beta-catenin-Tcf complex in APC-/- colon carcinoma.
Science. 1997 Mar 21;275(5307):1784-7.

- Krebsdatenbank Deutschland:
www.Krebsdaten.de
- Laemmli UK (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4
Nature 227, 680-685.
- Lapeyre B, Bourbon H und Amalric F
Nucleolin, the major nucleolar protein of growing eukaryotic cells: an unusual protein structure revealed by the nucleotide sequence
PNAS 1987 84 (6) 1472-1476
- Lee YY, Yang YP, Huang MC, *et al.*, (2014)
MicroRNA142-3p promotes tumor-initiating and radioresistant properties in malignant pediatric brain tumors.
Cell Transplant. 2014;23(4-5):669-90.
- Lento W, Ito T, Zhao C, *et al.*, (2014)
Loss of β -catenin triggers oxidative stress and impairs hematopoietic regeneration.
Genes Dev. 2014 May 1;28(9):995-1004.
- Lischwe, M. A., Roberts, K. D., Yeoman, L. C. and Busch, H.
(1982) Nucleolar specific acidic phosphoprotein C23 is highly methylated.
J. Biol.Chem. 257, 14600-14602
- Liu J, Pan S, Hsieh, *et al.* (2013).
Targeting Wnt-driven cancer through the inhibition of porcupine by LGK974.
Proc Natl Acad Sci U S A 110,20224–20229.
- Lu X, Li X, He Q, *et al.*, (2013)
miR-142-3p regulates the formation and differentiation of hematopoietic stem cells in vertebrates.
Cell Res. 2013 Dec;23(12):1356-68
- Luis TC, Ichii M,Brugman MH, *et al.*, (2012)
Wnt signaling strength regulates normal hematopoiesis and its deregulation is involved in leukemia development
Leukemia (2012) 26, 414–421;
- Lustig B, Jerchow B, Sachs M, *et al.*, (2002)
Negative feedback loop of Wnt signaling through upregulation of conductin/axin2 in colorectal and liver tumors.
Mol Cell Biol. 2002 Feb;22(4):1184-93.
- Ma N, Matsunaga S, Takata H, Ono-Maniwa R, Uchiyama S, *et al.* (2007)
Nucleolin functions in nucleolus formation and chromosome congression.
J Cell Sci 120: 2091–2105.
- MacDonald BT, Hien A, Zhang X, *et al.*, (2014)
Disulfide bond requirements for active Wnt ligands.
J Biol Chem. 2014 Jun 27;289(26):18122-36.
- Maeda O, Usami N, Kondo M, *et al* (2004)
Plakoglobin (c-catenin) has TCF/LEF family-dependent transcriptional activity in b-catenin-deficient cell line
Oncogene 23, 964–972
- Mak, AB, Nixon ALM, Kittanakom M. *et al.* (2012)
Regulation of CD133 by HDAC6 Promotes β -Catenin Signaling to Suppress Cancer Cell Differentiation
Cell Reports , Volume 2 , Issue 4 , 951 - 963

- Millington M, Arndt A, Boyd M (2009)
Towards a Clinically Relevant Lentiviral Transduction Protocol for Primary Human CD34+ Hematopoietic Stem/Progenitor Cells
Plos One, July 2009 Volume 4 Issue 7
- Miraglia S, Godfrey W, Yin AH, et al (1997).
A Novel Five-Transmembrane Hematopoietic Stem Cell Antigen: Isolation, Characterization, and Molecular Cloning
Blood, 90 (12) (1997), pp. 5013–5021
- Miyoshi H, Blomer U, Takahashi M, *et al.* (1998)
Development of a self-inactivating lentivirus vector.
J Virol. Oct;72(10):8150-7.
- Mödder UI, Oursler MJ, Khosla S, *et al.*, (2011)
Wnt10b activates the Wnt, notch, and NFκB pathways in U2OS osteosarcoma cells.
J Cell Biochem. 2011 May;112(5):1392-402
- Moritz T, Dutt P, Xiao X, *et al.*, (1996)
Fibronectin improves transduction of reconstituting hematopoietic stem cells by retroviral vectors: evidence of direct viral binding to chymotryptic carboxy-terminal fragments.
Blood,88,855-862
- Müller-Tidow C, Steffen B, Cauvet T, *et al.*, (2004)
Translocation products in acute myeloid leukemia activate the Wnt signaling pathway in hematopoietic cells.
Mol Cell Biol. 2004 Apr;24(7):2890-904.
- Na Y, Lee SM und Kim DS (2012)
Promotor methylation of Wnt antagonist DKK1 gene and prognostic value in Korean patients with non-small cell lung cancers.
Cancer Biomark. 2012;12(2):73-9
- Naldini L, Blomer U, Gallay P, et al (1996).
In vivo gene delivery and stable transduction of nondividing cells by a lentiviral vector.
Science.1996 Apr 12;272(5259):263-7.
- Nemeth MJ, Topol L, Anderson SM *et al.*, (2007)
Wnt5a inhibits canonical Wnt signaling in hematopoietic stem cells and enhances repopulation.
Proc Natl Acad Sci U S A. 2007 Sep 25;104(39):15436-41
- Ng OH, Erbilgin Y, Firtina S, *et al.*, (2014)
Deregulated Wnt signaling in childhood T-cell acute lymphoblastic leukemia.
Blood Cancer J. 2014 Mar 14;4:e192. doi: 10.1038/bcj.2014.12.
- Niehrs C (2006)
Function and biological roles of the Dickkopf family of Wnt modulators
Oncogene (2006) 25, 7469–7481
- Nishido I, Nakamura Y, Miyoshi Y, *et al.*, (1991)
Mutations of chromosome 5q21 genes in FAP and colorectal cancer patients
Science **253** (5020): 665–9.
- Nusse R und Varmus H E (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.
- Nusse R, Brown A, Papkoff J, *et al.* (1991).
A new nomenclature for int-1 and related genes: the Wnt gene family.
Cell 64, 231.

- Nusse R (1999)
Wnt targets. Repression and activation.
Trends Genet. 1999 Jan;15(1):1-3.
- O'Doherty U, Swiggard WJ, Malim MH (2000)
Human immunodeficiency virus type 1 spinoculation enhances infection through virus binding
J Virol. 2000 Nov; 74(21):10074-80.
- Okamoto M, Udagawa N, Uehara S, *et al.*, (2014)
Noncanonical Wnt5a enhances Wnt/ β -catenin signaling during osteoblastogenesis.
Sci Rep. 2014 Mar 27;4:4493
- Otake Y, Soundararajan S, Sengupta TK, *et al.*, (2007)
Overexpression of nucleolin in chronic lymphocytic leukemia cells induces stabilization of bcl2 mRNA.
Blood. 2007 Apr 1;109(7):3069-75.
- Orrick, L. R., Olson, M. O. and Busch, H.
Comparison of nucleolar proteins of normal rat liver and Novikoff hepatoma ascites cells by two-dimensional polyacrylamide gel electrophoresis.
PNAS (1973);70, 1316-1320
- Pamuk GE, Uyanik MS, Pamuk ON, *et al.*, (2014)
Decreased dickkopf-1 levels in chronic lymphocytic leukemia and increased osteopontin levels in non-Hodgkin's lymphoma at initial diagnosis: Could they be playing roles in pathogenesis?
Hematology. 2014 Oct 1. [Epub ahead of print]
- Park, C. H., Chang, J. Y., Hahm, E. R., *et al.*, (2005)
Quercetin, a potent inhibitor against beta-catenin/Tcf signaling in SW480 colon cancer cells.
Biochem Biophys Res Commun 328, 227–234.
- Patrawala L, Calhoun T, Schneider-Broussard R, *et al.* (2006)
Highly purified CD44+ prostate cancer cells from xenograft human tumors are enriched in tumorigenic and metastatic progenitor cells.
Oncogene. 25:1696–1708.
- Perry JM, He XC, Sugimura R, *et al.*, (2011)
Cooperation between both Wnt/ β -catenin and PTEN/PI3K/Akt signaling promotes primitive hematopoietic stem cell self-renewal and expansion
Genes & Dev. 2011. 25: 1928-1942
- Pfaffl MW (2001)
A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR
Nucleic acid research. 29, 2003-07
- Polakis P (2012)
Wnt signaling in cancer.
Cold Spring Harb Perspect Biol. 2012 May 1;4(5).
- Pui CH, Mullighan CG, Evans WE, *et al.*, (2012)
Pediatric acute lymphoblastic leukemia: where are we going and how do we get there?
Blood. 2012 Aug 9;120(6):1165-74.
- Quentmeier, H., Zaborski, M., Drexler, H. G. (1997).
The human bladder carcinoma cell line 5637 constitutively secretes functional cytokines.
Leukemia research 21 (4): 343-350 .

- Qiang YW, Hu B, Chen Y, *et al.*, (2009)
Bortezomib induces osteoblast differentiation via Wnt-independent activation of β -Catenin/TCF signalling
Blood, 30 APRIL 2009 ,Vol 113, No 18
- Reed S, Staley EM, Mayginnes JP, *et al* (2006)
Transfection of mammalian cells using linear polyethylenimine is a simple and effective means of producing recombinant adeno-associated virus vectors,
Journal of Virological Methods, Volume 138, Issues 1–2, Pages 85-98
- Reister S, Kordes C, Sawitza I, *et al.*, (2010)
The epigenetic regulation of stem cell factors in hepatic stellate cells.
Stem Cells Dev. 2011 Oct;20(10):1687-99.
- Revet I, Huizenga G, Koster J, *et al.*, (2010)
MSX1 induces the Wnt pathway antagonist genes DKK1, DKK2, DKK3, and SFRP1 in neuroblastoma cells, but does not block Wnt3 and Wnt5A signalling to DVL3.
Cancer Lett. 2010 Mar 28;289(2):195-207.
- Reya T, Duncan AW, Ailles L, *et al.*, (2003)
A role for Wnt signalling in self-renewal of haematopoietic stem cells.
Nature. 2003 May 22;423(6938):409-14. Epub 2003 Apr 27.
- Rhee CS, Sen M, Lu D, *et al.* (2002)
Wnt and frizzled receptors as potential targets for immunotherapy in head and neck squamous cell carcinomas.
Oncogene 21, 6598–6605
- Rio, D. C., Clark, S. G., Tjian, R. (1985).
A mammalian host-vector system that regulates expression and amplification of transfected genes by temperature induction.
Science (New York, N.Y.) 227 (4682): 23-28
- Roman-Gomez J, Jimenez-Velasco A, Agirre X, *et al.*, (2004)
Transcriptional silencing of the Dickkopfs-3 (Dkk-3) gene by CpG hypermethylation in acute lymphoblastic leukaemia.
Br J Cancer 2004 Aug 16;91(4):707-13.
- Rosner F und Lee SL (1972)
Down's syndrome and acute leukemia: myeloblastic or lymphoblastic? Report of forty-three cases and review of the literature.
Am J Med. 1972 Aug;53(2):203-18.
- Rother K, Johne C, Spiesbach K, *et al.*, (2004)
Identification of Tcf-4 as a transcriptional target of p53 signalling
Oncogene. 2004 Apr 22;23(19):3376-84.
- Rountree CB, Barsky L, Ge S, *et al.* (2007)
A CD133-expressing murine liver oval cell population with bilineage potential.
Stem Cells 10, 2419-29
- Rubnitz JE (2012)
How I treat pediatric acute myeloid leukemia.
Blood. 2012 Jun 21;119(25):5980-8.
- Saegusa M, Hashimura M, Kuwata T, *et al.*, (2005)
Upregulation of TCF4 expression as a transcriptional target of beta-catenin/p300 complexes during trans-differentiation of endometrial carcinoma cells.
Lab Invest. 2005 Jun;85(6):768-79.
- Saegusa M, Hashimura M und Kuwata T (2012)
Sox4 functions as a positive regulator of β -catenin signaling through upregulation of TCF4 during morular differentiation of endometrial carcinomas
Laboratory Investigation (2012) 92, 511–521

- Sambrook J, Russell und Russell (2000)
Molecular Cloning, A Laboratory Manual 3. Auflage
Cold Spring Harbor Laboratory Press
- Sanger F, Air GM, Garell BG *et al.* (1977)
Nucleotide sequence of bacteriophage phi X174 DNA.
Nature. Bd. 265, S. 687–695
- Satoh S, Daigo Y, Furukawa , *et al.*, (2000)
AXIN1 mutations in hepatocellular carcinomas, and growth suppression in cancer cells by virus-mediated transfer of AXIN1.
Nat Genet. 2000 Mar;24(3):245-50.
- Schmidt-Ott KM, Masckauchan TN, Chen X, *et al.*, (2007)
beta-catenin/TCF/Lef controls a differentiation-associated transcriptional program in renal epithelial progenitors.
Development. 2007 Sep;134(17):3177-90.
- Shan BE, Wang M.X. und Li RQ. (2009).
Quercetin inhibit human SW480 colon cancer growth in association with inhibition of cyclin D1 and survivin expression through Wnt/beta-catenin signaling pathway.
Cancer Invest 27, 604–612.
- Sharma M, Jamieson C, Johnson M, *et al.*, (2012)
Specific armadillo repeat sequences facilitate β -catenin nuclear transport in live cells via direct binding to nucleoporins Nup62, Nup153, and RanBP2/Nup358.
J Biol Chem. 2012 Jan 6;287(2):819-31
- Shen YL, Luo Q, Guo YX, *et al.*, (2014)
Bone marrow mesenchymal stem cell-derived Wnt5a inhibits leukemia cell progression in vitro via activation of the non-canonical Wnt signaling pathway.
Oncol Lett. 2014 Jul;8(1):85-90. Epub 2014 May 7.
- Shmelkov SV, Jun L, St Clair, *et al.*, (2003)
Alternative Promoters regulate transcription of the gene that encodes stem cell surface protein AC133
Blood: 103 (6)
- Soundararajan S, Chen W, Spicer EK, *et al.*, (2008)
The nucleolin targeting aptamer AS1411 destabilizes Bcl-2 messenger RNA in human breast cancer cells.
Cancer Res. 2008;68:2358–65
- Srivastava M, McBride OW, Fleming PJ *et al.*
Genomic organization and chromosomal localization of ht ehuman nucleolin gene
JBC, 1990; Vol 265 No.25
- Staal FJ und Anton W. Langerak AW (2008)
Signaling pathways involved in the development of T-cell acute lymphoblastic leukemia
haematologica 2008; 93(4)
- Suh EK und Gumbiner BM (2003)
Translocation of beta-catenin into the nucleus independent of interactions with FG-rich nucleoporins.
Exp Cell Res.2003 Nov 1;290(2):447-56.
- Surmann-Schmitt C, Widmann N, Dietz U, *et al.*, (2009)
Wif-1 is expressed at cartilage-mesenchyme interfaces and impedes Wnt3a-mediated inhibition of chondrogenesis.
J Cell Sci. 2009 Oct 15;122(Pt 20)

- Suzuki H, Watkins DN, Jair KW, *et al.*, (2004)
Epigenetic inactivation of SFRP genes allows constitutive Wnt signaling in colorectal cancer.
Nat Genet. 2004 Apr;36(4):417-22. Epub 2004 Mar 14.
- Tabu K, Sasai K, Kimura T, *et al.*, (2008).
Promotor hypomethylation regulates CD133 expression in human gliomas.
Cell Res 2008; 18: 1037-1046.
- Tabu K, Kimura T, Sasai K, *et al.*, (2010)
Analysis of an alternative human CD133 Promotor reveals the implication of Ras/ERK pathway in tumor stem-like hallmarks.
Mol Cancer. 2010 Feb 19;9:39..
- Takagi M, Absalon MJ, McLure KG, *et al.*, (2005).
Regulation of p53 translation and induction after DNA damage by ribosomal protein L26 and nucleolin.
Cell 123: 49–63.
- Tajrishi MM, Tuteja R und Tuteja N, (2011)
Nucleolin, The most abundant multifunctional phosphoprotein of nucleolus
Commun Integr Biol. 2011 May-Jun; 4(3): 267–275.
- Tondreau T, Meuleman N, Delforge A, *et al.*, (2005)
Mesenchymal Stem Cells Derived from CD133-Positive Cells in Mobilized Peripheral Blood and Cord Blood: Proliferation, Oct4 Expression, and Plasticity
STEM CELLS Volume 23, Issue 8, pages 1105–1112, September 2005
- Ugrinova I, Monier K, Ivaldi C, *et al.* (2007)
Inactivation of nucleolin leads to nucleolar disruption, cell cycle arrest and defects in centrosome duplication.
BMC Mol Biol 8: 66
- Vakic T Lemke und G (2011)
Dominant negative isoforms of Tcf/Lef in development and disease
Cell cycle 10:24
- Valencia A, Román-Gómez J, Cervera J, *et al.*, (2009)
Wnt signaling pathway is epigenetically regulated by methylation of Wnt antagonists in acute myeloid leukemia.
Leukemia 2009 Sep;23(9):1658-66.
- Van Den Berg DJ, Sharma AJ, Bruno E, *et al.*, (1998)
Role of Members of the Wnt Gene Family in Human Hematopoiesis
1998 92: 3189-3202
- Veeck J, Wild PJ, Fuchs T, *et al.*, (2009)
Prognostic relevance of Wnt-inhibitory factor-1 (WIF1) and Dickkopf-3 (DKK3) Promotor methylation in human breast cancer
BMC Cancer 2009, 9:217
- Waalder J, Machon O, Tumova L, *et al.* (2012).
A novel tankyrase inhibitor decreases canonical Wnt signaling in colon carcinoma cells and reduces tumor growth in conditional APC mutant mice.
Cancer Res 72,2822–2832.
- Wang Y, Krivtsov AV, Sinha AU, *et al.*, (2010)
The Wnt/beta-catenin pathway is required for the development of leukemia stem cells in AML
Science. 2010 Mar 26;327(5973):1650-3. doi: 10.1126/science.1186624.
- Weeraratna A T, Jiang Y, Hostetter G, *et al.*, (2002)
Wnt5a signaling directly affects cell motility and invasion of metastatic melanoma.
Cancer Cell 1, 279–288 (2002).

- Weidner CI, Walenda T, Lin Q, *et al.*, (2013)
Hematopoietic stem and progenitor cells acquire distinct DNA-hypermethylation during in vitro culture.
Sci Rep. 2013 Nov 28;3:3372
- Wend P, Runke S, Wend K, *et al.*, (2013)
Wnt10B/ β -catenin signalling induces HMGA2 and proliferation in metastatic triple-negative breast cancer
EMBO Mol Med. 2013 Feb;5(2):264-79
- Wu CD, Chou HW, Kuo YS, *et al.*, (2012)
Nucleolin antisense oligodeoxynucleotides induce apoptosis and may be used as a potential drug for nasopharyngeal carcinoma therapy.
Oncol Rep. 2012;27:94-100
- Wu Y und Wu PY (2009)
CD133 as a marker for cancer stem cells: progresses and concerns
Stem Cells Dev. 2009 Oct;18(8):1127-34.
- Yamada T, Park CS, Shen Y, *et al.*, (2014)
G0S2 inhibits the proliferation of K562 cells by interacting with nucleolin in the cytosol.
Leuk Res. 2014 Feb;38(2):210-7.
- Yan D, Wiesmann M, Rohan M, *et al.*, (2001)
Elevated expression of axin2 and hnk4 mRNA provides evidence that Wnt/ β -catenin signaling is activated in human colon tumors.
Proc Natl Acad Sci U S A. 2001 Dec 18;98(26):14973-8.
- Yang SH, Li SL, Dong ZM, *et al.*, (2012)
Epigenetic inactivation of Wnt inhibitory factor-1 in human esophageal squamous cell carcinoma.
Oncol Res. 2012;20(2-3):123-30.
- Yin AH, Miraglia S, Zanjani ED, *et al.* (1997)
AC133, a novel marker for human hematopoietic stem and progenitor cells.
Blood 1997 Dec 15;90(12):5002-12.
- You H, Ding W und Rountree CB (2010)
Epigenetic regulation of cancer stem cell marker CD133 by transforming growth factor- β .
Hepatology.2010 May;51(5):1635-44.
- Ysebaert L, Chicanne G, Demur C, *et al.*, (2006)
Expression of β -catenin by acute myeloid leukemia cells predicts enhanced clonogenic capacities and poor prognosis.
Leukemia 2006 Jul;20(7):1211-6. Epub 2006 May 11.

9 Danksagung

Die Durchführung dieser Arbeit fand im Rahmen folgender Drittmittelprojekte statt:

Deutsche Forschungsgemeinschaft -Forschungsprojekt GR 3581/2-1 (Projektleiter Dr. E. Grinstein), sowie

Deutsche José Carreras Leukämie-Stiftung - Forschungsprojekt DJCLS R 12/32 (Projektleiter Dr. E. Grinstein).

Ich danke in erster Linie Herrn Prof. Borkhardt für die Möglichkeit diese Arbeit im KMT-Labor der Kinderklinik anfertigen zu können, sowie die Begutachtung dieser Arbeit. Weiterhin danke ich Herrn Professor Gohlke für die Begutachtung der Arbeit von Seite der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät.

Herrn Dr. E. Grinstein möchte ich für das Anvertrauen des faszinierenden Themas und für die kontinuierliche Unterstützung bei der Durchführung der Doktorarbeit, in der Arbeitsgruppe Zelluläre Signalübertragung und Stammzellbiologie, sowie für seine Hilfsbereitschaft danken.

Herrn Sanil Bhatia möchte ich für die Zusammenarbeit und die Hilfsbereitschaft danken, sowie der Kultur der primären CD34⁺ Zellen und der Bereitstellung der cDNA transduzierter Mutz-2 und SEM Zellen für die Isoformanalysen (verwendet in 4.1.1-4.1.2 und 4.3.2**Fehler! Verweisquelle konnte nicht gefunden werden.**)

Dr René Martin Linka danke ich für die Hilfe beim Erlernen der *site directed mutagenesis* die für große Teile der Arbeit essentiell war.

Herrn Daniel Scholtyssik danke ich für die exzellente technische Unterstützung

Meiner Freundin Deborah danke ich von ganzen Herzen, da sie mir viel Kraft und Denkanstöße gegeben hat sowie für das Korrekturlesen dieser Arbeit.

Weiterhin danke ich allen Mitgliedern des KMT-Labors für ihre Hilfe sowie der einen oder anderen Ablenkung die den Spaß an der Laborarbeit noch verstärkt.

Zu guter Letzt geht der Dank an meine Eltern die mein Interesse für Naturwissenschaften immer unterstützt haben und mir alle erdenkliche Hilfe vor, während und nach dem Studium gegeben haben.

10 Erklärung

Hiermit erkläre ich vor Eides statt, dass die hier vorliegende Arbeit selbstständig verfasst und ohne ausdrücklich erwähnte Hilfe angefertigt wurde und keine Daten geschönt wurden. Die Arbeit wurde in dieser oder veränderter Form nicht an einer anderen Hochschule als Prüfungsarbeit vorgelegt.

Düsseldorf, den

Sven Reister

11 Lebenslauf

SVEN TOBIAS REISTER

PERSONALIA

Familienstatus: Ledig
Nationalität: Deutsch
Geburtsdatum: 18.06.1984

BILDUNGSWEG

Heinrich Heine Universität Düsseldorf
Klinik für Kinder-Onkologie,-Hämatologie und Klinische Immunologie
Promotion zum Thema Untersuchungen zum Einfluss von Nucleolin auf die Regulation
stammzellassoziierter Gene in hämatopoetischen Zellen **2010-2014**

Heinrich Heine Universität Düsseldorf
Experimentelle Hepatologie, Klinik für Gastroenterologie, Hepatologie und Infektiologie
Diplomarbeit **2009-2010**
Untersuchungen zur Beteiligung von Stammzellen an der Leberregeneration im
Modellorganismus
Rattus norvegicus (Note 1,0)

Heinrich Heine Universität Düsseldorf
Biologiestudium **2007-2009**

Heinrich Heine Universität Düsseldorf
Biochemiestudium (Bachelor) **2004-2007**
Bachelorarbeit „Einfluss von CTCFL auf Proliferation und
Apoptose“

Theodor Heuss Gymnasium Essen
Abschluss Abitur (Note 2,6) **1994-2003**
Leistungskurse Deutsch und Biologie

12 Anhang

12.1 Verwendete Geräte

Name	Funktion	Hersteller
ABI 7900 HAT	Real Time PCR Gerät	Applied Biosystems, Darmstadt
Mastercycler gradient	PCR Gerät mit Gradient	Eppendorf, Hamburg
Gene Amp PCR System 2700	PCR Gerät	Applied Biosystems, Darmstadt
Biophotometer		Eppendorf, Hamburg
NanoDrop	Messung von Nukleinsäuren	Thermo, Darmstadt
pH Meter		WTW, Weilheim
Mirkoliterzentrifuge		Thermo, Darmstadt
Standzentrifuge		Thermo, Darmstadt
Großzentrifuge		Beckman, Krefeld
Axiovert 200	Inverses Zellkultur Mikroskop	Zeiss, Jena
Mini Protean Tetra Cell	Protein Elektrophorese Laufmodul	Biorad, München
Mini Trans Blot Cell	Protein Elektrophorese Blotmodul	Biorad, München
Novex Mini Cell	Protein Elektrophorese Laufmodul	Invitrogen, Frankfurt a.M.
Trans Blot Cell	Tank-Blot Modul	Biorad, München
Wide Mini Sub Cell GT	DNA Elektrophoresekammer	Biorad, München
V15.17 Maxi Gel	vertikale Elektrophorese	Biometra, Göttingen
Thermomixer comfort	temperierte Inkubation unter schütteln	Eppendorf, Hamburg
Luminoscan Ascent	Luminometer	Thermo, Darmstadt
Las 3000Mini	Chemoluminescent Dokumentation	GE-Healthcare, Frankfurt a.M.
FLA7000IR	Radiographie Dokumentation	GE-Healthcare, Frankfurt a.M.
Intas UV Gel Dok Mini	Agarosegel-Dokumentation	Intas, Göttingen
³² P Dokumentationsschirm	Detektion von ³² P-Signalen	GE-Healthcare, Frankfurt a.M.
Geltrockner	Trocknung von EMSA-Gelen	Thermo, Darmstadt
Infinite 200M	Plattenphotometer	Tecan, Langenfeld
FACS Calibur	Durchflussscytometer	Beckton Dickinson, Heidelberg

12.2 Für die Arbeit verwendete Kits

Name	Verwendung	Hersteller
RNeasy Mini Kit	Isolation von Gesamt- RNA	Qiagen (Hilden)
RNeasy Micro Kit	Isolation von Gesamt- RNA	Qiagen (Hilden)
DNeasy Blood and Tissue Mini Kit	Isolation genomischer DNA	Qiagen (Hilden)
Fast Plasmid Mini Kit	Isolation von Plasmid DNA	Machery-Nagel (Düren)
Nucleobond Xtra Maxi Kit	Isolation von Plasmid DNA	Machery-Nagel (Düren)
Nucleobond Xtra Maxi Kit EF	Isolation von Plasmid DNA	Machery-Nagel (Düren)
Nucleobond Xtra Midi Kit	Isolation von Plasmid DNA	Machery-Nagel (Düren)
Nucleobond Xtra Midi Kit EF	Isolation von Plasmid DNA	Machery-Nagel (Düren)
NucleoSpin Gel and PCR Clean-up	Aufreinigung von DNA Fragmenten aus Agarosegel	Machery-Nagel (Düren)
BioSpin P-30 Säulen	Aufreinigung von ³² P markierten DNA Fragmenten	Biorad (München)
DyeEx2.0	Aufreinigung von Fluoreszenz markierten DNA Fragmenten zur Sequenzierung	Qiagen (Hilden)
RNase Free DNase Set	Entfernung genomischer DNA aus RNA Proben	Qiagen (Hilden)

Quantitect Reverse Transcription Kit	Synthese von copyDNA	Qiagen (Hilden)
Quick change site directed Mutagenesis Kit	Gezielte Mutagenese von Plasmid DNA	Agilent (Waldbronn)
Rapid DNA Ligation Kit	Ligation von DNA Fragmenten	Roche (Penzberg)
Western Blot Detektionssystem ECL	Visualisierung von Signalen mittels Meerrettich-Peroxidase	GE-Healthcare, (Frankfurt a.M.)
PageR 10%-20% Mini Gel	Gradientengel	Lonza (Köln)
Luciferase Reporter Gene Assay	Promotorstudienmittels Luciferase Reporter	Roche (Penzberg)
Bradford Protein Assay	Bestimmung der Proteinkonzentration	Biorad (München)
Colloidal Blue Staining Kit	Visualisierung von Proteinbanden	Invitrogen (Darmstadt)

12.3 Verwendete Enzyme

Name	Verwendung	Hersteller
Taq Polymerase	Amplifikation von DNA Fragmenten	Qiagen (Hilden)
Phusion HF Master Mix	Amplifikation von DNA Fragmenten	NEB (Darmstadt)
<i>Pfu</i> Ultra HF DNA Polymerase	Amplifikation von DNA Fragmenten	Agilent (Waldbronn)
Power Sybr green PCR Master Mix	Sybr Green basierte qPCR	Invitrogen (Darmstadt)

12.4 Antikörperliste

Target	Spezies	Klon/	Hersteller
β-Aktin	Maus	AC-74	Sigma-Adrich (Taufkirchen)
GSK3-β	Kaninchen		NEB (Darmstadt)
pGSK3-β (Ser9)	Kaninchen		NEB (Darmstadt)
Aktives Beta Catenin	Maus	8E7	EMD Millipore
pan-Beta Catenin	Kaninchen		Santa Cruz (Heidelberg)
Nucleolin	Kaninchen		Edgar Grinstein
Nucleolin	Maus	MS-3	Santa Cruz (Heidelberg)
TCF-4	Maus	YY-71	Santa Cruz (Heidelberg)
FLAG	Maus	M2	Sigma-Aldrich (Taufkirchen)
EGFR	Kaninchen		Santa Cruz (Heidelberg)
normale Kaninchen IgG	Kaninchen		Santa Cruz (Heidelberg)
normale Maus IgG FITC	Maus	IS5-21F5	Miltenyi (Bergisch Gladbach)
normale Maus IgG PE	Maus	IS5-21F5	Miltenyi (Bergisch Gladbach)
normale Maus IgG APC	Maus	IS5-21F5	Miltenyi (Bergisch Gladbach)
DKK2	Kaninchen		Santa Cruz (Heidelberg)
Dkk3	Ziege		Abcam
MSX1	Kaninchen		Santa Cruz (Heidelberg)
CD133/1 APC	Maus	AC133	Miltenyi (Bergisch Gladbach)
CD133/1 PE	Maus	AC133	Miltenyi (Bergisch Gladbach)
CD34 FITC	Maus		BD
CD271 FITC	Maus	ME20.4-1.H4	Miltenyi (Bergisch Gladbach)
P75 NTR	Kaninchen		NEB (Darmstadt)
CD271 APC	Maus	ME20.4-1.H4)	Miltenyi (Bergisch Gladbach)

12.5 Verwendete Plasmide

12.5.1 Verwendete Plasmide für Reporterassays

Name	Funktion	Referenz
pGL3 enhancer	Luciferase Report-Leervektor	Promega
pGL3 CD133	CD133 Promotor Reporter	Bart Rountree
pGL3 control	konstitutiv aktiver Reporter	Promega
pGL3 CD133 Δ1	Reporter mit selektiver Bindestellen Deletion	selbst erzeugt
pGL3 CD133 Δ2	Reporter mit selektiver Bindestellen Deletion	selbst erzeugt
pGL3 CD133 Δ3	Reporter mit selektiver Bindestellen Deletion	selbst erzeugt
pGL3 CD133 Δ1Δ2	Reporter mit selektiver Bindestellen Deletion	selbst erzeugt
pGL3 CD133 Δ1Δ3	Reporter mit selektiver Bindestellen Deletion	selbst erzeugt
pGL3 CD133 Δ2Δ3	Reporter mit selektiver Bindestellen Deletion	selbst erzeugt
pCMVTab2B	Expressionsplasmid	Clontech
pCMVTag2B NCL	NCL-Expressionplasmid	Edgar Grinstein
pCMV Tag2B NCL-ΔN	NCL-ΔN-Expressionplasmid	selbst erzeugt
pUC19	Auffüllplasmid für Titrations	NEB
pGL4 TCF7L2	TCF7L2 Promotor-Reporter Konstrukt	selbst erzeugt
pGL4 TCF7L2 ΔA	Derivat mit selektiver Deletion Bindemotives A	selbst erzeugt
pGL4 TCF7L2 ΔB	Derivat mit selektiver Deletion Bindemotives B	selbst erzeugt
pGL4 TCF7L2 ΔAΔB	Derivat mit selektiver Deletion Bindemotives AB	selbst erzeugt
pGL4.10	Leervektor des TCF7L2 Reporters	Promega
pcDNA3.1	Leervektor	Invitrogen
pcDNA CTNNB1 S33Y	Expression der konstitutiv aktiven CTNNB1 Mutante S33Y	Addgene#
pcDNA-dNTCF4-Myc	Expression von ΔNTCF4	Addgene #

12.5.2 Verwendete Plasmide für die Herstellung lentiviraler Partikel

Name	Funktion	Referenz
pMD2.G	Hüllplasmid 2. Generation	Addgene #12259
pCMVR8.74	Verpackungsplasmid 2. Generation	Addgene # 22036
p125	Verpackungsplasmid 3. Generation	Dr. Julia Hauer
p126	Verpackungsplasmid 3. Generation	Dr. Julia Hauer
p127	Hüllplasmid 3. Generation	Dr. Julia Hauer
pCDHT2A LNGFR	Expressions-Leervektor	System Bioscience
pCDH NCL T2A Lngfr	NCL Expressionsvektor	Sanil Bhatia
pCDH ΔN T2A Lngfr	ΔN Expressionsvektor	Sanil Bhatia
pLenti X1 Puro	Kontrollvektor	Addgene #17297
pLenti Sh2 Puro	NCL shRNA 1	Sanil Bhatia
pLenti Sh4 Puro	NCL shRNA 2	Sanil Bhatia
pLenti sh8 Puro	off target shRNA	Sanil Bhatia
pGreen Fire Neo	lentiviraler Reporter-Leervektor	System Bioscience
pGreen Fire TCF RE Neo	lentiviraler Wnt-Reporter	System Bioscience

12.6 Verwendete Software und Datenbanken

Name	Funktion	Quelle
ApE-A plasmid Editor	in silico DNA Manipulation	M. Wayne Davis
Sequencher	Auswertung von Sequenzierungen	Genecodes
BioGPS	Gen-Expressionsdatenbank	www.BioGPS.org
Multi Gauge	Densitometrie von Gelen	GE-healthcare
Flowo	FACS-Auswertung	FlowJo LLC
Cell-Quest	FACS-Auswertung	BD

12.7 Verwendete DNA Oligonukleotide

12.7.1 Analyse von Genexpression mittels qRT-PCR

Name	Sequenz 5'-3'	Amplifikat	Tm
β -Aktin for	GCACTCTTCCAGCCTTCC	351 bp	55
β -Aktin rev	CTAGAAGCATTGCGGTG		
NCL for	GATCACCTAATGCCAGAAGCCAGCCATCC	297 bp	55
NCL rev	CAAAGCCGCCTCTGCCTCCACCAC		
CTNNB1 for	TGGAACATGAGATGGGTGGC	175 bp	60
CTNNB1 rev	TGCAAGTTCAGACAATACAGCTAA		
TCF7L2 for	CGATTGAACACCAGATTGCAGTTCAG	982 bp	61
TCF7L2 rev	CTGCACGGTTTGCACCATAAAG		
CD133 1a for	GGCCATGCTCTCAGCTCT	285 bp	55
CD133 1a rev	TTCCCGCACAGCCCAGCAGCAACAG		
CD133 1b for	GAGGAAGCCGCAACGGGTCC	497 bp	58
CD133 1b rev	CCCAGCAGCAACAGGGAGC		
CD133 all for	ACTATGAAGCAGGGATTATTCTATG	217 bp	58°C
CD133 all rev	CCATAGAAGATGCCAATGCTTA		
DKK1 for	TTGACAACCTACCAGCCGTACC	173 bp	58°C
DKK1 rev	TTTGCAGTAATCCCGGGGC		
DKK2 for	CTCTGGATGGTACTCGGCAC	124 bp	58°C
DKK2 rev	GGGTCTCCTTCATGCCCTTTTA		
DKK3 for	AGATGTTCCGCGAGGTTGAG	255 bp	58°C
DKK3 rev	CAGTCTGGTTGTTGGTTATCTTGT		
MSX1 for	AGAAGATGCGCTCGTCAAAG	144 bp	58°C
MSX1 rev	GGCTTACGGTTCGTCTTGTG		
CCND1 for	GGCAGCAGAAGCGAGAGC	285 bp	60°C
CCND1 rev	CTCGCAGACCTCCAGCATC		
γ -Catenin for	CCCTATGGAGATGACATGGATGC	206 bp	60°C
γ -Catenin for	GAAAAGCCTGCAAAGAGGGG		

12.7.2 Primer für Reporter copy Number Analyse

Name	Sequenz	Amplifikat	Tm
36B4 for	CAGCAAGTGGGAAGGTGTAATCC	75 bp	58°C Cawthon, 2002
36B4 rev	CCCATTCTATCATCAACGGGTACAA		
Neo for	CAAGATGGATTGCACGCAGG	249 bp	58°C
Ne0 rev	TTCAGTGACAACGTCGAGCA		

12.8 Verwendete E.coli Stämme

Stamm	Genotyp
Stabl 3	F ⁻ mcrB mrrhsdS20(r _B ⁻ , m _B ⁻) recA13 supE44 ara-14 galK2 lacY1 proA2 rpsL20(Str ^R) xyl-5 λ leumtl-1
Top10-DH10 β	F ⁻ endA1 recA1 galE15 galK16 nupG rpsL Δ lacX74 Φ 80lacZ Δ M15 araD139 Δ (ara,leu)7697 mcrA Δ (mrr-hsdRMS-mcrBC) λ
XL10 gold	endA1 glnV44 recA1 thi-1 gyrA96 relA1 lac Hte Δ (mcrA)183 Δ (mcrCB-hsdSMR-mrr)173 tet ^R F'[proAB lacI ^q Z Δ M15 Tn10(Tet ^R Amy Cm ^R)]
BL21 DE3	F ⁻ ompT gal dcm lon hsdS _B (r _B ⁻ m _B ⁻) λ (DE3 [lacI lacUV5-T7 gene 1 ind1 sam7 nin5])

12.9 Puffer und molekularbiologische Medien

10x Oligo-Hybridisierungspuffer

500 mM NaCl
10 mM Tris-Cl, pH 8.0
1 mM EDTA, pH 8.0
100mM MgCL₂

ChIP Lysepuffer

1% SDS
10 mM EDTA
50 mM Tris-HCl pH 8,1

ChIP Dilution Puffer

0,01% SDS
1,1% TRriton-X-100
1,2 mM EDTA
16,7 mM Tris-HCl pH 8,1
150 mM NaCL

ChIP Blockierungspuffer

2,5% Milchplver in PBS

ChIP Low salt wash

0,1% SDS
1% Triton-X-100
2 mM EDTA
20 mM Tris-HCl pH 8,1
150 mM NaCL

ChIP High salt wash

0,1% SDS
1% Triton-X-100
2 mM EDTA
20 mM Tris-HCl pH 8,1
500 mM NaCL

ChIP LiCL Immun wash

250 mM LiCL
1% Igepal-CA630
1% Natriumdeoxycholat
1 mM EDTA
10 mM Tris-HCl pH 8,1

ChIP TE wash

1mM EDTA pH 8,0
10 mM Tris pH 8,0

ChIP Elution-Puffer

1% SDS
100mM NaHCO₃

6x DNA Ladepuffer

60mM Tris-HCl pH 7.0
60mM EDTA pH 8.0
60% Glyzerin
0,05% Xyclen Cyanol FF

TAE Puffer

40mM Tris
20mM Essigsäure
1mM EDTA pH 8.0

Emsa Bindepuffer

10 mM Tris pH 7,5
50 mM NaCl
4% Glyzerin
1 mM DTT
PMSF
Aprotinin
Leupeptin
Roche complete EDTA Free

Protein Stabilisierungspuffer

200 mM Tris pH 8.0
5 mM EGTA pH 8.0
5 mM EDTA pH 8.0
50 mM NaCl
4% Glyzerin
Roche Complete Protease Inhibitor 1X
10 µg/ml Aprotinin
10 µg/ml Leupeptin
10mM PMSF
1mM DTT

5x TBE Puffer

445 mM Tris
445 mM Borsäure
10 mM EDTA (pH 8.0)

STE Puffer

100mM NaCl
10mM Tris
1mM EDTA
1mM DTT

Natives TBE-Acrylamidgel

4% Acrylamid/Bisacrylamid (37,5:1)
1% APS
0,1% TEMED
22,25 mM Tris

22,25 mM Borsäure
0,5 mM EDTA (pH 8.0)

SDS-Acrylamid-Trenngel (10%)

10% Acrylamid/Bisacrylamid (37,5:1)
375 mM Tris pH 8,8
1% SDS
1% APS
0,05% Temed

SDS Sammelgel (4%)

4% Acrylamid/Bisacrylamid (37,5:1)
125 mM Tris pH 6,8
1% SDS
1% APS
0,1% Temed

Lämmli Laufpuffer

25mM Tris
191 mM Glycin
1% SDS

Lämmli Blotpuffer

25 mM Tris
191 mM Glycin

2x Lämmli DTT Ladepuffer

100mM Tris pH 6,8
4% SDS
200mM DTT
20% Glycerin
0,2% Bromphenolblau

TBS-T

137 mM NaCl
20 mM Tris-HCL pH 6,8
0,05 % Tween-20

PBS-T

137 mM PBS
2,7 mM
10 mM Na₂HPO₄
2 mM KH₂PO₄
0,05% Tween-20

RF1 Puffer

100 mM RbCl₂
50 mM MnCl₂
30mM KOAc
10mM CaCl₂

15% Glyzerin
pH 5,8

RF2 Puffer
10mM MOPS
10mM RbCl₂
75mM CaCl₂
15% Glyzerin
pH 6,8

Luria Bertani Medium (Lennox)
Trypton 10 g/L
Hefeextrakt 5 g /L
NaCl 5 g/L
pH 7,0

Luria Bertani Agar (Lennox)
Trypton 10 g/L
Hefeextrakt 5 g /L
NaCl 5 g/L
15 g/L Agar-Agar
pH 7,0

Terrific Broth modifiziert
Casein 12g/L
Hefeextrakt 24g/ L
K₂HPO₄ 53 mM
KH₂PO₄ 16 mM
4% Glyzerin

SOC-Medium
Trypton 20 g/L
Hefeextrakt 5 g/L
MgCL₂ 10mM
NaCl 10mM
Kcl 2mM
Glukose 20mM

FACS Puffer
PBS
1% FCS
0,05% Natriumazid

TE Puffer
1x SDS Laufpuffer
1x Blotpuffer