

Charakterisierung der Mikrotubulus-assoziierten PP2A und ihrer Zielproteine

DISSERTATION

zur Erlangung des akademischen Grades
doctor rerum naturalium

(Dr. rer. nat.)
im Fach Biologie

eingereicht an der
Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät I
der Humboldt-Universität zu Berlin

von

Diplom-Ingenieurin (FH) Sybille Ellen Krauß
geboren am 22.01.1978 in Berlin

Präsident der Humboldt-Universität zu Berlin
Prof. Dr. Jürgen Mlynek
Dekan der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät I
Prof. Thomas Buckhout, PhD

Gutachter: 1. Prof. Dr. Thomas Börner
2. Prof. Dr. Susann Schweiger
3. Prof. Dr. Rainer Schneider

eingereicht am: 27.05.2005

Tag der mündlichen Prüfung: 21.09.2005

Inhaltsverzeichnis

INHALTSVERZEICHNIS.....	2
EINLEITUNG	7
1. OPITZ SYNDROM	7
1.1 <i>Opitz Syndrom - Klinik</i>	7
1.2 <i>OS und MID1</i>	8
1.2.1 Mutationen im <i>MID1</i> -Gen verursachen OS	8
1.2.2 MID1-Protein	9
1.2.2.1 MID1 – Protein-Struktur	9
1.2.2.2 Die Funktion des MID1-Proteins	11
1.3 <i>Die Embryonalentwicklung des Menschen</i>	15
1.3.1 Die Embryonalentwicklung des Menschen in den ersten Wochen	15
1.3.2 Gastrulation und Organentwicklung	15
1.4 <i>Die Entwicklung der ventralen Mittellinie</i>	18
1.6 <i>Der MID1-α4-PP2A-Komplex und die Entwicklung der ventralen Mittellinie</i>	21
2. SHH-SIGNALTRANSDUKTION.....	23
2.1 <i>Die Hh-Signaltransduktionskaskade in Drosophila</i>	24
2.2 <i>Die SHH-Signaltransduktionskaskade im Säugetier</i>	26
2.3 <i>GLI-Proteine</i>	26
2.4 <i>SHH-Zielgene</i>	30
2.5 <i>Rolle der SHH-Signaltransduktionskaskade bei der Entwicklung der vorderen Mittellinie</i>	35
ZIEL DER ARBEIT.....	39
MATERIAL	40
1. KITS	40
2. VEKTOREN	40
3. PUFFER.....	41
4. CHEMIKALIEN	41
5. MARKER.....	44
6. MEDIEN.....	44
7. ENZYME	44
8. ANTIKÖRPER	45

9.EDV-PROGRAMME	46
METHODEN	47
1. KLONIERUNGEN / KONSTRUKTE.....	47
1.1 Bereitgestellte Vektoren zur Expression von GFP-GLI3-Fusionsproteinen in eukaryotischen Zelllinien	47
1.2 Herstellung der Vektoren zur eukaryotischen Expression von myc-GLI3- bzw. flag-GLI3-Fusionsproteinen	48
1.3 Herstellung der Vektoren zur eukaryotischen Expression von myc-MID1-Fusionsproteinen.....	48
1.4 Herstellung der Vektoren zur eukaryotischen Expression von α 4-V5-, myc- α 4- bzw. flag- α 4-Fusionsproteinen	49
1.5 Vektoren zur eukaryotischen Expression von myc-GLI1- bzw. myc-mGli2-Fusionsproteinen.....	49
1.6 Vektoren zur eukaryotischen Expression von V5-hFu-Fusionsproteinen	50
1.7 Primer.....	50
1.8 Polymerase Chain Reaction (PCR).....	51
1.9 Aufreinigung der PCR-Produkte	51
1.10 Restriktion	52
1.11 Agarosegel-Elektrophorese.....	52
1.12 DNA-Isolierung aus Agarose	53
1.13 Ligation	53
1.14 Transformation.....	53
1.15 Plasmid-DNA-Isolierung.....	54
1.16 Sequenzierung	54
1.17 In-vitro Mutagenese	55
2. ZELLKULTUR.....	55
2.1 Zelllinien.....	55
3. PROTEINBIOCHEMISCHE METHODEN	56
3.1 Transfektion und Immunfluoreszenz.....	56
3.2 Fluoreszenz-Mikroskopie / 3D-Mikroskopie / Lebendzellanalyse	57
3.3 Proteinbestimmung nach Bradford	58
3.4 Westernblot.....	59
3.4.1 Sodiumdodecylsulfat Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)	59
3.4.2 Westernblot	60

3.5 Transfektion / Zellfraktionierung	61
3.6 Transfektion / Immunpräzipitation / in-vitro Behandlungen.....	62
3.7 RNAi (RNA interference).....	63
3.8 Orthophosphat-Markierung	65
4. HERSTELLUNG EINES GLI3-ANTIKÖRPERS.....	66
4.1 Klonierung.....	66
4.2 Peptidexpression in <i>E. coli</i> und Aufreinigung.....	66
4.3 Coomassie Staining.....	67
4.4 Affinitätsreinigung der Antikörper.....	67
4.5 Dot Blot	68
5. SEMIQUANTITATIVE RT-PCR.....	70
5.1 Zellen / Behandlungen.....	70
5.2 RNA-Isolation aus Zellen	70
5.3 cDNA-Synthese.....	70
5.4 Semiquantitative RT-PCR	71
ERGEBNISSE	72
1. DIE INTRAZELLULÄRE LOKALISATION VON GLI3 IN ABHÄNGIGKEIT VON MIKROTUBULI	72
1.1 Die intrazelluläre Lokalisation von <i>GLI3</i>	72
1.2 Zerstörung der Mikrotubuli (MT) durch Colcemid beeinflusst die intrazelluläre Lokalisation von <i>GLI3</i>	74
1.3 Zerstören der Mikrotubuli durch Kälteschock.....	76
2. KOLOKALISATION VON GLI3 MIT MIKROTUBULI BZW. MIT DEM MIKROTUBULUS-ASSOZIIERTEN MID1-PROTEIN.....	80
2.1 Kolokalisation von <i>GLI3</i> mit Mikrotubuli.....	80
2.2 Kolokalisation von <i>GLI3</i> und <i>MID1</i>	82
3. VERÄNDERUNG DER INTRAZELLULÄREN LOKALISATION VON GLI3 DURCH VERÄNDERTE PROTEIN PHOSPHATASE 2A (PP2A)-AKTIVITÄT.....	83
3.1 Einfluss des $\alpha 4$ -Proteins auf die intrazelluläre Lokalisation von <i>GLI3</i>	83
3.1.1 Koexpression von <i>GLI3</i> und $\alpha 4$	83
3.1.2 <i>GLI3</i> Lokalisation nach „Knockdown“ von $\alpha 4$	86
3.2 Überexpression von <i>MID1-myc</i> hat keinen Einfluss auf die intrazelluläre Lokalisation von <i>GLI3</i>	88
3.3 Beeinflussung der Aktivität endogener PP2A durch Koexpression der B-Box1 des <i>MID1</i> -Proteins	92

3.4 Aufheben des B-Box1-Effekts durch Fostriecin	96
3.5 Effekt von PP2A-Inhibitoren auf die GLI3-Lokalisation	98
3.5.1 Behandlung mit dem PP2A Inhibitor „ocadaic acid“	99
3.5.2 Behandlung mit dem PP2A-Inhibitor Fostriecin.....	100
3.6 Induktion der Aktivität endogener PP2A durch Rapamycinbehandlung beeinflusst die GLI3-Lokalisation	102
3.6.1 Rapamycin-Effekt auf die intrazelluläre Lokalisation von GLI3.....	102
3.6.2 Aufheben des Rapamycin-Effekts auf die intrazelluläre Lokalisation von GLI3 durch Überexpression von $\alpha 4$ bzw. MID1	104
3.7 Proteasom-Inhibition mittels Lactacystin beeinflusst die GLI3-Lokalisation.....	108
3.8 Verifizierung der beobachteten Lokalisationseffekte mittels Westernblot	109
4. WELCHE KINASE BEEINFLUSST DIE INTRAZELLULÄRE LOKALISATION VON GLI3 ALS GEGENSPIELER VON PP2A?.....	112
5. SPEZIFITÄT DER BEOBACHTETEN LOKALISATIONSEFFEKTE	117
6. DIE INTRAZELLULÄRE LOKALISATION VON GLI3 WIRD DURCH PHOSPHORYLIERUNG VON FU REGULIERT	119
6.1 „Knockdown“ von Fu	119
6.2 Die Phosphorylierung von Fu wird durch PP2A und GSK3 β reguliert	121
6.2.1 Fu-Phosphorylierung in-vitro	121
6.2.2 Fu-Phosphorylierung in-vivo	122
6.2.3 Abhängigkeit der Fu-Phosphorylierung von endogener PP2A-Aktivität	123
6.2.4 Abhängigkeit der Fu-Phosphorylierung von GSK3 β	127
6.3 Phosphospezifische Modifikation von GLI3.....	130
6.3.1 GLI3-Phosphorylierung in-vitro	130
6.3.2 Identifizierung eines kürzeren GLI3-Fragments, dessen Lokalisation über PP2A bzw. GSK3 β reguliert wird.	132
6.3.2.1 Die durch GSK3 β beeinflusste Domäne liegt im C-Terminus des GLI3- Proteins.....	132
6.3.2.3 Phosphorylierungsstatus der GLI3-Fragmente (Aminosäure 586-1549 bzw. 18-1100)	134
6.4 Interaktion von Fu mit den GLI3-Fragmenten Aminosäure 586-1549 und Aminosäure 18-1100	136
7. WIRD DIE TRANSKRIPTIONELLE AKTIVITÄT VON ENDOGENEM GLI3 DURCH INHIBIERUNG VON GSK3 β BZW. INDUKTION VON PP2A BEEINFLUSST?	139

8. HERSTELLUNG EINES ANTI-GLI3-ANTIKÖRPERS.....	141
DISKUSSION	145
1. DIE INTRAZELLULÄRE LOKALISATION VON GLI3 HÄNGT VON DER INTEGRITÄT DER MIKROTUBULI AB.....	145
2. DIE INTRAZELLULÄRE LOKALISATION VON GLI3 – NICHT ABER DIE VON GLI1 UND GLI2 – WIRD ÜBER GSK3 β UND PP2A REGULIERT	146
3. DIE REGULATION DER INTRAZELLULÄREN LOKALISATION VON GLI3 IST PKA- UND SPALTUNGS-UNABHÄNGIG	149
4. NICHT ALLE ZELLEN REAGIEREN IN GLEICHER WEISE AUF DIE DURCHGEFÜHRTEN BEHANDLUNGEN	150
5. MID1-ÜBEREXPRESSION UND BEHANDLUNGEN MIT „OCADAIC ACID“ HABEN KEINEN EINFLUSS AUF DIE INTRAZELLULÄRE LOKALISATION VON GLI3	151
6. RAPAMYCIN-BEHANDLUNG FÜHRT ZUR AKKUMULATION DES GLI3 IM CYTOSOL.....	153
7. LiCl-BEHANDLUNG FÜHRT ZUR REDUKTION DER PTCH1-EXPRESSION.....	154
8. DELETIONSKONSTRUKTE.....	156
9. PP2A / GSK3 β -ABHÄNGIGE REGULATION VON GLI3 – IMPLIKATION IN DIE ENTWICKLUNG DER VENTRALEN MITTELLINIE.....	157
10. DER MID1 / α 4 / PP2A-KOMPLEX UND DIE INTERAKTION MIT GLI3 / FU – TREFFPUNKT VIELER SIGNALTRANSDUKTIONSKASKADEN.....	160
11. VERGLEICH MIT DER HH-SIGNALTRANSDUKTIONSKASKADE IN DROSOPHILA	163
12. MODELL	164
ZUSAMMENFASSUNG	167
LITERATURVERZEICHNIS	168
ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS.....	178
DANKSAGUNG	182
PUBLIKATIONEN	183
ZUR PUBLIKATION EINGEREICHT	183
LEBENS LAUF	184
SELBSTÄNDIGKEITSERKLÄRUNG	185

Einleitung

1. *Opitz Syndrom*

1.1 Opitz Syndrom - Klinik

Das Opitz BBB/G Syndrom (OS) ist eine genetisch bedingte, heterogene Erkrankung des Menschen, die durch Defekte der vorderen Mittellinie charakterisiert ist. Das OS wurde erstmals von John Opitz beschrieben. Ursprünglich wurde zwischen BBB- und G-Syndrom unterschieden, wobei das BBB-Syndrom durch Lippen-Kiefer-Gaumenspalte und mentale Retardierung (Opitz J, 1969b) und das G-Syndrom durch gastrointestinale Defekte (Opitz J, 1969a) gekennzeichnet war. Nachfolgende Berichte von Familien, in denen beide Syndrome auftraten, deuteten darauf hin, dass beide Syndrome eine klinische Einheit darstellen. Die Buchstaben in den Bezeichnungen der Krankheiten (BBB/G) resultieren aus den Initialen der Familien, in denen die Erkrankung erstmals beschrieben wurde. Folgende Symptome charakterisieren OS:

- 1) fazial: Hypertelorismus, breiter Nasenrücken, Lippen-Kiefer-Gaumenspalte
- 2) gastrointestinal: Ösophagotracheale Fistel, Dysphagie, imperforierter Anus
- 3) kardiovaskulär: Atembeschwerden, angeborene Herzfehler
- 4) urogenital: Hypospadie, imperforiertes Hymen
- 5) Hirnanomalien, Entwicklungsstörungen, Agenesie des Corpus callosum, mentale Retardierung.

Die Patienten zeigen kein einheitliches Krankheitsbild, da die verschiedenen Symptome unterschiedlich stark ausgeprägt sein können. Auch innerhalb einer Familie können sich die Phänotypen bei Patienten mit der gleichen Mutation sehr unterschiedlich ausprägen.

1.2 OS und MID1

1.2.1 Mutationen im *MIDI*-Gen verursachen OS

Anhand der Stammbäume von Familien, in denen OS diagnostiziert wurde, wurden zwei verschiedene Formen der Vererbung von OS ermittelt: ein X-chromosomal-rezessiver und ein autosomal-dominanter Erbgang. Mittels Kopplungsanalysen wurden zwei Genloci, die für die Erkrankung verantwortlich sind, identifiziert. Demnach kann der verantwortliche Gendefekt entweder auf Chromosom 22 (22q11.2) oder auf dem X-Chromosom (Xp22) liegen (Robin et al., 1995). Die beiden Formen der Erkrankung sind klinisch nicht voneinander zu unterscheiden.

Mittels Positionsklonierung wurde das *MIDI*-Gen (MID steht für midline) auf Xp22.3 identifiziert. Es wurde gezeigt, dass Mutationen in diesem Gen die X-chromosomal vererbte Form der Erkrankung verursachen (Quaderi et al., 1997).

Bei den bisher durchgeführten Mutationsanalysen in Patienten mit X-chromosomal gekoppeltem OS variierte der Anteil der Patienten, bei denen eine Mutation im *MIDI*-Gen gefunden wurde: Während So et al. (2005) und Cox et al. (2000) bei 75% der Familien mit X-chromosomalem Erbgang Mutationen im *MIDI*-Gen nachweisen konnten, fanden Gaudenz et al. (1998) nur in 36% der Familien eine Mutation im codierenden Bereich des *MIDI*-Gens.

Die Detektionsrate von *MIDI*-Mutationen in sporadischen OS-Fällen zeigt eine noch größere Diskrepanz. Während So et al. (2005) bei 15% der Patienten mit sporadischem OS Mutationen im *MIDI*-Gen detektierten, wurden von einer anderen Gruppe Gaudenz et al. (1998) in 6% und von einer weiteren Gruppe Cox et al. (2000) in 36% der Patienten mit sporadischem OS Mutationen im codierenden Bereich des *MIDI*-Gens gefunden.

1.2.2 MID1-Protein

1.2.2.1 MID1 – Protein-Struktur

Das *MID1*-Gen codiert für ein 72kDa großes Protein, das 6 Domänen umfasst (Abb.1.2.2.1.1) und zur Familie der RING(Really Interesting New Gene)-Finger Proteine gehört. MID1 gehört zur RBCC-Untergruppe der Familie der RING-Finger Proteine. Diese sind durch ein RBCC-Motiv, der Abfolge der folgenden Domänen gekennzeichnet: RING-Finger-Domäne, zwei B-Boxen und eine Coiled-coil-Domäne. Der Amino(N)-Terminus von MID1 ist durch eine RING-Finger-Domäne mit dem Cys-His-Motiv Cys-X₂-Cys-X₁₁-Cys-X-His-X₂-Cys-X₂-Cys-X₂₂-Cys-X₂-Cys charakterisiert, wobei X jede beliebige Aminosäure sein kann. RING-Finger-Domänen wird eine wichtige Rolle bei Proteininteraktionen zugeschrieben. Viele Proteine, die eine RING-Finger-Domäne enthalten, spielen bei biochemischen Prozessen, wie zum Beispiel bei der DNA-Bindung (Lovering et al., 1993), als Transaktivator bzw. Transrepressor [(Chapman und Verma, 1996) und (Satijn et al., 1997)], bei der RNA-Bindung (Elenbaas et al., 1996), bei der Metall-Ionen-Bindung (Roehm und Berg, 1997) oder bei der Protein-Bindung (Wu et al., 1996) eine Rolle. Viele der RING-Finger-Proteine binden E2-ubiquitinkonjugierende Enzyme und weisen eine E3-Ubiquitinligase-Aktivität auf (Joazeiro und Weissman, 2000), für die die RING-Finger-Domäne essentiell ist. Ein Beispiel für ein RING-Finger-Protein ist BRCA1. BRCA1 bildet über seine RING-Finger-Domäne Heterodimere mit BARD1, einem zweiten RING-Finger-Protein (Wu et al., 1996). Diese Heterodimere üben mit ihren RING-Finger-Domänen eine E3-Ubiquitinligase-Aktivität in Verbindung mit dem E2-Enzym UbcH5c aus (Hashizume et al., 2001). Mutationen in BRCA1, die in Patienten mit Brustkrebs gefunden wurden, inaktivieren diese Ubiquitinligase-Aktivität (Hashizume et al., 2001).

Die RING-Finger-Domäne des MID1-Proteins ist über eine Region von etwa 45 Aminosäuren mit den beiden B-Box-Domänen verbunden. Die B-Box-Domänen sind ebenfalls durch ein Cys-His-Motiv gekennzeichnet (Cys-X₂-His-X₇-Cys-X₇-Cys-X₂-Cys-X₅-His-X₂-His). Wie auch der RING-Finger-Domäne wird den B-Boxen eine Rolle bei Protein-Protein-Interaktionen zugeschrieben. Die Formierung von makromolekularen Proteinkomplexen wurde für viele Proteine, die ein RBCC-Motiv enthalten, beschrieben. So wurde zum Beispiel für das PML-Protein die Ausbildung von Multiproteinkomplexen beschrieben. Hier konnte außerdem gezeigt werden, dass dieses Protein über seine B-Boxen eine Dimerisierung eingehen kann (Borden et al., 1996). Für die B-Box1 des MID1-Proteins konnte eine Bindung

an das $\alpha 4$ -Protein, einer regulatorischen Untereinheit der PP2A, nachgewiesen werden (Trockenbacher et al., 2001). An die B-Box2-Domäne von MID1 schließt eine Coiled-coil-Domäne an, die etwa 100 Aminosäuren umfasst. Coiled-coils spielen in der Oligomerisierung von Proteinen eine wichtige Rolle. Für die Coiled-coil-Domäne des MID1 konnte gezeigt werden, dass diese sowohl eine Homodimerisierung des Proteins (Cainarca et al., 1999), als auch eine Heterodimerisierung mit dem verwandten MID2-Protein ermöglicht (Short et al., 2002).

Eine 60 Aminosäuren umfassende Region verbindet die Coiled-coil-Domäne mit einer FNIII-Domäne (fibronectin type III). FNIII-Domänen wurden in verschiedensten Proteinen wie zum Beispiel Zelladhäsions-Molekülen, Zytokinrezeptoren und Chaperonen nachgewiesen (Schweiger und Schneider, 2003). Wie auch das RBCC-Motiv können FNIII-Domänen bei Protein-Protein-Interaktionen eine wichtige Rolle spielen (Bork et al., 1994; Perry und Ashworth, 1999). Mutationen in FNIII-Domänen können zur Bildung von Aggregaten des betreffenden Proteins führen (Steward et al., 2002), was auch für das MID1-Protein gezeigt wurde (Schweiger et al., 1999).

Der C-Terminus des MID1-Proteins besteht aus einer B30.2-Domäne. B30.2-Domänen kommen sowohl in der Familie der RBCC-Proteine, als auch in nicht verwandten Proteinen, wie zum Beispiel dem Butyrophilin (Quaderi et al., 1997), vor. Obwohl vermutet wurde, dass B30.2-Domänen eine Untergruppe der SPRY-Domänen, welchen eine Rolle in der Regulation intrazellulärer Signale zugeordnet wird, darstellen, wurde der B30.2-Domäne des MID1-Proteins noch keine spezifische Funktion zugeordnet (Schweiger und Schneider, 2003). Allerdings könnte sie bei der Assoziation des Proteins an Mikrotubuli eine Rolle spielen (Schweiger et al., 1999).

Die meisten Mutationen (68%), die in OS Patienten gefunden wurden, sind im C-terminalen Bereich des MID1-Proteins lokalisiert (Abb.1.2.2.1.1). Die restlichen Mutationen sind über das Protein verteilt. Lediglich in der RING-Finger-Domäne wurden bisher keine Mutationen gefunden. Neben vielen Stop-Mutationen und Leserasterverschiebungen (68%) treten auch Aminosäure-Austausch-Mutationen (18%), Deletionen (14%) und Insertionen (3,6%) auf (Schweiger und Schneider, 2003).

Die PP2A ist eine der zentralen Serin/Threonin-Phosphatasen, die etwa 1% des Gesamtproteingehalts in der Zelle ausmacht. Sie ist für die Dephosphorylierung eines Großteils der Serin/Threonin-Phosphorylierungen verantwortlich [zusammengefasst in (Sontag, 2001)]. Biochemische und genetische Studien zeigten, dass PP2A ubiquitär stark exprimiert wird und in der Evolution auffallend konserviert ist. Deletionen des *PP2A*-Gens führen zu einem letalen Phänotypen in Hefen und Mäusen, was zeigt, dass PP2A essentiell ist. Das Herzstück der PP2A ist die katalytische Untereinheit (C-Untereinheit, PP2Ac), die ein 36kDa großes Protein umfasst. Diese katalytische Untereinheit dephosphoryliert in vitro eine große Anzahl an Substraten. Die katalytische C-Untereinheit assoziiert an die Untereinheiten A und B, welche die enzymatische Aktivität und Substratspezifität der PP2Ac regulieren. Während jeweils nur zwei Isoformen der A- und C-Untereinheiten (α und β) beschrieben wurden, gibt es eine große Anzahl an B-Isoformen. Ein Großteil der PP2A-Holoenzyme liegt in der Zelle in Form von ABC-Heterotrimeren vor [zusammengefasst in Sontag (2001)]. Das $\alpha 4$ -Protein bindet die katalytische Untereinheit der PP2A unabhängig von den A- und B-Untereinheiten (Murata et al., 1997). Die Aktivität der PP2Ac wird durch die Bindung an $\alpha 4$ reduziert (Nanahoshi et al., 1999; Raught et al., 2001).

Über die Bindung an $\alpha 4$ übt MID1 eine E3-Ubiquitinligase-Aktivität auf die Mikrotubulus-assoziierte PP2A aus und leitet damit deren ubiquitinabhängige Degradierung ein (Trockenbacher et al., 2001).

Die ubiquitinabhängige Degradierung eines Zielproteins gliedert sich in folgende Schritte: Ubiquitin reagiert zunächst mit einem ubiquitinaktivierenden Enzym (E1). Das E1-Enzym bildet ein Thiol-Ester mit der Carboxylgruppe des Gly76, und aktiviert damit den C-Terminus des Ubiquitins für einen nukleophilen Angriff. Das so aktivierte Ubiquitin bindet dann transient als Thiol-Ester an ein ubiquitinkonjugierendes Enzym (E2). Eine Ubiquitinligase (E3) transferiert dann das aktivierte Ubiquitin vom E2-Protein auf den Lysinrest des Zielproteins bzw. des schon vorhandenen Ubiquitins. An das Zielprotein wird auf diese Weise entweder ein Ubiquitin oder eine Ubiquitinkette angehängt (Abb.1.2.2.2.1). Die Ubiquitinierung markiert das Zielprotein zum Abbau durch das Proteasom oder durch Endocytose.

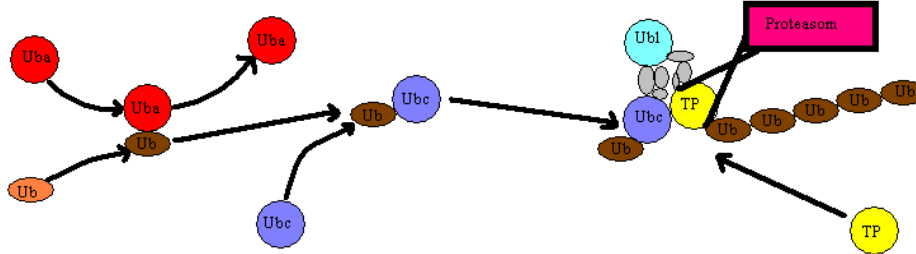


Abb.1.2.2.2.1: Darstellung der ubiquitinabhängigen Degeneration eines Zielproteins.
 Uba: ubiquitinaktivierendes Enzym, Ubc: ubiquitinkonjugierendes Enzym, Ub: Ubiquitin,
 Ubl: Ubiquitinligase, TP: Zielprotein

Während in den meisten Organismen (auch im Menschen) nur ein E1-Enzym bekannt ist, gibt es mehrere E2-Enzyme und eine sehr große Anzahl an E3-Enzymen. Über die E3-Enzyme wird die Spezifität des Abbau-Prozesses reguliert. Die E3-Enzyme teilen sich in zwei große Gruppen: HECT-E3s, Enzyme, die eine HECT-Domäne enthalten oder RING-E3s, Enzyme, die eine RING-Finger-Domäne aufweisen (Pickart, 2001). Bei den RING-E3s spielt die RING-Finger-Domäne bei der Übertragung des Ubiquitins auf das Zielprotein eine wichtige Rolle. Ein bekanntes Beispiel für ein solches RING-Finger Protein ist das Mdm2, ein Onkogen, das die Zellzyklus-Progression über ubiquitinvermittelte Degradierung von p53 reguliert (Honda et al., 1997; Honda und Yasuda, 2000).

Eine ähnliche Funktion wurde auch für die RING-Finger-Domäne des MID1-Proteins nahegelegt. Hier wird die Spezifität der E3-Ubiquitinligase-Aktivität von MID1 auf PP2Ac über die Bindung des $\alpha 4$ -Proteins an die B-Box1 vermittelt. Durch diese Bindung wird der Transfer von Ubiquitin auf die katalytische Untereinheit der PP2A eingeleitet, was zu deren proteasomabhängigen Degradierung führt (Abb.1.2.2.2.2) (Trockenbacher et al., 2001).

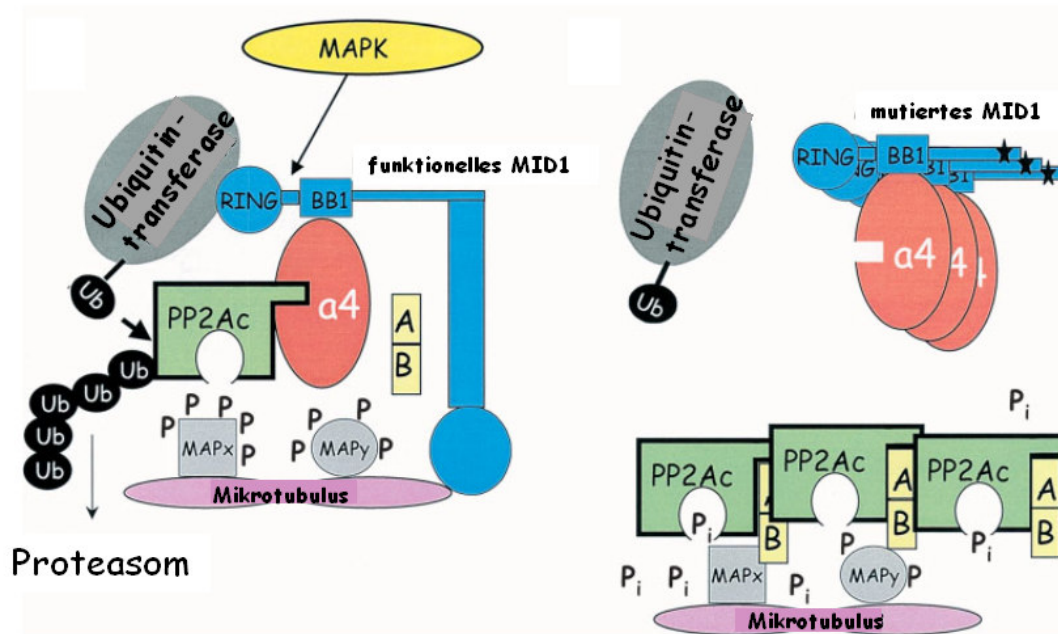


Abb.1.2.2.2.2: Modell der E3-Ubiquitinligase-Aktivität des funktionellen MID1-Proteins (links) sowie des mutierten (rechts) [nach (Trockenbacher et al., 2001)].

1.3 Die Embryonalentwicklung des Menschen

Da sich die Defekte der vorderen Mittellinie, wie sie in OS-Patienten beobachtet wurden, während der Embryonalentwicklung des Individuums manifestieren, wird im Folgenden die Embryonalentwicklung des Menschen zum besseren Verständnis zusammengefasst.

1.3.1 Die Embryonalentwicklung des Menschen in den ersten Wochen

Nach der Befruchtung beginnt die erste Furchungsteilung (Zellteilungen ohne G1- bzw. Wachstumsphase). Nach etwa drei Tagen ist der sich entwickelnde Embryo zu einer aus 16 Zellen bestehenden Kugel („Morula“) herangewachsen. Diese wird von einer festen Hülle, der Zona pellucida, umgeben. Nach dem 3. Tag beginnt der Embryo Flüssigkeit aus der Umgebung aufzunehmen und im Inneren eine mit Flüssigkeit gefüllte Höhle, das Blastocoel, auszubilden. Die Blastula wird gebildet. Diese besteht aus einer kugelförmigen einschichtigen Zelllage und einem Zellklumpen, der sich an einer Stelle im Inneren der Kugel befindet. Während sich aus dieser inneren Zellmasse der eigentliche Embryo entwickelt, entsteht aus der kugelförmigen Schicht der für die Versorgung des Embryos zuständige Trophoblast. Nach 6-7 Tagen ist der Embryo im Uterus angekommen und beginnt sich zu implantieren. Der Implantationsprozess nimmt etwa eine Woche in Anspruch, d.h. der Embryo ist 14 Tage nach der Befruchtung voll implantiert. In dieser Zeit wächst die Blastocyste heran und es bildet sich eine Keimscheibe, aus der sich später die Keimblätter entwickeln (Moore, 1988).

1.3.2 Gastrulation und Organentwicklung

Die Keimscheibe besteht aus zwei Schichten: den dorsal liegenden größeren Zellen, dem primären Ektoderm, das die äußere Haut, Sinnesorgane und das Nervensystem bilden wird, und den ventral liegenden kleineren Zellen, dem primären Entoderm, aus dem der spätere Darm heranwächst (Abb.1.3.2.1). Zwischen primärem Ektoderm und Trophoblast bildet sich die Amnionhöhle. In ähnlicher Weise bildet sich durch Aufspaltung die vom Entodermepithel umschlossene Höhle des Dottersacks. Die Grenze zwischen diesen beiden Hohlräumen ist das Keimschild. Bereits am 8. Tag treten an der Innenseite des Trophoblasten amöboid

bewegliche Mesenchymzellen auf, die sich stark vermehren, bis sie die ganze Keimblase von innen auskleiden (Abb.1.3.2.1) (Moore, 1988).

Um den Stoffaustausch und die Ernährung des Keims zu sichern, kommt es zu einer besonderen Differenzierung des Trophoblasten. Seine Oberfläche wird durch die Ausbildung eines reich verzweigten Zottennetzes stark vergrößert. Diese Zotten werden von embryonalem Bindegewebe und Blutgefäßen erfüllt; der Trophoblast ist damit zum Chorion (Zottenhaut) geworden. Das Chorion umgibt vorerst den ganzen Keim, wird jedoch im Lauf der Entwicklung bis auf den Bereich des Haftstiels, einem kleinen Bereich zwischen Amnionhöhle und Trophoblast, abgebaut. Hier bildet es gemeinsam mit Teilen der Gebärmutter Schleimhaut den Mutterkuchen, die Plazenta. Eine Primitivfurche wird angelegt, Zellmaterial wandert zwischen Ektoderm und Entoderm ein und wird zum embryonalen Mesoderm sowie zur Chorda. Die Materialverschiebung setzt am Vorderende des Keims ein und wandert unter gleichzeitiger Streckung und fortschreitender Einstülpung immer neuen Chorda-Mesoderm-Materials bis zum Hinterende des Keimschildes. Noch während der Streckung bilden sich über der Chorda die ektodermalen Neuralwülste. Ihre Schließung zum Neuralrohr, der Anlage für Gehirn und Rückenmark, beginnt etwa an Tag 24 des sich entwickelnden Embryos (Abb.1.3.2.1). Aus dem Neuralrohr wandern Zellen, die Neuralleistenzellen, aus. Diese können die Entwicklung verschiedener Organe in der Peripherie des Körpers induzieren. Entlang der Chorda bzw. des Neuralrohrs bilden sich Somiten (Mesodermkugeln, die den Körper deutlich segmentieren). Aus jedem Somit geht ein entsprechender Teil Muskulatur, ein Wirbel und ein Unterhautbereich (Lederhaut) der äußeren Haut hervor. Erst jetzt gewinnt der Embryo immer mehr an Gestalt. Ein Kopf- und Schwanzende wird erkennbar. Aus dem Mesoderm bildet sich ein Gefäßsystem, das über die Plazenta mit der Gebärmutter Schleimhaut der Mutter verbunden ist. Am Ende der 7. Woche kann man praktisch alle Organe deutlich erkennen (Moore, 1988).

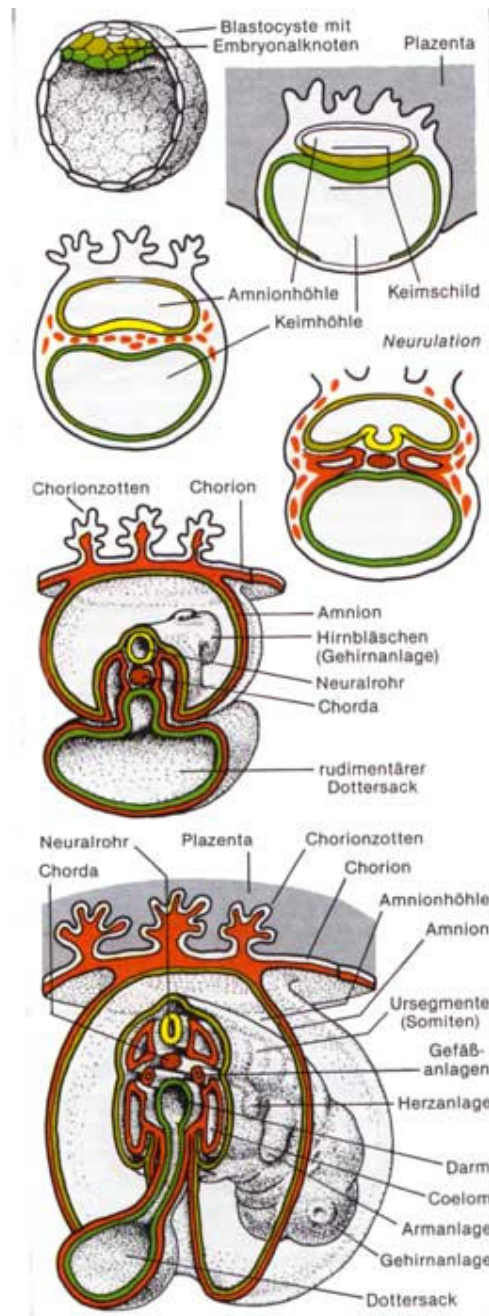


Abb.1.3.2.1: Embryonalentwicklung des Menschen (Abb. www.vobs.at/bio/evol/e09-embryogenese.htm)

1.4 Die Entwicklung der ventralen Mittellinie

Die Entwicklung der vorderen Mittellinie des Menschen ist ein komplexer Vorgang. Viele entscheidende molekulare Mechanismen, die der Entwicklung der vorderen Mittellinie zu Grunde liegen, sind noch weitgehend unerforscht. Gemeinsame Prozesse, die bei der Entwicklung aller Strukturen der vorderen Mittellinie eine Rolle spielen, sind die Migration von Neuralleistenzellen, die epithelial-mesenchymale Transition (EMT) und der programmierte Zelltod (Schweiger und Schneider, 2003).

Das Zusammenspiel dieser Prozesse in der Entwicklung der vorderen Mittellinie soll anhand der Gesichtsentwicklung exemplarisch erläutert werden:

Schon in der 4. Woche treten um die ektodermale Mundbucht herum fünf Gesichtsfortsätze auf (Abb.1.4.1):

Der unpaare Stirnforsatz, der die obere Begrenzung der ektodermalen Mundbucht darstellt;

Die paarigen Oberkieferfortsätze an der lateralen Seite der ektodermalen Mundbucht;

Die paarigen Unterkieferfortsätze an der unteren Begrenzung der ektodermalen Mundbucht (Moore, 1988).

Zum Zeitpunkt der Ausbildung des Neuralrohrs wird in den Neuralleistenzellen ein verändertes Programm der Genexpression initiiert, das zur Auflösung der Zell-Zell-Adhäsionskomplexe und zur Veränderungen im Cytoskelett der Zellen führt. Dadurch werden diese Epithelzellen zu mesenchymartigen Zellen umgewandelt (Ectomesenchym). Dieser Prozess wird als epithelial-mesenchymale Transition (EMT) bezeichnet (Cox, 2004). Die Ausbildung der fünf Gesichtsanlagen wird durch die Immigration von solchen Neuralleistenzellen induziert (Ectomesenchym). Die Entwicklung des Gesichts erfolgt hauptsächlich zwischen der 5. und der 8. Woche. Zunächst wachsen die Unterkieferfortsätze aufeinander zu und verschmelzen an ihren medialen Enden. Im unteren Bereich des Stirnforsatzes bildet sich beiderseits eine ovale Ektodermverdickung, die sogenannte Riechplakode (Abb.1.4.1). An den Rändern dieser Riechplatte proliferiert das Mesenchym und bildet dadurch den medialen und lateralen Nasenforsatz. Die Oberkieferfortsätze wachsen aufeinander zu und verschmelzen mit der lateralen Nasenwulst (Moore, 1988). Zeitgleich wandern die Augenanlagen von beiden Seiten nach vorne.

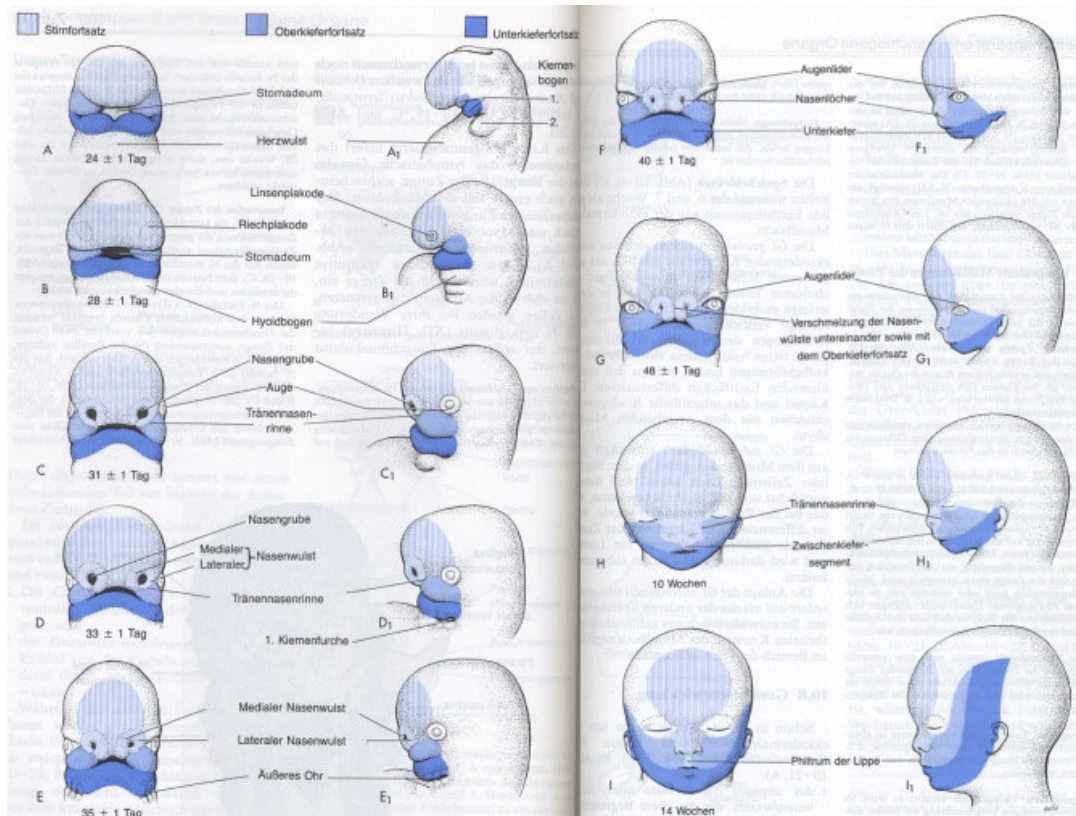


Abb.1.4.1: Gesichtsentwicklung des Menschen. Die fünf Gesichtsfortsätze: der unpaare Stirnfortsatz (blau-weiß gestreift), die paarigen Oberkieferfortsätze (hellblau) und paarigen Unterkieferfortsätze (dunkelblau) sind dargestellt [Abb. aus (Moore, 1988)].

Das Zusammenwachsen und Verschmelzen der Gesichtsfortsätze umfasst sowohl die Proliferation und Differenzierung der Ectomesenchymzellen als auch den programmierten Zelltod (Apoptose). Die Fusion der Gesichtsfortsätze ist in Abb.1.4.2 detailliert dargestellt und ist in 7 Stadien gezeigt. In Stadium 1 sind die Zellen eines Gesichtsfortsatzes kurz vor der Fusion gezeigt. Die aus den Neuralleisten eingewanderten Zellen sind von einer Basalzellen- und einer Epithelzellschicht überzogen. In Stadium 2 gehen einige der Epithelzellen in Apoptose. Die sterbenden Zellen werden ausgestoßen. In Stadium 3 werden die Zellkontakte der Epithelzellen gelockert und die Zellen beginnen sich aufzuwölben. In Stadium 4 werden von den Epithelzellen Filopodien gebildet, die den Kontakt zwischen den beiden Gesichtsfortsätzen herstellen. In Stadium 5 werden feste Zell-Zell-Kontakte zwischen den Epithelzellen der beiden Gesichtsfortsätze ausgebildet. Durch EMT werden die Epithelzellen in Stadium 6 und 7 in mesenchymartige Zellen umgewandelt und die hergestellte Verbindung zwischen den nun fusionierten Gesichtsfortsätzen verstärkt. Die während des Zusammenwachsens und Verschmelzens der Gesichtsfortsätze auftretende Differenzierung und Proliferation der aus den Neuralleisten stammenden Ectomesenchymzellen wird durch

eine Vielzahl von Signaltransduktionswegen gesteuert. Unter anderem umfasst dies Mitglieder der FGF (fetal growth factor) und BMP (bone morphogenic protein) Familien, sowie Bestandteile der SHH (sonic hedgehog) Signaltransduktionskaskade (Cox, 2004).

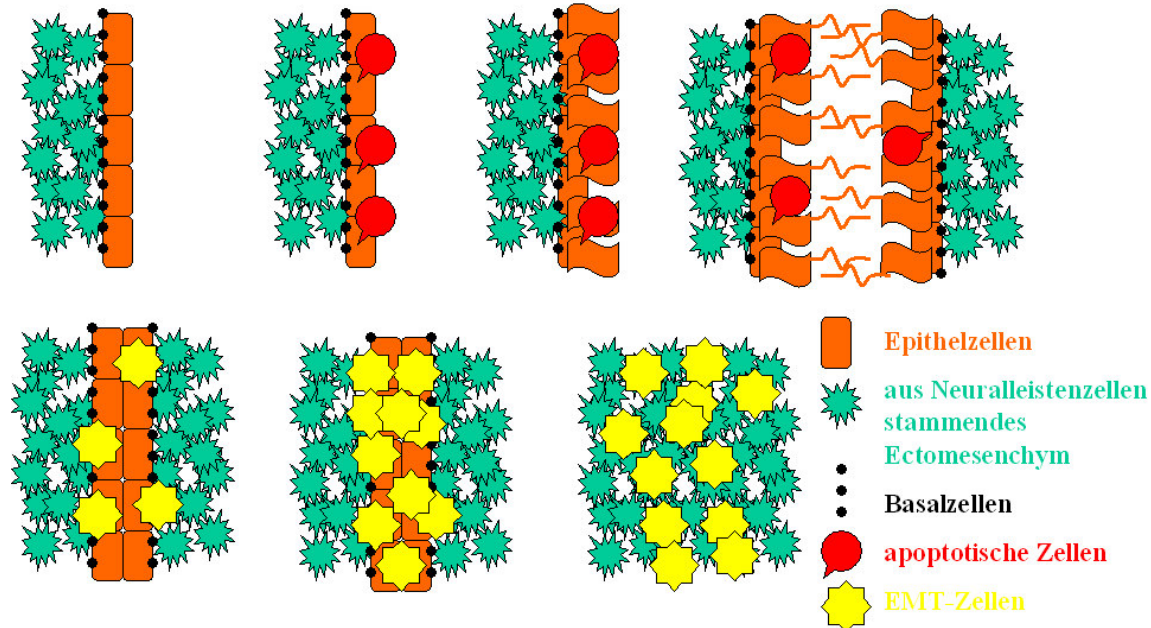


Abb.1.4.2: Sieben Stadien der Fusion der Gesichtsfortsätze. Obere Reihe: Stadium 1-4 von links nach rechts. Untere Reihe Stadium 5-7 von links nach rechts.

Bei defekter Gesichtsentwicklung können Lippen-Kiefer-Gaumen-Spalten entstehen. Diese sind mit einer Häufigkeit von 1 in 600 bis 1 in 1000 Neugeborenen eine der häufigsten kongenitalen Defekte. 70-90% der Patienten mit Lippen-Kiefer-Gaumen-Spalten zeigen keine weiteren Symptome, während die restlichen Fälle von Lippen-Kiefer-Gaumen-Spalten mit syndromischen Erkrankung wie dem OS in Verbindung gebracht werden (Cox, 2004). Die Entstehung von Lippen-Kiefer-Gaumen-Spalten kann sowohl genetisch bedingt als auch umweltbedingt sein. Die einzelnen Faktoren beeinflussen möglicherweise die Einwanderung des Neuralleistenmaterials in die embryonalen Gesichtsanlagen. Steht zu wenig Material zur Verfügung, kommt es zur Spaltbildung der Lippe und/oder des Gaumens (Moore, 1988). Ferner spielen der programmierte Zelltod und der Prozess des EMT bei der Fusion der Gesichtsfortsätze eine wichtige Rolle. Auch hier können Fehler in den genannten Prozessen zur Ausbildung von Lippen-Kiefer-Gaumen-Spalten führen. Mittels Positionsklonierung konnten zahlreiche Gene, die an der Entstehung von Syndromen mit Lippen-Kiefer-Gaumen-Spalten beteiligt sind, identifiziert werden (z.B. *PTCH1*, *MID1*, *MSX1*, *PVRL1*) (Cox, 2004).

1.6 Der MID1- α 4-PP2A-Komplex und die Entwicklung der ventralen Mittellinie

Der Phänotyp von Patienten mit OS wird durch Defekte der ventralen Mittellinie, wie zum Beispiel Lippen-Kiefer-Gaumen-Spalten, gekennzeichnet. Dies gibt den Hinweis darauf, dass bei Patienten mit OS fundamentale Prozesse in der Embryonalentwicklung der vorderen Mittellinie, wie zum Beispiel die EMT, die Migration der Neuralleistenzellen oder der programmierte Zelltod, gestört sind. Während der EMT werden das Aktin- und Mikrotubulus-Cytoskelett reorganisiert. Möglicherweise spielt hierbei das Mikrotubulus-assoziierte MID1-Protein eine wichtige Rolle. Hinweise hierfür liefern folgende Beobachtungen: MID1 ist im Neuroepithelium exprimiert, wo eine partielle Colokalisation des MID1 und einem Marker für Neuralleistenzellen beobachtet wurde (Richman et al., 2002). Dies könnte bedeuten, dass die MID1-Funktion für die EMT, die die Migration der Neuralleistenzellen vorbereitet, wichtig ist. Darüber hinaus wurde MID1-Expression in den proliferierenden und differenzierenden Zellen der aufeinanderzuwachsenden Gesichtsfortsätze beobachtet (Richman et al., 2002). Mutationen im MID1-Protein, die in OS-Patienten gefunden wurden stören die Mikrotubulus-Assoziation von MID1 (Schweiger et al., 1999), was auf eine mögliche Funktion des MID1-Proteins während der Reorganisation des Cytoskeletts in EMT-Zellen hindeutet. So vermittelt MID1 mittels seiner Ubiquitinligase-Funktion die Degradierung von PP2Ac. In OS-Patienten können Mutationen im MID1-Protein dazu führen, dass diese Funktion nicht mehr ausgeübt werden kann. Die Folge ist eine erhöhte PP2Ac-Aktivität und folglich eine Hypophosphorylierung ihrer Zielproteine (Trockenbacher et al., 2001), was eine Vielzahl Mikrotubulus-abhängiger Prozesse, wie zum Beispiel die Reorganisation des Cytoskeletts während der EMT, beeinflussen kann.

Weiterhin wurde MID1 eine regulatorische Funktion auf *BMP4* zugeordnet: demnach kann MID1 die Expression von *BMP4* induzieren (Granata und Quaderi, 2003). Die verstärkte Expression von *BMP4* ist für die Induktion der EMT wichtig.

Des weiteren beschrieben Granata und Quaderi et al. (2003) eine antagonistische Rolle von MID1 und SHH bei der Definition der Rechts-Links-Asymmetrie während der Embryonalentwicklung des Huhns. Auf der rechten Seite wird die *MID1*-Expression induziert, was zur Induktion der *BMP4*-Expression führt, das wiederum die Expression von *SHH* unterdrückt. Auf der linken Seite wird *SHH* exprimiert, was dort die *MID1*-Expression verhindert (Granata und Quaderi, 2003). Auch beim Menschen gibt es Hinweise auf eine

Verbindung zwischen MID1 und der SHH-Signaltransduktionskaskade: Patienten mit *SHH*-Mutationen haben Hypotelorismus, oder in Extremfällen Zyklopie, während Patienten mit *PTCH1*- oder *GLI3*-Mutationen Hypertelorismus haben. *PTCH1* und *GLI3* sind negative Regulatoren von SHH. OS Patienten haben ebenfalls Hypertelorismus. Granata und Quaderi et al. (2003) stellten die Hypothese auf, dass MID1 auch in der Embryonalentwicklung des Menschen SHH unterdrücken kann, da Funktionsverluste von SHH und MID1 im Menschen gegensätzliche Phänotypen hervorrufen.

2. SHH-Signaltransduktion

Der Hedgehog (Hh) Signaltransduktionsweg spielt eine wichtige regulatorische Rolle während der Embryonalentwicklung. Hh wurde zuerst in *Drosophila* bei einem Mutations-Screening gefunden, bei dem nach Genen, die an der Segment-Polarisation beteiligt sind, gesucht wurde.

Im Gegensatz zu *Drosophila* gibt es in Säugetieren 3 Hh-Homologe:

1. Sonic Hedgehog (SHH); SHH kontrolliert die Entwicklung des Neuralrohrs, der Extremitäten, der Somiten, des Darms und der Lungen und spielt eine Rolle bei der Ausbildung der Rechts-Links-Asymmetrie.
2. Indian Hedgehog (IHH); IHH wird im Darm und in Knorpelgeweben exprimiert und reguliert die Knochenbildung.
3. Desert Hedgehog (DHH); DHH wird vor allem im Testis exprimiert und spielt bei der Entwicklung der Keimzellen eine wichtige Rolle [zusammengefasst in Murone et al (1999)].

Die Hh-Signaltransduktionskaskade wurde in *Drosophila* am detailliertesten beschrieben, weshalb im Folgenden zunächst die Hh-Signaltransduktionskaskade in *Drosophila* und anschließend die SHH-Signaltransduktionskaskade im Menschen erklärt wird.

2.1 Die Hh-Signaltransduktionskaskade in *Drosophila*

In *Drosophila* sind zwei Transmembranproteine an der Aufnahme und Transduktion des Hedgehog-Signals beteiligt: Patched (Ptc) und Smoothed (Smo). Ptc ist der Hh-Rezeptor und ein negativer Regulator der Hh-Signaltransduktion. In Abwesenheit von Hh reprimiert Ptc Smo. Bindet Hh an Ptc, so wird dieses inaktiviert und Smo folglich aktiviert. Smo ist ein positiver Regulator der Hh-Signaltransduktionskaskade, und die Aktivität von Smo ist für die Transduktion des Hh-Signals notwendig. Die genauen Mechanismen der Transduktion des Hh-Signals wurden bislang nur ansatzweise erforscht. In Abwesenheit von Hh liegt ein Mikrotubulus-assoziiertes Komplex vor, der die Proteine Fused (Fu), Costal2 (Cos2), Suppressor of Fused (SuFu) und Cubitus Interruptus (Ci) umfasst. Die Assoziation an Mikrotubuli wird über Cos2 vermittelt. Ci ist ein Zink-Finger-Transkriptionsfaktor, der ein 9bp umfassendes Konsensus-Motiv in der Promotorregion der Hh-Zielgene bindet und somit deren Expression steuern kann. In Abwesenheit von Hh wird Ci proteolytisch gespalten, wobei das hierbei entstehende N-terminale Fragment in den Zellkern transportiert wird, wo es als Repressor auf Hh-Zielgene wirkt. Diese proteasomabhängige Spaltung des Ci involviert PKA (Protein Kinase A), GSK3 β (Glykogensynthasekinase 3 β), CKI (Casein Kinase I) und das F-Box/WD40 Protein Slimb (Proteine dieser Familie spielen bei der ubiquitinabhängigen Proteolyse spezifischer Phosphoproteine eine Rolle). In Antwort auf das Hh-Signal wird die Spaltung von Ci in die Repressorform unterdrückt. Der Proteinkomplex (bestehend aus Fu, Cos2, SuFu, Ci) löst sich von den Mikrotubuli und das ungespaltene Ci wird zu einem Transkriptionsaktivator modifiziert, der den Cofaktor CBP bindet und dann die Transkription der Hh-Zielgene aktiviert. Diese Modifikationen von Ci werden durch Fu und Cos2 positiv reguliert. SuFu ist der Gegenspieler von Fu und wirkt der Reifung von Ci in einen Transkriptionsaktivator entgegen (Abb.2.1.1) [zusammengefasst in Murone et al. (1999)].

Die genauen Mechanismen, die bei der Reifung des Ci in einen Transkriptionsaktivator beteiligt sind, sind noch weitgehend unerforscht. Es konnte jedoch gezeigt werden, dass Fu eine Kinase-Aktivität aufweist, die zur Ci-vermittelten Aktivierung der Expression von Hh-Zielgenen benötigt wird. Diese Kinase-Aktivität von Fu wird durch eine Phosphorylierung des Fu an der Aminosäure Thr158 induziert (Fukumoto et al., 2001). Ferner konnte nachgewiesen werden, dass Fu, wenn es durch Phosphorylierung aktiviert wurde, Cos2 phosphoryliert (Nybakken et al., 2002). Dieser Prozess erscheint notwendig, um den Proteinkomplex (Fu, Cos2, SuFu, Ci) von den Mikrotubuli zu lösen und somit die Reifung

von Ci in einen Transkriptionsaktivator zu ermöglichen. Ferner wurde gezeigt, dass die Regulation der intrazellulären Lokalisation von Ci für die Transduktion des Hh-Signals sehr wichtig ist. In Abwesenheit von Hh wird Ci proteolytisch gespalten und in den Kern transportiert. Nicht gespaltenes in den Kern transportiertes Ci wird jedoch wieder aus dem Zellkern ausgeschleust. Erst nach den in Antwort auf das Hh-Signal erfolgenden Modifikationen des Ci in den Transkriptionsaktivator wird das Verhältnis von Kern-Import und -Export verschoben, so dass der Transkriptionsaktivator im Kern lokalisiert wird [zusammengefasst in Ruiz (1999)].

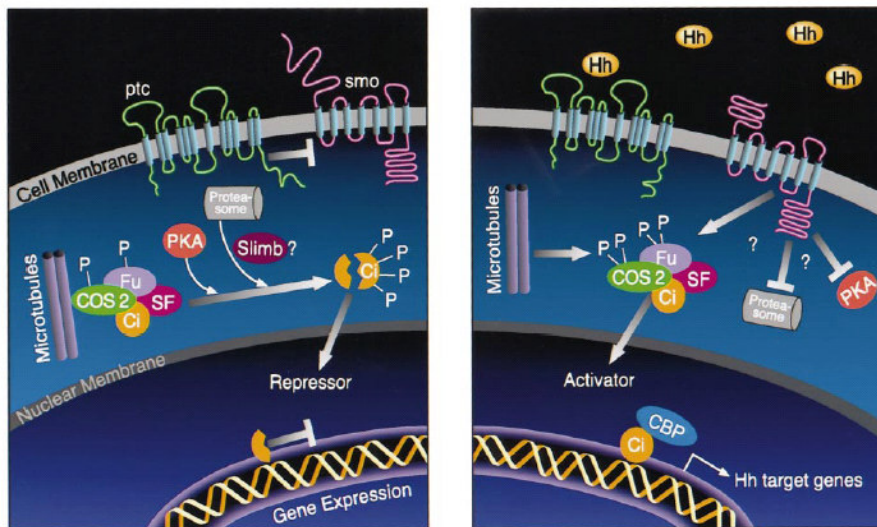


Abb.2.1.1: Darstellung der Hh-Signaltransduktionskaskade in Drosophila (Murone et al., 1999).

2.2 Die SHH-Signaltransduktionskaskade im Säugetier

Die Hh-Signaltransduktionskaskade ist im Interspeziesvergleich auffallend konserviert. Wie oben beschrieben gibt es drei Hh-Homologe (IHH, DHH, SHH) in Säugetieren. Das Transmembranprotein Ptc hat im Menschen zwei Homologe, PTCH1 und PTCH2, die sowohl SHH, DHH als auch IHH binden können. Da *PTCH2* vorwiegend in Spermatozyten exprimiert wird, ist dies vermutlich der Rezeptor für DHH [zusammengefasst in Murone et al. (1999)]. Im Folgenden soll die SHH-Signaltransduktionskaskade im Menschen näher erläutert werden. SHH wird zunächst durch eine Spaltung in zwei Fragmente geteilt. Das N-terminale Fragment wird mit einem Cholesterolrest fusioniert, und damit aktiviert. Das so aktivierte SHH kann dann an seinen Rezeptor PTCH1 binden, und diesen dadurch inaktivieren. PTCH1 ist ein negativer Regulator des SHH-Signalwegs und unterdrückt die Funktion des Transmembranproteins SMO. Bindet SHH an PTCH1 wird SMO aktiviert und erlaubt somit die Aktivierung der GLI-Transkriptionsfaktoren. Die GLI-Transkriptionsfaktoren GLI1, GLI2 und GLI3 sind die humanen Homologe von Ci in *Drosophila*. Die Transkriptionsfaktoren GLI1 und GLI3 binden beide an das Motiv GACCACCCA in der Promotorregion des jeweiligen Zielgens, während GLI2 das nahezu identische Motiv GAACCACCCA bindet, worüber die Expression der entsprechenden Gene gesteuert wird [zusammengefasst in Villavicencio et al. (2000)]. Während Homologe von Fu (Fu) und SuFu (SuFu) bekannt sind, konnte bislang kein Cos2-Homolog identifiziert werden. Erste Hinweise auf die Existenz eines Cos2-Homologs in Säugetieren fanden Y.Katoh und M.Katoh (2004), die anhand von in-silico-Analysen nahelegten, dass KIF27 das wahrscheinliche Cos2-Homolog ist.

2.3 GLI-Proteine

Die Transduktion des SHH-Signals auf die jeweiligen Zielgene wird durch die drei GLI-Transkriptionsfaktoren vermittelt. Wie das *Drosophila*-Homolog Ci enthalten die drei Proteine eine Zink-Finger-Domäne, die fünf Zink-Finger umfasst. Außerhalb der Zink-Finger-Domänen sind die drei GLI-Proteine untereinander, sowie im Vergleich zu Ci nur wenig konserviert (zwischen 21% Identität zwischen Ci und GLI1 und 39% Identität zwischen GLI2 und GLI3 auf Aminosäureebene) (Abb.2.3.1).

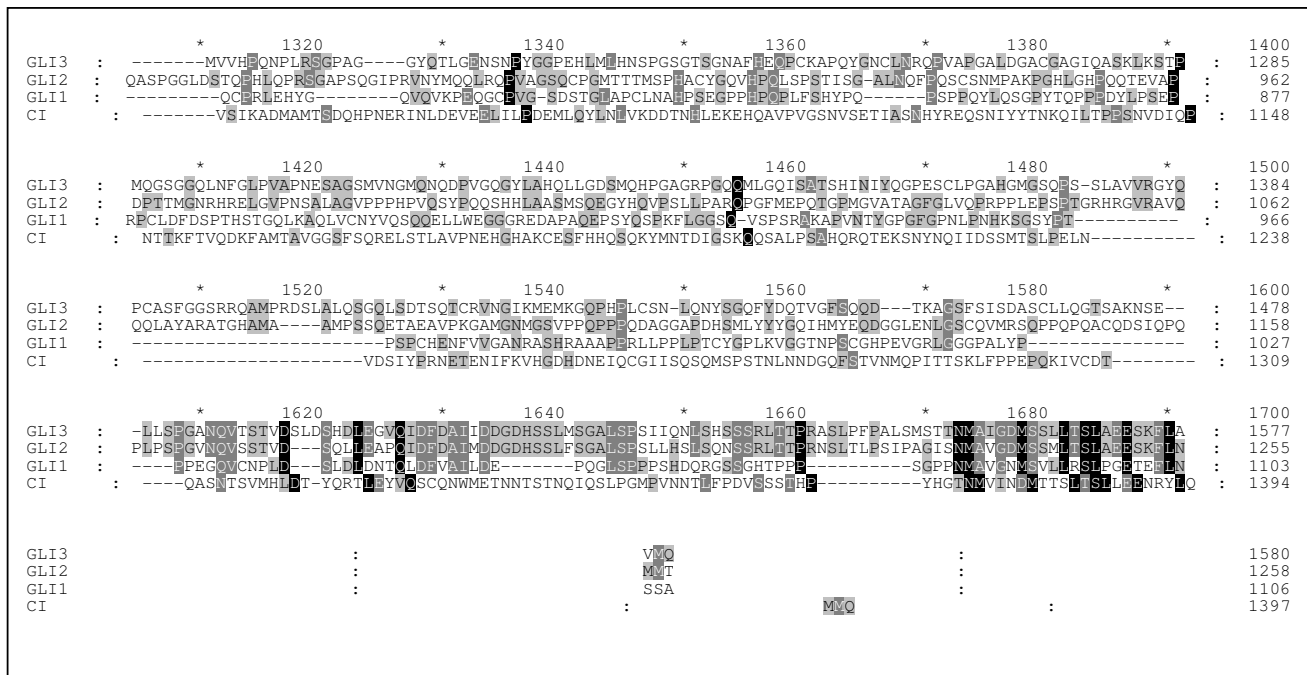


Abb.2.3.1: Sequenzvergleich der GLI-Proteine und Ci. Zwischen allen vier Proteinen identische Aminosäuren sind schwarz hervorgehoben, zwischen drei Proteinen identische Aminosäuren sind dunkelgrau hervorgehoben und zwischen zwei Proteinen identische Aminosäuren sind hellgrau hervorgehoben. Die Zink-Finger-Domänen sind durch eine rote Linie gekennzeichnet.

Viele Fragen bezüglich der Regulation der drei GLI-Proteine und deren Funktionen sind bislang unbeantwortet. In den letzten Jahren gab es zahlreiche Spekulationen darüber, ob die GLI-Proteine als Transkriptionsaktivatoren, -repressoren oder als beides wirken können. Für GLI1 konnte bislang nur eine Transkriptionsaktivator-Funktion nachgewiesen werden (Dai et al., 1999), während GLI2 und GLI3 sowohl Aktivator- als auch Repressor-Funktionen ausüben können (Dai et al., 1999; Sasaki et al., 1999; Wang et al., 2000). Weiterhin gibt es gegensätzliche Ergebnisse aus Analysen der intrazellulären Lokalisation der GLI-Proteine. Die intrazelluläre Lokalisation von GLI1 wurde von verschiedenen Forschungsgruppen untersucht. Die erzielten Ergebnisse zeigten, dass die Lokalisation in verschiedenen Zelllinien sehr unterschiedlich ist. Während GLI1 in humanen Tumorzelllinien sowohl im Cytosol als auch im Zellkern vorlag, wurde es in Tera-1 und D259MG-Zellen überwiegend im Zellkern und in Basalzellcarzinom-Zellen größtenteils im Cytosol nachgewiesen [zusammengefasst in Villavicencio et al. (2000)]. Die intrazelluläre Lokalisation von GLI3 wurde ebenfalls von verschiedenen Forschungsgruppen unterschiedlich beschrieben. Während Lee et al. (1997) GLI3 in COS-Zellen überwiegend im Cytosol beobachtete, fanden Shin et al. (1999), dass GLI3 in HeLa-Zellen ebenfalls cytoplasmatisch lokalisiert ist, und die Lokalisation durch verschiedene Mutationen verändert werden konnte. Zusätzlich wird seit Jahren das Auftreten

einer proteolytischen Spaltung der GLI-Proteine in mögliche Repressor-Formen, wie es für Ci beschrieben wurde, diskutiert. Während für GLI1 bislang kein Spaltungsprozess nachgewiesen werden konnte, gibt es verschiedene Studien, die eine Spaltung von GLI3 beschreiben. Wie bei Ci konnte für GLI3 gezeigt werden, dass eine PKA-abhängige Phosphorylierung eine Spaltung induziert (Wang et al., 2000). Durch diese Spaltung entsteht ein N-terminales Fragment, welches als Repressor auf SHH-Zielgene wirkt. Durch Analyse von GLI3-Deletionskonstrukten konnte die Repressor-Domäne von GLI3 im N-Terminus zwischen den Aminosäuren 1 und 397 lokalisiert werden (Dai et al., 1999; Sasaki et al., 1999). Weiterhin konnte gezeigt werden, dass GLI3 eine Aktivierungsdomäne enthält. In Anwesenheit von SHH wird die proteolytische Spaltung von GLI3 in einen Transkriptionsrepressor unterdrückt, und das ungespaltene GLI3 kann durch noch nicht erforschte Modifikationen in einen Transkriptionsaktivator umgewandelt werden. Deletionen der Aktivierungsdomäne zeigten, dass dieser Bereich von GLI3 sowohl für die Bindung an dessen Co-Aktivator CBP (CREB Binding Protein) als auch für die Aktivierung der Transkription seiner Zielgene verantwortlich ist (Dai et al., 1999) (Abb.2.3.2). Weiterhin wurde nahegelegt, dass die intrazelluläre Lokalisation der GLI-Proteine –wie für Ci beschrieben- bei der Transduktion des SHH-Signals von großer Bedeutung ist. Nach dem Modell von Ruiz (1999) wird in Abwesenheit von SHH die proteolytisch gespaltene Repressorform der GLI-Proteine in den Zellkern transportiert. In den Kern transportierte ungespaltene GLI-Proteine würden jedoch wieder aus dem Zellkern ausgeschleust. In Antwort auf das SHH-Signal würden dann die ungespaltenen GLI-Proteine modifiziert und das Gleichgewicht von Kern-Import und –Export zugunsten der Kernlokalisierung der Transkriptionsaktivatoren verschoben. Bisher konnte jedoch nur für GLI1 eine Abhängigkeit der intrazellulären Lokalisation vom Kern-Export bewiesen werden (Kogerman et al., 1999).

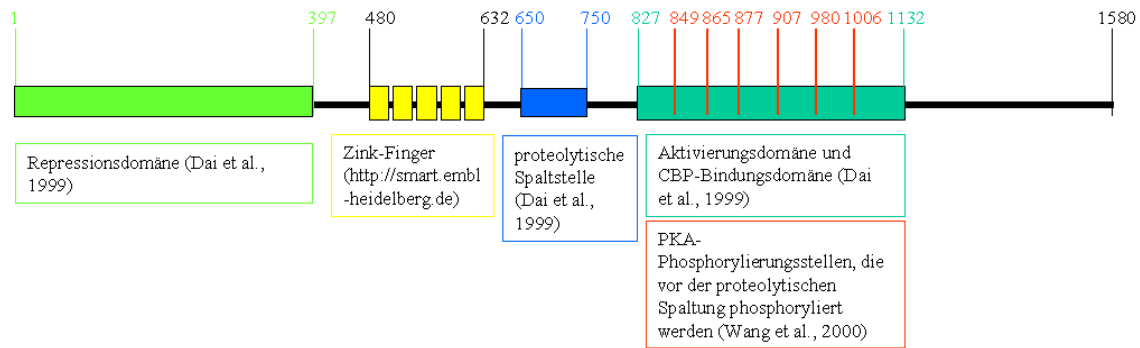


Abb.2.3.2: Darstellung der Struktur des GLI3-Proteins.

Zusätzlich zur Regulation der Aktivator- bzw. Repressoreigenschaften der GLI-Proteine reguliert SHH auch deren Transkription. Während durch SHH die Transkription von *GLI1* und *GLI2* induziert wird, unterdrückt es die Transkription von *GLI3*. Demnach werden GLI3 und SHH antagonistische Funktionen zugeordnet [zusammengefasst in Ruiz i Altaba (1999a)]. Um die Transkription von *GLI1* und *GLI2* durch SHH zu induzieren, müsste ein schon vorher vorhandener Faktor existieren, der eine Antwort auf das SHH-Signal zulässt. Hierfür wurde eine schwache, SHH-unabhängige Transkription der GLI-Proteine nahegelegt (Ruiz i Altaba, 1999a).

2.4 SHH-Zielgene

Die SHH-Signaltransduktionskaskade steuert die Expression zahlreicher Gene. Eine Zusammenfassung bekannter SHH-Zielgene ist in Tab.2.4.1 gegeben. Interessanterweise finden sich unter den SHH-Zielgenen auch Elemente der SHH-Signaltransduktionskaskade, wie zum Beispiel *PTCH1* und *GLI1*. Die Transkription beider Gene wird über GLI3 gesteuert. Weiterhin wird die Transkription von *HIP* (Hedgehog Interacting Protein) über den SHH-Signalweg reguliert. HIP wirkt als Repressor auf SHH. Durch diese Art der Selbstregulation von Bestandteilen des SHH-Signalwegs wird ein negativer „Feedback Loop“ erzielt [zusammengefasst in Ruiz (1999)]. Hierüber könnte nach induziertem SHH-Signal dafür gesorgt werden, dass das Signal nur zeitlich begrenzt an einem Zielort zu einer bestimmten Zellantwort führt und anschließend wieder abgeschaltet wird.

Tab.2.4.1: Darstellung bekannter SHH-Zielgene. Sowohl die Genloci als auch bekannte Krankheitsbilder, die mit Mutationen in den SHH-Zielgenen einhergehen, sind angegeben.

Gen	Publikation	Genlocus	durch Mutation in diesem Gen hervorgerufene Krankheit	reguliert über....
ANG-2 (angiopoietin 2)	(Pola et al., 2001)	8p23	Hepatozelluläre Karzinome, wichtig in Angiogenese in Karzinomen	-
Anti-mullerian hormone (Amh)	(Ingram et al., 2002)	12q13	Syndrom des persistierenden Müllerschen Gangs	-
BCL2	(Regl et al., 2004)	18q21.3	Dereguliert in B-Zell-Lymphomen	GLI2
BF-2 (=FOXG1A / Brain factor 2)	(Ingram et al., 2002)	14q11-q13	-	-
Bmp-2 (bone morphogenic protein 2)	(Laufer et al., 1994)	20p12	wichtig in der Knochenbildung, Fibrodysplasia ossificans progressiva	-
Bmp4	(Kawai und Sugiura, 2001)	14q22-q23	Überexprimiert in Patienten mit Fibrodysplasia ossificans progressiva	GLI1 und GLI3
Bmp7	(Kawai und Sugiura, 2001)	20	-	GLI1 und GLI3
Bmp-4 (bone morphogenic protein 4)	(Weaver et al., 2003)	14q22-q23	spielt wichtige Rolle in Entwicklung der Rechts-Links-Asymmetrie, wichtig in der Knochenbildung, Überexpression in Patienten mit Fibrodysplasia ossificans progressiva	-
CCND1 (G1/S-specific cyclin-D1)	(Oliver et al., 2003)	11q13	die mRNA-Menge von CCND1 ist in verschiedenen Karzinomen erhöht; von Hippel-Lindau Syndrom	-
CCND2 (G1/S-specific cyclin-D2)	(Yoon et al., 2002)	12p13	-	GLI1
COUP-TFII (COUP transcription factor II)	(Krishnan et al., 1997)	15q26	-	-
EMB (embigin)	(Yoon et al., 2002)	5q11.1	-	GLI1
Emx	(Theil et al., 1999)	-	-	GLI3
Fgf-4 (fibroblast growth factor-4)	(Hayes et al., 1998)	11q13.3	-	-
Fgf-8	(Aoto et al., 2002)	10q25-q26	-	GLI3
Foxc2 (Forkhead	(Yamagishi	16q12-	Syndrom mit Lymphödem,	-

box protein C2	et al., 2003)	16q24	Distichiasis und Ptosis	
Foxe1	(Eichberger et al., 2004)	9q22	Bamforth-Lazarus Syndrom, Hypothyroidismus, Athyroidal, mit Haarveränderungen und Gaumenspalten	GLI2
Foxf1	(Mahlapuu et al., 2001)	16q24	Kandidat für Fehlbildungen wie Ösophagotrachealfistel und Lungenanomalien	GLI2 oder GLI3
Foxm1	(Teh et al., 2002)	12p13	hochreguliert in Basalzellkarzinomen	GLI1
GILZ (Glucocorticoid-induced leucine zipper protein)	(Ingram et al., 2002)	Xp22.3	-	-
GLI1	(Dai et al., 1999; Ikram et al., 2004),	12q13.3-14.1	Überexpression induziert: Basalzellkarzinom, Cylindrom, Trichoblastom und Trichoepitheliom	GLI3 oder GLI2
HKI (Hexokinase I)	(Brewster, et al., 2000)	Gallus gallus Chromosom 6	-	GLI2
HIP (= HHIP / Hedgehog interacting Prot.)	(Ruiz, 1999)	4q28-q32	-	-
HNF-3 β (=Foxa2 / hepatocyte nuclear factor 3-beta)	(Sasaki et al., 1997)	20p11	-	GLI1
HoxD13 (homeobox protein Hox-D13)	(Hayes et al., 1998)	2q31-32	Synpolydaktylie durch Expansion einer Poly-Alanin-Region im HoxD13-Protein, intragene Deletionen führen zu Synpolydaktylie und zur Entwicklung rudimentärer Extra-Zehen, mutiert in Brachydaktylie-Patienten	-
IGF2 (insulin-like growth factor II)	(Ingram et al., 2002)	11p15.5	Transkripte vermehrt in Wilms-Tumor; Kandidat für Beckwith-Wiedemann Syndrom; IGF2 unterliegt normalerweise imprinting: bei Hochwuchs-Syndromen Transkription von beiden Allelen	-
IGFBP-6 (Insulin-like growth factor binding protein 6)	(Yoon et al., 2002)	12q13	-	GLI1
LASP1 (Lim und SH3 protein 1)	(Ingram et al., 2002)	17q11-q21.3	überexprimiert in Brustkrebs	-

Mf2 (Maus-Homolog von Foxd2)	(Wu et al., 1998)	Foxd2 1p34-p32	-	-
Mip1- γ (macrophage inflammatory protein 1-gamma)	(Ingram et al., 2002)	mouse 12	-	-
Myf5 (myogenic factor 5)	(Gustafsson et al., 2002)	12q21	-	-
N-myc (N-myc proto-oncogene protein)	(Oliver et al., 2003)	2p24.1	Überexpression in Neuroblastomen und Retinoblastomen	-
Nr4a1 (Orphan nuclear receptor NR4a1)	(Ingram et al., 2002)	12q13	-	-
osteopontin (SPP1)	(Yoon et al., 2002)	4q11-q21	erhöhte Transkriptmengen wurden im Gehirn von Patienten mit multipler Sklerose detektiert	GL1
pax3 (paired box protein Pax-3)	(Ericson et al., 1996)	2q35-37	alveolares Rhabdomyosarcom	-
PAX7 (paired box proteon Pax-7)	(Ericson et al., 1996)	1p36.2-p36.12	Rhabdomyosarcom-2	-
plakoglobin	(Yoon et al., 2002)	17q21	-	GLI1
Poliovirus receptor / CD155	(Solecki et al., 2002)	19q13.2	hochreguliert in Medulloblastomen, Glioblastomen und kolorektalen Karzinomen	GLI1 oder GLI3
PTCH1	(Agren et al., 2004)	9q22.3	Gorlin Syndrom	GLI3
SFRP1 (secreted frizzled-related protein 1)	(Ingram et al., 2002)	8p12-p11.1	-	-
SFRP2 (secreted frizzled-related protein 2)	(Ingram et al., 2002)	4q31.3	-	-
Sox14	(Hargrave et al., 2000)	3q22-q23	-	-
SWiP-1 (SOCS box-containing WD protein SWiP-1 = WSB1)	(Vasiliauskas et al., 1999)	17q11.2	-	-
Tbx1	(Yamagishi et al., 2003)	22q11.21	Kandidat für DiGeorge Syndrom	indirekt: SHH aktiviert Foxc2 und Foxa2, welche Tbx1

				induzieren
Thrombomodulin	(Ingram et al., 2002)	20p12-cen	könnte die Ursache von Thrombophilie sein	-
TSC22 (TGFB-stimulated clone)	(Yoon et al., 2002)	13q14	-	GLI1
USP7 (Ubiquitin carboxy-terminal hydrolase 7)	(Yoon et al., 2002)	16p13.3	deubiquitiniert und stabilisiert den Tumorsuppressor p53	GLI1
Wnt5a	(Mullor et al., 2001; Reddy et al., 2001)	3p21-p14	-	GLI1, GLI2, GLI3
Wnt7b	(Mullor et al., 2001)	22q13	hochreguliert in Tumoren	GLI1, GLI2, GLI3
Wnt7c	(Mullor et al., 2001)	Xenopus laevis	-	GLI1, GLI2, GLI3
Wnt8	(Mullor et al., 2001)	human Wnt8A 5q31 human Wnt8B 10q24	-	GLI1, GLI2, GLI3
Wnt8c	(Mullor et al., 2001)	Gallus gallus	-	GLI2, GLI3
Wnt11	(Mullor et al., 2001)	11q13.5	-	GLI2, GLI3

Auch wenn die drei GLI-Proteine möglicherweise nicht die einzigen Vermittler des SHH-Signals sind, wurde jedoch in vielen der SHH-Zielgene eine GLI-Bindungssequenz gefunden. Bei einigen SHH-Zielgenen wie zum Beispiel *PTCH1* und *GLII* konnte sogar nachgewiesen werden, dass diese über GLI3 reguliert werden. Allerdings sind weitere Möglichkeiten der Regulation der GLI-Proteine – unabhängig von SHH – nicht auszuschließen. Nichtsdestotrotz wird den GLI-Proteinen die Hauptrolle bei der Transduktion und Interpretation des SHH-Signals zugeordnet.

2.5 Rolle der SHH-Signaltransduktionskaskade bei der Entwicklung der vorderen Mittellinie

Die SHH-Signaltransduktionskaskade spielt bei der Embryonalentwicklung des Menschen eine wichtige Rolle. Dies wird besonders deutlich durch Krankheitsbilder, die durch Mutationen in Bestandteilen des SHH-Signalwegs hervorgerufen werden:

Mutationen in *SHH* führen zu Holoprosencephalie [schwerer Mittelliniendefekt mit Lippen-Kiefer-Gaumenspalte, Hypotelorismus, Fusion der Schneidezähne und Defekten des zentralen Nervensystems; zusammengefasst in Villavicencio et al. (2000)].

Mutationen, die die Cholesterolsynthese betreffen, verursachen Smith-Lemli-Opitz-Syndrom [mentale Retardierung, Hypospadie, breiter Nasenrücken, Syndaktylie, Kleinwuchs; zusammengefasst in Villavicencio et al. (2000)].

Mutationen in *PTCH1* resultieren in Gorlin Syndrom [Hypertelorismus, Basalzellkarzinome; zusammengefasst in Villavicencio et al. (2000)].

Mutationen in *GLI3* können sowohl zu Greig-Syndrom [kraniofaziale Fehlbildungen, wie Hypertelorismus, Polydaktylie, Syndaktylie (Debeer et al., 2003; Wild et al., 1997)] als auch zu Pallister-Hall-Syndrom [Polydaktylie, Syndaktylie, undurchgängiger Anus, Gesichtsabnormalitäten (Kang et al., 1997)] oder zu Acrocallosal-Syndrom [Polydaktylie, Hallux Duplikation, Macrocephalus, Agenesie des Corpus Callosum, mentale Retardierung, Lippen-Kiefer-Gaumenspalte, Hypertelorismus (Elson et al., 2002)] führen.

Mutationen in *GLI2* führen zu Holoprosencephalie-ähnlichen Phänotypen (Roessler et al., 2003).

Mutationen in *CBP* verursachen Rubinstein-Taybi-Syndrom [faziale Fehlbildungen, wie breite Nase, Syndaktylie, Kleinwuchs, Mikrocephalus, geistige Behinderung, breite Zehen und Finger; zusammengefasst in Villavicencio et al. (2000)] (Abb.2.5.1).

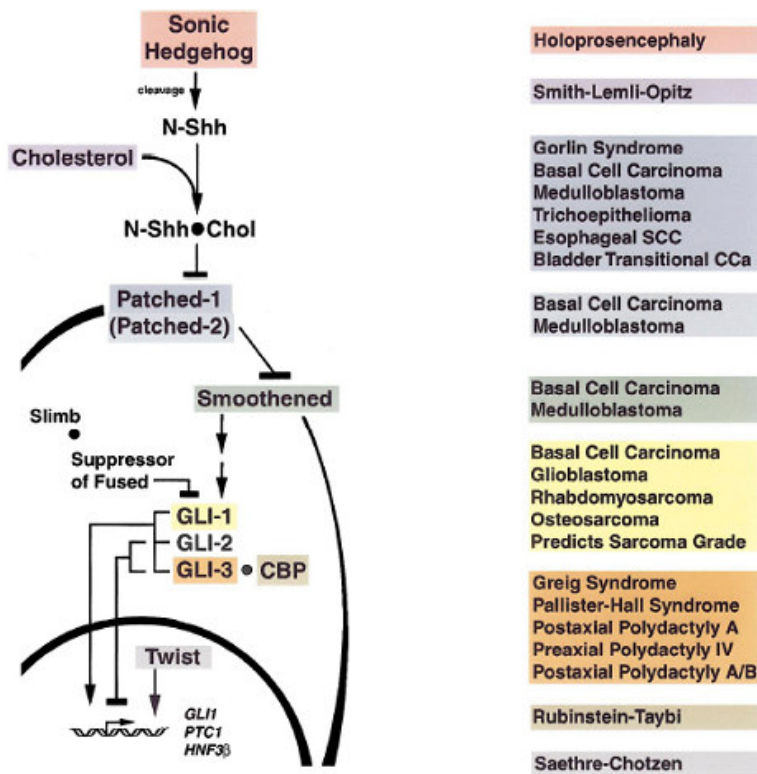
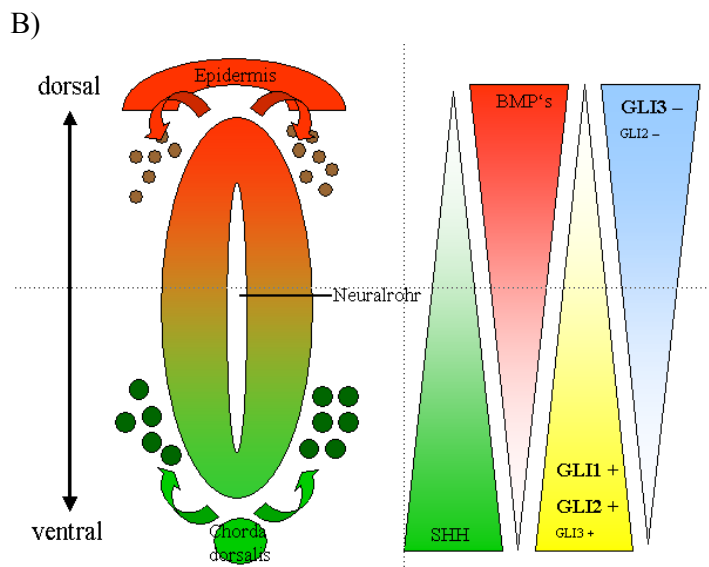
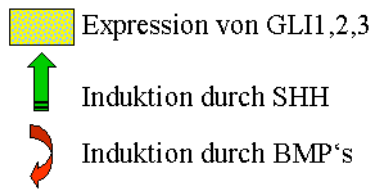
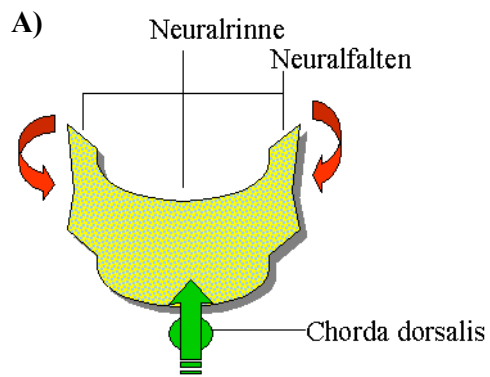
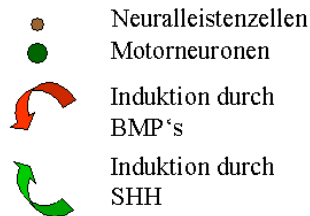


Abb.2.5.1: Die SHH-Signaltransduktionskaskade im Menschen. Krankheiten, die durch Mutationen der jeweiligen Bestandteile des Signalwegs hervorgerufen werden, sind aufgeführt (Villavicencio et al., 2000).

Beim Vergleich der hier aufgezählten Krankheitsbilder wird deutlich, dass die SHH-Signaltransduktionskaskade besonders bei der Entwicklung der vorderen Mittellinie eine wichtige Rolle spielt. Es gibt drei bekannte Prozesse, die über den SHH-Signalweg gesteuert werden: Proliferation, Differenzierung und Schutz vor Zelltod. Diese Prozesse sind während der Embryonalentwicklung von besonderer Wichtigkeit. Demnach wird das Schicksal und die Funktion einzelner Zellen während der Embryonalentwicklung durch eine spezifische Kombination der GLI-Proteine und SHH und dem daraus resultierenden Expressionsprofil der SHH-Zielgene gesteuert [zusammengefasst in Ruiz i Altaba (1999a)]. In Abb.2.5.2 ist das Expressionsprofil von SHH und den GLI-Proteinen gezeigt. Hier wird deutlich, wie die unterschiedliche Expression der GLI-Proteine und von SHH das Schicksal der einzelnen Zellen beeinflussen kann. So induziert die Expression von *SHH* sowie die der drei GLI-Proteine die Faltung des Neuralrohrs. Später reguliert die Expression der GLI-Proteine das Schicksal der jeweiligen Zellen: Motoneuronen bilden sich in Regionen hoher GLI-Transkriptionsaktivatoren-Expression, Neuralleistenzellen wandern aus Regionen, in denen GLI-Transkriptionsrepressoren exprimiert werden, aus.





GLI1 + = GLI1-Transkriptionsaktivator

GLI2 + = GLI2-Transkriptionsaktivator

GLI3 + = GLI3-Transkriptionsaktivator

GLI2 - = GLI2-Transkriptionsrepressor

GLI3 - = GLI3-Transkriptionsrepressor

Abb. 2.5.2: Expression der GLI-Proteine und von SHH während der Embryonalentwicklung. (A) Frühe Neuralplatte. Die Induktion durch SHH ist mit grünen Pfeilen dargestellt, die Induktion durch BMP's (bone morphogenic proteins) durch rote Pfeile. Die Expression der drei GLI-Proteine ist blau-gelb strukturiert dargestellt. (B) Neuralrohr. Die Induktion durch SHH ist mit grünen Pfeilen dargestellt, die Induktion durch BMP's (bone morphogenic proteins) ist mit roten Pfeilen dargestellt. Die Regionen der Expression von SHH sind rot dargestellt. Die Regionen, in denen GLI-Transkriptionsaktivatoren exprimiert werden, sind gelb dargestellt, die Regionen, in denen GLI-Transkriptionsrepressoren exprimiert werden, sind blau dargestellt. Die Expression von BMP's ist rot dargestellt [Abb. gezeichnet nach (Jacob und Briscoe, 2003; Ruiz i Altaba, 1999a; Ruiz i Altaba et al., 2003)].

Ziel der Arbeit

Die Existenz eines Mikrotubulus-assoziierten Pools der PP2A, sowie die Regulation der Aktivität Mikrotubulus-assoziiierter PP2A über den MID1- α 4-PP2A-Komplex waren zu Beginn der vorliegenden Arbeit bereits bekannt (Trockenbacher et al., 2001). Deregulation der Mikrotubulus-assoziierten PP2A durch Mutationen in *MIDI* führen zu Defekten in der vorderen Mittellinie charakteristisch für OS (siehe Einleitung). In der vorliegenden Arbeit sollte nach möglichen Ziel-Proteinen der Mikrotubulus-assoziierten PP2A gesucht werden, deren Hypophosphorylierung bei der Entstehung des OS-Phänotyps eine Rolle spielen könnte. Dafür sollten gezielt Kandidaten-Proteine untersucht werden. Anhand phänotypischer Ähnlichkeiten zwischen OS- und Greig-, Acrocallosal- bzw. Pallister-Hall-Syndrom-Patienten wurde eine biochemische Interaktion zwischen dem MID1- α 4-PP2A-Komplex einerseits und dem GLI3-Protein, das für die Entstehung der genannten Phänotypen verantwortlich ist, andererseits postuliert. In *Drosophila* wurde beschrieben, dass die intrazelluläre Lokalisation und Aktivität des GLI3-Homologs Ci von einem Mikrotubulus-assoziierten Proteinkomplex abhängt und über Serin-Threonin-Phosphorylierungsschritte reguliert wird. In Analogie daran sollte in der vorliegenden Arbeit eine mögliche Abhängigkeit der intrazellulären GLI3-Lokalisation von dem Mikrotubulus-assoziierten MID1- α 4-PP2A-Komplex und somit von Mikrotubulus-assoziiierter PP2A-Aktivität untersucht werden.

Material

1. Kits

Kit	Hersteller
Advantage 2 Polymerase Mix	Clontech
QIAquick PCR Purification Kit	Qiagen
QIAquick Gel Extraction Kit	Qiagen
QIAprep Spin Miniprep Kit	Qiagen
QIAprep Spin Maxiprep Kit	Qiagen
ABI Prism BigDye Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction Kit	Perkin Elmer
Quik Change Site-Directed Mutagenesis Kit	Stratagene
Polyfect Transfection Reagent	Qiagen
TUNEL Enzyme	Roche
Oligofectamine	Invitrogen
QIAexpressionist	Qiagen
SulfoLink	Pierce
Quantum RNA 18S Internal Standards	Ambion
T4 DNA Ligase	Promega
Superscript II Reverse Transkriptase	Invitrogen

2. Vektoren

Vektor	Hersteller
pEGFP-C1	BD Biosciences Clontech
pEGFP-N1	BD Biosciences Clontech
pEGFP-N2	BD Biosciences Clontech
pEGFP-N3	BD Biosciences Clontech
pBluescript	Stratagene
pCMVTag2A	Stratagene
pCMVTag3A	Stratagene
GpBUDCE4	Invitrogen
pET32a	Novagen

3. Puffer

Puffer	Zusammensetzung
Bromphenolblau Ladebuffer	15% Ficoll, 0,25% Bromphenolblau
Xylencyanol Ladebuffer	15% Ficoll, 0,25% Xylencyanol
1xLämmli Puffer	15g Tris, 72g Glycin, 5g SDS, ad 5l H ₂ O
50xTAE	1211,4g Tris, 285ml Eisessig, 93,06g EDTA, ad 5l H ₂ O
10xPEM	1M Pipes, 0,05M EGTA, 0,02M MgCl ₂
10xPBS	1360mM NaCl, 20mM KCl, 106mM Na ₂ HPO ₄ *2H ₂ O, 15mM KH ₂ PO ₄
PBST	1xPBS, 0,1% Tween20
5xBlotting Buffer	29,1g Tris, 14,65g Glycin, 18,75ml 10% SDS, ad 1l H ₂ O
2xmagic mix	48% Harnstoff, 15mM Tris pH7,5, 8,7% Glycerin, 1% SDS, 0,004% Bromphenolblau, 143mM β-Mercaptoethanol
Mounting Medium	90% Glycerin, 0,1M Tris pH8, 2,3% DABCO
DAPI-Medium	0,5μg/μl DAPI in Mounting-Medium
5xSDS-PAGE Puffer	15% β-Mercaptoethanol, 15% SDS, 1,5% Bromphenolblau, 50% Glycerin
Puffer A	0,32M Sucrose, 4mM Hepes pH 7,4, 1%β-Mercaptoethanol, Complete Mini Protease Inhibitor
staining Coomassie	1g Coomassie, 400ml Methanol, 100ml Essigsäure, 500μl H ₂ O
destaining Coomassie	400ml Methanol, 100ml Essigsäure, 500μl H ₂ O

4. Chemikalien

Substanz	Hersteller
Agarose	Invitrogen
Sucrose	Gibco
Complete Mini Protease Inhibitor	Roche
Coomassie Brilliant Blue G 250	Serva
DMEM	Cambrex
EMEM	Cambrex
DMEM, phosphatefree	ICN

FCS	Biochrom
Glutamin	Cambrex
non essentiel amino acids	Biochrom
sodium pyruvate	SIGMA
Paraformaldehyd	Merck
TritonX100	SIGMA
BSA (bovine serum albumine)	SIGMA
Rapamycin	SIGMA
Okadaic acid	SIGMA
Forskolin	ICN
ddForskolin	ICN
IBMX (3-Isobutyl-1-methylxanthine)	ICN
Fostriecin	SIGMA
LLnL (N-Acetyl-Leu-Leu-Norleucinal) / Calpain inhibitor I	SIGMA
Lactacystin	SIGMA
LiCl	Merck
Wortmannin	Biomol
CKI-7 (N-(2-aminoethyl)-5-chloro-isoquinoline-8-sulfonamide)	Seikagaku
HePC (Hexadecylphosphocholin)	SIGMA
U73122	Biomol
U73343	Biomol
Bradford Reagenz	SIGMA
dNTP Set	Fermentas
APS (Ammonium Persulfat)	Biorad
SDS (Sodiumdodecylsulfate)	SIGMA
TEMED	Gibco
Acrylamid/bis-Acrylamid 37,5:1	Roth
Tris (Tris(hydroxymethyl)-aminomethan)	Merck
Western lightning Chemiluminescence Reagent	Perkin Elmer
Trypsin	Cambrex
Hepes	Calbiochem

NaCl	Merck
Protein-A-Agarose / Protein-G-Agarose	Roche
Ficoll (Type 400)	Pharmacia
Antipain-dihydrochloride	Roche
Bestatin	Roche
Chymostatin	Roche
E-64	Roche
Leupeptin	Roche
Pepstatin	Roche
Phosphoramidon	Roche
Pefabloc SC	Roche
EDTA-Na2	Roche
Aprotinin	Roche
H ₃ ³² PO ₄ in HCl	Amersham
Pipes	SIGMA
Citrat (tri-Nacitrat-Dihydrat)	Merck
Glycin	Merck
Triethylamin	SIGMA
pd(N) ₆	Pharmacia
Bromphenolblau	Serva
Xylencyanol	Serva
Essigsäure (Eisessig)	Merck
EDTA	SIGMA
EGTA	SIGMA
MgCl ₂	Merck
NaCl	Merck
KCl	Merck
Na ₂ HPO ₄	Merck
KH ₂ PO ₄	Merck
Harnstoff	Biorad
Glycerin	Merck
β-Mercaptoethanol	Merck
DABCO (1,4-diazobicyclo-2,2,2-octane)	SIGMA

DAPI (4,6-Diamidino-2-phenylindole-2HCl*H ₂ O)	Serva
DTT	Promega
Ethanol	Merck
Methanol	Merck
Tween 20	SIGMA

5.Marker

DNA-Marker	Hersteller
1kb Marker	Gibco
Hyperladder I	Bioline
Protein-Marker	Hersteller
Rainbow Marker	Amersham
Kaleidoskop Marker	Biorad
Seeblye Marker	Invitrogen

6.Medien

Medium	Zusammensetzung
LB-Medium	10 g/l Trypton, 5 g/l Hefeextrakt, 10 g/l NaCl, (15 g/l Agar für Platten), Antibiotikum (Ampicillin oder Kanamycin Konzentration: 50 µg/ml)
LB low salt Medium	10 g/l Trypton, 5 g/l Hefeextrakt, 5 g/l NaCl, (15 g/l Agar für Platten), Antibiotikum (Zeocin Konzentration: 50 µg/ml)

7.Enzyme

Enzym	Hersteller
PP2A	Upstate
λ Phosphatase	NEB
LAR Tyrosine Phosphatase	NEB
Thrombin	Novagen

8. Antikörper

Antikörper	Hersteller
anti-V5 Antikörper	Invitrogen
anti-c-myc monoclonal Antikörper	Clontech
anti-c-myc polyclonal Antikörper	Santa Cruz
anti-flag Antikörper	Stratagene
anti-tubulin MCA 77s	Serotec
anti-tubulin MCA 78s	Serotec
anti-ubiquitin	Santa Cruz
anti-Aktin	SIGMA
anti-PP2A catalytic subunit	BD Bioscience
anti- α 4	Trockenbacher et al., 2001
anti-GFP	Roche
anti-Lamin A/C	Chemicon
anti-GSK3	upstate
Cy3-anti-mouse	Dianova
Cy3-anti-rabbit	Dianova
Cy3-anti-rat	Dianova
FITC-anti-mouse	Dianova
FITC-anti-rabbit	Dianova
HRP-anti-mouse	Dianova
HRP-anti-rabbit	Amersham
HRP-anti-rat	Serotec
normal mouse IgG	Santa Cruz Biotechnologie

9.EDV-Programme

Name	Anwendung	Version/Internetadresse
Celera Database	Homologiesuche	www.celera.com
GCG	Sequenzauswertung / Homologiesuche	Wisconsin Package Version 10.2 Genetics Computer Group Madison, Wisc.
STADEN	Sequenzauswertung	Version 1999.0
NCBI	Homologiesuche (blast)	www.ncbi.nlm.nih.gov
Clustalw	Sequenzvergleiche (multiple sequence alignment program)	www.ebi.ac.uk/clustalw/
prosite	Vorhersage von Protein-Domänen (database of protein families und domains)	www.expasy.org/prosite/
pfam	Vorhersage von Protein-Domänen (large collection of multiple sequence alignments and hidden Markov models covering many common protein domains and families)	www.sanger.ac.uk/Software/Pfam/
smart	Vorhersage von Protein-Domänen	http://smart.embl-heidelberg.de

Methoden

1. Klonierungen / Konstrukte

1.1 Bereitgestellte Vektoren zur Expression von GFP-GLI3-Fusionsproteinen in eukaryotischen Zelllinien

Tab.1.1: Vektoren zur Expression von GFP-GLI3-Fusionsproteinen

Plasmidbezeichnung	Vektor und Insert	Referenz
fpn1-396	GLI3-cDNA codierend für Aminosäure 1-396 in pEGFP-N2- (BD Biosciences Clontech).	Dissertation M. Wessling (Freundlichst überlassen von K.-H. Grzeschik).
fpn1-422	GLI3-cDNA codierend für Aminosäure 1-422 in pEGFP-N3- (BD Biosciences Clontech).	Dissertation M. Wessling (Freundlichst überlassen von K.-H. Grzeschik).
fpn1-667	GLI3-cDNA codierend für Aminosäure 1-667 in pEGFP-N2- (BD Biosciences Clontech).	Dissertation M. Wessling (Freundlichst überlassen von K.-H. Grzeschik).
fpn1-828	GLI3-cDNA codierend für Aminosäure 1-828 in pEGFP-N3- (BD Biosciences Clontech).	Dissertation M. Wessling (Freundlichst überlassen von K.-H. Grzeschik).
fpn1-1100	GLI3-cDNA codierend für Aminosäure 1-1100 in pEGFP-N3- (BD Biosciences Clontech).	Dissertation M. Wessling (Freundlichst überlassen von K.-H. Grzeschik).
fpn1-1522	GLI3-cDNA codierend für Aminosäure 1-1522 in pEGFP-N1- (BD Biosciences Clontech).	Dissertation M. Wessling (Freundlichst überlassen von K.-H. Grzeschik).
fpn824-1100	GLI3-cDNA codierend für Aminosäure 824-1100 in pEGFP-N3- (BD Biosciences Clontech).	Dissertation M. Wessling (Freundlichst überlassen von K.-H. Grzeschik).
fpc18-828	GLI3-cDNA codierend für Aminosäure 18-828 in pEGFP-C1- (BD Biosciences Clontech).	Dissertation M. Wessling (Freundlichst überlassen von K.-H. Grzeschik).

fpc18-667	GLI3-cDNA codierend für Aminosäure 18-667 in pEGFP-C1- (BD Biosciences Clontech).	Dissertation M. Wessling (Freundlichst überlassen von K.-H. Grzeschik).
fpc18-1100	GLI3-cDNA codierend für Aminosäure 18-1100 in pEGFP-C1- (BD Biosciences Clontech).	Dissertation M. Wessling (Freundlichst überlassen von K.-H. Grzeschik).
fpc18-1549	GLI3-cDNA codierend für Aminosäure 18-1549 in pEGFP-C1- (BD Biosciences Clontech).	Dissertation M. Wessling (Freundlichst überlassen von K.-H. Grzeschik).
fpc586-1549	GLI3-cDNA codierend für Aminosäure 586-1549 in pEGFP-C1- (BD Biosciences Clontech).	Dissertation M. Wessling (Freundlichst überlassen von K.-H. Grzeschik).
pBS-GLI3	vollständige GLI3-cDNA in pBluescript- (Stratagene).	Freundlichst überlassen von A. Vortkamp.

1.2 Herstellung der Vektoren zur eukaryotischen Expression von myc-GLI3- bzw. flag-GLI3-Fusionsproteinen

Die GLI3-cDNA kodierend für Aminosäure 18-1580 wurde aus dem Plasmid pBS-GLI3 (siehe Tab.1.1) mit dem Restriktionsenzym EcoRI (NEB) ausgeschnitten und in die Vektoren pCMVTag2A (Stratagene) bzw. pCMVTag3A (Stratagene) ligiert.

1.3 Herstellung der Vektoren zur eukaryotischen Expression von myc-MID1-Fusionsproteinen

Zu Beginn der Klonierung lag die gesamte MID1-cDNA (Quaderi et al., 1997) im pBluescript-Vektor (Stratagene) vor. Die komplette MID1-cDNA wurde mittels PCR mit den Primern 5MID1-Eco und 3MID1-Hind amplifiziert (Tab.1.7.1). Das PCR-Produkt wurde

mittels PCR Purifikation Kit (Qiagen) aufgereinigt, mit den Restriktionsenzymen HindIII (NEB) und EcoRI (NEB) geschnitten und in den Vektor pCMVTag3A (Stratagene) ligiert. Die MID1-cDNA-Sequenz codierend für die B-Box1-Domäne (Aminosäure 105-167) wurde mit den Primern 5BBox1-Eco und 3BBox1-Hind (Tab.1.7.1) mittels PCR amplifiziert und aufgereinigt. Das aufgereinigte PCR-Produkt wurde mit den Restriktionsenzymen HindIII (NEB) und EcoRI (NEB) geschnitten und sowohl in den Vektor pCMVTag2A (Stratagene) als auch in den Vektor pCMVTag3A (Stratagene) ligiert.

1.4 Herstellung der Vektoren zur eukaryotischen Expression von α 4-V5-, myc- α 4- bzw. flag- α 4-Fusionsproteinen

Zu Beginn der Klonierung lag uns die gesamte α 4-cDNA (RZPD, Deutsches Ressourcenzentrum für Genomforschung GmbH) in der multiple cloning site unter dem EF-1 α -Promotor des pBUDCE4-Vektors (Invitrogen) vor. Die komplette α 4-cDNA wurde mit den Primern alpha4-f1 und alpha4-r1 (Tab.1.7.1) mittels PCR amplifiziert. Das PCR-Produkt wurde mittels PCR Purifikation-Kit aufgereinigt (Qiagen), mit den Restriktionsenzymen HindIII (NEB) und Sall (NEB) geschnitten und sowohl in den Vektor pCMVTag2A (Stratagene) als auch in den Vektor pCMVTag3A (Stratagene) ligiert.

1.5 Vektoren zur eukaryotischen Expression von myc-GLI1- bzw. myc-mGli2-Fusionsproteinen

Ausgehend von den GLI1 bzw. mGli2 c-DNAs, die in pBluescript kloniert vorlagen (freundlichsten von K.-H. Grzeschik zur Verfügung gestellt), wurde die GLI1-cDNA mittels PCR mit den Primern Gli-f1 und Gli-r2 (Tab.1.7.1) amplifiziert und aufgereinigt. Das aufgereinigte PCR-Produkt wurde mit den Restriktionsenzymen HindIII (NEB) und Sall (NEB) geschnitten und in den Vektor pCMVTag3A (Stratagene) ligiert. Die mGli2-cDNA wurde mit den Primern Gli2-f1 und Gli2-r2 (Tab.1.7.1) mittels PCR amplifiziert und aufgereinigt. Das aufgereinigte PCR-Produkt wurde mit den Restriktionsenzymen BamHI (NEB) und Sall (NEB) geschnitten und in den Vektor pCMVTag3A (Stratagene) ligiert.

1.6 Vektoren zur eukaryotischen Expression von V5-hFu-Fusionsproteinen

Die komplette Fu-cDNA im Vektor pBluescript wurde vom RZPD (Deutsches Ressourcenzentrum für Genomforschung GmbH, clone ID IRAKp961P0834Q2) bezogen. Mittels PCR mit den Primern Fu-f1 und Fu-r1 (Tab.1.7.1) wurde die Fu-cDNA amplifiziert, aufgereinigt und mit den Restriktionsenzymen NotI (NEB) und BglII (NEB) geschnitten. Anschließend erfolgte die Ligation in die EF-1 α - gesteuerte multiple cloning site des pBUDCE4-Vektors (Invitrogen).

1.7 Primer

Tab.1.7.1: verwendete Klonierungsprimer

Primername	Sequenz (5'-3')	TA (°C)
5MID1-Eco	AGGAATTCGGAAACACTGGAGTCAGAA	53
3MID1-Hind	TAAGCTTGCTCACGGCAGCTGCTCTGT	58
5BBox-Eco	AGGAATTCGACCATGACCTCCGCCGAGAAG	59
3BBox-Hind	TAAGCTTGCAATTGGCTCAATCAGACG	53
alpha4-f1	ATATCAAGCTTAATGGCTGCTGAGGACGAGTTAC	62
alpha4-r1	CGAGGTCGACGGTCAGCCCATGTTCTGTTCGGTTC	62
gli-f1	TCAAGCTTAATGACCCCAACCAATCAG	59
gli-r2	GGTCGACGGGGCACTAGAGTTGAGGAATTC	57
gli2-f1	GCGGATCCCATGGAGACTTCTGCCCCAG	58
gli2-r2	GGTCGACGGGGCCTTTAGGTCATCATG	56
fu-f1	CGCGGCCGCTTCATGGAAAAGTACCACGTGTTGG	58
fu-r1	CAGATCTCTCGACATGCTATGGGCTGGCCTC	63

1.8 Polymerase Chain Reaction (PCR)

Bei der PCR wird ein DNA-Abschnitt enzymatisch zwischen zwei Oligonucleotid-Primern, die gegenläufig an komplementäre DNA-Stränge gebunden sind, exponentiell vermehrt.

Die Oligonucleotid-Primer hybridisieren an komplementäre Regionen des zu amplifizierenden DNA Fragments. Die hitzestabile Taq-DNA-Polymerase hängt Nucleotide an die 3'-OH-Primer-Enden und synthetisiert das zwischen den Primern liegende DNA-Fragment. Darauf folgt ein neuer Zyklus bestehend aus Denaturierung, Hybridisierung, DNA-Synthese. Der Zyklus wird 20-50 mal wiederholt. Es handelt sich um eine Kettenreaktion, bei der winzige Mengen einer gegebenen DNA-Sequenz exponentiell amplifiziert werden.

Als PCR-Standard-Programm wurde in dieser Arbeit das folgenden Temperatur-Zeit-Profil angewendet:

- 94°C 3min (Denaturierung)
- 94°C 30sek (Denaturierung)
- x°C 1min (Annealing)
- 68°C 1,5min (Elongation)
- 68°C 3min.

30 Zyklen

Die Annealing-Temperatur wurde in Anlehnung der für die verwendeten Primer errechneten Annealing-Temperaturen (siehe Tab.1.7.1) gewählt. Die PCR-Reaktionen wurden unter Verwendung des Advantage 2 Polymerase Mix (Clontech) im mitgelieferten Puffer durchgeführt.

1.9 Aufreinigung der PCR-Produkte

Die PCR-Produkte wurden mit Hilfe des QIAquick PCR Purification Kits (Qiagen) aufgereinigt. Die Durchführung erfolgte nach den Angaben des Herstellers. Die Elution erfolgte in 30µl 1:10 verdünntem Puffer EB (Qiagen).

1.10 Restriktion

Die Restriktionen wurden in den vom Hersteller mitgelieferten Puffern nach den Angaben des Herstellers durchgeführt. Die zu den Klonierungen verwendeten Restriktionsenzyme sind tabellarisch aufgelistet:

Tabl.10.1: Restriktionsenzyme

Restriktionsenzym	Hersteller
EcoRI	NEB (New England Biolabs)
HindIII	NEB (New England Biolabs)
Sall	NEB (New England Biolabs)
BamHI	NEB (New England Biolabs)
NotI	NEB (New England Biolabs)
BglII	NEB (New England Biolabs)

1.11 Agarosegel-Elektrophorese

Die Elektrophorese in Agarose-Gelen dient der Auftrennung verschieden grosser DNA-Fragmente. Die Geschwindigkeit, mit der die DNA-Stücke durch Agarose-Gele im elektrischen Feld wandern, hängt von verschiedenen Bedingungen (Größe der DNA, Stromstärke, Pufferbedingungen, Agarose-Konzentration, Konformation der DNA) ab. Am wichtigsten ist hierbei die Größe der DNA: lineare, doppelsträngige DNA-Moleküle bewegen sich durch die Agarose-Matrix mit einer Geschwindigkeit, die umgekehrt proportional zum Logarithmus ihrer Größe ist.

In dieser Arbeit wurden die jeweiligen DNA-Proben mit 10% Bromphenolblau- oder Xylencyanolblau-Ladepuffer versetzt und auf 1%igen Agarose-Gelen (1g Agarose in 100ml TAE-Puffer, 5µl Ethidiumbromid [10mg/ml]) aufgetrennt. Die Gel-Läufe erfolgten in TAE-Puffer bei 100V. Als DNA-Standards wurden der 1kb Marker (GibcoBRL) oder Hyperladder I (Bioline) eingesetzt. Nach dem Gellauf wurden die Banden auf einem UV-Transilluminator sichtbar gemacht und mit einem Geldokumentationssystem (Herolab) analysiert.

1.12 DNA-Isolierung aus Agarose

Die jeweiligen Banden wurden aus den Agarose-Gelen ausgeschnitten und mit Hilfe des QIAquick Gel Extraction Kits (Qiagen) aufgereinigt. Die Durchführung erfolgte nach den Angaben des Herstellers. Die Elution erfolgte in 30µl 1:10 verdünntem Puffer EB (Qiagen).

1.13 Ligation

Die Ligation in die jeweiligen Vektoren erfolgte mit T4 DNA Ligase (Promega). Das Mengen-Verhältnis von Vektor zu Insert wurde nach folgender Formel berechnet:

$$\frac{ngVektor * kbInsert}{kbVektor} * 3 = xngInsert$$

Es wurden jeweils 100ng Vektor eingesetzt. Zu der DNA wurden 1µl 10xLigase Puffer (Promega) und 1µl T4 DNA Ligase (Promega) zugefügt (Reaktionsvolumen 10µl). Die Ansätze wurden 16h bei 16°C inkubiert.

1.14 Transformation

Die Ligationsansätze wurden jeweils mit 100µl einer Suspension von chemisch kompetenten E.coli Fusion Blue-Zellen (BD Biosciences) gemischt und 30min auf Eis inkubiert. Dann erfolgte ein Hitzeschock für 1,5min bei 42°C. Die Zellen wurden 2min auf Eis ausgekühlt und mit 1ml LB-Medium versetzt. Es erfolgte eine Inkubation bei 37°C für 1h. Anschließend wurde die Zellsuspension auf eine mit Antibiotikum supplementierte LB-Agar-Platte (nach Angabe des Vektorherstellers) ausplattiert und bei 37°C für 24h inkubiert.

1.15 Plasmid-DNA-Isolierung

Die DNA-Präparation aus 5ml-Flüssig-Übernachtskulturen wurde mit Hilfe des QIAprep Spin Miniprep Kits (Qiagen) nach dem mitgelieferten Protokoll durchgeführt. Um größere Mengen an DNA zu gewinnen, wurden 100ml-Flüssig-Übernachtskulturen angeimpft und die DNA mit Hilfe des QIAprep Spin Maxiprep Kits (Qiagen) nach den Angaben des Herstellers isoliert.

1.16 Sequenzierung

Zur Sequenzierung wurde der ABI Prism BigDye Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction Kit (Perkin Elmer Biosystems) benutzt. Die DNA (10ng pro 100bp) wurde in 7µl H₂O aufgenommen und mit 1µl Primer (10pmol/µl) und 2µl Terminator Ready Reaction Mix (Perkin Elmer Biosystems) gemischt. Die Sequenzreaktion erfolgte nach den Angaben des Herstellers. Zum Abtrennen der nicht eingebauten Nucleotide und Primer wurde eine DNA-Präzipitation durchgeführt. Durch Zugabe von 30µl 100% Ethanol und eine anschließende Zentrifugation für 1h bei 2700xg und Raumtemperatur wurde die DNA präzipitiert. Das Pellet wurde zweimal mit 150µl 70% Ethanol gewaschen und in der Vakuumzentrifuge für 2min getrocknet.

Die Auftrennung der Fragmente im Kapillargel wurde von der Servicegruppe am Max-Planck-Institut übernommen. Zur Auftrennung und Detektion der DNA-Fragmente wurde der ABI PRISM 377 DNA Sequencer verwendet.

1.17 In-vitro Mutagenese

In das Plasmid pBUDCE4+hFU wurden mittels in-vitro Mutagenese folgende Mutation eingefügt: G13V. Die Mutagenese wurde mit Hilfe des QuikChange Site-Directed Mutagenesis Kit (Stratagene) nach den Angaben des Hersteller durchgeführt.

Tab.1.17.1: Primer für in-vitro Mutagenese

Primername	Sequenz (5'-3')	TA (°C)
Fu-G13V	TGTTGGAGATGATTGGAGAAGTATCTTTTGGGAGGGTGTAC	78°C
Fu-antisense-G13V	GTACACCCTCCCAAAGATACTTCTCCAATCATCTCCAACA	78°C

2. Zellkultur

2.1 Zelllinien

Tab.2.1: verwendete Zelllinien

Zelllinie	Beschreibung	Medium
HeLa	Human Negroid cervix epitheloid carcinoma	DMEM, 10% Fetal Bovine Serum
COS7	African green monkey kidney	DMEM, 10% Fetal Bovine Serum
U373MG	Human Glioblastoma Astrocytoma	EMEM, 2mM Glutamine, 1% non essential amino acids, 1mM Sodium Pyruvate, 10% Fetal Bovine Serum

3. Proteinbiochemische Methoden

3.1 Transfektion und Immunfluoreszenz

Einen Tag vor der Transfektion wurden 1×10^5 Zellen pro well in eine 6-well-Platte ausgesät. Die Zellen wurden mit Polyfect Transfection Reagent (Qiagen) nach den Angaben des Herstellers transfiziert. 24-48 Stunden nach der Transfektion wurden die Zellen mit 1,2xPEM gewaschen und anschließend mit 3,7% Paraformaldehyd in 1,2xPEM für 10min bei Raumtemperatur fixiert. Nachdem die Zellen mit 1xPBS gewaschen wurden, wurden sie mit 0,2% TritonX100 in PBS für 10min bei Raumtemperatur permeabilisiert. Nun wurde 4 mal für je 3min mit PBS gewaschen. Im Anschluß daran erfolgte das Blocken unspezifischer Bindungsstellen mit 1%BSA in PBS für 20min bei RT. Es erfolgte die Inkubation mit dem primären Antikörper in PBS+1%BSA nach Angaben des Herstellers. Nach 4 mal 3min waschen mit PBS wurden die Zellen mit dem sekundären Antikörper in PBS (Verdünnung nach Herstellerangaben) für 30min bei Raumtemperatur inkubiert. Die Zellen wurden erneut 4 mal 3min mit PBS gewaschen und in DAPI-Medium eingebettet.

Tab. 3.1.1: Behandlungen der Zellen vor der Immunfluoreszenz

Art der Behandlung	Endkonzentration der zugesetzten Substanz im Medium	Inkubation
Kälteschock	-	4°C für 30min
Rapamycin	25nM	37°C für 30min
Ocadaic acid	100nM	37°C für 30min
Forskolin	40µM	37°C für 15h
ddForskolin	40µM	37°C für 15h
IBMX	150µM	37°C für 15h
Fostriecin	500nM	37°C für 1h
LLnL	25µM	37°C für 2h
Lactacystin	300nM / 1mM	37°C für 4h
LiCl	50mM	37°C für 4h
Wortmannin	100nM	37°C für 1h
CKI-7	100µM	37°C für 4h
HePC	5µM	37°C für 1h
U37122	1µM	37°C für 1h
U37343	1µM	37°C für 1h
Colcemid	100mg/ml	37°C für 2h

3.2 Fluoreszenz-Mikroskopie / 3D-Mikroskopie / Lebendzellanalyse

Die mikroskopische Analyse der Immunfluoreszenz-Präparate erfolgte an einem Auflicht-Fluoreszenzmikroskop (Axioskop, Zeiss), das sowohl mit einem Doppelbandpassfilter (Chroma Technologies) zur simultanen Visualisierung roter und grüner Fluoreszenzen als auch mit separaten Einzelbandpassfiltern zur einfachen Darstellung blauer, roter und grüner Fluoreszenzen ausgerüstet war. Mit einer CCD (Charge coupled device) -Kamera (Hamamatsu) wurden schwarz-weiße digitale Bilder aufgenommen. Mit Hilfe des Bildverarbeitungsprogramm ISIS3 (Metasystems) wurden den einzelnen Graubildern die Farben der eingesetzten Fluorochrome zugeordnet. Die Zusammenlegung dieser Bilder resultiert in RGB-Bildern (rot/grün/blau).

Die 3D-Analysen der Immunfluoreszenz-Präparate wurden mit einem Mikroskop des Typs Axiovert (Zeiss) durchgeführt. Das Objektiv (100x-plan-neofluar Öl-Imm./NA 1.35; Zeiss)

war an einen PIFOC z-SCAN (Physik Instrumente) und eine 12-bit CCD-Kamera (SensiCam; PCO) gekoppelt. Die Kontrolle erfolgte durch die TILLvisION v4.0 software. Die Fluorochrome wurden über einen Polychrome IV Monochromator (T.I.L.L. Photonics Deutschland) in Kombination mit einem Vierfachbandpass Strahlenteiler und Sperrfilter (Chroma Technology Corp.) angeregt. Das erlaubte die sequentielle Aufnahme von blauen (DAPI 372nm), roten (Cy3 565nm) und grünen (GFP 496nm) Fluoreszenzen aus einer Z-Ebene. Die Dekonvolution der Bilddaten erfolgte mit dem cMLE Algorithmus der Huygens 2.1.4-essential Software (Scientific Volume Imaging, Holland). Das Rendering (digitales Berechnen eines Bildes) zur 3D-Darstellung der Zellen wurde mit dem Programm Imaris 3.3.2 (Bitplane, Schweiz) durchgeführt.

Die Lebendzellanalysen wurden wie bei der 3D-Mikroskopie mit einem Mikroskop des Typs Axiovert (Zeiss) durchgeführt. Das Objektiv (100x-plan-neofluar Öl-Imm./NA 1.35; Zeiss) war an einen PIFOC z-SCAN (Physik Instrumente) und eine 12-bit CCD-Kamera (SensiCam; PCO) gekoppelt. Die Kontrolle erfolgte durch die TILLvisION v4.0 software. Die Fluorochrome wurden über einen Polychrome IV Monochromator (T.I.L.L. Photonics Deutschland) in Kombination mit einem Vierfachbandpass Strahlenteiler und Sperrfilter (Chroma Technology Corp.) angeregt. In 1-minütigen Intervallen wurden über ein Zeitfenster von 4h Bilder aufgenommen (resultierend in 240 Einzelaufnahmen). Die einzelnen Bilder wurden mit Hilfe der TILLvisION v4.0 software zu einem Film verbunden.

Nachträgliche Bildbearbeitungen sowie das Erstellen der Abbildungen erfolgte mit dem Adobe Photoshop 7.0 und Paintshop Pro Version 6.02.

3.3 Proteinbestimmung nach Bradford

Die Proteinbestimmung nach Bradford dient der Ermittlung der Proteinkonzentration. Diese Methode basiert auf dem Gleichgewicht zwischen zwei Formen von Coomassie Blue G. Im sauren Milieu liegt der Farbstoff in einer protonierten, roten Form vor. Bindet dieser an ein Protein, so nimmt er eine nicht protonierte, blaue Form an. Die Intensität der blauen Farbe kann im Photometer bei einer Wellenlänge von 595nm gemessen werden und ist proportional zur Menge des an den Farbstoff gebundenen Proteins. Um den Proteingehalt einer Probe zu ermitteln, wurde zunächst eine Eichreihe pipettiert. Dazu wurde BSA in 1:1000 verdünntem Probenpuffer auf die folgenden Konzentrationen verdünnt: 1µg/ml, 2µg/ml, 4µg/ml, 5µg/ml, 7,5µg/ml, 10µg/ml. Die Proben wurden 1:1000 in H₂O verdünnt. Je 80µl der BSA-

Verdünnungen bzw. der verdünnten Proben wurden mit 20µl Bradford-Reagenz (Sigma) gemischt und in eine Mikrotiterplatte (Falcon) pipettiert. Die Messung der Absorption bei 595nm erfolgte im Spektralphotometer Anthos 2020. Die Proteinkonzentration der Proben wurde über eine Standardkurve bestimmt.

3.4 Westernblot

3.4.1 Natriumdodecylsulfat Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)

Bei der SDS-PAGE handelt es sich um eine Methode, mit der Proteine ihrem Molekulargewicht entsprechend aufgetrennt werden. Durch Inkubation der Proteine mit dem stark anionischen Detergenz SDS (in Verbindung mit einem Reduktionsmittel wie DTT oder β -Mercaptoethanol) und hoher Temperatur werden diese vollständig denaturiert und dissoziiert. Die Proteine binden das SDS und erhalten dadurch eine negative Ladung. Da die Menge an gebundenem SDS proportional zum Molekulargewicht des Proteins ist (1,4g SDS binden etwa 1g Protein), wandern die SDS-Proteinkomplexe abhängig von ihrer Größe durch das Gel. Die SDS-Gele wurden in dieser Arbeit nach den Angaben in Tab.3.4.1.1 hergestellt.

Tab.3.4.1.1 SDS-Gele

Komponente	Volumen (in ml) zur Herstellung von 5ml Trenngel
H ₂ O	2,6
Acrylamid/bis-Acrylamid 37,5:1 Mix (Roth)	1,0
1,5M Tris (pH8,8)	1,3
10% SDS	0,05
10% APS (Biorad)	0,05
TEMED (GibcoBRL)	0,004
Komponente	Volumen (in ml) zur Herstellung von 1ml Sammelgel
H ₂ O	0,68
Acrylamid/bis-Acrylamid 37,5:1 Mix (Roth)	0,17
1,5M Tris (pH6,8)	0,13
10% SDS	0,01
10% APS (Biorad)	0,01
TEMED (GibcoBRL)	0,001

Vor dem Auftragen auf das Gel wurden die Proben mit magic mix bzw. SDS-PAGE-Puffer versetzt und 5min bei 95°C denaturiert. Der Gellauf erfolgte bei 200V für etwa 45min.

3.4.2 Westernblot

Mit diesem Verfahren werden die im SDS-Gel aufgetrennten Proteine auf eine Polyvinylindendifluorid (PVDF)-Membran transferiert, auf der sie mit spezifischen Antikörpern detektiert werden können. In dieser Arbeit wurden die SDS-Gele nach dem Gellauf für 15min in 1xBlotting-Puffer (mit 20% Methanol) gelegt. Die PVDF-Membranen (Roche) wurden wie folgt vorbereitet: 2sek in Methanol, 2min in Wasser, 15min in Blotting-Puffer. Blotting Papier (Biorad) wurde kurz in Blotting-Puffer getaucht. Im Anschluß daran wurde der Blot folgendermaßen in einer Trans-Blot SD semidry Transfer Cell (Biorad) aufgebaut:

- (Kathode)

Blotting Papier

Gel

PVDF-Membran

Blotting Papier

+ (Anode)

Es wurde bei 20V für 30min geblottet.

Im Anschluss daran wurde die Membran zum Blocken in 5% Milchpulver in PBST gelegt und für 30min bei Raumtemperatur inkubiert. Nun erfolgte die Inkubation mit dem primären Antikörper in PBST+1% BSA nach Angaben des Herstellers. Nach 4x3min waschen mit PBST wurden die Blots mit dem sekundären, Horseradishperoxidase(HRP)-konjugierten Antikörper in PBST (Verdünnung nach Herstellerangaben) inkubiert. Die Detektion erfolgte mit Western Lightning Chemiluminescence Reagent (Perkin Elmer) nach den Angaben des Herstellers.

3.5 Transfektion / Zellfraktionierung

Einen Tag vor der Transfektion wurden 8×10^5 Zellen pro 75cm^2 -Flasche ausgesät. Die Zellen wurden mit Polyfect Transfection Reagent (Qiagen) nach den Angaben des Herstellers transfiziert.

48h nach der Transfektion wurden die Zellen einmal mit PBS gewaschen und durch Abschaben mit einem Zellschaber (Biochrom) vom Flaschenboden abgelöst. Die Zellen wurden abzentrifugiert (1000xg, 10min). Im Anschluss daran wurde das Zell-Pellet in Puffer A resuspendiert. Die Zellen wurden mit dem Potter aufgeschlossen. Die Kern- und Cytosol-Fractionen wurden durch Zentrifugation (1000xg 10min) voneinander getrennt. Die Zell-Pellets (Kernfraktion) wurden in 2xmagic mix resuspendiert. Die Fractionen wurden mittels Westernblot analysiert.

3.6 Transfektion / Immunpräzipitation / in-vitro Behandlungen

Einen Tag vor der Transfektion wurden 8×10^5 Zellen pro 75cm^2 -Flasche ausgesät. Die Zellen wurden mit Polyfect Transfection Reagent (Qiagen) nach den Angaben des Herstellers transfiziert.

48h nach der Transfektion wurden die Zellen einmal mit PBS gewaschen und durch Abschaben mit einem Zellschaber (Biochrom) vom Flaschenboden abgelöst. Die Zellen wurden abzentrifugiert ($1000 \times g$, 10min) und das Zell-Pellet in 40mM Hepes/ 150mM NaCl resuspendiert. Der Zellaufschluss erfolgte mittels Ultraschall. Protein-A-Agarose bzw. Protein-G-Agarose (Roche) wurde durch dreimaliges Waschen mit 40mM Hepes/ 150mM NaCl vorbereitet. Jeweils 2mg Protein wurden in 1ml 40mM Hepes/ 150mM NaCl gelöst. Um unspezifische Bindungen von Proteinen an die Protein-A-Agarose bzw. Protein-G-Agarose vorzubeugen, wurde ein „precleaning“ durchgeführt: Zu den 2mg Protein in 1ml 40mM Hepes/ 150mM NaCl wurden $50 \mu\text{l}$ Protein-A-Agarose bzw. Protein-G-Agarose zugesetzt. Es folgte eine Inkubation für $1,5 \text{h}$ im Überkopfschüttler bei 4°C . Die Agarose wurde durch eine Zentrifugation (3000rpm , 1min , 4°C) vom Ansatz abgetrennt. Der Überstand wurde mit $1-2 \mu\text{g}$ Antikörper versetzt. Es folgte eine Inkubation über Nacht bei 4°C im Überkopfschüttler. Anschließend wurden $75 \mu\text{l}$ Protein-A-Agarose bzw. Protein-G-Agarose zugesetzt und 2h im Überkopfschüttler bei 4°C inkubiert. Die Protein-A-Agarose bzw. Protein-G-Agarose, an die nun Antikörper, Zielprotein und Interaktionspartner des Zielproteins gebunden sind, wurde drei mal gewaschen. Im Anschluss daran wurde die Protein-A-Agarose bzw. Protein-G-Agarose abzentrifugiert (3000rpm , 1min , 4°C) und der Überstand abgenommen.

Die in-vitro-Behandlungen der Immunpräzipitate bzw. der Zellfraktionen wurden wie in Tab.3.6.1 dargestellt durchgeführt.

Tab.3.6.1: *in-vitro*-Behandlungen

Reagenz / Enzym	zusetzte Menge	Inkubation	Hersteller
Purified PP2A	0,5U	2h bei 37°C im für λ Phosphatase (NEB) mitgelieferten Puffer	Upstate
λ Phosphatase	2000U	2h bei 30°C im mitgelieferten Puffer	NEB

Nach den entsprechenden *in-vitro* Behandlungen wurden die Immunpräzipitate mittels Westernblot analysiert.

3.7 RNAi (RNA interference)

RNAi ist eine Form posttranskriptionaler Genregulation, welche durch doppelsträngige RNA-Moleküle vermittelt wird. Als siRNA (short interfering RNA) bezeichnet man kurze (21-23 Nukleotide), doppelsträngige RNA-Moleküle (dsRNA), die durch intrazelluläre Spaltung längerer dsRNA-Moleküle mit dem Enzym Dicer entstehen (Abb.3.7.1).



Abb.3.7.1: Spaltung längerer dsRNA-Moleküle mit dem Enzym Dicer

Diese siRNA-Moleküle können spezifisch an ihre Ziel-mRNA binden und deren Degradierung durch den RISC-Proteinkomplex (RNA-induced silencing complex) auslösen (Abb.3.7.2). Als Folge dessen kann das entsprechende Protein nicht weiter synthetisiert werden. Der RISC-Komplex umfasst mehrere Proteine, wie zum Beispiel eine Helicase, die die dsRNA auftrennt.

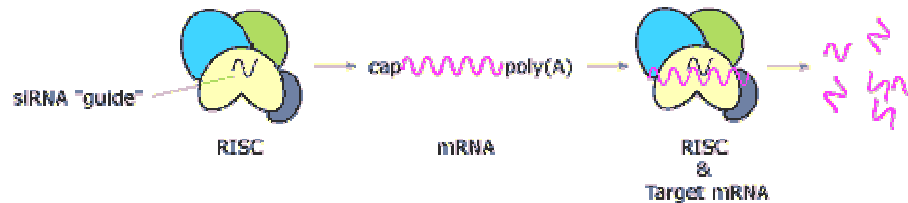


Abb.3.7.2: Degradierung einer Ziel-mRNA durch den RISC-Proteinkomplex.

Dieser Mechanismus kann experimentell ausgenutzt werden, indem synthetisierte siRNA-Moleküle mittels Transfektion in Zellen eingeschleust werden, und somit die Expression spezifischer Ziel-Gene verringert werden kann.

Hierfür wurden in dieser Arbeit 1×10^5 HeLa Zellen pro well einer 6-well-Platte einen Tag vor der Transfektion ausgesät. Die Transfektion erfolgte mit Hilfe des Transfektionsreagenz Oligofectamine (Invitrogen) nach den Angaben des Herstellers. Es wurden $1,3 \mu\text{g}$ synthetischer siRNA pro well transfiziert. Die Sequenzen der genspezifischen siRNA sind in Tab.3.7.1 aufgeführt. Als Negativ-Kontrolle wurde non-silencing siRNA (Qiagen) eingesetzt. Die Transfektionseffizienz wurde mit FITC-markierter siRNA überprüft und betrug etwa 95%.

Tab.3.7.1: Zielsequenzen der siRNA

Zielgen	Zielsequenz / Bestellnr.	Hersteller
$\alpha 4$	CAAGAGAGGCATCAACTTCTA	Qiagen
GSK3 β	Cat.#51012 silencer validated siRNA (targeted exons 2&3)	Ambion
β -catenin	GCTGAAACATGCAGTTGTA	Qiagen
Fu	AGAGTCTACTGAAGTGACA	Qiagen

3.8 Orthophosphat-Markierung

In diesem Verfahren wird untersucht, ob ein Zielprotein in der Zelle phosphoryliert wird. Zu dem Kulturmedium wird radioaktiv markiertes Phosphat zugegeben, welches an Phosphoproteine angehängt wird. Diese radioaktiv markierten Proteine reinigt man mittels Immunpräzipitation auf. Wurde das Zielprotein phosphoryliert, so ist es radioaktiv markiert und kann mittels Autoradiographie nachgewiesen werden.

Für die Markierung wurden 8×10^5 Zellen einen Tag vor der Transfektion in 75cm^2 -Flaschen ausgesät. Die Zellen wurden mit Polyfect Transfection Reagent (QIAGEN) nach den Angaben des Herstellers transfiziert. 24h nach der Transfektion wurde das Kulturmedium entfernt und durch 5ml phosphatfreies DMEM (ICN) pro Flasche ersetzt. Es wurden 5 mCi $\text{H}_3^{32}\text{PO}_4$ in HCl (Amersham) zugesetzt. Die Zellen wurden für 24h in diesem labeling-Medium inkubiert. Anschließend wurden die Zellen in TBS gewaschen, abgeschabt und abzentrifugiert. Das Zell-Pellet wurde in 1ml 40mM Hepes/150mM NaCl resuspendiert. Der Zellaufschluss erfolgte mittels QIAshredder (Qiagen). Die radioaktiv markierten Proteine wurden mittels Immunpräzipitation aufgereinigt und auf einem SDS-Gel aufgetrennt (Durchführung wie oben beschrieben). Das SDS-Gel wurde getrocknet und ein Röntgenfilm (Fuji) exponiert.

4. Herstellung eines GLI3-Antikörpers

4.1 Klonierung

Zwei Fragmente der GLI3-cDNA (codierend für Aminosäure 1-121 bzw. Aminosäure 1171-1470) wurden mittels PCR amplifiziert. Die hierfür verwendeten Primer sind in Tab.4.1.1 dargestellt.

Tab.4.1.1: Primer zur Klonierung

Primername	Sequenz (5'-3')	TA (°C)
Gli3-f22	ATCGGATCCATGGAGGCCAGTCCCACAG	63
Gli3-r22	TTGTCGACGCTATCATTAGTGGGGCTCCATGTAACCTA	59
Gli3-f23	ATCGGATCCCTGTCCTCCTCCAAGCTCAAG	61
Gli3-r23	TTGTCGACGCTATCATTACTGTAGCAGGCAGCTGGCGT	63

Die PCR-Produkte wurden aufgereinigt und mit den Restriktionsenzymen BamHI und Sall geschnitten und in den Vektor pET32a (Novagen) ligiert. Im pET32a-Vektor exprimierte Peptide werden mit 3 Tags versehen: S-Tag, His-Tag und Thioredoxin-Tag. Der His-Tag wurde hier zur späteren Peptidaufreinigung ausgenutzt, der Thioredoxin-Tag gewährt eine bessere Löslichkeit der produzierten Peptide.

4.2 Peptidexpression in E. coli und Aufreinigung

Die Plasmide wurden in den E. coli-Expressionsstamm BL-21Codon-Plus (DE3)-RIL (Novagen) transformiert. Der Transformationsansatz wurde auf LB-Medium mit Ampicillin (50µg/ml) und Chloramphenicol (33,74µg/ml) ausplattiert. Das im Expressionsstamm enthaltene RIL-Plasmid trägt ein Chloramphenicol-Resistenzgen, das pET32a-Plasmid trägt ein Ampicillin-Resistenzgen. Es erfolgte eine Inkubation bei 37°C über Nacht. Anschließend wurde eine 20ml-Flüssigkultur mit einer der gewachsenen Kolonien angeimpft und bei 37°C über Nacht geschüttelt. Am nächsten Tag wurde eine 1l-Flüssigkultur mit den 20ml

Übernachtskultur angeimpft. Es erfolgte eine Inkubation bei 37°C bis die OD600 = 0,5-0,7 erreicht war. Es wurde ein 1ml-Aliquot zur späteren Analyse auf einem SDS-Gel genommen (nicht induziert). Nun wurde die Expression der Peptide durch Zugabe von 0,1mM IPTG induziert. Es wurde für 1,5h bei 30°C inkubiert. Im Anschluss wurde zunächst ein 1ml-Aliquot zur späteren Analyse auf einem SDS-Gel genommen (induziert) und die restlichen Zellen wurden vom Medium mittels Zentrifugation (4000xg, 20min, 4°C) abgetrennt. Das Zell-Pellet wurde ausgewogen und in 3ml/g Pellet Lysis Buffer (Qiagen, QIAexpressionist) resuspendiert. Die Zellen wurden in flüssigem Stickstoff eingefroren. Später wurden die Zellen auf Eis aufgetaut und mittels Ultraschall aufgeschlossen. Die lösliche Fraktion wurde von der unlöslichen durch einen Zentrifugationsschritt (10000xg, 30min, 4°C) abgetrennt. Es wurde sowohl von der löslichen (Überstand) als auch von der unlöslichen (Pellet) Fraktion ein Aliquot zur späteren Analyse auf einem SDS-Gel genommen. Die Aufreinigung der Peptide erfolgte nun unter Verwendung des QIAexpressionist-Systems (Qiagen) nach den Angaben des Herstellers. Hierbei wird die Bindung des His-Tags der Peptide an Nickel ausgenutzt, um das Peptid in einer Säule binden, waschen und eluieren zu können.

4.3 Coomassie Staining

Die während der Expression und Aufreinigung der Peptide gewonnenen Aliquots wurden auf SDS-Gelen aufgetrennt. Die Proteine in den SDS-Gelen wurden mittels Färbung mit Coomassie Blau visualisiert. Dazu wurden die SDS-Gele zunächst für 1h bei Raumtemperatur in staining Coomassie-Lösung inkubiert, und anschließend für 1h bei Raumtemperatur in destaining Coomassie-Lösung entfärbt.

4.4 Affinitätsreinigung der Antikörper

Die aufgereinigten Peptide wurden in 100mM HEPES (pH7,2) dialysiert und zur Immunisierung von Kaninchen eingesetzt. Das Serum des Kaninchens, das mit dem Peptid „Gli3-22“ (Aminosäure 1-121) immunisiert wurde, wurde einer Affinitätsreinigung unterzogen. Dazu wurde das in E. coli exprimierte, aufgereinigte Peptid mit dem Enzym Thrombin (Novagen) geschnitten. Durch das Schneiden mit Thrombin wurden der

Thioredoxin-Tag und der His-Tag vom GLI3-Peptid abgeschnitten. Mit Hilfe von Ni-NTA (Qiagen, QIAexpressionist) wurde das GLI3-Peptid von den Tags getrennt. Das GLI3-Peptid wurde nun an eine Sulfolink-Säule (Pierce) gebunden. In diesem System werden Peptide, die ein (oder mehrere) Cystein enthalten, über spezifische Bindungen von freien Sulfhydrylgruppen des Peptids an Iodacetylgruppen der Gel-Matrix, in einer Säule immobilisiert. Die Bindung des Peptids an die Säule, sowie das Blocken unspezifischer Bindungen erfolgte nach den Angaben des Herstellers. Die so hergestellte Säule wurde im Anschluss zur Affinitätsreinigung der GLI3-Antikörper aus dem Serum des Kaninchens benutzt. Zu 50ml Serum wurden 50ml binding buffer (Pierce) und die an das GLI3-Peptid gekoppelte Sulfolink-Gel-Matrix zugegeben. Es wurde bei 4°C über Nacht im Überkopfschüttler inkubiert. Anschließend wurde der Ansatz in eine Polypropylensäule (Qiagen) überführt, und der Durchlauf abgelassen. Die Elution der Antikörper erfolgte in folgenden Schritten (insgesamt 25 Eluate):

5 Elutionen mit je 2ml gentle antigen-antibody elution buffer (Pierce)

5 Elutionen mit je 2ml 50mM Pipes (pH5,8)

5 Elutionen mit je 2ml 100mM Citrat (pH5,0)

5 Elutionen mit je 2ml 50mM Glycin (pH2,5)

5 Elutionen mit je 2ml 100mM Triethylamin (pH11,5).

Der pH-Wert der Eluate wurde durch sofortige Zugabe von 100µl 1M Tris pH 7,5 neutralisiert.

4.5 Dot Blot

Um zu testen, in welchem Eluat der oben aufgeführten Affinitätsreinigung GLI3-Antikörper vorliegen, wurde ein Dot Blot durchgeführt. Hierzu wurden jeweils ~25µg des Thrombin-geschnittenen GLI3-Peptids auf eine Nitrozellulose-Membran (Amersham) aufgetropft. Im Anschluss daran wurde die Membran zum Blocken in 5%Milchpulver in PBST gelegt und für 30min bei Raumtemperatur inkubiert. Nun erfolgte die Inkubation mit dem affinitätsgereinigten GLI3-Antikörper in PBST+1%BSA (Verdünnung 1:100) bei 4°C über Nacht. Nach 4 mal 3min waschen mit PBST wurden die Blots mit dem sekundären, HRP-markierten Anti-Kaninchen-Antikörper in PBST (Verdünnung nach Herstellerangaben) inkubiert. Die Detektion erfolgte mit Western Lightning Chemiluminescence Reagent (Perkin Elmer) nach den Angaben des Herstellers.

4.6 Mäuse-Embryonen

Die Extremitäten-Anlagen von 15 NMRI-Mäuseembryonen (E11.5) wurden in 400µl Puffer A aufgenommen. Der Zellaufschluss erfolgte mit dem Potter. Die Kern- und Cytosol-Fractionen wurden durch Zentrifugation (1000xg, 10min, 4°C) voneinander getrennt. Die Zell-Pellets (Kernfraktion) wurden in 2x magic mix resuspendiert. Die Fractionen wurden mittels Westernblot analysiert.

5. Semiquantitative RT-PCR

Semiquantitative RT-PCR ist eine gängige Methode zur quantitativen Analyse der Genexpression. Ausgehend von gleichen Mengen an RNA verschiedener Proben, wird unter gleichen Bedingungen cDNA synthetisiert und das gleiche PCR-Produkt darauf amplifiziert. Die Menge des entstandenen PCR-Produkts ist proportional der Menge der RNA des jeweiligen Transkripts. Im gleichen Reaktionsansatz wird zusätzlich ein Kontroll-Transkript (hier: 18S rRNA) zum Abgleich experimentell bedingter Abweichungen amplifiziert.

5.1 Zellen / Behandlungen

Für die semiquantitativen RT-PCR's wurden jeweils $1,1 \times 10^6$ Zellen einen Tag vor der Behandlung und RNA-Isolation in 10cm-Petrischalen ausgesät. 24h nach der Transfektion wurden die Zellen für 4h mit LiCl (50mM) bzw. Rapamycin (25nM) behandelt.

5.2 RNA-Isolation aus Zellen

Die Zellen wurden mit einem Zell-Schaber vom Boden des Kulturgefäßes gelöst und abzentrifugiert (1000xg, 10min, 4°C). Der Zellaufschluss erfolgte im Lysepuffer (Qiagen) mit Hilfe des QIAshredder Kit (Qiagen). Die RNA-Isolation erfolgte mit dem RNeasy Mini Kit (Qiagen) nach dem mitgelieferten Protokoll.

5.3 cDNA-Synthese

Zur cDNA-Synthese wurde 1µg RNA mit 1µl 10mM dNTPs (Fermentas), 3µl pd(N)₆ (100ng/µl, Pharmacia) und H₂O (ad 15,5µl) gemischt. Es erfolgte eine Inkubation bei 70°C für 5min. Danach wurden 5µl 5x1st Strand Buffer (Invitrogen), 2,5µl 0,1M DTT (Invitrogen) und 0,5µl RNA Guard (Amersham) zugesetzt und für 2min bei 42°C inkubiert. Nach Zugabe

von 1µl Superscript II Reverser Transkriptase (Invitrogen) wurde zunächst 1h bei 42°C inkubiert. Im Anschluss wurde die cDNA-Synthese durch eine Inkubation bei 70°C für 15min beendet. Es wurden jeweils 3µl cDNA für die folgenden semiquantitativen RT-PCRs eingesetzt.

5.4 Semiquantitative RT-PCR

Die semiquantitativen RT-PCRs wurden unter Verwendung des QuantumRNA 18S Internal Standards Kits (Ambion) nach dem mitgelieferten Protokoll durchgeführt. Die genspezifischen Primer, sowie die PCR-Bedingungen sind in Tab.5.4.1 dargestellt.

Tab.5.4.1: semiquantitative RT-PCR

Gen	Primernamen	Primersequenz (5'-3')	TA (°C)	Primer:Competimer-Verhältnis	Zyklenzahl	Zelllinie
PTCH1	RT-PTCH1-for3	TACGGACATTGTACC TCGGG	59,4	1:9	30	HeLa
PTCH1	RT-PTCH1-rev1	GGCATGTAGTCGGCT TTGTC	59,4	1:9	30	HeLa
Fu	RT-Fu-f2	GCCCTGTACTATCTG CATTG	57,5	1:9	30	HeLa
Fu	RT-Fu-r2	TTGAGAATGAGGCTG ACCAG	57,3	1:9	30	HeLa
β-catenin	β-catenin-sense	ATGGAACCAGACAG AAAAGC	55,3	1:9	30	HeLa
β-catenin	β-catenin-antisense	GCTACTTGTTCTGAG TGAAG	55,3	1:9	30	HeLa

Ergebnisse

1. Die intrazelluläre Lokalisation von GLI3 in Abhängigkeit von Mikrotubuli

1.1 Die intrazelluläre Lokalisation von GLI3

Zu Beginn der vorliegenden Arbeit wurde die intrazelluläre Lokalisation von GFP-GLI3-Fusionsproteinen mittels Immunfluoreszenzmikroskopie (siehe Methodenteil) in HeLa-Zellen untersucht. Es wurden sowohl GLI3-Fusionsproteine, die N-terminal markiert waren, als auch GLI3-Fusionsproteine, die C-terminal markiert waren, verwendet. In den untersuchten Zellen wurden drei Kategorien von Zellen beobachtet: a) Zellen, in denen GLI3 ausschließlich im Zellkern lokalisiert ist, b) Zellen, in denen GLI3 sowohl im Zellkern als auch im Cytosol lokalisiert ist, c) Zellen, in denen GLI3 ausschließlich im Cytosol lokalisiert ist. Pro Immunfluoreszenz-Experiment wurden jeweils 100 GLI3-überexprimierende Zellen, die in eine der oben genannten Kategorien eingeordnet wurden, ausgezählt. Jedes Immunfluoreszenz-Experiment wurde drei mal wiederholt. Die Mittelwerte aus den so ermittelten Zahlenwerten wurden graphisch im Balkendiagramm dargestellt und zur Berechnung der Standardabweichung benutzt.

In $52 \pm 6\%$ der GFP-GLI3 exprimierenden HeLa-Zellen war das N-terminal markierte GFP-GLI3 ausschließlich im Zellkern lokalisiert, während es in $13 \pm 8\%$ der Zellen ausschließlich im Cytosol lokalisiert war. Die restlichen GFP-GLI3-positiven Zellen zeigten eine Verteilung des Fusionsproteins sowohl im Kern als auch im Cytosol (Abb.1.1.1).

Vergleichbare Ergebnisse wurden auch mit dem C-terminal markierten GLI3-GFP erzielt: Hier war in $57 \pm 4\%$ der GLI3-GFP exprimierenden HeLa-Zellen das C-terminal markierte GLI3-GFP ausschließlich im Zellkern lokalisiert, während es in $11 \pm 3\%$ der Zellen ausschließlich im Cytosol lokalisiert war. Die restlichen GFP-GLI3-positiven Zellen zeigten eine Verteilung des Fusionsproteins sowohl im Kern als auch im Cytosol (Abb.1.1.1).

Um auszuschließen, dass die Lokalisation der GLI3-Fusionsproteine durch die Markierung mit dem GFP (green fluorescent protein) verändert wird, wurde auch mit einem myc-Epitop fusioniertes GLI3 (myc-GLI3) in HeLa-Zellen auf seine Lokalisation hin untersucht. In $53 \pm 3\%$ der myc-GLI3 exprimierenden HeLa-Zellen war das N-terminal markierte myc-GLI3

ausschließlich im Zellkern lokalisiert, während es in $19 \pm 6\%$ der Zellen ausschließlich im Cytosol lokalisiert war. Die restlichen GFP-GLI3-positiven Zellen zeigten eine Verteilung des Fusionsproteins sowohl im Kern als auch im Cytosol (Abb.1.1.1).

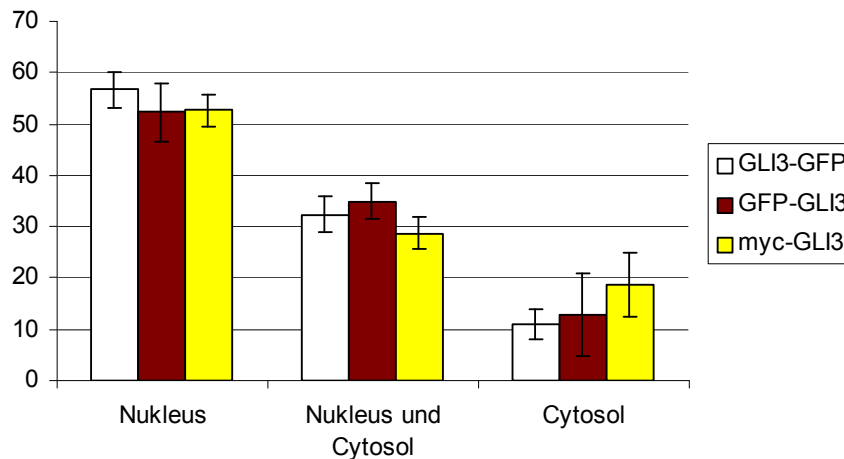


Abb.1.1.1: Lokalisation verschiedener GLI3-Fusionsproteine in HeLa-Zellen. In HeLa-Zellen wurde C-terminal GFP-markiertes (weiße Balken), N-terminal GFP-markiertes (rote Balken) bzw. mit einem myc-Epitop fusioniertes (gelbe Balken) GLI3 überexprimiert. In jeweils drei unabhängigen Experimenten wurden jeweils 100 GLI3-überexprimierende Zellen ausgezählt und in eine der drei folgenden Kategorien eingeordnet: a) Zellen, in denen GLI3 ausschließlich im Zellkern lokalisiert ist, b) Zellen, in denen GLI3 sowohl im Zellkern als auch im Cytosol lokalisiert ist, c) Zellen, in denen GLI3 ausschließlich im Cytosol lokalisiert ist. Die Mittelwerte aus den jeweils drei Ergebnissen sind im Balkendiagramm mit den jeweiligen Standardabweichungen dargestellt.

1.2 Zerstörung der Mikrotubuli (MT) durch Colcemid beeinflusst die intrazelluläre Lokalisation von GLI3

Durch Zerstörung der MT mittels Colcemidbehandlung sollte untersucht werden, ob die intrazelluläre Lokalisation von GFP-GLI3 von intakten MT abhängt. Die Zerstörung der Mikrotubuli wurde mittels Tubulin-Färbung überprüft (Abb.1.2.2). Die mikroskopische Auswertung der Colcemid-behandelten Zellen zeigte eine signifikante ($p = 0,007$) Veränderung der intrazellulären Lokalisation von GFP-GLI3 (Abb.1.2.1): in $27 \pm 7\%$ der HeLa-Zellen war GFP-GLI3 ausschließlich im Zellkern lokalisiert, während es in $24 \pm 4\%$ der Zellen ausschließlich im Cytosol lokalisiert war. In den restlichen Zellen wurde GFP-GLI3 sowohl im Zellkern als auch im Cytosol gefunden. Vergleichbare Ergebnisse wurden auch mit C-terminal markiertem GLI3-GFP in HeLa-Zellen erzielt (Abb.1.2.3).

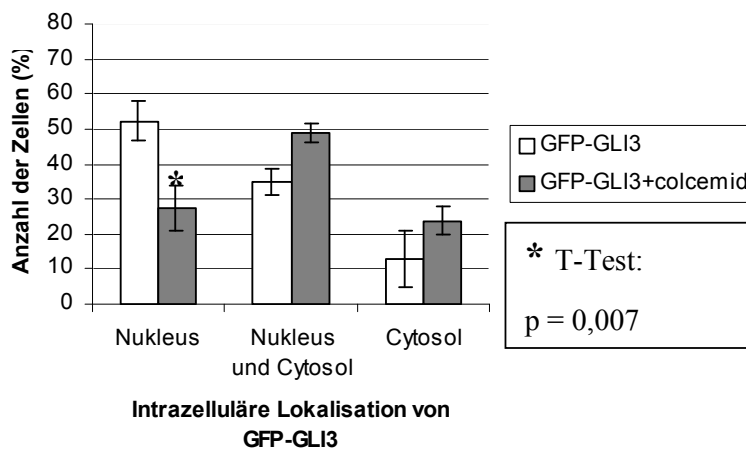


Abb.1.2.1: Die Lokalisation von N-terminal markiertem GFP-GLI3 in HeLa-Zellen ist abhängig von intakten Mikrotubuli. GFP-GLI3 wurde in HeLa-Zellen mit (graue Balken) bzw. ohne (weiße Balken) Zugabe von Colcemid (100mg/ml) überexprimiert. In drei unabhängigen Experimenten wurden jeweils 100 GFP-GLI3-exprimierende Zellen ausgezählt und in eine der drei folgenden Kategorien eingeordnet: a) GFP-GLI3 ist ausschließlich im Zellkern lokalisiert, b) GFP-GLI3 ist sowohl im Zellkern als auch im Cytosol lokalisiert, c) GFP-GLI3 ist ausschließlich im Cytosol lokalisiert. Die Mittelwerte aus den jeweils drei Ergebnissen sind im Balkendiagramm mit den jeweiligen Standardabweichungen dargestellt. Die Signifikanz der beobachteten Lokalisationsänderung wurde unter Annahme einer Normalverteilung mittels T-Test überprüft, das Ergebnis des T-Tests ist in der Abbildung angegeben.

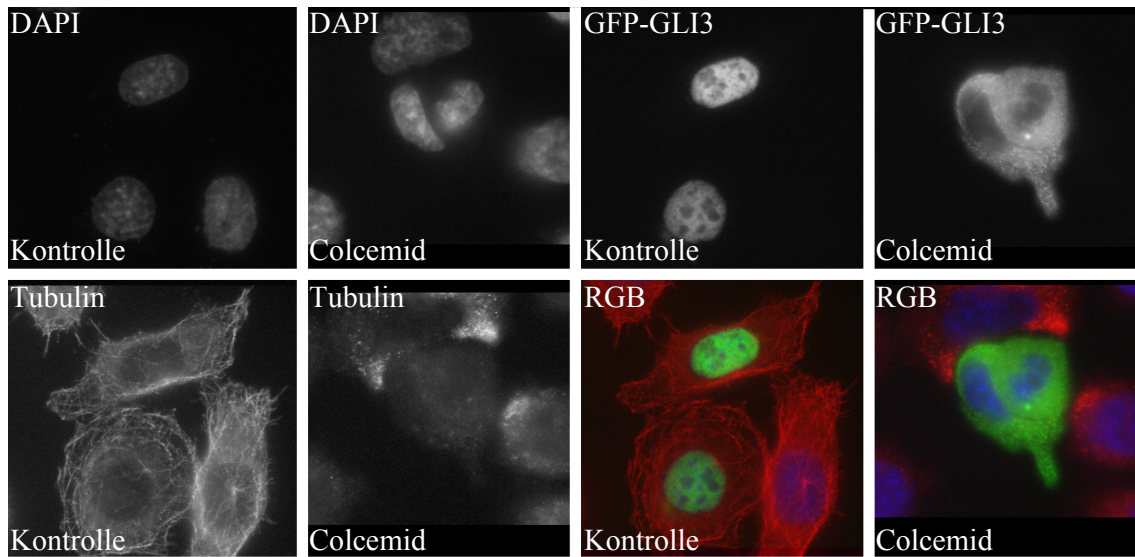


Abb.1.2.2: Die Lokalisation von GFP-GLI3 in HeLa-Zellen ist abhängig von intakten Mikrotubuli. GFP-GLI3 wurde in HeLa-Zellen mit bzw. ohne Zugabe von Colcemid überexprimiert. Die Zellkerne sind mit DAPI-Färbung visualisiert (blau, oben links). Die GFP-GLI3-Lokalisation (grün, oben rechts) nach Colcemid-Behandlung bzw. in Kontroll-Zellen ist exemplarisch gezeigt. Tubulin-Färbung zur Darstellung der Integrität der Mikrotubuli in Kontroll-Zellen bzw. zur Darstellung der Zerstörung der Mikrotubuli nach Colcemid-Behandlung (rot, unten links) sind gezeigt.

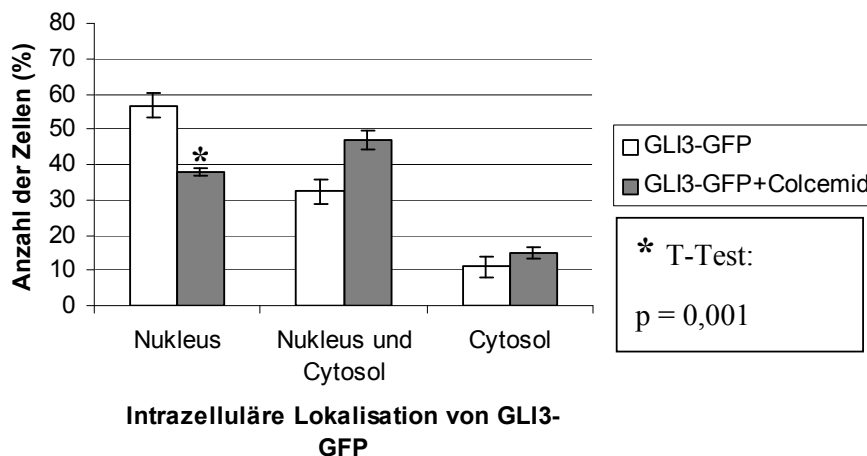


Abb.1.2.3: Die Lokalisation von C-terminal markiertem GLI3-GFP in HeLa-Zellen ist abhängig von intakten Mikrotubuli. GLI3-GFP wurde in HeLa-Zellen mit (graue Balken) bzw. ohne (weiße Balken) Zugabe von Colcemid überexprimiert. In drei unabhängigen Experimenten wurden jeweils 100 GFP-GLI3-exprimierende Zellen ausgezählt und in eine der drei folgenden Kategorien eingeordnet: a) GLI3-GFP ist ausschließlich im Zellkern lokalisiert, b) GLI3-GFP ist sowohl im Zellkern als auch im Cytosol lokalisiert, c) GLI3-GFP ist ausschließlich im Cytosol lokalisiert. Die Mittelwerte aus den jeweils drei Ergebnissen sind im Balkendiagramm mit den jeweiligen Standardabweichungen dargestellt. Die Signifikanz der beobachteten Lokalisationsänderung wurde unter Annahme einer Normalverteilung mittels T-Test überprüft, das Ergebnis des T-Tests ist in der Abbildung angegeben.

1.3 Zerstören der Mikrotubuli durch Kälteschock

Um auszuschließen, dass die beobachteten Lokalisationsänderungen von GFP-GLI3 Nebeneffekte der Behandlung mit Colcemid sind, wurden in einem zweiten Experiment die Mikrotubuli mittels Kälteschock zerstört.

In HeLa-Zellen wurde N-terminal markiertes GFP-GLI3 exprimiert. Die Mikrotubuli wurden mittels Kälteschock zerstört (Abb.1.3.1). In 56% der Zellen mit intakten Mikrotubuli lag GFP-GLI3 ausschließlich im Zellkern vor, während es in 14% der Zellen im Cytosol und in 30% der Zellen in beiden Kompartimenten lokalisiert war. Nach Zerstörung der Mikrotubuli lag GFP-GLI3 nur noch in 24% der Zellen im Zellkern, in 30% der Zellen im Cytosol und in 46% der Zellen in beiden Kompartimenten vor (Abb.1.3.2). Vergleichbare Ergebnisse wurden auch mit C-terminal markiertem GLI3-GFP in HeLa-Zellen erzielt (Abb.1.3.3).

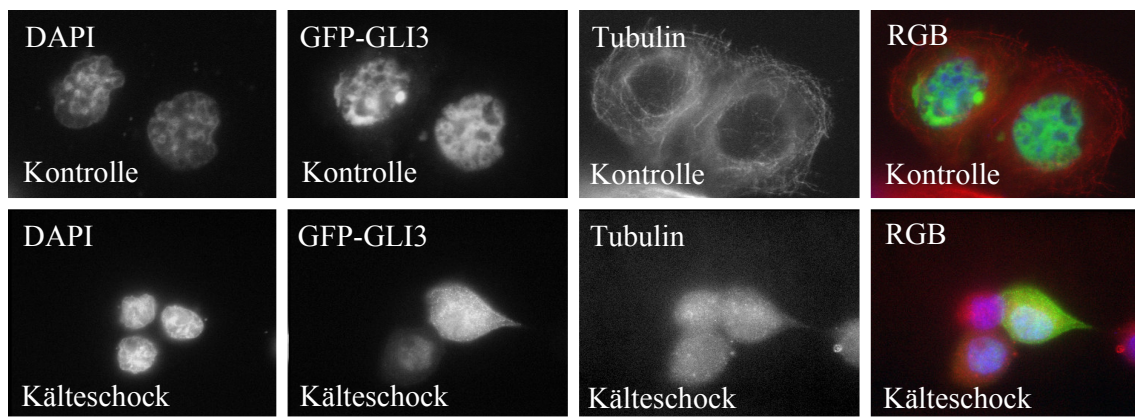


Abb.1.3.1: Die Lokalisation von GFP-GLI3 in HeLa-Zellen ist abhängig von intakten Mikrotubuli. GFP-GLI3 wurde in HeLa-Zellen mit bzw. ohne Kälteschock überexprimiert. Die Zellkerne sind mit DAPI-Färbung visualisiert (blau, links). Die GFP-GLI3-Lokalisation (grün, Mitte links) nach Kälteschock bzw. in Kontroll-Zellen ist exemplarisch gezeigt. Tubulin-Färbung zur Darstellung der Integrität der Mikrotubuli in Kontroll-Zellen bzw. zur Darstellung der Zerstörung der Mikrotubuli nach Colcemid-Behandlung (rot, Mitte rechts) sind gezeigt.

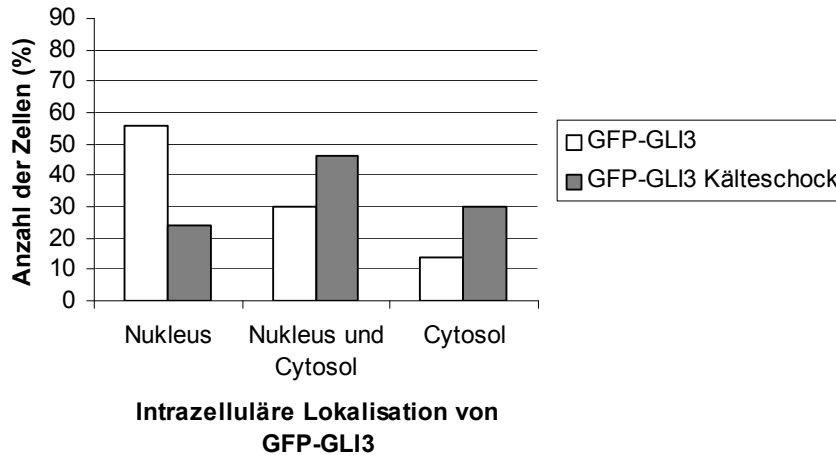


Abb.1.3.2: Intrazelluläre Lokalisation von N-terminal markiertem GFP-GLI3 in HeLa-Zellen nach Zerstören der Mikrotubuli mittels Kälteschock (4°C, 30min). GFP-GLI3 wurde in HeLa-Zellen überexprimiert. Die GLI3-Lokalisation wurde in jeweils 100 Zellen mit (graue Balken) bzw. ohne (weiße Balken) Kälteschock analysiert. Dargestellt ist die Anzahl der Zellen (in %), die in jeweils eine der folgenden Kategorien eingeordnet wurden: a) GFP-GLI3 liegt ausschließlich im Nukleus vor, b) GFP-GLI3 liegt im Nukleus und im Cytosol vor, c) GFP-GLI3 liegt ausschließlich im Cytosol vor.

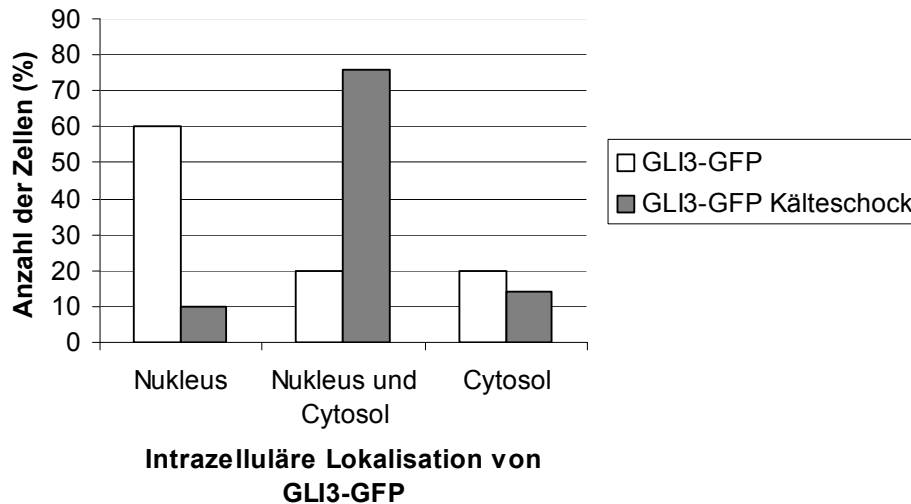


Abb.1.3.3: Intrazelluläre Lokalisation von C-terminal markiertem GLI3-GFP in HeLa-Zellen nach Zerstören der Mikrotubuli mittels Kälteschock. Die Auswertung der Experimente sowie die Darstellung der Ergebnisse erfolgte exakt wie in Abb.1.3.2.

Zusätzlich wurde dieses Experiment in einer anderen Zelllinie (U373MG) durchgeführt, um auszuschließen, dass die beobachteten Effekte Zelllinien-abhängig sind.

N-terminal markiertes GFP-GLI3 wurde in U373MG-Zellen überexprimiert und die Mikrotubuli wurden mittels Kälteschock zerstört. In 54% der Zellen mit intakten Mikrotubuli lag GFP-GLI3 ausschließlich im Zellkern vor, während es in 8% der Zellen im Cytosol und in 38% der Zellen in beiden Zellkompartimenten lokalisiert war. Nach Zerstörung der Mikrotubuli lag GFP-GLI3 nur noch in 34% der Zellen im Zellkern vor, während es in 57% der Zellen sowohl im Kern als auch im Cytosol und in 9% der Zellen ausschließlich im Cytosol verteilt war (Abb.1.3.4). Mit C-terminal markiertem GLI3-GFP wurden in U373MG-Zellen ähnliche, wenn auch weniger deutliche Effekte beobachtet (Abb.1.3.5).

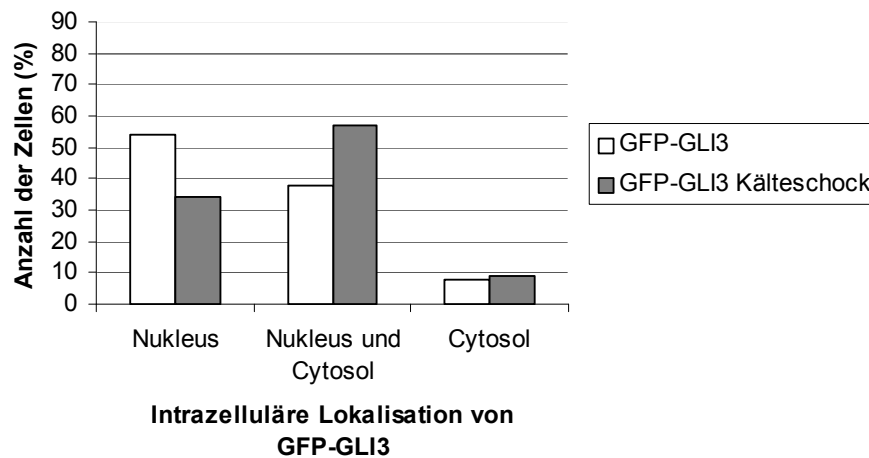


Abb.1.3.4: Intrazelluläre Lokalisation von N-terminal markiertem GFP-GLI3 in U373MG-Zellen nach Zerstören der Mikrotubuli mittels Kälteschock. GFP-GLI3 wurde in U373MG-Zellen exprimiert. Die GLI3-Lokalisation in jeweils 100 Zellen mit (graue Balken) bzw. ohne (weiße Balken) Kälteschock wurde analysiert. Dargestellt ist die Anzahl der Zellen (in %), die in jeweils eine der folgenden Kategorien eingeordnet wurden: a) GFP-GLI3 liegt ausschließlich im Nukleus vor, b) GFP-GLI3 liegt im Nukleus und im Cytosol vor, c) GFP-GLI3 liegt ausschließlich im Cytosol vor.

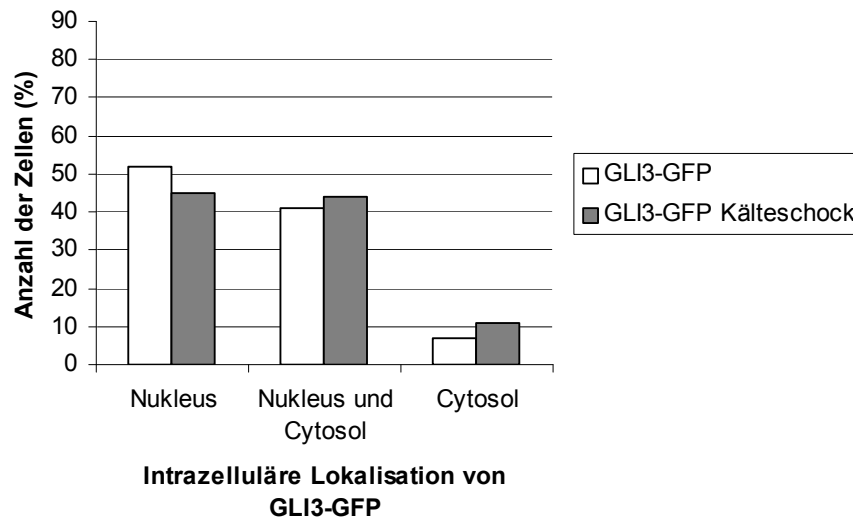


Abb.1.3.5: Intrazelluläre Lokalisation von C-terminal markiertem GLI3-GFP in U373MG-Zellen nach Zerstören der Mikrotubuli mittels Kälteschock. Die Auswertung der Experimente sowie die Darstellung der Ergebnisse erfolgte exakt wie in Abb.1.3.4.

2. Kolokalisation von GLI3 mit Mikrotubuli bzw. mit dem Mikrotubulus-assoziierten MID1-Protein

2.1 Kolokalisation von GLI3 mit Mikrotubuli

Im Rahmen dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass die GLI3-Lokalisation von der Integrität der Mikrotubuli abhängt. Wie anhand der Immunfluoreszenz-Bilder zu erkennen ist, liegt GLI3 aber offensichtlich nicht vollständig an Mikrotubuli assoziiert in der Zelle vor. Es sollte nun untersucht werden, ob es eine partielle, zeitlich begrenzte Bindung von GLI3 an Mikrotubuli gibt. Hierfür wurde N-terminal markiertes GFP-GLI3 in HeLa-Zellen überexprimiert. Nach Färbung der Mikrotubuli wurden die Zellen mittels 3D-Mikroskopie analysiert. Es konnte eine partielle Kolokalisation von GFP-GLI3 mit Mikrotubuli gezeigt werden (Abb.2.1.2). Als Positiv-Kontrolle wurde MID1-myc in HeLa-Zellen exprimiert (Abb.2.1.1), hier konnte vollständige Kolokalisation gezeigt werden. Als Negativ-Kontrolle wurde GFP in HeLa-Zellen exprimiert (Abb.2.1.1), hier war keine Kolokalisation nachweisbar.

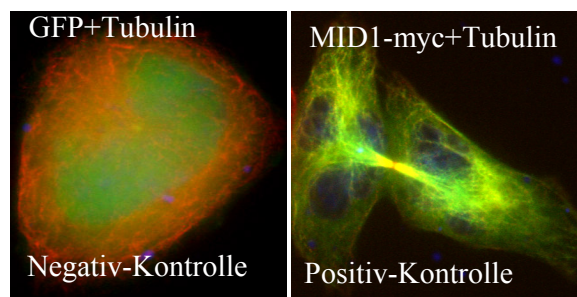


Abb.2.1.1: Kontrollen für 3D-Mikroskopie. Links: GFP (grün) wurde in HeLa-Zellen exprimiert. Die Mikrotubuli wurden mit anti-Tubulin gefärbt (rot). Hier ist keine Kolokalisation zu beobachten, weiterhin sind keine Protein-Akkumulationen wie bei GFP-GLI3 zu beobachten. Rechts: MID1-myc (grün) wurde in HeLa-Zellen exprimiert. Die Mikrotubuli wurden mit anti-Tubulin gefärbt (rot). Die gelbe Färbung zeigt deutlich Kolokalisation.

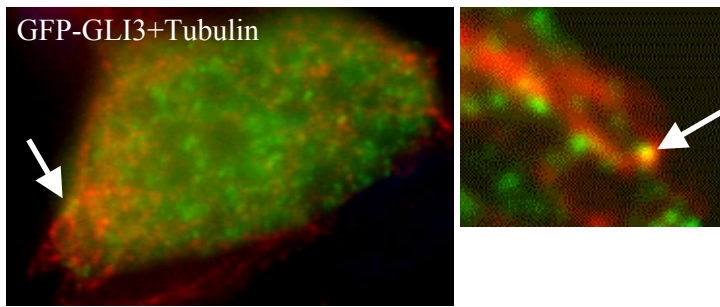


Abb.2.1.2: Partielle Kolokalisation von GFP-GLI3 mit Mikrotubuli. Links: Eine ganze HeLa-Zelle, die GFP-GLI3 (grün) exprimiert, ist gezeigt. Die Mikrotubuli wurden mit anti-Tubulin gefärbt (rot). Der Pfeil deutet auf eine partielle Kolokalisation von GFP-GLI3 mit Mikrotubuli (gelb). Rechts: Darstellung eines vergrößerten Ausschnitts einer z-Ebene des dekonvolvierten Bildes einer Zelle wie links. Der Pfeil deutet auf eine Stelle, an der GFP-GLI3 mit den Mikrotubuli Kolokalisiert.

2.2 Kolokalisation von GLI3 und MID1

Die oben gezeigte Kolokalisation legte die Vermutung nahe, dass GLI3 auch mit dem Mikrotubulus-assoziierten MID1-Protein partiell kolokalisieren könnte. Um dies zu überprüfen, wurden N-terminal markiertes GFP-GLI3 und MID1-myc in HeLa-Zellen koexprimiert. Die Zellen wurden mittels 3D-Mikroskopie analysiert. Die qualitative Analyse zeigt eine partielle Kolokalisation von GLI3 und MID1 (Abb.2.2.1).

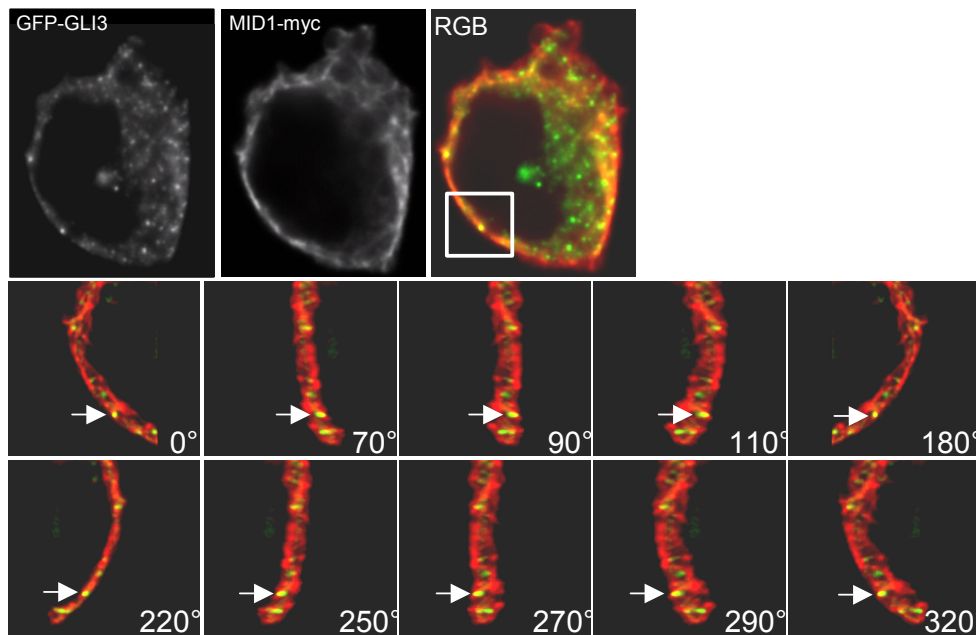


Abb.2.2.1: Partielle Kolokalisation von GFP-GLI3 mit MID1-myc. Oben: Eine z-Ebene eines dekonvolvierten Bilds einer HeLa-Zelle, die GFP-GLI3 (grün, links) und MID1-myc (rot, Mitte) koexprimiert, ist gezeigt. Eine partielle Kolokalisation von GFP-GLI3 mit MID1-myc stellt sich gelb dar. Unten: Darstellung des im Bild oben markierten Ausschnitts. Der Bildabschnitt ist von verschiedenen Blickwinkeln gezeigt (Blickwinkel sind in den einzelnen Bildern unten rechts angegeben), um auszuschließen, dass die gelben Signale durch zufällige Überlagerung der roten und grünen Signale entstehen. Der Pfeil deutet auf die gleiche Stelle, betrachtet von verschiedenen Blickwinkeln, an der GFP-GLI3 und MID1 kolokalisieren.

3. Veränderung der intrazellulären Lokalisation von GLI3 durch veränderte Protein Phosphatase 2a (PP2A)-Aktivität

Ein wesentlicher Faktor für die Regulation des GLI3-Homologs in *Drosophila*, Ci, ist die Serin-Threonin-Phosphorylierung und Dephosphorylierung dessen Interaktionspartner Fu und Cos2 in dem dort vorliegenden Mikrotubulus-assoziierten Protein-Komplex [zusammengefasst in Murone et al. (1999)]. Im Rahmen der vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, dass die intrazelluläre Lokalisation von GLI3 in Abhängigkeit der Integrität der Mikrotubuli reguliert wird und es eine partielle Kolokalisation von GLI3 und MID1 gibt. Mikrotubulus-assoziierte PP2A macht einen Großteil der Mikrotubulus-assoziierten Phosphatase-Aktivität aus. Durch Beeinflussung der Aktivität Mikrotubulus-assoziiierter PP2A mit Hilfe verschiedener Mechanismen sollte deren Einfluss auf die intrazelluläre Lokalisation von GLI3 untersucht werden.

3.1 Einfluss des α 4-Proteins auf die intrazelluläre Lokalisation von GLI3

3.1.1 Koexpression von GLI3 und α 4

Durch eine Anreicherung von α 4 in der Zelle kann viel MID1 an die katalytische Untereinheit der PP2A binden und deren Abbau vermitteln. Das führt nach Trockenbacher et al. (2001) zur Verringerung der Mikrotubulus-assoziierten PP2A und folglich zur Hyperphosphorylierung ihrer Mikrotubulus-assoziierten Zielproteine.

Um zu untersuchen, ob sich die intrazelluläre Lokalisation von GLI3 durch Überexpression von α 4 beeinflussen lässt, wurde N-terminal markiertes GFP-GLI3 in HeLa-Zellen mit α 4-V5 koexprimiert. Der Anteil der Zellen, in denen GFP-GLI3 im Kern vorliegt, veränderte sich nach α 4-V5-Coexpression von $55 \pm 2\%$ auf $75 \pm 8\%$. Der Anteil der Zellen mit cytosolischem GFP-GLI3 änderte sich von $11 \pm 6\%$ auf $4 \pm 3\%$. In den restlichen GFP-GLI3 und α 4-V5 koexprimierenden Zellen lag GFP-GLI3 in beiden Kompartimenten verteilt vor (Abb.3.1.1.1). Die Signifikanz dieser Lokalisationsänderung wurde unter Annahme einer Normalverteilung mittels T-Test überprüft ($p=0,014$). Vergleichbare Ergebnisse wurden auch mit dem C-terminal markierten GLI3-GFP erreicht (Abb.3.1.1.2).

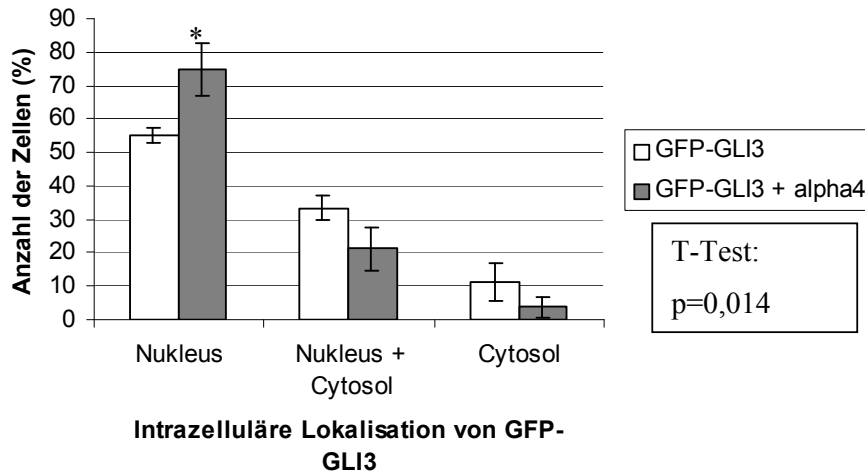


Abb.3.1.1.1: Koexpression von N-terminal markiertem GFP-GLI3 und $\alpha 4$ -V5 in HeLa-Zellen. Die intrazelluläre Lokalisation von GFP-GLI3 in HeLa-Zellen mit (graue Balken) bzw. ohne (weiße Balken) Koexpression von $\alpha 4$ -V5 wurde analysiert. In drei unabhängigen Experimenten wurden jeweils 100 Zellen ausgezählt und in eine der drei folgenden Kategorien eingeordnet: a) GFP-GLI3 ist ausschließlich im Zellkern lokalisiert, b) GFP-GLI3 ist sowohl im Zellkern als auch im Cytosol lokalisiert, c) GFP-GLI3 ist ausschließlich im Cytosol lokalisiert. Die Mittelwerte aus den jeweils drei Ergebnissen sind im Balkendiagramm mit den jeweiligen Standardabweichungen dargestellt. Unter Annahme einer Normalverteilung wurde die Signifikanz des beobachteten Effekts mittels T-Test ermittelt. Das Ergebnis des T-Tests ist in der Abbildung angegeben.

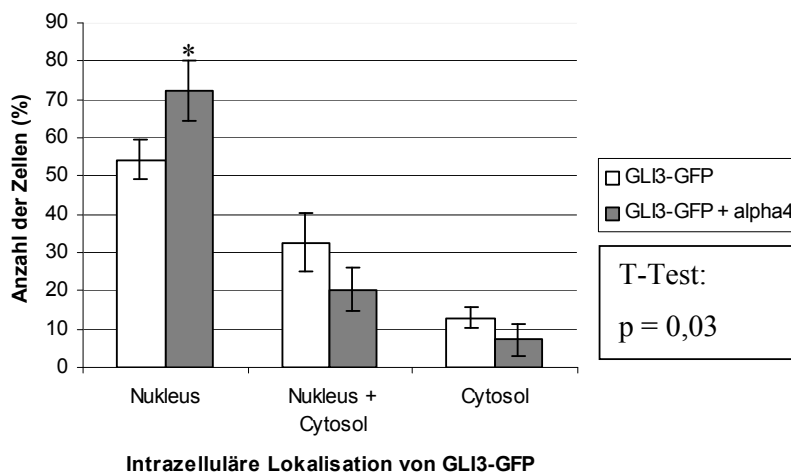


Abb.3.1.1.2: Koexpression von C-terminal markiertem GLI3-GFP und $\alpha 4$ -V5 in HeLa-Zellen. Die intrazelluläre Lokalisation von GLI3-GFP in HeLa-Zellen mit (graue Balken) bzw. ohne (weiße Balken) Koexpression von $\alpha 4$ -V5 wurde analysiert. Die Auswertung erfolgte exakt wie in 3.1.1.1. Die Mittelwerte aus den jeweils drei Ergebnissen sind im Balkendiagramm mit den jeweiligen Standardabweichungen dargestellt. Unter Annahme einer Normalverteilung wurde die Signifikanz des Ergebnisses mittels T-Test untersucht. Das Ergebnis des T-Tests ist in der Abbildung angegeben.

Um auszuschließen, dass die hier beobachteten Lokalisationsänderungen von GFP-GLI3 nach Koexpression von $\alpha 4$ artifiziell nur bei GFP-fusioniertem GLI3 auftreten, wurde myc-markiertes GLI3 mit $\alpha 4$ -V5 koexprimiert. Die koexprimierenden Zellen wurden mittels Immunfluoreszenz und Fluoreszenzmikroskopie (siehe Methoden) analysiert. Wie bei GFP-markiertem GLI3 wurde nach Koexpression von $\alpha 4$ eine Anreicherung von myc-GLI3 im Zellkern beobachtet. So lag myc-GLI3 nach Koexpression von $\alpha 4$ in $61 \pm 4\%$ der Zellen im Zellkern vor, gegenüber $53 \pm 3\%$ in den Kontrollzellen. Der Anteil der Zellen mit cytosolischem myc-GLI3 änderte sich nach Koexpression von $\alpha 4$ von $15 \pm 4\%$ auf $17 \pm 2\%$. In den restlichen myc-GLI3 und $\alpha 4$ -V5 koexprimierenden Zellen lag myc-GLI3 in beiden Kompartimenten verteilt vor (Abb.3.1.1.3).

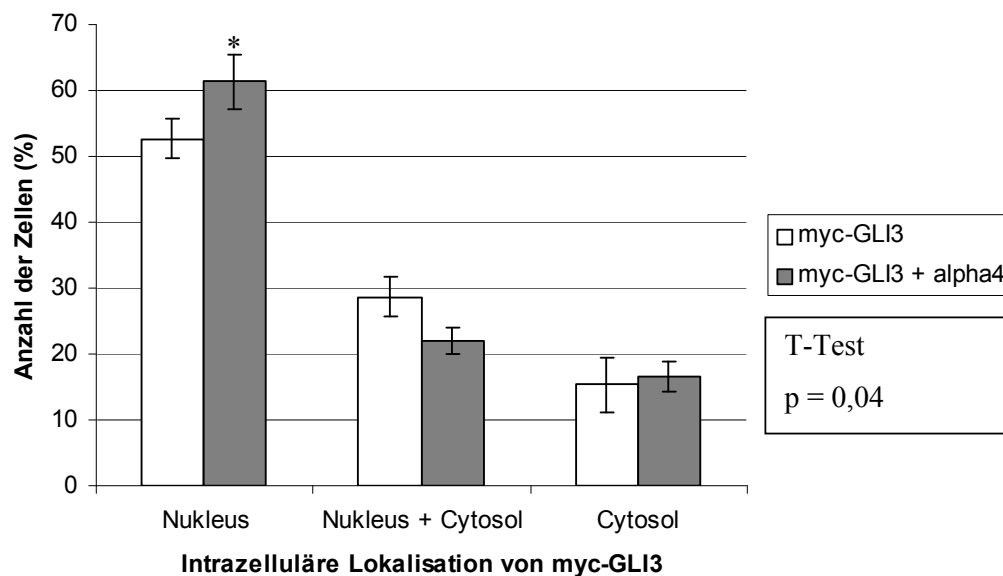


Abb.3.1.1.3: Koexpression von myc-GLI3 und $\alpha 4$ -V5 in HeLa-Zellen. Die intrazelluläre Lokalisation von myc-GLI3 in HeLa-Zellen mit (graue Balken) bzw. ohne (weiße Balken) Koexpression von $\alpha 4$ -V5 wurde analysiert. In drei unabhängigen Experimenten wurden jeweils 100 Zellen ausgezählt und in eine der drei folgenden Kategorien eingeordnet: a) myc-GLI3 ist ausschließlich im Zellkern lokalisiert, b) myc-GLI3 ist sowohl im Zellkern als auch im Cytosol lokalisiert, c) myc-GLI3 ist ausschließlich im Cytosol lokalisiert. Die Mittelwerte aus den jeweils drei Ergebnissen sind im Balkendiagramm mit den jeweiligen Standardabweichungen dargestellt. Unter Annahme einer Normalverteilung wurde die Signifikanz des Ergebnisses mittels T-Test untersucht. Das Ergebnis des T-Tests ist in der Abbildung angegeben.

3.1.2 GLI3 Lokalisation nach „Knockdown“ von $\alpha 4$

Das $\alpha 4$ -Protein vermittelt die Interaktion zwischen MID1 und PP2A. Fehlt das $\alpha 4$ -Protein, kann MID1 nicht mehr seine Ubiquitinligase-Funktion auf PP2A ausüben. Dies führt zur Akkumulation von Mikrotubulus-assoziiierter PP2A und folglich zur Hypophosphorylierung ihrer Zielproteine. Es sollte nun in einer weiteren Serie von Experimenten die GLI3-Lokalisation nach Kotransfektion mit $\alpha 4$ -spezifischen siRNAs, die die Reduktion der Menge des endogenen $\alpha 4$ -Proteins einleiten (siehe Methoden RNAi), analysiert werden. Nach Kotransfektion von HeLa-Zellen mit GFP-GLI3 und $\alpha 4$ -spezifischen siRNAs, wurde mittels Fluoreszenzmikroskopie die intrazelluläre GFP-GLI3 Lokalisation untersucht. Nach „Knockdown“ von $\alpha 4$ verringerte sich die Anzahl der Zellen, bei denen GFP-GLI3 ausschließlich im Kern vorlag von $56 \pm 7,8\%$ auf $17 \pm 11,6\%$. Die Anzahl der Zellen, in denen GFP-GLI3 ausschließlich im Cytosol vorlag, veränderte sich nach dem $\alpha 4$ „Knockdown“ von $11 \pm 7\%$ auf $31 \pm 14\%$. In den jeweils restlichen GLI3-positiven Zellen lag GFP-GLI3 sowohl im Zellkern als auch im Cytosol vor (Abb.3.1.2.1). Die Effizienz des $\alpha 4$ „Knockdown“ wurde mittels Westernblot (siehe Methoden) gezeigt (Abb.3.1.2.2). Hier wurden jeweils $50\mu\text{g}$ Proteinextrakt der oben beschriebenen Zellen auf einem 10% igen SDS-Gel aufgetrennt und geblottet. Die Blots wurden mit einem anti- $\alpha 4$ -Antikörper bzw. einem anti-Aktin-Antikörper inkubiert.

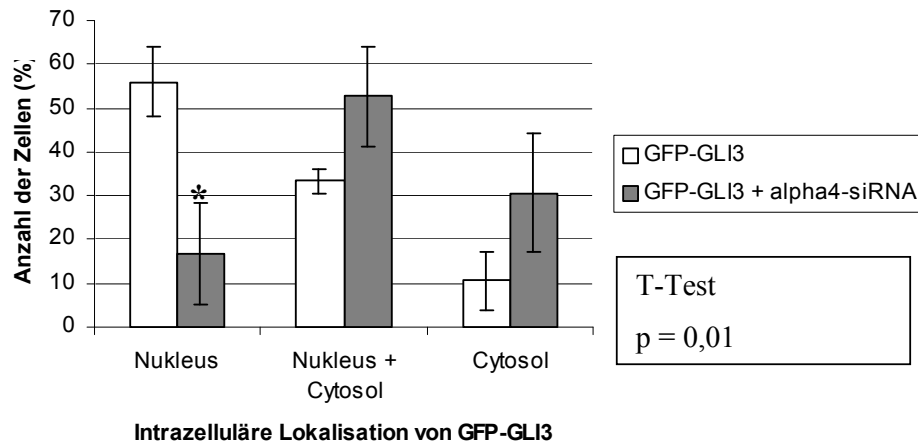


Abb.3.1.2.1: Kotransfektion von GFP-GLI3 und $\alpha 4$ -siRNA in HeLa-Zellen. Die intrazelluläre Lokalisation von GFP-GLI3 in HeLa-Zellen mit (graue Balken) bzw. ohne (weiße Balken) Kotransfektion von $\alpha 4$ -siRNA wurde analysiert. In drei unabhängigen Experimenten wurden jeweils 100 Zellen ausgezählt und in eine der drei folgenden Kategorien eingeordnet: a) GFP-GLI3 ist ausschließlich im Zellkern lokalisiert, b) GFP-GLI3 ist sowohl im Zellkern als auch im Cytosol lokalisiert, c) GFP-GLI3 ist ausschließlich im Cytosol lokalisiert. Die Mittelwerte aus den jeweils drei Ergebnissen sind im Balkendiagramm mit den jeweiligen Standardabweichungen dargestellt. Unter Annahme einer Normalverteilung wurde die Signifikanz des Ergebnisses mittels T-Test untersucht. Das Ergebnis des T-Tests ist in der Abbildung angegeben.

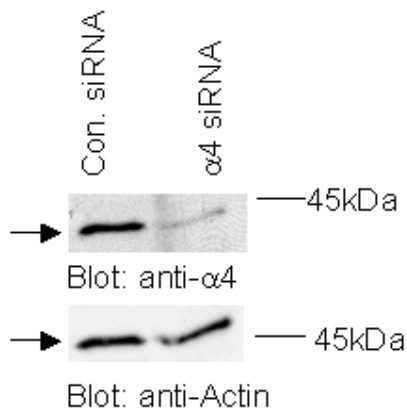


Abb.3.1.2.2: Verifizierung des „Knockdown“ von $\alpha 4$. Jeweils 100 μ g Proteinextrakt von HeLa-Zellen, die mit $\alpha 4$ -spezifischen siRNAs (rechte Spur) bzw. Kontroll-siRNAs (linke Spur) transfiziert wurden, wurden auf einem 10%igen SDS-Gel aufgetrennt und mittels Westernblot analysiert. Die Detektion des Blots mit anti- $\alpha 4$ -Antikörpern zeigt eine deutliche Abnahme der Menge an $\alpha 4$ nach dem „Knockdown“ (oben). Als Ladekontrolle wurde der gleiche Blot mit anti-Aktin-Antikörpern detektiert (unten).

3.2 Überexpression von MID1-myc hat keinen Einfluss auf die intrazelluläre Lokalisation von GLI3

Dem Modell nach Trockenbacher et al. (2001) (siehe Einleitung) zufolge sollte eine Überexpression von MID1 genauso wie eine Überexpression von $\alpha 4$ zu einem vermehrten Abbau der Mikrotubulus-assoziierten PP2A und somit zu einer reduzierten PP2A-Aktivität und einer Hyperphosphorylierung Mikrotubulus-assoziiierter Proteine führen. Daher sollte überprüft werden, ob die Überexpression von MID1-myc die intrazelluläre Lokalisation von GLI3 beeinflussen kann. Hierzu wurden N-terminal markiertes GFP-GLI3 und MID1-myc in HeLa-Zellen koexprimiert und die Zellen mittels Immunfluoreszenz und Fluoreszenz-Mikroskopie (siehe Methoden) analysiert. Pro Immunfluoreszenz-Experiment wurden jeweils 100 GFP-GLI3 und MID1-myc koexprimierende Zellen ausgezählt und wie in den vorhergehenden Kapiteln in eine der folgenden Kategorien eingeordnet: a) Zellen, in denen GFP-GLI3 ausschließlich im Zellkern lokalisiert ist, b) Zellen, in denen GFP-GLI3 sowohl im Zellkern als auch im Cytosol lokalisiert ist, c) Zellen, in denen GFP-GLI3 ausschließlich im Cytosol lokalisiert ist. Jedes Immunfluoreszenz-Experiment wurde drei mal wiederholt. Die Mittelwerte aus den so ermittelten Zahlenwerten wurden graphisch im Balkendiagramm dargestellt und zur Berechnung der Standard-Abweichung benutzt. Durch Überexpression von *MID1-myc* erhöhte sich der Anteil der Zellen, in denen *GFP-GLI3* ausschließlich im Zellkern lokalisiert war von $54 \pm 6\%$ auf $60 \pm 7\%$, während sich der Anteil der Zellen mit cytosolischem GFP-GLI3 von $11 \pm 6\%$ auf $7 \pm 1\%$ änderte. In den jeweils restlichen *GFP-GLI3*-überexprimierenden Zellen verteilte sich das GLI3-Fusionsprotein in beiden Zellkompartimenten. Die statistische Analyse dieser Lokalisationsänderung mittels T-Test zeigte jedoch, dass diese Lokalisationsänderung nicht signifikant war ($p = 0,32$) (Abb.3.2.1). Vergleichbare Ergebnisse wurden mit dem C-terminal markierten GLI3-GFP erzielt (Abb.3.2.2).

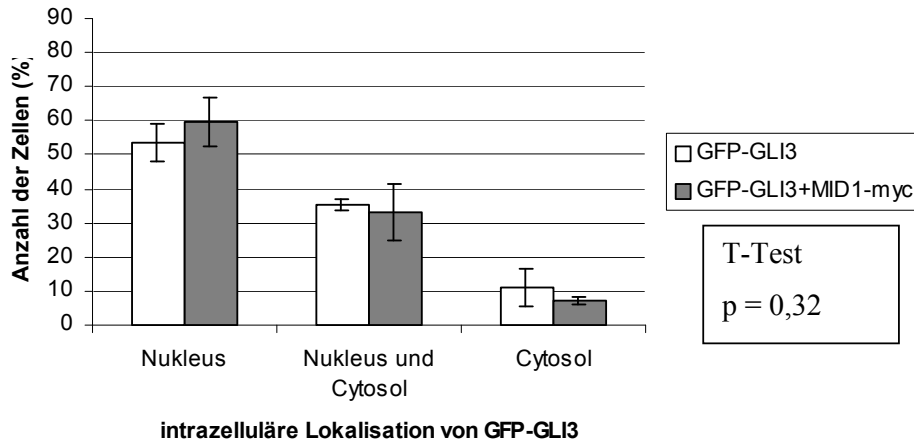


Abb.3.2.1: Koexpression von N-terminal markiertem GFP-GLI3 und MID1-myc in HeLa-Zellen. Die intrazelluläre Lokalisation von GFP-GLI3 in HeLa-Zellen mit (graue Balken) bzw. ohne (weiße Balken) Koexpression von MID1-myc wurde analysiert. In drei unabhängigen Experimenten wurden jeweils 100 Zellen ausgezählt und in eine der drei folgenden Kategorien eingeordnet: a) GFP-GLI3 ist ausschließlich im Zellkern lokalisiert, b) GFP-GLI3 ist sowohl im Zellkern als auch im Cytosol lokalisiert, c) GFP-GLI3 ist ausschließlich im Cytosol lokalisiert. Die Mittelwerte aus den jeweils drei Ergebnissen sind im Balkendiagramm mit den jeweiligen Standardabweichungen dargestellt. Unter Annahme einer Normalverteilung wurde die Signifikanz des beobachteten Effekts mittels T-Test ermittelt. Das Ergebnis des T-Tests ist in der Abbildung angegeben.

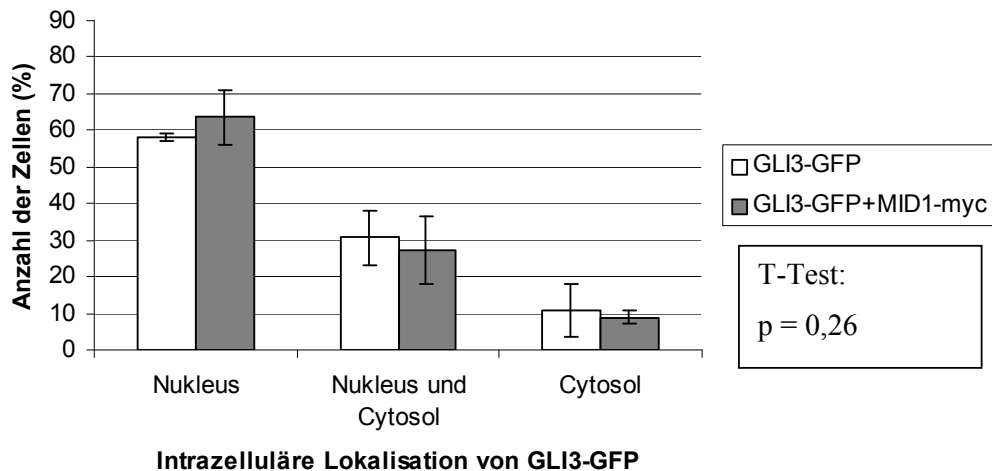


Abb.3.2.2: Koexpression von C-terminal markiertem GLI3-GFP und MID1-myc in HeLa-Zellen. Die intrazelluläre Lokalisation von GLI3-GFP in HeLa-Zellen mit (graue Balken) bzw. ohne (weiße Balken) Koexpression von MID1-myc wurde analysiert. In drei unabhängigen Experimenten wurden jeweils 100 Zellen ausgezählt und in eine der drei folgenden Kategorien eingeordnet: a) GLI3-GFP ist ausschließlich im Zellkern lokalisiert, b) GLI3-GFP ist sowohl im Zellkern als auch im Cytosol lokalisiert, c) GLI3-GFP ist ausschließlich im Cytosol lokalisiert. Die Mittelwerte aus den jeweils drei Ergebnissen sind im Balkendiagramm mit den jeweiligen Standardabweichungen dargestellt. Unter Annahme einer Normalverteilung wurde die Signifikanz des beobachteten Effekts mittels T-Test ermittelt. Das Ergebnis des T-Tests ist in der Abbildung angegeben.

Ein vergleichbares Experiment wurde auch in U373MG-Zellen durchgeführt, um zu zeigen, dass die in HeLa-Zellen erzielten Ergebnisse nicht Zelllinien-abhängig auftraten. Auch die hier festgestellten Änderungen ($58 \pm 5\%$ gegenüber $60 \pm 4\%$ der Zellen mit nukleärem GLI3; $5 \pm 5\%$ gegenüber $6 \pm 4\%$ der Zellen mit cytosolischem GLI3; $37 \pm 4\%$ gegenüber $34 \pm 3\%$ der Zellen, in denen GLI3 in beiden Zellkompartimenten vorlag) waren statistisch nicht signifikant ($p = 0,62$) (Abb.3.2.3). Vergleichbare Ergebnisse wurden in U373MG-Zellen auch mit dem C-terminal markierten GLI3-GFP erzielt (Abb.3.2.4).

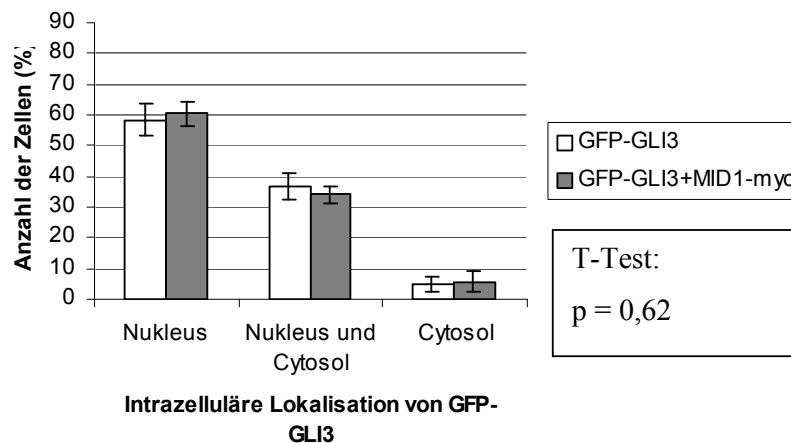


Abb.3.2.3: Koexpression von N-terminal markiertem GFP-GLI3 und MID1-myc in U373MG-Zellen. Die intrazelluläre Lokalisation von GFP-GLI3 in U373MG-Zellen mit (graue Balken) bzw. ohne (weiße Balken) Koexpression von MID1-myc ist gezeigt. In drei unabhängigen Experimenten wurden jeweils 100 Zellen ausgezählt und in eine der drei folgenden Kategorien eingeordnet: a) GFP-GLI3 ist ausschließlich im Zellkern lokalisiert, b) GFP-GLI3 ist sowohl im Zellkern als auch im Cytosol lokalisiert, c) GFP-GLI3 ist ausschließlich im Cytosol lokalisiert. Die Mittelwerte aus den jeweils drei Ergebnissen sind im Balkendiagramm mit den jeweiligen Standardabweichungen dargestellt. Unter Annahme einer Normalverteilung wurde die Signifikanz des beobachteten Effekts mittels T-Test ermittelt. Das Ergebnis des T-Tests ist in der Abbildung angegeben.

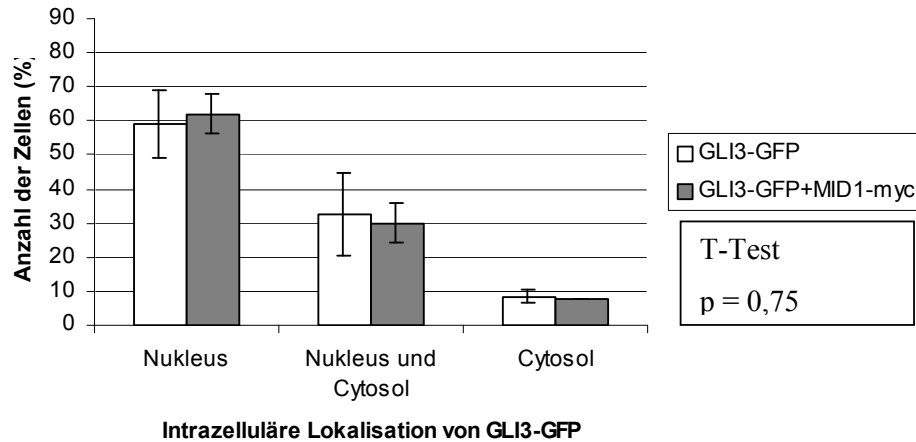


Abb.3.2.4: Koexpression von C-terminal markiertem GLI3-GFP und MID1-myc in U373MG-Zellen. Die intrazelluläre Lokalisation von GLI3-GFP in U373MG-Zellen mit (graue Balken) bzw. ohne (weiße Balken) Koexpression von MID1-myc wurde analysiert. In zwei unabhängigen Experimenten wurden jeweils 100 Zellen ausgezählt und in eine der drei folgenden Kategorien eingeordnet: a) GLI3-GFP ist ausschließlich im Zellkern lokalisiert, b) GLI3-GFP ist sowohl im Zellkern als auch im Cytosol lokalisiert, c) GLI3-GFP ist ausschließlich im Cytosol lokalisiert. Die Mittelwerte aus den jeweils drei Ergebnissen sind im Balkendiagramm mit den jeweiligen Standardabweichungen dargestellt. Unter Annahme einer Normalverteilung wurde die Signifikanz des beobachteten Effekts mittels T-Test ermittelt. Das Ergebnis des T-Tests ist in der Abbildung angegeben.

3.3 Beeinflussung der Aktivität endogener PP2A durch Koexpression der B-Box1 des MID1-Proteins

Die Überexpression der isolierten B-Box1-Domäne des MID1-Proteins erzeugt einen dominant negativen Effekt bezüglich der MID1-Funktion, wodurch die Aktivität der Mikrotubulus-assoziierten PP2A erhöht wird [nach Trockenbacher et al. (2001)]: Die isolierte B-Box1 bindet das $\alpha 4$ -Protein mit einer höheren Affinität als das MID1-Protein (Winter et al., 2004). Die überexprimierte B-Box1 wird somit das in der Zelle vorhandene, endogene $\alpha 4$ -Protein binden, und folglich dessen Bindung an MID1 stören. Dadurch kann MID1 nicht mehr seine Ubiquitinligase-Aktivität auf PP2A ausüben, wodurch deren Abbau verhindert wird. Dies führt zu einer erhöhten Aktivität der Mikrotubulus-assoziierten PP2A in der Zelle. N-terminal markiertes GFP-GLI3 und die myc-markierte B-Box1 des MID1-Proteins wurden in HeLa-Zellen kotransfiziert und mittels Immunfluoreszenz analysiert. Pro Immunfluoreszenz-Experiment wurden jeweils 100 GFP-GLI3 und B-Box1-myc koexprimierende Zellen ausgezählt und wie in Kapitel 1.1-3 quantifiziert.

Nach Koexpression von N-terminal markiertem *GFP-GLI3* mit der B-Box1-myc in HeLa-Zellen reduzierte sich die nukleäre GLI3-Lokalisation von $58 \pm 5\%$ auf $30 \pm 5\%$ (Abb.3.3.1). Der Anteil der Zellen mit cytosolischer GLI3-Lokalisation veränderte sich nach Koexpression der B-Box1 von $5 \pm 1\%$ auf $12 \pm 6\%$. In den restlichen GFP-GLI3-positiven Zellen war das Fusionsprotein in beiden Zellkompartimenten verteilt. Vergleichbare Ergebnisse wurden auch mit C-terminal markiertem GLI3-GFP erreicht (Abb.3.3.2).

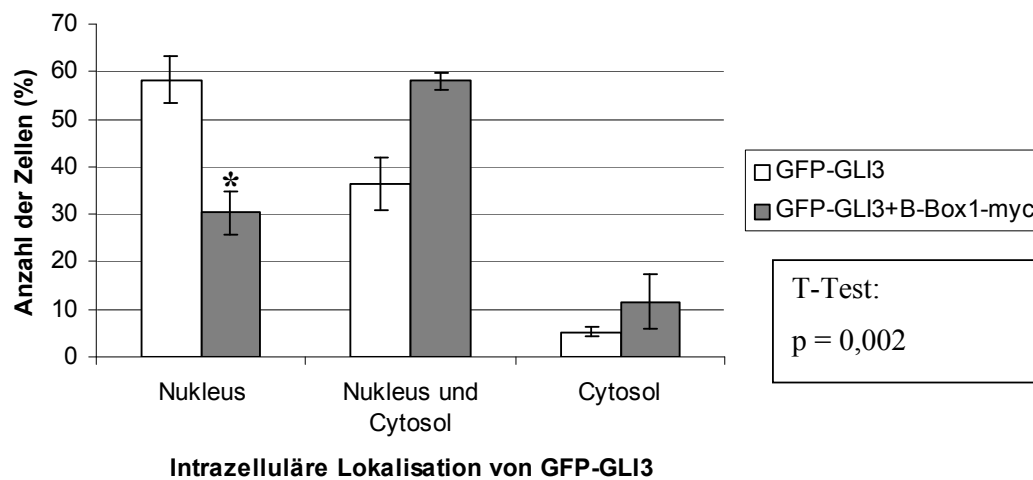
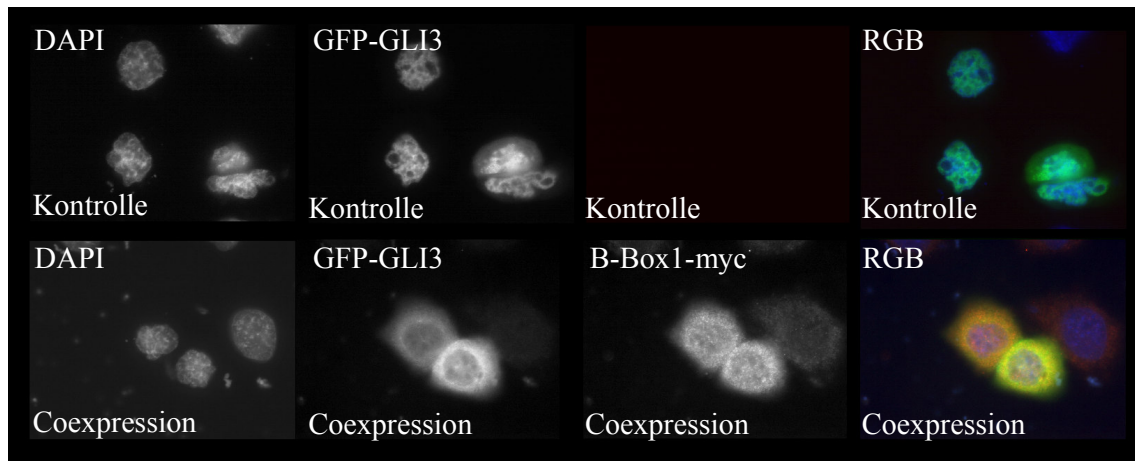


Abb.3.3.1: Oben: GFP-GLI3 wurde in HeLa-Zellen mit bzw. ohne B-Box1-myc überexprimiert. Die Zellkerne sind mit DAPI-Färbung visualisiert (blau, links). Die typische GFP-GLI3-Lokalisation (grün, Mitte links) nach Koexpression der B-Box1-myc bzw. in Kontroll-Zellen ist exemplarisch gezeigt. Die Expression der B-Box1-myc ist gezeigt (rot, Mitte rechts). Das RGB-Bild (Rot-Grün-Blau) ist rechts dargestellt. Unten: Koexpression von N-terminal markiertem GFP-GLI3 und B-Box1-myc in HeLa-Zellen. Die intrazelluläre Lokalisation von GFP-GLI3 in HeLa-Zellen mit (graue Balken) bzw. ohne (weiße Balken) Koexpression der B-Box1-myc ist gezeigt. In drei unabhängigen Experimenten wurden jeweils 100 Zellen ausgezählt und in eine der drei folgenden Kategorien eingeordnet: a) GFP-GLI3 ist ausschließlich im Zellkern lokalisiert, b) GFP-GLI3 ist sowohl im Zellkern als auch im Cytosol lokalisiert, c) GFP-GLI3 ist ausschließlich im Cytosol lokalisiert. Die Mittelwerte aus den jeweils drei Ergebnissen sind im Balkendiagramm mit den jeweiligen Standardabweichungen dargestellt. Unter Annahme einer Normalverteilung wurde die Signifikanz des beobachteten Effekts mittels T-Test ermittelt. Das Ergebnis des T-Tests ist in der Abbildung angegeben.

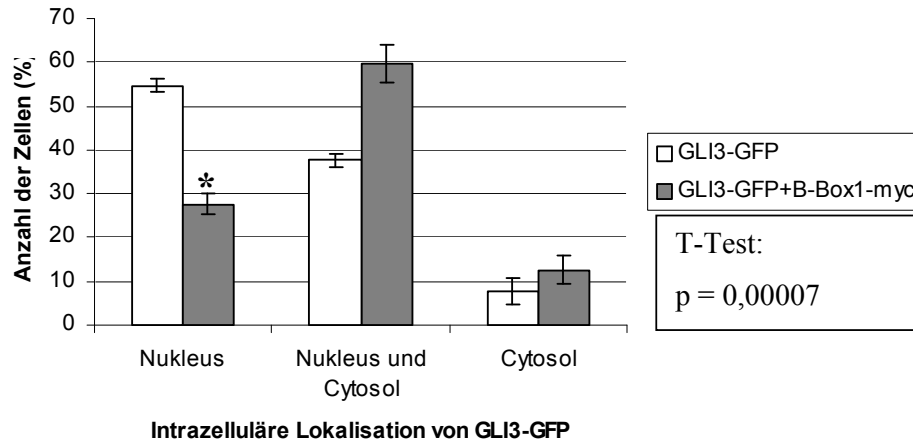


Abb.3.3.2: Koexpression von C-terminal markiertem GLI3-GFP und B-Box1-myc in HeLa-Zellen. Die intrazelluläre Lokalisation von GLI3-GFP in HeLa-Zellen mit (graue Balken) bzw. ohne (weiße Balken) Koexpression der B-Box1-myc wurde analysiert. In drei unabhängigen Experimenten wurden jeweils 100 Zellen ausgezählt und in eine der drei folgenden Kategorien eingeordnet: a) GLI3-GFP ist ausschließlich im Zellkern lokalisiert, b) GLI3-GFP ist sowohl im Zellkern als auch im Cytosol lokalisiert, c) GLI3-GFP ist ausschließlich im Cytosol lokalisiert. Die Mittelwerte aus den jeweils drei Ergebnissen sind im Balkendiagramm mit den jeweiligen Standardabweichungen dargestellt. Unter Annahme einer Normalverteilung wurde die Signifikanz des beobachteten Effekts mittels T-Test ermittelt. Das Ergebnis des T-Tests ist in der Abbildung angegeben.

Um auszuschließen, dass der hier gezeigte B-Box1-Effekt auf die intrazelluläre Lokalisation von GFP-GLI3 artifiziell durch das an GLI3 fusionierte GFP erzeugt wird, wurde ein Immunfluoreszenz-Experiment mit flag-markiertem GLI3 in Anwesenheit bzw. Abwesenheit der B-Box1-myc wie für GFP-GLI3 oben beschrieben durchgeführt. Nach Koexpression von flag-GLI3 und der B-Box1-myc in HeLa-Zellen sank der Anteil der Zellen mit nukleärer Lokalisation von GLI3 von 56% der Zellen auf 32% (Abb.3.3.3). Der Anteil der Zellen mit cytosolischen GLI3 änderte sich von 18% auf 32%, der Anteil der Zellen, in denen GLI3 in beiden Zellkompartimenten vorliegt, änderte sich von 26% auf 36%.

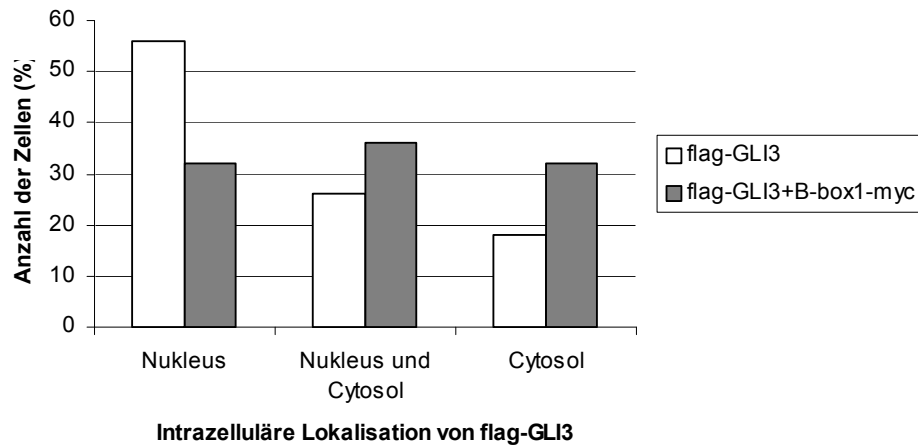


Abb.3.3.3: Koexpression von N-terminal markiertem flag-GLI3 und B-Box1-myc in HeLa-Zellen. Die intrazelluläre Lokalisation von flag-GLI3 in HeLa-Zellen mit (graue Balken) bzw. ohne (weiße Balken) Koexpression der B-Box1-myc wurde analysiert. Jeweils 100 Zellen wurden ausgezählt und in eine der drei folgenden Kategorien eingeordnet: a) flag-GLI3 ist ausschließlich im Zellkern lokalisiert, b) flag-GLI3 ist sowohl im Zellkern als auch im Cytosol lokalisiert, c) flag-GLI3 ist ausschließlich im Cytosol lokalisiert. Die Ergebnisse sind im Balkendiagramm dargestellt.

3.4 Aufheben des B-Box1-Effekts durch Fostriecin

Im Folgenden sollte verifiziert werden, dass der in Abschnitt 3.3 beobachtete B-Box1-Effekt, der nach Überexpression der isolierten, myc-markierten B-Box1 des MID1-Proteins auf die Lokalisation von GLI3 zu beobachten war, spezifisch auf erhöhte PP2A-Aktivität zurückzuführen ist. Hierfür wurde zunächst N-terminal markiertes GFP-GLI3 mit der B-Box1 koexprimiert (um die PP2A-Aktivität in der Zelle zu erhöhen). Anschließend wurden dieselben Zellen zusätzlich mit Fostriecin, einem spezifischen PP2A-Inhibitor behandelt (wodurch die erhöhte PP2A-Aktivität annulliert werden sollte). Wie schon in Abschnitt 3.3 gezeigt, änderte sich die Lokalisation von GFP-GLI3 durch Koexpression der B-Box1 deutlich (von $54 \pm 4\%$ auf $39 \pm 3\%$ der Zellen mit nukleärem GFP-GLI3; von 10 ± 5 auf $21 \pm 5\%$ der Zellen mit cytosolischem GFP-GLI3; in den restlichen GFP-GLI3-positiven Zellen war das Fusionsprotein in beiden Zellkompartimenten verteilt). Die Zugabe von Fostriecin nach Koexpression von B-Box1 und GFP-GLI3 resultierte in vollständiger Wiederherstellung des Ausgangszustands ($60 \pm 7\%$ Zellen mit nukleärem GFP-GLI3; $12 \pm 4\%$ Zellen mit cytosolischem GFP-GLI3) (Abb.3.4.1). Dies zeigt, dass der B-Box1-Effekt auf die intrazelluläre Lokalisation von GFP-GLI3 mit Fostriecin aufgehoben werden konnte, was darauf hindeutet, dass der B-Box1-Effekt auf erhöhte PP2A-Aktivität zurückzuführen ist. Vergleichbare Ergebnisse wurden auch mit dem C-terminal markierten GLI3-GFP erzielt (Abb.3.4.2).

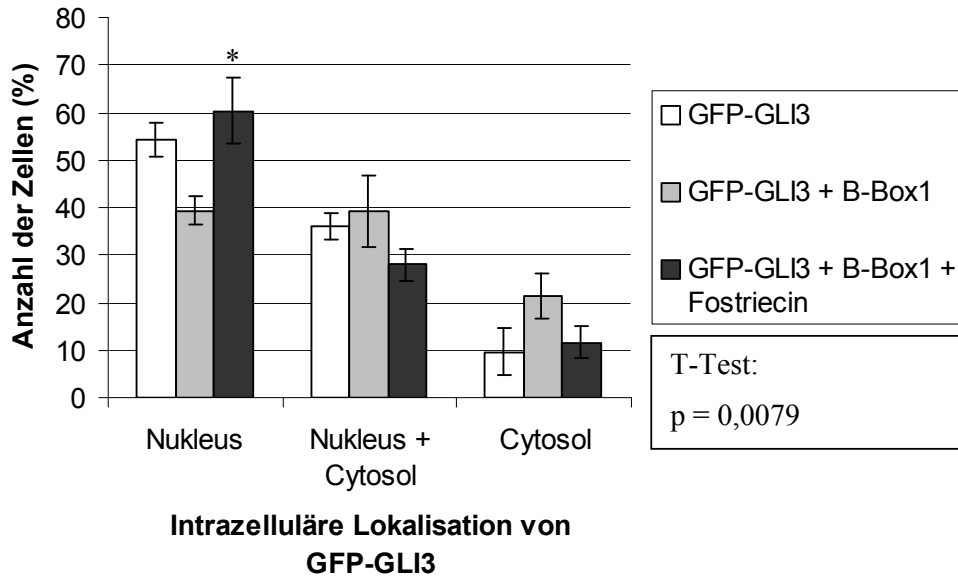


Abb.3.4.1: Intrazelluläre Lokalisation von N-terminal markiertem GFP-GLI3 in HeLa-Zellen (weiße Balken) nach Koexpression der B-Box1 mit (dunkelgraue Balken) bzw. ohne (hellgraue Balken) Zugabe von Fostriecin. In drei unabhängigen Experimenten wurde aus jeweils 100 Zellen der Anteil der Zellen, bei denen GFP-GLI3 ausschließlich im Kern, im Kern und im Cytosol, bzw. ausschließlich im Cytosol vorliegt, bestimmt. Die Ergebnisse sind unter Indikation der Standardabweichung im Balkendiagramm dargestellt.

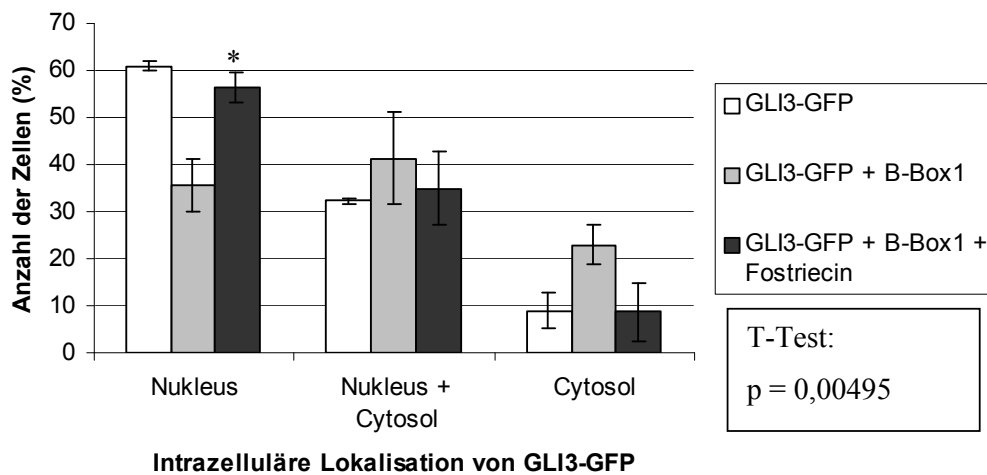


Abb.3.4.2: Intrazelluläre Lokalisation von C-terminal markiertem GLI3-GFP in HeLa-Zellen (weiße Balken) nach Koexpression der B-Box1 mit (dunkelgraue Balken) bzw. ohne (hellgraue Balken) Zugabe von Fostriecin. In drei unabhängigen Experimenten wurde aus jeweils 100 Zellen der Anteil der Zellen, bei denen GLI3-GFP ausschließlich im Kern, im Kern und im Cytosol, bzw. ausschließlich im Cytosol vorliegt, bestimmt. Die Ergebnisse sind unter Indikation der Standardabweichung im Balkendiagramm dargestellt.

3.5 Effekt von PP2A-Inhibitoren auf die GLI3-Lokalisation

In den vorhergehenden Kapiteln konnte gezeigt werden, dass eine Erhöhung der Aktivität von Mikrotubulus-assoziiierter PP2A eine vermehrte Akkumulierung von GLI3 im Cytosol bewirkt. In einem weiteren Experiment sollte untersucht werden, ob durch Inhibition von PP2A ein gegenteiliger Effekt auf die intrazelluläre Lokalisation von GLI3 beobachtet werden kann.

3.5.1 Behandlung mit dem PP2A Inhibitor „ocadaic acid“

Zunächst wurde N-terminal markiertes GFP-GLI3 in HeLa- bzw. U373MG-Zellen exprimiert und diese Zellen mit dem PP2A-Inhibitor „ocadaic acid“ behandelt. „Ocadaic acid“ hemmt bei Konzentrationen von 1nM 50% der Aktivität von PP2A. In höheren Konzentrationen (0,1-0,5mM) werden auch andere Phosphatasen inhibiert (Bialojan et al., 1988). Mittels Immunfluoreszenz und Fluoreszenz-Mikroskopie (siehe Methoden) wurde die intrazelluläre Lokalisation von GFP-GLI3 ermittelt. Wie in den vorangegangenen Experimenten wurden die Zellen wieder in Abhängigkeit der intrazellulären GFP-GLI3 Lokalisation drei Gruppen zugeordnet: ausschließlich nukleäre Lokalisation, ausschließlich cytosolische Lokalisation oder Verteilung über beide Kompartimente. Durch Behandlung mit dem Phosphataseinhibitor „ocadaic acid“ änderte sich die intrazelluläre Lokalisation von GFP-GLI3 nicht signifikant (Abb.3.5.1.1).

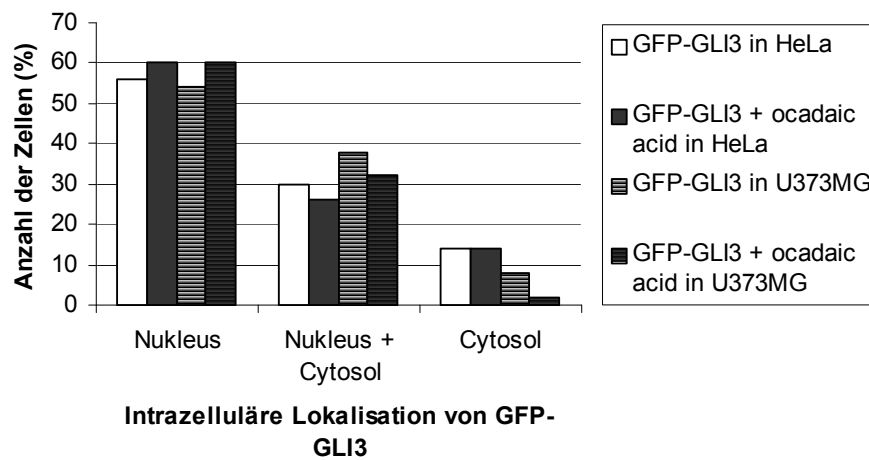


Abb.3.5.1.1: Intrazelluläre Lokalisation von GFP-GLI3 in HeLa-Zellen (homogene Balken) und U373MG-Zellen (gestreifte Balken) in Anwesenheit (graue Balken) bzw. Abwesenheit (weiße Balken) von dem Phosphatase-Inhibitor „ocadaic acid“. In jeweils 100 Zellen wurde die intrazelluläre Lokalisation von GFP-GLI3 analysiert. Die Anzahl der Zellen, bei denen GFP-GLI3 ausschließlich im Zellkern, sowohl im Kern als auch im Cytosol, bzw. ausschließlich im Cytosol vorlag, wurde jeweils im Balkendiagramm dargestellt.

3.5.2 Behandlung mit dem PP2A-Inhibitor Fostriecin

Da „ocadaic acid“ neben PP2A auch noch andere Phosphatasen inhibieren kann, wurde ein vergleichbares Experiment mit dem für PP2A-Inhibition spezifischeren Fostriecin durchgeführt. Hierfür wurde N-terminal markiertes GFP-GLI3 in HeLa-Zellen exprimiert, die mit Fostriecin behandelt wurden. Die Zellen wurden mittels Immunfluoreszenz und Fluoreszenz-Mikroskopie analysiert und die intrazelluläre Lokalisation von GFP-GLI3 wurde in drei unabhängigen Experimenten in jeweils 100 Zellen analysiert. Nach Behandlung mit Fostriecin erhöhte sich der Anteil der Zellen, bei denen GFP-GLI3 ausschließlich im Zellkern vorlag von $53 \pm 1,5\%$ auf $58 \pm 4,2\%$ (Abb.3.5.2.1). Ausschließlich cytosolisches GFP-GLI3 lag in $13 \pm 2\%$ der behandelten und $16 \pm 1\%$ der Kontrollzellen vor. In den restlichen GFP-GLI3-positiven Zellen war das Fusionsprotein in beiden Zellkompartimenten verteilt. Die statistische Auswertung dieser Ergebnisse mittels T-Test unter Annahme einer Normalverteilung zeigte jedoch, dass diese Unterschiede nicht signifikant waren ($p = 0,091$). Ein vergleichbares Experiment wurde auch mit dem C-terminal markierten GLI3-GFP durchgeführt. Auch hier veränderte sich die intrazelluläre Lokalisation von GLI3-GFP nach Fostriecin-Behandlung nicht signifikant (Abb.3.5.2.2).

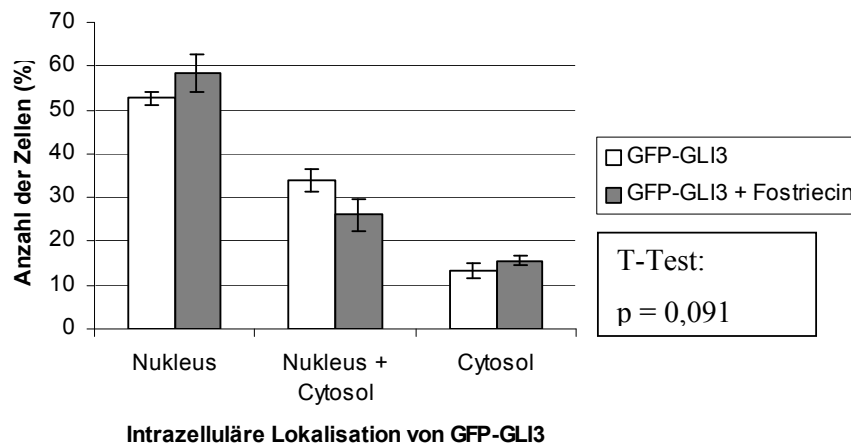


Abb.3.5.2.1: Intrazelluläre Lokalisation von N-terminal markiertem GFP-GLI3 in HeLa-Zellen mit (graue Balken) bzw. ohne (weiße Balken) Zugabe von Fostriecin. In drei unabhängigen Experimenten wurde aus jeweils 100 Zellen der Anteil der Zellen, bei denen GFP-GLI3 ausschließlich im Kern, im Kern und im Cytosol, bzw. ausschließlich im Cytosol vorliegt, bestimmt. Die Ergebnisse sind unter Indikation der Standardabweichung im Balkendiagramm dargestellt. Unter Annahme einer Normalverteilung wurde die Signifikanz des beobachteten Effekts mittels T-Tests ermittelt. Das Ergebnis des T-Tests ist in der Abbildung angegeben.

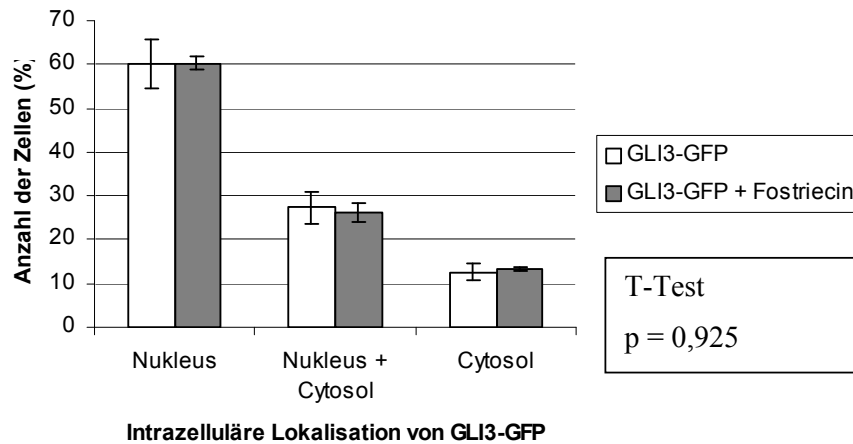


Abb.3.5.2.2: Intrazelluläre Lokalisation von C-terminal markiertem GLI3-GFP in HeLa-Zellen mit (graue Balken) bzw. ohne (weiße Balken) Zugabe von Fostriecin. In drei unabhängigen Experimenten wurde aus jeweils 100 Zellen der Anteil der Zellen, bei denen GLI3-GFP ausschließlich im Kern, im Kern und im Cytosol, bzw. ausschließlich im Cytosol vorliegt, bestimmt. Die Ergebnisse sind unter Indikation der Standardabweichung im Balkendiagramm dargestellt. Unter Annahme einer Normalverteilung wurde die Signifikanz des beobachteten Effekts mittels T-Test ermittelt. Das Ergebnis des T-Tests ist in der Abbildung angegeben.

3.6 Induktion der Aktivität endogener PP2A durch Rapamycinbehandlung beeinflusst die GLI3-Lokalisation

3.6.1 Rapamycin-Effekt auf die intrazelluläre Lokalisation von GLI3

Rapamycin wird zur Induktion von PP2A-Aktivität eingesetzt. Hierbei hemmt Rapamycin die TOR-Kinase (target of rapamycin), welche als Repressor auf PP2A wirkt. Hierdurch kommt es zur Induktion der PP2A-Aktivität [zusammengefasst in Jacinto und Hall (2003)]. Um zu untersuchen, ob eine Induktion der PP2A-Aktivität zu einer Veränderung der intrazellulären GLI3-Lokalisation führt, wurde zunächst N-terminal markiertes GFP-GLI3 in HeLa-Zellen exprimiert. Anschließend wurden diese Zellen mit Rapamycin behandelt. In drei unabhängigen Experimenten wurde in jeweils 100 Zellen die intrazelluläre Lokalisation von GFP-GLI3 untersucht. Durch die Behandlung mit Rapamycin verringerte sich die Anzahl der Zellen, in denen GFP-GLI3 im Nukleus lokalisiert war, von $55 \pm 2\%$ auf $37 \pm 8\%$, während sich die Anzahl von Zellen mit cytosolischem GFP-GLI3 von $11 \pm 6\%$ auf $18 \pm 6\%$ erhöhte (Abb.3.6.1.1). Vergleichbare Ergebnisse wurden mit dem C-terminal markierten GLI3-GFP erreicht (Abb.3.6.1.2).

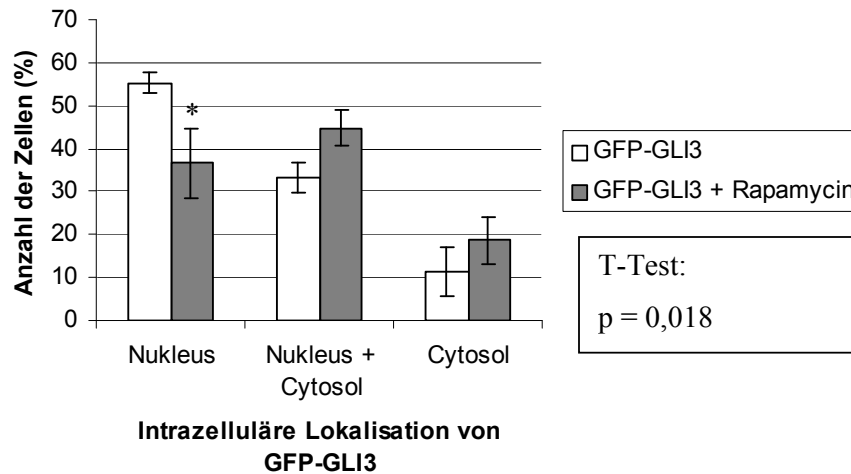


Abb.3.6.1.1: Die intrazelluläre Lokalisation von GFP-GLI3 in HeLa-Zellen mit (graue Balken) bzw. ohne (weiße Balken) Zugabe von Rapamycin (25nM, 30min) wurde analysiert. In drei unabhängigen Experimenten wurden jeweils 100 Zellen ausgezählt und in eine der drei folgenden Kategorien eingeordnet: a) GFP-GLI3 ist ausschließlich im Zellkern lokalisiert, b) GFP-GLI3 ist sowohl im Zellkern als auch im Cytosol lokalisiert, c) GFP-GLI3 ist ausschließlich im Cytosol lokalisiert. Die Mittelwerte aus den jeweils drei Ergebnissen sind im Balkendiagramm mit den jeweiligen Standardabweichungen dargestellt. Unter Annahme einer Normalverteilung wurde die Signifikanz des Ergebnisses mittels T-Test untersucht. Das Ergebnis des T-Tests ist in der Abbildung angegeben.

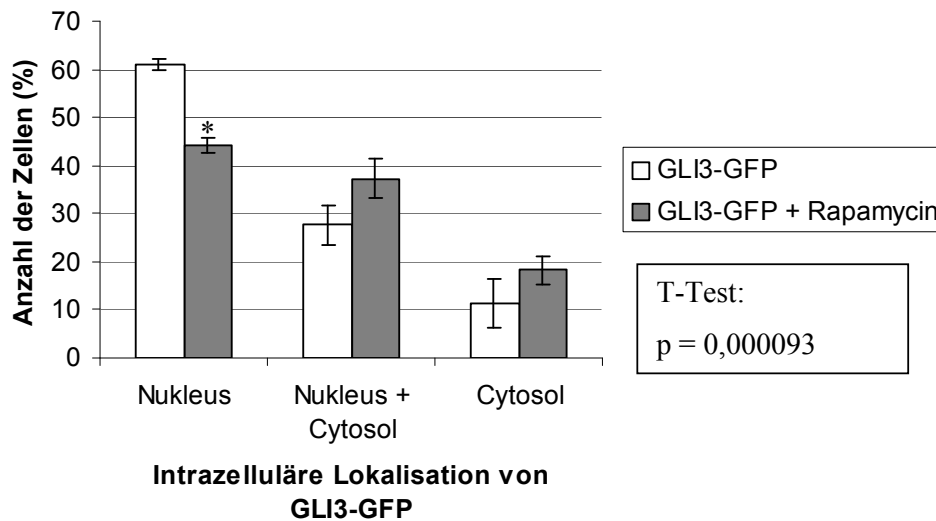


Abb.3.6.1.2: Die intrazelluläre Lokalisation von GLI3-GFP in HeLa-Zellen mit (graue Balken) bzw. ohne (weiße Balken) Zugabe von Rapamycin (25nM, 30min) wurde analysiert. In drei unabhängigen Experimenten wurden jeweils 100 Zellen ausgezählt und in eine der drei folgenden Kategorien eingeordnet: a) GLI3-GFP ist ausschließlich im Zellkern lokalisiert, b) GLI3-GFP ist sowohl im Zellkern als auch im Cytosol lokalisiert, c) GLI3-GFP ist ausschließlich im Cytosol lokalisiert. Die Mittelwerte aus den jeweils drei Ergebnissen sind im Balkendiagramm mit den jeweiligen Standardabweichungen dargestellt. Unter Annahme einer Normalverteilung wurde die Signifikanz des Ergebnisses mittels T-Test untersucht. Das Ergebnis des T-Tests ist in der Abbildung angegeben.

3.6.2 Aufheben des Rapamycin-Effekts auf die intrazelluläre Lokalisation von GLI3 durch Überexpression von $\alpha 4$ bzw. MID1

Durch Induktion der PP2A-Aktivität konnte eine Veränderung der intrazellulären Lokalisation von GLI3 induziert werden. Im Gegensatz hierzu führte die Koexpression des $\alpha 4$ -Proteins zu einer Anhäufung des GFP-GLI3-Fusionsproteins im Nukleus. Liegt eine Anreicherung von $\alpha 4$ in der Zelle vor, kann die Bindung von MID1 an die katalytische Untereinheit der PP2A vermehrt werden, was zu deren Abbau führt. Hierdurch wird die Aktivität der Mikrotubulus-assoziierten PP2A reduziert. Da diese beiden beobachteten Effekte auf die intrazelluläre Lokalisation von GLI3 gegensätzlich zueinander sind, sollte im Folgenden analysiert werden, ob die Veränderung der intrazellulären Lokalisation von GLI3, die nach Rapamycin-Behandlung beobachtet wurde, durch Koexpression von $\alpha 4$ aufgehoben werden kann. Dazu

wurden $\alpha 4$ -V5 und N-terminal markiertes GFP-GLI3 in HeLa-Zellen koexprimiert, welche dann mit Rapamycin behandelt wurden.

Die intrazelluläre Lokalisation von GLI3 nach Rapamycin-Behandlung änderte sich durch die Koexpression von $\alpha 4$ von $37 \pm 8\%$ auf $66 \pm 7\%$ der Zellen, in denen GFP-GLI3 ausschließlich im Nukleus lokalisiert war, während sich die Anzahl der Zellen mit cytosolischem GFP-GLI3 von $19 \pm 3\%$ auf $9 \pm 4\%$ veränderte (Abb.3.6.2.1). Vergleichbare Ergebnisse wurden auch mit C-terminal markiertem GLI3-GFP erreicht (Abb.3.6.2.2).

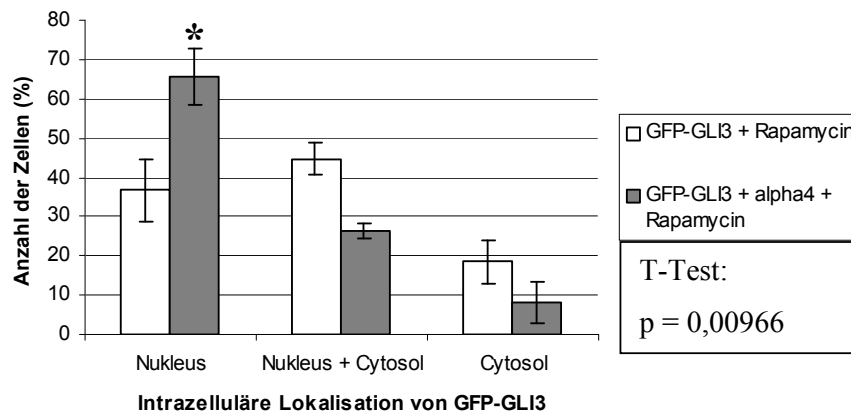


Abb.3.6.2.1: Die intrazelluläre Lokalisation von GFP-GLI3 in HeLa-Zellen nach Rapamycin-Behandlung (25nM, 30min) mit (graue Balken) bzw. ohne (weiße Balken) Koexpression von $\alpha 4$ wurde analysiert. In drei unabhängigen Experimenten wurden jeweils 100 Zellen ausgezählt und in eine der drei folgenden Kategorien eingeordnet: a) GFP-GLI3 ist ausschließlich im Zellkern lokalisiert, b) GFP-GLI3 ist sowohl im Zellkern als auch im Cytosol lokalisiert, c) GFP-GLI3 ist ausschließlich im Cytosol lokalisiert. Die Mittelwerte aus den jeweils drei Ergebnissen sind im Balkendiagramm mit den jeweiligen Standardabweichungen dargestellt.

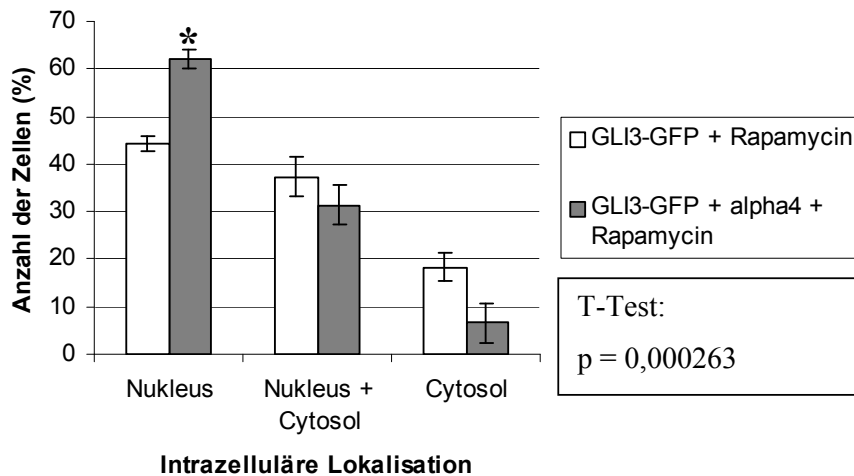


Abb.3.6.2.2: Die intrazelluläre Lokalisation von GLI3-GFP in HeLa-Zellen nach Rapamycin-Behandlung (25nM, 30min) mit (graue Balken) bzw. ohne (weiße Balken) Koexpression von $\alpha 4$ wurde analysiert. In drei unabhängigen Experimenten wurden jeweils 100 Zellen ausgezählt und in eine der drei folgenden Kategorien eingeordnet: a) GLI3-GFP ist ausschließlich im Zellkern lokalisiert, b) GLI3-GFP ist sowohl im Zellkern als auch im Cytosol lokalisiert, c) GLI3-GFP ist ausschließlich im Cytosol lokalisiert. Die Mittelwerte aus den jeweils drei Ergebnissen sind im Balkendiagramm mit den jeweiligen Standardabweichungen dargestellt.

Durch Rapamycin wird die Aktivität der PP2A induziert, während MID1 durch seine Ubiquitinligase-Aktivität den Abbau von PP2A einleiten kann. Nachdem hier gezeigt werden konnte, dass die Überexpression von $\alpha 4$ den Rapamycin-Effekt auf die intrazelluläre Lokalisation von GLI3 aufheben konnte, sollte nun untersucht werden, ob die Überexpression von MID1 eine ähnliche Wirkung hat. Dazu wurden HeLa-Zellen, die N-terminal markiertes GFP-GLI3 und MID1-myc koexprimierten, mit Rapamycin behandelt.

Die intrazelluläre Lokalisation von GFP-GLI3 nach Rapamycin-Behandlung änderte sich durch Koexpression von MID1-myc von $37 \pm 8\%$ auf $60 \pm 4\%$ der Zellen, in denen GFP-GLI3 ausschließlich im Nukleus lokalisiert war. Der Anteil der Zellen, in denen GFP-GLI3 im Cytosol vorlag, änderte sich von $19 \pm 6\%$ auf $12 \pm 4\%$. In den restlichen Zellen war GFP-GLI3 in beiden Zellkompartimenten verteilt (Abb.3.6.2.3). Vergleichbare Ergebnisse wurden auch mit C-terminal markiertem GLI3-GFP erreicht (Abb.3.6.2.4).

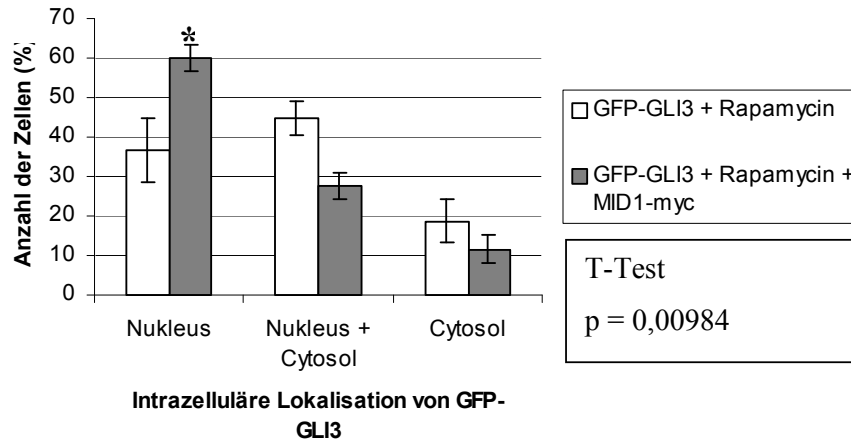


Abb.3.6.2.3: Die intrazelluläre Lokalisation von GFP-GLI3 in HeLa-Zellen nach Rapamycin-Behandlung mit (graue Balken) bzw. ohne (weiße Balken) Koexpression von MID1-myc wurde analysiert. In drei unabhängigen Experimenten wurden jeweils 100 Zellen ausgezählt und in eine der drei folgenden Kategorien eingeordnet: a) GFP-GLI3 ist ausschließlich im Zellkern lokalisiert, b) GFP-GLI3 ist sowohl im Zellkern als auch im Cytosol lokalisiert, c) GFP-GLI3 ist ausschließlich im Cytosol lokalisiert. Die Mittelwerte aus den jeweils drei Ergebnissen sind im Balkendiagramm mit den jeweiligen Standardabweichungen dargestellt.

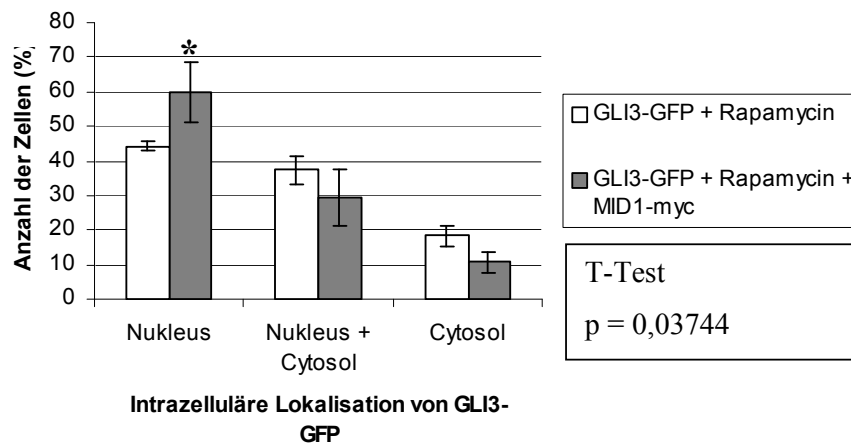


Abb.3.6.2.4: Die intrazelluläre Lokalisation von GLI3-GFP in HeLa-Zellen nach Rapamycin-Behandlung mit (graue Balken) bzw. ohne (weiße Balken) Koexpression von MID1-myc wurde analysiert. In drei unabhängigen Experimenten wurden jeweils 100 Zellen ausgezählt und in eine der drei folgenden Kategorien eingeordnet: a) GLI3-GFP ist ausschließlich im Zellkern lokalisiert, b) GLI3-GFP ist sowohl im Zellkern als auch im Cytosol lokalisiert, c) GLI3-GFP ist ausschließlich im Cytosol lokalisiert. Die Mittelwerte aus den jeweils drei Ergebnissen sind im Balkendiagramm mit den jeweiligen Standardabweichungen dargestellt.

3.7 Proteasom-Inhibition mittels Lactacystin beeinflusst die GLI3-Lokalisation

Durch Behandlung von Zellen mit dem Proteasom-Inhibitor Lactacystin kann der Abbau Mikrotubulus-assoziiierter PP2A über die MID1 vermittelte Ubiquitinierung der PP2A verhindert werden. Wird weniger Mikrotubulus-assoziierte PP2A abgebaut, so wird deren Aktivität erhöht. Um zu überprüfen, ob die Induktion der PP2A-Aktivität mittels Lactacystin-Behandlung die intrazelluläre Lokalisation von GLI3 verändert, wurden HeLa-Zellen, die GFP-GLI3 exprimieren, mit Lactacystin behandelt und einer Lebendzellanalyse (siehe Methoden) unterzogen. Nach der Behandlung mit Lactacystin wurde in einem Zeitfenster von 4 Stunden eine Anreicherung von GFP-GLI3 im Cytosol beobachtet (Abb.3.7.1.).

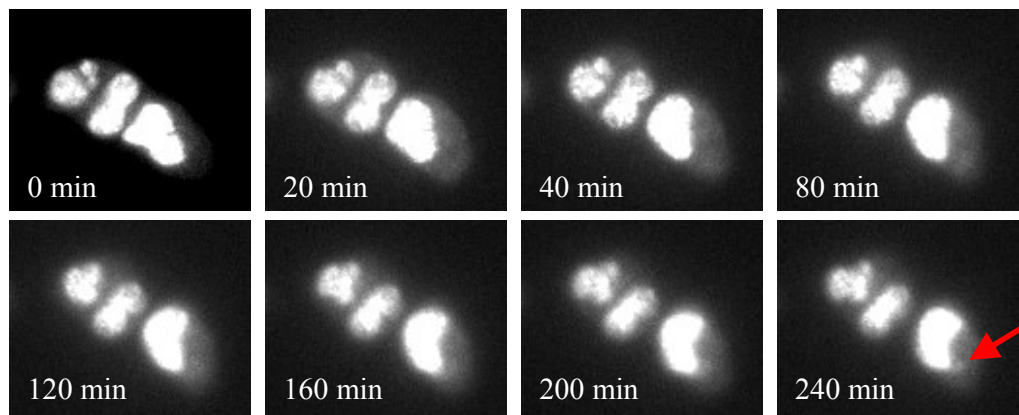


Abb.3.7.1: Lebendzellanalyse. In HeLa-Zellen wurde GFP-GLI3 exprimiert. Nach Zusatz von Lactacystin wurden in 1-minütigen Intervallen über ein Zeitfenster von 4h Bilder aufgenommen (resultierend in 240 Einzelaufnahmen). Der jeweilige Zeitpunkt der Aufnahme ist in den Bildern angegeben. Der Pfeil zeigt auf eine GLI3-Anreicherung im Cytosol.

Um den hier gezeigten Effekt der Induktion endogener PP2A-Aktivität durch Proteasom-Inhibition mittels Lactacystin auf die GLI3-Lokalisation durch Immunfluoreszenz und anschließende Fluoreszenzmikroskopie in fixierten Präparaten zu verifizieren, wurde GFP-GLI3 in HeLa-Zellen exprimiert. Die Anzahl der Zellen mit nukleärer GLI3-Lokalisation veränderte sich durch Lactacystin-Behandlung von 50% auf 42% bei einer Konzentration von 300nM (die Anzahl der Zellen mit cytosolischer Lokalisation änderte sich von 13% auf 5%, die Anzahl der Zellen, in denen GLI3 in beiden Zellkompartimenten vorliegt, stieg von 37% auf 53%), und von 54% auf 29% bei einer Konzentration von 1mM (die Anzahl der Zellen mit cytosolischer Lokalisation änderte sich von 13% auf 2%, die Anzahl der Zellen, in denen GLI3 in beiden Zellkompartimenten vorliegt, stieg von 33% auf 69%) (Abb.3.7.2). Dies

bestätigt den in der Lebendzellanalyse beobachteten Effekt der GLI3-Akkumulierung im Cytosol nach Lactacystin-Behandlung.

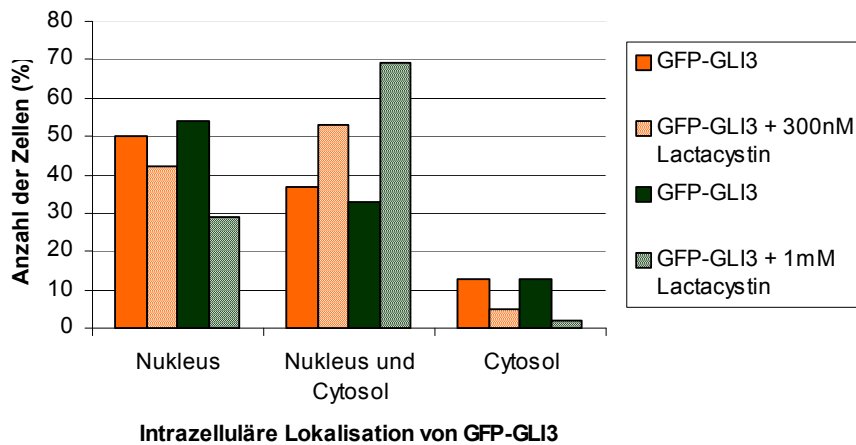


Abb.3.7.2: Einfluss des Proteasom-Inhibitors Lactacystin auf die GLI3-Lokalisation. GFP-GLI3 wurde in HeLa-Zellen exprimiert, die ohne (einfarbige Balken), mit 300nM Lactacystin (orange gestreifte Balken) bzw. 1mM Lactacystin (grün gestreifte Balken) behandelt wurden. Die Anzahl der Zellen, in denen GFP-GLI3 ausschließlich im Kern, in Kern und Cytosol, bzw. ausschließlich im Cytosol vorlag, ist im Balkendiagramm dargestellt.

3.8 Verifizierung der beobachteten Lokalisationseffekte mittels Westernblot

Um die in den oben beschriebenen Immunfluoreszenz-Experimenten beobachteten PP2A-abhängigen Effekte auf die GLI3-Lokalisation mit einer zweiten Methode zu verifizieren, wurden HeLa-Zellen mit GFP-GLI3 transfiziert bzw. mit der B-Box1 bzw. mit $\alpha 4$ kotransfiziert und einer Zellfraktionierung unterzogen. Jeweils 100 μ g Protein der Kern- und Cytosol-Fractionen wurden auf einem 6%igen SDS-Gel aufgetrennt und mittels Westernblot (siehe Methoden) analysiert. Die GFP-GLI3-spezifischen Banden wurden mit einem anti-GFP-Antikörper detektiert. Zur Überprüfung des Erfolgs der Trennung der Kern- und Cytosol-Fractionen wurde derselbe Blot mit anti-Lamin A/C-Antikörpern inkubiert. Als Ladekontrolle wurde derselbe Blot ebenfalls mit anti-Tubulin-Antikörpern inkubiert (Abb.3.8.1). Die resultierenden GFP-GLI3-spezifischen Banden wurden mittels ImageQuant5.2 quantifiziert (Abb.3.8.2). Die daraus berechneten Zahlenwerte wurden zur Ermittlung der jeweiligen Verteilung der Gesamt-GFP-GLI3-Menge zwischen den Kern- und Cytosol-Fractionen benutzt, welche im Balkendiagramm dargestellt wurde (Abb.3.8.3). Der

Anteil des Gesamt-GFP-GLI3 in der Kernfraktion verringerte sich nach Koexpression der B-Box1 von 79,4% auf 61,5%. Der Anteil des Gesamt-GFP-GLI3 in der Kernfraktion vergrößerte sich nach Koexpression von $\alpha 4$ von 79,4% auf 88,4%. Diese Veränderungen bestätigen die in den Immunfluoreszenz-Experimenten ermittelten Daten.

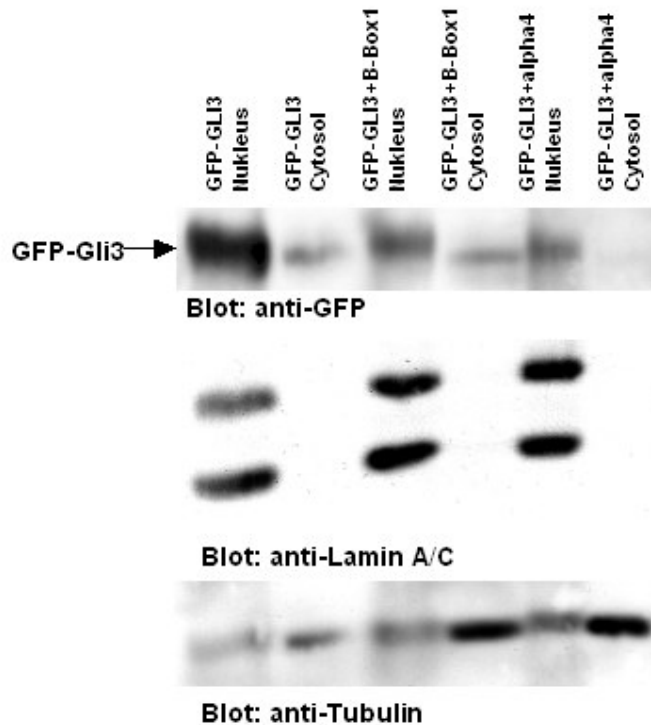


Abb.3.8.1: Westernblot-Analyse von Kern- bzw. Cytosol-Fractionen GFP-GLI3 exprimierender bzw. GFP-GLI3 und B-Box1 bzw. $\alpha 4$ koexprimierender HeLa-Zellen. Jeweils 100 μ g der Proteine wurden auf einem 6%igen SDS-Gel aufgetrennt und geblottet. Die GFP-GLI3-spezifischen Banden wurden mit einem anti-GFP-Antikörper detektiert (oben). Die erfolgreiche Trennung der Kern- und Cytosol-Fractionen wurde durch Inkubation des Blots mit anti-Lamin A/C-Antikörpern gezeigt (Mitte). Die geladene Proteinmenge wurde durch Inkubation des Blots mit einem anti-Tubulin-Antikörper gezeigt (unten).

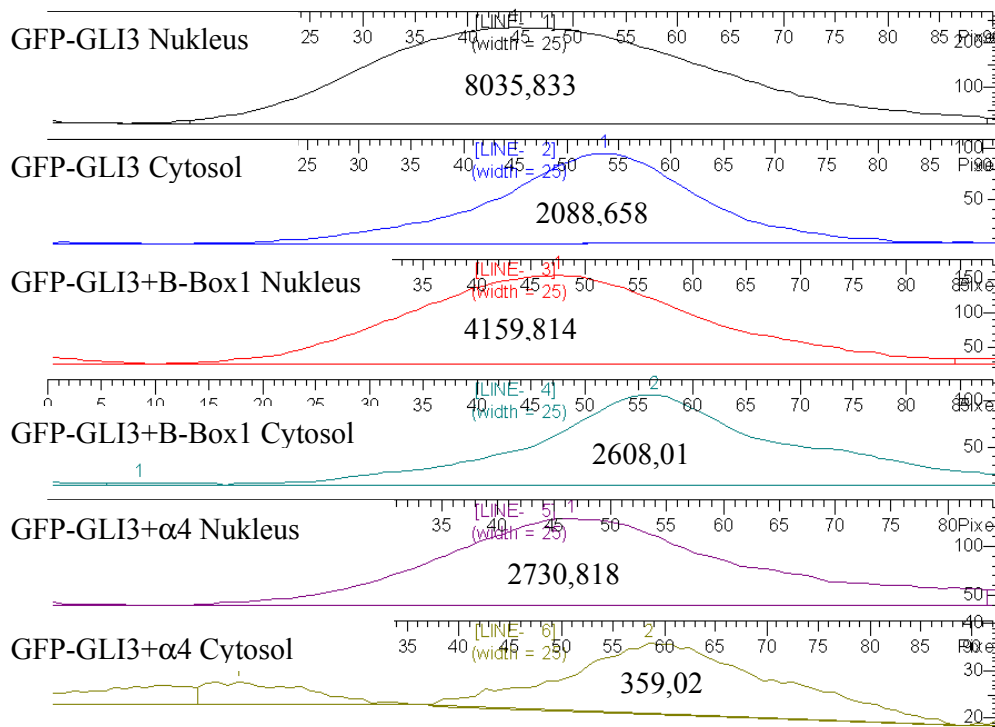


Abb.3.8.2: Quantifizierung der Banden aus 3.8.1 mittels ImageQuant5.1. Die Fläche unter den Peaks korrespondiert jeweils zur Intensität der Banden auf dem Westernblot. Die Integrale der jeweiligen Flächen unter den Peaks sind in der Abbildung angegeben.

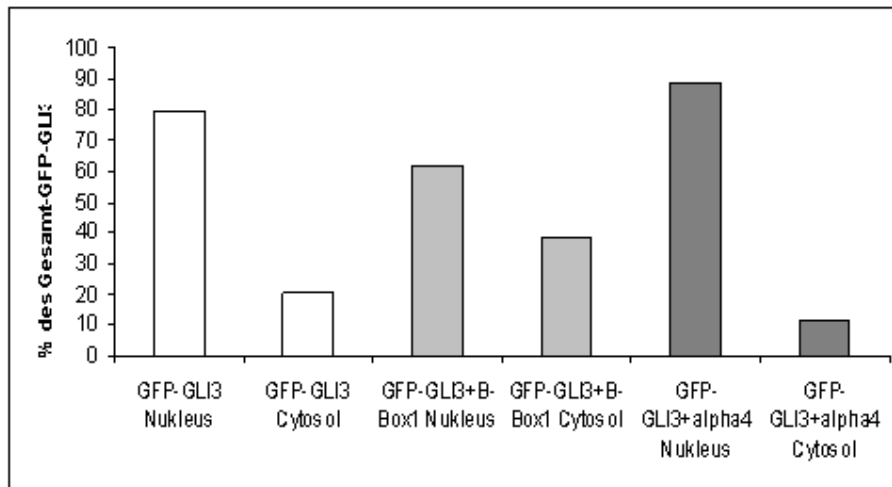


Abb.3.8.3: Die in 3.8.2 ermittelten Zahlenwerte der GFP-GLI3-spezifischen Banden der Kern- und Cytosol-Fraaktionen aus 3.8.1 wurden jeweils zusammengefasst, um den Gesamt-GFP-GLI3-Gehalt der jeweiligen Zellen zu bestimmen. Der prozentuale Anteil der GFP-GLI3-Verteilung in den jeweiligen Zellkompartimenten ist im Balkendiagramm dargestellt. Die Balken der GFP-GLI3 exprimierenden Zellen sind weiß dargestellt, die der GFP-GLI3 und B-Box1 koexprimierenden Zellen hellgrau, und die der GFP-GLI3 und α4 koexprimierenden Zellen dunkelgrau.

4. Welche Kinase beeinflusst die intrazelluläre Lokalisation von GLI3 als Gegenspieler von PP2A?

Die intrazelluläre Lokalisation von GLI3 ist von der Aktivität Mikrotubulus-assoziiierter PP2A abhängig, wie in den Abschnitten 3.1-3.8 gezeigt wurde. Im Folgenden sollte untersucht werden, welche Kinase hierbei der PP2A entgegenwirkt. Dazu wurde GFP-markiertes GLI3 in HeLa-Zellen exprimiert und dessen intrazelluläre Lokalisation nach Behandlung mit verschiedenen Kinase-Inhibitoren mittels Immunfluoreszenz und Fluoreszenzmikroskopie analysiert. Während Inhibitoren von PKA (Protein Kinase A), CK1 (Casein Kinase 1), PI3-Kinase und Phospholipase C keinen Effekt auf die intrazelluläre Lokalisation von GLI3 hatten, veränderte sich diese nach Behandlung mit LiCl (Tab.4.1-4.2), einem Inhibitor der GSK3 β (Glycogen Synthase Kinase 3 β). Die Anzahl der Zellen mit ausschließlich nukleärer Lokalisation des N-terminal markierten GFP-GLI3-Fusionsproteins verringerte sich von $58 \pm 6\%$ auf $23 \pm 6\%$ nach LiCl-Behandlung (Tab.4.1). Die Anzahl der Zellen mit ausschließlich cytosolischem GFP-GLI3 veränderte sich nach LiCl-Behandlung von $12 \pm 1\%$ auf $16 \pm 2\%$. Für das C-terminal markierte GLI3-GFP wurden vergleichbare Ergebnisse erzielt (Tab.4.2).

Tab.4.1: GFP-GLI3-exprimierende HeLa-Zellen wurden mit verschiedenen Kinase-Inhibitoren behandelt. Mittels Immunfluoreszenz und Fluoreszenzmikroskopie wurde die intrazelluläre Lokalisation von GFP-GLI3 analysiert. Die Wirkung der jeweiligen Substanz sowie die intrazelluläre Lokalisation von GFP-GLI3 sind in der Tabelle dargestellt. In jeweils drei unabhängigen Experimenten wurde die intrazelluläre Lokalisation von GFP-GLI3 in je 100 Zellen analysiert. Die Mittelwerte aus den drei Experimenten sind unter Angabe der jeweiligen Standardabweichung in der Tabelle angegeben.

Behandlung der Zellen mit...	Wirkung der Substanz	intrazelluläre Lokalisation von GFP-GLI3 (Anzahl der Zellen in %)		
		Nukleus	Nukleus und Cytosol	Cytosol
∅	Kontrolle	58 ± 6	30 ± 5	12 ± 1
Forskolin	induziert PKA	65 ± 6	27 ± 6	9 ± 1
IBMX	induziert PKA	64 ± 11	28 ± 9	8 ± 3
CKI-7	inhibiert Casein Kinase 1	60 ± 2	26 ± 5	10 ± 2
Wortmannin	inhibiert PI3-Kinase	52 ± 4	36 ± 4	12 ± 6
HePC	inhibiert Phospholipase C	57 ± 4	35 ± 7	8 ± 3
U73122	inhibiert Phospholipase C	56 ± 3	34 ± 5	10 ± 2
U73343	Negativkontrolle für U73122	56 ± 3	32 ± 8	12 ± 6
LiCl	inhibiert GSK3β	23 ± 6	61 ± 6	16 ± 2

Tab.4.2: Darstellung der intrazellulären Lokalisation von C-terminal markiertem GLI3-GFP nach Behandlung der Zellen mit verschiedenen Kinase-Inhibitoren, wie in Tab.4.1.

Behandlung der Zellen mit...	Wirkung der Substanz	intrazelluläre Lokalisation von GLI3-GFP (Anzahl der Zellen in %)		
		Nukleus	Nukleus und Cytosol	Cytosol
∅	Kontrolle	53 ± 8	38 ± 8	9 ± 5
Forskolin	induziert PKA	62 ± 10	32 ± 9	6 ± 2
IBMX	induziert PKA	63 ± 8	30 ± 6	6 ± 2
CKI-7	inhibiert Casein-Kinase 1	60 ± 5	32 ± 8	6 ± 2
Wortmannin	inhibiert PI3-Kinase	55 ± 6	36 ± 4	10 ± 4
LiCl	inhibiert GSK3 β	33 ± 9	54 ± 14	13 ± 8

Um den hier beobachteten LiCl-Effekt auf die intrazelluläre Lokalisation von GLI3 an lebenden Zellen zu verdeutlichen, wurde N-terminal markiertes GFP-GLI3 in HeLa-Zellen exprimiert. Diese Zellen wurden mit LiCl versetzt und anschließend einer Lebendzellanalyse unterzogen. Über ein Zeitfenster von 4 Stunden wurde alle 60 sek ein Bild einer GFP-GLI3 exprimierenden Zelle aufgenommen. Zu Beginn der Aufnahme war GFP-GLI3 ausschließlich im Zellkern lokalisiert. Nach LiCl-Behandlung bildeten sich GFP-GLI3-Akkumulate im Cytosol der Zelle; GFP-GLI3 war nach Ablauf der 4-stündigen Inkubation mit LiCl sowohl im Zellkern als auch im Cytosol nachweisbar (Abb.4.1). Dies unterstützt die Immunfluoreszenz Ergebnisse.

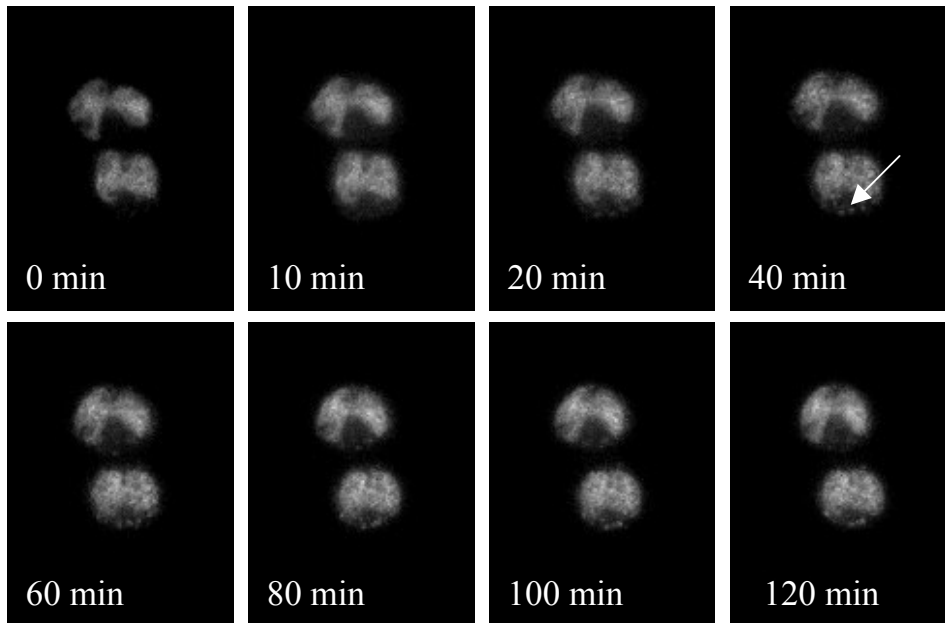


Abb.4.1: Lebendzellanalyse. In HeLa-Zellen wurde GFP-GLI3 exprimiert. Nach Zusatz von LiCl wurden in 1-minütigen Intervallen über ein Zeitfenster von 4h Bilder aufgenommen (resultierend in 240 Einzelaufnahmen). Der jeweilige Zeitpunkt der Aufnahme ist in den Bildern angegeben. Der Pfeil deutet auf eine Stelle, an der sich GFP-GLI3 im Cytosol angereicht hat.

Um auszuschließen, dass die hier beobachteten Effekte der LiCl-Behandlung nicht auf GSK3 β -Inhibition zurückzuführen sind, wurde im folgenden Experiment die endogene Menge der GSK3 β durch RNAi (siehe Methoden) reduziert. In HeLa-Zellen wurde N-terminal markiertes GFP-GLI3 mit GSK3 β -spezifischen bzw. Kontroll-siRNAs kotransfiziert. Mittels Immunfluoreszenz und Fluoreszenzmikroskopie (siehe Methoden) wurde die intrazelluläre Lokalisation von GFP-GLI3 analysiert. Durch GSK3 β -„Knockdown“ änderte sich der Anteil der Zellen mit nukleärem GFP-GLI3 von $55 \pm 6\%$ auf $37 \pm 7\%$, während sich der Anteil der Zellen mit cytosolischem GFP-GLI3 von $12 \pm 1\%$ auf $18 \pm 4\%$ veränderte. In den restlichen GFP-GLI3-positiven Zellen war GLI3 in beiden Zellkompartimenten verteilt (Abb.4.2). Die Analyse der beobachteten Lokalisationsänderung mittels T-Test zeigte, dass durch GSK3 β -„Knockdown“ eine signifikante Reduktion der nukleären Lokalisation von GFP-GLI3 hervorgerufen wird ($p = 0,024329$). Diese Ergebnisse verifizieren die GSK3 β -Spezifität der nach LiCl-Behandlung beobachteten Lokalisationsänderung von GLI3. Die Effizienz des GSK3 β -„Knockdowns“ wurde mittels Westernblot (siehe Methoden) überprüft (Abb.4.3). Hierfür wurden jeweils 50 μ g Proteinextrakt der oben beschriebenen Zellen auf einem 10%igen SDS-Gel aufgetrennt und geblottet. Der Blot wurde mit einem anti-GSK3-

Antikörper, der sowohl GSK3 α als auch GSK3 β detektiert, wobei die untere Bande der GSK3 β entspricht.

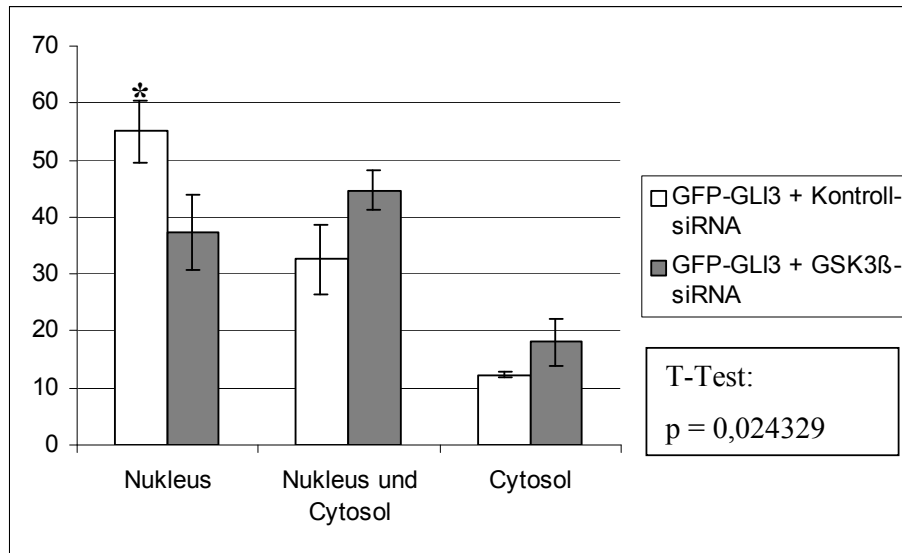


Abb.4.2: Intrazelluläre Lokalisation von GFP-GLI3 nach GSK3 β -„Knockdown“. GFP-GLI3 wurde in HeLa-Zellen exprimiert, die mit Kontroll-siRNA (weiße Balken) bzw. mit GSK3 β -siRNA (graue Balken) kotransfiziert wurden. Die Anzahl der Zellen, in denen GFP-GLI3 ausschließlich im Kern, in Kern und Cytosol, bzw. ausschließlich im Cytosol vorlag, ist im Balkendiagramm unter Darstellung der Standardabweichung dargestellt. Die Signifikanz der Lokalisationsänderung wurde unter Annahme einer Normalverteilung mittels T-Test gezeigt. Das Ergebnis des T-Tests ist in der Abbildung angegeben.

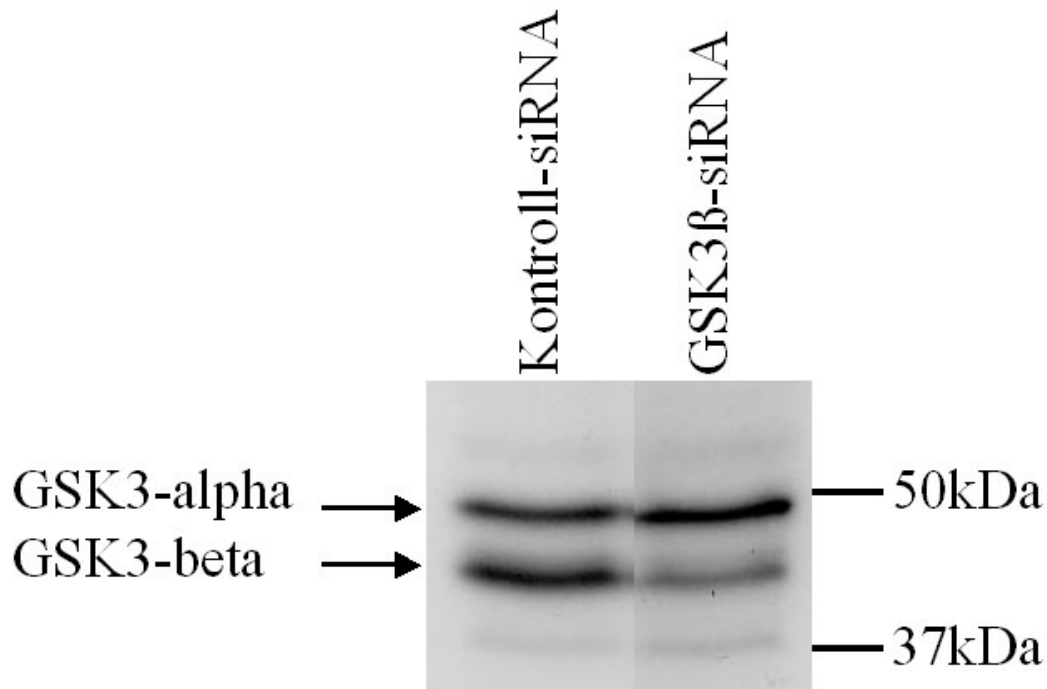


Abb.4.3: Westernblot-Analyse von HeLa-Zelllysaten nach Transfektion von Kontroll-siRNAs (linke Spur) bzw. GSK3 β -siRNAs (rechte Spur). Jeweils 50 μ g Protein wurden auf einem 10%igen SDS-Gel aufgetrennt und geblottet. Der Blot wurde mit einem GSK3-Antikörper inkubiert, der sowohl GSK3 α (obere Bande) als auch GSK3 β (untere Bande) detektiert.

5. Spezifität der beobachteten Lokalisationseffekte

Im Folgenden wurde untersucht, ob die hier beobachteten Lokalisationseffekte von PP2A- bzw. GSK3 β -Aktivität außer der intrazellulären Lokalisation von GLI3 auch die intrazelluläre Lokalisation von GLI1 oder GLI2 beeinflussen kann. Dazu wurden GLI1 bzw. mGLI2 (das Maus-Homolog von humanem GLI2) in HeLa-Zellen (fusioniert mit entweder dem myc-Epitop oder dem flag-Epitop) exprimiert und – wie für GLI3 oben beschrieben – entweder mit der B-Box1 oder mit α 4 koexprimiert, bzw. mit Rapamycin, Fostriecin oder LiCl behandelt. Durch keine der aufgeführten Behandlungen konnte die intrazelluläre Lokalisation von GLI1 oder mGLI2 beeinflusst werden (Tab.5.1).

Tab.5.1: Intrazelluläre Lokalisation von GLI1 und mGLI2. myc-GLI1 bzw. myc-mGLI2 wurden in HeLa-Zellen exprimiert und entweder mit $\alpha 4$ bzw. der B-Box1 koexprimiert oder mit LiCl, Rapamycin bzw. Fostriecin behandelt. Die intrazelluläre Lokalisation von GLI1 bzw. mGLI2 ist unter Angabe der jeweiligen Behandlung der Zellen in der Tabelle dargestellt. Jedes Experiment wurde drei mal wiederholt und pro Experiment wurden jeweils 100 Zellen analysiert. In der Tabelle sind die Mittelwerte aus diesen drei Ergebnissen unter Angabe der Standardabweichung dargestellt.

Exprimiertes Konstrukt	Behandlung	Intrazelluläre Lokalisation von GLI1 bzw. GLI2 (Anzahl der Zellen in %)		
		Nukleus	Nukleus und Cytosol	Cytosol
myc-GLI1	Kontrolle	0	38,7 \pm 2,3	61,3 \pm 2,3
myc-GLI1	Coexpression der B-Box1	0	40,7 \pm 3,1	59,3 \pm 3,1
myc-GLI1	LiCl	0	32,0 \pm 5,3	68,0 \pm 5,3
myc-GLI1	Kontrolle	0	67,7 \pm 10,1	32,3 \pm 10,1
myc-GLI1	Rapamycin	0	66,7 \pm 8,1	33,3 \pm 8,1
myc-GLI1	Coexpression von $\alpha 4$	0	62,7 \pm 10,2	37,3 \pm 10,2
myc-GLI1	Kontrolle	0	49,3 \pm 8,3	50,7 \pm 8,3
myc-GLI1	Fostriecin	0	42,0 \pm 5,3	58,0 \pm 5,3
myc-mGLI2	Kontrolle	60,7 \pm 1,2	28,0 \pm 0	11,3 \pm 1,2
myc-mGLI2	Coexpression der B-Box1	60,3 \pm 0,6	26,7 \pm 3,1	13,0 \pm 3,0
myc-mGLI2	LiCl	63,3 \pm 6,4	26,7 \pm 4,6	10,0 \pm 2,0
myc-mGLI2	Kontrolle	59,7 \pm 1,5	29,3 \pm 1,5	11,0 \pm 3,0
myc-mGLI2	Rapamycin	63,0 \pm 6,1	28,7 \pm 7,0	8,7 \pm 3,1
myc-mGLI2	Coexpression von $\alpha 4$	59,0 \pm 4,4	33,3 \pm 6,8	7,7 \pm 2,5
myc-mGLI2	Kontrolle	59,3 \pm 1,2	27,7 \pm 1,5	13,0 \pm 1,7
myc-mGLI2	Fostriecin	59,7 \pm 3,2	29,7 \pm 3,8	10,7 \pm 0,6

6. Die intrazelluläre Lokalisation von GLI3 wird durch Phosphorylierung von Fu reguliert

Im Folgenden sollte untersucht werden, wie die intrazelluläre Lokalisation von GLI3 über PP2A- bzw. GSK3 β -Aktivität reguliert werden kann. In *Drosophila* liegt das GLI3-Homolog Ci in einem Proteinkomplex mit weiteren Proteinen – darunter Fu – vor (siehe Einleitung). In *Drosophila* wurde auch gezeigt, dass Fu eine Kinase ist, die durch Phosphorylierung aktiviert wird. Das aktivierte Fu phosphoryliert ein weiteres interagierendes Protein, Cos2, woraufhin der Transport der Aktivatorform des Ci in den Zellkern erfolgt (Fukumoto et al., 2001; Nybakken et al., 2002). Um zu überprüfen, ob ein ähnlicher Mechanismus in der Säugetierzelle für die in der vorliegenden Arbeit beschriebenen Lokalisationsänderungen des GLI3-Proteins verantwortlich ist, sollte zunächst überprüft werden, ob das Fu-Protein für den Kerntransport von GLI3 notwendig ist.

6.1 „Knockdown“ von Fu

Um den Einfluss des Fu-Proteins auf die intrazelluläre Lokalisation von GLI3 zu untersuchen, sollte mittels „Knockdown“ die Menge des endogenen Fu reduziert werden. Nach Kotransfektion der Fu-spezifischen siRNAs bzw. Kontroll-siRNAs mit N-terminal GFP-markiertem GLI3 in HeLa-Zellen wurde die intrazelluläre Lokalisation des GFP-GLI3 mittels Immunfluoreszenz analysiert. Durch „Knockdown“ von Fu änderte sich die intrazelluläre Lokalisation von GFP-GLI3 von $54 \pm 6\%$ der Zellen, in denen GFP-GLI3 ausschließlich im Nukleus lokalisiert war auf $43 \pm 2\%$ (Abb.6.1.1). Der Anteil der Zellen, in denen GFP-GLI3 ausschließlich im Cytosol vorlag, stieg nach Fu-„Knockdown“ von $6 \pm 3\%$ auf 16 ± 5 . In den restlichen Zellen war GFP-GLI3 sowohl im Zellkern als auch im Cytosol lokalisiert. Die Analyse dieser Lokalisationsänderung mittels T-Test unter Annahme einer Normalverteilung zeigte, dass diese statistisch signifikant war ($p=0,026486$). Die Effizienz des „Knockdown“ wurde mittels semiquantitativer RT-PCR überprüft (Abb.6.1.2). Dieses Ergebnis zeigt, dass das Fu-Protein für die Kernlokalisierung des GLI3 wichtig ist.

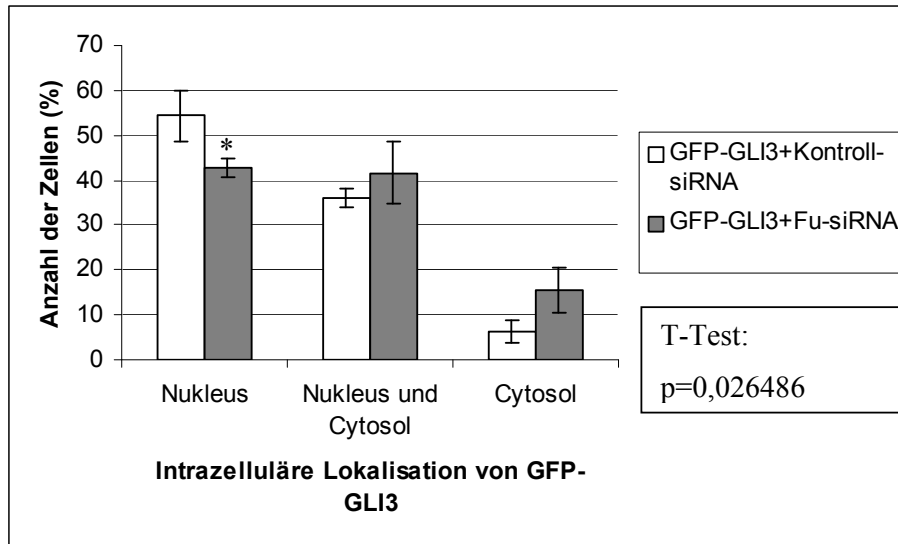


Abb.6.1.1: Kotransfektion von N-terminal markiertem GFP-GLI3 mit Kontroll-siRNAs (weiße Balken) bzw. Fu-spezifischen siRNAs (graue Balken) in HeLa-Zellen. In drei unabhängigen Experimenten wurden jeweils 100 Zellen ausgezählt und in eine der drei folgenden Kategorien eingeordnet: a) GFP-GLI3 ist ausschließlich im Zellkern lokalisiert, b) GFP-GLI3 ist sowohl im Zellkern als auch im Cytosol lokalisiert, c) GFP-GLI3 ist ausschließlich im Cytosol lokalisiert. Die Mittelwerte aus den jeweils drei Ergebnissen sind im Balkendiagramm mit den jeweiligen Standardabweichungen dargestellt. Unter Annahme einer Normalverteilung wurde die Signifikanz des beobachteten Effekts mittels T-Test ermittelt. Das Ergebnis des T-Tests ist in der Abbildung angegeben.

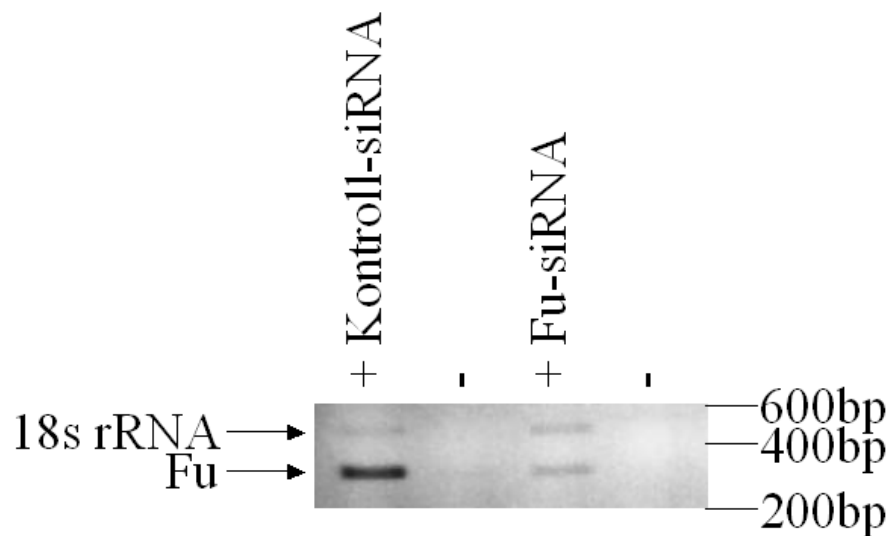


Abb.6.1.2: Semiquantitative RT-PCR. Auf cDNA aus HeLa-Zellen, die mit Kontroll-siRNAs (linke Spur) bzw. mit Fu-spezifischen siRNAs (rechte Spur) transfiziert wurden, wurde eine semiquantitative RT-PCR durchgeführt. Die PCR-Produkte wurden auf einem Agarose-Gel aufgetrennt. Die obere Bande ist die Kontroll-Bande, die untere die Fu-spezifische.

6.2 Die Phosphorylierung von Fu wird durch PP2A und GSK3 β reguliert

Nachdem hier gezeigt werden konnte, dass das Fu-Protein Einfluss auf die intrazelluläre Lokalisation von GLI3 hat, sollte nun untersucht werden, ob der Phosphorylierungsstatus des Fu-Proteins über die Aktivitäten der Mikrotubulus-assoziierten PP2A und GSK3 β gesteuert wird, und ob somit, wie es in *Drosophila* beschrieben wurde, die Effekte der beiden Enzyme auf die intrazelluläre Lokalisation des GLI3 über eine Phosphorylierungs-abhängige Interaktion mit Fu erklärt werden könnten. Dazu sollte zunächst untersucht werden, ob das Fu-Protein ein Phosphoprotein ist.

6.2.1 Fu-Phosphorylierung in-vitro

Um zu überprüfen, ob Fu ein Phosphoprotein ist, wurde V5-markiertes Fu in HeLa-Zellen exprimiert. Jeweils 100 μ g Proteinextrakt dieser Zellen wurden mit aufgereinigter λ -Phosphatase bzw. ohne Zugabe der λ -Phosphatase inkubiert. Anschließend wurden diese Proteinextrakte auf einem 6%igen SDS-Gel aufgetrennt und mittels Westernblot (siehe Methoden) analysiert. In nicht behandelten Kontrollzellen wurden auf dem Westernblot mit einem V5-Antikörper zwei Banden (150kDa und 145kDa) detektiert. Dies zeigt, dass in den analysierten Zellen zwei Isoformen des Fu-Proteins vorliegen. Nach Behandlung mit λ -Phosphatase konnte keine der beiden Fu-Isoformen mehr auf dem Westernblot nachgewiesen werden (Abb.6.2.1.1). Dies deutet darauf hin, dass beide Fu-Isoformen phosphoryliert sind.

Anschließend wurde Fu in HeLa-Zellen exprimiert und mittels Immunpräzipitation (siehe Methoden) mit V5-Antikörpern aufgereinigt. Die Immunpräzipitate wurden mit bzw. ohne Zugabe der gereinigten katalytischen Untereinheit von PP2A inkubiert und anschließend auf einem 6%igen SDS-Gel aufgetrennt und mittels Westernblot analysiert. Wie auch bei der Behandlung mit λ -Phosphatase wurden im Kontrollansatz zwei Isoformen des Fu-Proteins nachgewiesen (150kDa und 145kDa), die nach PP2A-Behandlung nicht mehr nachweisbar waren (Abb.6.2.1.1).

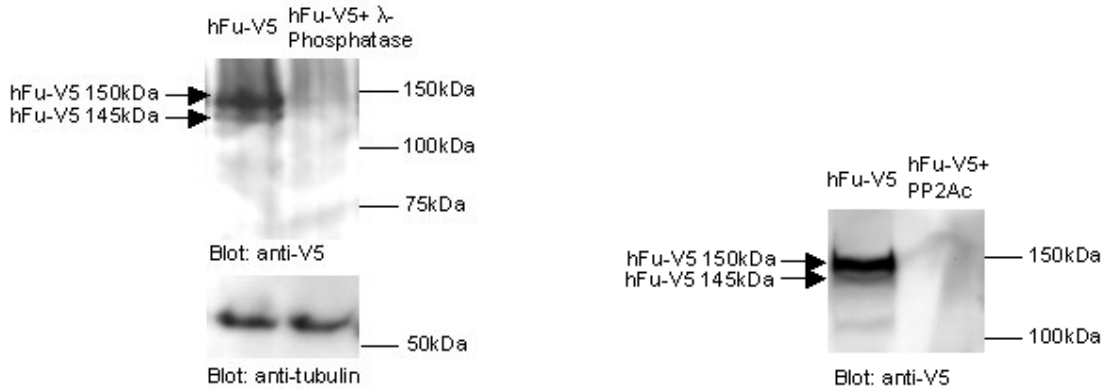


Abb.6.2.1.1: Analyse von Zelllysaten Fu-V5 exprimierender HeLa-Zellen mittels Westernblot. Links: Jeweils 100µg Protein wurden mit (rechte Spur) bzw. ohne (linke Spur) Zugabe von λ-Phosphatase inkubiert und anschließend auf einem 6%igen SDS-Gel aufgetrennt und geblottet. Fu-V5 wurde mittels anti-V5-Antikörper detektiert (oben). Das Auftragen gleicher Proteinmengen wurde mittels Tubulin-Antikörper nachgewiesen (unten). Rechts: Immunpräzipitate wurden mit (rechte Spur) bzw. ohne (linke Spur) Zugabe von PP2Ac inkubiert. Fu-V5 wurde mittels anti-V5-Antikörper detektiert.

6.2.2 Fu-Phosphorylierung in-vivo

In einem weiteren Experiment sollte die Phosphorylierung von Fu in-vivo untersucht werden. Hierzu wurde V5-markiertes Fu in HeLa-Zellen exprimiert bzw. mit der B-Box1 des MID1-Proteins koexprimiert. Diese Zellen wurden einer Orthophosphat-Markierung unterzogen (siehe Methoden). Aus den radioaktiv markierten Zelllysaten wurde Fu-V5 mittels Immunpräzipitation aufgereinigt. Die Immunpräzipitate wurden auf einem 6%igen SDS-Gel aufgetrennt, das anschließend zur Belichtung eines Films benutzt wurde. Auf dem Film wurden Banden in Höhe der beiden Fu-Isoformen (150kDa / 145kDa) detektiert, was – übereinstimmend mit den Ergebnissen in Kapitel 6.2.1 – auf die Phosphorylierung beider Isoformen hinweist (Abb.6.2.2.1.). Interessanterweise verschwanden die Banden der beiden Fu-Isoformen nach Koexpression der B-Box1, was darauf hindeutet, dass die Phosphorylierung von Fu von der Aktivität endogener PP2A abhängig ist.

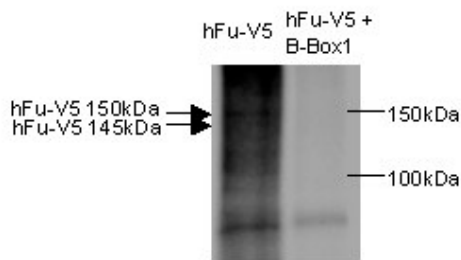


Abb.6.2.2.1: Orthophosphat-Markierung von Immunpräzipitaten Fu-V5 exprimierender (linke Spur) bzw. Fu-V5 und B-Box1-myc koexprimierender (rechte Spur) HeLa-Zellen. Die Pfeile zeigen auf die zu der 150kDa- bzw. 145kDa-Isoform korrespondierenden Banden von Fu.

6.2.3 Abhängigkeit der Fu-Phosphorylierung von endogener PP2A-Aktivität

Nachdem in Abschnitt 6.2.2 erste Hinweise darauf gefunden wurden, dass die Phosphorylierung von Fu über die Aktivität endogener PP2A reguliert werden könnte, sollten weitere Experimente durchgeführt werden, um dies zu verifizieren. Dazu wurde V5-markiertes Fu in HeLa-Zellen unter Koexpression von $\alpha 4$ bzw. der B-Box1 exprimiert. Nach dem Modell von Trockenbacher et al. (2001) wird durch Koexpression von $\alpha 4$ die Mikrotubulus-assoziierte PP2A schneller abgebaut, während die Koexpression der B-Box1 den Abbau des Enzyms blockiert. Durch Koexpression von $\alpha 4$ kann demnach die Aktivität der endogenen PP2A reduziert werden, während deren Aktivität durch Koexpression der B-Box1 erhöht werden kann. Lysate von Zellen, die V5-markiertes Fu unter Koexpression von $\alpha 4$ bzw. der B-Box1 exprimieren, wurden auf einem Westernblot mit anti-V5-Antikörpern untersucht (Abb.6.2.3.1). Die Quantifizierung der auf dem Westernblot detektierten Banden ergab eine deutliche Anreicherung der 145kDa-Isoform im Verhältnis zur 150kDa-Isoform nach Koexpression der B-Box1 (Verhältnis 150kDa Isoform / 145kDa Isoform = 3,42 in Kontrollzellen im Gegensatz zu 1,64 nach Koexpression der B-Box1) (Abb.6.2.3.2). Dies deutet auf eine gesteigerte Dephosphorylierung der 150kDa-Isoform von Fu nach Koexpression der B-Box1 hin. Im Gegensatz dazu, erhöhte sich der Anteil der 150kDa-Isoform von Fu im Verhältnis zur 145-kDa-Isoform nach Koexpression von $\alpha 4$ (Verhältnis 150kDa Isoform / 145kDa Isoform = 3,42 in Kontrollzellen im Gegensatz zu 5,44 nach Koexpression von $\alpha 4$) (Abb.6.2.3.1-6.2.3.2). Auch dies deutet darauf hin, dass der Fu-Phosphorylierungsstatus von der Aktivität Mikrotubulus-assoziiierter PP2A abhängig ist.

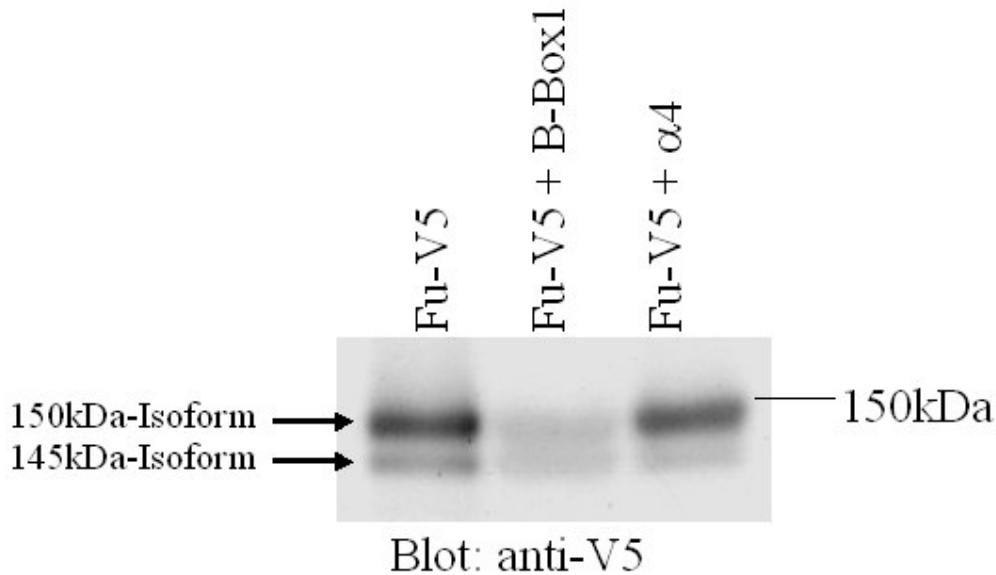


Abb.6.2.3.1: Westernblot-Analyse von Proteinextrakten von HeLa-Zellen, die Fu-V5 (linke Spur), Fu-V5 und die B-Box1 (mittlere Spur) oder Fu-V5 und $\alpha 4$ (rechte Spur) exprimieren. Jeweils 100 μ g Protein wurden auf einem 6%igen SDS-Gel aufgetrennt und geblottet. Die Detektion erfolgte mit einem anti-V5-Antikörper. Die Banden, die zur 150kDa-Isoform bzw. zur 145kDa-Isoform von Fu-V5 korrespondieren, sind mit Pfeilen gekennzeichnet.

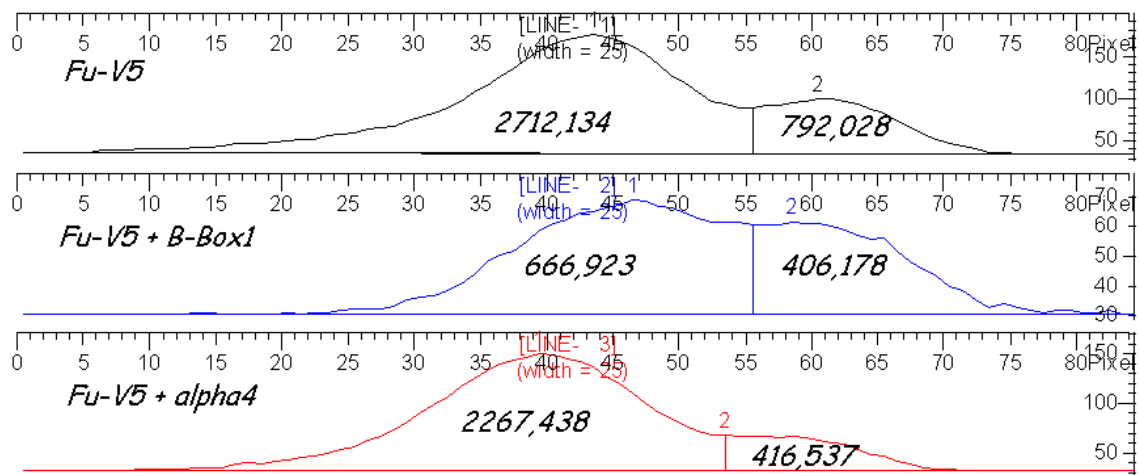


Abb.6.2.3.2: Quantifizierung der Banden aus 6.2.3.1 mittels ImageQuant5.1. Die Fläche unter den Peaks korrespondiert jeweils zur Intensität der Banden auf dem Westernblot. Die Integrale der jeweiligen Flächen unter den Peaks sind in der Abbildung angegeben.

Um diese Ergebnisse weiter zu verifizieren, wurde in HeLa-Zellen V5-markiertes Fu exprimiert und gleichzeitig die endogene Menge von $\alpha 4$ mittels RNAi reduziert. Jeweils 100 μ g der Proteinextrakte dieser Zellen wurden auf einem 6%igen SDS-Gel aufgetrennt und mittels Westernblot (siehe Methoden) mit einem anti-V5-Antikörper analysiert (Abb.6.2.3.3) und die resultierenden Banden mittels ImageQuant5.1 quantifiziert (Abb.7.2.3.4). Nach $\alpha 4$ -„Knockdown“ ergab sich eine deutliche Anreicherung der 145kDa-Isoform im Verhältnis zur 150kDa-Isoform (Verhältnis 150kDa Isoform / 145kDa Isoform = 3,82 in Kontrollzellen im Gegensatz zu 2,76 nach $\alpha 4$ -„Knockdown“). Die Effizienz des „Knockdowns“ wurde auf einem Westernblot mittels Detektion mit einem anti- $\alpha 4$ -Antikörper kontrolliert (Abb.6.2.3.5).

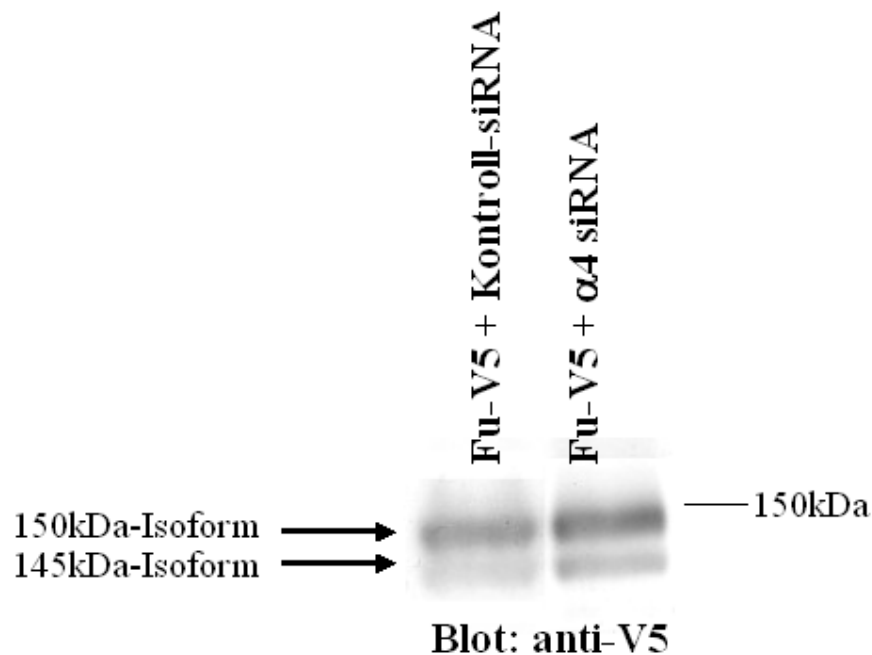


Abb.6.2.3.3: Westernblot-Analyse von Proteinextrakten von HeLa-Zellen, die mit Fu-V5 und Kontroll-siRNAs (linke Spur) oder mit Fu-V5 und $\alpha 4$ -spezifischen siRNAs (rechte Spur) kotransfiziert sind. Jeweils 100 μ g Protein wurden auf einem 6%igen SDS-Gel aufgetrennt und geblottet. Die Detektion erfolgte mit einem anti-V5-Antikörper. Die Banden, die zur 150kDa-Isoform bzw. zur 145kDa-Isoform von Fu-V5 korrespondieren, sind mit Pfeilen gekennzeichnet.

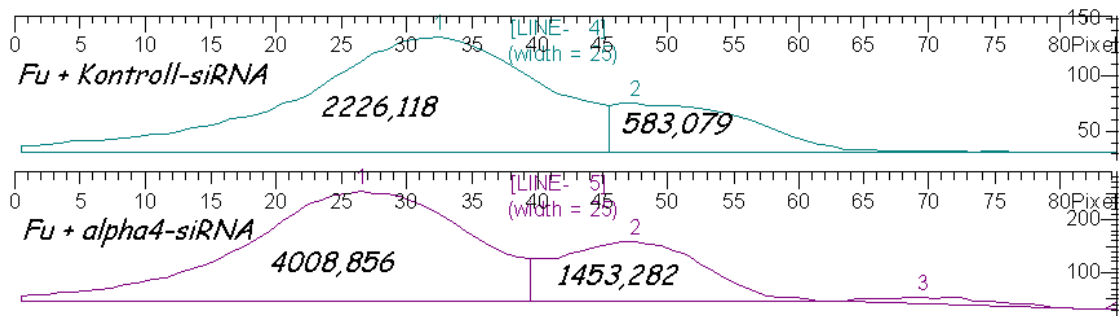


Abb.6.2.3.4: Quantifizierung der Banden aus 6.2.3.3 mittels ImageQuant5.1. Die Fläche unter den Peaks korrespondiert jeweils zur Intensität der Banden auf dem Westernblot. Die Integrale der jeweiligen Flächen unter den Peaks sind in der Abbildung angegeben.

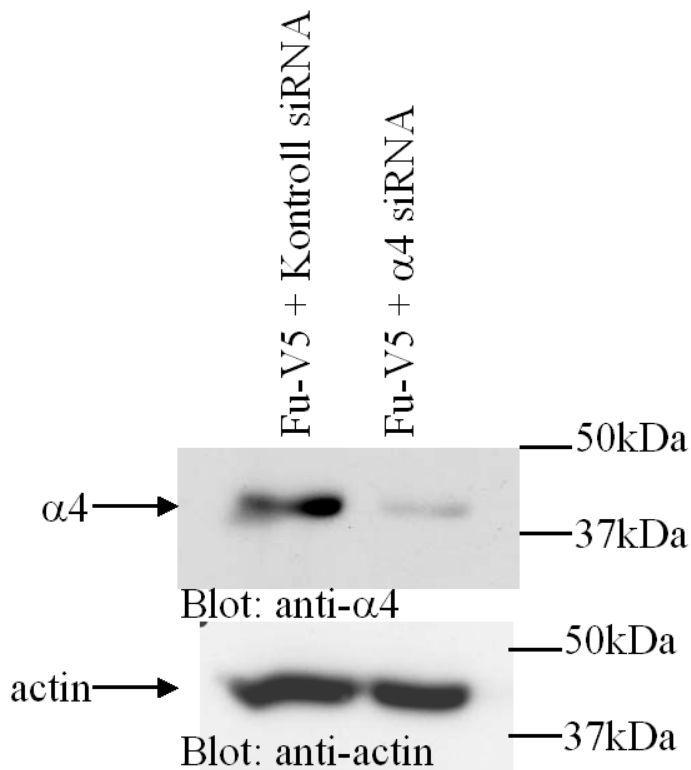


Abb.6.2.3.5: Westernblot-Analyse von denselben Proteinextrakten wie in Abb.6.2.3.4. Jeweils 50µg Proteinextrakt wurden auf einem 10%igen SDS-Gel aufgetrennt und geblottet. Die Effizienz des α4-„Knockdowns“ wurde durch Detektion mit anti-α4 (oben) gezeigt. Als Ladekontrolle wurde der Blot mit einem anti-Aktin-Antikörper (unten) detektiert.

6.2.4 Abhängigkeit der Fu-Phosphorylierung von GSK3 β

Nachdem gezeigt wurde, dass die PP2A-abhängige Regulation der intrazellulären Lokalisation von GLI3 mit einer Veränderung des Phosphorylierungsstatus von Fu einhergeht, sollte nun gezeigt werden, ob auch die von GSK3 β -Aktivität abhängige Regulation der intrazellulären Lokalisation von GLI3 mit einer Fu-Phosphorylierung verbunden ist. Um zu überprüfen, ob die Kinase, die der PP2A-abhängigen Dephosphorylierung von Fu entgegenwirkt, GSK3 β ist, wurde V5-markiertes Fu in HeLa-Zellen überexprimiert, die entweder mit Kontroll-siRNA oder mit GSK3 β -spezifischer siRNA kotransfiziert wurden. Lysate dieser Zellen wurden auf einem 6%igen SDS-Gel aufgetrennt und mittels Westernblot mit anti-V5-Antikörpern analysiert (Abb.6.2.4.1). Die Quantifizierung der auf dem Westernblot detektierten Banden ergab eine deutliche Anreicherung der 145kDa-Isoform im Verhältnis zur 150kDa-Isoform nach GSK3 β -„Knockdown“ (Verhältnis 150kDa Isoform / 145kDa Isoform = 5,70 in Kontrollzellen im Gegensatz zu 2,68 nach GSK3 β -„Knockdown“) (Abb.6.2.4.2). Dies deutet auf eine gesteigerte Dephosphorylierung der 150kDa-Isoform von Fu nach GSK3 β -„Knockdown“ hin. Hiermit wurde bestätigt, dass die GSK3 β -abhängige Änderung der intrazellulären Lokalisation von GLI3 mit einer GSK3 β -abhängigen Phosphorylierung des Fu-Protein einhergeht.

GSK3 β spielt neben der hier neu identifizierten Kinase-Funktion auf Fu eine wichtige Rolle im Wnt-Signaltransduktionsweg. Um zu untersuchen, ob die hier gezeigten GSK3 β -spezifischen Effekte über den Wnt-Signaltransduktionsweg reguliert werden, wurde in einem weiteren Experiment ein β -catenin-„Knockdown“ durchgeführt. β -catenin ist das zentrale Molekül der Wnt-Signaltransduktionskaskade. Hierfür wurde V5-markiertes Fu in HeLa-Zellen überexprimiert, die entweder mit Kontroll-siRNA oder mit β -catenin-spezifischer siRNA kotransfiziert wurden. Lysate dieser Zellen wurden auf einem 6%igen SDS-Gel aufgetrennt und mittels Westernblot mit anti-V5-Antikörpern analysiert (Abb.6.2.4.1). Die Quantifizierung der auf dem Westernblot detektierten Banden zeigte, dass der β -catenin-„Knockdown“ keinen Einfluss auf die Phosphorylierung von Fu hat (Verhältnis 150kDa Isoform / 145kDa Isoform = 5,70 in Kontrollzellen und 5,63 nach β -catenin-„Knockdown“) (Abb.6.2.4.2). Dies zeigt, dass die in dieser Arbeit identifizierte Phosphorylierung von Fu

über GSK3 β eine von der Wnt-Signaltransduktionskaskade unabhängige, neue Funktion des Enzyms darstellt.

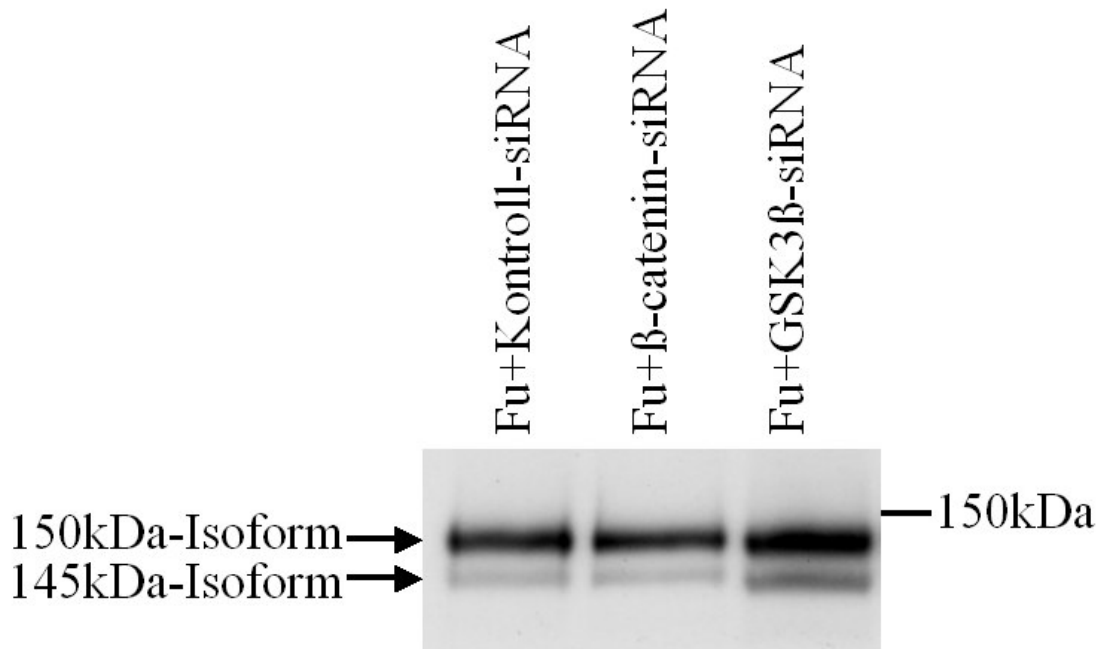


Abb.6.2.4.1: Westernblot-Analyse von Proteinextrakten von HeLa-Zellen, die Fu-V5 exprimieren und mit Kontroll-siRNA (linke Spur), β-catenin-siRNA (mittlere Spur) oder GSK3β-siRNA (rechte Spur) kotransfiziert sind. Jeweils 50μg Protein wurden auf einem 6%igen SDS-Gel aufgetrennt und geblottet. Die Detektion erfolgte mit einem anti-V5-Antikörper. Die Banden, die zur 150kDa-Isoform bzw. zur 145kDa-Isoform von Fu-V5 korrespondieren, sind mit Pfeilen gekennzeichnet.

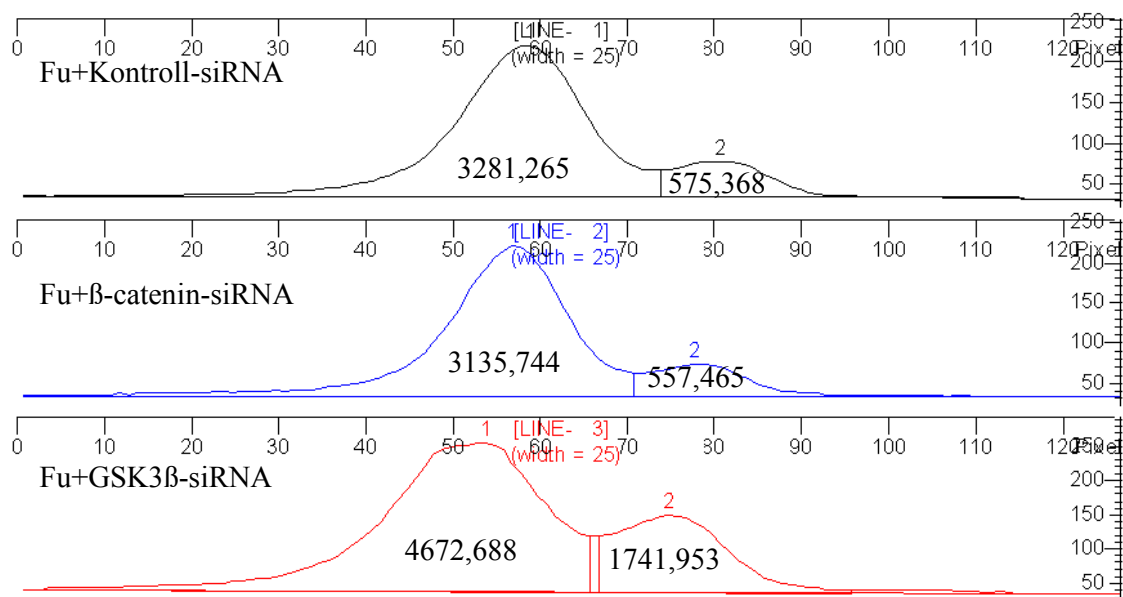


Abb.6.2.4.2: Quantifizierung der Banden aus 6.2.4.1 mittels ImageQuant5.1. Die Fläche unter den Peaks korrespondiert jeweils zur Intensität der Banden auf dem Westernblot. Die Integrale der jeweiligen Flächen unter den Peaks sind in der Abbildung angegeben.

6.3 Phosphospezifische Modifikation von GLI3

Nachdem hier gezeigt werden konnte, dass die Veränderung der intrazellulären Lokalisation von GLI3 über die Mikrotubulus-assoziierte PP2A bzw. GSK3 β mit einer Veränderung des Phosphorylierungsstatus von Fu einhergeht, sollte nun untersucht werden, ob es, wie in *Drosophila* beschrieben, eine Interaktion zwischen Fu und GLI3 abhängig vom Phosphorylierungsstatus des Fu gibt. Dazu sollte zunächst untersucht werden, ob das GLI3 selbst ein Phosphoprotein ist, und ob es mit Fu interagieren kann.

6.3.1 GLI3-Phosphorylierung in-vitro

N-terminal bzw. C-terminal GFP-markiertes GLI3 wurde in HeLa-Zellen exprimiert. Nach dem Zellaufschluss wurden Kern- und Cytosol-Fraktionen voneinander getrennt (siehe Methoden). Die Fraktionen wurden mit aufgereinigter λ -Phosphatase bzw. der katalytischen Untereinheit von PP2A (PP2Ac) inkubiert und anschließend auf einem 6%igen SDS-Gel aufgetrennt und mittels Westernblot analysiert (siehe Methoden). Die isolierte katalytische Untereinheit der PP2A dephosphoryliert in-vitro alle Serin- und Threonin-Phosphorylierungen, während λ -Phosphatase sowohl Serin- und Threonin-Phosphorylierungen als auch Tyrosin-Phosphorylierungen dephosphoryliert. Die Blots wurden mit einem anti-GFP-Antikörper inkubiert. Die GFP-GLI3-spezifischen Banden der nicht behandelten Kernfraktionen scheinen ein minimal anderes Laufverhalten im SDS-Gel zu haben als die Banden der PP2Ac bzw. λ -Phosphatase behandelten Kernfraktionen (Abb.6.3.1.1). Bei den Cytosol-Fraktionen ist kein Unterschied im Laufverhalten im SDS-Gel zwischen den Kontrollen und den Phosphatase-behandelten Ansätzen zu sehen. Dies könnte ein Hinweis darauf sein, dass das im Zellkern vorliegende GFP-GLI3 phosphoryliert ist, nicht jedoch das cytosolische.

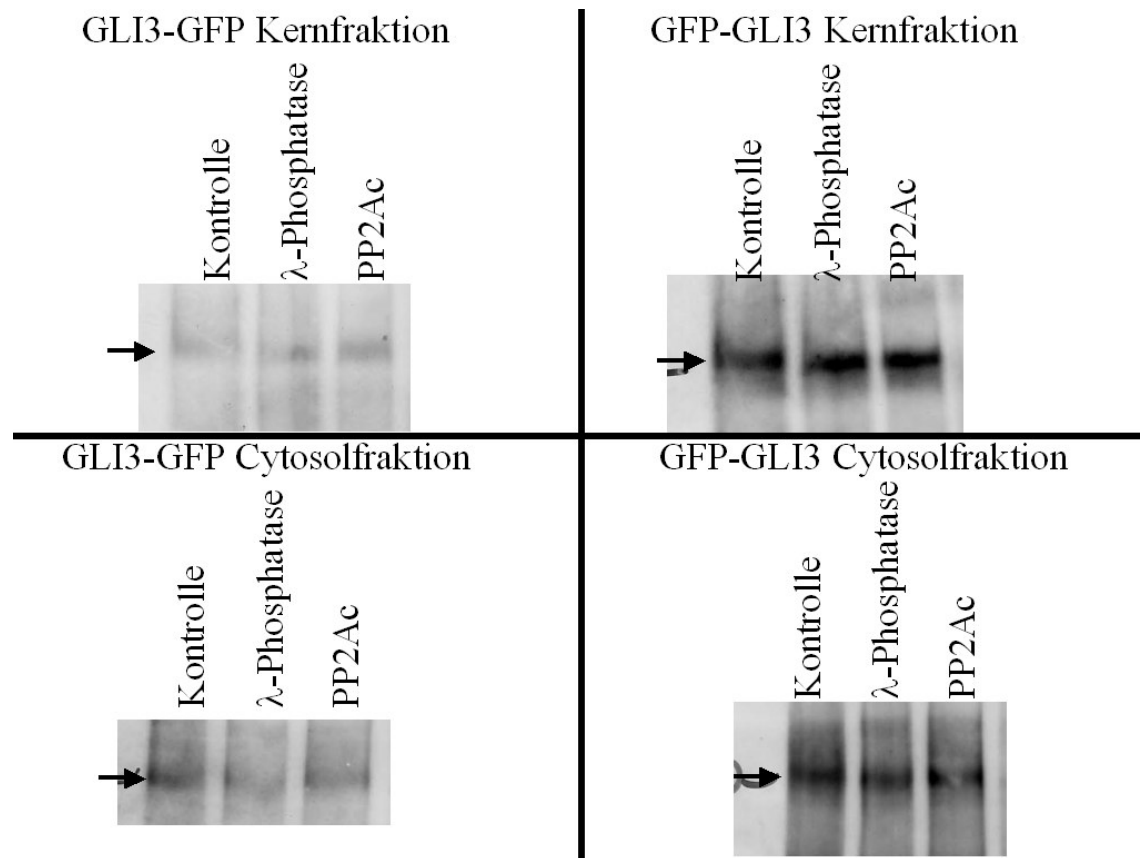


Abb.6.3.1.1: Westernblotanalyse von Kern-(oben) bzw. Cytosol-Fractionen (unten) aus HeLa-Zellen, die entweder C-terminal (links) oder N-terminal (rechts) GFP-fusioniertes GLI3 exprimieren. Die einzelnen Fraktionen wurden mit bzw. ohne (jeweils linke Spur) Zusatz von λ -Phosphatase (jeweils mittlere Spur) oder PP2Ac (jeweils rechte Spur) inkubiert und auf einem 6%igen SDS-Gel aufgetrennt und geblottet. Die Detektion erfolgte mit einem anti-GFP-Antikörper.

Da diese Änderungen im Laufverhalten im SDS-Gel jedoch sehr klein und demnach schwer zu interpretieren sind, sollte im Folgenden mit Hilfe von GLI3-Deletionskonstrukten, die Region des GLI3 näher eingegrenzt werden, die für die Regulation der GLI3-Lokalisation über die Aktivitäten von PP2A und GSK3 β wichtig ist. Anschließend sollte der Phosphorylierungsstatus der entsprechenden Proteindomäne untersucht werden.

6.3.2 Identifizierung eines kürzeren GLI3-Fragments, dessen Lokalisation über PP2A bzw. GSK3 β reguliert wird.

10 verschiedene GFP-markierte GLI3-Deletionsfragmente wurden in HeLa-Zellen überexprimiert und auf ihre intrazelluläre Lokalisation hin untersucht. Exemplarisch sollten mit Hilfe einer LiCl-Behandlung mögliche Effekte von GSK3 β -Aktivität auf die Lokalisation der entsprechenden GLI3-Deletionskonstrukte analysiert werden.

6.3.2.1 Die durch GSK3 β beeinflusste Domäne liegt im C-Terminus des GLI3-Proteins

Die N- bzw. C-terminal GFP-markierten GLI3-Deletionskonstrukte wurden in HeLa-Zellen überexprimiert. Die intrazelluläre Lokalisation der GFP-Fusionsproteine mit bzw. ohne Zugabe von LiCl – einem GSK3 β -Inhibitor - wurde mittels Immunfluoreszenz analysiert. In drei unabhängigen Experimenten wurden jeweils 100 GFP-positive Zellen ausgezählt und in die drei Kategorien: a) GFP-Signal ausschließlich im Nukleus, b) GFP-Signal im Nukleus und im Cytosol und c) GFP-Signal ausschließlich im Cytosol eingeteilt. Die Mittelwerte der Auszählungen sind unter Angabe der Standardabweichung in Tab.6.3.2.1.1 dargestellt. Nur mit den Deletionskonstrukten, die die Aminosäuren 586-1549 bzw. 18-1100 umfassen, konnte eine statistisch signifikante Änderung der intrazellulären Lokalisation nach der LiCl-Behandlung erreicht werden. Für die folgenden Phosphorylierungsstudien wurden deshalb diese Konstrukte eingesetzt.

Tab.6.3.2.1.1: Intrazelluläre Lokalisation der verschiedenen GLI3-Deletionskonstrukte. Die Konstrukte sind unter der Angabe der enthaltenen Aminosäuren (AA) von GLI3 aufgeführt.

Exprimiertes Konstrukt	Behandlung	Intrazelluläre Lokalisation (Anzahl der Zellen in %)			T-Test p=
		Nukleus	Nukleus und Cytosol	Cytosol	
GFP-GLI3 AA18-369	Kontrolle	0	76 ± 7	24 ± 7	-
GFP-GLI3 AA18-369	LiCl	0	69 ± 11	31 ± 11	
GFP-GLI3 AA18-667	Kontrolle	77 ± 4	19 ± 5	5 ± 2	0,584815
GFP-GLI3 AA18-649	LiCl	74 ± 8	23 ± 7	3 ± 1	
GFP-GLI3 AA18-828	Kontrolle	62 ± 11	31 ± 10	7 ± 3	0,772373
GFP-GLI3 AA18-828	LiCl	60 ± 10	35 ± 7	6 ± 4	
GFP-GLI3 AA18-1100	Kontrolle	62 ± 3	32 ± 2	7 ± 2	0,007633
GFP-GLI3 AA18-1100	LiCl	52 ± 1	42 ± 2	6 ± 2	
GFP-GLI3 AA586-1549	Kontrolle	17 ± 3	77 ± 2	6 ± 3	0,001353
GFP-GLI3 AA586-1549	LiCl	2 ± 1	73 ± 6	25 ± 5	
GLI3-GFP AA1-369	Kontrolle	0	100	0	-
GLI3-GFP AA1-369	LiCl	0	100	0	
GLI3-GFP AA1-667	Kontrolle	77 ± 3	18 ± 3	5 ± 2	0,917386
GLI3-GFP AA1-649	LiCl	77 ± 5	19 ± 5	4 ± 1	
GLI3-GFP AA1-828	Kontrolle	75 ± 5	19 ± 2	5 ± 4	0,367856
GLI3-GFP AA1-828	LiCl	71 ± 5	16 ± 12	6 ± 4	
GLI3-GFP AA1-1100	Kontrolle	71 ± 8	19 ± 2	5 ± 4	0,093904
GLI3-GFP AA1-1100	LiCl	61 ± 2	35 ± 2	4 ± 1	
GLI3-GFP AA824-1100	Kontrolle	0	100	0	-
GLI3-GFP AA824-1100	LiCl	0	100	0	

6.3.2.3 Phosphorylierungsstatus der GLI3-Fragmente (Aminosäure 586-1549 bzw. 18-1100)

Um zu überprüfen, ob die GLI3-Konstrukte AA586-1549 bzw. AA18-1100 phosphoryliert werden, wurden sie zunächst in HeLa-Zellen überexprimiert. Nach dem Zellaufschluss wurden die Zellen einer Zellfraktionierung, bei der die Kern- und Cytosol-Fractionen voneinander getrennt wurden, unterzogen. Jeweils 50µg Protein der Fractionen wurden in vitro mit λ -Phosphatase inkubiert, welche alle Serin-, Threonin- und Tyrosinreste dephosphoryliert. Nach dieser Behandlung wurden die Ansätze auf einem 6%igen SDS-Gel aufgetrennt und mittels Westernblot mit einem anti-GFP-Antikörper analysiert. Nach der Phosphatase-Behandlung war in der Kern-Fraction der Zellen, die das GLI3-Konstrukt AA585-1549 exprimierten, kein GFP-GLI3-Fragment mehr detektierbar, während die Behandlung in der Cytosol-Fraction keine Veränderung verursachte (Abb.6.3.2.3.1). Dies deutet darauf hin, dass dieses GFP-GLI3-Fragment in der Kern-Fraction phosphoryliert vorliegt. Im dephosphorylierten Zustand wird es scheinbar instabil und abgebaut. Dieses Ergebnis bestätigt die in 6.3.1 vermutete Phosphorylierung des nukleären, nicht aber des cytosolischen GLI3-Proteins. Nach der Phosphatase-Behandlung der Kern- und Cytosol-Fractionen der Zellen, die das GLI3-Konstrukt AA18-1100 exprimierten, wurde keine Veränderung beobachtet (Abb.6.3.2.3.1). Entweder ist dieses Fragment nicht phosphoryliert, oder die Dephosphorylierung führt nicht zu einer instabilen Form, wie es bei dem Fragment AA586-1549 der Fall ist. Der Erfolg der Zellfraktionierung wurde durch Inkubation derselben Blots mit einem anti-Lamin A/C-Antikörper gezeigt.

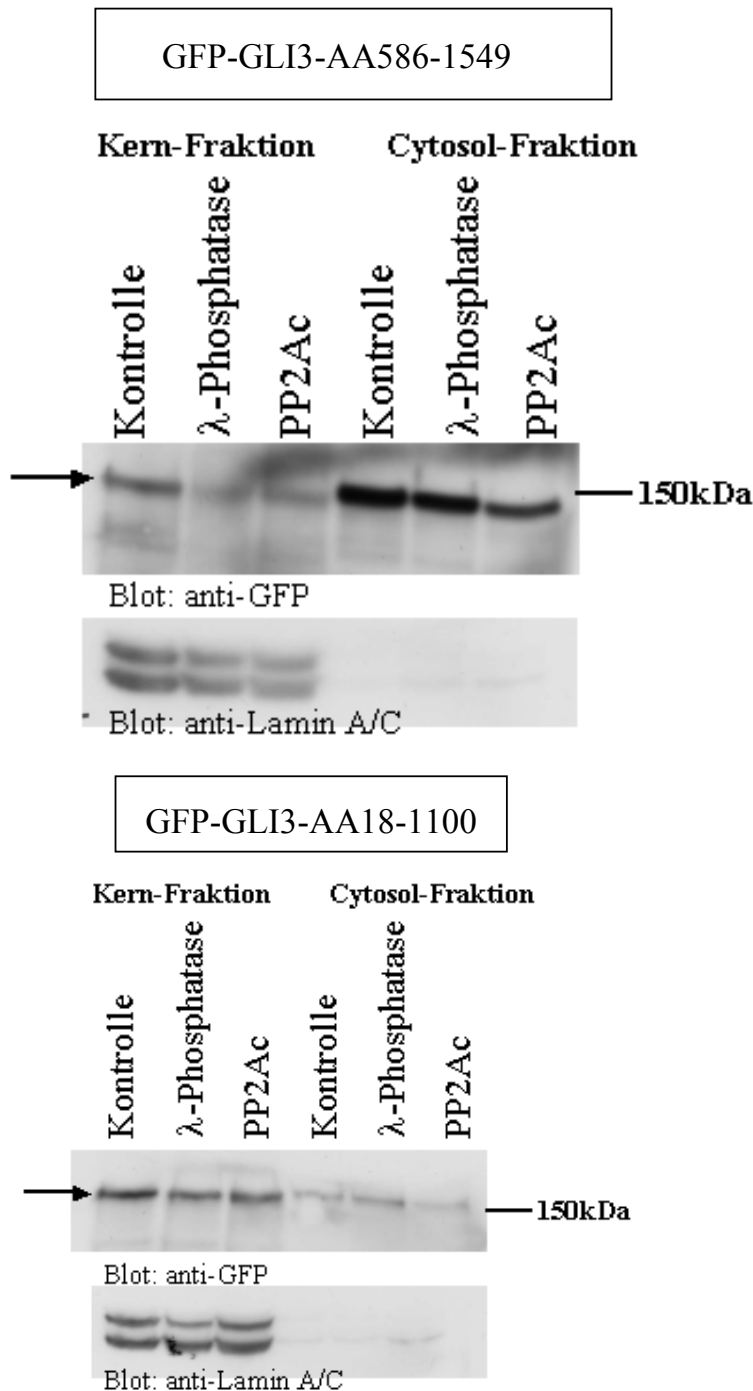


Abb.6.3.2.3.1: In-vitro-Phosphatase-Behandlung von Kern- (jeweils linke drei Spuren) und Cytosol-Fractionen (jeweils rechte drei Spuren) GFP-GLI3-AA586-1549 (oben) bzw. GFP-GLI3-AA-18-1100 (unten) überexprimierender HeLa-Zellen. Die nicht behandelten (jeweils linke Spur), λ -Phosphatase-behandelten (jeweils mittlere Spur) bzw. PP2Ac-behandelten (jeweils rechte Spur) Proben wurden auf 6%igen SDS-Gelen aufgetrennt und geblottet. Die Blots wurden mit einem GFP-Antikörper inkubiert (jeweils obere Reihe). Der Erfolg der Zellfraktionierung wurde durch Inkubation der Blots mit einem anti-Lamin A/C-Antikörpern überprüft (jeweils untere Reihe).

6.4 Interaktion von Fu mit den GLI3-Fragmenten Aminosäure 586-1549 und Aminosäure 18-1100

Nachdem hier gezeigt werden konnte, dass die intrazelluläre Lokalisation von GLI3, sowie der Phosphorylierungsstatus von Fu über die Aktivitäten von Mikrotubulus-assoziiierter PP2A und GSK3 β reguliert werden, sollte nun untersucht werden, ob eine Interaktion zwischen Fu und dem cytosolischen, nicht phosphorylierten GLI3 – abhängig vom Phosphorylierungsstatus des Fu - stattfindet. Hierzu sollte eine Ko-Immunpräzipitation durchgeführt werden. Dazu wurden V5-markiertes Fu und das GFP-markierte GLI3-Fragment AA586-1549 bzw. das GLI3-Fragment AA18-1100 in HeLa-Zellen koexprimiert. In einem zweiten Ansatz wurde zur Ko-Expression eine Fu-Mutante, bei der durch eine Mutation (G13V) eine in-silico vorhergesagte Kinase-Domäne inaktiviert wurde, eingesetzt. Sollte – wie in *Drosophila* beschrieben – eine Kinase-Aktivität des Fu für die Interaktion mit GLI3 notwendig sein, so könnte die Ko-Immunpräzipitation von GLI3 und Fu durch eine Inaktivierung der Fu-Kinase erleichtert werden: Interaktionen mit Kinasen sind oft von kurzer Dauer. Wenn das entsprechende Zielprotein phosphoryliert ist, dissoziiert es von der Kinase. Durch das Inaktivieren der Kinase kann das Zielprotein nicht phosphoryliert werden und die Dissoziation wird verhindert, was eine Ko-Immunpräzipitation erleichtert. Nach der Koexpression der Konstrukte in HeLa-Zellen wurden mittels Zellfraktionierung die Zellkerne abgetrennt (siehe Methoden). Die Cytosol-Fractionen der Zellen wurden zur Ko-Immunpräzipitation (siehe Methoden) einerseits mit einem V5-Antikörper und andererseits mit einem GFP-Antikörper versetzt. Als Negativkontrolle wurde eine Ko-Immunpräzipitation mit Maus-IgG's durchgeführt. Die Immunpräzipitate wurden anschließend auf einem 6%igen SDS-Gel aufgetrennt und auf einem Westernblot analysiert. Der Blot wurde sowohl mit V5- als auch mit GFP-Antikörpern detektiert. Dabei wird deutlich, dass das GLI3-Fragment AA586-1549 mit Fu ko-immunpräzipitiert, wobei die Ko-Immunpräzipitation mit der Fu-Mutante eine deutlich stärkere Anreicherung des GLI3-Fragments im Vergleich zur Negativ-Kontrolle zeigt als das Wildtyp-Fu (Abb.6.4.1). Die Präzipitation des GLI3-Fragments AA586-1549 mit anti-GFP-Antikörpern zeigt, dass im Vergleich zur Negativ-Kontrolle vor allem die 150kDa-Isoform der Fu-Mutante in der Ko-Immunpräzipitation angereichert wird. Vergleichbare Ergebnisse wurden auch mit dem GLI3-Fragment AA18-1100 erzielt (Abb.6.4.1). Diese Ergebnisse deuten auf eine Interaktion zwischen dem GLI3-Protein und dem hyperphosphorylierten Fu (150kDa-Isoform) hin, die von der Kinase-Aktivität des Fu

abhängig ist. Diesen Ergebnissen nach führt die Interaktion des cytosolischen, nicht phosphorylierten GLI3 mit der phosphorylierten Form des Fu zur Akkumulation des phosphorylierten GLI3 im Zellkern. Durch Inaktivierung der Kinase-Domäne wird die Interaktion zwischen Fu und GLI3 noch verstärkt, was darauf hindeutet, dass Fu eine Kinase-Aktivität auf GLI3 ausübt, durch die dessen Akkumulation im Zellkern eingeleitet wird. An dieser Stelle sollten weitere Analysen, die eine direkte Phosphorylierung des GLI3 durch die phosphorylierte Form des Fu zeigen, durchgeführt werden.

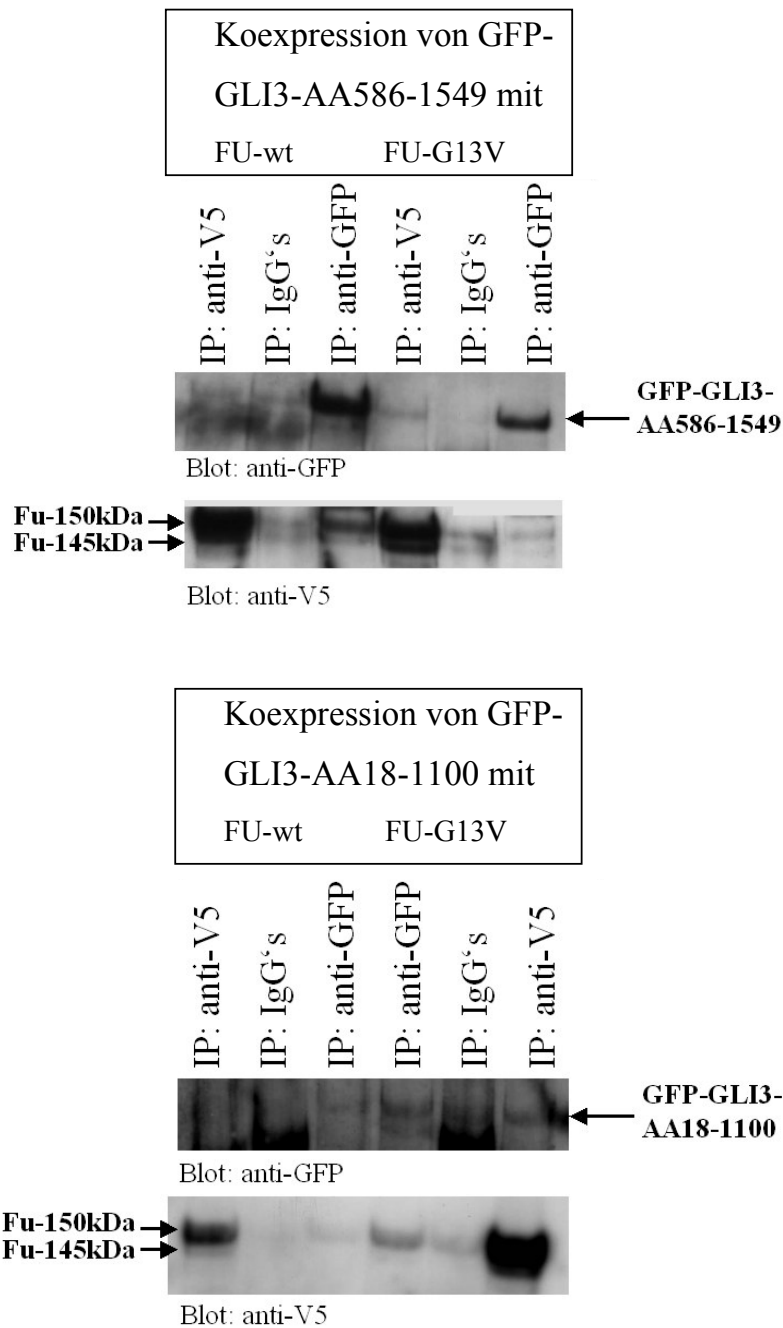


Abb.6.4.1: Ko-Immünpräzipitationen von Fu-wt bzw. einer Fu-Mutante (Fu-G13V) mit den GFP-GLI3-Konstrukten AA586-1549 (oben) und AA18-1100 (unten). Mit Zelllysaten Fu (wt bzw. G13V) und GLI3 (AA586-1549 bzw. 18-1100) koexprimierender HeLa-Zellen wurden Immünpräzipitationen mit einem anti-GFP-Antikörper (bindet GLI3-Konstrukte), mit einem anti-V5-Antikörper (bindet Fu-Konstrukte) bzw. mit Maus-IgG's (Negativkontrolle) durchgeführt. Die Immünpräzipitate wurden auf 6%igen SDS-Gelen aufgetrennt und gebロットet. Die Blots wurden sowohl mit einem GFP-Antikörper (detektiert GLI3-Konstrukte) als auch mit einem V5-Antikörper (detektiert Fu-Konstrukte) inkubiert. Die jeweils resultierenden Fu- bzw.-GLI3-spezifischen Banden sind mit Pfeilen markiert.

7. Wird die transkriptionelle Aktivität von endogenem GLI3 durch Inhibierung von GSK3 β bzw. Induktion von PP2A beeinflusst?

In den bisherigen Ergebnissen wurde die intrazelluläre Lokalisation und die Phosphorylierung von überexprimiertem GLI3 bzw. Fu untersucht. Nun sollte gezeigt werden, ob die transkriptionelle Aktivität von endogenem GLI3 durch seine intrazelluläre Lokalisation und somit über die Aktivität Mikrotubulus-assoziiierter PP2A bzw. GSK3 β reguliert wird. Hierfür wurde die Expression des SHH-Zielgens *PTCHI* in HeLa-Zellen nach Behandlung mit LiCl, einem GSK3 β -Inhibitor, mittels semiquantitativer RT-PCR untersucht. Bei der semiquantitativen RT-PCR wird das jeweils erwünschte genspezifische PCR-Produkt in einem Reaktionsgefäß mit einer internen Kontrolle (hier: 18S rRNA) amplifiziert. Hierdurch wird eine spätere Quantifizierung der PCR-Produkte ermöglicht. Dazu wurden in drei unabhängigen Ansätzen HeLa-Zellen 4 Stunden lang mit bzw. ohne LiCl-Zugabe inkubiert. Anschließend wurde aus diesen Zellen RNA isoliert (siehe Methoden) und eine cDNA-Synthese (siehe Methoden) durchgeführt. Auf der cDNA dieser Zellen wurde dann eine semiquantitative RT-PCR (siehe Methoden) mit *PTCHI*-spezifischen Primern und Kontroll-Primern, die die 18S rRNA amplifizieren (Ambion), durchgeführt. Die hier erzielten PCR-Produkte wurden auf einem Agarose-Gel aufgetrennt. Das Photo des Gels ist in Abb.7.1 gezeigt. Die jeweils oberen Banden sind die genspezifischen, die unteren die Kontroll-Banden. Nach der LiCl-Behandlung verringerte sich die Transkriptmenge des SHH-Zielgens *PTCHI* deutlich. Dies deutet darauf hin, dass die Aktivatorform des endogenen GLI3 –wie das oben analysierte überexprimierte GFP-GLI3 –nach LiCl-Behandlung nur noch in geringem Ausmaß in den Zellkern gelangen kann, und somit die Aktivierung des Zielgens *PTCHI* nach dieser Behandlung zurück geht.

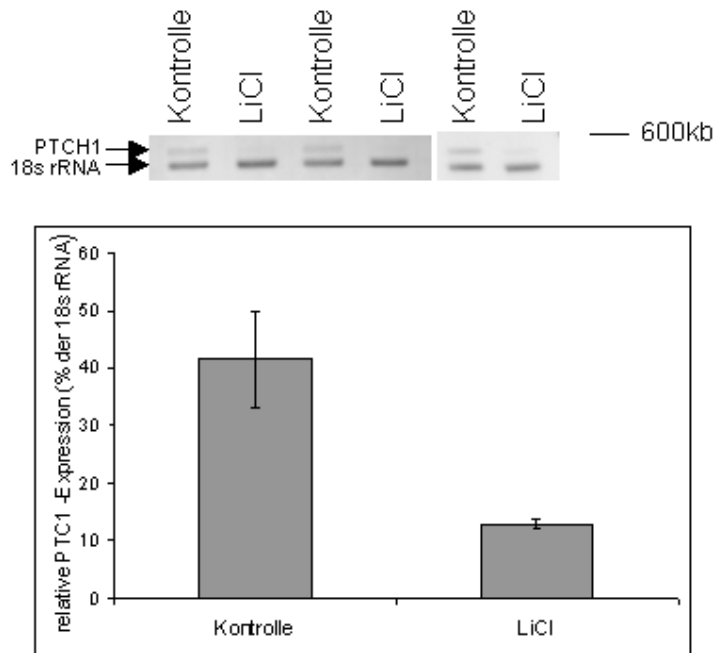


Abb.7.1: Semiquantitative RT-PCR. Auf cDNA aus HeLa-Zellen, die mit bzw. ohne Zugabe von LiCl inkubiert wurden, wurde eine semiquantitative RT-PCR durchgeführt. Die PCR-Produkte wurden auf einem Agarose-Gel aufgetrennt (oben). Die obere Bande ist die PTCH1-spezifische, die untere die Kontroll-Bande. Nach der Quantifizierung der Banden wurde die relative PTCH1-Expression (in % von der Kontrollbande) im Balkendiagramm dargestellt (unten).

8. Herstellung eines anti-GLI3-Antikörpers

Im Vorangegangenen wurde die intrazelluläre Lokalisation und der Phosphorylierungsstatus von überexprimiertem, GFP-markiertem GLI3 untersucht und gezeigt, dass sowohl die intrazelluläre Lokalisation, als auch die transkriptionelle Aktivität von GLI3 über die gegenläufigen Aktivitäten von GSK3 β und PP2A reguliert wird. Um analoge Experimente auch an endogenem GLI3 durchzuführen, benötigt man einen Antikörper, der endogenes GLI3 detektiert.

Um einen solchen Antikörper herzustellen, wurde zunächst ein GLI3-Peptid ausgewählt, das eine geringe Homologie zu GLI1 und GLI2 aufweist. Dieses Peptid umfasste die Aminosäuren 1-121 von GLI3. Die für diese Region kodierende cDNA wurde in den pET32a-Vektor kloniert. Das resultierende Plasmid wurde in E.coli-Zellen transformiert und zur Expression des gewünschten Peptids benutzt. Das so in E.coli exprimierte Peptid, das mit einem Hexa-HIS-Epitop fusioniert ist, wurde mit Hilfe des QIAexpressionist-Kits (Qiagen) über eine Nickel-Agarose-Säule aufgereinigt. Das aufgereinigte Peptid wurde zur Immunisierung eines Kaninchens benutzt und das Serum einer Affinitätsreinigung (siehe Methoden) unterzogen. Die Fraktionen der Affinitätsreinigung wurden zunächst auf einem Dotblot, auf dem das gereinigte Peptid aufgetragen wurde, getestet. Die Fraktionen I.1-II.2 und IV.1-V.1 zeigten positive Signale (Abb.8.1). Diese Fraktionen wurden für weitere Tests des Antikörpers eingesetzt: Nach Überexpression von GFP-GLI3 in HeLa-Zellen wurden jeweils 100 μ g der Proteinextrakte dieser Zellen auf einem 6%igen SDS-Gel aufgetrennt und mittels Westernblot (siehe Methoden) mit den jeweiligen Fraktionen des affinitätsgereinigten Antikörpers analysiert (Abb.8.2). Um zu überprüfen, ob GFP-GLI3 auf den jeweiligen Westernblots detektierbar war, wurden dieselben Blots mit GFP-Antikörpern inkubiert (Abb.8.3). Die Fraktionen IV.3-IV.5 detektierten eindeutig das überexprimierte GFP-GLI3. Da außer der GFP-GLI3-Bande keine weitere Bande mit dem anti-GLI3-Antikörper detektiert werden konnte, scheint mit diesem Antikörper in HeLa-Zellen nur überexprimiertes, nicht aber das endogene GLI3 detektierbar zu sein. Möglicherweise ist die Menge an endogenem GLI3-Protein in HeLa-Zellen zu gering, um mittels Westernblot mit diesem Antikörper nachgewiesen zu werden.

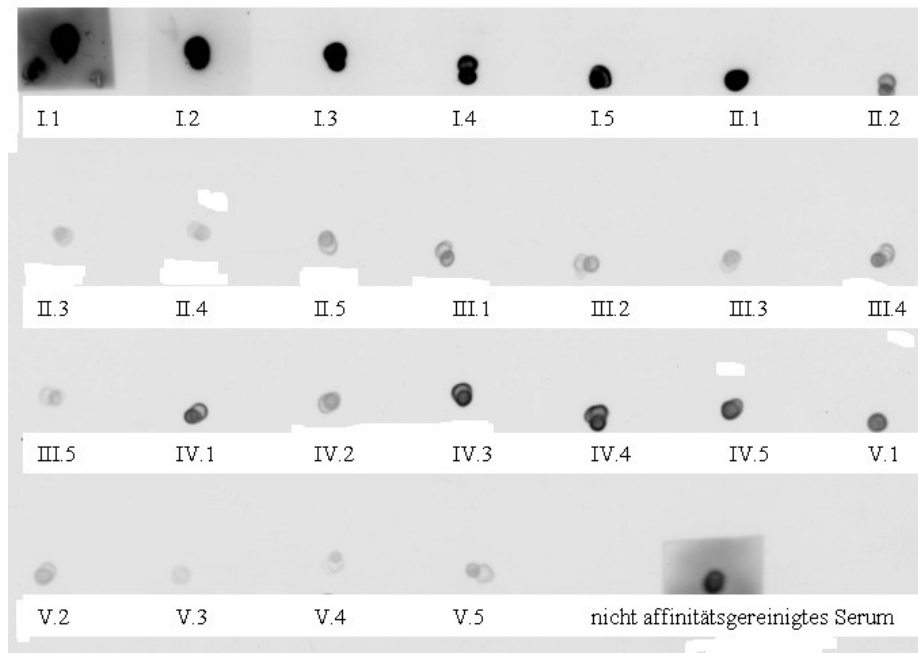


Abb.8.1: Auf 26 Dotblots wurde aufgereinigtes GLI3-Peptid (Aminosäure 1-121) aufgetropft. Die Blots wurde mit den Fraktionen aus der Affinitätsreinigung des GLI3-Antikörpers detektiert. Die Nummern der jeweiligen Fraktionen sind in der Abbildung angegeben.

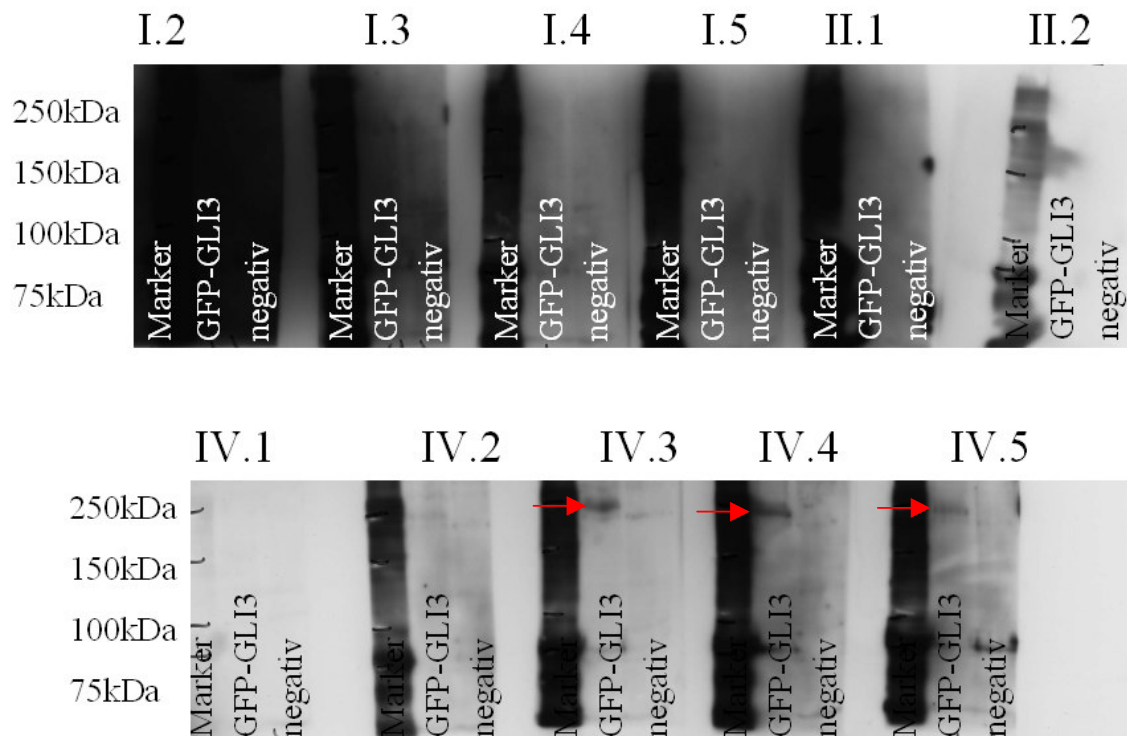


Abb.8.2: Westernblots von Proteinextrakten GFP-GLI3 überexprimierender (jeweils linke Spur) bzw. nicht transfizierter Zellen (jeweils rechte Spur). Jeweils 100 μ g Protein wurden auf einem 6%igen SDS-Gel aufgetrennt und geblottet. Die Blots wurden mit verschiedenen Fraktionen des affinitätsgereinigten anti-GLI3-Antikörpers inkubiert. Die Nummer der jeweiligen Fraktion ist angegeben. Die spezifischen GLI3-Banden sind mit Pfeilen markiert.

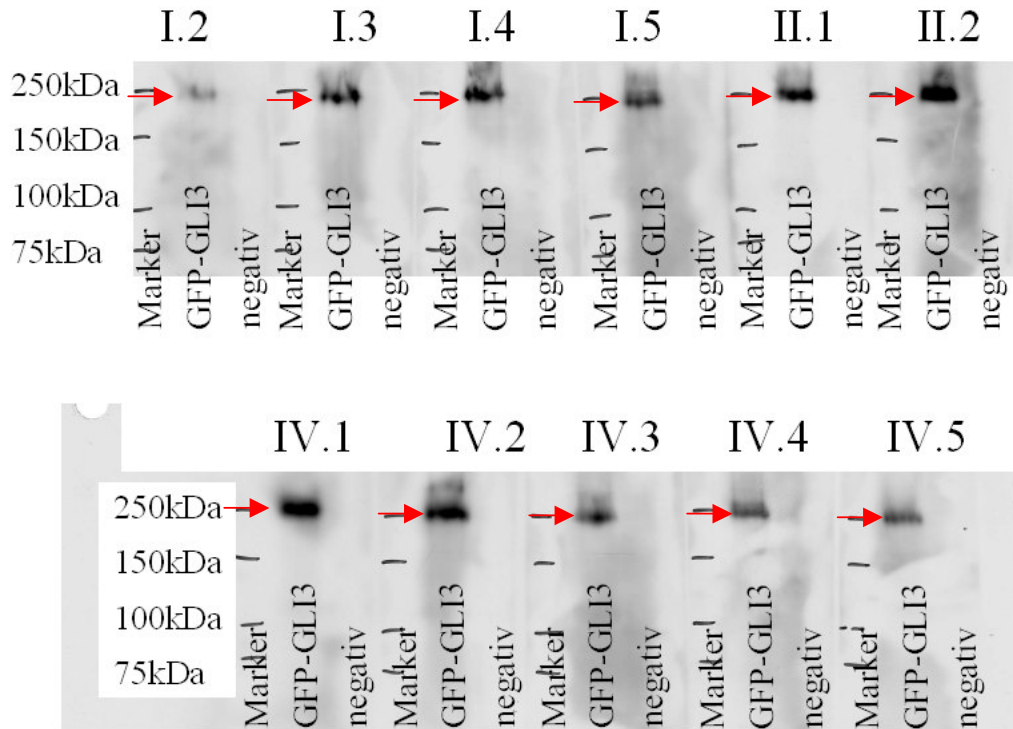


Abb.8.3: Detektion der Blots aus Abb.8.2 mit einem anti-GFP-Antikörper. Die Pfeile zeigen die GFP-GLI3-Bande.

Um zu überprüfen, ob der hier hergestellte GLI3-Antikörper endogenes GLI3 detektieren kann, wurden Kern- bzw. Cytosolfractionen aus den Extremitäten-Anlagen von Mäuse-Embryonen (E11,5) mittels Westernblot (siehe Methoden) analysiert. Dieses Gewebe wurde ausgewählt, da bereits bekannt war, dass GLI3 in diesem Stadium in den Extremitäten-Anlagen hoch exprimiert wird. Jeweils 100µg Protein wurden auf einem 6%igen SDS-Gel aufgetrennt und mittels Westernblot analysiert. Mit dem GLI3-Antikörper aus der Fraktion IV.3 konnten in der Kernfraktion eine 170kDa-Bande detektiert werden, die dem ungespaltenen GLI3-Protein entspricht und eine 75kDa-Bande, die der gespaltenen Repressorform von GLI3 entspricht. Beide Banden konnten durch Präinkubation des Antikörpers mit dem GLI3-Peptid (Aminosäure 1-121) geblockt werden (Abb.8.4). In der Cytosolfraktion konnten 3 Banden (170kDa, 100kDa, 75kDa) detektiert werden, die auch durch Präinkubation des Antikörpers mit dem GLI3-Peptid (Aminosäure 1-121) geblockt werden konnten, was die Spezifität der detektierten Banden beweist. Dies zeigt, dass hier ein GLI3-spezifischer Antikörper hergestellt wurde, der endogenes GLI3 detektieren kann. Da in diesen Extremitäten-Anlagen von Mäuse-Embryonen (E11,5) - nicht aber in HeLa-Zellen - endogenes GLI3 detektierbar war, wäre es für weitere Experimente nötig, eine Zelllinie auszuwählen, in der eine ausreichende Menge an GLI3-Protein synthetisiert wird.

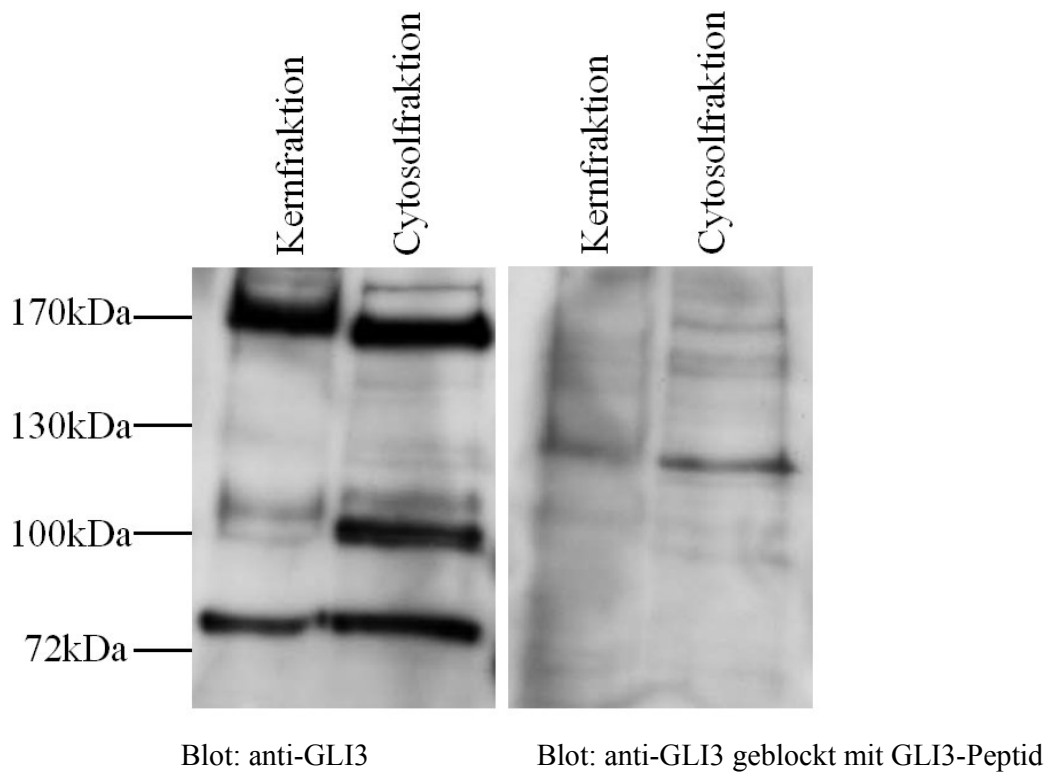


Abb.8.4: Westernblot-Analyse von Kern- (jeweils linke Spur) bzw. Cytosolfractionen (jeweils rechte Spur) aus Extremitäten-Anlagen von Mäuse-Embryonen (E11,5). Links: Der Blot wurde mit anti-GLI3-Antikörpern [Fraktion IV.3 aus der Affinitätsreinigung (Abb.8.1-8.2)] inkubiert. Rechts: Der Blot wurde mit anti-GLI3-Antikörper (Fraktion IV.3) nach Präinkubation des Antikörpers mit dem GLI3-Peptid (Aminosäure 1-121) zum Blocken der GLI3-spezifischen Banden inkubiert.

DISKUSSION

In der vorliegenden Arbeit wurde nach Zielproteinen der Mikrotubulus-assoziierten PP2A gesucht. Anhand überlappender Phänotypen von Patienten mit OS, bei denen die Aktivität der Mikrotubulus-assoziierten PP2A aufgrund von Mutationen im MID1-Protein missreguliert ist, und Patienten mit Mutationen in Bestandteilen der SHH-Signaltransduktionskaskade, wurde der Transkriptionsfaktor GLI3 als Kandidat für eine mögliche Interaktion mit der Mikrotubulus-assoziierten PP2A untersucht. Es konnte gezeigt werden, dass die intrazelluläre Lokalisation des Transkriptionsfaktors GLI3 über die gegensätzlichen Aktivitäten von GSK3 β und der Mikrotubulus-assoziierten PP2A reguliert wird. Die Lokalisationsänderung von GLI3 geht dabei mit einer Veränderung des Phosphorylierungsstatus von Fu – einem cytosolischen Interaktionspartner von GLI3 – einher.

1. Die intrazelluläre Lokalisation von GLI3 hängt von der Integrität der Mikrotubuli ab

Während in *Drosophila* eine Mikrotubulus-Assoziation des Proteinkomplexes, bestehend aus Ci, Fu, SuFu und Cos2, bereits beschrieben wurde [zusammengefasst in Murone et al. (1999)], gab es bislang noch keinen Beweis für eine Mikrotubulus-Assoziation der homologen Proteine im Säugetierorganismus. In dieser Arbeit konnte eine partielle, transiente Assoziation von GLI3 an Mikrotubuli sowie eine partielle, transiente Kolo-kalisation von GLI3 und dem Mikrotubulus-assoziierten MID1-Protein in HeLa-Zellen gezeigt werden. Dies deutet - wenigstens teilweise - auf eine Analogie zu den in *Drosophila* gezeigten Mechanismen hin.

In Bezug auf die intrazelluläre Lokalisation der 3 GLI-Proteine werden in der Literatur gegensätzliche Ergebnisse beschrieben. Während GLI1 in humanen Tumorzelllinien sowohl im Cytosol als auch im Zellkern vorliegt, wurde es in Tera-1 und D259MG-Zellen überwiegend im Zellkern und in Basalzellcarzinom-Zellen größtenteils im Cytosol nachgewiesen [zusammengefasst in Villavicencio et al. (2000)]. Die intrazelluläre Lokalisation von GLI3 wurde ebenfalls von verschiedenen Forschungsgruppen unterschiedlich beschrieben (Lee et al., 1997; Ruiz i Altaba, 1999b; Shin et al., 1999).

Weiterhin fanden Ruiz i Altaba (1999b), dass identische GLI-Konstrukte in Cos und 10T1/2-Zelllinien jeweils unterschiedliche Lokalisationen aufweisen. Mit diesen Studien wurde also auf eine Zelllinien-abhängige Lokalisation der GLI-Proteine hingewiesen.

In der vorliegenden Arbeit konnte durch Colcemid-Behandlung und Kälteschock-Experimente in HeLa-Zellen gezeigt werden, dass die intrazelluläre GLI3 Lokalisation von der Integrität der Mikrotubuli abhängt. Die Stabilität der Mikrotubuli wiederum ist von den Kulturbedingungen und der Fixierungsmethode abhängig. Diese Beobachtung könnte neben der gezeigten Gewebsspezifität ein weiterer Grund für die stark variierenden Ergebnisse in den bisher veröffentlichten Studien sein.

2. Die intrazelluläre Lokalisation von GLI3 – nicht aber die von GLI1 und GLI2 – wird über GSK3 β und PP2A reguliert

In der vorliegenden Arbeit konnte eine antagonistische regulatorische Aktivität von GSK3 β , einer Serin / Threonin-Kinase, und PP2A, einer Serin / Threonin-Phosphatase, auf die intrazelluläre Lokalisation von GLI3 gezeigt werden. Hierbei wurde mit verschiedenen Ansätzen, durch die die Aktivität der Mikrotubulus-assoziierten PP2A erhöht wurde [wie zum Beispiel Ko-Expression der B-Box1 des MID1-Proteins, „Knockdown“ des α 4-Proteins oder der Zusatz von Rapamycin (induziert PP2A-Aktivität)], eine Anreicherung von GLI3 im Cytosol gezeigt. Durch Verringerung der Aktivität der Mikrotubulus-assoziierten PP2A (zum Beispiel durch Überexpression des α 4-Proteins) wurde der gegenteilige Effekt, eine nukleäre Akkumulation von GLI3, erreicht.

Die Aktivität der GSK3 β wirkt hierbei der PP2A-Aktivität entgegen. So führte sowohl die Inhibition der GSK3 β durch LiCl, als auch deren „Knockdown“ zur Anreicherung des GLI3 im Cytosol. In zahlreichen verschiedenen Experimenten wurde ermittelt, dass durch die gegensätzlichen Aktivitäten der beiden Enzyme neben der intrazellulären Lokalisation von GLI3 auch der Phosphorylierungsstatus von Fu reguliert wird. Sowohl in einem in-vivo Orthophosphat-Markierungs-Experiment als auch durch in-vitro-Phosphorylierungsstudien wurden zwei phosphorylierte Isoformen von Fu gefunden. Der Phosphorylierungsschritt, der die beiden Isoformen unterscheidet, wird durch die antagonistischen Aktivitäten Mikrotubulus-assoziiierter PP2A und GSK3 β reguliert. Dies wurde sowohl durch GSK3 β - bzw. α 4-„Knockdown“ als auch durch Ko-Expression der B-Box1 des MID1-Proteins oder

des $\alpha 4$ -Proteins belegt. Ferner wurde durch Ko-Immunpräzipitationen gezeigt, dass die Phosphorylierung von Fu durch GSK3 β notwendig ist, um eine Interaktion mit dem cytosolischen GLI3 zu ermöglichen. Diese Interaktion zwischen Fu und GLI3 erscheint nach den in der vorliegenden Arbeit erzielten Ergebnissen notwendig, um GLI3 im Zellkern anzureichern. Die Mikrotubulus-assoziierte PP2A wirkt hierbei der Aktivität der GSK3 β entgegen.

In der vorliegenden Arbeit wurde gezeigt, dass nur die intrazelluläre Lokalisation von GLI3, nicht aber die von GLI1 und GLI2, über die gegensätzlichen Aktivitäten von PP2A und GSK3 β reguliert wird. Die Regulation der drei GLI-Proteine erscheint wesentlich komplexer als die des Ci in *Drosophila*. So wurden eine Reihe unterschiedlicher Regulationsmechanismen für die einzelnen GLI-Proteine beschrieben:

a) Funktion als Transkriptionsaktivator und / oder –repressor

Während für GLI1 bislang nur eine Funktion als Transkriptionsaktivator beschrieben wurde, können GLI2 und GLI3 sowohl als Transkriptionsaktivatoren als auch als Transkriptionsrepressoren fungieren (Sasaki et al., 1999).

b) Regulation der GLI-Proteine durch SHH:

In Bezug auf die Expression der GLI-Proteine hat SHH auf GLI1 eine positive, auf GLI2 keine signifikante und auf GLI3 eine negative Wirkung (Sasaki et al., 1999).

Auch die Regulation der intrazellulären Lokalisation der GLI-Proteine durch SHH verläuft unterschiedlich: während SHH keinen Einfluss auf die Lokalisation von GLI1 und GLI2 hat, wurde eine Anhäufung von GLI3 im Zellkern nach Stimulation mit SHH beobachtet (Aza-Blanc et al., 2000).

c) PKA-abhängige Spaltung:

In Bezug auf eine PKA-abhängige Phosphorylierung und anschließende proteolytische Spaltung der drei GLI-Proteine wurden in verschiedenen Studien unterschiedliche Ergebnisse erzielt. Während Altaba et al. (1999b) eine PKA-abhängige Spaltung nur für GLI3 nicht aber für GLI1 und GLI2 fanden, beschrieben Wang et al. (2000) PKA-Phosphorylierungs-Stellen sowohl in GLI2 als auch GLI3. Aza-Blanc et al. (2000) beschrieben auch eine antagonistische Funktion von PKA auf die GLI1-Aktivität, allerdings ohne proteolytische Spaltung von GLI1. Ferner wurden in derselben Studie für GLI2 und GLI3 proteolytische Spaltungen nachgewiesen, wobei jedoch nur die Spaltung von GLI3 durch Stimulation mit SHH inhibiert werden konnte.

d) Während alle GLI-Proteine an ähnliche Motive in der Promotorregion ihrer Zielgene binden, haben sie doch sehr distinkte Rollen während der Embryogenese. So wurde zum

Beispiel gezeigt, dass durch ektope Injektion von GLI2 oder GLI3 in Gewebe, in denen normalerweise GLI1 die Transkription von HNF3 β induziert, ein gegenteiliger Effekt, nämlich eine Repression der HNF3 β -Transkription erreicht wurde (Ruiz i Altaba, 1998). Außerdem wurden für vertebrate Transgene von GLI1 und GLI2, die in *Drosophila*-Flügeln exprimiert wurden, Aktivitäten auf unterschiedliche Zielgene gemessen: So induzierte GLI1 dort die *ptc*-Expression, während GLI2 die *dpp*-Expression in Antwort auf das Hh-Signal aktivierte. Weiterhin wurde hier eine reprimierende Funktion von GLI2 auf Hh nachgewiesen (Aza-Blanc et al., 2000). Darüber hinaus wurden auch teilweise überlappende Funktionen für GLI2 und GLI3 beschrieben: So haben GLI2 und GLI3 induzierende Wirkung auf die Entwicklung ventraler Zellen in Mäuseembryonen in der Brustebene, die sich gegenseitig ersetzen können, während in der Rumpfebene nur GLI2 die Spezifizierung der Zellen induzieren kann (Motoyama et al., 2003). Daraus folgt, dass die Aktivität der GLI-Proteine lokal und temporal spezifisch reguliert wird.

e) Bindung an Interaktionspartner:

Ein bekannter Interaktionspartner der GLI-Proteine ist das CREB binding protein (CBP). Während für GLI2 und GLI3 die Bindung an das CBP-Protein nachgewiesen wurde, interagiert GLI1 nicht mit CBP (Akimaru et al., 1997; Dai et al., 1999). Zwei weitere bekannte Interaktionspartner der GLI-Proteine sind Fu und SuFu. In Ko-Immunitäzpräzipitationsexperimenten konnte die Bindung aller drei GLI-Proteine an SuFu nachgewiesen werden (Ding et al., 1999; Pearse et al., 1999). Hierbei konnte für GLI1 gezeigt werden, dass SuFu dessen Aktivität als Transkriptionsaktivator entgegenwirkt (Kogerman et al., 1999; Merchant et al., 2004; Pearse et al., 1999; Ruiz i Altaba, 1999b; Stone et al., 1999). Die Interaktion von Fu mit GLI1, GLI2 und GLI3 wurde von Murone et al. (2000) beschrieben. Auch Aza-Blanc et al. (2000) wiesen die Interaktion von Fu mit GLI1 nach. Hieraus wird ersichtlich, dass ein komplexer Regulationsmechanismus für die jeweilige Aktivierung spezifischer GLI-Proteine existiert. Die in dieser Arbeit erzielten Ergebnisse zeigen eine weitere Möglichkeit der spezifischen Regulation von GLI3 über den MID1 / α 4 / PP2A-Komplex und GSK3 β .

3. Die Regulation der intrazellulären Lokalisation von GLI3 ist PKA- und Spaltungs-unabhängig

In der vorliegenden Arbeit wurden in zahlreichen Immunfluoreszenz-Experimenten mit N-terminal und C-terminal markierten GLI3-Konstrukten vergleichbare Ergebnisse erzielt. Ferner konnten mittels Westernblot-Analysen nur Banden nachgewiesen werden, die zur Größe der ungespaltenen Form des GLI3 korrespondieren. Weiterhin wurden hier keine Effekte auf die intrazelluläre Lokalisation des GLI3 durch Inhibierung bzw. Induktion der PKA beobachtet. Die PKA-induzierte proteolytische Spaltung führt ja zu einer Verlagerung des N-terminalen Repressorpeptids in den Zellkern (Ruiz i Altaba, 1999b). Demnach scheint die proteolytische Spaltung des GLI3 in seine Repressorform in den hier betrachteten Zellsystemen keine Rolle zu spielen. Vielmehr sind die beschriebenen Daten ein erster Hinweis darauf, dass die hier identifizierten Interaktionen möglicherweise bei der Reifung des ungespaltenen GLI3-Proteins in einen Transkriptionsaktivator eine Rolle spielen könnten. Nach dem Modell der SHH-Signaltransduktionskaskade wird die Aktivator-Form der GLI-Proteine durch das SHH-Signal induziert. SHH hat auf das GLI3-Protein zwei verschiedene Wirkungen (Ruiz i Altaba, 1999b):

a) Posttranslational:

Das SHH-Signal führt zur Umwandlung der reprimierenden Aktivität von GLI3 zu einer aktivierenden Funktion (Dai et al., 1999; Litingtung und Chiang, 2000; Shin et al., 1999). Dies geschieht durch Hemmung der proteolytischen Spaltung des GLI3 in seine Repressorform und der gleichzeitigen Induktion einer Umwandlung des ungespaltenen GLI3 in einen Transkriptionsaktivator. Die genauen molekularen Vorgänge bei dieser Umwandlung sind bislang noch unklar.

b) Transkriptionell:

SHH unterdrückt die Expression des GLI3-Gens (Ruiz i Altaba, 1998; Ruiz i Altaba, 1999b).

In der vorliegenden Arbeit wurden konstitutiv überexprimierte GLI3-Konstrukte eingesetzt, so dass eine transkriptionelle Regulation von GLI3 über SHH in dem hier verwendeten System keine Rolle spielt. Ferner wurde keine proteolytische Spaltung des GLI3 beobachtet. So bleibt noch die Möglichkeit, dass die in der vorliegenden Arbeit gezeigten Interaktionen

bei posttranslationalen Modifikationen des GLI3 zur Umwandlung in einen Transkriptionsaktivator wichtig sind. Interessanterweise wurden die hier benutzten Zelllinien nicht mit SHH induziert, so dass nach dem gängigen Modell keine Umwandlung in die Aktivatorform vorliegen sollte. Dies weist entweder auf eine Auto-Aktivität der SHH-Signaltransduktionskaskade in den benutzten Zelllinien, oder auf einen SHH-unabhängigen Mechanismus hin. Eine solche SHH-unabhängige Induktion der GLI-Proteine wurde bereits von Lee et al. (1997) gezeigt, die fanden, dass GLI1 und GLI3 auch in Geweben exprimiert werden, in denen kein SHH vorliegt. Außerdem machte auch Ruiz i Altaba (1999b) die Beobachtung, dass transfizierte GLI-Proteine zwar in COS-Zellen proteolytisch gespalten werden, nicht aber in 10T1/2-Zellen. Auch hier spekulieren die Autoren entweder über eine Auto-Aktivität des SHH-Signalwegs oder eine SHH-unabhängige Regulation der GLI-Proteine in 10T1/2-Zellen.

4. Nicht alle Zellen reagieren in gleicher Weise auf die durchgeführten Behandlungen

Durch die in dieser Arbeit durchgeführten verschiedenen Behandlungen, die zur Veränderung der Aktivitäten von PP2A bzw. GSK3 β führten, wurden die Lokalisationsänderungen des GLI3 nur in einem Teil der analysierten Zellen verursacht. Ähnliche Beobachtungen machte auch Ruiz i Altaba (1999b). Hier lagen in COS-Zellen transfizierte GLI-Proteine in manchen Zellen nucleär vor, während diese in anderen Zellen cytosolisch lokalisiert waren. Die Autoren stellten die Hypothese auf, dass nicht alle Zellen GLI-Proteine prozessieren können. Eine weitere Möglichkeit, ausbleibende Effekte in Zellen, die Proteine überexprimieren, zu erklären, ist, dass die in der Zelle endogen vorliegenden, zum Prozessieren notwendigen Interaktionspartner nicht in ausreichender Menge für die Interaktion mit dem überexprimierten Protein vorliegen („Sättigungseffekt“). Ein solcher Sättigungseffekt würde nur in den Zellen zum Tragen kommen, in denen besonders viel Protein exprimiert ist. Abgesehen davon könnte aber auch ein bislang noch nicht identifizierter Faktor beteiligt sein, der die hier gezeigten Regulationen begünstigt oder unterdrückt. Dies könnten zum Beispiel Zellzyklus-abhängige Bedingungen sein. Zur Analyse möglicher Zellzyklus-abhängiger Faktoren sollten Experimente mit synchronisierten Zellkulturen erfolgen.

5. MID1-Überexpression und Behandlungen mit „ocadaic acid“ haben keinen Einfluss auf die intrazelluläre Lokalisation von GLI3

In der vorliegenden Arbeit wurde gezeigt, dass die intrazelluläre Lokalisation von GLI3 über die Aktivität der Mikrotubulus-assoziierten PP2A reguliert wird. Drei Experimente, die zu diesem Ergebnis führten, waren die Kotransfektion von GFP-GLI3 mit der B-Box1 des MID1-Protein, dem $\alpha 4$ -Proteins sowie mit $\alpha 4$ -spezifischen siRNAs. Durch eine Anreicherung von $\alpha 4$ in der Zelle durch dessen Überexpression kann viel MID1 an die katalytische Untereinheit der PP2A binden und deren Abbau vermitteln. Das führt [nach Trockenbacher et al. (2001)] zu einer Reduktion der Mikrotubulus-assoziierten PP2A und folglich zur Hyperphosphorylierung ihrer Mikrotubulus-assoziierten Zielproteine. Wird die endogene Menge des $\alpha 4$ -Proteins durch „Knockdown“ verringert, kann MID1 seine Ubiquitinligase-Funktion auf PP2A nicht mehr ausüben. Dies führt zur Akkumulation von Mikrotubulus-assoziiierter PP2A und folglich zur Hypophosphorylierung ihrer Zielproteine. Die Überexpression der isolierten B-Box1-Domäne des MID1-Proteins erzeugt einen dominant negativen Effekt bezüglich der MID1-Funktion, wodurch die Aktivität der Mikrotubulus-assoziierten PP2A ebenfalls erhöht wird [nach Trockenbacher et al. (2001)]: Die isolierte B-Box1 bindet das $\alpha 4$ -Protein mit einer höheren Affinität als das MID1-Protein (Winter et al, 2004). Die überexprimierte B-Box1 wird somit das in der Zelle vorhandene, endogene $\alpha 4$ -Protein binden, und folglich dessen Bindung an MID1 stören. Dadurch kann MID1 seine Ubiquitinligase-Aktivität auf PP2A nicht mehr ausüben und deren Abbau wird verhindert. Zusammenfassend konnte aus den Experimenten der Koexpressionen von GLI3 und $\alpha 4$ bzw. GLI3 und der B-Box1 sowie der Kotransfektion $\alpha 4$ -spezifischer siRNAs mit GLI3 der Schluss gezogen werden, dass eine erhöhte PP2A-Aktivität zur Akkumulation des GLI3 im Cytosol führt, während eine verringerte PP2A-Aktivität zur Akkumulation des GLI3 im Nukleus führt. Nach diesen Ergebnissen und dem Modell nach Trockenbacher et al. (2001) wäre auch bei der Koexpression von MID1 und GLI3 eine Akkumulation des GLI3 im Zellkern zu erwarten. In der vorliegenden Arbeit wurde jedoch kein Einfluss von MID1-Überexpression auf die intrazelluläre Lokalisation des GLI3 gefunden. Vermutlich liegt der Grund hierfür darin, dass die endogene Menge des $\alpha 4$ -Proteins nicht ausreicht, um nach Überexpression alle MID1-Moleküle an die katalytische Untereinheit der PP2A zu binden. Somit kann das überexprimierte MID1 nicht als Ubiquitinligase aktiv werden. Dies führt zu einem Gleichbeiben des PP2A-Abbaus und die PP2A-Aktivität und die Lokalisation des GLI3

ändern sich nicht. Die Menge des $\alpha 4$ -Proteins in den benutzten Zellen scheint somit der limitierende Faktor für den Ubiquitin-spezifischen Abbau von Mikrotubulus-assoziiierter PP2A zu sein.

Weiterhin wurde in der vorliegenden Arbeit untersucht, ob durch Behandlung mit den PP2A-Inhibitoren „ocadaic acid“ und Fostriecin eine Veränderung der intrazellulären Lokalisation des GLI3 bewirkt wird, was durch die oben geschilderten Ergebnisse zunächst zu erwarten wäre. Diese Behandlungen führten jedoch nur zu einer leichten, statistisch nicht signifikanten Akkumulation des GLI3 im Zellkern. Bei Überexpression oder „Knockdown“ von $\alpha 4$ verändert sich die Menge der $\alpha 4$ -Moleküle in der Zelle verändert. Da die regulatorischen Untereinheiten, $\alpha 4$ bzw. A und B, um die Bindung an die katalytische C-Untereinheit der PP2A konkurrieren, verschiebt sich dadurch das Verhältnis der verschiedenen Heterotrimere zueinander. Während durch die Bindung an $\alpha 4$ der Abbau, also eine Limitierung der Aktivität der PP2Ac vermittelt wird, könnte durch Bindung der PP2Ac an andere A- und B-Untereinheiten eine Aktivierung an anderer Stelle verursacht werden. Eine solche Veränderung der Zusammensetzung der Heterotrimere könnte die Effekte auf die intrazelluläre Lokalisation des GLI3 verursachen. Im Gegensatz hierzu haben die PP2A-Inhibitoren „ocadaic acid“ und Fostriecin auf alle Heterotrimere die gleiche inhibierende Wirkung; es kommt also zu keinem Verschieben der Aktivitäten der verschiedenen Heterotrimere.

Das Ergebnis, dass der durch Überexpression der B-Box1 des MID1-Proteins erzielte Effekt auf die intrazelluläre Lokalisation des GLI3 durch Fostriecin-Behandlung aufgehoben werden konnte, lässt sich hierdurch ebenfalls erklären: Durch Überexpression der B-Box1 wird die Bindung des MID1 / $\alpha 4$ / PP2A-Komplexes gestört. Die aus dem Komplex verdrängten PP2Ac-Moleküle werden nun von anderen A- und B-Untereinheiten gebunden und üben somit andere Funktionen aus, wodurch der Effekt auf die intrazelluläre Lokalisation von GLI3 erzeugt wird. Die Behandlung mit Fostriecin führt zu Inhibition aller PP2A-Heterotrimere, unabhängig von den gebundenen Untereinheiten. Dadurch wird die veränderte PP2A-Aktivität, die zu den beobachteten Effekten geführt hat, aufgehoben.

6. Rapamycin-Behandlung führt zur Akkumulation des GLI3 im Cytosol

In der vorliegenden Arbeit wurde nach Behandlung mit Rapamycin eine Akkumulation von GLI3 im Cytosol beobachtet. Rapamycin induziert die Aktivität der PP2A durch Inhibition der TOR-Kinase. Im Hefesystem wurde gezeigt, dass durch Inhibierung der TOR-Kinase die Bindung des TAP42-Proteins, dem $\alpha 4$ -Homolog der Hefe, an die katalytische Untereinheit der PP2A gehemmt wird [zusammengefasst in Jacinto und Hall (2003)]. Da der in der vorliegenden Arbeit beschriebene Rapamycin-Effekt auf die intrazelluläre Lokalisation des GLI3 durch Koexpression des $\alpha 4$ -Proteins aufgehoben werden konnte, liegt die Vermutung nahe, dass im humanen System vergleichbare Interaktionen stattfinden. Demnach würde durch Rapamycin-Behandlung die Bindung des endogenen $\alpha 4$ -Proteins an die katalytische Untereinheit der PP2A gestört werden. Wird nun zusätzlich $\alpha 4$ -Protein überexprimiert, so spielt im Verhältnis zur endogenen Menge der TOR-Kinase die indirekte Wirkung des Rapamycins keine Rolle mehr, und der Rapamycin-Effekt wird aufgehoben. Interessanterweise konnte der Rapamycin-Effekt auch durch Koexpression des MID1-Proteins aufgehoben werden. Dieser Effekt zeigt, dass hier TOR-unabhängig die Aktivität der PP2A reguliert werden kann, die der PP2A-Induktion durch Rapamycin entgegen wirken kann.

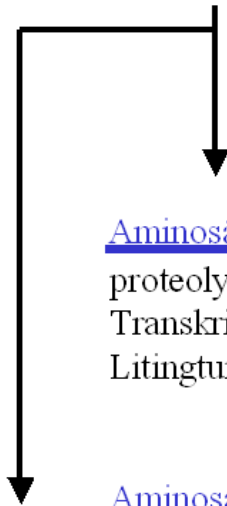
7. LiCl-Behandlung führt zur Reduktion der *PTCH1*-Expression

PTCH1 ist ein Zielgen der SHH-Signaltransduktionskaskade. Die Expression von *PTCH1* wird über den Transkriptionsfaktor GLI3 gesteuert (Chen et al., 2004; Litingtung und Chiang, 2000; Motoyama et al., 2003; Ruiz i Altaba, 1999b; Shin et al., 1999). In der vorliegenden Arbeit konnte demonstriert werden, dass die Behandlung mit dem GSK3 β -Inhibitor LiCl zur Reduktion der *PTCH1*-Expression führt. Dieser Effekt kann durch die in dieser Arbeit gefundenen Lokalisationsänderung des GLI3 nach LiCl-Behandlung erklärt werden. Die gefundene Repression der *PTCH1*-Transkription ist ein wichtiger Hinweis darauf, dass die in der vorliegenden Arbeit identifizierten, Phosphorylierungs-abhängigen Interaktionen zwischen Fu und GLI3 zur Umwandlung des GLI3 in einen Transkriptionsaktivator notwendig sind. Wie Sasaki et al. (1999) und Altaba et al. (1999b) unabhängig voneinander gezeigt haben, wirkt auch das ungespaltene, nicht weiter modifizierte GLI3 als Transkriptionsrepressor. Ein zusätzlicher Reifungsprozess, der das ungespaltene GLI3 in einen Transkriptionsaktivator umwandelt, scheint daher nötig. Eine Phosphorylierung des GLI3, wie sie in der vorliegenden Arbeit gefunden wurde, könnte eine zentrale Rolle in einem solchen Reifungsprozess spielen. In der Abb.7.1 ist ein hypothetisches Modell der Regulierung der Repressor- bzw. Aktivatoreigenschaften von GLI3 dargestellt.

GLI3-Protein

Aminosäure 1 1580

nicht modifiziertes GLI3-Protein wirkt als
Transkriptionsrepressor (Sasaki et al., 1999, Altaba et al., 1999)



Aminosäure 1 ~700

proteolytische Spaltung des GLI3 in einen
Transkriptionsrepressor (Wang et al., 2000, Dai et al., 1999,
Litingtung&Chiang et al., 2000)

Aminosäure 1 1580

Reifung des GLI3 in einen Transkriptionsaktivator unter der
Phosphorylierungs-abhängigen Interaktion zwischen Fu und
GLI3, die über PP2A und GSK3 β gesteuert wird

Abb.7.1: Schematische Darstellung der Repressor- bzw. Aktivator-Funktionen von GLI3. Während das ungespaltene, nicht modifizierte GLI3, sowie das proteolytisch gespaltene GLI3 Repressoreigenschaften haben, spielt die in der vorliegenden Arbeit identifizierte Phosphorylierungs-abhängige Interaktion zwischen GLI3 und Fu bei der Entstehung der Aktivator-Form des GLI3 eine Rolle.

8. Deletionskonstrukte

Anhand von Untersuchungen der intrazellulären Lokalisation zahlreicher GLI3-Deletionskonstrukte konnte der Bereich von GLI3, der für die Phosphorylierungs-abhängige Interaktion mit Fu benötigt wird, eingegrenzt werden. Deletionskonstrukte, die die Aminosäuren 18-1100 bzw. 586-1549 von GLI3 umfassen, zeigten vergleichbare Änderungen in der intrazellulären Lokalisation nach LiCl-Behandlungen wie das vollständige GLI3. Dies gibt einen Hinweis darauf, dass die Interaktionsdomäne zwischen Aminosäure 586 und 1100 liegen muss. Zur näheren Eingrenzung dieser Interaktionsdomäne müssten weitere Deletionskonstrukte analysiert werden.

Außerdem wurde aus der Analyse der Deletionskonstrukte ersichtlich, dass C-terminale Deletionen (Konstrukte, die die Aminosäuren 1-667, 18-667, 1-828, 18-828, 1-1100, 18-1100 umfassen) im Gegensatz zum vollständigen GLI3 zu verstärkter Akkumulation im Zellkern führen. Vergleichbare Ergebnisse erzielte auch Ruiz i Altaba (1999b), die die nukleäre Akkumulation von GLI3-Konstrukten, die die Aminosäuren 18-745 bzw. 18-700 enthielten, beobachteten. Vermutlich führt eine Deletion des C-Terminus dazu, dass sich das Deletionskonstrukt analog dem proteolytisch gespaltenen GLI3 verhält und somit im Zellkern akkumuliert. Dies stimmt mit den Experimenten von Wang et al. (2000) und Dai et al. (1999) überein, die die proteolytische Spaltstelle des GLI3 zwischen Aminosäure 650 und 750 eingrenzten. Eine weitere Beobachtung, die aus den in der vorliegenden Arbeit durchgeführten Analysen der GLI3-Deletionskonstrukte hervorgeht, ist, dass die Zink-Finger-Domänen des GLI3 offenbar für dessen Kernlokalisierung notwendig sind. Konstrukte, die keine Zink-Finger, oder nur einen Teil der Zink-Finger-Domäne enthielten, waren deutlich häufiger im Cytosol lokalisiert als Konstrukte mit der Zink-Finger-Domäne. Darüber hinaus ist die Zink-Finger-Domäne für die Bindung des GLI3 an DNA verantwortlich. Ist die Fähigkeit des GLI3 an DNA zu binden gestört, wird es offenbar entweder aus dem Zellkern ausgeschleust, oder erst gar nicht in den Zellkern transportiert. Eine Untersuchung der Transportmaschinerie, die für den Kern-Import oder gegebenenfalls den Kern-Export von GLI3 verantwortlich ist, wäre ein interessanter Ansatzpunkt für nachfolgende Studien.

9. PP2A / GSK3 β -abhängige Regulation von GLI3 – Implikation in die Entwicklung der ventralen Mittellinie

In der vorliegenden Arbeit konnte eine Interaktion des MID1 / α 4 / PP2A-Komplexes mit der SHH-Signaltransduktionskaskade gezeigt werden. Erste Hinweise auf eine solche Interaktion lieferten auch die Experimente von Granata und Quaderi (2003), die antagonistische Funktionen von MID1 und SHH bei der Entwicklung der Rechts-Links-Asymmetrie in Hühnerembryonen zeigten. Die teilweise überlappenden Phänotypen von Patienten mit OS bzw. Greig-, Acrocallosal- oder Pallister-Hall-Syndrom geben einen Hinweis darauf, dass die in dieser Arbeit beschriebenen Interaktionen während der Entwicklung der vorderen Mittellinie eine wichtige Rolle spielen. Die Entwicklung der vorderen Mittellinie des Menschen ist ein komplexer Vorgang. Viele entscheidende molekulare Mechanismen, die der Entwicklung der vorderen Mittellinie zu Grunde liegen, sind noch weitgehend unerforscht. Gemeinsame Prozesse, die bei der Entwicklung aller Strukturen der vorderen Mittellinie eine Rolle spielen, sind die Migration von Neuralleistenzellen, die epithelial-mesenchymale Transition (EMT) und der programmierte Zelltod (Schweiger und Schneider, 2003). Die Entwicklung des Neuralrohrs und die Migration der Neuralleistenzellen werden durch die Expression verschiedener Bestandteile der SHH-Signaltransduktionskaskade bestimmt. SHH wird hierbei auf der ventralen und GLI3 auf der dorsalen Seite des Neuralrohrs exprimiert [zusammengefasst in Ruiz i Altaba et al. (2003)]. MID1-Expression wurde vor allem in den auswandernden Neuralleistenzellen gefunden, die nach ventral wandern und dort die Entstehung der vorderen Mittellinie beeinflussen (Richman et al., 2002). Möglicherweise spielt die Interaktion zwischen dem MID1 / α 4 / PP2A-Komplex und GLI3 / Fu eine wichtige Rolle bei der Auswanderung der Neuralleistenzellen. Liegen Mutationen in GLI3 bzw. MID1 vor, die diese Interaktion stören, so ließen sich die an der vorderen Mittellinie überlappenden Phänotypen der Patienten mit OS bzw. Greig-, Acrocallosal- oder Pallister-Hall-Syndrom hierdurch erklären.

Außerdem wurde MID1-Expression in den aufeinander zuwachsenden Gesichtsfortsätzen beschrieben (Richman et al., 2002). Mutationen in MID1 oder GLI3, die die Interaktion zwischen dem MID1 / α 4 / PP2A-Komplex und GLI3 / Fu stören, könnten bei der Gesichtsentwicklung Defekte hervorrufen, die sich dann bei Patienten mit OS, Greig- und Acrocallosal-Syndrom als Hypertelorismus oder Lippen-Kiefer-Gaumenspalten äußern. Bei der Entstehung der vorderen Mittellinie könnte der Prozeß der epithelial-mesenchymalen

Transition (EMT) ebenfalls eine Rolle spielen, der zum Beispiel bei der Fusion der aufeinanderzuwachsenden Gesichtsfortsätze von großer Bedeutung ist. Dass MID1 bei der EMT eine wichtige Rolle spielt, wird auch durch Beobachtungen von Granata und Quaderi (2003) unterstützt, die zeigen, dass MID1 die Expression von *BMP4* induziert. Die Expression von *BMP4* induziert wiederum die EMT. Beobachtungen von Kuschel et al. (2003) zeigen, dass auch *GLI3* zur Induktion von BMP-Signalen wichtig ist. Hier wurde in *GLI3*-Mutanten gezeigt, dass diese keine BMP/Wnt-Expression aufweisen. Zusammengefasst legen diese verschiedenen Beobachtungen und die in dieser Arbeit erzielten Ergebnisse die Hypothese nahe, dass durch die Interaktion zwischen dem MID1 / $\alpha 4$ / PP2A-Komplex und *GLI3* / Fu auf der dorsalen Seite des Neuralrohrs eine SHH-unabhängige Modifizierung von *GLI3* in einen Transkriptionsaktivator erfolgt, der dann die *BMP4*-Expression induzieren kann. Hierdurch werden Prozesse wie das Auswandern der Neuralleistenzellen oder die EMT reguliert. Ferner spielt die *GLI3*-Repressorform, die nach Spaltung des *GLI3* entsteht, eine Rolle beim Aufbau eines SHH-Gradienten auf der ventralen Seite des Neuralrohrs. *GLI3* ist somit wichtig, um die gegenüberliegenden Zentren von SHH-Signalen bzw. BMP/Wnt-Signalen zu etablieren (Abb.9.1).

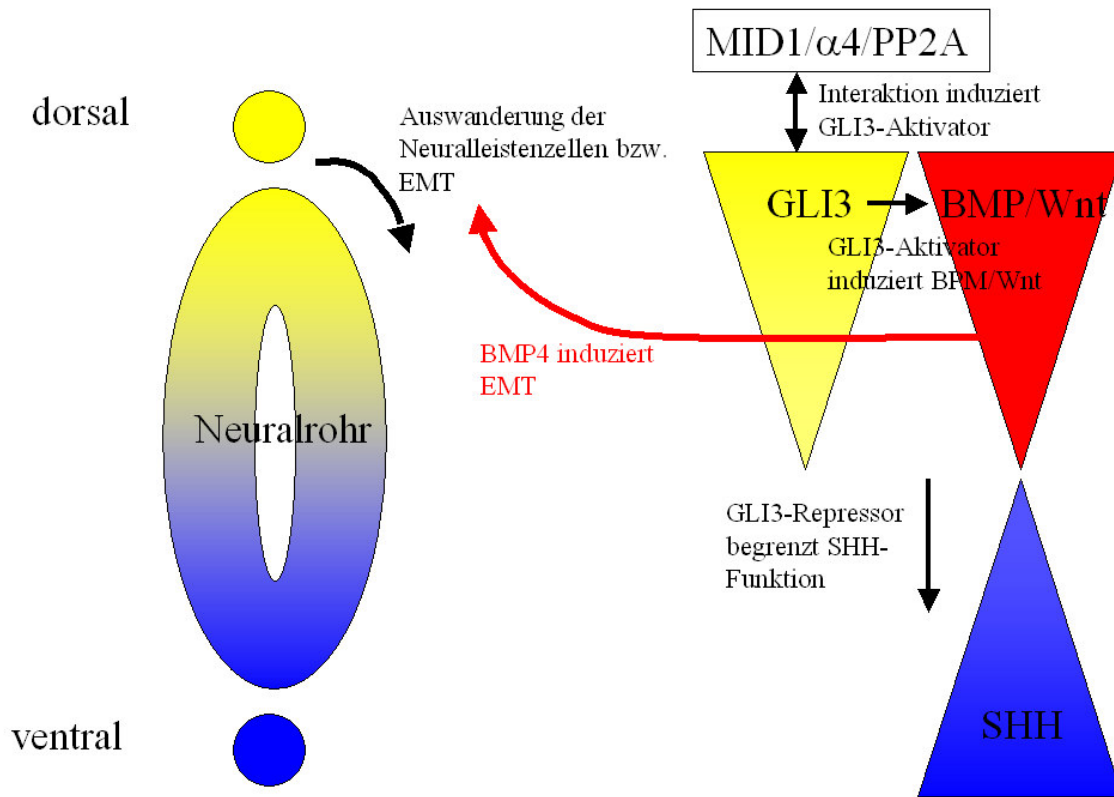


Abb.9.1: Hypothetisches Modell der Funktionen des MID1 / α4 / PP2A-Komplex und GLI3 während der Embryonalentwicklung.

10. Der MID1 / α 4 / PP2A-Komplex und die Interaktion mit GLI3 / Fu – Treffpunkt vieler Signaltransduktionkaskaden

In der vorliegenden Arbeit wurde eine Interaktion zwischen dem MID1 / α 4 / PP2A-Komplex bzw. GSK3 β und GLI3 und Fu beschrieben, die offenbar der Modifizierung des ungespaltenen GLI3 in einen Transkriptionsaktivator dient. Dies stellt eine SHH-unabhängige spezifische Regulation des GLI3, nicht aber des GLI1 oder GLI2, dar. Neben der SHH-gesteuerten Regulation der drei GLI-Proteine wurden in der Literatur auch alternative, SHH-unabhängige Regulationsmechanismen beschrieben:

- 1.) GLI2 und GLI3 können über FGF-Signale reguliert werden (Brewster et al., 2000);
- 2.) GLI3 wird über BMP-Signale reguliert (Meyer und Roelink, 2003);
- 3.) GLI2 und GLI3 können über die Wnt-Signaltransduktionskaskade gesteuert werden (Borycki et al., 2000);
- 4.) Bei der Entwicklung der Extremitätenanlagen kann durch Interaktion des GLI3-Repressors mit HoxD12 eine GLI3-Aktivatorform erzeugt werden (Chen et al., 2004).

Diese SHH-unabhängigen Regulationsmechanismen der GLI-Proteine haben teilweise gegenläufige Wirkungen (wie sie auch für SHH und GLI3 beschrieben wurden). So kann GLI3 beispielsweise nicht nur über die Wnt-Signaltransduktionskaskade gesteuert werden (Borycki et al., 2000), sondern hat auch die Fähigkeit, die Expression von Wnt8 und Wnt11 zu regulieren (Mullor et al., 2001).

Neben den in der vorliegenden Arbeit gezeigten Funktionen der PP2A und GSK3 β spielen diese beiden Enzyme auch eine wichtige Rolle im Wnt-Signaltransduktionsweg. Hier phosphoryliert GSK3 β β -catenin. Dadurch wird die ubiquitinvermittelte Degradierung von β -catenin über das Protein Slimb eingeleitet. PP2A wirkt diesem Effekt entgegen und stabilisiert somit β -catenin (Wodarz und Nusse, 1998). In der vorliegenden Arbeit konnte durch β -catenin-„Knockdown“-Experimente gezeigt werden, dass die hier beobachteten regulatorischen Aktivitäten von PP2A und GSK3 β auf die intrazelluläre Lokalisation von GLI3 β -catenin- und somit Wnt-unabhängig sind. Somit wurde hier eine neue Funktion für die beiden Enzyme identifiziert. Für die Wnt-Signaltransduktionskaskade und die SHH-Signaltransduktionskaskade wurden während der Embryonalentwicklung gegensätzliche Rollen beschrieben (Kalderon, 2002). Dies stimmt mit den in dieser Arbeit beschriebenen

Aktivitäten der GSK3 β und der Mikrotubulus-assoziierten PP2A überein: Während GSK3 β durch die Phosphorylierung von β -catenin einen negativen regulatorischen Effekt auf die Wnt-Signaltransduktionskaskade hat, reguliert sie über die Phosphorylierung von Fu die Akkumulation des ungespaltenen GLI3 im Zellkern und hat somit einen positiven Einfluß auf die Aktivierung der SHH-Zielgene. Im Gegensatz hierzu hat PP2A eine stabilisierende Wirkung auf β -catenin und somit einen positiven Einfluss auf die Transduktion des Wnt-Signals, während sie der Phosphorylierung von Fu und somit der Akkumulation des ungespaltenen, aktiven GLI3 im Zellkern entgegenwirkt.

Die in der vorliegenden Arbeit identifizierte Regulation von GLI3 und Fu über den MID1 / α 4 / PP2A-Komplex bzw. GSK3 β stellen zusätzlich zu den oben aufgeführten SHH-unabhängigen Regulationsmechanismen der drei GLI-Proteine stellt eine weitere Möglichkeit der spezifischen Regulation von GLI3 (unabhängig von SHH) dar.

Durch die unterschiedlichen Regulationswege der GLI-Proteine werden während der Embryonalentwicklung gewebsspezifische Expressionsmuster von GLI-Zielgenen induziert, und somit die Entwicklung verschiedener Gewebsstrukturen ermöglicht. Der in der vorliegenden Arbeit identifizierte Regulationsweg spielt wahrscheinlich bei der Entwicklung der Strukturen der vorderen Mittellinie eine Rolle. Funktionsverluste der beteiligten Proteinen, wie zum Beispiel MID1 oder GLI3, führen zu Defekten in diesen Strukturen (siehe Einleitung). GLI3-Mutationen können neben Fehlern bei der Entwicklung der vorderen Mittellinie auch Extremitäten-Fehlbildungen wie eine präaxiale oder postaxiale Polydaktylie verursachen. Interessanterweise wurden solche Fehlbildungen bei OS-Patienten mit MID1-Mutationen nicht beschrieben. Dies wäre dadurch zu erklären, dass bei Patienten mit GLI3-Mutationen alle in der Zelle vorhandenen GLI3-Moleküle fehlerhaft sind. Dadurch werden sowohl Mittellinien-Defekte als auch Extremitäten-Fehlbildungen verursacht. Bei MID1-Mutationen hingegen, würde nach den in der vorliegenden Arbeit erzielten Ergebnissen, wahrscheinlich die Reifung des GLI3-Proteins in einen Transkriptionsaktivator gestört; dies gilt jedoch nicht für alle in der Zelle vorliegenden GLI3-Moleküle. Möglicherweise ist auch eine geringe Menge an GLI3-Transkriptionsaktivator-Molekülen für die Entwicklung der Extremitäten ausreichend, während die Verringerung dieser Menge zu Mittellinien-Fehlbildungen führt. Eine weitere Möglichkeit, um die unterschiedlichen Phänotypen von Patienten mit MID1- bzw. GLI3-Mutationen zu erklären, wäre, dass GLI3 bei der Entwicklung der Extremitätenanlagen eine lokal-spezifische Funktion ausübt, die nicht über

die Interaktion mit dem MID1 / α 4 / PP2A-Komplex bzw. GSK3 β reguliert wird. In den Extremitätenanlagen könnte zum Beispiel die Interaktion mit HoxD12 für die gewebsspezifische Regulation von GLI3 verantwortlich sein.

11. Vergleich mit der Hh-Signaltransduktionskaskade in *Drosophila*

Die Hh-Signaltransduktionskaskade ist zwischen verschiedenen Spezies von *Drosophila* bis zum Menschen auffallend konserviert. Viele der an dem Signalweg beteiligten Proteine sind zwischen den Spezies homolog. Es gibt jedoch auch deutliche Unterschiede zwischen dem humanen SHH-Signalweg und der *Drosophila* Hh-Signaltransduktionskaskade:

So gibt es im Gegensatz zu *Drosophila* in Säugetieren drei Hh-Homologe: Sonic Hedgehog (SHH), Indian Hedgehog (IHH) und Desert Hedgehog (DHH) [zusammengefasst in Murone et al. (1999)].

Weiterhin gibt es in *Drosophila* nur einen Transkriptionsfaktor, Ci, während das SHH-Signal im Menschen drei GLI-Proteine, GLI1, GLI2 und GLI3, reguliert. Hierbei üben die einzelnen GLI-Proteine vermutlich jeweils Teilfunktionen der Ci-Funktionen aus. Die Existenz von drei GLI-Proteinen im Menschen im Gegensatz zu einem Ci in *Drosophila* könnte im Laufe der Evolution zum Beispiel durch Gen-Duplikationen und Fächerung der Funktionen der einzelnen Genprodukte entstanden sein. Das *Drosophila*-Genom zeichnet sich durch seine geringe Gen-Anzahl aus, die sogar niedriger ist als die von *C. elegans* (Rubin, 2000). Durch einen solchen Mechanismus ließe sich die höhere Komplexität der Säugetierzelle im Gegensatz zum kompakten Transkriptom bei *Drosophila* erklären.

Zusätzlich zur Anzahl der Transkriptionsfaktoren in der Hh-Signaltransduktionskaskade unterscheidet sich auch deren Regulation über das Hh-Signal zwischen *Drosophila* und Mensch: In Antwort auf das Hh-Signal in *Drosophila* wird die nukleäre Konzentration der Repressorform des Ci verringert, und die Spaltung von Ci in einen Transkriptionsrepressor inhibiert. Darüber hinaus erhöht das Hh-Signal sowohl die cytosolische als auch die nukleäre Konzentration des Ci-Aktivators (Aza-Blanc et al., 1997; Chen et al., 1999). Die Regulation von GLI3 über SHH unterscheidet sich hiervon deutlich: So reprimiert SHH zum einen die Expression von GLI3 und stimuliert zum anderen die Formierung des GLI3-Aktivators.

Ferner wurde in *Drosophila* beschrieben, dass zur proteolytischen Spaltung des Ci in einen Repressor Phosphorylierungsschritte durch die Kinasen CKI, GSK3 β und PKA notwendig sind (Price und Kalderon, 2002). In der vorliegenden Arbeit wurde ein Zusammenhang zwischen GSK3 β und GLI3 identifiziert, der bei der Bildung der Aktivatorform des GLI3

eine Rolle spielt. Dadurch wird der GSK3 β eine gegensätzliche Aktivität im Hh-Signalweg in *Drosophila* im Vergleich zum Menschen zugeordnet. In *Drosophila* führt eine Hyperphosphorylierung des bereits durch PKA phosphorylierten Ci durch CKI und GSK3 β zu einer Spaltung des Proteins und damit der Entstehung der Repressorform von Ci. Eine weitere Möglichkeit wäre auch eine duale Funktion der GSK3 β im Menschen: Einerseits könnte das Enzym bei der SHH-unabhängigen Modifikation des GLI3 in einen Transkriptionsaktivator aktiv sein, und andererseits auch die proteolytische Spaltung des GLI3 induzieren, wie es in *Drosophila* für Ci beschrieben wurde.

12. Modell

Anhand der in der vorliegenden Arbeit erzielten Ergebnisse wurde das folgende hypothetische Modell erstellt (Abb.12.1):

Durch die gegensätzlichen Aktivitäten der Mikrotubulus-assoziierten PP2A und der GSK3 β wird die Hyperphosphorylierung des Fu-Proteins reguliert. Die Existenz zweier phosphorylierter Isoformen wurde durch Orthophosphatmarkierung, sowie durch in-vitro Phosphatase-Behandlungen gezeigt. Die Abhängigkeit des Hyperphosphorylierungsschritts (Isoform 145kDa zu 150kDa) von den Aktivitäten der Mikrotubulus-assoziierten PP2A und GSK3 β wurde durch Überexpression der B-Box1 des MID1-Proteins, durch Überexpression bzw. „Knockdown“ des α 4-Proteins sowie durch LiCl-Behandlung (Inhibition der GSK3 β) und „Knockdown“ der GSK3 β bewiesen.

Die durch GSK3 β hyperphosphorylierte Isoform des Fu-Proteins interagiert mit dem ungespaltenen GLI3, wodurch dieses phosphoryliert wird und im Zellkern akkumuliert. Die Interaktion zwischen Fu und GLI3 wurde durch Ko-Immunpräzipitationen demonstriert und die Phosphorylierung von GLI3 durch in-vitro-Phosphatase-Behandlungen nahegelegt.

In *Drosophila* wurde dem Fu-Protein eine Kinase-Aktivität zugeschrieben (Nybakken et al., 2002). In Analogie dazu könnte in der Säugetierzelle die Fu-Kinase durch Hyperphosphorylierung aktiviert werden und dann die Phosphorylierung des GLI3 katalysieren. Um dies zu überprüfen sind weitere Experimente nötig. So würde zum Beispiel die in-vitro-Inkubation von aufgereinigtem Fu mit aufgereinigtem GLI3 unter Zusatz von radioaktiv markiertem ATP Auskunft über eine putative Kinase-Aktivität des Fu auf GLI3 geben.

Das nicht modifizierte ungespaltene GLI3 hat eine Repressorfunktion aufgrund der dominanten N-terminalen Repressor-Domäne. Durch die Phosphorylierung des ungespaltenen GLI3 könnte eine Umfaltung des Proteins stattfinden, bei der die Aktivierungsdomäne freigelegt wird. Dass in der vorliegenden Arbeit eine Aktivatorform des GLI3 analysiert wurde, konnte anhand von semiquantitativen RT-PCRs der mRNA des GLI3-Zielgens *PTCH1* gezeigt werden. Die Westernblot-Analyse von C- und N-terminal markierten Konstrukten, die sich im verwendeten System vergleichbar verhielten, ergab, dass eine proteolytische Spaltung des GLI3 auszuschliessen war.

Aus den in der Literatur beschriebenen, sowie den in der vorliegenden Arbeit erhobenen Daten, lässt sich ableiten, dass es drei verschiedene Formen des GLI3-Proteins geben muss:

- 1.) die ungespaltene nicht modifizierte Form, die als Transkriptionsrepressor wirken kann (Ruiz i Altaba, 1999b; Sasaki et al., 1999).
- 2.) die proteolytisch gespaltene C-terminal trunke Repressorform (Wang et al., 2000, Dai et al., 1999, Litingtung und Chiang, 2000),
- 3.) die modifizierte ungespaltenen Aktivatorform.

Im *Drosophila*-System wird in Abwesenheit von Hh Ci proteolytisch gespalten und in den Kern transportiert. Nicht gespaltenes in den Kern transportiertes Ci wird jedoch wieder aus dem Zellkern ausgeschleust. Erst nach den in Antwort auf das Hh-Signal erfolgenden Modifikationen des Ci in den ungespaltenen Transkriptionsaktivator wird das Verhältnis von Kern-Import und Export verschoben, so dass der Transkriptionsaktivator im Kern akkumulieren kann [zusammengefasst in Ruiz (1999)]. Beim Menschen scheint ein ähnlicher Regulationsmechanismus für GLI3 zu existieren. Somit würde nicht aktiviertes GLI3 proteolytisch gespalten und in den Kern transportiert werden (Repressorform), während ungespaltenes GLI3 (Repressorform), das in den Kern transportiert wurde, wieder aus dem Kern ausgeschleust werden würde. Durch die in dieser Arbeit beschriebenen Interaktionen könnte GLI3 aktiviert und modifiziert werden und folglich als Transkriptionsaktivator im Zellkern akkumulieren. Eine mögliche Inhibition des Kernexports von GLI3 wäre ein weiterer Ansatzpunkt für nachfolgende Studien.

Zusammenfassung

In der vorliegenden Arbeit sollten Ziel-Proteine der Mikrotubulus-assoziierten PP2A gefunden werden. Anhand phänotypischer Ähnlichkeiten zwischen OS- und Greig-, Acrocallosal- bzw. Pallister-Hall-Syndrom-Patienten wurde eine mögliche Interaktion zwischen dem MID1- α 4-PP2A-Komplex und GLI3, einem zentralen Transkriptionsfaktor der SHH-Signaltransduktionskaskade, postuliert. In einer Reihe von zellbiologischen und proteinbiochemischen Experimenten konnte gezeigt werden, dass sowohl die intrazelluläre Lokalisation des GLI3 als auch der Phosphorylierungsstatus von Fu, einem Interaktionspartner von GLI3, über den MID1- α 4-PP2A-Komplex und Mikrotubulus-assoziiierter PP2A-Aktivität reguliert werden. Erhöhte Aktivität der Mikrotubulus-assoziierten PP2A führt hierbei zur Dephosphorylierung von Fu und zu einer Akkumulation des GLI3 im Cytosol, während verringerte PP2A-Aktivität zu einer Anreicherung der hyperphosphorylierten Form des Fu und zur Akkumulation des GLI3 im Nukleus führt. Darüber hinaus konnte GSK3 β als die der Mikrotubulus-assoziierten PP2A entgegenwirkende Kinase identifiziert werden. Eine verringerte Aktivität der GSK3 β führt zur Dephosphorylierung von Fu und zu einer Akkumulation des GLI3 im Cytosol. Außerdem wurde in der vorliegenden Arbeit eine Interaktion zwischen GLI3 und der hyperphosphorylierten Form des Fu beschrieben. Die Hyperphosphorylierung von Fu wird über die gegenläufigen Aktivitäten der Mikrotubulus-assoziierten PP2A und GSK3 β reguliert. Durch die Interaktion des hyperphosphorylierten Fu mit cytosolischem, nicht phosphorylierten GLI3 wird dessen Phosphorylierung gesteuert. Phosphoryliertes GLI3 reichert sich im Zellkern an und die Transkription von SHH-Zielgenen wird induziert. Die in dieser Arbeit identifizierten Mechanismen sind ein möglicher zellbiologischer Hintergrund der Übereinstimmung in den klinischen Erscheinungsbildern von OS und Syndromen, die mit Genen der SHH-Signaltransduktionskaskade assoziiert sind.

Literaturverzeichnis

- Agren, M., P. Kogerman, M.I. Kleman, M. Wessling, and R. Toftgard. 2004. Expression of the PTCH1 tumor suppressor gene is regulated by alternative promoters and a single functional Gli-binding site. *Gene*. 330:101-14.
- Akimaru, H., Y. Chen, P. Dai, D.X. Hou, M. Nonaka, S.M. Smolik, S. Armstrong, R.H. Goodman, and S. Ishii. 1997. *Drosophila* CBP is a co-activator of cubitus interruptus in hedgehog signalling. *Nature*. 386:735-8.
- Aoto, K., T. Nishimura, K. Eto, and J. Motoyama. 2002. Mouse GLI3 regulates Fgf8 expression and apoptosis in the developing neural tube, face, and limb bud. *Dev Biol*. 251:320-32.
- Aza-Blanc, P., H.Y. Lin, A. Ruiz i Altaba, and T.B. Kornberg. 2000. Expression of the vertebrate Gli proteins in *Drosophila* reveals a distribution of activator and repressor activities. *Development*. 127:4293-301.
- Aza-Blanc, P., F.A. Ramirez-Weber, M.P. Laget, C. Schwartz, and T.B. Kornberg. 1997. Proteolysis that is inhibited by hedgehog targets Cubitus interruptus protein to the nucleus and converts it to a repressor. *Cell*. 89:1043-53.
- Bialojan, C., Takai, A. 1988. Inhibitory effect of a marine-sponge toxin, okadaic acid, on protein phosphatases. Specificity and kinetics. *Biochem J*. 1:283-90
- Borden, K.L., J.M. Lally, S.R. Martin, N.J. O'Reilly, E. Solomon, and P.S. Freemont. 1996. In vivo and in vitro characterization of the B1 and B2 zinc-binding domains from the acute promyelocytic leukemia protooncoprotein PML. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 93:1601-6.
- Bork, P., L. Holm, and C. Sander. 1994. The immunoglobulin fold. Structural classification, sequence patterns and common core. *J Mol Biol*. 242:309-20.
- Borycki, A., A.M. Brown, and C.P. Emerson, Jr. 2000. Shh and Wnt signaling pathways converge to control Gli gene activation in avian somites. *Development*. 127:2075-87.
- Brewster, R., J.L. Mullor, and A. Ruiz i Altaba. 2000. Gli2 functions in FGF signaling during antero-posterior patterning. *Development*. 127:4395-405.
- Cainarca, S., S. Messali, A. Ballabio, and G. Meroni. 1999. Functional characterization of the Opitz syndrome gene product (midin): evidence for

- homodimerization and association with microtubules throughout the cell cycle. *Hum Mol Genet.* 8:1387-96.
- Chapman, M.S., and I.M. Verma. 1996. Transcriptional activation by BRCA1. *Nature.* 382:678-9.
 - Chen, C.H., D.P. von Kessler, W. Park, B. Wang, Y. Ma, and P.A. Beachy. 1999. Nuclear trafficking of Cubitus interruptus in the transcriptional regulation of Hedgehog target gene expression. *Cell.* 98:305-16.
 - Chen, Y., V. Knezevic, V. Ervin, R. Hutson, Y. Ward, and S. Mackem. 2004. Direct interaction with Hoxd proteins reverses Gli3-repressor function to promote digit formation downstream of Shh. *Development.* 131:2339-47.
 - Cox, T.C. 2004. Taking it to the max: the genetic and developmental mechanisms coordinating midfacial morphogenesis and dysmorphology. *Clin Genet.* 65:163-76.
 - Cox, T.C., L.R. Allen, L.L. Cox, B. Hopwood, B. Goodwin, E. Haan, and G.K. Suthers. 2000. New mutations in MID1 provide support for loss of function as the cause of X-linked Opitz syndrome. *Hum Mol Genet.* 9:2553-62.
 - Dai, P., H. Akimaru, Y. Tanaka, T. Maekawa, M. Nakafuku, and S. Ishii. 1999. Sonic Hedgehog-induced activation of the Gli1 promoter is mediated by GLI3. *J Biol Chem.* 274:8143-52.
 - Debeer, P., H. Peeters, S. Driess, L. De Smet, K. Freese, G. Matthijs, D. Bornholdt, K. Devriendt, K.H. Grzeschik, J.P. Fryns, and M. Kalff-Suske. 2003. Variable phenotype in Greig cephalopolysyndactyly syndrome: clinical and radiological findings in 4 independent families and 3 sporadic cases with identified GLI3 mutations. *Am J Med Genet A.* 120:49-58.
 - Ding, Q., S. Fukami, X. Meng, Y. Nishizaki, X. Zhang, H. Sasaki, A. Dlugosz, M. Nakafuku, and C. Hui. 1999. Mouse suppressor of fused is a negative regulator of sonic hedgehog signaling and alters the subcellular distribution of Gli1. *Curr Biol.* 9:1119-22.
 - Eichberger, T., G. Regl, M.S. Ikram, G.W. Neill, M.P. Philpott, F. Aberger, and A.M. Frischauf. 2004. FOXE1, a new transcriptional target of GLI2 is expressed in human epidermis and basal cell carcinoma. *J Invest Dermatol.* 122:1180-7.
 - Elenbaas, B., M. Dobbstein, J. Roth, T. Shenk, and A.J. Levine. 1996. The MDM2 oncoprotein binds specifically to RNA through its RING finger domain. *Mol Med.* 2:439-51.

- Elson, E., R. Perveen, D. Donnai, S. Wall, and G.C. Black. 2002. De novo GLI3 mutation in acrocallosal syndrome: broadening the phenotypic spectrum of GLI3 defects and overlap with murine models. *J Med Genet.* 39:804-6.
- Ericson, J., S. Morton, A. Kawakami, H. Roelink, and T.M. Jessell. 1996. Two critical periods of Sonic Hedgehog signaling required for the specification of motor neuron identity. *Cell.* 87:661-73.
- Fukumoto, T., R. Watanabe-Fukunaga, K. Fujisawa, S. Nagata, and R. Fukunaga. 2001. The fused protein kinase regulates Hedgehog-stimulated transcriptional activation in *Drosophila* Schneider 2 cells. *J Biol Chem.* 276:38441-8.
- Gaudenz, K., E. Roessler, N. Quaderi, B. Franco, G. Feldman, D.L. Gasser, B. Wittwer, J. Horst, E. Montini, J.M. Opitz, A. Ballabio, and M. Muenke. 1998. Opitz G/BBB syndrome in Xp22: mutations in the MID1 gene cluster in the carboxy-terminal domain. *Am J Hum Genet.* 63:703-10.
- Granata, A., and N.A. Quaderi. 2003. The Opitz syndrome gene MID1 is essential for establishing asymmetric gene expression in Hensen's node. *Dev Biol.* 258:397-405.
- Gustafsson, M.K., H. Pan, D.F. Pinney, Y. Liu, A. Lewandowski, D.J. Epstein, and C.P. Emerson, Jr. 2002. Myf5 is a direct target of long-range Shh signaling and Gli regulation for muscle specification. *Genes Dev.* 16:114-26.
- Hargrave, M., A. Karunaratne, L. Cox, S. Wood, P. Koopman, and T. Yamada. 2000. The HMG box transcription factor gene Sox14 marks a novel subset of ventral interneurons and is regulated by sonic hedgehog. *Dev Biol.* 219:142-53.
- Hashizume, R., M. Fukuda, I. Maeda, H. Nishikawa, D. Oyake, Y. Yabuki, H. Ogata, and T. Ohta. 2001. The RING heterodimer BRCA1-BARD1 is a ubiquitin ligase inactivated by a breast cancer-derived mutation. *J Biol Chem.* 276:14537-40.
- Hayes, C., J.M. Brown, M.F. Lyon, and G.M. Morriss-Kay. 1998. Sonic hedgehog is not required for polarising activity in the Doublefoot mutant mouse limb bud. *Development.* 125:351-7.
- Honda, A., A.K. Batta, G. Salen, G.S. Tint, T.S. Chen, and S. Shefer. 1997. Screening for abnormal cholesterol biosynthesis in the Smith-Lemli-Opitz syndrome: rapid determination of plasma 7-dehydrocholesterol by ultraviolet spectrometry. *Am J Med Genet.* 68:288-93.
- Honda, R., and H. Yasuda. 2000. Activity of MDM2, a ubiquitin ligase, toward p53 or itself is dependent on the RING finger domain of the ligase. *Oncogene.* 19:1473-6.

- Ikram, M.S., G.W. Neill, G. Regl, T. Eichberger, A.M. Frischauf, F. Aberger, A. Quinn, and M. Philpott. 2004. GLI2 is expressed in normal human epidermis and BCC and induces GLI1 expression by binding to its promoter. *J Invest Dermatol.* 122:1503-9.
- Ingram, W.J., C.A. Wicking, S.M. Grimmond, A.R. Forrest, and B.J. Wainwright. 2002. Novel genes regulated by Sonic Hedgehog in pluripotent mesenchymal cells. *Oncogene.* 21:8196-205.
- Jacinto, E., and M.N. Hall. 2003. Tor signalling in bugs, brain and brawn. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 4:117-26.
- Jacob, J., and J. Briscoe. 2003. Gli proteins and the control of spinal-cord patterning. *EMBO Rep.* 4:761-5.
- Joazeiro, C.A., and A.M. Weissman. 2000. RING finger proteins: mediators of ubiquitin ligase activity. *Cell.* 102:549-52.
- Kalderon, D. 2002. Similarities between the Hedgehog and Wnt signaling pathways. *Trends Cell Biol.* 12:523-31.
- Kang, S., J.M. Graham, Jr., A.H. Olney, and L.G. Biesecker. 1997. GLI3 frameshift mutations cause autosomal dominant Pallister-Hall syndrome. *Nat Genet.* 15:266-8.
- Kawai, S., and T. Sugiura. 2001. Characterization of human bone morphogenetic protein (BMP)-4 and -7 gene promoters: activation of BMP promoters by Gli, a sonic hedgehog mediator. *Bone.* 29:54-61.
- Kogerman, P., T. Grimm, L. Kogerman, D. Krause, A.B. Unden, B. Sandstedt, R. Toftgard, and P.G. Zaphiropoulos. 1999. Mammalian suppressor-of-fused modulates nuclear-cytoplasmic shuttling of Gli-1. *Nat Cell Biol.* 1:312-9.
- Krishnan, V., F.A. Pereira, Y. Qiu, C.H. Chen, P.A. Beachy, S.Y. Tsai, and M.J. Tsai. 1997. Mediation of Sonic hedgehog-induced expression of COUP-TFII by a protein phosphatase. *Science.* 278:1947-50.
- Kuschel, S., U. Ruther, and T. Theil. 2003. A disrupted balance between Bmp/Wnt and Fgf signaling underlies the ventralization of the Gli3 mutant telencephalon. *Dev Biol.* 260:484-95.
- Laufer, E., C.E. Nelson, R.L. Johnson, B.A. Morgan, and C. Tabin. 1994. Sonic hedgehog and Fgf-4 act through a signaling cascade and feedback loop to integrate growth and patterning of the developing limb bud. *Cell.* 79:993-1003.
- Lee, J., K.A. Platt, P. Censullo, and A. Ruiz i Altaba. 1997. Gli1 is a target of Sonic hedgehog that induces ventral neural tube development. *Development.* 124:2537-52.

- Litingtung, Y., and C. Chiang. 2000. Specification of ventral neuron types is mediated by an antagonistic interaction between Shh and Gli3. *Nat Neurosci.* 3:979-85.
- Lovering, R., I.M. Hanson, K.L. Borden, S. Martin, N.J. O'Reilly, G.I. Evan, D. Rahman, D.J. Pappin, J. Trowsdale, and P.S. Freemont. 1993. Identification and preliminary characterization of a protein motif related to the zinc finger. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 90:2112-6.
- Mahlapuu, M., M. Ormestad, S. Enerback, and P. Carlsson. 2001. The forkhead transcription factor Foxf1 is required for differentiation of extra-embryonic and lateral plate mesoderm. *Development.* 128:155-66.
- Merchant, M., F.F. Vajdos, M. Ultsch, H.R. Maun, U. Wendt, J. Cannon, W. Desmarais, R.A. Lazarus, A.M. de Vos, and F.J. de Sauvage. 2004. Suppressor of fused regulates Gli activity through a dual binding mechanism. *Mol Cell Biol.* 24:8627-41.
- Meyer, N.P., and H. Roelink. 2003. The amino-terminal region of Gli3 antagonizes the Shh response and acts in dorsoventral fate specification in the developing spinal cord. *Dev Biol.* 257:343-55.
- Moore, K. 1988. The Developing human clinically oriented embryology. F.K. Schattauer Verlagsgesellschaft.
- Motoyama, J., L. Milenkovic, M. Iwama, Y. Shikata, M.P. Scott, and C.C. Hui. 2003. Differential requirement for Gli2 and Gli3 in ventral neural cell fate specification. *Dev Biol.* 259:150-61.
- Mullor, J.L., N. Dahmane, T. Sun, and A. Ruiz i Altaba. 2001. Wnt signals are targets and mediators of Gli function. *Curr Biol.* 11:769-73.
- Murata, K., J. Wu, and D.L. Brautigam. 1997. B cell receptor-associated protein alpha4 displays rapamycin-sensitive binding directly to the catalytic subunit of protein phosphatase 2A. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 94:10624-9.
- Murone, M., S.M. Luoh, D. Stone, W. Li, A. Gurney, M. Armanini, C. Grey, A. Rosenthal, and F.J. de Sauvage. 2000. Gli regulation by the opposing activities of fused and suppressor of fused. *Nat Cell Biol.* 2:310-2.
- Murone, M., A. Rosenthal, and F.J. de Sauvage. 1999. Hedgehog signal transduction: from flies to vertebrates. *Exp Cell Res.* 253:25-33.
- Nanahoshi, M., Y. Tsujishita, C. Tokunaga, S. Inui, N. Sakaguchi, K. Hara, and K. Yonezawa. 1999. Alpha4 protein as a common regulator of type 2A-related serine/threonine protein phosphatases. *FEBS Lett.* 446:108-12.

- Nybakken, K.E., C.W. Turck, D.J. Robbins, and J.M. Bishop. 2002. Hedgehog-stimulated phosphorylation of the kinesin-related protein Costal2 is mediated by the serine/threonine kinase fused. *J Biol Chem.* 277:24638-47.
- Oliver, T.G., L.L. Grasdeder, A.L. Carroll, C. Kaiser, C.L. Gillingham, S.M. Lin, R. Wickramasinghe, M.P. Scott, and R.J. Wechsler-Reya. 2003. Transcriptional profiling of the Sonic hedgehog response: a critical role for N-myc in proliferation of neuronal precursors. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 100:7331-6.
- Opitz J, F.J., Gutenberger J, Pellet J. 1969a. The G-syndrome of multiple congenital anomalies. *Birth Defects Orig Artic Ser.* 2:95-101.
- Opitz J, S.R., Smith D. 1969b. The BBB syndrome: Familial telecanthus with associated congenital anomalies. *Birth Defects Orig Artic Ser.* 2:86-94.
- Pearse, R.V., 2nd, L.S. Collier, M.P. Scott, and C.J. Tabin. 1999. Vertebrate homologs of *Drosophila* suppressor of fused interact with the gli family of transcriptional regulators. *Dev Biol.* 212:323-36.
- Perry, J., and A. Ashworth. 1999. Evolutionary rate of a gene affected by chromosomal position. *Curr Biol.* 9:987-9.
- Pickart, C.M. 2001. Mechanisms underlying ubiquitination. *Annu Rev Biochem.* 70:503-33.
- Pola, R., L.E. Ling, M. Silver, M.J. Corbley, M. Kearney, R. Blake Pepinsky, R. Shapiro, F.R. Taylor, D.P. Baker, T. Asahara, and J.M. Isner. 2001. The morphogen Sonic hedgehog is an indirect angiogenic agent upregulating two families of angiogenic growth factors. *Nat Med.* 7:706-11.
- Price, M.A., and D. Kalderon. 2002. Proteolysis of the Hedgehog signaling effector Cubitus interruptus requires phosphorylation by Glycogen Synthase Kinase 3 and Casein Kinase 1. *Cell.* 108:823-35.
- Quaderi, N.A., S. Schweiger, K. Gaudenz, B. Franco, E.I. Rugarli, W. Berger, G.J. Feldman, M. Volta, G. Andolfi, S. Gilgenkrantz, R.W. Marion, R.C. Hennekam, J.M. Opitz, M. Muenke, H.H. Ropers, and A. Ballabio. 1997. Opitz G/BBB syndrome, a defect of midline development, is due to mutations in a new RING finger gene on Xp22. *Nat Genet.* 17:285-91.
- Raught, B., A.C. Gingras, and N. Sonenberg. 2001. The target of rapamycin (TOR) proteins. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 98:7037-44.
- Reddy, S., T. Andl, A. Bagasra, M.M. Lu, D.J. Epstein, E.E. Morrisey, and S.E. Millar. 2001. Characterization of Wnt gene expression in developing and postnatal

- hair follicles and identification of Wnt5a as a target of Sonic hedgehog in hair follicle morphogenesis. *Mech Dev.* 107:69-82.
- Regl, G., M. Kasper, H. Schnidar, T. Eichberger, G.W. Neill, M.P. Philpott, H. Esterbauer, C. Hauser-Kronberger, A.M. Frischauf, and F. Aberger. 2004. Activation of the BCL2 promoter in response to Hedgehog/GLI signal transduction is predominantly mediated by GLI2. *Cancer Res.* 64:7724-31.
 - Richman, J.M., K.K. Fu, L.L. Cox, J.P. Sibbons, and T.C. Cox. 2002. Isolation and characterisation of the chick orthologue of the Opitz syndrome gene, Mid1, supports a conserved role in vertebrate development. *Int J Dev Biol.* 46:441-8.
 - Robin, N.H., G.J. Feldman, A.L. Aronson, H.F. Mitchell, R. Weksberg, C.O. Leonard, B.K. Burton, K.D. Josephson, R. Laxova, K.A. Aleck, and et al. 1995. Opitz syndrome is genetically heterogeneous, with one locus on Xp22, and a second locus on 22q11.2. *Nat Genet.* 11:459-61.
 - Roehm, P.C., and J.M. Berg. 1997. Sequential metal binding by the RING finger domain of BRCA1. *Biochemistry.* 36:10240-5.
 - Roessler, E., Y.Z. Du, J.L. Mullor, E. Casas, W.P. Allen, G. Gillessen-Kaesbach, E.R. Roeder, J.E. Ming, A. Ruiz i Altaba, and M. Muenke. 2003. Loss-of-function mutations in the human GLI2 gene are associated with pituitary anomalies and holoprosencephaly-like features. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 100:13424-9.
 - Rubin, G.M. 2000. Biological annotation of the *Drosophila* genome sequence. *Novartis Found Symp.* 229:79-82; discussion 82-3.
 - Ruiz i Altaba, A. 1998. Combinatorial Gli gene function in floor plate and neuronal inductions by Sonic hedgehog. *Development.* 125:2203-12.
 - Ruiz i Altaba, A. 1999a. Gli proteins and Hedgehog signaling: development and cancer. *Trends Genet.* 15:418-25.
 - Ruiz i Altaba, A. 1999b. Gli proteins encode context-dependent positive and negative functions: implications for development and disease. *Development.* 126:3205-16.
 - Ruiz i Altaba, A., V. Nguyen, and V. Palma. 2003. The emergent design of the neural tube: prepattern, SHH morphogen and GLI code. *Curr Opin Genet Dev.* 13:513-21.
 - Ruiz, I.A.A. 1999. The works of GLI and the power of hedgehog. *Nat Cell Biol.* 1:E147-8.
 - Sasaki, H., Y. Nishizaki, C. Hui, M. Nakafuku, and H. Kondoh. 1999. Regulation of Gli2 and Gli3 activities by an amino-terminal repression domain: implication of Gli2 and Gli3 as primary mediators of Shh signaling. *Development.* 126:3915-24.

- Satijn, D.P., M.J. Gunster, J. van der Vlag, K.M. Hamer, W. Schul, M.J. Alkema, A.J. Saurin, P.S. Freemont, R. van Driel, and A.P. Otte. 1997. RING1 is associated with the polycomb group protein complex and acts as a transcriptional repressor. *Mol Cell Biol.* 17:4105-13.
- Schweiger, S., J. Foerster, T. Lehmann, V. Suckow, Y.A. Muller, G. Walter, T. Davies, H. Porter, H. van Bokhoven, P.W. Lunt, P. Traub, and H.H. Ropers. 1999. The Opitz syndrome gene product, MID1, associates with microtubules. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 96:2794-9.
- Schweiger, S., and R. Schneider. 2003. The MID1/PP2A complex: a key to the pathogenesis of Opitz BBB/G syndrome. *Bioessays.* 25:356-66.
- Shin, S.H., P. Kogerman, E. Lindstrom, R. Toftgard, and L.G. Biesecker. 1999. GLI3 mutations in human disorders mimic *Drosophila* cubitus interruptus protein functions and localization. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 96:2880-4.
- Short, K.M., B. Hopwood, Z. Yi, and T.C. Cox. 2002. MID1 and MID2 homo- and heterodimerise to tether the rapamycin-sensitive PP2A regulatory subunit, alpha 4, to microtubules: implications for the clinical variability of X-linked Opitz GBBB syndrome and other developmental disorders. *BMC Cell Biol.* 3:1.
- So, J., V. Suckow, Z. Kijas, V. Kalscheuer, B. Moser, J. Winter, M. Baars, H. Firth, P. Lunt, B. Hamel, P. Meinecke, C. Moraine, S. Odent, A. Schinzel, J.J. van der Smagt, K. Devriendt, B. Albrecht, G. Gillessen-Kaesbach, I. van der Burgt, F. Petrij, L. Faivre, J. McGaughran, F. McKenzie, J.M. Opitz, T. Cox, and S. Schweiger. 2005. Mild phenotypes in a series of patients with Opitz GBBB syndrome with MID1 mutations. *Am J Med Genet A.* 132:1-7.
- Solecki, D.J., M. Gromeier, S. Mueller, G. Bernhardt, and E. Wimmer. 2002. Expression of the human poliovirus receptor/CD155 gene is activated by sonic hedgehog. *J Biol Chem.* 277:25697-702.
- Sontag, E. 2001. Protein phosphatase 2A: the Trojan Horse of cellular signaling. *Cell Signal.* 13:7-16.
- Steward, A., S. Adhya, and J. Clarke. 2002. Sequence conservation in Ig-like domains: the role of highly conserved proline residues in the fibronectin type III superfamily. *J Mol Biol.* 318:935-40.
- Stone, D.M., M. Murone, S. Luoh, W. Ye, M.P. Armanini, A. Gurney, H. Phillips, J. Brush, A. Goddard, F.J. de Sauvage, and A. Rosenthal. 1999. Characterization of the

- human suppressor of fused, a negative regulator of the zinc-finger transcription factor Gli. *J Cell Sci.* 112 (Pt 23):4437-48.
- Teh, M.T., S.T. Wong, G.W. Neill, L.R. Ghali, M.P. Philpott, and A.G. Quinn. 2002. FOXM1 is a downstream target of Gli1 in basal cell carcinomas. *Cancer Res.* 62:4773-80.
 - Theil, T., G. Alvarez-Bolado, A. Walter, and U. Ruther. 1999. Gli3 is required for Emx gene expression during dorsal telencephalon development. *Development.* 126:3561-71.
 - Trockenbacher, A., V. Suckow, J. Foerster, J. Winter, S. Krauss, H.H. Ropers, R. Schneider, and S. Schweiger. 2001. MID1, mutated in Opitz syndrome, encodes an ubiquitin ligase that targets phosphatase 2A for degradation. *Nat Genet.* 29:287-94.
 - Vasilias, D., S. Hancock, and C.D. Stern. 1999. SWiP-1: novel SOCS box containing WD-protein regulated by signalling centres and by Shh during development. *Mech Dev.* 82:79-94.
 - Villavicencio, E.H., D.O. Walterhouse, and P.M. Iannaccone. 2000. The sonic hedgehog-patched-gli pathway in human development and disease. *Am J Hum Genet.* 67:1047-54.
 - Wang, B., J.F. Fallon, and P.A. Beachy. 2000. Hedgehog-regulated processing of Gli3 produces an anterior/posterior repressor gradient in the developing vertebrate limb. *Cell.* 100:423-34.
 - Weaver, M., L. Batts, and B.L. Hogan. 2003. Tissue interactions pattern the mesenchyme of the embryonic mouse lung. *Dev Biol.* 258:169-84.
 - Wild, A., M. Kalff-Suske, A. Vortkamp, D. Bornholdt, R. Konig, and K.H. Grzeschik. 1997. Point mutations in human GLI3 cause Greig syndrome. *Hum Mol Genet.* 6:1979-84.
 - Winter, J., T. Lehmann, S. Krauss, A. Trockenbacher, Z. Kijas, J. Foerster, V. Suckow, M.L. Yaspo, A. Kulozik, V. Kalscheuer, R. Schneider, and S. Schweiger. 2004. Regulation of the MID1 protein function is fine-tuned by a complex pattern of alternative splicing. *Hum Genet.* 114:541-52.
 - Wodarz, A., and R. Nusse. 1998. Mechanisms of Wnt signaling in development. *Annu Rev Cell Dev Biol.* 14:59-88.
 - Wu, L.C., Z.W. Wang, J.T. Tsan, M.A. Spillman, A. Phung, X.L. Xu, M.C. Yang, L.Y. Hwang, A.M. Bowcock, and R. Baer. 1996. Identification of a RING protein that can interact in vivo with the BRCA1 gene product. *Nat Genet.* 14:430-40.

- Wu, S.C., J. Grindley, G.E. Winnier, L. Hargett, and B.L. Hogan. 1998. Mouse Mesenchyme forkhead 2 (Mf2): expression, DNA binding and induction by sonic hedgehog during somitogenesis. *Mech Dev.* 70:3-13.
- Yamagishi, H., J. Maeda, T. Hu, J. McAnally, S.J. Conway, T. Kume, E.N. Meyers, C. Yamagishi, and D. Srivastava. 2003. Tbx1 is regulated by tissue-specific forkhead proteins through a common Sonic hedgehog-responsive enhancer. *Genes Dev.* 17:269-81.
- Yoon, J.W., Y. Kita, D.J. Frank, R.R. Majewski, B.A. Konicek, M.A. Nobrega, H. Jacob, D. Walterhouse, and P. Iannaccone. 2002. Gene expression profiling leads to identification of GLI1-binding elements in target genes and a role for multiple downstream pathways in GLI1-induced cell transformation. *J Biol Chem.* 277:5548-55.
-

Abkürzungsverzeichnis

°C	Grad Celsius
μ	mikro
A	Adenin
A	Alanin (Ala)
AA	Aminosäuren
Abb.	Abbildung
APS	Ammoniumpersulfat
ATP	Adenosintriphosphat
BMP	bone morphogenic protein
bp	Basenpaare
BSA	Rinderserum Albumin
C	Cytosin
C	Cystein (Cys)
CBP	CREB binding protein
cDNA	complementary DNA (engl.), komplementäre DNA
Ci	Curie
Ci	Cubitus interruptus
Cos2	Costal 2
cps	counts per second
D	Asparaginsäure (Asp)
DABCO	1,4-diazobicyclo-2,2,2-octan
DEPC	Diethylpyrocarbonat
DNA	desoxyribonucleic acid (engl.), Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoxynucleotidtriphosphat
DTT	Dithiothreitol
E	Glutaminsäure (Glu)
E.coli	Escherichia coli
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
EMT	epithelial-mesenchymale Transition
EtBr	Ethidiumbromid
F	Phenylalanin (Phe)

FGF	fetal growth factor
FNIII	fibronectin type III
Fu	Fused
G	Guanin
g	Gramm
G	Glycin (Gly)
h	Stunde
H	Histidin (His)
HCl	Salzsäure
Hepes	4-(2-Hydroxyethyl)-piperazin-1-ethansulfonsäure
Hh	Hedgehog
I	Isoleucin (Ile)
IPTG	Isopropyl- β -D-Thiogalactopyranoside
K	Lysin (Lys)
kb	Kilobasen
KCl	Kaliumchlorid
kDa	kilo Dalton
l	Liter
L	Leucin (Leu)
LB	Luria-Bertani
LiCl	Lithiumchlorid
m	milli
M	Methionin (Met)
Mb	Megabasen
MgCl ₂	Magnesiumchlorid
min	Minute
mRNA	messenger RNA (engl.), Boten-RNA
MT	Mikrotubuli
n	nano
N	Asparagin (Asn)
NaCl	Natriumchlorid
OD	optische Dichte
OS	Opitz Syndrom

P	Prolin (Pro)
PBS	phosphate buffered saline
PCR	polymerase chain reaction
Ptc	Patched
PTCH	Patched 1
PP2A	Phosphatase2A
PP2Ac	katalytische Untereinheit der PP2A
Q	Glutamin (Gln)
R	Arginin (Arg)
RBCC	RING-B-Box-Coiled-coil
RING	really interesting new gene
RNA	ribonucleic acid (engl.), Ribonukleinsäure
RNAi	RNA interference (engl.), RNA Interferenz
rNTP	Ribonucleotidtriphosphat
rpm	rotations per minute (engl.), Umdrehungen pro Minute
RT	Reverse Transkription
S	Serin (Ser)
SDS	Natriumlaurylsulfat
sek	Sekunde
SHH	Sonic Hedgehog
Smo	Smoothened
SuFu	Suppressor of Fused
T	Thymin
T	Threonin (Thr)
TA	annealing temperature (engl.), Anlagerungstemperatur
Tab.	Tabelle
TAE	Tris / acetic acid / EDTA
Taq	Thermus aquatius
TE	Tris / EDTA
TEA	Tris / Ethanol / Amin
TEMED	N,N,N,NB, ' -Tetramethylethylendiamin
U	Uracil
V	Valin (Val)

W	Tryptophan (Trp)
Y	Tyrosin (Tyr)

Danksagung

An dieser Stelle möchte ich allen denen danken, die mich bei der Anfertigung der Doktorarbeit unterstützt haben.

Mein besonderer Dank gilt Prof. S. Schweiger für die intensive Betreuung dieser Arbeit und ihre stete Diskussionsbereitschaft. Darüber hinaus möchte ich Prof. Schneider und Prof. Börner für die Betreuung der Arbeit danken.

Herrn Prof. H-H. Ropers möchte ich dafür danken, dass er mir die Durchführung dieser Arbeit in seiner Abteilung ermöglichte.

Bei Beatriz Aranda, Ewa Jastrzebska, Joyce So, Jennifer Winter, Melanie Kunath und Melanie Hambrock möchte ich mich für die freundschaftliche Arbeitsatmosphäre in unserer Arbeitsgruppe bedanken. Vanessa Suckow danke ich für die geduldige Einarbeitung in zahlreiche Methoden.

Für die Hilfe in der Zellkultur danke ich Susanne Freier und Hannelore Madle.

Für die Unterstützung bei den Lebendzellanalysen und 3D-Mikroskopien danke ich Dr. Trelles Sticken und Dr. Liebe.

Weiterhin möchte ich mich bei meinen Eltern dafür bedanken, dass sie mir das Studium ermöglichten und mich jederzeit bei der Anfertigung der Doktorarbeit ermutigt und unterstützt haben.

Publikationen

Trockenbacher A, Suckow V, Foerster J Winter J, **Krauss S**, Ropers HH, Schneider R, Schweiger S. MID1, mutated in Opitz syndrome, encodes an ubiquitin ligase that targets phosphatase 2A for degradation. Nat Genet. 2001 Nov;29(3):287-94.

Winter J, Lehmann T, **Krauss S**, Trockenbacher A, Kijas Z, Foerster J, Suckow V, Yaspo ML, Kulozik A, Kalscheuer V, Schneider R, Schweiger S. Regulation of the MID1 protein function is fine-tuned by a complex pattern of alternative splicing. Hum Genet. 2004 May;144(6):541-52.

14. Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Humangenetik

Marburg, 1.-4. Oktober 2003. Vortrag: W14 03. GLI3 subcellular localization depends on microtubule-associated PP2A activity. **Krauss S**, Suckow V, Aranda B, Winter J, Haesler S, Scharff C, Wesslin M, Schneider R, Ropers HH, Grzeschik KH, Schweiger S.

European human genetics conference. München, 12.-15.Juni. Poster: P1120

The MID1/PP2A complex: a meeting point of the TGF β signaling cascade and the SHH pathway. **Krauss S**, Lehmann T, Suckow V, Schweiger S.

Zur Publikation eingereicht

Krauss S, Winter J, Trelles-Sticken E, Liebe B, Haesler S, Scharff C, Aranda B, Hambrock M, Wessling M, Grzeschik KH, Quaderi N, Schneider R, Schweiger S. The MID1/PP2A complex and GSK3 β regulate nuclear export of GLI3: implications for syndromes affecting the ventral midline.

Lebenslauf

1984-1990	Käthe-Kollwitz-Grundschule
1990-1997	Ulrich-von-Hutten-Oberschule (Gymnasium) Abschluß: Abitur (Durchschnittsnote: 1,8)
7/1997-12/1997	Praktikum Institut Dr. E. Kirchhoff Berlin Praktikum auf dem Gebiet biochemische Analytik und Mikrobiologie
1/1998-4/1998	Arbeit als Aushilfskraft Institut Dr. E. Kirchhoff Berlin
4/1998-2/2002	Studium der Biotechnologie an der Technischen Fachhochschule Berlin Abschluß: Diplom (Gesamtprädikat: sehr gut bestanden) Diplomarbeit (angefertigt am Max-Planck-Institut für molekulare Genetik): Molekulare Charakterisierung des MID1 Gens bei Mensch, Maus und Fugu
Semesterferien und WS98/99)	SS98 Praktikum Institut Dr. E. Kirchhoff Berlin Praktikum mit den Aufgabenschwerpunkten: Wasser- und Bodenanalyse
Praxissemester SS00	Praktikum am Max-Planck-Institut für molekulare Genetik Praktikum zum Thema: Protein-Interaktionen des MID1 Genprodukts
seit 2/2002	Doktorandin am Max-Planck-Institut für molekulare Genetik Thema der Arbeit: Charakterisierung der Mikrotubulus-assoziierten PP2A und ihrer Zielproteine

Selbständigkeitserklärung

Hiermit erkläre ich, Sybille Krauß (geboren am 22.01.1978 in Berlin), die vorliegende Arbeit selbständig und ohne unerlaubte Hilfe angefertigt zu haben und alle verwendeten Hilfsmittel und Inhalte aus anderen Quellen als solche kenntlich gemacht zu haben. Des weiteren versichere ich, dass die vorliegende Arbeit noch an keiner anderen Fakultät oder Universität zur Prüfung vorgelegen hat.

Der Inhalt der Promotionsordnung ist mir bekannt.