

Charakterisierung und Funktionalisierung von β -Catenin-spezifischen Einzeldomänen- Antikörperfragmenten

Dissertation

der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät

der Eberhard Karls Universität Tübingen

zur Erlangung des Grades eines

Doktors der Naturwissenschaften

(Dr. rer. nat.)

vorgelegt von

Dipl. Biol. Felix Emele

aus Freudenstadt

Tübingen

2017

Gedruckt mit Genehmigung der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät der Eberhard Karls Universität Tübingen.

Tag der mündlichen Qualifikation:	14.12.2017
Dekan:	Prof. Dr. Wolfgang Rosenstiel
1. Berichterstatter:	Prof. Dr. Ulrich Rothbauer
2. Berichterstatter:	Prof. Dr. Hans-Jürgen Volkmer

Diese Arbeit ist meiner lieben Mama Beate Emele gewidmet, die uns leider am 29.11.2016 an Eileiterkrebs verstorben ist. Ganz lieben Dank für all die schönen Jahre mit dir und für deinen standhaften Glauben, dass diese Arbeit vollendet wird.

Inhaltsangabe

Abbildungsverzeichnis.....	6
Abkürzungen.....	7
1. Zusammenfassung.....	9
2. Abstract	11
3. Einleitung.....	13
3.1. Entdeckung von β-Catenin	13
3.2. Molekulare Struktur von β-Catenin	13
3.3. Interaktion mit Proteinen des Wnt-Signalwegs.....	15
3.4. Zelluläre Funktionen von β-Catenin und seine Regulation	16
3.4.1. Zell-Zell-Kontakte	16
3.4.2. β-Catenin als Transkriptionsaktivator	17
3.4.3. Wnt/ β-Catenin-Signalweg.....	18
3.5. Die Rolle von β-Catenin bei Erkrankungen	19
3.5.1. Mutationen	20
3.5.2. EMT	20
3.6. Methoden zur experimentellen Untersuchung von β-Catenin.....	21
3.7. Einzeldomänen Antikörper/ Nanobodies (Nbs).....	23
3.7.1. VH-basierte Antikörperfragmente (Fabs & scFvs)	23
3.8. VHHs/VNARs	25
3.9. Zielsetzung der Arbeit.....	27
4. Material & Methoden	29
4.1. Material	29
4.1.1. Chemikalien und Lösungen	29
4.1.2. Geräte	35
4.1.3. Verbrauchsmaterial.....	37

4.1.4.	Antikörper.....	39
4.1.5.	Oligonukleotide	41
4.1.6.	Vektoren	42
4.1.7.	DNA Konstrukte.....	42
4.2.	Methoden	43
4.2.1.	Molekular-biologische Methoden	43
4.2.2.	Immunologische Methoden.....	45
4.2.3.	Zellkulturmethoden	46
4.2.4.	Biochemische Methoden	48
5.	Ergebnisse.....	53
5.1.	Selektion von Nbs, die sich in der DNA der CDRs signifikant unterscheiden	53
5.2.	Auswahl spezifischer Nbs durch Immunpräzipitation von rekombinantem β -Catenin	55
5.3.	Eliminierung von Nbs mit geringer Sensitivität oder Spezifität	56
5.4.	Messung der K_D der Nbs zur Evaluierung der Affinität.....	57
5.5.	Nachweis der Sensitivitätsgrenzen der Nbs für β -Catenin.....	58
5.6.	Domänenkartierung: Einteilung Nbs nach der adressierten β -Catenin-Domäne	60
5.7.	Epitop-Kartierung von BC1 und BC2 mittels Peptid-Screen	61
5.8.	Präzipitation endogenen β -Catenins mit Hilfe der Nbs.....	63
5.9.	Nachweis über die intrazelluläre Expression der Nbs (CBs) und Präzipitation von endogenem β -Catenin (wt).....	65
5.10.	Untersuchung der Zytotoxizität der CBs BC1,-6 und -9 mit Resazurin-Assay	68
5.11.	Luziferase-Reporter-Assay zur Untersuchung der Auswirkungen auf die transkriptionellen Funktionen von β -Catenin (TopFlash)	70
5.12.	Einsatz von Nbs in der Diagnostik	73
6.	Diskussion.....	81

6.1. Selektion und Charakterisierung von 5 variablen β-Catenin-spezifischen Nbs	
81	
6.2. Charakterisierung der Nbs für generelle Anwendungsfelder	83
6.3. Simulation von Anwendungen in Zellkultur, Diagnostik und Proteomik	86
6.3.1. Einsatz der Nbs als diagnostisches Werkzeug	89
7. Fazit und Ausblick	94
8. Danksagungen	96
9. Publikationsliste	97
10. Eidesstattliche Erklärung	98
11. Referenzen	99

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1 β -Catenin-Aufbau und Interaktionsproteine.....	15
Abbildung 2: β -Catenin-Funktion im Wnt-Signalweg und an den Adhärenzverbindungen.....	18
Abbildung 3: EMT	21
Abbildung 4: Antikörper und Antikörperfragmente.....	24
Abbildung 5: Nb Aufbau.....	26
Abbildung 6: Darstellung der Abfolge der Entwicklung von Nbs.....	54
Abbildung 7: Exemplarischer Aminosäuresequenzvergleich der variablen Domäne CDR der 14 Nb Klone.....	55
Abbildung 8: Immunblot des präzipitierten rekombinanten GST- β -Catenins mit angezeigten Nbs.....	56
Abbildung 9: Mikrosphären-Array zum Nachweis der spezifischen β -Catenin-Bindung.....	57
Abbildung 10: Nb Kinetik am Beispiel von BC2.....	58
Abbildung 11: Mikrosphären-basierter Immunarray zur Messung der Nb-Sensitivität für rekombinantes GST- β -Catenin.....	59
Abbildung 12: β -Catenin-Domänenkartierung der Nbs mittels mikrosphärenbasierter Immunarrays.....	60
Abbildung 13: Epitopkartierung der Nbs mittels mikrosphärenbasierter Immunarrays.....	62
Abbildung 14: Mikrosphären-basierter Immunarray zur Bestimmung des Minimalepitops von BC2.....	63
Abbildung 15: Immunpräzipitation von endogenem β -Catenin mit Nbs aus Zelllysaten.....	65
Abbildung 16: Präzipitation von CBs (CB) aus HEK293T-Zelllysaten.....	67
Abbildung 17: Vergleich der intrazellulären Expression der CBs in HEK293T-Zellen.....	68
Abbildung 18: Vitalitätsmessung von transient mit CBs transfizierten HEK293T-Zellen mit Resazurin.....	69
Abbildung 19: Topflash Luziferasereporteransatz von HEK293T-Zellen transient transfiziert mit Fusionsprotein GFP- β -Catenin.....	70
Abbildung 20: Topflash Luziferase-Reporteransatz.....	71
Abbildung 21: Topflash-Luziferase-Reporteransatz.....	72
Abbildung 22: Immunblot von β -Catenin mit Atto488 gekoppelten Nbs.....	74
Abbildung 23: Mikrosphären-basierter Array zur Selektion von Fänger/Detektor Paaren.....	76
Abbildung 24: Nachweis von endogenem β -Catenin mit dem Fänger/Detektor-Paar BC1/BC2-LCLC-Biotin im Mikrosphären-Array.....	78
Abbildung 25: WB-Analyse des β -Catenin-Interaktoms.....	80

Abkürzungen

Tabelle 1: Abkürzungen

Abkürzung	Ausgeschrieben
AK	Antikörper
APC	Adenomatöses Poliposis Coli Protein
ARM	Armadillo
AS	Aminosäure/n
CB	'Chromobody'
CDR	„complementary determining regions“
cfu	Colony forming units
CK1 α	Casein Kinase 1 α
CTD	C-terminale Domäne
DNA	„di-desoxy-ribonucleicacid“
dNTPs	Desoxyribonukleotid-tri-Phosphat
Dvl	'dishevelled'
E-Cadherin	Ephiteliales Cadherin
ELISA	„enzyme ligated immunosorbent assay“
EMT	Ephiteliale-mesenchymale Transition
FAP	Familiäre adenomatöse Polyposis
FKS/FCS	Fötale Kälberserum
GFP/YFP/RFP	'green/yellow/red fluorescent protein'
GSK3- β	Glycogensynthasekinase 3 β
GST	Gluthation-S-Transferase
hcAb	„heavy chain Antibody“
HRP	„horseradish peroxidase“
IMAC	Immobilisierte Metallionen Affinitätschromatographie
IP	Immunpräzipitation
ITC	Isotherme Titrationskalorimetrie
Kb	Kilobasen
kDa	Kilodalton
LRP5	'low density lipoprotein receptor-related protein 5'
MP	Milchpulver
Nbs	Nanobodies
N-Cadherin	Neurales Cadherin
NTD	N-terminale Domäne
PCR	„polymerase chain reaction“
PE	Phycoerythrin
pI	Isoelektrischer Punkt
PP2A	Protein Phosphatase 2A

Abkürzung	Ausgeschrieben
Rpm	„rounds per minute“
RT	Raumtemperatur
RU	„response units“
sdAbs	„single domain antibodies“
Sec	Sekunde
SNP	„single nucleotide polymorphism“
SOC	„Super optimal broth catabolic-repression“
SPR	„surface plasmon resonance“
TCF/LEF	T-cell factor/ lymphoid enhancer factor
TCF7L2	Transkriptionfaktor like 2/TCF4 [T-Cell Factor 4]
üN	Über Nacht
VH	„variable heavy chain“
VHH	„variable heavy chain of heavy chain only antibody“
VL	„variable light chain“
Wnt	W ingless/ I nt-1
WRE	„Wnt responsive elements“
β-TrCP	β-Transducinwiederholung beinhaltendes Protein

1. Zusammenfassung

β -Catenin ist das Schlüsselprotein des Wnt/ β -Catenin Signalwegs und ist durch seine Funktion als Adaptorprotein zwischen E-Cadherin und α -Catenin an der Verknüpfung der Adhärenzverbindungen mit dem Zytoskelett beteiligt. Diese Verknüpfung zwischen Zytoskelett und Adhärenzverbindungen spielt eine wichtige Rolle bei der Zell-polarisierung und der Zell-Zell-Interaktion. Des Weiteren ist β -Catenin über den Wnt-Signalweg an entwicklungsbiologischen und homöostatischen Prozessen beteiligt. Intrazelluläre β -Catenin Level werden durch einen Multi-Protein-Komplex, bekannt als ‚Destruction-Komplex‘ reguliert. Durch Aktivierung des kanonischen (β -Catenin abhängig) Wnt-Signalwegs, über die Bindung von Wnt mit den extrazellulären Domänen der Rezeptorproteine (LRP6 und Frizzled) an der Zellmembran, kommt es zur Inaktivierung des Destruction-Komplexes und zur Stabilisierung des zytoplasmatischen β -Catenin. Dieses translociert in den Zellkern und aktiviert über die Interaktion mit Proteinen der TCF/LEF-Familie die Expression Wnt-assoziiertes Gene (WRE). Proteine, die am Destruction-Komplex beteiligt sind, kontrollieren die Phosphorylierung einer Regulationsdomäne und die nachfolgende Ubiquitinierung und den proteasomalen Abbau von β -Catenin. Aufgrund dessen ist die anomale Stabilisierung durch Mutationen von β -Catenin oder Schlüsselregulatoren des ‚Destruction-Komplexes‘ assoziiert mit einer Vielzahl von Erkrankungen. In 80 % aller kolorektalen Karzinome, in einigen Fällen von Brustkrebs, sowie in neurodegenerativen Erkrankungen, wie der Alzheimer Erkrankung, spielt die Deregulation von β -Catenin eine wichtige Rolle. Dies macht β -Catenin zu einem wichtigen Ziel für die Untersuchung der Wnt gesteuerten Regulation und der intrazellulären Dynamik, sowie der Forschung und Entwicklung von Inhibitoren, die der kanzerogenen Wirkung entgegenwirken.

Herkömmliche Methoden der Beobachtung von intrazellulären Abläufen, wie Fusionsproteine oder Antikörper, haben den enormen Nachteil, dass sie häufig die Funktion des Antigens beeinträchtigen und natürliche Abläufe des Wnt-Signalwegs nicht detailliert abbilden können.

Eine Alternative schaffen hier neue Entwicklungen in der rekombinanten Antikörpertechnologie. Im Besonderen zu erwähnen, die Verwendung kleiner, flexibler und intrazellulär exprimierbarer Antikörperfragmente. Diese werden aus den variablen Domänen von nur schweren Ketten enthaltenden Antikörpern, welche in *Camelidae* vorkommen, gewonnen. In dieser Arbeit wird die Selektion, Charakterisierung und Spezialisierung von β -Catenin-spezifischen Einzeldomänen-Antikörper-Fragmenten (single domain antibodies/sdAbs) oder Nanobodies (Nbs) für ein weites Feld von Anwendungen demonstriert. Die Nbs werden über biochemische Verfahren charakterisiert und der Einsatz für Immunpräzipitations-Assays zur Analyse des Interaktoms von β -Catenin, sowie einem immundiagnostischen Verfahren demonstriert. Dabei konnte ein Nb identifiziert werden, welcher ein lineares 12 AS-Epitop erkennt und als Affinitätstag verwendet werden kann. Des

Weiteren konnte die intrazelluläre Expression und Adressierung des Antigens von drei Nbs in zellbiologischen Verfahren unter Beweis gestellt werden. Dabei wurde in Transkriptionsanalyse-Assays ermittelt, dass zwei intrazelluläre Nbs die Fähigkeit zur Inhibition β -Catenin-assoziiierter Transkription besitzen. Zuletzt konnte durch die Charakterisierung ein Nb selektiert werden, der alle Eigenschaften besitzt die β -Catenin-Dynamik darstellen zu können. Dazu gehört hohe Affinität und Spezifität zum Antigen, intrazelluläre Löslichkeit und Expression in Verbindung mit einem fluoreszierenden Fusionstag, geringe Toxizität und keine Inhibition oder Aktivierung der β -Catenin-gesteuerten Transkription. Diese Arbeit zeigt die vielfältigen Anwendungsmöglichkeiten der Nb-Technologie auch im Bereich komplexer Signaltransduktionen, wie des Wnt/ β -Catenin-Signalwegs.

2. Abstract

β -catenin is the key-protein of the Wnt/ β -catenin-signaling-pathway, and as adaptor-protein between E-cadherin and α -catenin it is also involved in connecting the aktin-cytoskeleton to the adherent junctions. This connection plays an important part in the polarization and interaction of cells. In addition, β -catenin contributes to cell-developmental and homeostatic processes through the Wnt-signaling-pathway. Intracellular β -catenin-levels are regulated by a multi-protein-complex, called destruction-complex. The activation of the canonical Wnt-signaling-pathway (β -catenin dependent) through binding of Wnt to the extracellular domains of its receptors (frizzled and the co-receptors LRP5/6) leads to the inactivation of the destruction-complex and to the subsequent stabilization of cytoplasmic β -catenin. Afterwards β -catenin will be translocated into the nucleus and activates the expression of Wnt-related elements (WRE) by interacting with the proteins of the TCF/LEF-family. The proteins, that are part of the destruction-complex, regulate the phosphorylation of β -catenin, the subsequent ubiquitination and the proteasomal degradation of β -catenin. As a result, mutations in β -catenin or key-regulators of the destruction-complex can lead to aberrant stabilization of β -catenin which is associated with multiple diseases. In 80 % of colorectal carcinomas, in some mamma carcinomas as well as some neurodegenerative diseases, like the alzheimer disease, the deregulation of β -catenin plays a central role. These insights make β -catenin an important object of scientific and pharmaceutical research to analyse the Wnt-regulated mechanisms and intracellular dynamics, as well as the development of inhibitors, which counteract the cancerogenous effect.

Conventional methods to observe intracellular processes like fusion proteins or antibodies have the disadvantage that they can impede the function and natural interactions of β -catenin in the Wnt-signaling-pathway. In addition, they can not always give detailed account of the current intracellular state.

New developments in the field of recombinant antibody technology offer an alternative: especially the usage of small, flexible and intracellular expressible antibody-fragments. These fragments are derived from the variable domains of heavy chain only antibodies, found only in camelidae and cartilagous fish. In this thesis the selection, characterization and specialization of β -catenin-specific single domain antibody fragments (sdAbs) or Nanobodies (Nbs) will be demonstrated for a wide field of applications. The characterization of the Nbs was done with biochemical assays and the application in immunoprecipitation-assays for interactome-analysis as well as immunodiagnostic-procedures will be shown. In doing so, a Nb has been

identified that recognizes a 12-aminoacid-long linear epitope that probably can be used as affinity-tag. Furthermore, intracellular application of three Nbs through expression-experiments and immunoprecipitation of endogenous β -catenin in cell biological assays was proven. Through transcriptional analysis with a luciferase-assay-system two Nbs have been identified which inhibit a Wnt-related gene expression by targeting the β -catenin. At last, one characterized Nb has been selected which is able to show β -catenin-dynamics. This includes high affinity, specificity, intracellular solubility and expression in connection with a fluorescent-tag, as well as low cytotoxicity and interference with transcriptional functions of β -catenin. This thesis therefore demonstrates the many possible applications of Nb-technologies in complex signal-transduction-cascades, such as the Wnt/ β -catenin-signaling-pathway.

3. Einleitung

3.1. Entdeckung von β -Catenin

Unabhängig voneinander wurde β -Catenin 1984 und 1989 entdeckt und beschrieben. Eine Publikation beschrieb die Assoziation von β -Catenin mit Plakoglobin (λ -Catenin), α -Catenin und E-Cadherin, welches essentielle Komponenten der Adhärenzverbindungen sind [1]. Die Beteiligung von β -Catenin an der Signaltransduktion wurde erstmals in *Drosophila melanogaster* beschrieben. Die Arbeitsgruppe um Eric Wieschaus entdeckte die Beteiligung im Rahmen von spermatischen Screens nach Mutationen, die die Segmentierung der Fruchtfliegen in der embryonalen Entwicklung beeinflussen [2]. Das neu entdeckte Gen, als *armadillo* bekannt, führte so zur Entdeckung des Signalpotentials von β -Catenin durch sein Ortholog in *Drosophila melanogaster*. Weitere Untersuchungen von *armadillo* etablierten die Erkenntnis, dass *armadillo* eine wichtige strukturelle Funktion in den Adhärenzverbindungen erfüllt [3-5]. Jedoch erst die Beobachtung, dass *armadillo* durch das Signalprotein *wingless* (Ortholog für Wnt) kontrolliert wird, führte zur Etablierung der Signalkaskade des kanonischen Wnt-Signalwegs (Wnt/ β -Catenin-Signaltransduktion) [6].

3.2. Molekulare Struktur von β -Catenin

β -Catenin ist ein multifunktionales Protein, das eine Schlüsselrolle in vielen Signalwegen übernimmt. Es beeinflusst die Zelldifferenzierung und ist an homöostatischen Prozessen beteiligt. Des Weiteren dient β -Catenin als Verbindungselement zwischen Zell-Zell Kontakten der Adhärenzverbindungen und dem Aktin-Zytoskelett. Dieses wird durch die Interaktion mit Proteinen der Cadherin-Familie und Aktin vermittelt. Aufgrund seiner Schlüsselposition in diesen Prozessen ist die Deregulation von β -Catenin mit schweren Erkrankungen, wie Krebs, psychischen und neurodegenerativen Erkrankungen, assoziiert [7]. Humanes β -Catenin besteht aus 781 Aminosäuren (AS) und ist ein ~86 KDa schweres Protein, das zur Familie der Armadillo (ARM)-Domänen Proteinen zählt. Alle Proteine dieser Familie weisen eine zentrale ARM-Domäne, flankiert von flexiblen, unstrukturierten N-terminalen und C-terminalen Regionen auf [8]. Typischerweise besteht die Armadillodomäne (ARM-Domäne) aus einer Abfolge von sich wiederholenden AS-Sequenzen (~42 AS), den sogenannten ARM-Repeats. Je drei aufeinanderfolgende α -Helices (H1, H2, H3) in triangulärer Anordnung bilden eine ARM-Repeat. Die ARM-Domäne des β -Catenins (AS-Sequenz 141-664) setzt sich aus zwölf solcher Wiederholungen (R1-R12) zusammen und bildet eine Superhelix, die eine lange positiv geladene Kavität formt. Innerhalb der Armadillodomäne von β -Catenin sind drei Besonderheiten beschrieben: Erstens liegt zwischen der Wiederholung 2 und 3 eine längere flexible AS-Sequenz, zweitens besteht die Wiederholung 7 nur aus den Helices H2 und H3 und drittens ist H1 flexibler als die restlichen Wiederholungen und bildet ein Gelenk, welches die Bindung an E-Cadherin und andere wichtige Interaktionsproteine vermittelt [9]. Die ARM-

Domäne bildet die Interaktionsmatrix für eine Vielzahl von Interaktionsproteinen (IPs) und ist somit die Schnittstelle für die Multifunktionalität von β -Catenin. Im Gegensatz dazu ist über die Struktur von N- (NTD) und C-terminaler Domäne (CTD) wenig bekannt. Dies liegt vermutlich an der hohen Flexibilität und der sogenannten ‚strukturellen Unordnung‘ die eine Kristallisierung und Aufklärung der Struktur verhindert [8, 10, 11]. Bekannt ist jedoch, dass auf die ARM-Domäne von β -Catenin, zu Beginn des N-Terminus der CTD, eine α -Helix (Helix-C) folgt. Diese scheint eine essentielle Rolle in der Signalaktivität von β -Catenin zu spielen [12]. Von der NTD ist die Kristallstruktur einer Peptidsequenz von AS 19–44 bekannt, für die zwei Phosphorylierungsstellen für Glycogensynthasekinase 3 β (GSK3- β) beschrieben wurden: Serin33 (Ser33) und Serin37 (Ser37). Die AS Sequenz 20-31 des Peptids weisen die Tendenz auf, eine helikale Struktur zu bilden, die für die Erkennung und Bindung durch β -TrCP-Ubiquitinligase wichtig ist [13, 14]. Zusätzlich zu den durch NMR und Kristallisierung bekannten Strukturen im NTD ist bekannt, dass das SSTS Motiv (Vorraussetzung für die zelluläre Stabilität von β -Catenin) aus vier aufeinanderfolgenden Phosphorylierungsstellen besteht. Diese setzen sich aus Ser33, Ser37, Threonin41 (Thr41) und Ser45 zusammen. Wobei das Motiv an Ser45 durch die Casein Kinase 1 α (CK1 α) initial und anschließend die Ser33, Ser34 und Thr41 von GSK3- β phosphoryliert werden [15-18].

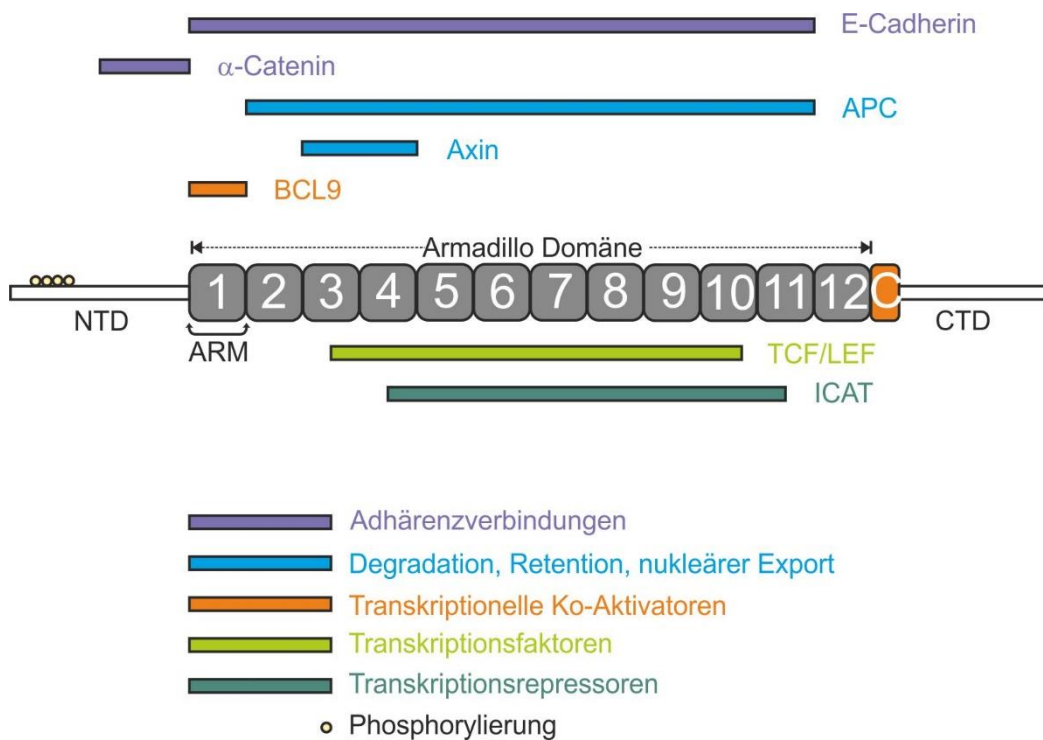


Abbildung 1 β -Catenin-Aufbau und Interaktionsproteine. Schematische Darstellung des Aufbaus von β -Catenin und Übersicht über einige ausgewählte Interaktionsproteine, sowie des Interaktionsbereichs mit β -Catenin. β -Catenin dient als Interaktionsplattform einer Vielzahl von Proteinen in den Adhärenzverbindungen, im Zytoplasma und im Zellkern. Der Aufbau besteht aus einer zentralen ARM-Domäne, die sich aus 12 ARM-Repeats zusammensetzt und den flankierenden N-terminalen- (NTD) und C-terminalen-Domänen (CTD). Der N-Terminus des CTD beginnt mit einer C-Helix (C). Die gefärbten Banden über und unter der β -Catenin Schematik repräsentieren die postulierten Interaktionsoberflächen und die Proteine, die eine Bindung mit β -Catenin eingehen. Violett: Proteine der Adhärenzverbindungen; hellblau: Proteine die an der Degradation beteiligt sind; orange: transkriptionelle Ko-Aktivatoren; hellgrün: Transkriptionsfaktoren; graugrün: Transkriptionsrepressoren. Gelbe Punkte repräsentieren Phosphorylierungsstellen, die für die Interaktion wichtig sind. Quelle: [19].

3.3. Interaktion mit Proteinen des Wnt-Signalwegs

Die meisten der Interaktionsproteine von β -Catenin interagieren mit der ARM-Domäne. Die wichtigsten sind das adenomatöse Poliposis Coli Protein (APC, Bestandteil des Destruction-Komplexes), E-Cadherin (Bestandteil der Adhärenzverbindungen) und TCF/LEF (Bestandteil des Transkriptionsaktivator-Komplexes im Zellkern), binden überlappende Bereiche zwischen R3 und R9. Dort werden ionische Bindungen mit zwei Lysinresten (AS 312 und 435) ausgebildet. Dies führt dazu, dass diese Interaktionsproteine sich nicht gleichzeitig an die ARM-Domäne binden können. Diese Konkurrenz um die gleiche Bindestelle spielt eine wichtige Rolle in der Regulation und Funktion von β -Catenin. Des Weiteren spielen Konformationsänderungen von β -Catenin eine wichtige Rolle um die Funktion von β -Catenin zu regulieren. Es wurde spekuliert und gezeigt, dass die negativ geladenen NTD und CTD über Rückfaltung sowohl miteinander, als auch mit der positiv geladenen ARM-Region interagieren und so teilweise die Interaktion von β -Catenin mit seinen Interaktionsproteinen vermitteln können [20-22]. Allerdings konnte dies durch eine ITC-Analyse (Isotherme Titrationskalorimetrie) mit gereinigtem β -Catenin für die hochaffinen Interaktionsproteine nicht belegt werden [23]. Einige Forschungsergebnisse zeigen, dass die transkriptionelle Aktivität

von β -Catenin, neben der Stabilisierung durch Phosphorylierung durch CK1 und GSK3- β , auch durch das Zurückfalten der CTD zur ARM-Domäne beeinflusst wird. Ausschlaggebend für diese Aktivität scheint hier die Helix-C zu sein. Die Phosphorylierung an Tyrosin AS 654 reduziert die Interaktion mit E-Cadherin und verstärkt die β -Catenin aktivierte Transkription [24]. Durch die Phosphorylierung können möglicherweise Wasserstoffbindungen zur ARM-Domäne nicht ausgebildet werden. Die Negative Ladung der Phosphorylierung verhindert so ein Zurückfalten des C-Terminus und ermöglicht die zusätzliche Phosphorylierung an Serin AS 675 durch die offene Konformation und damit die Interaktion mit weiteren Aktivatoren [12, 24-26]. Die CTD oder die Helix-C scheinen für β -Catenin, in seiner Rolle als Adaptorprotein zwischen den Adhärenzverbindungen und dem Zytoskelett, keine entscheidende Rolle zu spielen. Stattdessen dürfte für die Zell-Zell-Kontakte eine dimere Form von β -Catenin eine wichtige Rolle spielen [5, 12, 22]. Diese Ergebnisse erscheinen plausibel im Hinblick darauf, dass viele der transkriptionellen Ko-Aktivatoren von β -Catenin eine intakte Helix-C oder R12 zusammen mit der Helix-C benötigen, um mit β -Catenin zu interagieren [27].

3.4. Zelluläre Funktionen von β -Catenin und seine Regulation

3.4.1. Zell-Zell-Kontakte

β -Catenin ist beteiligt an einer Vielzahl wichtiger zellulärer Funktionen. Einerseits wird durch einen stabilen Pool von β -Catenin an den Adhärenzverbindungen die Verknüpfung von Zell-Zell-Kontakten (E-Cadherin) und dem Zytoskelett (Aktin) vermittelt. In der Abwesenheit von Wnt-Signalaktivität ist das einzig stabile Reservoir von β -Catenin assoziiert mit E-Cadherin an den Adhärenzverbindungen (Abbildung 2). Dort trägt es zur Verknüpfung der Cadherin basierten Adhärenzverbindungen mit dem Aktin-Zytoskelett bei. Diese sind beteiligt an der Bildung von polarisiertem epithelialen Gewebe und der Integrität der Zellverbände [28]. Proteine der Cadherine sind Transmembranproteine, die Ca^{2+} -abhängig Homodimere mit Cadherinen von benachbarten Zellen ausbilden. Über ihre zytoplasmatische Domäne interagieren Cadherine mit β -Catenin und werden über die Interaktion von β -Catenin mit α -Catenin mit dem Aktin-Zytoskelett verbunden. Cadherine werden in der Regel nach den Zelltypen benannt, in denen sie vorkommen: Epitheliales Cadherin (E-Cadherin) oder neuronales Cadherin (N-Cadherin) [28], [29]. Die meisten Studien werden jedoch mit E-Cadherin durchgeführt (Übersicht auch in [19]). Neu gebildetes E-Cadherin, in monomerer Form, besitzt eine kurze Halbwertszeit (~5 h), aufgrund einer PEST-Sequenz (eine AS-Sequenz reich an den AS Prolin [P], Glutaminsäure [E], Serin [S] und Threonin [T]) innerhalb des Proteins. Diese wird von einer Ubiquitinligase erkannt und E-Cadherin nachfolgend der Markierung mit Polyubiquitin dem proteasomalen Abbau zugeführt. Die Bindung von β -Catenin an Cadherin stabilisiert dieses durch das Blockieren des PEST-Motivs. Die Interaktion von β -Catenin mit E-Cadherin findet hierbei noch innerhalb des endoplasmatischen Retikulums statt

[30], [31]. Umgekehrt stabilisiert die Bindung auch β -Catenin, weil es eine Inkorporation in den Destruction-Komplex durch Axin und APC verhindert [32]. Durch diese stabilisierende Wirkung von β -Catenin ist β -Catenin essentiell an der Ausbildung von Zell-Zell-Kontakten beteiligt. Die Bindung von α -Catenin an β -Catenin findet über den N-terminalen Teil der NTD und der ersten ARM-Repeat (R1) statt. In dieser Region befindet sich, wie schon oben erwähnt, eine flexiblere Struktur, die einem Gelenk ähnlich ist. α -Catenin stabilisiert diese Gelenkstruktur in einer Konformation, die eine gleichzeitige Bindung von α -Catenin und E-Cadherin ermöglicht [32, 33]. Dadurch wird die Dimerisierungsdomäne von α -Catenin durch die Bindung von β -Catenin blockiert und die Homodimerisierung von α -Catenin unterbunden. Dies führt zu einer Hemmung der Aktinfilamentbildung, die ein dimerisiertes α -Catenin zur Förderung desselben benötigt [34]. Dem entsprechend ist der E-Cadherin/ β -Catenin/ α -Catenin Komplex ein dynamisches Konstrukt, in dem α -Catenin nicht gleichzeitig mit E-Cadherin und β -Catenin oder α -Catenin mit Aktin interagiert [35]. Dies gibt β -Catenin eine zusätzliche Funktion, in dem es indirekt auf die Aktin Dynamik einwirkt.

3.4.2. β -Catenin als Transkriptionsaktivator

Die wichtigste Schlüsselfunktion spielt β -Catenin im Signaltransduktionsweg von Wnt. Dieser ist durch die transkriptionelle Kontrolle einer Vielzahl von Genen an der embryonalen Entwicklung und der Homöostase beteiligt. Ohne die Aktivierung des Wnt-Signalweges durch das Glykoprotein Wnt wird die Menge an zytoplasmatischem β -Catenin streng reguliert. Zytoplasmatisches β -Catenin wird durch einen Multiproteinkomplex gebunden und durch Phosphorylierung für den proteasomalen Abbau markiert. Dieser Multiproteinkomplex ist bekannt als ‚Destruction-Komplex‘. Sowohl freies β -Catenin, das von den Adhärenzverbindungen freigesetzt wurde, als auch neu synthetisiertes wird von diesem Komplex adressiert. Im Gegensatz dazu ist zytoplasmatisches β -Catenin, das durch zelluläre Mechanismen stabilisiert und nicht durch den Destruction-Komplex adressiert wird, im Zellkern (Nukleus) transkriptionell aktiv. Nukleäres β -Catenin funktioniert durch die Komplexierung mit DNA-Bindeproteinen der TCF/LEF-Familie als transkriptioneller Ko-Aktivator/Ko-Faktor der Wnt-induzierten Transkription. Die Interaktion mit β -Catenin ändert die Wirkung der TCF/LEF-Proteine von einer repressorischen hin zu einer aktivatorischen Wirkung. Dies führt zur Konvertierung des Wnt-Signals in eine Transkription der Wnt-Zielgene (WRE/ Wnt Responsive Elements) [36, 37]. Diese transkriptionelle Aktivität ist abhängig von der Menge an stabilem, freiem β -Catenin und wird strengstens durch den Destruction-Komplex reguliert. Denn eine fehlerhafte, anormale Aktivierung der WRE ist in vielen Fällen mit schweren Störungen der Zellfunktionen verbunden (siehe auch [38]).

3.4.3. Wnt/ β -Catenin-Signalweg

Der Destruction-Komplex, der die Aktivität von β -Catenin reguliert, besteht aus dem Gerüstprotein Axin, dem APC, den Kinasen, die das SSTS-Motiv phosphorylieren, CKI und GSK3- β , sowie der Protein Phosphatase 2A (PP2A). β -Catenin wird dabei von Axin und APC gebunden. Diese beiden Interaktoren bilden das Gerüst für den Destruction-Komplex. Über Axin und APC wird die Bindung der Kinasen CKI und GSK3- β vermittelt [39, 40] (Abbildung 2).

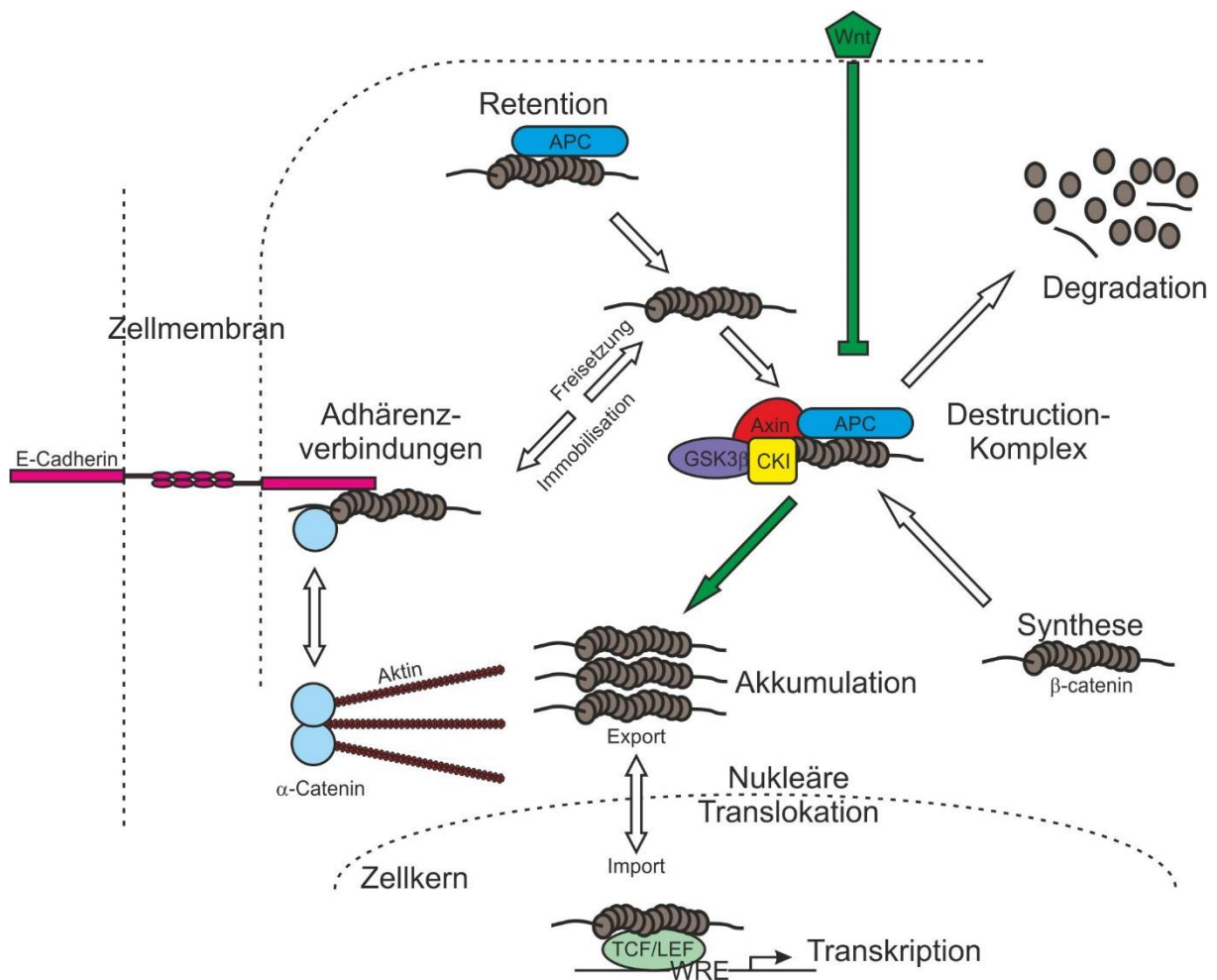


Abbildung 2: β -Catenin-Funktion im Wnt-Signalweg und an den Adhärenzverbindungen. Darstellung wichtiger Funktionen und Signalwege in denen β -Catenin involviert ist. Neusynthetisiertes β -Catenin wird über die Bindung an E-Cadherin an die Adhärenzverbindungen rekrutiert (Immobilisation). Durch die Interaktion mit α -Catenin reguliert β -Catenin die Polymerisation von Aktin und beeinflusst somit indirekt die Zytoskelettbildung. Durch den Verlust oder durch die Phosphorylierung von E-Cadherin kann β -Catenin von den Adhärenzverbindungen freigesetzt werden (Release). Das freie zytoplasmatische β -Catenin wird bei inaktivem Wnt-Signalweg über den Destruction-Komplex für die proteasomale Degradation durch Phosphorylierung markiert. In Anwesenheit von Wnt-Glykoprotein an den Wnt-Rezeptoren der Zellmembran wird der Destruction-Komplex inhibiert und neusynthetisiertes β -Catenin kann im Zytoplasma akkumulieren. Anschließend wird β -Catenin in den Zellkern importiert (Import/Nukleäre Translokation). Im Zellkern interagiert es mit Transkriptions-Aktivatoren der TCF/LEF-Familie und bildet aktive Transkriptionskomplexe. Dies führt zur Expression von Wnt abhängigen Genen (WER/Wnt responsive elements). Jedoch auch andere Faktoren können im Zellkern mit β -Catenin aktive Transkriptionskomplexe ausbilden. Quelle: modifiziert nach [19].

CKI dient bei der Phosphorylierung als Initiationskinase. Die Phosphorylierung von Ser45 im SSTS-Motiv initiiert die weiterfolgende Phosphorylierung durch GSK3 β , an den Positionen

Thr41/ Ser 37/ Ser33 [18, 41]. Ohne Axin und APC wird β -Catenin nicht durch GSK3- β phosphoryliert. Dajani et al. beschrieben, dass die Interaktion von β -Catenin an das Axin-Gerüst die Phosphorylierungseffizienz durch GSK3- β um ein über 20.000faches erhöht [42]. Gleichzeitig wird durch die Bindung von APC der Destruction-Komplex stabilisiert und die Phosphorylierung des SSTS-Motivs vor PP2A, einer Phosphatase, geschützt. PP2A hat somit eine antagonistische Wirkung zu APC. Des Weiteren beschrieben Su et al., dass nach der Phosphorylierung das β -Catenin, gebunden an APC, den Destruction-Komplex verlässt und über die Phosphorylierungsregionen Ser33 und 37 mit dem E3-Ubiquitin-Ligase-Komplex interagiert. Dieser besteht aus β -TrCP (β -Transducinwiederholung beinhaltendes Protein), welches das Phosphorylierungs-Motiv erkennt. Skp1 und Cul1 werden von β -TrCP rekrutiert, β -Catenin wird polyubiquitiniert und über das S26-Proteasom degradiert [43-45]. Die Aktivierung des Wnt-Signalweges findet über die Interaktion von Wnt mit dem Transmembranrezeptor Frizzled und seinem Co-Rezeptor LRP5 (low density lipoprotein receptor-related protein 5) statt. Der aktivierte Rezeptor Frizzled rekrutiert das zytoplasmatische Protein Dishevelled (Dvl) an die Zellmembran zum Rezeptorkomplex und induziert durch Multimerisierung die Bildung der LRP assoziierten Wnt-Signalosomen [46]. Daraufhin wird Axin durch Dvl gebunden und die Bildung neuer Destruction-Komplexe verhindert [47, 48]. Es wird vermutet, dass mit der Rekrutierung von Axin auch assoziierte Kinasen wie CKI und GSK3- β gebunden werden. CKI phosphoryliert daraufhin, initiiert durch Dvl, LRP5, was zu einer Inaktivierung der Kinaseaktivität von GSK3- β führt [49]. Diese stehen dann ebenfalls nicht mehr für die Phosphorylierung von β -Catenin zur Verfügung. Möglicherweise führt dies zur Stabilisierung von neu synthetisiertem β -Catenin, da keine neuen Destruction-Komplexe gebildet werden können [48]. β -Catenin kann dann im Zytoplasma akkumulieren und wird dann über einen noch nicht bekannten Mechanismus in den Nukleus transloziert (Vermutet wird eine noch nicht bekannte Funktion von β -Catenin, entweder durch die Membran oder durch Transportproteine zu translozieren) [50-52].

3.5. Die Rolle von β -Catenin bei Erkrankungen

Durch das dynamische Zusammenspiel von β -Catenin mit einer Vielzahl von Interaktionsproteinen (z.B. Wnt-Signalweg und Zell-Kontakte) erhält es eine große Bedeutung für die Regulation zellulärer Funktionen in der Homöostase und der Differenzierung. Aufgrund dessen sind Mutationen in zentralen Proteinen des Wnt-Signalwegs mit schweren Erkrankungen assoziiert. Die unnatürliche Aktivierung des Wnt-Signalwegs ist assoziiert mit der Entstehung von Krebs (Kolonkarzinom), neurodegenerativen Erkrankungen (Alzheimer) und neurologischen Störungen (Schizophrenie), sowie Störungen im Aufbau des Skeletts, fibrotischen und metabolischen Erkrankungen [38, 53-55]. Zum Beispiel beschrieb die WHO (Welt Gesundheitsorganisation/ World Health Organization) 2012 das kolorektale Karzinom

(CRC) mit 1,36 Millionen Fällen weltweit als die dritthäufigste Krebsart (WHO www.who.int 2012). In 90% der untersuchten Fälle konnten somatische Mutationen in Genen, die mit zentralen Funktionen des kanonischen oder β -Catenin-abhängigen Wnt-Signalweges assoziiert sind, mit dem Auftreten von Kolonkarzinomen assoziiert werden [56].

3.5.1. Mutationen

Die am häufigsten gefundenen Mutationen im Wnt/ β -Catenin-Signalweg finden sich in den Genen die für APC, β -Catenin, TCF7L2 (Transkription factor like 2/TCF4 [T-Cell Factor 4]) und Axin1/2 kodieren [57-61]. Die Mutation des APC-Genes wurde erstmalig beschrieben anhand einer erblichen Erkrankung namens ‚familiäre adenomatöse Polyposis‘ (FAP) [60]. Mutationen, die zu einer C-Terminal-verkürzten und nicht mehr funktionalen Form von APC führen, wurden für FAP und 80 % der kolorektalen Karzinome beschrieben [62]. Der Verlust des funktionellen APC führt zur Stabilisierung von β -Catenin und so zu einer subsequenten Aktivierung von Wnt-kontrollierten Genen [63, 64]. In einigen Fällen von Karzinomen (kolorektale Karzinome, Leber-, Brust- und Lungenkrebs) wurden Mutationen für Axin-1/2 beschrieben (Übersicht in [65]). Für Axin-1 wurden Mutationen entdeckt, die durch den Verlust ihrer GSK3- β -Bindedomäne oder durch reduzierte Bindung an GSK3- β eine stabilisierende Auswirkung auf β -Catenin zu haben scheinen [66]. Beschriebene Axin-2 Mutationen beinhalten einen frühen Transkriptionsstop durch eine Verschiebung im Leseraster. Vermutet wurde, dass dies entweder zum Abbau von Axin-2 oder zum Gewinn einer neuen Funktion führte, welches eine Stabilisierung des zytoplasmatischen β -Catenins zur Folge hat [67, 68]. TCF7L2-Deregulation wurde bisher in Diabetes mellitus Typ 2 und Krebs beschrieben [69, 70]. In kolorektalen Karzinomen konnten Genfusionen von TCF7L2 mit VTI1A beobachtet werden, die keine β -Catenin-Bindedomäne mehr aufwiesen. Die für β -Catenin am häufigsten beschriebenen Mutationen beschränken sich größtenteils auf die NTD, in der auch das SSTS-Motiv lokalisiert ist. Für viele der bekannten Mutationen gilt, dass die Phosphorylierung von β -Catenin und somit der sukzessive Abbau verhindert oder erschwert wird. So sind einerseits aktivierende Punktmutationen im SSTS-Motiv als auch Deletionen beschrieben [71]. Diese Varianten treten in sporadischen kolorektalen Karzinomen, Melanomen und weiteren Tumoren auf [69, 71, 72]. Die häufigsten Ursachen für eine Deregulation des Wnt-Signalweges haben zur Folge, dass β -Catenin nicht mehr abgebaut wird, akkumuliert und die Wnt-gesteuerte Gentranskription aktiviert. Dies findet entweder durch Mutationen in Schlüsselregionen von Proteinen die β -Catenin regulieren oder durch Mutationen in β -Catenin selbst statt [66-68, 73].

3.5.2. EMT

Ein weiterer Punkt in dem eine unnatürliche Aktivierung des Wnt-Signalweges eine wichtige Rolle spielt ist die epitheliale-mesenchymale Transition (EMT) (Abbildung 3).

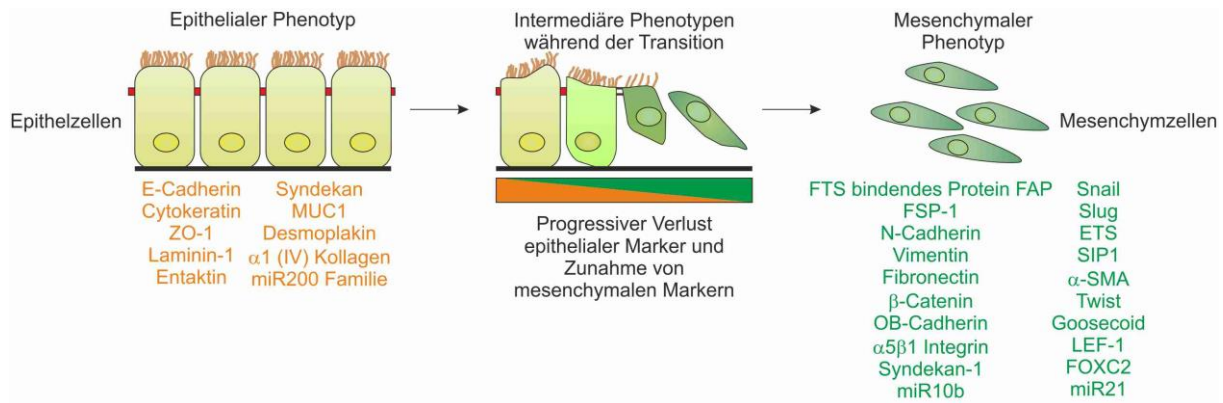


Abbildung 3: EMT Übersicht über den Ablauf der EMT und Aufzählung exemplarischer epithelialer (orange) und mesenchymaler Markerproteine (grün). EMT ist die Transition von stationären Epithelzellen zu mobilen fibroplastischen Mesenchymzellen. Zellen, die sich in der Intermediärphase befinden, sind erkennbar durch die Ko-Lokalisation von sowohl epithelialen als auch mesenchymalen Markern. ZO-1, zona occludens 1; MUC1, mucin 1, cell surface associated; miR200, microRNA 200; SIP1, survival of motor neuron protein interacting protein 1; FOXC2, forkhead box C2. Quelle: modifiziert nach [74].

Im Besonderen spielt dies eine Rolle im Krankheitsverlauf bei Karzinomen und Tumoren. So treibt die Aktivierung von EMT die Invasivität und Bildung von Metastasen eines Primärkarzinoms/-tumors voran. Natürlicherweise ist EMT ein wichtiger Prozess in der embryonalen Entwicklung und bei der Stammzellendifferenzierung. Hierbei wandeln sich immobile, polarisierte epitheliale Zellen in motile mesenchymale fibroblastoide Zellen um (beschrieben in [75]). Ein wichtiges Kennzeichen für den Ablauf des EMT-Prozesses ist der Austausch von E-Cadherin durch N-Cadherin an der Zellmembran [76]. Dabei ist oftmals ein Anstieg von freiem zytoplasmatischem β -Catenin zu beobachten. Es wird vermutet, dass beim Austausch von E- durch N-Cadherin das in den Adhärenzverbindungen gebundene β -Catenin freigesetzt wird. Diese Erhöhung der β -Catenin-Konzentration könnte somit eine Aktivierung Wnt-abhängiger Gene verursachen [77]. Dazu zählen Gene, die die Prozesse von EMT steuern. Zum Beispiel Twist, Snail2 und ZEB1 (Zinkfinger E-box-Binde-Homeobox 1/ δ EF1). Diese und auch das indirekt durch Wnt beeinflusste Protein Snail1 reduzieren die Expression von E-Cadherin und wirken induzierend auf den EMT-Prozess [78-81].

3.6. Methoden zur experimentellen Untersuchung von β -Catenin

Die Beteiligung von β -Catenin an einer Vielzahl von essentiellen zellulären Prozessen und schweren Erkrankungen macht es zu einem wichtigen Ziel für die Entwicklung therapeutischer Inhibitoren, aber auch zum Ziel intensiver Erforschung der Zusammenhänge von Prozessen und Signalwegen in denen β -Catenin eine Rolle spielt (siehe auch [19, 38, 82]). Dazu ist es notwendig die miteinander verbundenen Signalwege, die Zusammensetzung von Interaktionskomplexen, die Regulation von Schlüsselproteinen und die Auswirkung auf die Expression verschiedener Genmarker genauer zu untersuchen. Dies wird erreicht indem man die Lokalisation und Dynamik der Proteine untersucht, aber auch durch die Entschlüsselung des Interaktoms von β -Catenin. Die Studien greifen hierbei zumeist auf zwei konventionelle,

jedoch leistungsfähige Werkzeuge zurück. Diese beinhalten die Adressierung des Antigens mittels Antikörpern und/oder den Einsatz von Fusionsproteinen. Der Einsatz von Antikörpern ist vielfältig. Einerseits können Antikörper verwendet werden um das Antigen aus Zelllysaten zu präzipitieren. Im Anschluss ist die Analyse der ko-präzipitierten Proteine über Immunblots mit Hilfe weiterer Antikörper zu identifizieren oder das Interaktom über sensitivere Methoden wie der Massenspektrometrie möglich. Zur Untersuchung von β -Catenin und seinem Interaktom ist es ein übliches Verfahren auf die hohe Sensitivität und Spezifität von Antikörpern zurückzugreifen [48, 83, 84]. Andererseits werden Antikörper auch zur zellulären Lokalisationsbestimmung des Antigens eingesetzt. Durch Immunfluoreszenzfärbung von fixierten Zellen konnte zum Beispiel die Lokalisation von β -Catenin an der Zellmembran, im Nukleus und in den Zentrosomen nachgewiesen werden [85-87]. Allerdings ermöglichen Antikörper nur die Untersuchung von Zellen in einem stationären Zustand, da sie zur Färbung fixiert und somit abgetötet werden müssen. Eine Abbildung der Antigendynamik ist damit nicht möglich. Dies ist aber nicht nur für β -Catenin essentiell, da viele Proteine im Verlauf der Signaltransduktionen ihre Lokalisation in der Zelle verändern. β -Catenin besitzt einen wichtigen und stabilen Pool an der Zellmembran, jedoch die transkriptionell aktive Form entsteht durch eine Stabilisierung im Verlauf des Wnt-Signaltransduktionswegs (siehe oben 3.4.3) und wandert nachfolgend in den Nukleus um dort im Komplex mit TCF/LEF-Proteinen die WRE zu aktivieren. Um eine solche Dynamik wiederzugeben, müssten jedoch funktionelle Antikörper intrazellulär exprimiert werden, um ihrem Antigen folgen zu können. Jedoch scheiterten Versuche mit intrazellulären Antikörpern häufig an der Komplexität des Aufbaus und der Struktur. So können die Disulfidbrücken zwischen den schweren Ketten und den leichten Ketten im reduzierenden Milieu der Zelle nicht ausgebildet werden. Dies verhindert sowohl die Bildung der antigen-erkennenden Domänen, als auch die korrekte Faltung der Antikörper. Ein anderes Problem stellt auch der hohe Anteil an hydrophoben AS dar, die eine Lösung der Antikörper verhindert und so zur Aggregatbildung führen kann. [88-91]. Neben der Darstellung der Dynamik haben Antikörper noch weitere Nachteile. Die hohe Affinität zum Antigen, die die AK so interessant machen für therapeutische Einsätze, kann auch zu einem Nachteil werden, wenn das Interaktom des Antigens betrachtet werden soll. Es ist bekannt, dass Antikörper eingesetzt werden um Interaktionspartner zu verdrängen (Kompetition) oder als Inhibitor der Antigenfunktion. Ursachen können hierbei Konformationsänderungen oder die Maskierung von Bindestellen für wichtige Interaktionsproteine sein. ([92-94]).

Die Fusionsproteine, Fusionen aus dem Antigen mit einem Protein-Tag, z.B. wie GST (Gluthation-S-Transferase) oder einem fluoreszierenden Protein wie GFP (green fluorescent protein), kommen unter ähnlichen Gesichtspunkten wie Antikörper zum Einsatz. Sie werden zum einen verwendet um über den Proteintag das Fusionsprotein zu präzipitieren und so Interaktionsproteine zu untersuchen oder um das Zielprotein in der Zelle sichtbar zu machen.

Insbesondere kann mit fluoreszierenden Fusionsproteinen, im Gegensatz zu Antikörpern, die Dynamik des Antigens verfolgt werden. Verschiedene Studien des β -Catenin/Wnt-Signalwegs verwenden Fusionen mit fluoreszierenden Proteinen (GFP, YFP oder RFP), um die Lokalisation und Dynamik der entsprechenden Zielproteine zu untersuchen. [95-97]. Jedoch sind auch hier Schwächen bekannt. So kann die Expression von Fusionsproteinen zu einem Anstieg der Antigen-Menge innerhalb der Zelle führen. Diese Überexpression führt im Falle von β -Catenin zu einer Sättigung des Destruction-Komplexes und es wird eine Stabilisierung des β -Catenin-Pools simuliert. Daraufhin kann eine Aktivierung der WRE beobachtet werden [98]. Es besteht die Möglichkeit, dass Fusionsproteine durch Überexpressionseffekte in die Regulation und Funktion des Antigens erheblich einwirken. Alle Beobachtungen, sei es von Immunpräzipitationsexperimenten oder solchen der Verfolgung der Dynamik, könnten in Frage gestellt werden. Denn die Ergebnisse entsprechen möglicherweise nicht dem Wildtypstatus. Ein weiterer Aspekt ist der Fusions-Tag: Durch eine Proteinfusion wird der wildtypischen AS-Sequenz eine artefizielle Verlängerung angehängt. Dies kann die Funktion des Proteins ebenfalls verändern. Dieses resultiert möglicherweise in Konformationsänderungen am Antigen, Änderungen der physikalischen Eigenschaften (Löslichkeit, Stabilität, usw.) oder der Maskierung von Epitopen, die wichtig sind für die Interaktion mit Interaktionsproteinen [99, 100].

3.7. Einzeldomänen Antikörper/ Nanobodies (Nbs)

Die Limitationen herkömmlicher Methoden zur Untersuchung von β -Catenin machen es notwendig neue Techniken zur Visualisierung anzuwenden, deren Vorteil in einer transienten Bindung des Binders/Antikörpers an das Antigen liegen. Rekombinante Techniken zur Herstellung und Verwendung rekombinanter Antikörper oder neuartiger Proteine, Peptid- oder Nukleinsäuren-basierte Bindemoleküle, eröffnen hier neue Möglichkeiten Bindemoleküle zu selektionieren, die einerseits hohe Spezifität und Selektivität aufweisen und andererseits durch eine möglichst geringe Interferenz mit den zellulären Funktionen des Antigens auffallen. Ein weiterer Vorteil ist die intrazelluläre Expression. Solche rekombinanten Bindemoleküle lassen sich grob einteilen in antikörperbasierte und nicht-antikörperbasierte Moleküle. Zu den nicht auf einem Antikörpergerüst basierenden Bindemolekülen zählt man FN3, welches von der Domäne 10 von Fibronectin Typ III abgeleitet ist, DARPs, die auf Ankyrinwiederholungen basieren und Aptamere, die aus kurzen zufallsgenerierten DNA und mRNA-Bibliotheken isoliert werden [91, 101-104].

3.7.1. VH-basierte Antikörperfragmente (Fabs & scFvs)

Neben den artifiziell erstellten Bindemolekülen greifen viele Anwendungen auf die rekombinante Antikörpertechnologie zurück. Konventionelle IgG bestehen aus zwei schweren

Proteinketten und zwei leichten Ketten, welche über vier Disulfidbrücken miteinander kovalent verbunden sind [105]. Eine schwere (VH) und eine leichte Kette (VL) bilden mit ihren variablen Enden am N-Terminus, die für die Antikörper Erkennung/Bindung zuständig sind, eine monovalente Bindestelle. Dabei wird die Bindung über jeweils (VH und VL) drei variable Domänen in den N-terminalen Enden vermittelt. Diese Enden werden als komplementaritätsbestimmende Regionen („complementary determining regions“/ CDRs) bezeichnet [106] (Abbildung 4).

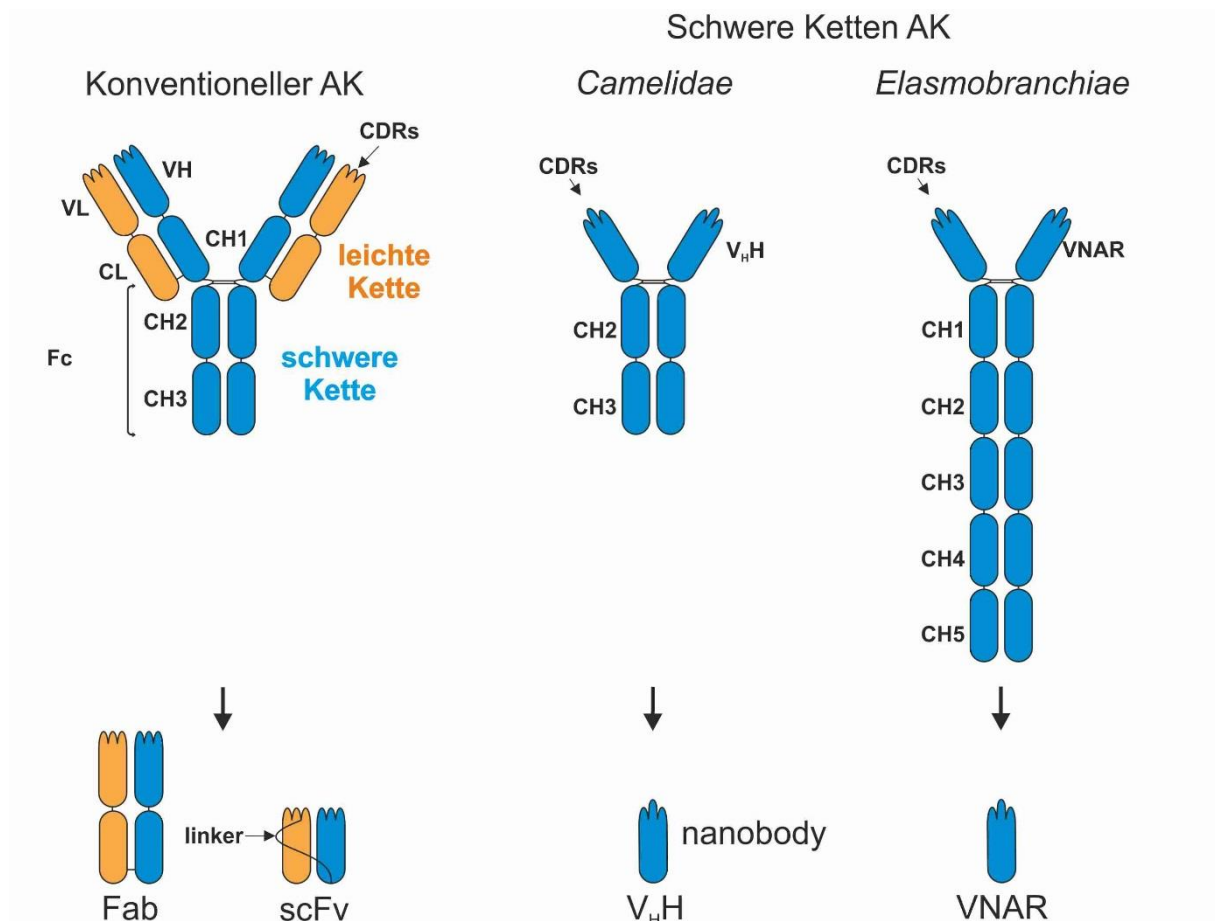


Abbildung 4: Antikörper und Antikörperfragmente. Schematische Darstellung von Immunglobulinen (Ig) und Antikörperfragmenten, die sich davon ableiten. Ein konventioneller IgG besteht aus zwei identischen schweren Ketten und zwei identischen leichten Ketten, verbunden über vier Disulfidbrücken. Die Antigenerkennung findet über je 3 komplementäre determinierende Domänen (CDRs) einer variablen leichten und einer variablen schweren Kette statt. Die schweren und leichten Ketten bestehen zusätzlich aus konstanten Domänen (CH/CL). Der Fc-Teil repräsentiert den Rezeptorerkennungsbereich des IgG. Über dem Antikörper sind die Antikörperfragmente illustriert. Fab-Fragmente repräsentieren einen vollständigen Arm ohne Fc-Teil. scFvs setzen sich aus VL und VH, die über einen flexiblen Peptidlinker verbunden sind, zusammen. In Camelidae und Elasmobranchiae kommen neben den konventionellen IgGs auch Antikörper vor, die nur aus schweren Ketten bestehen. Darüber sind die jeweiligen Einzeldomänen Antikörper (Nb) dargestellt. Das VHH-Fragment (auch: nanobody) aus dem Camelidae basierten AKs und der VNAR aus den Elasmobranchiae basierten AKs bestehen nur aus dem N-terminalen Endstück des Antikörpers, welches die CDRs enthält. Modifiziert nach Quelle: [107]

Fab und scFvs sind die häufigsten auf konventionellen Antikörpern basierten Bindemoleküle. Fab-Fragmente bestehen aus der vollständigen leichten Kette und der N-terminalen Sequenz der schweren Kette (~50 kDa). Beim scFv werden nur die Endstücke der Antikörperererkennungssequenzen von je einer leichten und einer schweren Kette über eine

flexible Peptidsequenz verbunden (~25 kDa) [108]. Im Gegensatz zu Fab-Fragmenten lassen sich ausgewählte scFvs intrazellulär exprimieren. Dies liegt einerseits am Fehlen von essentiellen Disulfidbrücken, denn diese können im reduzierenden Milieu des Zytoplasmas nicht gebildet werden und sind für die Faltung der Fab- und scFv-Fragmente essentiell. Andererseits wurde die Expression auch durch Verbesserung des strukturellen Aufbaus wie dem Austausch hydrophober AS durch hydrophile AS ermöglicht. Ebenfalls konnte durch das Erstellen von kombinatorischer Bibliotheken und durch die Entwicklung verbesserter Selektionsmethoden die Verfügbarkeit anwendungsspezifischer Antikörperfragmente erreicht werden [109-112].

3.8. VHHs/VNARs

Dennoch haben sich durch die Entdeckung von nur aus schweren Ketten bestehenden Antikörpern (heavy chain Antibody/ hcAb, aus Camelidae und Elasmobranchiae) neue Möglichkeiten zur Verwendung intrazellulärer Bindemoleküle aus Einzeldomänen Antikörper (,single domain antibody'/sdAb) ergeben [113-115]. Nbs werden aus den variablen Antigenbindedomänen der hcAbs gewonnen, die die CDRs enthalten (~15 kDa).

Die Eigenschaften der Nbs, die sie interessant für die Forschung, Diagnostik und Therapie machen, sind zwischen den Formaten VHH und VNAR sehr ähnlich. Die Eigenschaften die Nbs interessant als Bindemoleküle machen, sind ihre geringe Größe, Umweltstabilität und die vergleichsweise einfache Herstellung in verschiedensten Wirtssystemen. Die weiteren Eigenschaften werden im Folgenden erläutert.

Vergleichbar mit Antikörpern, wird die Erkennung des Antigens über die CDRs vermittelt. Diese bilden jedoch leicht nach außen gestülpte Schleifen (Abbildung 5). Im Besonderen die CDR3s, diese bilden häufig lange, konvexe, fingerähnliche Polypeptidschlaufen und erkennen meist Vertiefungen oder 3D-Strukturen ihres Antigens [116]. In vielen Nbs wird die CDR3 zusätzlich durch eine Disulfidbrücke zwischen Cysteinen im CDR3 und CDR1 oder FR2 stabilisiert [117] (Abbildung 5).

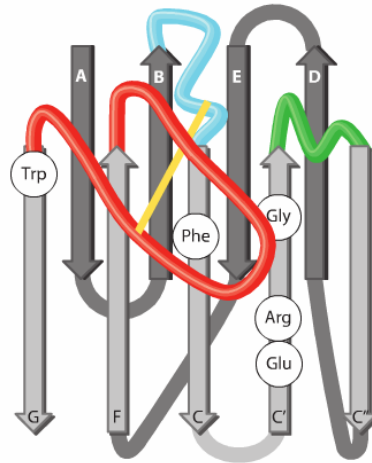


Abbildung 5: Nb Aufbau. Schematische Abbildung über Struktur und Aufbau eines Nbs. Das Gerüst besteht aus fassartig angeordneten β -Faltblättern (A-G), die die vier Gerüstsequenzen (FR1-4) repräsentieren. FR1 besteht aus A und B, FR2 aus C und C', FR3 aus C'', D, E und F, sowie FR4 aus G. Folgende Zuordnung der Farben wurde gewählt: Hellblau= CDR1, grün= CDR2 und rot= CDR3. Häufig wird beschrieben, dass der lange, flexible CDR3 über eine Disulfidbrücke (gelb) stabilisiert wird. Die Disulfidbrücke wird entweder mit der Gerüstsequenz von FR2 (E und D) oder wie hier mit dem CDR1 ausgebildet. Quelle: [118].

Ebenfalls bestehen Nbs, wie die VH-Domäne der konventionellen Antikörper, aus vier konservierten Gerüstsequenzen, in die die drei variablen CDRs eingebettet sind. Diese bestehen aus β -Faltblättern, die in einer ‚barrel‘-förmigen Struktur angeordnet sind ([119]). Ein weiterer Unterschied zwischen Nbs und der VH-Domäne ist die höhere Anzahl von hydrophilen AS in den variablen Domänen. Die hydrophoben AS in FR2, die in VHs für die Ausbildung der Interaktion durch hydrophobe Wechselwirkungen zwischen VH und VL wichtig sind, liegen in VHHs als hydrophile AS vor [119, 120]. Diese strukturellen Unterschiede sind der Grund für die positiven Eigenschaften und die Flexibilität der Nbs im Einsatz für Forschung, Diagnostik und Therapie. Durch ihre geringe Größe, Solubilität, hohe thermische und chemische Stabilität, sowie der einfachen Verwendung von Nb-Genfragmenten, ist die Selektion und rekombinante Produktion einfach [121-125]. Durch Klonierung der Nb-Gensegmente aus einer Nbs-Immunistheke in Phagen-Display-Vektoren können Phagen-Bibliotheken generiert werden. Die Selektion hochaffiner Binder findet im Anschluß über das Phagen-Display, einer Biopanning-Methode, statt. Nach der Selektion antigen-spezifischer Nb-Phagen können die Nb-Gensegmente einfach aus dem Phagen-genom extrahiert, in Vektoren für Produktionsstämme kloniert und effizient mit hoher Ausbeute in *Escherichia coli*, *Saccharomyces cerevisiae* oder *Pichia pastoris* exprimiert werden [126-130]. Bakterien garantieren hohe Konzentrationen an Nbs, wohingegen Hefen die Ausbildung von Disulfidbrücken erleichtern und das Produkt in das Wachstumsmedium sekretieren können. Auch für die Selektion sind alternative Methoden beschrieben. So werden auch das Hefe- oder Ribosomen-Display zur Selektion eingesetzt [131, 132]. Eine weitere Eigenschaft von Nbs ist ihre geringe Größe. Sie sind bisher die kleinsten beschriebenen rekombinanten Antikörper (~14 kDa). Diese und die hydrophile Ladung der Nbs ermöglichen sogar die Überwindung der

Blut-Hirn-Schranke (‘blood/brain barrier’, BBB), die bisher als eine der am schwierigsten zu überwindenden Barrieren für Therapeutika darstellt. [133, 134]. Eine andere Arbeit erreichte die Penetration der BBB mit Nbs, um Astrocyten *in vivo* anzufärben. Dies gelang über die Modifikation der AS-Sequenz des Nbs um den pI (Isoelektrischer Punkt) zu erhöhen. Der positiv geladene Nb lagert sich vermutlich an die negativ geladene Membran an und überwindet die Zellmembran durch endosomale Aufnahme [135]. Des Weiteren wurde berichtet, dass Nbs auch gegenüber extremen Umwelteinflüssen stabil sind. Selbst bei hohen Temperaturen, niedrigen oder hohen pH-Werten, Detergenzien und Proteasen zeigen sie eine hohe Resistenz und behalten ihre Funktionalität bei [121-125]. Die hohe Löslichkeit in wässrigen Medien und die damit einhergehenden hervorragenden Eigenschaften zur intrazellulären Expression wird dem hohen Anteil an hydrophilen AS zugeschrieben [136]. Die fingerähnliche Form der Schlaufe des CDR3, sowie die insgesamt konvexen Strukturen der CDRs, erkennen bevorzugt dreidimensionale Epitope und Kavitäten [107, 116, 118, 137, 138]. Diese Eigenschaften machen Nbs interessant auch für die biochemische Analyse und die Beobachtung der Dynamik von komplexen Signalwegen wie dem kanonischen Wnt-Signalweg. Die geringe Größe, Stabilität in reduzierenden Medien, sauren oder basischen Umgebungen, sowie die Löslichkeit in wässrigen Medien, machen Nbs optimal für den intrazellulären Einsatz. In Kombination mit einem fluoreszierenden Protein können sie dazu verwendet werden endogene Zielstrukturen sichtbar zu machen [139]. Darüber hinaus besteht die Möglichkeit Nbs zur gezielten Immunmodulation der Proteinfunktion in der lebenden Zelle zu verwenden [140].

3.9. Zielsetzung der Arbeit

Die große Bedeutung von β -Catenin für eine Vielzahl von essentiellen Prozessen in Homöostase und Zellentwicklung, sowie bei der Entstehung von diversen Erkrankungen machen β -Catenin zu einem wichtigen Ziel für die Forschung. Ziel dieser Arbeit war, das Potential von Nbs als neue Forschungsreagenzien für Studien an β -Catenin zu untersuchen. Dazu sollten Nbs mittels Phagen-Display aus einer Llama-Immunbibliothek-basierten Nb-Phagen-Bibliothek selektiert und die Spezifität der Einzelklone mit einem Phagen-ELISA nachgewiesen werden. Im Anschluss sollte dann die Charakterisierung der biochemischen Eigenschaften stehen. Dazu fand die Messung von Sensitivität, Spezifität, Affinität und Domänen- und Epitopkartierung statt. Die intrazelluläre Charakterisierung sollte Eigenschaften wie Zytotoxizität, Expression und Interferenz mit der Funktion des endogenen β -Catenins untersuchen. Aufgrund der ermittelten Eigenschaften folgte dann der Einsatz in biochemischen Methoden wie Immunpräzipitationsexperimenten mit nachgeschalteter Analyse des Interaktoms entweder mit der Immunblotmethode oder durch Massenspektrometrie und Datenbankenabgleich. Ebenfalls sollte die Anwendung eines diagnostischen Assays für

multiplexe Analysen, sowie der Einsatz für die Immunfluoreszenz im WB untersucht werden. Im Anschluß sollte anhand der intrazellulär bestimmten Fähigkeiten der Einsatz in zellulären Assays untersucht werden.

4. Material & Methoden

4.1. Material

4.1.1. Chemikalien und Lösungen

Tabelle 2: Auflistung der verwendeten Chemikalien, Puffer und Lösungen

Chemikalien / Puffer/ Lösungen	Hersteller
10x RIPA Puffer	ChromoTek, Martinsried, Deutschland
10x T4 DNA-Ligase Reaktionspuffer	New England Biolabs GmbH, Frankfurt, Deutschland
Isopropanol	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
2x YT Medium (2xYT)	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
3,3',5,5'-Tetramethylbenzidin (TMB)	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
5x Phusion HF- Puffer	New England Biolabs GmbH, Frankfurt, Deutschland
6x DNA Loading Dye	Thermo Scientific GmbH, Schwerte, Deutschland
Essigsäure, 99-100%	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
Aceton	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
Akrylamid-Bisakrylamid	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
Agarose	Serva Electrophoresis GmbH, Heidelberg, Deutschland
Ammoniumperoxodisulfat (APS)	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
Ampicillin	AppliChem GmbH, Darmstadt, Deutschland

Chemikalien / Puffer/ Lösungen	Hersteller
ATTO dye (NHS Ester)	ATTO-TEC GmbH, Siegen, Deutschland
Blasticidin	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
β -Mercaptoethanol	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
BSA	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München, Deutschland
CHIR 99021	Tocris Bioscience, Bristol, UK
Coomassie Brilliant Blue G250, R250	Serva Electrophoresis GmbH, Heidelberg, Deutschland
DAPI (4,6-diamidino-2-phenylindole)	Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Deutschland
Di-Natriumhydrogenphosphat	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
DMEM, high glucose, with phenolred	Life Technologies GmbH, Darmstadt, Deutschland
DMEM/HAMs F12	Life Technologies GmbH, Darmstadt, Deutschland
DMSO ≥ 99 %	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München, Deutschland
DNase I	AppliChem GmbH, Darmstadt, Deutschland
dNTP-Mix	New England Biolabs GmbH, Frankfurt, Deutschland
EDTA	AppliChem GmbH, Darmstadt, Deutschland
Estradiol	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München, Deutschland
Ethanol, absolut	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München, Deutschland

Chemikalien / Puffer/ Lösungen	Hersteller
Ethanol, denatured	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
Ethidiumbromid-Lösung (0,025 %)	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
Fötales Kälberserum	Life Technologies GmbH, Darmstadt, Deutschland
Formaldehyd (37%)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München, Deutschland
G418	Life Technologies GmbH, Darmstadt, Deutschland
GeneRuler 1 kb plus DNA Ladder	Thermo Scientific GmbH, Schwerte, Deutschland
Glucose D (+)	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
Glycin	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
Hoechst 33342 Solution	Life Technologies GmbH, Darmstadt, Deutschland
Salzsäure 37%	AppliChem GmbH, Darmstadt, Deutschland
Wasserstoffperoxid	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München, Deutschland
Hygromycin	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
Hyperphage (M13K07ΔpIII)	Progen Biotechnik GmbH, Heidelberg, Deutschland
Imidazol	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München, Deutschland

Chemikalien / Puffer/ Lösungen	Hersteller
Isopropyl-beta-D-thiogalaktopyranosid (IPTG)	Diagonal GmbH, Münster, Deutschland
Kanamycin	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
L-glutamine	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München, Deutschland
Lipofectamin 2000	Life Technologies GmbH, Darmstadt, Deutschland
Lithiumchlorid	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
Luria Broth (LB) Medium	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
Lysozym	AppliChem GmbH, Darmstadt, Deutschland
Magnesiumchlorid	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München, Deutschland
Methanol, min. 99 %	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
Midiprep System PureYield Plasmid	Promega GmbH, Mannheim, Germany
Milchpulver, Blotting Grade	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
NEB- Puffer 1-4, CutSmart	New England Biolabs GmbH, Frankfurt, Deutschland
NHS-activated Sepharose™ 4 Fast Flow	GE Healthcare, Uppsala, Schweden
NucleoSpin Gel and PCR Clean-up Kit	Macherey-Nagel, Düren, Deutschland
NucleoSpin Plasmid Kit	Macherey-Nagel, Düren, Deutschland
NP-40	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, Deutschland

Chemikalien / Puffer/ Lösungen	Hersteller
PageRuler™ Prestained Protein Ladder Plus	Fermentas GmbH, St.Leon-Rot, Deutschland
Phenylmethansulfonylfluorid (PMSF)	SERVA Electrophoresis GmbH, Heidelberg, Deutschland
Phosphate Buffered Saline (PBS), 1x	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München, Deutschland
Phusion™ High-Fidelity DNA Polymerase	New England Biolabs GmbH, Frankfurt, Deutschland
Pierce protein free blocking Puffer	Thermo Scientific GmbH, Schwerte, Deutschland
Polyakrylamidmix 30%	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
Polyethyleimin (PEI)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München, Deutschland
Ponceau S	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München, Deutschland
Kaliumchlorid	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München, Deutschland
Protease Inhibitor Mix M	SERVA Electrophoresis GmbH, Heidelberg, Deutschland
Resazurin (alamarBlue®)	AbD Serotec, Puchheim, Deutschland
Restriktionsenzyme	New England Biolabs GmbH, Frankfurt, Deutschland
RNase A (10 mg/ml)	AppliChem GmbH, Darmstadt, Deutschland
Roti Phenol	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
Roti Phenol/Chloroform/Isoamylalkohol	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, Deutschland

Chemikalien / Puffer/ Lösungen	Hersteller
Rubidiumchlorid	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
Select Agar	Invitrogen GmbH, Karlsruhe, Deutschland
Natriumbikarbonat	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Deutschland
Natriumkarbonat	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Deutschland
Natriumchlorid	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
Natrium-dodecyl-sulfate (SDS)	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
Schwefelsäure, 96 %	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
T4 Ligationskit	New England Biolabs GmbH, Frankfurt, Deutschland
TEMED	Carl Roth GmbH & Co.KG, Karlsruhe, Deutschland
Tris (Trisaminomethan)	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
Triton X-100	Carl Roth GmbH & Co.KG, Karlsruhe, Deutschland
Trypsin/EDTA (1:250)	PAA Laboratories GmbH, Cölbe, Deutschland
Tween 20	Carl Roth GmbH & Co.KG, Karlsruhe, Deutschland

4.1.2. Geräte

Tabelle 3: Auflistung der verwendeten Geräte

Gerätebezeichnung	Hersteller
ÄKTA FPLC system UPC 900	GE Healthcare, Uppsala, Schweden
Autoklav VX-95	Systec GmbH, Wettenberg, Deutschland
Biacore 2000	GE Healthcare, Uppsala, Schweden
Cell Observer SD	Zeiss AG, Oberkochen, Deutschland
CO2-Inkubator CB150	Binder GmbH, Tuttlingen, Deutschland
Elektrophorese-Kammer	Bio-Rad Laboratories GmbH, München, Deutschland
Envision 2102 Multilabel Reader	Perkin Elmer, Rodgau, Deutschland
FlexMap3D	Luminex, Austin, Texas, USA
GFL Wasserbad 1002	GFL, Burgwedel, Deutschland
GFL Wasserbad 1083	GFL, Burgwedel, Deutschland
INTAS UV Dokumentationssystem	INTAS, Goettingen, Deutschland
Konfocales Laserscan Mikroskop LSM510	Zeiss AG, Oberkochen, Deutschland
Lichtmikroskop TMS-F	Nikon, Duesseldorf, Deutschland
Magnetrührer RCTbasic	IKA-Werke GmbH, Staufen, Deutschland
Mikroskop Axiovert 200M	Zeiss AG, Oberkochen, Deutschland
Mikroskop Olympus CKX 41	Olympus, Hamburg, Deutschland
Multipipete plus	Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland
Mupid One electrophoresis unit	NIPPON Genetics EUROPE GmbH, Dueren, Deutschland
Neubauerkammer	Brand, Wertheim, Deutschland

Gerätebezeichnung	Hersteller
PCR device Primus 96 plus	MWG Biotech AG, Ebersberg, Deutschland
PHERASTAR Plattenlesegerät	BMG Labtech, Offenburg, Deutschland
pH-Meter	Mettler-Toledo GmbH, Giessen, Deutschland
Photometer	Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland
Pipet HandyStep	Brand GmbH & Co KG, Wertheim, Deutschland
Pipetboy	Integra BioSciences, Fernwald, Deutschland
Pipette, 8-Kanal, 0,5 µl - 10 µl	Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland
Pipetten 10 µl, 20 µl, 100 µl, 200 µl, 1000 µl	Brand GmbH & Co KG, Wertheim, Deutschland
Platteninkubator	Heraeus Instruments, Hanau, Deutschland
Power supply gel elektrophoresis MP-300V	Major Science, Saratoga, CA, USA
PowerPac Basic Power Supply	Bio-Rad Laboratories GmbH, München, Deutschland
Schüttelinkubator C25	New Brunswick Scientific, Nürtingen, Deutschland
Semi-Dry Transferzelle	Bio-Rad Laboratories GmbH, München, Deutschland
Sonifier Sonopuls HD60/UW60	Bandelin, Berlin, Deutschland
Spektrometer NanoDrop 2000	Thermo Scientific, Schwerte, Deutschland
Sterilbank	BDK GmbH, Sonnenbühl-Genkingen, Deutschland
Thermomixer comfort	Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland
Typhoon Trio Scanner	GE Healthcare, Uppsala, Schweden
Überkopfroter	Bachofer, Reutlingen, Deutschland
Vortex Genie 2	Scientific Industries, Karlsruhe, Deutschland

Gerätebezeichnung	Hersteller
Waage AE160	Mettler-Toledo GmbH, Giessen, Deutschland
Waage BP 3100S	Sartorius AG, Göttingen, Deutschland
Waage CPA225D-0CE	Sartorius AG, Göttingen, Deutschland
Waage XS205 DualRange	Mettler-Toledo GmbH, Giessen, Deutschland
Zentrifuge 5415R	Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland
Zentrifuge 5424	Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland
Zentrifuge 5810R	Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland
Zentrifuge Megafuge 1.0R	Heraeus Instruments, Hanau, Deutschland
Zentrifuge Universal 2S	Hettich GmbH & Co KG, Tuttlingen, Deutschland

4.1.3. Verbrauchsmaterial

Tabelle 4: Auflistung der verwendeten Verbrauchsmaterialien

Verbrauchsmaterial	Hersteller
µClear 96-well Platte	Greiner Bio-One, Frickenhausen, Deutschland
µ-slide, 8-well, unbeschichtet	Ibidi GmbH, Martinsried, Deutschland
96 well assay block	Thermo Scientific GmbH, Schwerte, Deutschland
Amersham Protran 0,45 µm Nitrozellulose	GE Healthcare, Uppsala, Schweden
Amicon® Ultra Centrifugal Filter Röhrchen	Millipore S.A.S., Molsheim, Frankreich
Assay Block, 96-well, 2 ml	Schubert & Weiss, München, Deutschland
Blotting Paper Grad 703	Bio-Rad Laboratories GmbH, München, Deutschland
CM5 Chip für Biacore	GE Healthcare, Uppsala, Schweden

Verbrauchsmaterial	Hersteller
Entsalzungssäulchen PD-10	GE Healthcare, Uppsala, Schweden
Zentrifugengefäße (15 ml und 50 ml)	Sarstedt AG & Co., Nümbrecht, Deutschland
Zentrifugengefäße (15 ml und 50 ml)	Greiner Bio-One, Frickenhausen, Deutschland
Filtropur S 0.2	Sarstedt AG & Co., Nümbrecht, Deutschland
Filtropur S 0.45	Sarstedt AG & Co., Nümbrecht, Deutschland
GFP-multiTrap, GFP-Trap, RFP-Trap	ChromoTek GmbH, Martinsried, Deutschland
HisTrap™ FF column, 1 ml	GE Healthcare, Uppsala, Schweden
Kryoröhrchen, 1,8 ml	Greiner Bio-One, Frickenhausen, Deutschland
Kulturschale, 92 x 16 mm	Sarstedt AG & Co., Nümbrecht, Deutschland
Kulturschale, 145 x 20 mm	Greiner Bio-one, Frickenhausen, Deutschland
LoBind Röhrchen	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
Multiwell Platte: 6, 12, 24, 48, 96 well, steril	Corning GmbH, Wiesbaden, Deutschland
NHS-activated Sepharose 4 Fast Flow	GE Healthcare, Uppsala, Schweden
Nitrozellulosemembran	Bio-Rad Laboratories GmbH, München, Deutschland
PageRuler Plus Prestained Protein Ladder	Thermo Scientific, Schwerte, Deutschland
Parafilm	Brand GmbH & Co. KG, Wertheim, Deutschland
PCR-Reaktionsröhrchen, 200 µl/500 µl	Sarstedt AG & Co., Nümbrecht, Deutschland
pH Indikatorstreifen, pH 0-14	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
Pipettenspitzen (10, 20, 200, 1000, 1250 µl)	Starlab GmbH, Hamburg, Deutschland
Protino® Ni-NTA Agarose	Macherey-Nagel, Düren, Deutschland
Reaction tube 1,5 ml / 2 ml (steril)	Sarstedt AG & Co., Nümbrecht, Deutschland

Verbrauchsmaterial	Hersteller
Spritze (2, 5, 10, 20, 50 ml)	B. Braun Melsungen AG, Melsungen, Deutschland
Spritzenfilter (0,22 µM, 0,45 µM)	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
Superdex 75 10/300 GL	GE Healthcare, Uppsala, Schweden
Typhoon TRIO	GE Healthcare, Uppsala, Schweden
UV Küvetten	Brand GmbH & co KG, Wertheim, Deutschland
Zellkulturflaschen T-25, T-75, T-125	Corning GmbH, Wiesbaden, Deutschland
Zellkulturschalen, p100	Corning GmbH, Wiesbaden, Deutschland
Magplex—beads	Luminex, Austin, Texas, USA

4.1.4. Antikörper

Nachfolgende primäre Antikörper wurden angewendet.

4.1.4.1. Primäre AK

Tabelle 5: Auflistung der verwendeten Primär-AK

AK (Spezies)	Hersteller
anti-GFP 3H9 (Ratte, mAb)	ChromoTek, München, Deutschland
anti-RFP 3F5 (Maus, mAb)	ChromoTek, München, Deutschland
anti-GAPDH (Hase, pAb)	Santa Cruz, Dallas, USA
anti-His6 (Maus, mAb)	GE Healthcare, Uppsala, Schweden
anti-TagRFP (Hase, mAb)	evrogen, Moscow, Russia
anti-vimentin clone V9 (Maus, mAb)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München, Deutschland
anti-M13 (Maus, mAb), HRP conjugate	GE Healthcare, Uppsala, Schweden

AK (Spezies)	Hersteller
anti- β -Catenin, Klon 14 (Maus)	BD-Biosciences, Heidelberg, Deutschland
anti-active- β -Catenin (anti-ABC), Klon 8E7	Millipore S.A.S., Molsheim, Frankreich
anti-non-phospho- β -Catenin (Ser33/37/Thr41), Klon D13A1	Cell Signaling, Leiden, Niederlande
anti-E-Cadherin, Klon 24E10	Cell Signaling, Leiden, Niederlande
anti-TCF4, Klon 6H5-3	Millipore S.A.S., Molsheim, Frankreich
anti-GSK3 β , Klon 27C10	Cell Signaling, Leiden, Niederlande
anti- α -catenin, Klon 6D202	US Biologicals, Salem, MA, USA
anti-TCF1, Klon C46C7	Cell Signaling, Leiden, Niederlande
anti-Axin1, Klon C7B12	Cell Signaling, Leiden, Niederlande
IRDye 680CW/ 800CW	LI-Core, Bad Homburg, Deutschland

4.1.4.2. Sekundäre AK

Tabelle 6: Auflistung der Sekundär-AK

Antikörper (Spezies)	Hersteller
anti-Maus (Ziege) Alexa 488/546/647 konjugiert	Life Technologies GmbH, Darmstadt, Deutschland
anti-Hase (Ziege) Alexa 488/546/647 konjugiert	Life Technologies GmbH, Darmstadt, Deutschland
anti-Ratte (Ziege) Alexa 488/546/647 konjugiert	Life Technologies GmbH, Darmstadt, Deutschland

4.1.5. Oligonukleotide

Die folgenden Oligonukleotide wurden von Metabion (Martinsried, Deutschland) hergestellt.

Tabelle 7: Auflistung der verwendeten Oligonukleotide

Oligos	Sequenz
VHH-I-fwd	5'-GGG GAG ATC TCC GGC CAT GGC TCA GGT GCA GCT GGT GGA GTC TGG-3'
VHH-II-fwd	5'-GGG GAG TTC TCC GGC CAT GGC TCA GGT GCA GCT GCA GGA GTC TGG-3'
VHH-III-fwd	5'-GGG GAG ATC TCC GGC CAT GGC TCA TGT GCA GCT GCA GGA GTC TGG-3'
VHH-I-rev	5'-GGG GGA AGC TTC TTG AGG AGA CGG TGA CCT GCA T-3'
VHH-II-rev	5'-GGG GGA AGC TTC TTG AGG AGA CGG TGA CCT GGG-3'
VHH-III-rev	5'-GGG GGA AGC TTC TGC TGG AGA CGG TGA CCT GGG T-3'
GFP-BC5T(BC5T-5)- for	5'-GCA CCA TGG ATG GTG AGC AAG GGC GAG G-3'
GFP-BC5T(BC5T-5)- rev	5'-GAC GTC GAC TTA TGC TGC CAG TGA CTA ACA GCC-3'
VIM-mCherry-fwd	5'-AAA AGC TTA GGT GGA GGA GGT TCT TCC ACC AGG TCC GTG TC-3'
rev-mcherry-Vim- BC5T-KpnI	5'-AAG GTA CCC TAT TGC TGC CAG TGA CTA ACA GCC GCT TTT CTG TCT GGT TCA AGG TCA TCG TG-3'

4.1.6. Vektoren

Diese Vektoren wurden als 'backbones' für die Klonierung verwendet.

Tabelle 8: Auflistung der verwendeten Plasmid-Vektoren

Vektoren	Hersteller
pRSETB	Addgene, Cambridge, USA
pGEX-6P-1	Addgene, Cambridge, USA
pEGFP-N1	Clontech, Mountain View, USA
pEGFP-C1	Clontech, Mountain View, USA
pHEN4	(Arbabi Ghahroudi et al., 1997)
pHEN6c	(Conrath et al., 2001)
pmCherry-C1	bereitgestellt von Labor Heinrich Leonhardt, LMU München, Deutschland

4.1.7. DNA Konstrukte

Diese durch Klonierung hergestellten DNA-Konstrukte wurden in dieser Arbeit verwendet.

Tabelle 9: Auflistung der hergestellten und zur Verfügung gestellten DNA-Konstrukte

Konstrukt	Vektorgerüst
β -Catenin-GST	pGEX6P-1
β -Catenin-Nt-GST	pGEX6P-1
β -Catenin-Ct-GST	pGEX6P-1
β -Catenin-ARM-GST	pGEX6P-1
His6- β -Catenin	pRSETB
GFP- β -Catenin	peGFP-C1
CB-Plasmide BC-1, -2, -6, -9 und -13	peGFP-C1

4.2. Methoden

4.2.1. Molekular-biologische Methoden

4.2.1.1. Restriktionsverdau von DNA

Beim Restriktionsverdau von DNA-Fragmenten, PCR-Amplifikaten und Plasmid-DNA wurden Restriktionsenzyme von New England Biolabs verwendet. Die Anwendung der Enzyme erfolgte nach Angaben des Herstellers.

4.2.1.2. Agarose-Gelelektrophorese von DNA-Fragmenten

Die Trennung der DNA erfolgte durch Agarose-Gelelektrophorese. Als Laufpuffer diente 1x Tris-Acetat-Puffer. Je nach der zu erwartenden DNA-Basenlänge wurden 0,5% (w/v), 1% (w/v) oder 2 %-ige (w/v) Agarosegele eingesetzt. Die DNA wurde durch Zugabe von Ethidiumbromid (0,025 µg/ml) unter UV-Bestrahlung sichtbar gemacht.

4.2.1.3. DNA Reinigung aus Agarosegelen

Zur Isolierung der DNA aus Agarosegelen diente das DNA-Extraktionskit NucleoSpin Extract Kit. Die Isolierung und Reinigung erfolgte nach Herstellerangaben.

4.2.1.4. Ligation

Die Ligation von DNA Molekülen erfolgte über Nacht (üN) bei 16 °C oder 4 h bei RT. Das Endvolumen der Lösung betrug 10 µl mit 1x T4-Ligationspuffer (0,5 mM ATP) und enthielt 100 ng Vektor. Das molare Verhältnis von Vektor zu Insert betrug 1:3.

4.2.1.5. Reinigung von Plasmid-DNA

Abhängig vom Volumen der Bakterienkulturen, wurden zwei verschiedene DNA Extraktionskits verwendet: Das NucleoSpin® Plasmid Kit (1-10 ml Kultur) oder das Midiprep System PureYield Plasmid® (50-200 ml). Die Durchführung der Extraktion fand nach Herstellerangaben statt. Die DNA-Konzentration wurde mittels Spektrometrie bestimmt.

4.2.1.6. Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

Für die PCR zur Amplifikation von DNA Molekülen wurden 30 Zyklen gewählt. PCR-Ansätze enthielten die Template-DNA, zwei Oligonukleotid-Primer, Desoxynukleotid-triphosphate (dNTPs), magnesiumchlorid-haltige (MgCl₂) Reaktionspuffer und die thermostabile Phusion-Polymerase (siehe Tabelle 10). Ein exemplarisches PCR-Amplifikationsprogramm ist in Tabelle 11 beschrieben.

Tabelle 10: Exemplarischer PCR-Ansatz

Komponenten	Menge/Volumen	finale Konzentration
Template	50 ng	50 ng
Vorwärts Primer (c= 10 pmol/μl)	1 μl	0.2 μM
Rückwärts Primer (c= 10 pmol/μl)	1 μl	0.2 μM
5x Phusion-Puffer	10 μl	1x
dNTP-Mix (c= 10mM/Nukleotid)	1 μl	200 μM/Nukleotid
Phusion-Polymerase	1 μl	0.08 U/μl
ddH ₂ O	ad 50 μl	

Tabelle 11: Exemplarisches PCR-Programm

Schritt	Temperatur	Zeit	Anzahl der Zyklen
Initiale Denaturierung	94°C	30 s	1
Denaturierung	94°C	15 s	
Bindung	58°C	15 s	25-30
Extension	72°C	20 s	
Finale Extension	72°C	7 min	1
Kühlung	4°C	∞	

4.2.1.7. Transformation von chemisch-kompetenten Bakterien

Die Transformation erfolgte mit chemisch-kompetenten (CaCl₂-Methode) JM110, TG1, XL1 Blue oder BL21 Bakterienzellen (*E. coli*). 50-100 ng Plasmid-DNA oder 10 µl Ligationsansatz wurden mittels Hitzeschock bei 42 °C transformiert. Zu Beginn wurden die Bakterien auf Eis inkubiert, dann fanden der Hitzeschock (30 sec) und die anschließende Inkubation mit SOC-Medium (1 h bei 37 °C und 300 rpm) statt. Der Transformationsansatz wird nachfolgend auf Selektionsagarplatten (Ampicillin und/oder Kanamycin) ausgestrichen und bei 37 °C üN inkubiert.

4.2.1.8. Kultivierung von Bakterien

Die Kultivierung von Bakterien geschah entweder in LB- oder 2xYT-Medium (mit oder ohne Zusatz von 2 % Glucose) bei 37 °C in einem Schüttelinkubator. Das Kulturmedium wurde mit Antibiotikum (Ampicillin oder Kanamycin) versetzt. Die optische Dichte (OD) der Kulturen ließ sich mittels UV-Spektrometer bestimmen.

4.2.2. Immunologische Methoden

Chromotek stellte die Phagen-Bibliothek mit einer Diversität von 10⁷ Klonen zur Selektion von β-Catenin-spezifischen Nbs zur Verfügung. Die Immunbibliothek stammte aus Alpakas (*Vicugna pacos*), die mit rekombinantem β-Catenin immunisiert worden waren. Die Phagen-Bibliothek wurde durch Klonierung von Nb-kodierenden DNA-Sequenzen in einem Phagenvektor erstellt. Die Selektion der Nbs wurde über Phagen-Display und Phagen-ELISA erreicht.

4.2.2.1. Vorbereitung der Phagen für das Phagen-Display

Zur Herstellung von Phagen wurden mit Nb-Phagemid transformierte TG1-Bakterien in 2xYT Medium (Ampicillin und Glucose) inokuliert. Anschließend infizierte man die Zellen mit M13-Hyperphagen (Progen). Nach einem Inkubationsschritt von 30 min bei 37 °C konnte die Kultur durch Zentrifugation geerntet und erneut in 2xYT-Medium (100 µg/ml Ampicillin und 25 µg/ml Kanamycin) resuspendiert werden. Danach wurde die Kultur üN im Schüttelinkubator (New Brunswick) bei 37 °C inkubiert. Die Ernte der Phagen aus dem Kulturüberstand erreichte man durch Inkubation mit 20 % Polyethylenglykol 6000 (PEG6000) für 1 h auf Eis und anschließender Zentrifugation (30 min, 4000 rpm, 4°C). Anschließend wurde das Phagen-Pellet in 1xPBS resuspendiert.

4.2.2.2. Feststellung der Diversität der VHH-Bibliothek

Um die Diversität der Phagen-Bibliothek zu erfassen wird nach jedem Panning der Phagen-Titer durch Zählung der kolonienformenden Einheiten (cfu) bestimmt. Nach Ausstrich der

infizierten TG1-Zellen auf Ampicillin-Selektionsagar führt dies zu einer Kolonie je infizierte Zelle.

4.2.2.3. Festphasen Adsorptionspanning

Das Festphasenpanning führte man mit rekombinantem GST- β -Catenin oder GST-beschichteten Nunc-Immunitube Maxisorp Röhrchen durch. Die Blockierung freier Positionen fand mit 5% Milchpulver (1xPBS) über 2 h bei RT statt. Das GST-beschichtete und geblockte Röhrchen wurde mit 1xPBS gewaschen und mit der Phagenlösung inkubiert (1 h, RT). Anschließend erfolgte die Verteilung der Phagenlösung auf das β -Catenin-beschichtete und das unbeschichtete Immunröhrchen (90 min, RT). Danach wurde die Phagenlösung verworfen und mit 1xPBS-Tween (10x) gewaschen. Die gebundenen Phagen eluierte man unter basischen Bedingungen in 1,4 %-iger TEA-Lösung. Die Neutralisierung wurde mit 1M Tris, pH7,5 durchgeführt. Die Reinfektion von TG1-Zellen erfolgte mit dieser Phagenlösung. Nach oben beschriebenem Prinzip wurden insgesamt drei Panning-Runden durchgeführt.

4.2.2.4. Phagen-ELISA

Die Selektion einzelner Phagenklone erfolgte mit einem Phagen-ELISA. Hierzu wurden einzelne Phagenklone in 96-Well, Deep-Well-Platten (Corning) kultiviert und präpariert. Eine immunabsorbierende 96-Well-Platte (Thermo Fisher Scientific) wurden mit β -Catenin üN bei 4°C beschichtet und mit 5% Milchpulver 1xPBS (4 h, RT) geblockt. Anschließend wird die 96-Well-Platte mit den präparierten Phagenlösungen inkubiert (2 h, RT). Danach erfolgten Waschschriffe mit 1xPBS-Tween und 1xPBS (je drei Mal). Gebundenen Phagen detektierte man mit HRP-konjugiertem anti-M13 Antikörper (GE Healthcare).

4.2.3. Zellkulturmethoden

4.2.3.1. Kultivierung von Zelllinien

Die Zellkulturarbeiten fanden unter einer Sterilbank statt. HeLa-Kyoto, HEK293T-, HCT116- und SW480-Säugerzelllinien wurden in DMEM+Glutamax, versetzt mit 10% FCS und 5 ml Penicillin/Streptomycin, bei 37 °C, 5% CO₂ und einer Luftfeuchtigkeit von 95% kultiviert. Spätestens alle 2-3 Tage wurde der Medienwechsel durchgeführt, subkonfluente Zellkulturen alle 2 Tage mit Trypsin/EDTA passagiert.

4.2.3.2. Aussaat, Inhibitorbehandlung und Transfektion von Säugerzelllinien

Für mikroskopische Assays und Luziferase-Reporter-Assays wurden die Zellen mit einer Dichte von 50-70 % in μ Clear 96-Well-Platten ausgesät.

Zur Herstellung von Lysaten erfolgte die Aussaat der Zellen bei einer Konfluenz bis zu 70 % in P-100-Zellkulturschalen.

Die Behandlung mit GSK3 β -Inhibitoren LiCl (20 mM) oder CHIR99021 (10 μ M) fand auf je 1×10^6 – 1×10^7 HEK293T-, HCT116-, SW480-Zellen für 24 h statt. Zur Kontrolle behandelte man die Zellen mit 0,5 % DMSO oder H₂O_{dd}. Anschließend wurden sie in eiskaltem 1xPBS gewaschen und geerntet. Die Lagerung der Zellpellets fand bei -20 °C oder -80 °C statt.

Die Transfektion fand 6 oder 24 h nach Aussaat statt. Hela-Kyoto-Zellen wurden mit PEI pH10, HEK293T-Zellen mit PEI pH7 und Zellen für Luziferase-Reporter-Assays mit Lipofectamine2000 transfiziert. Die pDNA (Plasmid-DNA) und das Transfektionsreagenz (PEI/Lipofectamine/Lipofectamine2000) wurden jeweils in DMEM verdünnt und anschließend gemischt. Nach einer 10minütigen Inkubation bei RT fügte man die Transfektionslösung den Zellen tröpfchenweise zu. Der Wechsel des Zellkulturmediums fand 6-12 h nach der Transfektion statt.

In P100-Schalen (Greiner) ausgesäte Zellen wurden mit 144 μ l PEI und 24 μ g pDNA transfiziert. Für die Transfektion in 96-Well- μ Clear wurde 0,1 μ g pDNA und 16 μ l PEI (HEK293T pH7,0 oder HeLa pH10) oder 0,2 μ l Lipofectamine2000 verwendet. Die Transfektion mit Lipofectamine erfolgte nach Herstellerangaben.

4.2.3.3. Fixierung von Zellen

Säugerzellen wurden mit 4% Paraformaldehyd (PFA) fixiert (10-15 min). Anschließend wurden die Zellen gewaschen (3x 1xPBS).

4.2.3.4. Metabolischer Zellvitalitäts-Assay

24 und 48 h nach Transfektion der HeLa-Zellen mit den CB (BC1-, BC6-, BC9-CB) oder EGFP kodierenden Plasmiden, wurden die Zellen für eine Stunde im Zellkulturmedium inkubiert, das Resazurin in einer Konzentration von 10 μ g/ml enthielt. Ein PHERAstar ELISA-Plattenlesegerät stand zum Auslesen der Fluoreszenz zur Verfügung. Der Zellvitalitäts-Assay wurde von Dr. Roman Anton (AG Rothbauer, pharmazeutische Biochemie, Universität Tübingen am NMI Reutlingen) durchgeführt.

4.2.3.5. Luziferase-Reporter-Assay

Die transkriptionelle Aktivität von β -Catenin wurde mittels eines TOPflash Luziferase-Reporter-Assays gemessen [141]. TOPflash- (TOP) und FOPflash-Plasmid (FOP; Kontrolle) wurden von Dr. Albert Braeuning zur Verfügung gestellt [142]. 2×10^4 HEK293T-Zellen wurden mit 50 ng Plasmid der TOP- oder FOP-Konstrukte und CMV-Renilla-Plasmid (pRen) in einem stöchiometrischen Verhältnis von 7:1 (Top/Fop;pRen) transfiziert. Zum Transfektionsansatz wird dann zusätzlich je 50 ng CB-Plasmid (BC1-CB, BC6-CB, BC9-CB) oder Kontrollplasmid peGFP zugegeben und anschließend die Zellen transfiziert. 24 Stunden danach wurden die

Zellen für weitere 4 h oder 24 h mit 10 mM LiCl-haltigem Medium inkubiert. Im Anschluss erfolgte die 'Dual Glo' Luziferase-Prozedur nach Angaben des Herstellers.

4.2.3.6. Mikroskopie

Die Zellen, die fluoreszierende Fusionsproteine (CBs, β -Catenin) exprimieren, wurden fixiert und mit einem Binokularen Auflicht-Mikroskop aufgenommen.

4.2.4. Biochemische Methoden

4.2.4.1. Protein Expression in *E. coli*

Die Nbs wurden in *E. coli* XL1 Blue und GST- β -Catenin/ β -Catenin-His6, sowie die β -Catenin-Proteindomänen in BL21 unter der Kontrolle eines *lac*-Promoters exprimiert. Die Expression induzierte man durch Zugabe von IPTG in das Kulturmedium. Eine \bar{u} N-Impfkultur (200 ml LB-Selektionsmedium, 37 °C, 150 rpm Schüttelinkubator) des Expressionsstammes diente zur Inokulation der Expressionskultur (2 l LB-Selektionsmedium). Die Bakterien wurden bis zu einer OD₆₀₀ von 0,6-0,8 (37 °C, 150 rpm, Schikanekolben) kultiviert. Anschließend induzierte man mit 0,5 mM IPTG. Die Expression der Proteine fand \bar{u} N (30 °C, 150 rpm) statt. Durch Zentrifugation (5 min, 5000g, 4°C) konnten die Bakterien pelletiert werden. Das Pellet wurde in 20 ml Binding-Puffer (nach Herstellerangaben siehe GSTrap/HisTrap-Protokoll [GE]) resuspendiert und eingefroren (-80 °C).

Die Lyse erfolgte enzymatisch mit 100 μ g/ml Lysozym und durch Scherkräfte einer Ultraschallbehandlung. Vor und nach einer Inkubation (1 h 30 min, 4 °C, Überkopfrator) wurde beschallt (je 10 x 10 Pulse). Mit PMSF (5 mM) und Protease Inhibitormix B (1:100) inhibierte man die Proteaseaktivität. Unlösliche Zellreste wurden durch Zentrifugation (18.000 g, 4 °C für 20 min) und Filtrierung (0,45 μ m PE-Spritzenfilter) des Überstands entfernt.

4.2.4.2. Immobilisierte Metallionen-Affinitätschromatographie (IMAC) mit Ni²⁺-NTA-Säulchen

Proteinreinigung von Hexa-His getaggtten Proteinen erfolgte über IMAC. Das Bakterienlysat wurde automatisiert über eine 1 ml FF HisTrap Säule (1 ml/min) gegeben. Nach einem Waschschrift (min. 5 Säulenvolumen Bindepuffer) wurde durch einen linearen Imidazol-Gradienten (500mM) das gebundene Protein eluiert (HisTrap-Elutionspuffer, lineare Steigerung von 0% bis 100%, 1 ml/min).

4.2.4.3. Affinitätschromatographie mit Glutathion-Säulchen

Die Reinigung von Glutathion-S-Transferase (GST) fusionierten Proteinen erfolgte mittels Affinitätschromatographie. Das Bakterienlysat wurde automatisiert über eine 1 ml FF GSTrap Säule (0,5 ml/min) gegeben. Nach einem Waschschrift (min. 5 Säulenvolumen Bindepuffer)

wurde mit reduziertem Gluthation (50 mM) in einer zweistufigen Elution (GST-Elutionspuffer-Elution 0%, 50%, 100%, 0,5 ml/min) gebundenes Protein eluiert.

4.2.4.4. Gelfiltration

Mittels Gelfiltration wurden die Proteine zusätzlich von Verunreinigungen getrennt und umgepuffert. Dazu wurde eine Superdex 75 Gelfiltrationssäule verwendet. Die Reinigung verlief automatisiert (0,5 ml/min, 1xPBS). Zu Beginn wurde die Säule mit einem Säulenvolumen 1xPBS equilibriert und im Anschluss mit Proteinlösung (max. 2 ml) beladen. Die Elution erfolgte durch 1,5 Säulenvolumen 1xPBS.

4.2.4.5. Kopplung von Nbs auf NHS-aktivierte Sepharose

Gereinigte Nbs wurden kovalent auf NHS-Sepharose nach Herstellerangaben gekoppelt.

4.2.4.6. Kopplung von Nbs mit Farbstoff NHS-Atto488

Gereinigte Nbs wurden kovalent mit NHS-Atto488 nach Herstellerangaben gekoppelt und überschüssiger Farbstoff mittels PD-10 Entsalzungssäulchen von der Proteinfraction abgetrennt.

4.2.4.7. SDS-PAGE, Western Blot und Coomassie Blue Färbung

Die Separierung der Proteine mittels SDS-PAGE erfolgte mit Polyakrylamid-Gelen laut Tabelle 12.

Tabelle 12: SDS-PAGE-Gel-Zusammensetzung

GEL	KOMPONENTEN
Trenngel	8-15% (w/v) Acrylamid; 0.08-0.3% (w/v) Bisacrylamid; 375 mM Tris/HCl pH8.8; 0.1% SDS, 0.05% (w/v) APS, 0.05% (v/v) TEMED
Sammelgel	5% (w/v) Akrylamid; 0.033% (w/v) Bisakrylamid; 60 mM Tris/HCl pH6.8; 0.1% SDS, 0.05% (w/v) APS, 0.1% (v/v) TEMED

Proteine wurden über SDS-Gele ihrer Größe nach aufgetrennt und mittels ‚Semi-dry blotting‘ auf Nitrozellulose transferiert (40 min bis 1 h 30 min, 25 mA/cm²). Anschließend erfolgte die Ponceaufärbung (5 min). Die Inkubation der Membran mit antigen-spezifischen Antikörpern (AK) fand in (5 % Milchpulver [MP] 1xTBST, 4 °C) statt. Anschließend nach einem Waschschrift (3x 5 ml 1xTBST) erfolgte die Detektion mit spezies-spezifischem AK, gekoppelt mit einem Fluoreszenzfarbstoff (5% MP 1xTBST, 1 h, RT). Zur Messung der Fluoreszenzsignale stand der Typhoon Laserscanner zur Verfügung. Die Auswertung der Signale geschah mit der Image Quant Software.

Die Proteine im SDS-Gel wurden mittels InstantBlue (Expedeon, 15 min, RT) oder Coomassie-Blue-Lösung angefärbt (1 h, RT). Durch aufeinanderfolgende Inkubation mit Entfärber 1 und 2 (je 1 h) konnte entfärbt werden. InstantBlue wurde mit H₂O_{dd} entfernt. Zur Dokumentation der Färbung wurden Typhoon Laserscanner und Image Quant Software genutzt.

4.2.4.8. Immunfärbung

Die Immunfärbung von fixierten und pmCherry-Vimentin-BC2-tag oder eGFP-BC2-tag transfizierten HeLa-Zellen fand durch BC2 gekoppelt mit Atto488 in µClear 96-Well-Platten statt. Die Zellen wurden mit 0,1% Triton (gelöst in 3% BSA 1xPBS, 20 min, RT) permeabilisiert. Anschließend erfolgte nach einem Waschschrift (1x 1xPBS) die Färbung mit BC2-Atto488 (üN, 4°C). Die Zellkernfärbung mit 4',6-Diamidin-2-phenylindol (DAPI) (1 µg/ml 1xPBS, 1 min, RT) fand nach einem weiteren Waschschrift (2x 1xPBS) statt.

4.2.4.9. Immunpräzipitation (IP) aus Säugerzelllysaten

Die Homogenisierung der Zellpellets (HEK293T, HCT116, SW480) fand (200 µl Lysepuffer) durch Pipettieren (auf Eis, 1 h alle 10 min) statt. Nach einem Zentrifugationsschritt (10 min, 4 °C, 18.000g) wurde der Überstand verdünnt (1:2,5 Verdünnungspuffer). Die Proteinkonzentrationsmessung erfolgte mit Coomasie Plus nach Herstellerangaben. Konzentrationen wurden auf die gleiche Höhe eingestellt. 10 µl Lysat wurde mit 4xLämmli-puffer (1:2) versetzt und als 'Input' deklariert. Die IP fand mit Nb-Agarose (50 µl) oder 5 µg Anti-β-Catenin Antikörpern (üN, 4 °C, je 200µl Lysat, Überkopfrator) statt. Die Antikörper wurden mit 50 µl Protein-A/G-Beads präzipitiert. Als Negativkontrolle diente inaktivierte Agarose oder GFP-Trap® Agarose. Anschließend wurde die Agarose pelletiert (2 min, 2500 g, 4 °C) und der Überstand, bis auf 2% (Durchfluss/'Flowthrough', 1:2 verdünnt mit 4xLämmli-puffer) verworfen. Auf einen Waschschrift (3x 1xPBS) folgte die Elution mit 2xLämmli-puffer ('Bound') in einem frischen Gefäß. Die Denaturierung der Proben erfolgte bei 95 °C (10 min). Über SDS-PAGE wurden die Proteine getrennt, auf eine Membran geblottet und mit spezifischen Antikörpern über Immunfluoreszenz detektiert.

4.2.4.10. Ko-Immunpräzipitation

Die Ko-Immunpräzipitation von β-Catenin-Interaktionskomplexen wurde wie bei 4.2.4.9 beschrieben durchgeführt. Die Ko-IP erfolgte nur mit den Nbs BC1, -2 und -13. Als Negativkontrolle diente inaktivierte Agarose. Die membran-fixierten Proteine wurden mit protein-spezifischen AK inkubiert. Die Detektion wurde mittels spezie-spezifischer Antikörper durchgeführt. Für die Messung der Fluoreszenzsignale stand der Typhoon FLA 7000 zur Verfügung und die Aufnahmen wurden mit ImageQuant TL 8.1 bearbeitet.

4.2.4.11. Intrazelluläre Expression und Ko-Immunpräzipitation von 'Chromobodies'

Die Untersuchung der intrazellulären CB-Expression und Ko-Immunpräzipitation (Ko-IP) erfolgte mit Lysaten aus transient mit CB-Plasmid transfizierten HEK293T-Zellen (mit oder ohne CHIR99021-Behandlung). Die Lyse, Proteinkonzentrationsmessungen, SDS-PAGE und WB fanden wie in 4.2.4.9 beschrieben statt. Die SDS-PAGE wurde mit Proben gleicher Proteinkonzentrationen und Volumen aller CB-Lysate durchgeführt (1:2 verdünnt, 4x Lämmli-puffer).

Die intrazelluläre Ko-IP der CB/Proteinkomplexe erfolgte mit GFP-Trap®-Agarose. Als Negativkontrolle diente Lysat aus eGFP-Plasmid transfizierten HEK293T-Zellen.

Als weitere Kontrolle wurde GAPDH mit einem anti-GAPDH Antikörper detektiert. Die Expression des Chromobodies (CBs) ermittelte man durch Immunfärbung mit einem GFP-spezifischen AK. Die Detektion fand wie in 4.2.4.9 beschrieben statt.

4.2.4.12. Oberflächen Plasmonenresonanz (SPR)

Die Affinitätsmessungen der Nbs wurde mit der Oberflächen Plasmonenresonanz-Spektroskopie an einem Biacore 3000 Instrument durchgeführt. Der Kopplungsvorgang von rek. β -Catenin-His6 auf CM5-Chips erfolgte durch Amino-Kopplung nach Herstellerangaben. Die erreichten Kopplungslevel lagen zwischen 1200 und 3000 RU (Response Units). Die Hintergrundsignale wurden durch eine inaktivierte Flußzelle von den Kinetiken subtrahiert. Die Messung der Nb-Kinetiken erfolgte mit Verdünnungsreihen zwischen 1 nM und 1 μ M als Duplikate und einer Konzentration als Triplikat. Es wurde die Assoziation (30 μ l/min, 3 min) und die Dissoziation (60 μ l/min, 5 min) bei 25 °C Lauftemperatur gemessen. Der Lauf von BC13 erfolgte durch Zusatz von 3 mM EDTA zum Laufpuffer. Nach jedem Lauf fand eine Regeneration durch zwei Injektionen Regenerationslösung statt (je 15 μ l, 60 μ l/min). Die Regeneration von BC1 wurde mit 10 mM Glycin pH 2, BC2 mit 100 mM H₃PO₄, BC6 und BC9 mit 10 mM Glycin pH 2,5 und für BC13 mit 3 M MgCl₂ erreicht.

Die Affinität von BC2 zum BC2-Epitop erfolgte durch Immobilisierung von GFP-BC2-tag auf einen mit GBP® (GFP-Binding Protein) nach Herstellerangaben gekoppelten CM5-Chip. Anschließend fand die Immobilisierung von GFP (Negativkontrolle) oder GFP-BC2-tag (500 RU) statt. Es wurde die Assoziation (50 μ l/min, 2,25 min) und Dissoziation gemessen (50 μ l/min, 10 min). Die Regeneration erfolgte mit 10 mM Glycin pH2,0 (23 μ l, 30 μ l/min).

Zur Auswertung der Daten stand die Software Bia evaluation 4.1 unter Nutzung des 1:1 Langmuir Bindemodell zur Verfügung. Für die Auswertung der Epitopkinetik nutzte man das 1:1 Langmuir Modell unter Berücksichtigung des Massentransports.

4.2.4.13. Mikrosphären-basierte Sandwich-Immunoassays

Die Domänenkartierung der Nbs erfolgte durch einen multiplexen Mikrosphären Immunarray. Dazu wurden die Nbs mit einem nach Poetz et al modifizierten Protokoll kovalent auf MagPlex® Mikrosphären immobilisiert [143]. Die immobilisierten Nbs wurden mit Domänen oder dem vollständigen Protein von β -Catenin, N-Terminus (AS 1-119), Armadillo Domäne AS (120-683) und C-Terminus (AS 683-781) inkubiert. Die Konzentrationen der Verdünnungsreihe lagen zwischen 0,25 $\mu\text{g/ml}$ und 2 $\mu\text{g/ml}$. GST wurde als Negativkontrolle eingesetzt. Gebundenes Protein detektierte man mit domänen-/antigen-spezifischen AK. Die Detektion der AK erfolgte mit Phycoerythrin (PE) gekoppelten, spezies-spezifischen Antikörpern. Zur Messung der Mikrosphären-Arrays stand eine FlexMap3D zur Verfügung. Die Auswertung der Daten erfolgte mit Excel.

Zur Charakterisierung der Nbs als β -Catenin-Detektoren wurde eine Konjugation mit sulfo-NHS-LC-Biotin, sulfo-NHS-LC-LC-Biotin und sulfo-NHS-PEG4000-Biotin nach Herstellerangaben durchgeführt. Mikrosphären immobilisierte Nbs (siehe oben) wurden mit rek. β -Catenin-His6 (1 $\mu\text{g/ml}$ und 0,1 $\mu\text{g/ml}$) inkubiert. Ein polyklonaler AK, spezifisch für β -Catenin, diente als Positivkontrolle für die Fänger. Ein für β -Catenin nicht spezifischer Nb wurde als Negativkontrolle verwendet. BSA (1 $\mu\text{g/ml}$ und 0,1 $\mu\text{g/ml}$) diente als Negativkontrolle für Proteinlösungen. Die Detektion von gebundenem β -Catenin erfolgte mit Biotin-konjugierten Nbs (1 $\mu\text{g/ml}$) und anti- β -Catenin Antikörper Klon 14. Die Detektion von gebundenem Nb (Biotin gekoppelt) fand durch den Nachweis mit Streptavidin-PE statt.

Die Detektion von endogenem β -Catenin aus Zelllysaten (HEK293T, HCT116 und SW480, mit oder ohne LiCl (20 mM)) wurde identisch durchgeführt. Als Positivkontrollen wurden die AK Anti-Phospho- β -Catenin Ser37/41/Thr45 und Anti-nonphospho- β -Catenin Ser37/41/thr45 als Fänger verwendet.

4.2.4.14. Epitopkartierung

Zur Kartierung des Epitops für BC1 und BC2 wurden die beiden Nbs mit sulfo-NHS-biotin nach Herstellerangaben biotinyliert und zur Detektion (1 $\mu\text{g/ml}$) eingesetzt. Die Detektion von gebundenen Nbs fand mit Streptavidin-PE (2,5 $\mu\text{g/ml}$) statt. Sowohl die Nbs als auch Streptavidin-PE wurden in 1xRochebuffer (0,05% Tween20, 0,05% Natriumazid) auf die Arbeitskonzentrationen verdünnt. Die Messung und Auswertung der Signale wurde wie in 4.2.4.13 beschrieben durchgeführt.

5. Ergebnisse

Aktuelle biochemische und zellbiologische Methoden zur Untersuchung von β -Catenin implementieren häufig AK und/oder Fusionsproteine. Allerdings wie in der Einleitung erwähnt besitzen diese Techniken Schwachstellen, die ihren Einsatz begrenzen. AK können als Ganzes kaum intrazellulär exprimiert werden und können somit keine dynamischen Prozesse abbilden. Des Weiteren benötigen AK in einigen Fällen extensive Epitope, was dazu führen kann, dass der AK mit Interaktionsproteinen kompetitiert [92-94]. Intrazellulär exprimierte Fusionsproteine hingegen führen zu einer Überexpression von β -Catenin, was sich direkt auf den sensiblen Wnt/ β -Catenin-Signalweg auswirkt und diesen aktiviert. Eine Beobachtung der normalen zellulären Dynamik oder von Interaktionskomplexen ist somit nicht oder schwer möglich [64, 98]. Deshalb ist eine ungestörte Beobachtung der Dynamik oder der Zusammensetzung des Interaktoms mit Fusionsproteinen von β -Catenin nicht möglich. Darum können AK-Fragmente in diesem sensiblen Bereich eine Brückentechnologie mit vielfältigen Anwendungsmöglichkeiten bieten. Deshalb fand in dieser Arbeit die Selektion von β -Catenin-spezifischen Nbs aus einer Phagenimmunbibliothek statt, um β -Catenin-spezifische Nbs für biochemische und zellbiologische Anwendungsmethoden zu charakterisieren. Die Nbs besitzen die Eigenschaften hoher Umweltstabilität, Löslichkeit und können meist unkompliziert in verschiedensten Expressionssystemen hergestellt werden [91, 107].

5.1. Selektion von Nbs, die sich in der DNA der CDRs signifikant unterscheiden

Zur Erstellung der in dieser verwendeten VHH-Gen-Bibliothek wurden zwei Alpakas (*Vicugna pacos*) mit rekombinantem β -Catenin (β -Catenin-His₆) immunisiert. Sechs Wochen nach Immunisierung wurden aus einer Blutprobe von ca. 100 ml die Lymphozyten isoliert und die mRNA extrahiert. Nach der Synthese von cDNA diente diese als Vorlage zur Amplifikation der VHH-kodierenden Bereiche die in drei aufeinanderfolgenden PCR Reaktionen erfolgte. Das PCR Produkt wurde enzymatisch verdaut und mit einem pHEN4-Vektor (Phagemid) ligiert. Durch die Transformation in *E. coli* TG1-Zellen wurde die Nb-Phagen-Bibliothek hergestellt. Die Immunisierung, Erstellung der Nb-Phagen-Bibliothek und die teilweise Selektion von Nbs-Sequenzen (im Folgenden BC1, BC2, BC3, BC4, BC5 genannt) führten das Tier- und Versuchsgut der LMU München und die Firma Chromotek durch. Zur Identifizierung weiterer β -Catenin-spezifischer Nanobodies wurde im Rahmen dieser Arbeit auf Basis der vorliegenden Nb-Phagen-Bibliothek ein dreiphasiges Bio-Panning (Phage-Display) mit rekombinantem β -Catenin durchgeführt. Nach erfolgter Anreicherung wurde die β -Catenin-Spezifität der selektierten Nb-Phagen mittels eines Phagen-ELISAs verifiziert (Abbildung 6).

Selektion der sdAbs

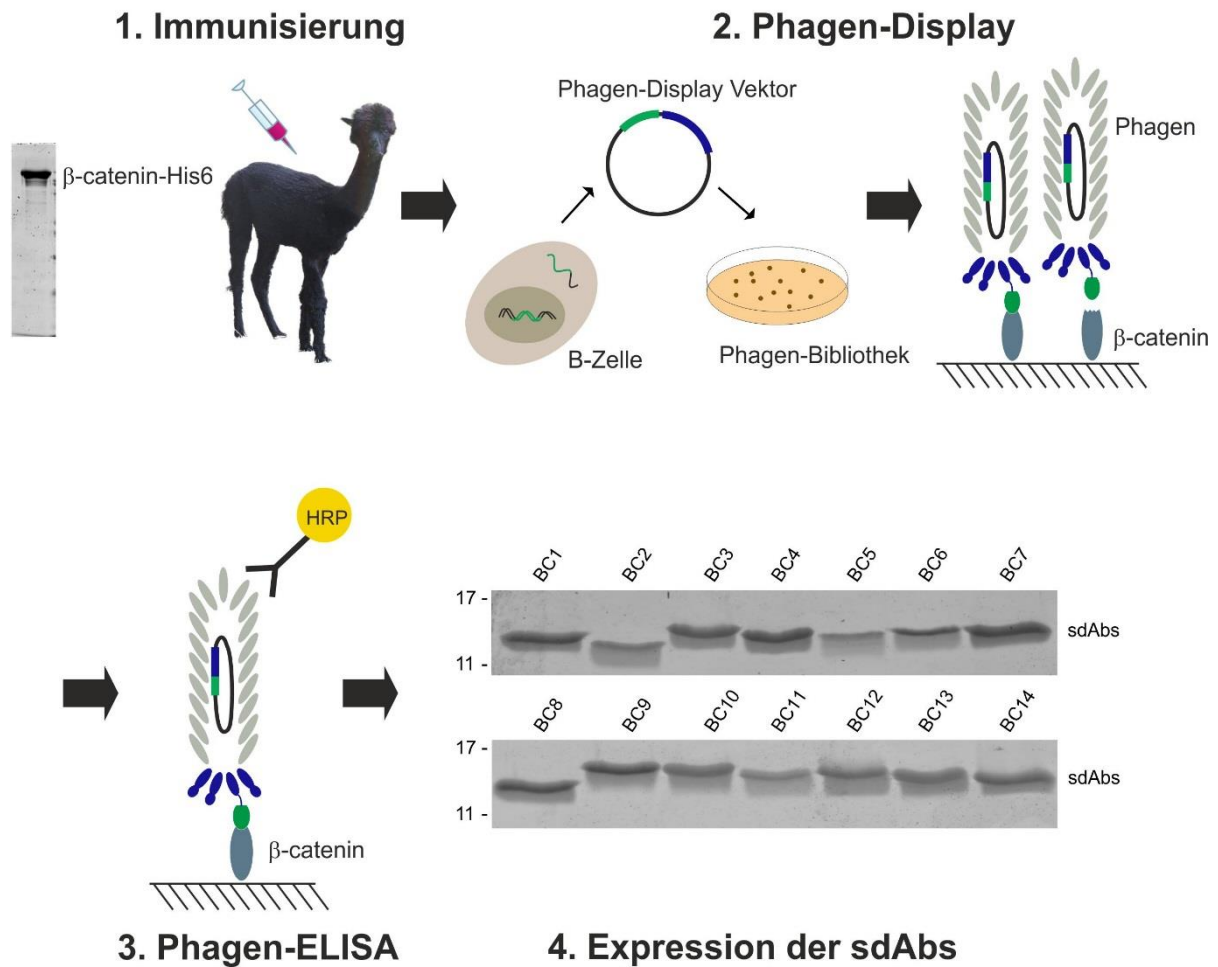


Abbildung 6: Darstellung der Abfolge der Entwicklung von Nbs. 1. Zu Beginn der Selektion von Nbs werden Llamas (Camelidae) subkutan mit dem rekombinanten Antigen β -Catenin injiziert. Das immunisierte Tier entwickelt eine Immunantwort gegen das Antigen und es reichern sich B-Zellen an, die spezifisch für β -Catenin Antikörper produzieren. 2. Aus den B-Zellen werden die Sequenzen für die VHHs isoliert und in Phage-Display-Vektoren kloniert. Die Phagen werden anschließend bakteriell exprimiert. Jeder Phage besitzt sowohl den Genotyp als auch den Phänotyp und präsentiert auf dem Hüllprotein pIII den Nb (VHH). Durch Präsentation des immobilisierten Antigens binden antigenspezifische Phagen und können eluiert werden. 3. Die einzelnen isolierten Phagenklone können dann über einen Phagen-ELISA detektiert werden. 4. Die isolierte Nb Information aus ELISA-positiven Phagenklonen kann dann extrahiert und in geeignete Expressionsvektoren kloniert werden. Die Expression der Nbs findet in geeigneten *E. coli* Stämmen statt. Die Coomassie-Färbung (4.) zeigt 14 unique, rekombinant gereinigte Nbs, die über Phagen-Display und Phagen-ELISA spezifisch für β -Catenin isoliert wurden.

Die DNA der positiven Einzelklone konnten dann isoliert und die Varianz innerhalb der Klone untersucht werden. Dazu wurde ein Sequenzabgleich der Einzelklone durchgeführt und ausschließlich Klone weiterverwendet, die sich in ihrer Sequenz unterschieden. Nach diesem Sequenzabgleich wurden 14 Klone, die speziell in den CDRs unterschiedliche Sequenzen aufwiesen, isoliert (Abbildung 7 CDR3s). Zur rekombinanten Proteinproduktion wurden die entsprechenden VHH-Genabschnitte in Expressionsvektoren für bakterielle Wirtssysteme überführt und produziert. Im Anschluss wurden die Nbs über eine immobilisierte Metallaffinitätschromatographie (IMAC), vermittelt durch den C-terminalen Histidin (His6) -Tag,

gefolgt von einer Gelfiltration gereinigt. Damit konnten monoklonale Reagenzien für die biochemische Charakterisierung hergestellt werden (Abbildung 6).

	FR 3	CDR 3	FR 4
BC1	...YYCNA	LSG--LPPYA-----TTYW	GQGTQVTVSS
BC2	...YYCAE	ARG-----CKR-GRYEYDFW	GQGTQVTVSS
BC3	...YYCNA	RGRYYSGGQ----VQRFDYW	GQGIQVTVSS
BC4	...YYCAA	DPSPLQHVCHT-ARSEYTSW	GQGTQVTVSS
BC5	...YYCNA	RRVGFGRGKIR-----ENYW	GQGTQVTVSS
BC6	...YYCNA	IDSDYG-----DDYW	GQGTQVTVSS
BC7	...YYCNT	VRSEAAPGGYTWVPTQSHSW	GQGTQVTVSS
BC8	...YYCHV	DRALEWGVYG--SEWHYDYW	GQGTQVTVSS
BC9	...YYCTA	VNSDPWGN-----EHDYR	GQGTQVTVSS
BC10	...YYCYL	EHRYWGTAP-----RDYW	GQGTQVTVSS
BC11	...YYCNA	GIGTIKEGRLY----TNDYW	GQGTQVTVSS
BC12	...YYCNV	GIGTIKEGRLY----TNDYW	GQGTQVTVSS
BC13	...YYCNA	R-----RYS-----RSDW	GQGTQVTVSS
BC14	...YYCQR	GDPSRRDWAWS-----RW	GQGTQVTVSS
	***		*****

Abbildung 7: Exemplarischer Aminosäuresequenzvergleich der variablen Domäne CDR3 der 14 Nb Klone. Der Sequenzvergleich der Einzelklone zeigt, dass 14 verschiedene Nb-Klone isoliert worden waren.

5.2. Auswahl spezifischer Nbs durch Immunpräzipitation von rekombinantem β -Catenin

Die bisherigen Selektionen der Nbs fanden im Kontext mit dem Phagenhüllprotein pIII statt. Diese Fusion kann den Zusammenbau zu einem funktionellen Phagen beeinflussen und/oder Auswirkungen auf das Bindungsverhalten der Nbs haben [144]. Die Trennung der Nbs vom Hüllprotein durch Klonierung der VHH-Sequenz in neue Vektoren könnte die Spezifität des Nbs beeinträchtigen. Um zu testen ob die Nbs in Abwesenheit des pIII-Proteins ihr Antigen binden, wurden die rekombinant gereinigten Nbs kovalent auf N-succinimidyl-Ester-aktivierte (NHS)-Agarose immobilisiert und in einem Interaktionsassay mit rekombinantem β -Catenin getestet. Die Bindung an das Antigen wurde mittels SDS-Page untersucht (Abbildung 8). Die Ergebnisse zeigen, dass alle isolierten Nb-Einzelklone rekombinantes GST- β -Catenin präzipitierten (Abbildung 8).

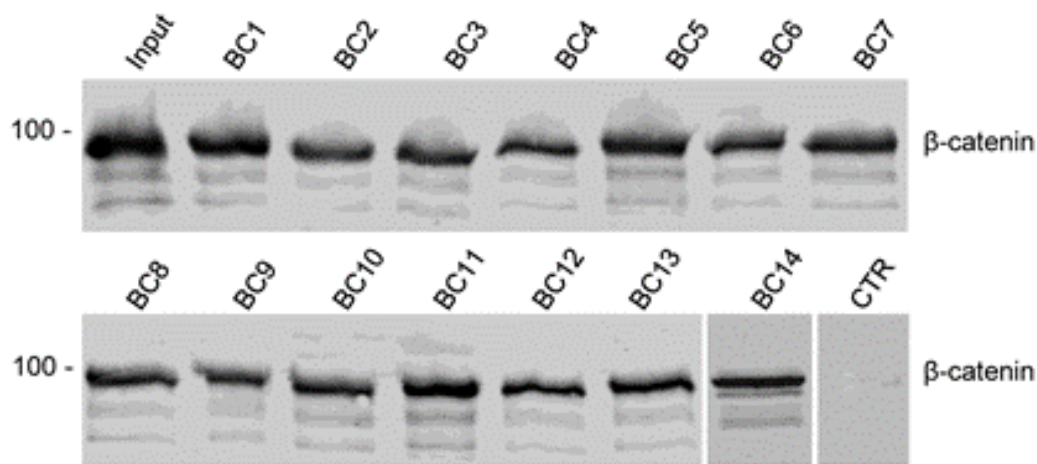


Abbildung 8: Immunblot des präzipitierten rekombinanten GST-β-Catenins mit angezeigten Nbs. Die Detektion von β-Catenin fand mit einem β-Catenin-spezifischen Antikörper statt.

5.3. Eliminierung von Nbs mit geringer Sensitivität oder Spezifität

In den Bindungsstudien konnte die Bindung der Nbs an ihr rekombinantes Antigen gezeigt werden. Um im nächsten Schritt die Nbs mit den höchsten Bindekapazitäten auszuwählen, wurde eine Vergleichsstudie durchgeführt. Diese wurde mit Hilfe eines multiplexen und mikrosphärenbasierten ELISAs gemessen. Die 14 Nbs wurden auf Mikrosphären immobilisiert und das GFP bindende Protein (GBP) als Negativkontrolle verwendet. Im Anschluss fand die zeitgleiche Inkubation der Nbs mit rek. GST-β-Catenin (1 µg/ml) statt. Das über die Nbs an die Mikrosphären gebundene β-Catenin wurde mit einem antigenspezifischen AK nachgewiesen und quantifiziert (Abbildung 9). Die Auswertung des Experiments zeigt deutliche Unterschiede in den Bindungskapazitäten der 14 Nbs. Es konnten 5 Klone identifiziert werden, die β-Catenin überdurchschnittlich gut im Mikrosphären-Array präzipitierten. Als Auswahlkriterium von effektiven Einzelklonen diente ein mindestens fünfzigfacher relativer Signalwert über der Negativkontrolle. Dieser Schwellenwert wurde von BC1 mit ca. 300 AU, BC-2 mit ca. 200 AU, BC-6 und BC-9 mit ca. 150 AU sowie BC-13 mit ca. 60 AU überschritten (Abbildung 9). Weitere Tests zur Charakterisierung wurden ausschließlich mit den Nb-Klonen Beta Catenin1 (BC1), BC2, BC6, BC9 und BC13 durchgeführt.

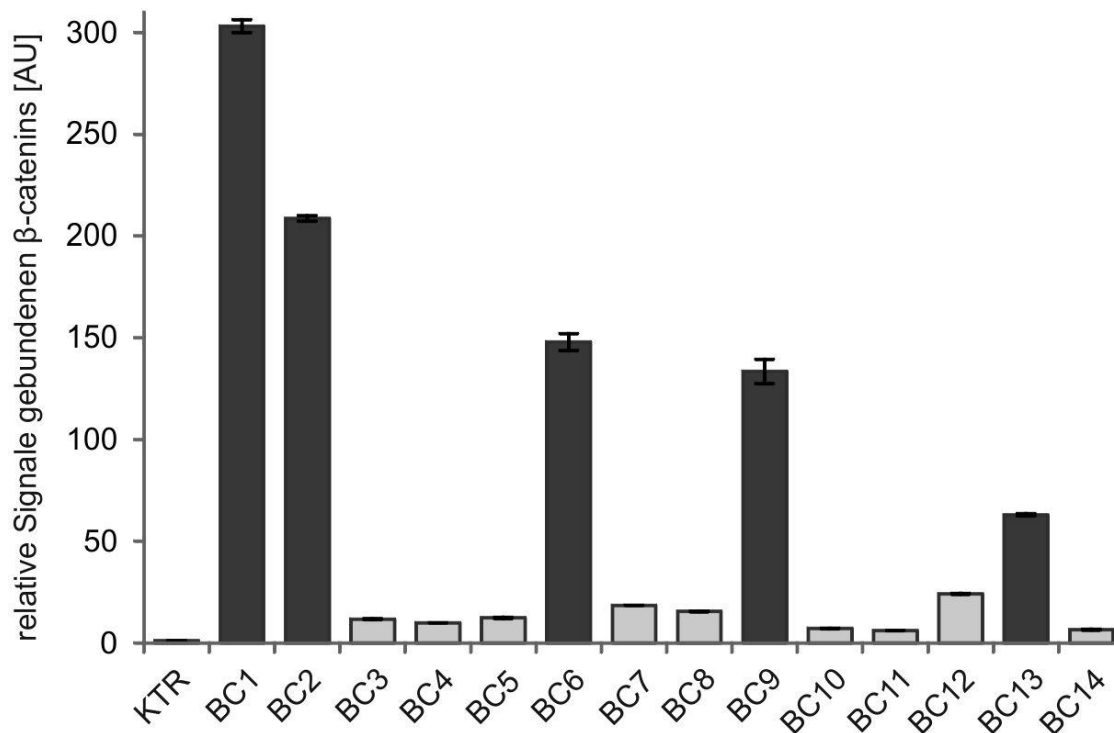


Abbildung 9: Mikrosphären-Array zum Nachweis der spezifischen β -Catenin-Bindung. Mikrosphären mit immobilisierten Nbs (BC1-14) wurden genutzt, um GST- β -Catenin (1 μ g/ml) zu binden. Gebundenes β -Catenin wurde über einen β -Catenin-spezifischen Antikörper detektiert. Ein unspezifischer Nb wurde als Negativkontrolle verwendet. Gemessen wurde die Fluoreszenz des spezie-spezifischen sekundären AK konjugiert mit PE. Das Signal des Kontroll-Nb (KTR) wurde auf 1 gesetzt. Gezeigt sind die Mittelwerte aus drei unabhängigen Replikaten \pm Standardabweichung. Die höchsten 5 Signale sind in dunkelgrau hervorgehoben.

5.4. Messung der K_D der Nbs zur Evaluierung der Affinität

Zur weiteren biochemischen Charakterisierung wurde die Affinität der 5 Nbs zu rekombinatem β -Catenin gemessen. Aus diesem Grund wurde von allen selektierten Nbs (BC1, -2, -6, -9 und -13) die Affinität (K_D) gemessen. Dazu verwendete man die Oberflächenplasmonresonanz (SRP)-Methode zur Messung der Affinität. Es wurde rekombinantes β -Catenin (His_6) auf die Oberfläche eines CM5-Chips (GE Healthcare) (Abbildung 10, B) aufgebracht. Die Assoziations und Dissoziationsraten der an β -Catenin bindenden Nbs, zur Ermittlung der K_D , erfolgten im Anschluss. Dazu wurde β -Catenin jeweils fünf verschiedenen molaren Konzentrationen der Nbs ausgesetzt (Abbildung 10, B). Durch die gemessenen Kinetiken konnte die Affinität der Nbs bestimmt werden (Abbildung 10, C).

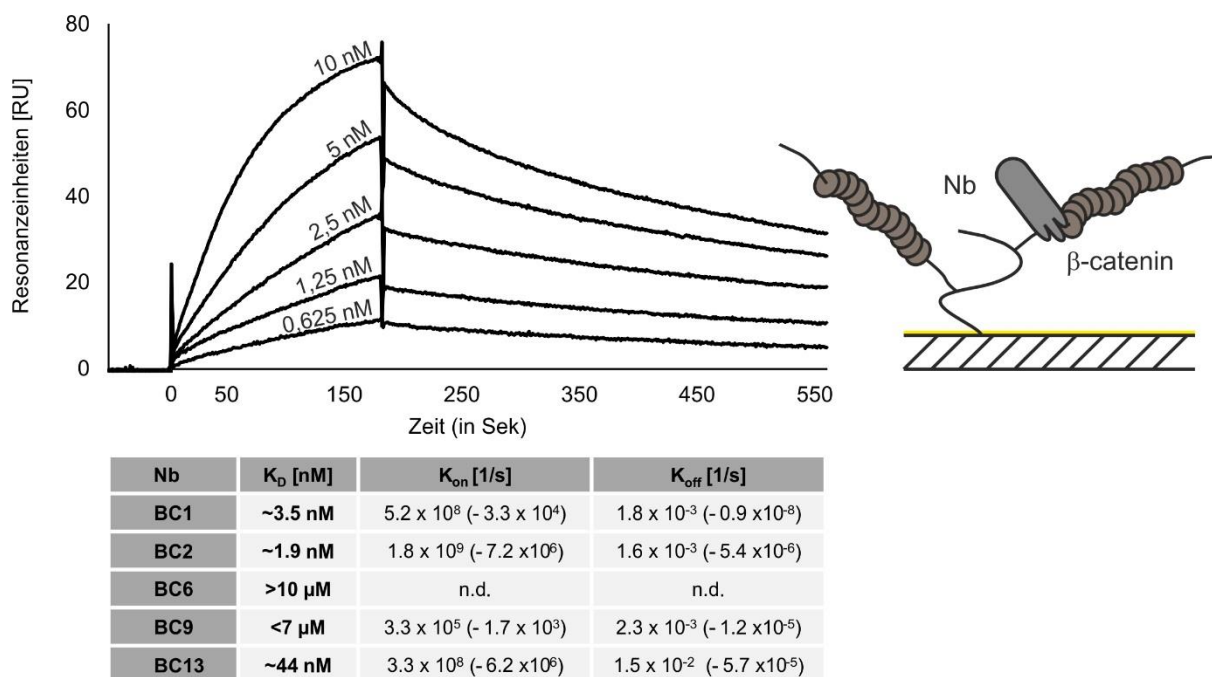


Abbildung 10: Nb Kinetik am Beispiel von BC2. A) Die Kinetik der Nbs (sdAbs) wurde mittels SPR ermittelt BC2 wurde mit den hier beschriebenen Nb-Konzentrationen durchgeführt. Die K_{on} ist der Anstieg an Resonanzeinheiten (RU) über die Zeit (Assoziation) und zeigt die Bindung des Nbs an sein, auf einem CM5-Chip, immobilisiertes Antigen (siehe Zeichnung B). Im Anschluss wird die K_{off} durch die Dissoziation des Nb gemessen. Aus den K_{on}/K_{off} -Werten (K_a/K_d -Werte) ermittelt man die Affinität (K_D). Die gemessenen K_D -, sowie die K_{on} - und K_{off} -Werte der Nbs sind in der Tabelle (C) mit dem Standardfehler aufgeführt. Jede SPR-Messung der Nbs wurde mit fünf Konzentrationen des Nbs durchgeführt.

BC1 erreichte eine K_D von ca. 3,5 nM, BC2 von 1,9 und BC13 44 nM. Für BC6 und -9 konnten keine exakten Angaben gemacht werden. Die Kinetiken (nicht gezeigt) zeigten ausschließlich Massentransportsignale.

5.5. Nachweis der Sensitivitätsgrenzen der Nbs für β -Catenin

Für den Einsatz der Nbs in diagnostischen Verfahren ist eine hohe sensitive und damit niedrige Nachweisgrenze für β -Catenin in biologischen Proben wichtig. In Zellextrakten sind selbst bei hoher Konzentration der Proteinlösung im Wnt/aus-Zustand nur β -Catenin-Mengen in der Größenordnung von Nanogramm (ng) zu finden [145, 146]. Um die Nachweisgrenze zu ermitteln, wurden die NBs auf MagPlex®-Microsphären (Luminex) immobilisiert und mit Verdünnungsreihen von β -Catenin (1 μ g/ml-0,25 ng/ml) inkubiert. Im Anschluss wurde das gebundene Protein durch einen β -Catenin-spezifischen AK in Kombination mit einem fluoreszenzgekoppelten Sekundärantikörper detektiert (Abbildung 11). Als Negativkontrolle diente GBP. Bei der höchsten Verdünnung (~0,25 ng/ml) zeigte ausschließlich BC9 ein Signal über dem der Negativkontrolle. BC1, BC2 und BC6 erreichten ihre Nachweisgrenze bei ~1 ng/ml. BC13 zeigte bei einer Konzentration von ~4 ng/ml noch ein Signal für gebundenes β -Catenin, welches über dem Signal der Negativkontrolle lag.

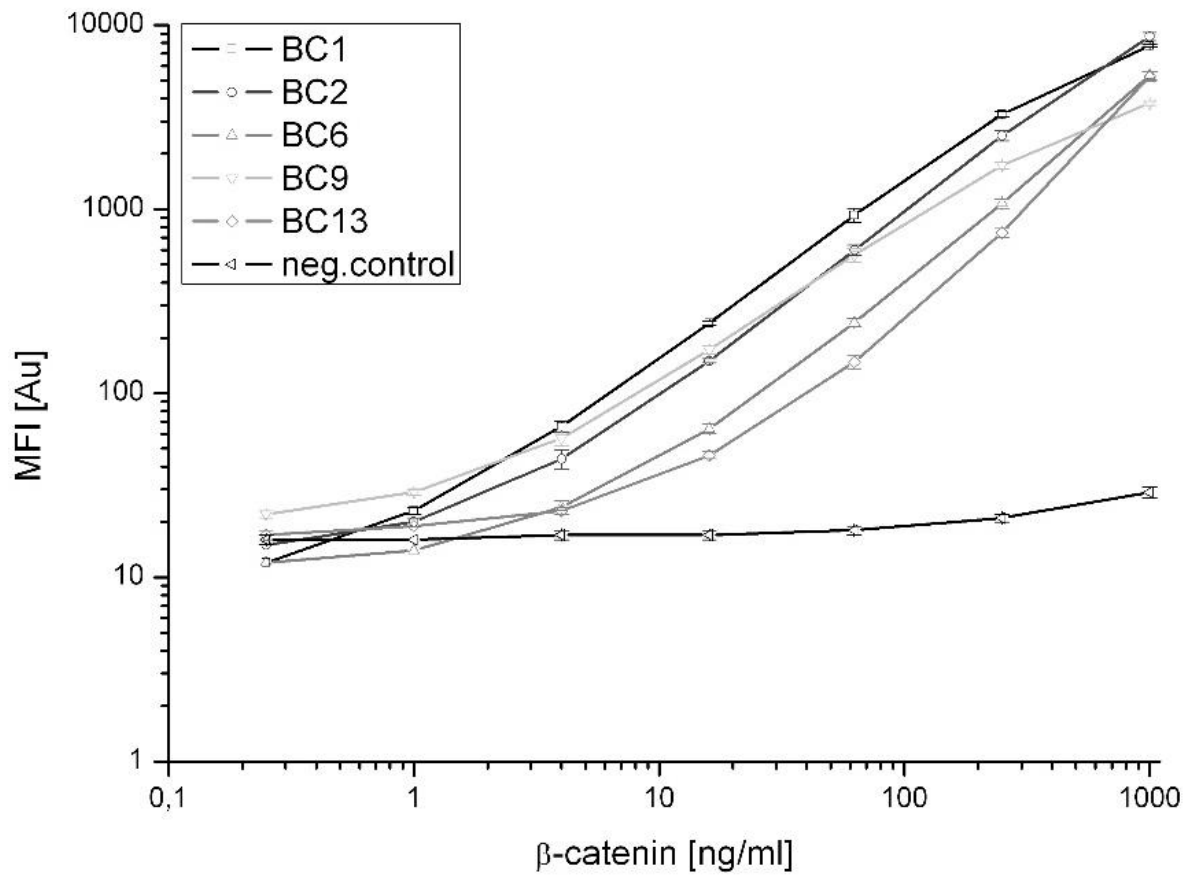


Abbildung 11: Mikrosphären-basierter Immunarray zur Messung der Nb-Sensitivität für rekombinantes GST- β -Catenin. Die Graphen bilden die Signale des von Nbs gebundenen β -Catenins bei ansteigender Konzentration ab. Die Messung wurde mit an Mikrosphären immobilisierten Nbs durchgeführt. Die Mikrosphären wurden mit ansteigenden Konzentrationen (ca. 0,25 ng/ml -1 μ g/ml) von β -Catenin inkubiert und das gebundene Protein mit einem β -Catenin-spezifischen AK nachgewiesen. Die Datenpunkte der Graphen repräsentieren den Mittelwert von je drei unabhängigen Messungen und die vertikalen Striche über und unter den Datenpunkten repräsentieren die Standardabweichung.

5.6. Domänenkartierung: Einteilung Nbs nach der adressierten β -Catenin-Domäne

Die Funktion des β -Catenins innerhalb der Zelle wird durch seine komplexe Struktur definiert. So besteht β -Catenin aus drei strukturell verschiedenen Domänen. 1. Der N-terminalen Domäne (N-Terminus; AS1-141), welche das SSTS-Motiv enthält und so die Stabilität von β -Catenin steuert. 2. Der ARM-Domäne (Armadillo; AS 142-664), die durch ihre positiv geladene Superhelix, bestehend aus den 12 ARM-Repeats, die wichtigste Bindedomäne für Interaktionsproteine ist. 3. Der C-Terminus (AS 665-781), in dem auch die C-Helix liegt, der zur Interaktion mit dem Zytoskelett beiträgt und die Aktivität von β -Catenin mitbestimmt (Abbildung 1) [24, 147, 148]. Jede dieser Regionen ist essentiell für die korrekte Funktion von β -Catenin. Darum ist es wichtig für die weitere Untersuchung der Nbs zu wissen, in welcher Region von β -Catenin ihr Bindungsepitop liegt. Um diese Frage zu beantworten wurde ein Screen mit den genannten Domänen von β -Catenin durchgeführt. Hierzu wurden diese als GST-Fusionen in Bakterien produziert und gereinigt. Für die Bindungsanalysen wurde ein multiplexer Immunassay durchgeführt bei dem die Nbs wie beschrieben auf farbkodierte Mikrosphären immobilisiert und gleichzeitig mit den gereinigten Domänen von β -Catenin, N-Terminus (AS 1-119), Armadillo (AS 120-683) und C-Terminus (AS 684-781), inkubiert wurden. Der Bindungsnachweis fand mit domänen-spezifischen AKs statt. Das Ergebnis dieses Experiment zeigte, dass die Epitope von BC1 und BC2 ausschließlich im N-Terminus, BC6 und -9 in der ARM und BC13 im C-Terminus (Abbildung 12) liegen. Eine leichte Kreuzreaktivität mit anderen Domänen (NTD) konnte für BC6 und -9 beobachtet werden.

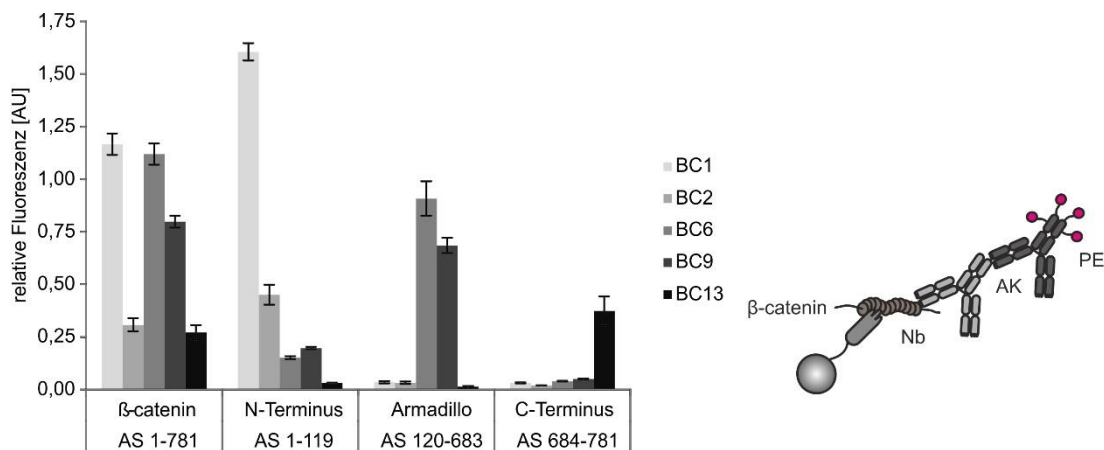


Abbildung 12: β -Catenin-Domänenkartierung der Nbs mittels mikrosphärenbasierter Immunarrays. Die angezeigten Nbs wurden auf Mikrosphären immobilisiert und mit 2 μ g/ml Proteinlösung der rek. Domänen (N-Terminus, Armadillodomäne [Armadillo] und C-Terminus) und dem vollständigen Protein β -Catenin inkubiert. Gebundene Domänen und das vollständige Protein wurden mit Hilfe domänenspezifischer AK detektiert (Siehe Schema rechts). Die Balken repräsentieren jeweils den Mittelwert aus drei unabhängigen Replikaten. Nb, Nanobody; AK, Antikörper; PE, Phycoerythrin.

5.7. Epitop-Kartierung von BC1 und BC2 mittels Peptid-Screen

Durch Interaktion mit Proteinen der TCF/LEF-Familie übt β -Catenin die Signalfunktion als Transaktivator des Wnt-Signalwegs aus. Dies wird durch ein stabilisiertes, N-terminal nicht phosphoryliertes, β -Catenin induziert [149, 150]. Dies macht somit gerade Bindemoleküle interessant, die zwischen N-terminal-modifizierten und nicht modifizierten β -Catenin-Reservoirs unterscheiden können. Aus diesem Grund wurde für die N-terminalen Bindemoleküle BC1 und -2 ein Peptid-Arrays-Scan mit 29 überlappenden (je 15 AS) Peptiden durchgeführt (Abbildung 13). Die Peptide repräsentierten die AS-Sequenz der NTD von AS 1-127. Dazu wurden im ersten Schritt die Peptide synthetisiert und ein endständiges C-terminales Cystein auf Ov-Albumin (OVA) gekoppelten Mikrosphären immobilisiert. Die Inkubation der Peptide mit den biotinylierten Nbs fand in einer multiplexen Analyse statt. Detektiert wurden die Bindungen über Streptavidin-Phycorythrin. Für BC1 konnte kein eindeutiges Signal für ein bestimmtes Peptid gemessen werden. Die noch als Signal interpretierbaren Werte entsprechen der AS-Sequenz QVLYEWEQGFSSFTQEQQVADIDGQYA (AS 61 – 87) (Abbildung 13 A). Insgesamt sind die Signale für dieses BC1-Epitop sehr gering. Dies könnte möglicherweise daran liegen, dass BC1 nur partiell an den Peptiden bindet und normalerweise eine dreidimensionale Struktur, basierend auf den Sequenzen der Peptide, erkennt. Dagegen konnte aus der Peptiduntersuchung mit BC2 die AS-Sequenz AMEPDRKAAVSHWQQQSYL (AS 13-31) aus den Signalen zweier aufeinanderfolgender Peptide isoliert werden (Abbildung 13 B). Interessanterweise liegt das detektierte Epitop in einer Region in der das Serin (Ser23) als Modifikationsstelle für CK1 (Phosphorylierung) oder für eine O- β -N-Acetylglucosaminierung (O-GlcNAc) beschrieben ist [151, 152]. Aus diesem Grund wurde ein weiterer Peptidscreen durchgeführt. Dieser bestand aus zwei Peptiden, welche das BC2-Epitop beinhalten, jedoch mit dem Unterschied, dass sie entweder an Ser23 nicht- (-) oder phosphoryliert wurden (+). Dadurch konnte gezeigt werden, dass nach Phosphorylierung des Ser23 keine Bindung an BC2 mehr stattfindet (Abbildung 13 B'). Daraus lässt sich schlussfolgern das BC2 sein Epitop ausschließlich in unmodifizierter Form erkennt.

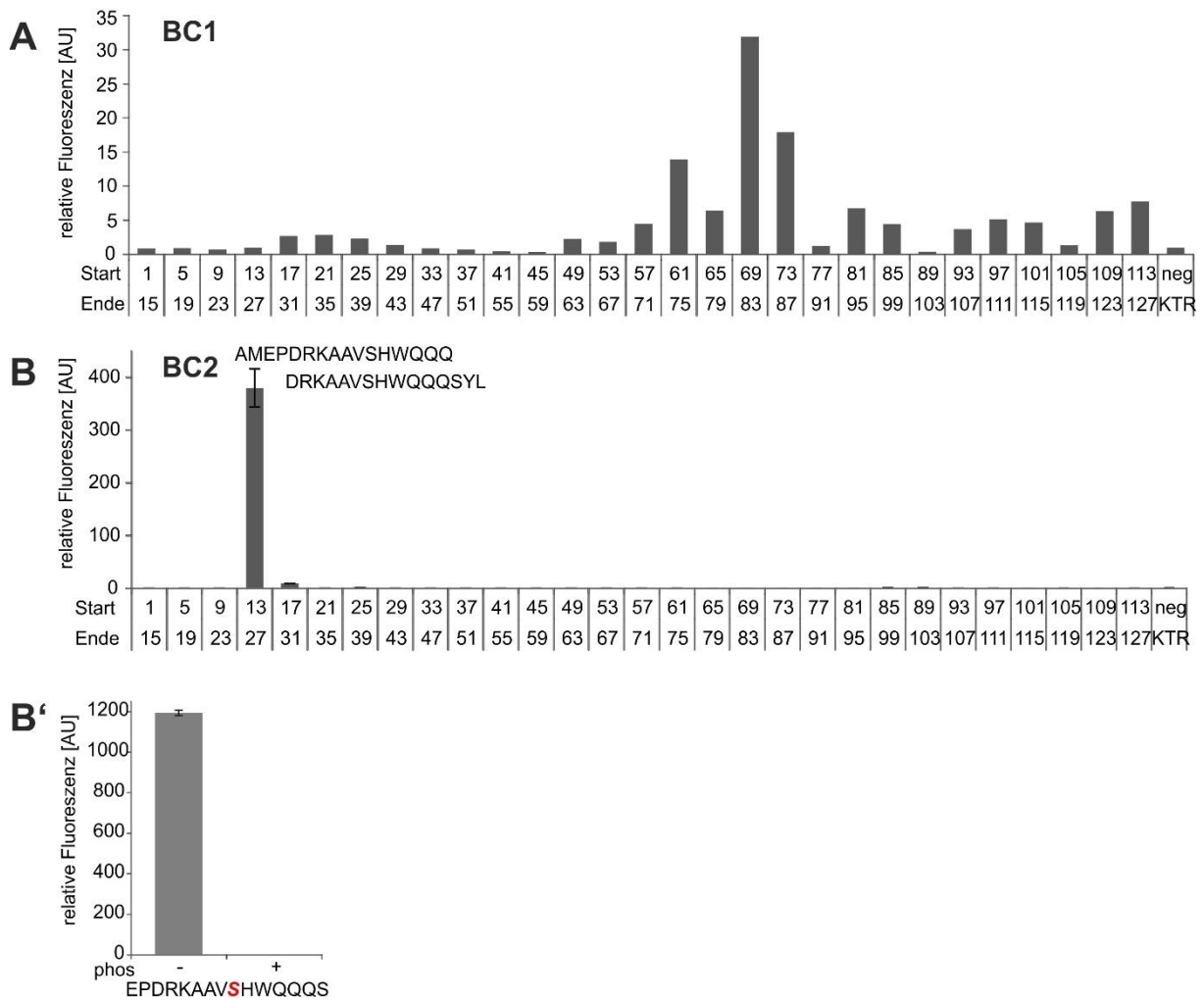


Abbildung 13: Epitopkartierung der Nbs mittels mikrosphärenbasierter Immunarrays. Die Kartierung des Epitops der Nb BC1 A) und BC2 B) erfolgte mit 29 überlappenden Peptiden, bestehend aus 15 AS, durch, welche die AS-Sequenz von 1-127 des NTD von β -Catenin repräsentierten. Mikrosphären mit OVA-immobilisierten Peptiden wurden mit 1 μ g/ml biotinyliertem Nb inkubiert und gebundene Nbs mit Streptavidin-PE nachgewiesen. B') Die Analyse ob BC2 an ein phosphoryliertes Peptid bindet, wurde mit einem Peptid mit (+) oder ohne (-) Phosphorylierung durchgeführt. Die Balken repräsentieren den Mittelwert aus drei unabhängigen Replikaten.

Abschließend wurde das Minimalpeptid von BC2, PDRKAAVSHWQQ (AS 16-27), mit N- oder C-Terminal verkürzten Peptiden der AS-Region (14-27) bestimmt (Abbildung 14). Dazu wurde das vorher im Peptidscreening ermittelte Peptid MEPDRKAAVSHWQQ (AS 14-27) vom N- oder C-Terminus verkürzt und auf Mikrosphären immobilisiert. Durch das anschließende Inkubieren mit biotinyliertem BC2 wurde die für eine Bindung essentiellen AS ermittelt. Gemessen wurde dabei das Signal an gebundenen BC2 durch Detektion mit Streptaphidin-PE. Alle Versuche zur Epitop-Kartierung von BC1 und BC2 wurden in Zusammenarbeit und mit Unterstützung von Dr. Oliver Poetz (NMI) durchgeführt.



Abbildung 14: Mikrosphären-basierter Immunarray zur Bestimmung des Minimalepitops von BC2. N- oder C-terminal verkürzte Peptide der AS-Sequenz 14-27 von β -Catenin von wurden mit biotinyliertem BC2 inkubiert. Die Detektion von gebundenem BC2 fand mit Streptaphidin-PE statt.

5.8. Präzipitation endogenen β -Catenins mit Hilfe der Nbs

Die vorhergehenden Experimente zeigten relative Effizienz der Nbs rek. β -Catenin zu binden und gaben Auskunft in welcher Domäne die Bindung erfolgt. Für BC1 und -2 wurden auch die Epitope ermittelt und es konnte eine Modifikationsabhängigkeit für die Bindung von BC2 festgestellt werden. Um einerseits nachzuweisen, dass die Nbs auch endogenes β -Catenin aus komplexen Proben, wie humanen Zelllysaten, präzipitieren können und andererseits um eine Abhängigkeit von der Phosphorylierung des SSTS-Motivs zu untersuchen, wurden IPs aus Zelllysaten durchgeführt. Dazu fand die Behandlung von Zellkulturen entweder mit (CHIR) oder ohne GSK3- β -Inhibitor CHIR99021 (unbeh.) statt. Die Behandlung mit den Inhibitoren verhindert die Phosphorylierung von β -Catenin durch GSK3- β und führt zu einer Anreicherung von nicht phosphoryliertem β -Catenin in der Zelle [153-155]. Nbs wurden an Agarose immobilisiert, um endogenes β -Catenin zu präzipitieren. Der totale Gehalt von β -Catenin (total), die durch Concanavalin A (ConA) präzipitierte Fraktion (β -Catenin an der Zellmembran in Verbindung mit E-Cadherin), sowie die finale Fraktion mit der die IP durchgeführt wurde (Input und die an Nbs gebundenen Fraktionen (BC1,-2,-6,-9 und -13) wurden untersucht. ConA ist ein Lektin aus der Jackbohne (*Canavalia ensiformis*) welches die Eigenschaft hat Glykoproteine wie E-Cadherin zu binden [156-158]. Die ConA-Agarose wurde eingesetzt um zellmembranassoziiertes β -Catenin aus dem Volllysat zu depletieren. Aufgrund des ebenfalls nicht phosphorylierten SSTS-Motivs würde dieser β -Catenin-Pool in der Analyse von transkriptionell aktiviertem β -Catenin stören, da es ebenfalls als ‚aktives‘ β -Catenin im Immunblot, mit α -non-phospho- β -Catenin spezifischem AK, auftaucht. Während der Detektion ‚aktiven‘ β -Catenins konnte durch diese Depletion gewährleistet werden, dass nur der Nachweis von zytoplasmatischem und nukleärem β -Catenin erfolgte. Im Folgenden wurden die Proben mit SDS-PAGE aufgetrennt und β -Catenin mittels Immunblotverfahren nachgewiesen. Die Ergebnisse zeigen, dass alle Nbs endogenes β -Catenin präzipitierten

(Abbildung 15 A). Zu erkennen ist, dass die Konzentration an β -Catenin nach der Behandlung mit CHIR99021 erhöht ist (Total). Dahingegen bleibt die Menge an zellmembranassoziiertem β -Catenin konstant (ConA). Nur der zytoplasmatische/nukleäre Anteil nimmt zu (Input). Bei allen Nbs ist nach Anreicherung von β -Catenin, wegen Hemmung der Phosphorylierung durch den GSK3-Inhibitor, eine Anreicherung von gebundenem β -Catenin zu beobachten. Allerdings bildet BC1, verglichen mit dem Input, die Stabilisierung endogenen β -Catenins am besten ab. Der Anstieg zwischen behandelter und unbehandelter Probe erscheint hier am höchsten. BC2 und -13 hingegen scheinen die höchste Effizienz bei der Anreicherung von β -Catenin zu zeigen. Bei BC6 und -9 ist kaum eine Anreicherung zu beobachten und die Effizienz im Bezug auf die Input-Proben am geringsten. Die Immunblots zeigen jedoch Abweichungen zur gebundenen β -Catenin-Menge, verglichen mit den Versuchen mit rek. β -Catenin (siehe Abbildung 9). Besonders bei BC6 und -9 ist dies der Fall. Diese zeigten in den Experimenten mit rekombinantem β -Catenin ausreichend hohe Signale von rund 150 AU. Dagegen kann endogenes β -Catenin sowohl aus unbehandelten, als auch behandelten Zellen nur in geringen Mengen präzipitiert werden. Die Nbs BC2 und -13 zeigen hingegen eine hohe Anreicherung nach Inhibition von GSK3- β (Abbildung 15 A). Bei beiden zeigt sich ein hohes Signal, aber nur eine geringe Anreicherung nach Inhibition von GSK3- β mit CHIR. BC1 präzipitiert aus Zelllysaten von unbehandelten Zellen sehr geringe Mengen β -Catenin, trotz der hohen Effizienz bei vorherigen Versuchen. Dagegen erhöht sich das Signal nach Behandlung mit dem GSK3- β -Inhibitor um mindestens das Dreifache. Dies liegt entweder am Phosphorylierungszustand oder an einer Anreicherung von freiem β -Catenin.

Für weitere Untersuchungen wurden IPs mit Lysaten der Zelllinien HCT116 und SW480 durchgeführt. In beiden Zelllinien ist eine Anreicherung von nicht phosphoryliertem β -Catenin beschrieben. Im Fall von SW480 führt eine Nonsense-Mutation zur Verkürzung von APC in einem Allel. HCT116 Zellen besitzen eine heterozygote Deletion (Codon 45), die eine Phosphorylierung von β -Catenin durch CK1 und die nachfolgende Phosphorylierung mit GSK3- β verhindert [48, 159]. Somit konnte in diesen Zellen durch Inhibitorbehandlung nur eine geringe Menge β -Catenin stabilisiert werden, weil β -Catenin durch beschriebene Mutationen schon angereichert vorliegt (Abbildung 15 B). Im Besonderen ist interessant, dass BC1 hier schon aus unbehandelten Zellen signifikant mehr β -Catenin präzipitieren konnte. Verglichen mit HEK293T-Zelllysaten konnte für die Nbs BC2,-6, -9 und -13 keine Veränderung im Signalmuster, weder für behandelte Proben, noch für unbehandelte, in diesen Zelllinien beobachtet werden. BC2 und -13 zeigen unverändert in beiden Zelllinien ein starkes β -Catenin-Signal, ohne dass eine Anreicherung von unbehandelten zu CHIR behandelten Zellen zu beobachten ist. BC6 und -9 bleiben bei niedrigen Signalwerten für präzipitiertes β -Catenin in allen Proben.

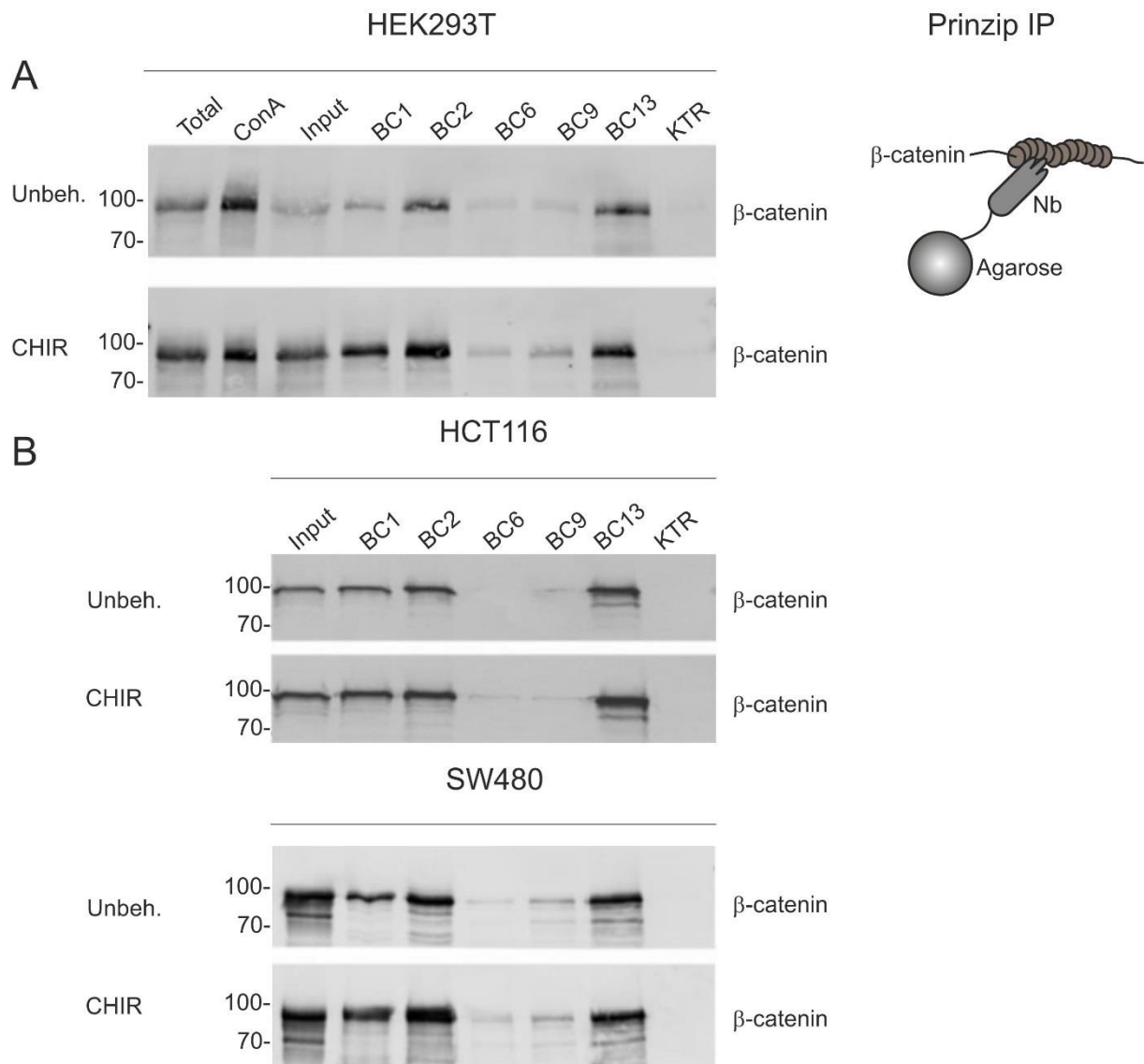


Abbildung 15: Immunpräzipitation von endogenem β -Catenin mit Nbs aus Zelllysaten. Endogenes β -Catenin wurde mit auf Agarose immobilisierten Nbs präzipitiert. A) Immunfärbung von β -Catenin präzipitiert mit den aufgeführten Nbs und AK aus HEK293T-Lysaten, die ohne (unbeh.) oder mit GSK3- β Inhibitor (CHIR99021) behandelt worden sind. Rechts daneben ist schematisch das Prinzip der IP aufgezeichnet. B) Immunblot des präzipitierten β -Catenins (behandelt [nt]/unbehandelt [CHIR]) aus Zelllysaten zweier Darmkrebszelllinien (HCT116, SW480).

5.9. Nachweis über die intrazelluläre Expression der Nbs (CBs) und Präzipitation von endogenem β -Catenin (wt)

Wie beschrieben liegen die Vorteile von Nbs in ihrer geringen Größe, einer hohen Stabilität und einer sehr guten Löslichkeit in hydrophiler Umgebung [91]. Diese Faktoren führen dazu, dass ausgewählte Nbs auch intrazellulär in humanen Zelllinien exprimiert werden und dort ihr Antigen erkennen und binden (siehe auch [98, 139, 160, 161]). Kombiniert man nun Nbs über Fusion mit fluoreszenten Proteinen zu sogenannten Chromobodies (CBs) hat dies den Vorteil, dass die Dynamik endogener Antigene mit den Nbs in Echtzeit verfolgt werden kann. Eine intrazelluläre Anwendung ist nicht nur für die Verfolgung dynamischer Prozesse, wie die Translokation von nicht phosphoryliertem β -Catenin in den Zellkern nach Akkumulation

interessant, sondern auch für die Adressierung von Interaktionskomplexen in der noch lebenden Zelle. Dies ermöglicht die Adressierung von ‚natürlichen‘ Komplexen. Bei einer Lyse werden Barrieren von Kompartimenten der Zellen ebenfalls aufgelöst, wie Zellkern, Mitochondrien, Lysosomen. Es kommt zu einer Vermischung. Eine Immunpräzipitation direkt aus dem Lysat adressiert möglicherweise schon veränderte Proteinkomplexe. Das würde bedeuten, dass es möglicherweise zu Interaktionen von Proteinen kommt, die vorher räumlich getrennt waren. Damit entsteht ein verzerrtes Bild der Proteininteraktion. Die Möglichkeit Antigene schon intrazellulär zu adressieren verringert die Zeit für eine Interaktion mit dem komplexen Medium des Lysats nach einer Lyse. Denn die Bindung des Antigens fand schon vor der Lyse im Zellinneren statt und nicht wie in konventionellen IPs nach der Lyse. Dies ermöglicht eventuell die Isolierung von realen Komplexen und wäre ein Gewinn für die traditionelle Interaktions-Analyse mit AK-Detektion, aber auch für moderne Methoden, wie der MS-Analyse. Denn die Wiedergabe des exakten Zustandes des Interaktoms zum gegebenen Zeitpunkt gibt Aufschlüsse über Funktion und Lokalisation des Antigens. Aus diesem Grund und um die bisherigen Immunpräzipitationsergebnisse auch intrazellulär zu bestätigen, wurden die Antigenbindung von β -Catenin-spezifischen Nbs in Kombination mit eGFP als CBs in lebenden Zellen untersucht (Abbildung 16 A). Dazu wurden HEK293T-Zellen mit Plasmiden der CBs transfiziert und die Zellen ca. 24 h nach Transfektion mit CHIR für weitere 24 h behandelt. Im Anschluss wurden die Zellen geerntet und lysiert. CB/ β -Catenin-Komplexe wurden mittels GFP-Trap[®] präzipitiert. Die Präzipitate wurden mittels quantitativem Immunblot-Verfahren analysiert und ausgewertet. Die Untersuchung des präzipitierten β -Catenins (gebundene Fraktion/B) aus der intrazellulären Immunpräzipitation (ICIP) mit CBs ergab ein anderes Bild als für die vorangegangenen IP-Experimente. Allgemein konnte festgestellt werden, dass alle Nbs ihr Antigen intrazellulär erkannten und als Komplex präzipitiert wurden. Jedoch beobachtete man für BC6 und -9 nach Behandlung mit CHIR (+), ungleich zu vorherigen Ergebnissen, einen starken Anstieg präzipitierten β -Catenins (B) (Abbildung 16 B). Dies führte zu einem relativen Signalanstieg von >6 für beide CBs (Abbildung 16 C). Für BC2 und -13 hingegen konnte bei den unbehandelten Proben (-) keine starken Signale für β -Catenin nachgewiesen werden. Auch nach Inhibition von GSK3- β mit CHIR wurde kaum Anreicherung beobachtet. Der relative Signalanstieg lag zwar über dem der Kontrolle, jedoch nur unwesentlich über 1 (Abbildung 16 C). Allerdings konnte bei näherer Betrachtung des im Lysat enthaltenen (I) und des präzipitierten CBs (B) festgestellt werden, dass die CB-Konstrukte von BC2 und -13 nur sehr gering intrazellulär exprimiert wurden. Dagegen lassen sich die CBs BC1, -6 und -9 genauso gut exprimieren wie die Negativkontrolle GFP ohne Bindungsanteil (Abbildung 16 B GFP-Signale). Die für BC1-CB beobachteten Signale waren vergleichbar mit vorherigen Ergebnissen aus der IP aus HEK293T-Zellen (Abbildung 15 A). Der relative Signalanstieg konnte auf ~ 6 ermittelt werden.

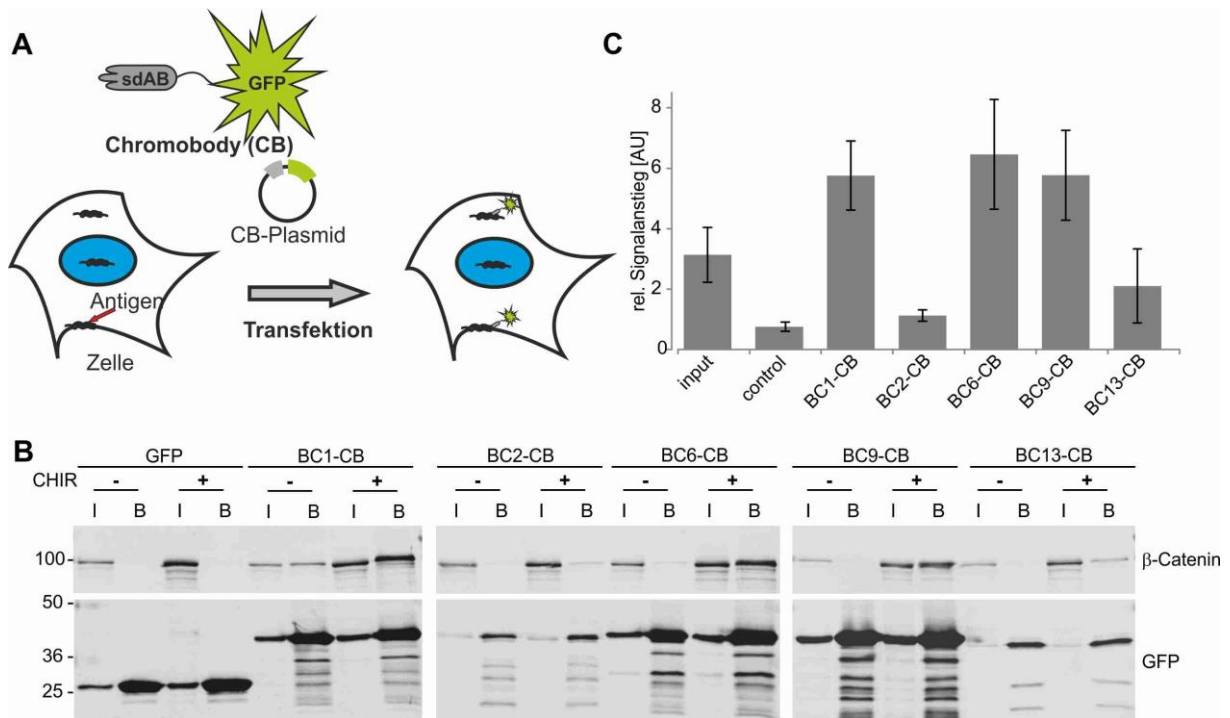


Abbildung 16: Präzipation von CBs (CB) aus HEK293T-Zelllysaten. A) Schematische Darstellung des Ablaufs einer intrazellulären Immunpräzipation vor der Lyse der Zellen. B) Berechnung des Verhältnisses von präzipitiertem β -Catenin. C) Immunfärbung der präzipitierten angezeigten CBs (GFP) und des ko-präzipitierten β -Catenins aus CHIR99021 behandelten (+) und unbehandelten (-) HEK293T-Lysaten im Vergleich. Der ‚Input‘ (I) repräsentiert die Gesamtprobe vor der Präzipation und die ‚Bound‘ (B) den gebundenen (/präzipitierten) Anteil. Die dargestellte Quantifizierung erfolgte auf Basis von 6 unabhängigen Experimenten (in Zusammenarbeit mit Dr. Ulrich Rothbauer)

Die unterschiedlichen Proteinmengen der CBs wurden im Anschluss genauer untersucht. Hierzu wurden Proben der Zelllysate von CB-exprimierenden HEK293T-Zellen in gleicher Konzentration und Menge nebeneinander aufgetragen, über SDS-PAGE aufgetrennt und mittels Immunblot-Verfahren untersucht. Mit Hilfe eines GFP-spezifischen AK (Chromotek) wurden die CBs angefärbt und die Stärke des Signals verglichen (Abbildung 17). Zu sehen war, dass BC1, -6 und -9 als CBs exprimiert werden, BC2 und -13 dagegen kaum. Vorstellbar ist, dass diese CBs Aggregate bilden und deshalb abgebaut werden.

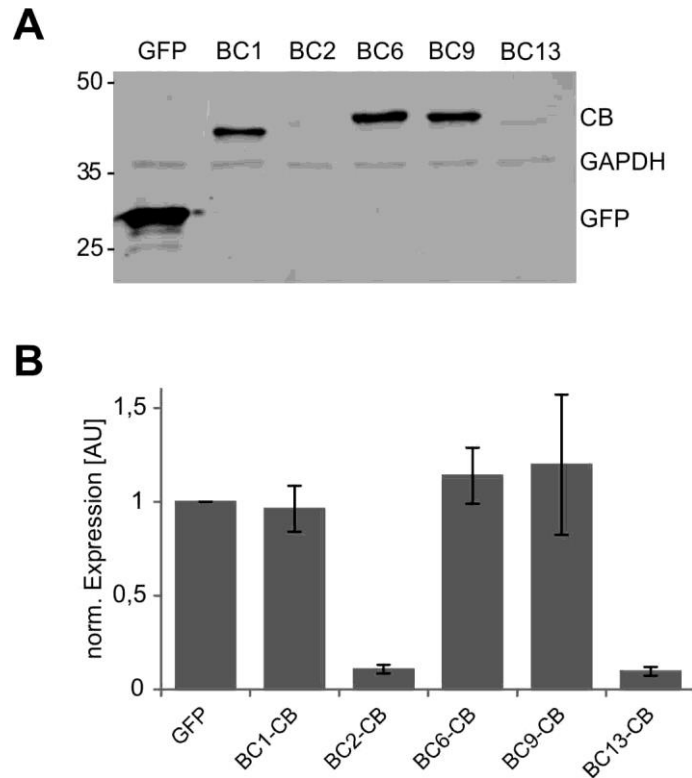


Abbildung 17: Vergleich der intrazellulären Expression der CBs in HEK293T-Zellen. Immunfluoreszenzfärbung von Proben von HEK293T-Lysaten von transient mit CBs transfizierten Zellen. Vergleich der Expression (CB/GAPDH).

5.10. Untersuchung der Zytotoxizität der CBs BC1,-6 und -9 mit Resazurin-Assay

Um die Auswirkung der CB-Expression auf die Vitalität der Zellen genauer zu untersuchen und eventuell Nbs mit zytotoxischer Wirkung zu selektieren, wurde ein Resazurin-Assay durchgeführt. Die Vitalität der transient mit CB-Plasmid transfizierten HEK293T-Zellen wurde 24 h und 48 h nach der Transfektion gemessen. Das nicht als zytotoxisch bekannte GFP konnte als Kontrolle verwendet werden. Mit Hilfe des Tests stellte man weder nach 24 h (A) noch 48 h (B) eine toxische oder gar eine proliferationsbeschleunigende Wirkung fest (Abbildung 18). Es wurden keine signifikanten Unterschiede zwischen CBs und GFP festgestellt.

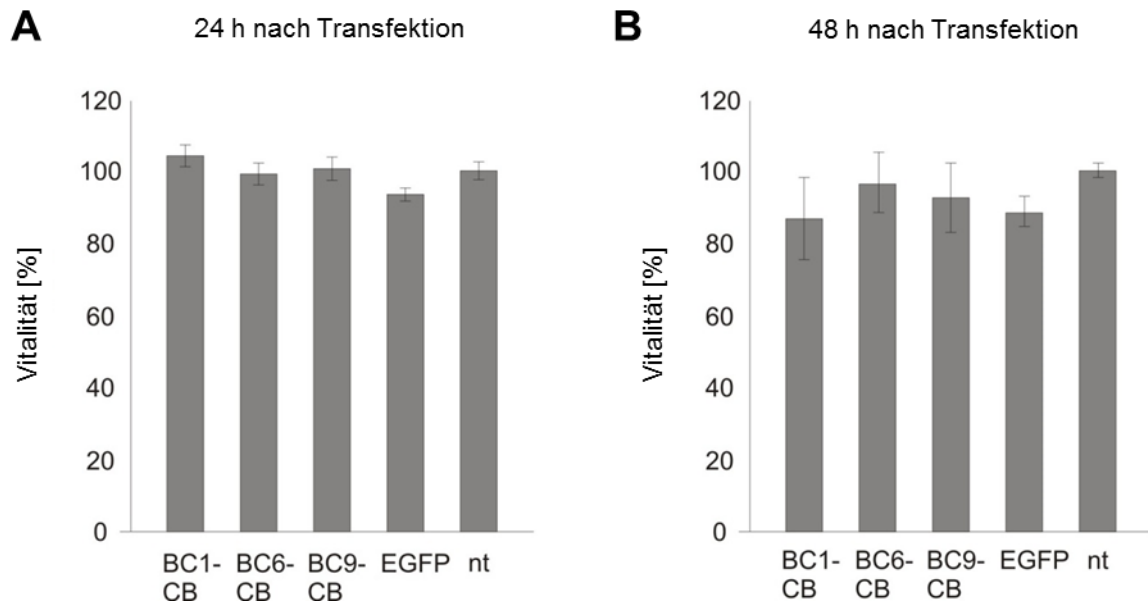


Abbildung 18: Vitalitätsmessung von transient mit CBs transfizierten HEK293T-Zellen mit Resazurin. Gezeigt sind Daten aus drei unabhängigen Replikaten des Resazurin-Assays von transient mit angezeigten CBs transfizierten HEK293T-Zellen. Nicht transfizierte Zellen (non-treated/nt) dienen als Kontrolle und stellen 100 % dar. Die Balken repräsentieren die Mittelwerte der auf nt normalisierten Messungen (in Zusammenarbeit mit Dr. Roman Anton)

5.11. Luziferase-Reporter-Assay zur Untersuchung der Auswirkungen auf die transkriptionellen Funktionen von β -Catenin (TopFlash)

Es ist bekannt, dass die Überexpression von β -Catenin-Fusionsproteinen zu einer Aktivierung der TCF4/LEF kontrollierten Genexpression führt. So konnte dies in der Vergangenheit in einem Luziferase-Reporter-Experiment von Korinek et al. gezeigt werden [64] (siehe Abbildung 19).

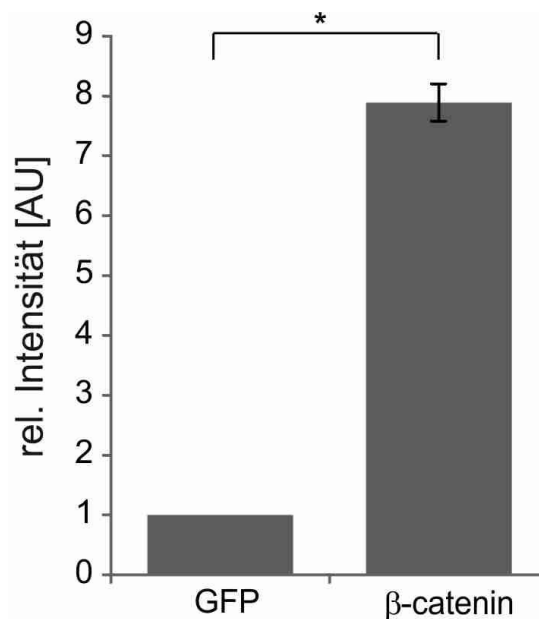


Abbildung 19: Topflash Luziferasereporteransatz von HEK293T-Zellen transient transfiziert mit Fusionsprotein GFP- β -Catenin. Gezeigt wird die relative Intensität aus 3 unabhängigen Messungen mit Standardabweichung. Quelle: [98]

Aufgrund der Experimente von Korinek et al ist bekannt, dass die Einbringung von rekombinanten Proteinen, die den Wnt-Signalweg adressieren, kritische Auswirkungen auf die Expression der WRE haben kann. Um die Auswirkungen der CB-Expression auf die transkriptionelle Funktion von β -Catenin zu untersuchen, wurden TOPflash-Assays durchgeführt. Dazu wurden HEK293T-Zellen mit Topflash- und CB-Plasmiden (BC1, -6 und -9) transfiziert und nach 24 h, mit 10 mM LiCl oder NaCl (Negativkontrolle) behandelt. Das Topflash-Plasmid ist ein Reporterkonstrukt eines Glühwürmchen-Luziferasegens, das unter der Kontrolle eines Promotors steht, der durch TCF4/ β -Catenin-Transkriptionskomplexe aktiviert wird. Bei Aktivierung des kanonischen Wnt/ β -Catenin-Signalwegs wird die Luziferase exprimiert und das Luziferase-Signal kann mittels eines Luziferase-Assays quantifiziert werden. Die Transkription der β -Catenin/TCF4-kontrollierten Luziferase wurde mittels LiCl induziert. LiCl ist als Inhibitor von GSK3 β bekannt und verhindert die Phosphorylierung von β -Catenin und damit den subsequenten Abbau durch das Proteasom. Im Folgenden stabilisiert sich der β -Catenin-Level und die nachgeschaltete β -Catenin-abhängige Transkription wird aktiviert. Unter anderem das Reportergen (Luziferase) welches dann im Luziferase-Assay

gemessen werden kann. Nach 4 h und 24 h wurde das Experiment durch Zugabe von Luziferase-Substrat abgestoppt und die Lumineszenz gemessen. Dabei zeigte sich, dass im Vergleich zur Kontrolle GFP (keine Inhibition/ 100% Signal) nur für die CBs BC6 und -9 eine dauerhafte Reduktion des Luziferasesignals von ca. 40 % nach 24 h zu beobachten war (Abbildung 20). BC1 erreichte nach 24 h die gleiche Signalintensität wie die Kontrolle. Dies deutet darauf hin, dass BC1 der einzige Nb ist, der sowohl effizient intrazellulär exprimiert werden kann, keine zytotoxischen Eigenschaften besitzt und die transkriptionelle Aktivität von β -Catenin nicht wesentlich beeinflusst. Aufgrund dieser Eigenschaften wurde der BC1-CB für den Nachweis der intrazellulären Dynamik von endogenem β -Catenin ausgewählt. In weiteren Untersuchungen konnte von Dr. Björn Traenkle der BC1-CB u.a. zur Detektion von der zytoplasmatischen zur nukleären Translokation von β -Catenin mittels HC-Analyse (High Content-Analysis) gezeigt werden [98]. BC6 und -9 dagegen sind als potentiell inhibitorische CBs für weitere Anwendungen interessant.

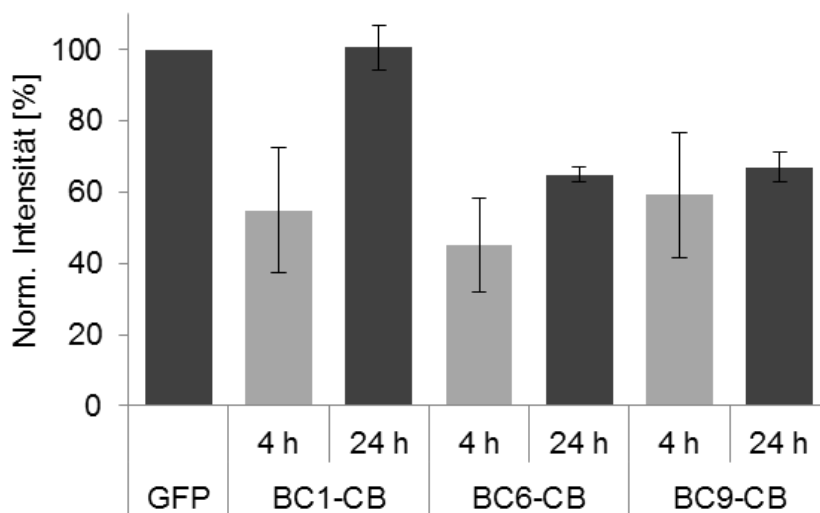


Abbildung 20: Topflash Luziferase-Reporteransatz. HEK293T-Zellen wurden mit den angezeigten Plasmiden der CBs oder GFP und TCF4-Reporterkonstrukten (Topflash) transfiziert. Die Zellen wurden mit 10 mM LiCl für 4 h (helles Grau) oder 24 h (dunkles Grau) behandelt. Gezeigt sind die normalisierten Werte der gemessenen Lumineszenz von drei unabhängigen Replikaten \pm Stdabw.

5.11.1. Nbs als Wnt-Signalweg-Inhibitoren

Um den Einfluss von BC6 und -9 auf die transkriptionelle Funktion von β -Catenin weiter zu untersuchen wurde ein Kombinationstest durchgeführt. Damit sollte untersucht werden, ob bei zeitgleicher Expression beider CBs die β -Catenin/TCF4-gesteuerte Transkription noch weiter inhibiert wird. Dazu wurde zusammen mit den Topflash-Plasmiden als Kontrolle die doppelten Konzentrationen GFP, GFP/BC6-CB, GFP/BC9-CB und BC6-CB/BC9-CB in HEK293T transfiziert und 24 h nach der Transfektion mit 10 mM LiCl die β -Catenin-abhängige Transkription aktiviert. Die Behandlung wurde nach 24 h und 48 h abgestoppt und die Lumineszenz gemessen. Hierbei konnte beobachtet werden, dass nach 24 h nur für BC-9 oder

die Kombinationsbehandlung mit BC6 und -9 eine deutliche Inhibition von ca. 30 % des Lumineszenzsignals aufwies (Abbildung 21 A). Interessanterweise war nach 48 h kein Unterschied des Inhibitionseffekts zwischen den Behandlungen in denen ein CB transfiziert wurde (GFP/BC6, GFP/BC9, BC6/BC9) sichtbar. Es konnte also durch eine Kombinationsbehandlung eine schnellere Inhibition als mit BC6 allein induziert werden (24 h ca. 20 %), die aber über die Zeit nicht zu einer stärkeren Inhibition führte.

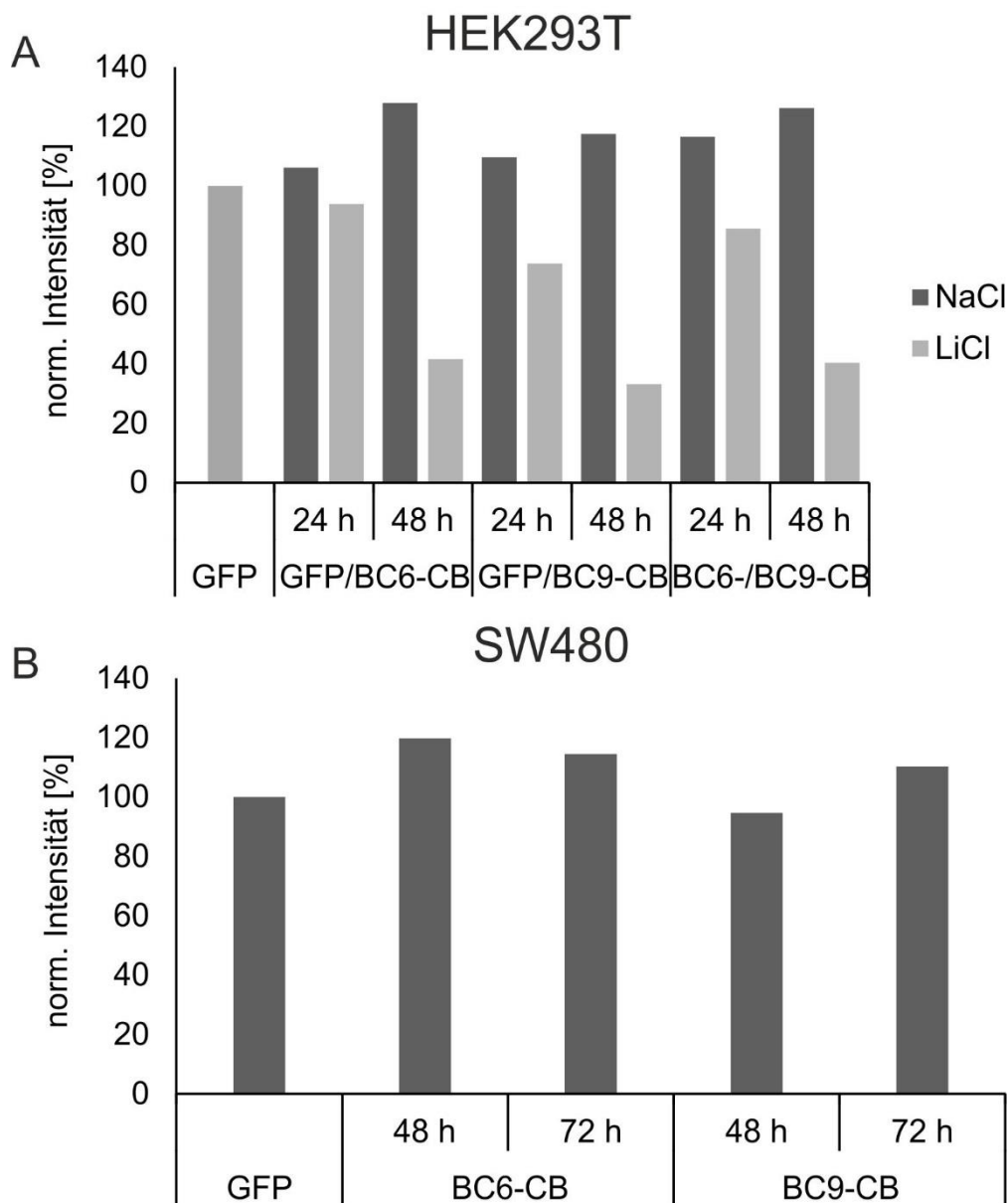


Abbildung 21: Topflash-Luziferase-Reporteransatz. HEK293T oder SW480-Zellen wurden mit angezeigten Konstrukten und TCF4-Reporterkonstrukt transfiziert. A) HEK293T Zellen wurden anschließend für 24 oder 48 h mit 10 mM LiCl oder NaCl behandelt. B) SW480-Zellen wurden nach je 48 h oder 72 h gemessen. Alle Daten repräsentierten eine Messung normalisierter Lumineszenz aus den Mittelwerten von 3 Triplikaten.

Wie beschrieben zeichnen sich 80% der Kolonkarzinome durch eine Mutation in APC aus, dadurch wird ein proteasomaler Abbau von β -Catenin verhindert [62]. Durch die darauffolgende Stabilisierung von aktivem (nicht phosphoryliertem) β -Catenin werden die

WRE aktiviert. Dies kann auch in humanen Darmkrebszelllinien, wie SW480, beobachtet werden [64]. Bisher fand die Charakterisierung der inhibitorischen CBs in HEK293T-Zellen statt. Diese besitzen aber nicht die charakteristischen Eigenschaften eines Kolonkarzinoms, bei der eine abnormale Stabilisierung von β -Catenin schon vorliegt und WRE aktiv transkribiert werden. Um nun zusätzlich die inhibitorischen Fähigkeiten von CB BC6 oder -9 in einem Modell zu testen, in dem die Aktivierung nicht von außen induziert und die typische transkriptionelle Aktivität eines Kolonkarzinoms simuliert wird, wurden SW480-Zellen mit den CBs transfiziert und die Effekte mittels TOPflash analysiert. Von einer Kombinationsbehandlung wurde aufgrund der nicht dokumentierten Wirkungssteigerung abgesehen. Die Lyse der Zellen und die Messung der Lumineszenz fand nach je 48 h und 72 h nach der Transfektion statt. Der erste Wert 48 h wurde gewählt aufgrund der Ergebnisse aus dem vorherigen Experiment. Denn erst zu diesem Zeitpunkt konnte eine eindeutige Inhibition beobachtet werden (Abbildung 21, A). Nach Auswertung der Lumineszenzsignale und Vergleich mit der GFP-Kontrolle konnte weder nach 48 h noch nach 72 h eine Inhibition für BC6 oder -9 in SW480-Zellen beobachtet werden (Abbildung 21, B).

5.12. Einsatz von Nbs in der Diagnostik

5.12.1. WB Immunfluoreszenznachweis mit Nbs

Eine traditionelle Methode zum Nachweis von Antigenen ist der Western Blot (WB). Die Detektion der Proteine findet dabei mit spezifischen Antikörpern statt. Der Nachteil von Antikörpern ist, dass ihre Selektion und Reifung mit großem Aufwand und Materialeinsatz verbunden ist [162]. Dagegen können Nbs nach der Selektion schnell als monoklonale Reagenzien rekombinant produziert werden. Um zu testen ob die Nbs auch in einem WB-Verfahren anwendbar sind, wurde β -Catenin-His6 in unterschiedlichen Konzentrationen auf Nitrozellulose elektrotransferiert und mit Atto488 konjugierten Nbs nachgewiesen. Ein unspezifischer Nb diente als Negativkontrolle. Anhand der detektierten Signale konnte gezeigt werden, dass die fluoreszent markierten Nbs BC1, -2 und -13 im Immunblot rekombinantes β -Catenin nachweisen konnten (Abbildung 22). Die höchsten Signale wurden mit BC2-Atto488 erreicht. Mit BC6 beobachtete man kein Signal und mit BC9 konnten nur sehr niedrige Signale gemessen werden. BC1, -2 und -13 adressieren Epitope in Domänen für die bisher kaum Sekundärstrukturen beschrieben sind (NTD und CTD) und somit vermutlich ungefaltete Regionen adressieren. BC6 und -9 hingegen erkennen Epitope in der Armadillodomäne, welche eine kompakte und konservierte Faltung besitzt [8, 19]. Deshalb ist es sehr wahrscheinlich, dass BC6 und -9 dreidimensionale-Strukturen erkennen. Diese könnten im Verlauf der Trennung der Proteine in SDS-PAGE und beim Elektrotransfer auf die Nitrozellulose-Membran denaturiert worden sein. Generell scheint ein Einsatz von Nbs im WB-Verfahren möglich. Jedoch konnten in weiteren Experimenten mit endogenem β -Catenin mit

keinem Nb eine Detektion erzielt werden (nicht gezeigt). Dies ist möglicherweise auf die geringe Sensitivität zurückzuführen. Die Detektion mit AK wird zumeist mit spezifischem Primär-AK und einem speziesspezifischen Sekundär-AK durchgeführt. Dies erhöht die Sensitivität dadurch, dass an einen Sekundär-AK mehr Farbstoffe konjugiert werden können. Außerdem besitzen AK zwei Paratope und haben eventuell eine höhere Avidität als Nbs.

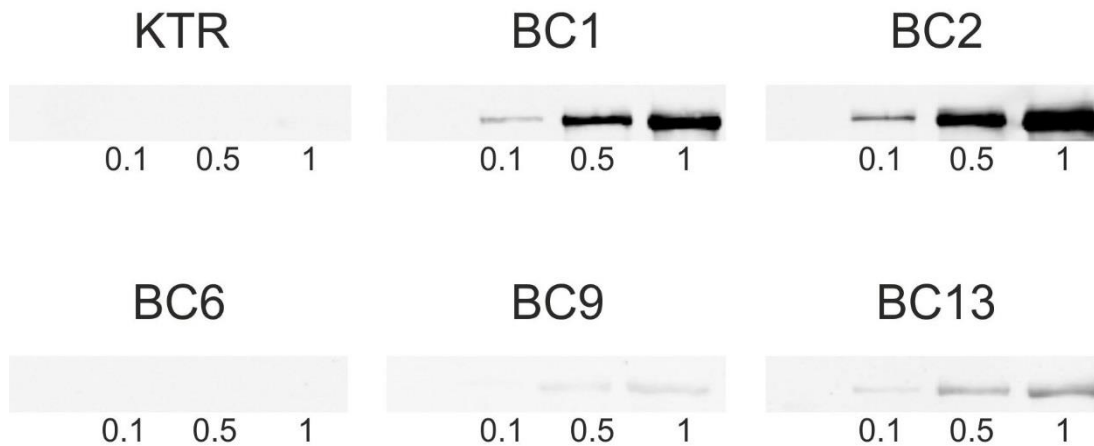


Abbildung 22: Immunblot von β -Catenin mit Atto488 gekoppelten Nbs. Unterschiedliche Mengen (0,1, 0,5 und 1 μ g) rekombinantes β -Catenins (His6) wurden über SDS-PAGE und WB auf eine Nitrozellulosemembran transferiert und mit Nbs-Atto488 gefärbt. Als Negativ-Kontrolle wurde GBP-Atto488 eingesetzt.

5.12.2. Mikrosphärenbasierte diagnostische Arrays zur Auswahl von Nbs als Fänger und Detektor

Wichtiger Bestandteil heutiger Krankheitsprävention und Vorsorge ist die Diagnostik. Hierbei werden Patientenproben auf Antigene, die Aufschluss über die Art der Erkrankung geben, untersucht. Die häufigste Anwendung in der Diagnostik sind AK-basierte Sandwich-Immunassays. Dabei wird das Antigen aus der Probe über AK auf einer Matrix immobilisiert und mit weiteren AK detektiert. Eine multiplexe Analyse wurde schon von Poetz et al und Luckert et al. in Mikrosphärenbasierten Immunarrays beschrieben [143, 163]. Im Rahmen dieser Arbeit sollte untersucht werden inwieweit sich die identifizierten Nbs für den Einsatz als Detektor und/oder Fängermoleküle eignen. Dazu wurden die Nbs auf Mikrosphären immobilisiert und als Fänger zur Präzipitation von β -Catenin-His₆ (1 und 0,1 μ g/ml) eingesetzt. Als Kontrollen wurde ein unspezifischer Nb (contr. neg.) sowie ein polyklonaler AK spezifisch für β -Catenin eingesetzt. Die Detektion gebundenen β -Catenins wurde mit biotinylierten Nbs mit unterschiedlicher Linker-Zusammensetzung zwischen den Nb (BC1, -2, -6, -9 und -13) und dem Biotin ermöglicht. Der Test verschiedener Linker erscheint sinnvoll, weil die Linker eventuell Auswirkungen auf das Bindeverhalten haben könnten. So könnten die Nähe, Entfernung oder Linkereigenschaften (Hydrophobizität, Polarität, usw.) Einfluss auf die Bindeeigenschaften von Paratop zu Epitop des Nbs oder auf die Bindung von Streptavidin-PE zu Biotin nehmen. Es sollte gewährleistet werden, dass eine höchstmögliche Sensitivität und

Spezifität durch die verwendeten Linker erhalten bleibt. Die Detektion auf Nbs-gekoppeltem Biotin erfolgte im Anschluss mit Streptavidin, konjugiert mit Phykoerythrin. Die Fluoreszenz je Mikrosphäre wurde im Durchflusszytometer gemessen. Als Positivkontrolle wurde ein monoklonaler β -Catenin-spezifischer AK (clone14, BD) eingesetzt. Nur für die Kombination von BC1 als Fänger, immobilisiert auf Mikrosphären und mit BC2 als Detektor konnten für rek. β -Catenin ausreichend hohe Signale detektiert werden (Abbildung 23 A). Alle anderen Detektor-Nbs zeigten nur unzureichende Signale (BC1) oder keine Signale (BC6, -9 und -13) in dieser experimentellen Anordnung (Daten nicht gezeigt). Mit LC-LC („Long chain-Long-chain/ Kohlenwasserstoffketten) als Linker wurden die höchsten Signale erreicht. Die Detektion mit β -Catenin-spezifischem AK zeigte ebenfalls, dass BC1 am effizientesten rek. β -Catenin-His6 präzipitiert (Abbildung 23 B). Im Vergleich zum polyklonalen AK konnte eine fast fünffach höhere Effizienz festgestellt werden. Das selektierte Nb Detektor/Fänger-Paar wurde im Anschluss in einem Array zur Präzipitation von endogenem β -Catenin aus verschiedenen Zelllysaten eingesetzt.

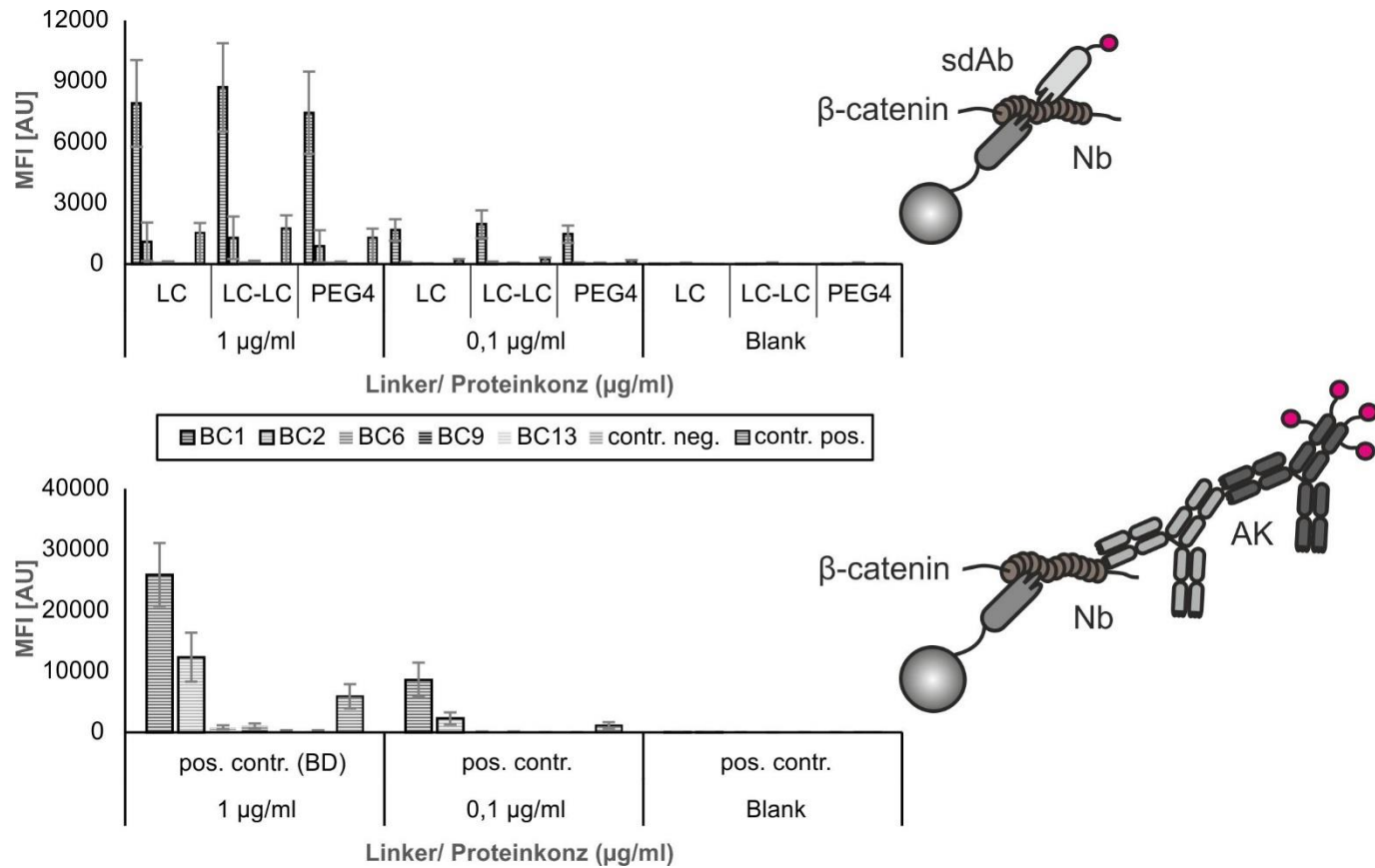


Abbildung 23: Mikrosphären-basierter Array zur Selektion von Fänger/Detektor Paaren. Oberes Diagramm zeigt die Detektion von rek. β -Catenin mit biotiniliertem BC2. Der Linker zwischen dem Nb und Biotin bestand aus einer Kohlenwasserstoffkette (LC/'long chain'), aus zwei LC (LC-LC) oder PEG4. Unteres Diagramm stellt die Kontrolle mit AK-Detektion dar. Alle Balken bestehen aus den Mittelwerten dreier unabhängiger Replikate und den Stabw.

5.12.2.1. Nachweis von endogenem β -Catenin in simulierten Patientenproben

Nach dem Nachweis für rekombinates β -Catenin mittels Mikrosphärenbasierten Arrays sollte das identifizierte Nb basierte Fänger/Detektorsystem in „simulierten“ Patientenproben getestet werden. Hierzu wurden Zelllysate von HEK293T-, HCT116- und SW480-Zellen, die mit 20 mM LiCl oder äquimolarer NaCl behandelt worden waren, verwendet. Die Veränderung des β -Catenin-Levels nach LiCl Behandlung sollte durch die in vorherigen Tests ausgewählte Fänger/Detektor-Anordnung untersucht werden. Dazu wurde mit Hilfe der Nb/AK konjugierten Mikrosphären das endogene β -Catenin präzipitiert und die gebundenen Fraktionen detektiert. Aus allen Proben konnte mit BC1 β -Catenin präzipitiert und mit BC2 als Detektor die gebundene Fraktion auch nachgewiesen werden (Abbildung 24 A). Auch die Anreicherung bei HEK293T-Lysaten aus behandelten Zellen (HEK293T+) bzw. die nicht weiter induzierbaren β -Catenin-Level in HCT116- und SW480-Zellen, konnte durch BC1/BC2-Kombination abgebildet werden. Der Vergleich mit dem AK gegen np- β -Catenin zeigte ein ähnliches Muster. Die eingesetzten Fängerantikörper zeigten bis auf pp- β -Catenin-AK jedoch höhere Signale mit BC2 als Detektor. Die Detektion mit β -Catenin-spezifischem AK zeigte ein ähnliches Muster, jedoch mit bis zu 30facher Amplifikation des Signals (Abbildung 24 B). Generell konnte ein Einsatz in der Diagnostik gezeigt werden. So konnte mit der Nb-Kombination BC1/BC2 Veränderungen des zellulären β -Catenin-Levels wiedergegeben werden. Allerdings muss für einen Einsatz in der Diagnostik die Sensitivität erheblich verbessert werden.

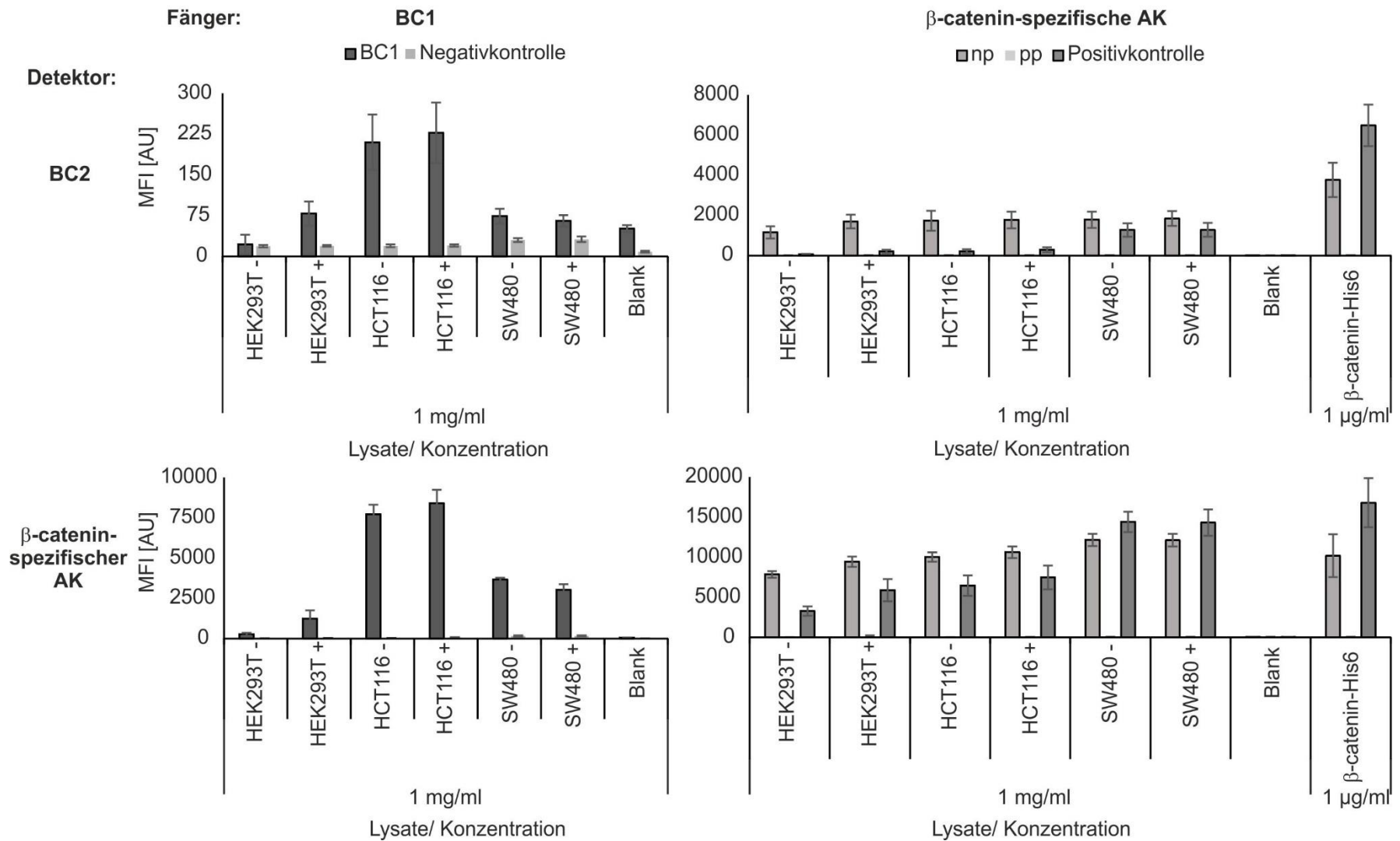


Abbildung 24: Nachweis von endogenem β -Catenin mit dem Fänger/Detektor-Paar BC1/BC2-LCLC-Biotin im Mikrosphären-Array. Rechts sind jeweils die Diagramme der Kontrollen dargestellt. Obige Diagramme stellen die Detektion mit BC2 und die unteren Diagramme mit einem β -Catenin-spezifischen AK. Alle Balken bestehen aus den Mittelwerten dreier unabhängiger Replikate und den Stabw. np: non-phospho-SSTS- β -Catenin-spezifischer AK; pp: phospho-SSTS- β -Catenin-spezifischer AK.

5.12.3. Interaktomanalyse von β -Catenin-Interaktionskomplexen mit Hilfe von Nb-Präzipitaten

Typische Anwendungsbereiche von Bindemolekülen ist die Präzipitation von Zielproteinen bzw. Antigenen mit anschließender Interaktomanalyse mittels Western Blot (Immunblot-Analyse) oder die Massenspektrometrie. Antikörper oder Fusionsproteine sind beliebte Werkzeuge um ein Antigen oder/und das Interaktom (die Interaktionsproteine) aufzureinigen und zu isolieren. Fusionen aus dem Antigen und einem Affinitäts- oder Fluoreszenz-Tag sind keine Entsprechungen für das endogene Antigen. Fusionstags können zum einen zu einer Strukturänderung führen und zum anderen die Proteindynamik behindern. Dies könnte zu einer nachhaltigen Beeinflussung der Interaktom-Zusammensetzung führen. AK können mit hoher Spezifität und Affinität ihr Antigen präzipitieren. Allerdings ist es möglich, dass es zu einer Kompetition zwischen AK und Interaktionsproteinen kommt und diese aus Proteinkomplexen verdrängt werden. Allein die Größe eines AK könnte die Ko-Präzipitation von Interaktionsproteinen des Antigens negativ beeinflussen. Ebenfalls können AK zumeist nur Oberflächen der Proteine binden. Kavitäten sind für konventionelle AK möglicherweise schwieriger zu binden. In diesem Zusammenhang konnten Nbs bereits als effiziente Alternative zu konventionellen AK für die Präzipitation und Analyse des Interaktoms von Proteinen gezeigt werden [99, 130, 160]. Ihre geringe Größe, die konvexe Struktur der CDRs, die es möglich macht auch Kavitäten als Epitope zu erkennen und ihre hohe Affinität, könnte sie in der Interaktom-Analyse zu einem wichtigen Werkzeug machen.

5.12.3.1. Nachweis der Interaktionsproteine mit der Immunblot-Methode

Um zu testen ob die Nbs auch Proteine des Interaktoms von β -Catenin präzipitieren, wurden aus HEK293T Zellen (mit oder ohne CHIR99021-Behandlung) Lysate hergestellt und mit den Nbs β -Catenin präzipitiert. Die Präzipitate wurden dann mittels Immunblot auf Proteine des β -Catenin-Interaktoms untersucht. Hierzu wurden spezifische AK verwendet um Proteine des Destructionkomplexes, der Adhärenzverbindungen, des TCF/LEF-Transkriptionskomplexes und des Zytoskeletts zu detektieren. Präzipitiert wurde mit BC1, -2 und -13, die in den IPs (siehe 5.8, Abbildung 15) hohe Signale für endogenes β -Catenin zeigten. Als Kontrolle wurde ein unspezifischer Nb eingesetzt und ein GAPDH-spezifischer AK fand Verwendung um unspezifische Bindungen zu untersuchen. Mit dieser Interaktom-Analyse konnte nachgewiesen werden, dass alle Nbs Proteine des Interaktoms von β -Catenin ko-präzipitierten (Abbildung 25). Die Kontrolle GAPDH, die bisher nicht als Teil des Interaktoms von β -Catenin beschrieben ist, wurde nur in der Input-Probe detektiert. Damit konnte eine unspezifische Bindung ausgeschlossen werden. Unterschiede im Präzipitationsmuster stellte man nur für E-Cadherin und GSK3- β fest. Dennoch wurde mit BC2 wie erwartet am meisten β -Catenin präzipitiert und auch die Interaktomproteine waren in der BC2-Fraktion am stärksten vertreten.

Interessanterweise wurden von BC1 und BC2 aus Zelllysaten unbehandelter Zellen relativ ähnliche Signale für GSK3- β detektiert. Alle Proteine wurden nach Behandlung mit CHIR angereichert, eine Ausnahme bildet E-Cadherin in der BC1-Fraktion. Eine Anreicherung konnte hier nicht festgestellt werden. TCF1 wurde wie erwartet erst bei Anreicherung von transkriptionell aktivem β -Catenin, nach CHIR-Behandlung, sehr stark angereichert.

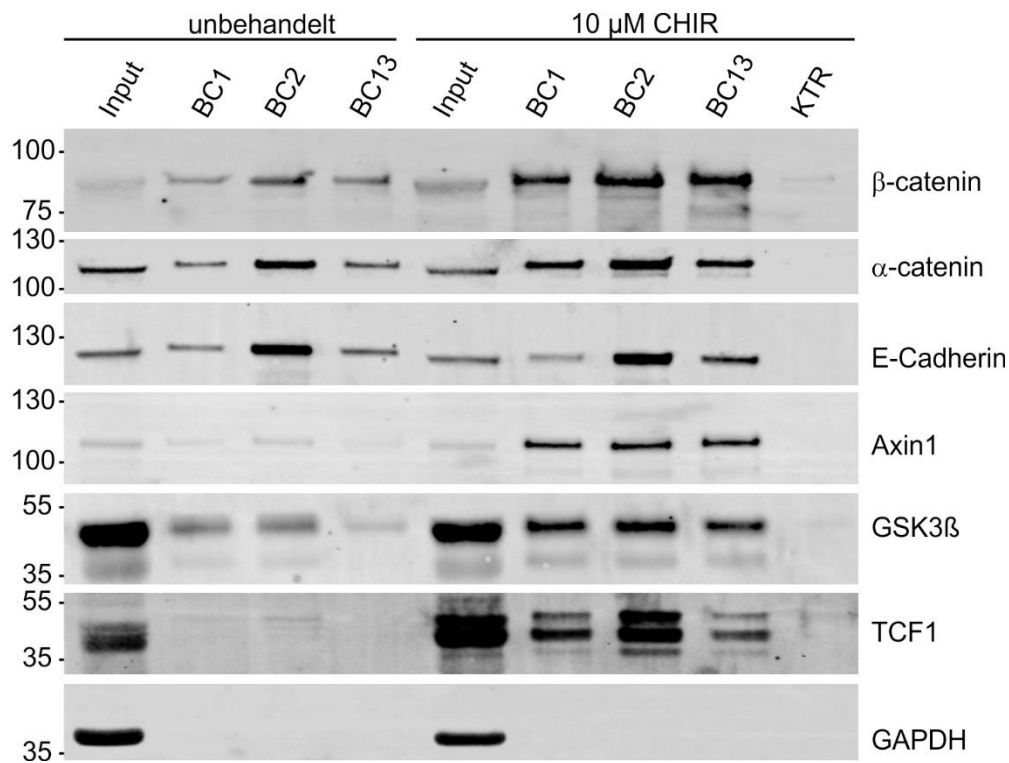


Abbildung 25: WB-Analyse des β -Catenin-Interaktoms. Immunblotanalyse der angegebenen Nb-Präzipitate aus Zelllysaten von HEK293T-Zellen, die mit oder ohne 10 μ M CHIR99021 behandelt worden waren. Es wurden die angegebenen Proteine mit spezifischen AK nachgewiesen.

6. Diskussion

6.1. Selektion und Charakterisierung von 5 variablen β -Catenin-spezifischen Nbs

In dieser Arbeit wurden 14 β -Catenin-spezifische Nbs aus einer Phagenbibliothek mit einer Diversität von bis zu 10^7 Einzelklonen isoliert. Über Phage-Display und mit einer anschließenden Einzelklon-Analyse, mittels eines Phage-ELISA, wurden spezifische Einzelklone selektioniert (Abbildung 6). Durch einen genetischen Vergleich der CDRs erfolgte die Selektion von 14 variablen Nb-Klonen (Abbildung 7). Verglichen mit anderen Studien konnte nur eine unterdurchschnittliche Anzahl an variablen Klonen isoliert werden [164, 165]. Möglicherweise werden hochaffine Klone durch solche Klone verdrängt, die eine hohe Populationsgröße in kurzer Zeit erreichen und so die Interaktion mit β -Catenin blockieren. Ein Einsatz von Waschpuffern mit chaotropen Salzen unterschiedlicher Konzentration oder mit basisch/saurem pH könnte die Selektion hochaffiner Klone begünstigen.

Die weitere Eingrenzung der Nbs durch eine Immunpräzipitation rekombinanten β -Catenins gefolgt von einer Immunblot-Analyse ergab aufgrund der geringen Unterschiede keinen Anhaltspunkt über die Effizienz (Abbildung 8). Anhand eines mikrosphären-basierten Assays erfolgte deshalb die finale Auswahl anhand der Höhe des Signals von gebundenem β -Catenin (Abbildung 9). Die dabei festgestellte unterschiedliche Sensitivität könnte an der Trennung vom Phagenhüllprotein pIII liegen. Möglicherweise führt diese zu einer geringeren sterischen Interferenz des Nb und somit zu einer geringeren Affinität/höheren Affinität. Andererseits kann die Variabilität der CDRs der 14 Nbs ebenfalls zur Erkennung unterschiedlicher Epitope oder einer höheren Affinität zum Epitop führen. Die Nbs BC1, -2, -6, -9 und -13 zeigten ein überdurchschnittliches Signal für Bindung zu β -Catenin (Abbildung 9). Die weitere Charakterisierung der Nbs wurde deshalb ausschließlich mit den selektierten fünf Nbs durchgeführt.

Die Implementierung von Nbs als alternatives Werkzeug für konventionelle Methoden bedingt den Nachweis der generellen Fähigkeiten der Nbs. So konnten sich AK für diagnostische Tests schon lange etablieren. Neuere Verfahren verwenden hierfür allerdings immer häufiger multiplexe Arraysysteme [143]. Aus diesem Grund wurde die Sensitivität ebenfalls mit einem mikrosphärenbasierten Array gemessen (Abbildung 11). Mit rekombinantem β -Catenin konnten so physiologische Mengen simuliert werden. Im Besonderen fiel auf, dass allein BC6 noch bei der geringsten Konzentration von 0,25 ng/ml β -Catenin ein von der Negativ-Kontrolle zu unterscheidendes Signal erkennbar war. Dies könnte auf eine höhere Affinität oder ein zugänglicheres Epitop zurückzuführen sein. Um dies zu untersuchen wurde mittels SPR die Affinität ermittelt und die Kartierung der β -Catenin-Bindedomänen durchgeführt.

Im Besonderen für die Nbs BC1, -2 und -13 wurden für β -Catenin-His6 hohe Affinitäten mittels SPR gemessen, die in ihrer Stärke mit konventionellen AK vergleichbar sind (Abbildung 10). Allerdings wurden für BC6 und -9 keine Signale gemessen. Dies liegt möglicherweise an der Veränderung der Antigen-Struktur. So wurde in vorherigen Versuchen GST- β -Catenin verwendet. GST stabilisiert möglicherweise den N-Terminus und verhindert eine kompakte Konformation von β -Catenin, bei der sich der N-Terminus zur ARM-Domäne zurückfaltet. β -Catenin-His6 fehlt dieser große Fusions-Tag (~37 kDa) und dadurch wird möglicherweise durch Zurückfaltung des N-Terminus auf die ARM-Domäne die Bindung der Nbs zu ihrem Epitop verhindert. Dieser Vorgang wurde mehrfach für die flexiblen End-Domänen NTD und CTD von β -Catenin vermutet und beschrieben ([22], [20]). Dies ist ein möglicher Hinweis, dass die Konformation und die Region des Epitops für die Nbs eine Rolle spielten.

Anhand des multiplexen Domänen-Arrays konnte die spezifische Bindedomäne, in der die Epitope der Nbs liegen, ermittelt werden (Abbildung 13). Interessanterweise konnte festgestellt werden, dass gerade die Nbs BC1, -2 und -13 für die Kinetiken messbar waren, in den terminalen Domänen von β -Catenin ihre Epitope besitzen, wohingegen BC6 und -9 gerade Epitope in der ARM-Domäne adressieren. Dies ist ein möglicher Hinweis, dass die Faltung von β -Catenin für die Erreichbarkeit des Epitops in der ARM-Domäne von enormer Bedeutung ist. So wurde mehrfach beschrieben und vermutet, dass sich die terminalen Domänen zur ARM-Domäne zurückfalten können [20, 22, 23, 148]. Diese blockieren möglicherweise die Bindestellen der ARM-Binder BC6 und -9. Dieses Ergebnis untermauert die oben angeführte Vermutung, dass die veränderte sterische Interferenz zwischen GST- β -Catenin und β -Catenin-His6 ein Grund für die nicht messbaren K_D s bei BC6 und -9 sein könnten.

Da gerade die NTD in der Regulation von β -Catenin durch die Phosphorylierung derselben eine große Rolle spielt, wurden für BC1 und -2 Nbs ein Epitop-Mapping durchgeführt. Daraus ergab sich nur für BC2, der auch die höchste Affinität aufwies, eine eindeutige AS-Sequenz. Dieses Epitop spielt eine Rolle in der Regulation von β -Catenin. So wurde für die AS Ser23, die innerhalb des Epitops (BC2-Epitop AS16-27, PDRKAAVSHWQQ) liegt, sowohl eine Phosphorylierung, als auch die Modifikation mit Glukuron-N-Acetylsäure beschrieben [166, 167]. Durch ein Peptid, das an diesem Serin-Rest phosphoryliert wurde, konnte die Abhängigkeit der BC2-Bindung von einer Modifikation an dieser Stelle nachgewiesen werden. Die Bindung zu einem vermutlich linearen Epitop ist für Nbs eine Seltenheit, denn die konvexe Struktur der CDRs sind besser geeignet dreidimensionale Strukturen zu binden [116, 118]. Die Signale für BC1 hingegen waren schwach und über mehrere Peptide verteilt. Dies weist möglicherweise auf eine Teilbindung verschiedener Peptide und damit auf ein dreidimensionales Epitop hin.

6.2. Charakterisierung der Nbs für generelle Anwendungsfelder

Im Anschluss an die biochemische Charakterisierung der Nbs ging es in dieser Arbeit nun im Wesentlichen um die Untersuchung der Eigenschaften für intrazelluläre Anwendungen oder um den Einsatz in biochemischen Methoden. Dazu wurde zuerst getestet, ob die Nbs endogenes β -Catenin erkennen und ob eine intrazelluläre Expression als auch die Adressierung des Antigens in der lebenden Zelle möglich ist. Im Anschluss wurde ermittelt, ob diese Bindung möglicherweise Auswirkungen auf die Zellvitalität oder die Proteinfunktion von β -Catenin hat.

Durch die Immunpräzipitation von endogenem β -Catenin mit immobilisierten Nbs aus Lysaten von HEK293T-Zellkulturen, behandelt (CHIR) oder unbehandelt (Unbeh.) mit einem GSK3- β -Inhibitor (CHIR99021), wurde die Spezifität zu endogenem β -Catenin nachgewiesen (Abbildung 15 A). Alle Nbs konnten in diesem Versuch endogenes β -Catenin erkennen. Allerdings ergaben sich Unterschiede in der Höhe der detektierten Signale. BC1 zeigte bei der unbehandelten Probe nur ein schwaches Signal und keine Anreicherung, das Signal konnte durch CHIR erheblich induziert werden. Dies spricht für eine präferenzielle Adressierung nicht-phosphorylierten β -Catenins. Allerdings bindet BC1 nach der Epitop-Kartierung nicht im Bereich des SSTS-Motivs (Abbildung 13). Dies schließt eine Maskierung des Epitops durch Phosphorylierung von β -Catenin als Grund aus. Jedoch könnte eine Konformationsänderung der NTD zwischen phosphoryliertem zu nicht-phosphoryliertem β -Catenin eine Erklärung geben. BC2 hingegen zeigte schon von Anfang an eine Anreicherung in der unbehandelten Probe im Vergleich zur Input-Probe. Dieses Bild wiederholt sich auch in der mit CHIR behandelten Probe und lässt vermuten, dass BC2 keine Präferenz für nicht-phosphoryliertes β -Catenin zu haben scheint. Dieses Ergebnis ist auch in Kohärenz mit dem kartierten Epitop (AS 16-27), das vor dem Phosphorylierungs-Motiv SSTS liegt und somit wahrscheinlich keine Maskierung des BC2-Epitops zur Folge hat. Dieselbe Beobachtung wie für BC2 konnte auch für den CTD-Binder BC13 gemacht werden. Die beiden scheinen den kompletten Pool von β -Catenin zu adressieren. BC6 und BC9 zeigen vergleichbar niedrige Signale, die sich nach Anreicherung von β -Catenin nur gering erhöhen. Wie oben im SPR-Experiment beschrieben, könnte in beiden Fällen (Unbeh. und CHIR) die Maskierung der Epitope durch die Konformation von β -Catenin oder durch Interaktionsproteine eine Bindung von BC6 oder -9 behindern. Die Präzipitation aus Lysaten aus Zellkulturen von Kolonkarzinomen (HCT116 und SW480) zeigten ähnliche Ergebnisse (Abbildung 15 B). Jedoch ist zu beobachten, dass in HCT116-Zellen keine starke Anreicherung im Input mit CHIR zu erreichen ist. Dies entspricht Ergebnissen aus der Literatur, die besagen, dass in HCT116 Zellen in einem Allel von *CTNNB1* eine Deletion an der Position von Ser45 zu finden ist und somit keine Initiationsphosphorylierung durch CK1 α möglich ist. Deshalb findet eine Phosphorylierung

nicht mehr statt [48, 159]. Dies führt zur Stabilisierung von β -Catenin, da kein proteasomaler Abbau von β -Catenin durchgeführt werden kann. Interessanterweise zeigt BC1 in HCT116-Zellen schon in der unbehandelten Probe, ganz im Gegensatz zu der entsprechenden HEK293T-Probe, ein starkes Signal. Dies spricht ebenfalls für eine Präferenz für nicht-phosphoryliertes β -Catenin. In SW480-Zellen hingegen wurde eine Anreicherung bei BC1 erzielt, obwohl keine im Input zu sehen ist. SW480-Zellen besitzen eine Deletion in APC, so dass die Proteinsequenz, welche für die Bindung von phosphoryliertem β -Catenin verantwortlich ist, fehlt [48, 159]. Dies führt zur Stabilisierung von β -Catenin. Im Gegensatz zu HCT116-Zellen funktioniert die Phosphorylierungsmaschinerie des Destructionkomplexes jedoch noch. Es wird nur die Polyubiquitinierung und die subsequente Degradation verhindert [168]. Eine Anreicherung eines β -Catenin-Pools, das phosphoryliert in Destruction-Komplexen vorliegt, wäre eine Erklärung. Dies konnte auch schon von Li et al gezeigt werden [48]. Die Inhibition von GSK3- β kann also zu einem Anstieg von nicht-phosphoryliertem β -Catenin führen. Wenn die Vermutung stimmt, dass BC1 präferentiell nicht-phosphoryliertes β -Catenin bindet, könnte dies die Menge von BC1-gebundenem β -Catenin nach Behandlung mit CHIR erklären.

Nachdem nachgewiesen werden konnte, dass die Nbs auch endogenes (wt/wildtypisches) β -Catenin adressieren, folgte ein Test um die Nbs auch für intrazelluläre Anwendung zu charakterisieren. Aufgrund dessen wurden HEK293T-Zellen mit CBs der Nbs transfiziert und die CB-Zelllinien mittels IP untersucht. Ziel war der Nachweis von gebundenem endogenem β -Catenin und der intrazellulären Expression der CBs. Dadurch sollten aus den CBs diejenigen selektiert werden, die sowohl eine hohe Expression als auch eine Adressierung von endogenem β -Catenin zeigten [98] (Abbildung 16). Der Nachweis der CBs mittels GFP-spezifischem AK zeigte Unterschiede in der Expression der CBs (Input/I) (Abbildung 10 B). BC1 und BC6 und BC9 waren gut exprimierbar und zeigen hohe Signale. Dagegen ließen sich BC2 und BC13 nur begrenzt intrazellulär exprimieren. Dennoch zeigte sich nach Präzipitation der CBs, dass alle endogenes β -Catenin binden. Für die CBs BC1, -2 und 13 zeigt sich sowohl in unbehandelten (-) als auch in behandelten Zellen (+) das gleiche Ergebnis wie in der konventionellen IP, allerdings für BC2 und -13 erheblich abgeschwächte Signale, vermutlich aufgrund der geringen Expression des CBs. Allerdings konnte für BC2 durch Kristallisierung eine Disulfidbrücke zwischen dem Framework und dem CDR3 dokumentiert werden [169]. Möglicherweise wird auch die Ausbildung der Disulfidbrücke im reduzierenden Milieu des Zytoplasmas verhindert. Dies könnte Auswirkungen auf die Bindungseigenschaften von BC5 haben. Interessanterweise ist für BC6 und -9 im Vergleich zur konventionellen IP eine starke Anreicherung von β -Catenin von unbehandelter zu behandelter Probe zu beobachten. Nach der Inhibition von GSK3- β wird das neusynthetisierte β -Catenin nicht mehr phosphoryliert und kann durch den blockierten Abbau im Zytoplasma akkumulieren [19, 48]. Dieses

neusynthetisierte β -Catenin befindet sich noch nicht in Komplexen mit Interaktionsproteinen und die ARM-Domäne ist somit frei verfügbar für die Interaktion mit den CBs BC6 und -9. Im Gegensatz zur konventionellen IP, in der die Nbs nach der Stabilisierung und Lyse der Zellen erst dem Lysat angeboten wurden, sind die CBs schon vor der Stabilisierung in der Zelle und können ihr Epitop noch vor der Lyse binden. Konventionelle AK werden nach der Lyse in die Proteinlösung zugegeben, dadurch können sich, wie oben beschrieben (Ergebnisse 5.9), möglicherweise schon neue Interaktionskomplexe gebildet haben und eventuell könnte durch ein Interaktionsprotein das Bindeepitop blockiert werden. Durch die Verrechnung von der Expression (GFP-Signal) und gebundenem β -Catenin (Abbildung 16) zeigte sich ein Präzipitationsverhältnis von einem fast 6fachen Anstieg von unbehandelter zu behandelter Probe des β -Catenin-Signals für die BC1, -6 und -9-Proben. Wohingegen die CBs, die scheinbar keine Präferenz für eine bestimmte β -Catenin-Population (BC2 und BC13) zeigten, nur einen schwachen Anstieg zu verzeichnen hatten. Dies unterstreicht die Annahme, dass diese beiden eventuell die Gesamtpopulation adressieren oder schon in der unbehandelten Probe (unbeh.) gesättigt vorliegen. Aufgrund der hohen Expression könnte die Steigerung bei BC1, -6 und -9 auch daran liegen, dass in der unbehandelten Probe keine Sättigung eintritt und durch Akkumulation von β -Catenin in der behandelten Probe die vorher freien CBs belegt werden. Es lässt sich für BC1 somit keine eindeutige Bestätigung der Ergebnisse der konventionellen IP, welche Subpopulation präferiert wird, verzeichnen. In dem Versuch, dessen Ergebnisse die Abbildung 17 zeigt, wurde noch einmal genauer die Expression in HEK293T-Zellen für die CBs untersucht (A) und ein Expressionsverhältnis durch Normalisierung mit dem Kontrollprotein GAPDH errechnet (B). Dabei zeigte sich, wie schon im vorherigen Experiment (Abbildung 16), dass BC2 und -13 kaum intrazellulär exprimiert werden. Möglicherweise sind die CBs toxisch und werden abgebaut oder sind im intrazellulären Milieu nicht stabil.

Um Zytotoxizität der CBs (BC1, -6 und -9) auszuschließen wurde ein auf Resazurin basierender Vitalitätstest durchgeführt. Der Vitalitätstest mit Resazurin zeigte weder Auffälligkeiten im Proliferationsverhalten, wie gesteigerte Proliferation oder Inhibition des Wachstums, noch konnte eine zytotoxische Wirkung festgestellt werden (Abbildung 18). Alle verwendeten CBs zeigten in diesem Test die Eignung für die intrazelluläre Anwendung. Dennoch konnte nicht ausgeschlossen werden, dass die CBs die Proteinfunktion von β -Catenin im Wnt/ β -Catenin-Signalweg beeinflussen. Dies könnte zu einer Störung der Signalkaskade führen und ungewollte Effekte hervorrufen.

Um Einflüsse auf den kanonischen Wnt-Signalweg auszuschließen, wurde ein TOPflash-Assay nach Korinek et al. [64] durchgeführt (Abbildung 19). Die CBs BC6 und -9 zeigten nach 24 h eine starke inhibitorische Wirkung von bis zu 40% der bei GFP gemessenen Aktivität

(100%) (Abbildung 20). BC1 zeigte nach 24 h keine inhibitorische Wirkung. Eine induzierende Wirkung in NaCl-behandelten Zellen konnte nicht beobachtet werden (nicht gezeigt). Dies macht BC1 zu einem möglichen Kandidaten zur Untersuchung der β -Catenin-Dynamik in lebenden Zellen. Denn um dynamische Prozesse und die Lokalisation von β -Catenin im Verlauf des Wnt-Signalwegs zu beobachten, sollte der CB die Fähigkeit haben seinen Antigen möglichst nicht in Funktion oder Segregation zu beeinträchtigen. Hierfür sind die CBs BC6 und BC9 nicht geeignet, da sie die transkriptionelle Aktivität von β -Catenin reduzieren. Jedoch ist ein Einsatz als Inhibitoren auf Proteinebene denkbar. Eine mögliche Anwendung als Inhibitor des Wnt-Signalwegs in der Grundlagenforschung, als Ersatz von siRNA oder Knockout-Mutanten könnte vielversprechend sein. Die Wirkung der CBs BC6 und -9 basiert vermutlich auf der Maskierung von Bindestellen in der ARM-Domäne, sodass ein aktiver Transkriptionskomplex mit TCF4 und anderen beteiligten Proteinen nicht gebildet werden kann. Andererseits kann auch eine Änderung der Konformation durch die Bindung von BC6 oder -9 zur Störung der β -Catenin-Funktion beisteuern. So konnte in einem Experiment von Kirchhofer et al. eine Strukturänderung von GFP durch Nbs zu unterschiedlichen Effekten, wie geringerer Fluoreszenz, aber auch einer Stärkung des Fluoreszenz-Signals beobachtet werden [170]. Auch andere Arbeitsgruppen berichten von der Möglichkeit mit Nbs die Funktion von Proteinen zu modulieren [171, 172]. Somit kann diese Wirkung nicht ausgeschlossen werden, weil die β -Catenin-Funktion abhängig von der korrekten Faltung der ARM-Domäne ist.

6.3. Simulation von Anwendungen in Zellkultur, Diagnostik und Proteomik

Um die inhibitorische Wirkung genauer zu untersuchen wurden weitere Experimente durchgeführt. Dazu gehört die Kombinationsbehandlung von CBs BC6 mit BC9 (Abbildung 21). Dadurch sollte untersucht werden, ob eine weitere Effektsteigerung durch Kombination möglich ist. Es fand jedoch keine weitere Verstärkung der Inhibition durch eine Kombinationsbehandlung mit den CBs BC6 und -9 statt. Gründe hierfür könnte die Adressierung des gleichen Epitops in der ARM-Domäne sein, sodass es zu einer Kompetition zwischen den beiden CBs kommt oder es kann durch das Verdrängen oder Blockieren von Interaktionsproteinen die inhibitorische Wirkung nicht weiter gesteigert werden. So kann zum Beispiel durch die Maskierung einer für die transkriptionelle Aktivität wichtigen Bindestelle eines Interaktionsproteins, z.B. TCF, der Transkriptionskomplex gestört werden. Die zusätzliche Maskierung eines Epitops durch den zweiten CB würde somit die Disfunktionalität des Transkriptionskomplexes nicht weiter steigern, da er schon disfunktional ist. Die Aufklärung könnte durch Ko-Präzipitationsstudien untersucht werden. Durch das Ko-Transfizieren von HEK293T-Zellen mit beiden CBs (BC6 und -9) und anschließender Behandlung mit CHIR oder LiCl könnte getestet werden, ob die beiden CBs die gleichen

Epitope binden. Dazu müsste ein CB mit einem RFP-tag versehen werden. Anschließend kann mit GFP-Trap oder respektive RFP-Trap (Chromotek) der CB mit entsprechendem spezifischem Affinitätstag (GFP/RFP) präzipitiert werden. Detektiert man dann im Immunblot auf den Fusionstag über den nicht präzipitiert wurde (im Fall von GFP-Trap dann Detektion auf RFP), sollte bei einer Konkurrenz um die gleiche Bindestelle keine Ko-Präzipitation nachweisbar sein (kein RFP-Signal). Des Weiteren konnte keine 100 %ige Inhibition erreicht werden. Dies bedeutet entweder, dass es eine funktionelle Restpopulation des β -Catenin/TCF-Aktivator-Komplexes gibt oder der Transkriptionskomplex behält trotz Bindung der Inhibitoren BC6/-9 eine reduzierte Aktivität. Der Nachweis ob die Restaktivität möglicherweise an einem Pool von aktiven, ungebundenen Transkriptionskomplexen liegt müsste schrittweise geschehen. Zuerst müsste das membrangebundene β -Catenin über ConA-Beads entfernt werden, so dass keine spätere Interaktion mit diesem stattfinden kann. Anschließend würde mittels Präzipitation von BC6 und/oder -9 der β -Catenin-Pool entfernt, der von diesen beiden Nbs gebunden/inhibiert wird. Sollte danach noch β -Catenin im Komplex mit TCF/LEF in der Proteinlösung vorliegen, könnte dies mit einem β -Catenin-spezifischen AK präzipitiert und durch Detektion auf TCF/LEF nachgewiesen werden.

Nachdem keine verstärkte Inhibition durch eine Kombinationsbehandlung nachgewiesen wurde, folgte die Untersuchung ob eine Inhibition auch in einer Darmkrebszelllinie möglich ist. Für dieses Experiment erfolgte die Transfektion der CBs (BC6 und -9) in SW480-Zellen. Wie vormals schon erwähnt, besitzen SW480-Zellen eine Mutante des APC-Gens, so dass APC kein phosphoryliertes β -Catenin binden und anschließend dem Ubiquitinierungskomplex, um β -TRCP, und nachfolgend dem Proteasom zuführen kann. Dadurch akkumulieren in SW480-Zellen verschiedene Spezies von β -Catenin [48, 62]. Die Aktivierung der WRE-Expression durch TCF/-LEF-Transkriptionskomplexe mittels β -Catenin, konnte ebenfalls bewiesen werden [64, 71]. Eine Inhibition sollte also im Topflash sichtbar werden. Die Zelllinie wurde mit je einer Kontrolle (GFP) oder den CBs von BC6 oder -9 transfiziert (Abbildung 21B). Der Vergleich mit GFP (Keine Inhibition/ Negativ Kontrolle) zeigte weder 48 h nach Transfektion noch nach 72 h eine Inhibition der TCF/LEF-gesteuerten Transkription im TopFlash-Experiment. Dies lässt sich auf eine Maskierung der Bindeepitope der beiden CBs zurückführen, wie schon dokumentiert in den konventionellen IPs (Abbildung 15). In SW480-Zellen liegt dieselbe Situation wie in CHIR-behandelten HEK293T-Zellen vor. Wie im IP-Experiment wurde erst nachträglich, hier durch Transfektion mit CBs, der Binder zugeführt. Damit sind aber vermutlich schon alle funktionellen Komplexe mit β -Catenin gebildet und eine nachträgliche Bindung nicht mehr möglich. Nur in, nach dem Anbieten (Transfektion und Expression) der Binder, induzierten HEK293T-Zellen wurde eine Bindung beobachtet (Abbildung 16 B). Interessanterweise hat eine weitere Arbeitsgruppe inhibitorische Nbs isoliert und getestet, jedoch nicht unter Einsatz von Darmkrebslinien in denen β -Catenin schon

stabilisiert vorliegt [164]. Dies könnte sich als Fehler herausstellen, denn eine Verwendung von inhibitorischen Nbs sollte gerade in diesen Zelllinien ebenfalls funktionieren. Wie in diesem Experiment gezeigt, ist der Zeitpunkt an dem die Nbs angeboten werden wichtig, um eine inhibitorische Wirkung zu beobachten. Dabei spielt mit großer Sicherheit die Verfügbarkeit des Epitops eine große Rolle. Generell konnten aber diese und die Arbeit von Newnham et al. zeigen, dass der Einsatz von Nbs als Inhibitoren von β -Catenin aktivierter Transkription möglich ist. Eine weitere Evaluation muss jedoch für BC6 und -9 sowohl in der Kombinationsbehandlung, als auch zur Anwendung in SW480-Zellen noch vorgenommen werden. Denn die dargestellten Ergebnisse zeigen nur ein biologisches Replikat, bestehend aus drei technischen Replikaten. Eine Verifizierung der Ergebnisse ist also notwendig. Des Weiteren könnte der Einsatz von bivalenten Bindemolekülen aus BC6 oder -9 mit BC1 eine Verbesserung der Ergebnisse liefern. BC1 hat schon eine Präferenz für nicht-phosphoryliertes β -Catenin gezeigt [98]. Dadurch ist es vielleicht möglich die Inhibitoren (BC6 oder BC9) spezifisch in räumliche Nähe des nicht-phosphorylierten β -Catenins zu bringen und einer Maskierung des ARM-Domänenepitops durch Interaktionsproteine zuvorzukommen.

Die Nbs könnten so als Alternative für die Anwendung von Knock-out-Mutanten, den genetischen Knock-down mit siRNA oder chemische Inhibitoren dienen. Die Inhibition von Proteinexpression mit Hilfe von Knock-out oder Knock-down wird auf der Ebene der DNA betrieben. Dies führt zur Unterdrückung der gesamten Proteinpopulation. Im Falle von einem β -Catenin-Knock-down/-out sind alle Interaktionskomplexe in denen β -Catenin eine Rolle spielt betroffen. Zum Beispiel die Ausbildung von Adhärenzverbindungen. Denn E-Cadherin wird durch β -Catenin vor dem Abbau geschützt [19]. Damit hat der Knock-down/-out eventuell Auswirkungen auf die Zellvitalität, den Zellzyklus oder andere wichtige Zellfunktionen. Auf Proteinebene könnten Nbs also eine Alternative bieten um spezifisch einzelne Signalwege auszuschalten. Inhibitoren aus organischen oder anorganischen Molekülen haben häufig den Nachteil, dass sie nicht nur speziell ein Protein/Enzym inhibieren, sondern in vielen Fällen eine Kreuzreaktivität mit z.B. verwandten/homologen Proteinen zeigen. Ein gutes Beispiel sind LiCl und CHIR, beide inhibieren GSK3- β , jedoch mit unterschiedlicher Spezifität. CHIR99021 weist auch eine hohe Kreuzreaktivität für GSK3- α und für verschiedene andere Kinasen, unter anderem die cyclinabhängige Kinase (Cdc2), auf [173]. Für LiCl dagegen wurde neben der Inhibition von GSK3- β auch die Inhibition von Casein Kinase 2 (CK2), sowie p38-aktivierte Kinase und einige weitere Kinasen beschrieben [174, 175]. Um allerdings nachzuweisen, dass die Nbs nur spezifisch an β -Catenin binden, müssten noch Proteinbindestudien mit reverser IP durchgeführt werden, sodass bei der Präzipitation von β -Catenin auch die Nbs/CBs mitpräzipitiert werden. Damit sollte dann auch eine unspezifische Bindung an Proteine des β -Catenin-Interaktoms ausgeschlossen werden.

6.3.1. Einsatz der Nbs als diagnostisches Werkzeug

Konventionelle Methoden beinhalten den Nachweis von β -Catenin mittels AK in einem Immunblotverfahren (WB). Um zu zeigen, dass dies auch mit Nbs möglich ist, wurden unterschiedliche Mengen an β -Catenin-His6 auf einen Immunblot elektrotransferiert und mit den Nbs, konjugiert mit Atto488 (Attotec), detektiert (Abbildung 22). Wie zu erwarten, konnten gerade die Nbs β -Catenin detektieren, die terminale Enden erkennen. Dies liegt vermutlich daran, dass diese von vornherein linearisiert, bzw unstrukturiert vorliegen. Dadurch wird gezeigt, dass die Nbs BC1, -2 und 13 vermutlich alle sehr lineare Strukturen oder sehr kondensierte Regionen erkennen. Für BC2 konnte dies während der Epitopkartierung schon belegt werden. BC1 dagegen schien im Epitopkartierungsversuch mehrere Peptide in der NTD zu erkennen. Das Gesamtepitop von BC1 besitzt deshalb möglicherweise eine sehr kompakte Faltung, die durch die Behandlung mit SDS nicht denaturiert wird. Solche Ergebnisse sind für GFP, das eine sehr kondensierte Faltung besitzt, welche selbst durch SDS nicht vollständig denaturiert werden kann, bekannt. So kann selbst nach der Denaturierung mit SDS im Immunblot die Fluoreszenz von GFP nachgewiesen werden. Dies ist ein klarer Beleg dafür, dass manche Sekundärstrukturen nur sehr schwer zu denaturieren sind [176, 177]. Möglicherweise trifft dies auch für das Epitop von BC1 zu. Für BC13 steht der Nachweis noch aus, ob ein lineares Epitop oder womöglich eine dreidimensionale Struktur wie die Helix-C erkannt wird. Eindeutig ist jedoch, sollte eine dreidimensionale Struktur für die Bindung durch den Nb wichtig sein, dass diese sehr stabil gegenüber Detergenzien, wie SDS, sein muss. Möglicherweise erkennen BC6 und -9 dreidimensionale Strukturen in der ARM-Domäne, die denaturiert wurden, da kaum Fluoreszenzsignale gemessen werden konnten. Dieses Ergebnis deckt sich auch mit diesen Vermutungen, denn gerade die ARM-Domäne besitzt eine kondensierte helikale Struktur die für die Funktion von β -Catenin essentiell ist [9, 178, 179]. Somit ist zumindest eine teilweise Denaturierung zu erwarten und die Veränderung der Oberflächenstruktur der Epitope von BC6 und -9 verhindert deren Bindung. Initial zeigt dieses Experiment, dass die Nbs sich selbst für traditionelle Anwendungen wie den Immunblot eignen und eine günstige Alternative für AK bieten könnten. Weiterführend ist es möglich über bivalente Nbs die Avidität und die Dichte der Fluoreszenzmoleküle durch eine vergrößerte Oberfläche zu erhöhen. Dies könnte die Sensitivität verbessern. Allerdings ist es unwahrscheinlich, dass Nbs AK in diesem Bereich verdrängen könnten. Grund hierfür ist die geringe Sensitivität. Aufgrund der wenigen vorhandenen Kopplungsstellen ist auch die Fluoreszenzmoleküldichte von Nbs geringer. AK werden zumeist mit der Sandwich-Methode eingesetzt. Dadurch werden mehr Fluoreszenz Moleküle pro spezifischem AK rekrutiert. Allein die Größe der AK (bis zu 150 kDa) macht mehr gekoppelte Fluoreszenzmoleküle pro AK-Molekül möglich. Bei der Sandwich-Methode, durch den Einsatz von sekundären AKs, sind es im optimalen Fall zwei fluoreszenz-gekoppelte AK je Antigen-bindendem

Detektionsantikörper. Allerdings ist die Selektion, Reifung und Produktion der Nb weniger zeit- und kostenintensiv als die vergleichbarer AK [107, 118].

In der Diagnostik spielen AK in Immunnachweisen von Krankheitsmarkern eine wichtige Rolle. Eine beliebte Methode um mehrere Antigene gleichzeitig zu untersuchen sind hierbei die multiplexen Arrays. Zumeist basieren diese Systeme auf Sandwich-Immunoarrays in denen AK sowohl den Fänger als auch den Detektor spielen [99, 163, 180]. AK haben den Vorteil einer hohen Spezifität und Sensitivität. Der Nachteil der Nbs ist, dass es monovalente Binder sind und sich aufgrund ihrer Größe nur sehr wenige Farbstoffmoleküle konjugieren lassen. Damit ist der Einsatz als Detektor begrenzt. Trotzdem haben Nbs den Vorteil, dass sehr effizient monoklonale AK-Lösungen produziert werden können. Dagegen werden AK über teure Reinigungsschritte gewonnen. Aufgrund dessen sind NBs bei hoher Affinität des Moleküls zum Antigen eine Alternative. Um den diagnostischen Einsatz zu testen wurde mit Hilfe eines mikrosphären-basierten Immunoarrays untersucht ob die Detektion von β -Catenin-His6 mit einem Nb Fänger-/Detektor-Pärchen möglich ist (Abbildung 23). Das effizienteste Pärchen, welches identifiziert werden konnte, bestand aus BC1 als Fängermolekül und BC2 als Detektor. Als Linker des konjugierten Biotins wählte man LC-LC aufgrund der leicht erhöhten Signale im Vergleichstest. Die Detektion oder Präzipitation mit BC6, BC9 und BC13 ergaben keine Signale und wurden deshalb in diesem Versuchsaufbau nicht mehr weiter berücksichtigt. Wie in den vorhergehenden Tests zeigte sich in diesem Testaufbau, dass die ARM-Domänen Nbs für diese Art von Test nicht geeignet sind. Nur bei intrazellulärer Anwendung konnten eine Präzipitation von β -Catenin in detektierbaren Mengen beobachtet werden. Dadurch sind sie als Fänger oder Detektor in diagnostischen Assays jedoch unbrauchbar.

Endogenes β -Catenin konnte mit dem Pärchen auch in verschiedenen Zelllysaten detektiert werden (Abbildung 21). Ziel war es hierbei den Anstieg von β -Catenin-Levels nachweisen zu können, um einen Nachweis von stabilisiertem β -Catenin zu erbringen. Dabei wurden zwei Kolonkarzinomzelllinien (HCT116 und SW480) verwendet, die positive Patientenproben simulieren sollten. Gleichzeitig wurde mit Hilfe von CHIR-stimulierten HEK293T-Zellen die Aktivierung des Wnt-Signalwegs simuliert. Dabei konnte festgestellt werden, dass das im vorherigen Test ausgewählte Nb-Pärchen (BC1/BC2) geeignet ist, in diagnostischen Tests eingesetzt zu werden. In stimulierten HEK293T-Zellen und in den Kolonkarzinomen konnte ein gehobener Level an β -Catenin festgestellt werden. Die Kontrollen mit herkömmlichen AK ergaben gleiche bzw. ähnliche Ergebnisse. Allerdings konnte für die Nbs keine höhere Sensitivität im Vergleich zu herkömmlichen AK-Nachweisen erzielt werden. Grund hierfür ist, wie im Immunblot Experiment beschrieben, die geringe Menge an Fluoreszenzfarbstoff die an Nbs konjugiert werden kann. Allerdings ist es möglich die Signalstärke eventuell durch Verbesserung der Avidität der Nbs oder durch Erhöhung des Lysin-Anteils zu verbessern. Die

Avidität könnte durch den Einsatz von bivalenten Nbs als Fänger-moleküle verbessert werden. Der Lysin-Anteil könnte durch das Klonieren von Lysinketten an die Detektor-Nbs oder durch Austausch von AS im ‚Framework‘ durch Lysine erhöht werden. Dadurch könnte die Kapazität von gekoppeltem Biotin erhöht und die Dichte an Fluoreszenz-molekülen je gebundenem Nb erhöht werden. Eine weitere Möglichkeit wäre der Einsatz einer polyklonalen Detektionslösung. Dazu würde man allerdings weitere Nbs benötigen, die unterschiedliche Epitope von β -Catenin erkennen und dabei nicht kompetitieren. Dies würde die Menge an Detektions-molekülen je Antigen erhöhen und somit das Signal verstärken. Möglicherweise sind Enzymtags, wie Horse-Radish-Peroxidase (HRP), eine Lösung um die Sensitivität von Nbs zu gewährleisten. Trotz der im Vergleich zu AK unzureichenden Signalstärke konnte gezeigt werden, dass Nbs auch in diagnostischen Tests eingesetzt werden können, gerade für Proteine für die keine spezifischen AKs zu finden sind. Hier ermöglichen Nbs möglicherweise den Zugriff auf alternative Epitope, die für AK nicht erreichbar sind. Zudem spricht für die Nbs ein vergleichbar kleinerer Aufwand bei der Selektion und Produktion. Außerdem können Nbs intrazellulär eingesetzt werden und als eine Basis für multiplexe Immunarrays dienen, die außerhalb der medizinischen Diagnostik ein interessanter Ansatzpunkt wären.

Um Interaktionsproteine nachzuweisen wurde von Präzipitaten der Nbs BC1, -2 und -13 ein Immunblot durchgeführt. Anhand spezifischer AK wurden Interaktionsproteine von β -Catenin detektiert. Der Vorteil bei der Präzipitation mit den verwendeten Nbs ist, dass durch ihre Bindung in N- oder C-terminaler Region von β -Catenin die Wahrscheinlichkeit reduziert wird, dass sie die Bindung von Proteinen des β -Catenin-Interaktoms, welches bevorzugt mit der ARM-Domäne Interaktionen eingeht, verhindern. Denn der N- oder C-Terminus sind oft nicht direkt an der Bindung der Interaktionsproteine beteiligt, außer bei selbstregulatorischen Effekten [19, 20, 22].

Mit CHIR99021 wurde in den Zellen das Wnt-,an‘-Stadium simuliert, um auch aktive β -Catenin /TCF-Transkriptionskomplexe zu präzipitieren. Außer TCF1 konnte in allen Präzipitaten aus CHIR unbehandelten Zellen die zu detektierenden Proteine nachgewiesen werden (Abbildung 25). Dies entspricht der Erwartung, dass im ‚aus‘-Stadium des Wnt-Signalwegs kaum oder keine Transkriptionskomplexe gebildet werden, weil β -Catenin über das Proteasom abgebaut wird [19]. Dagegen wird im ‚an‘-Stadium der Zellen β -Catenin stabilisiert und kann nach Translokation in den Zellkern mit Proteinen der TCF/LEF-Familie Bindungen eingehen und einen aktiven Transkriptionskomplex bilden [37]. Interessant ist, dass Axin1, Teil des Destruction-Komplexes, erst im aktiven Wnt-Signalweg stabilisiert und in größerer Menge präzipitiert wird. Ebenfalls GSK3 β , das durch CHIR inaktiviert wird, ist erst im ‚an‘-Zustand in erheblicher Menge präsent. Dies spricht mehr für eine Stabilisierung des Destruction-

Komplexes, als für eine Destabilisierung nach der Aktivierung des Wnt/ β -Catenin-Signalwegs [48]. Die Proteine der Zellkontakte E-Cadherin und des Zytoskeletts α -Catenin dagegen wurden nach Aktivierung mit CHIR nur leicht angereichert. Deshalb könnte dies auch ein Dosis-abhängiger Effekt sein. Denn je mehr β -Catenin vorhanden ist, desto mehr Interaktionskomplexe können präzipitiert werden. Besonders da β -Catenin durch Maskierung der E-Cadherin-PEST-Sequenz E-Cadherin stabilisiert [30], [31]. Ausnahme hierbei ist das Präzipitat von BC1. Hier konnte E-Cadherin nicht angereichert werden. Möglicherweise interferiert die Bindung von BC1, der sehr nahe am C-terminalen Ende des N-Terminus vermutet wird (Abbildung 13), mit der Bindung von E-Cadherin. Dies entspricht den Erfahrungen durch die Immunfärbung mit BC1 in Zellen, die keine Zellwandfärbungen von β -Catenin in den Adhärenzverbindungen zeigten (nicht gezeigt). E-Cadherin wurde als ein Protein beschrieben, das überwiegend die ARM-Domäne als Interaktionsplattform verwendet. Jedoch wurde auch gezeigt, dass Teile des N-Terminus von β -Catenin für die Interaktion benötigt werden um eine starke Bindung einzugehen [32, 181]. BC13 dagegen bindet den C-Terminus, der bei E-Cadherin nicht benötigt wird und BC2 bindet nahe des N-terminalen Endes der NTD. Somit ist hier nicht von einer Blockierung der Bindung auszugehen, wie auch die Ergebnisse zeigen. Mit diesem Experiment konnte nachgewiesen werden, dass mit Nbs sowohl unterschiedliche β -Catenin-Pools adressiert werden (siehe Abbildung 25), und sie eine effiziente Alternative für AK darstellen können. Der generelle Vorteil der Nbs dürfte jedoch im Kostenfaktor und in der Erkennung dreidimensionaler Epitope, wie Kavitäten und ihrer Größe liegen [91, 107, 118]. Dies ermöglicht eine geringe Interferenz mit Interaktionsproteinen und gleichzeitig die Erkennung von neuen Epitopen, die von AK nicht erkannt werden können, da diese nur relativ große Epitope und Oberflächen binden. Dadurch wird möglicherweise die Adressierung neuer Komplexe oder β -Catenin-Spezies ermöglicht.

WBs sind allerdings dadurch limitiert, dass nur eine limitierte Anzahl an AK je Blot verwendet werden kann und dies in relativ hoher Konzentration und Menge. Ausserdem können mit dem WB nur schon bekannte oder allenfalls durch Indikationen vermutete Interaktionsproteine nachgewiesen werden. Ein Nachweis völlig unbekannter Proteine wäre viel zu ineffizient und teuer. Die multiplexen Immunarrays zeigen hier hohes Potential, da mehrere AK-Detektionen in geringen Konzentrationen gleichzeitig durchgeführt werden können [98, 142]. Allerdings werden in herkömmlichen multiplexen Assays AK verwendet, die intrazellulär aufgrund ihrer Komplexität nicht eingesetzt werden können. Nbs hingegen sind hier nicht limitiert und könnten intrazellulär als Fängermolekül eingesetzt werden (siehe Abbildung 16). Der Vorteil ist, dass Immunkomplexe schon vor der Lyse in einem natürlichen Umfeld gebunden werden. Außerdem könnte die geringe Größe der Nbs die Wahrscheinlichkeit einer Kompetition mit Interaktionsproteinen verringern. Somit lägen gebundene Komplexe in einer natürlicheren Komposition vor. Des Weiteren ist auch im Immunarray die Detektion neuer

Interaktionsfaktoren schwierig, wenn diese in sehr geringen Mengen vorhanden sind oder der verwendete AK nicht die benötigte Sensitivität oder Spezifität besitzt.

In diesem Falle bietet sich die Massenspektrometrie an. Durch das Zerlegen der Interaktionsproteine durch Trypsin in Peptide und die anschließende weitere Zerkleinerung in kurze Peptidsequenzen durch die MS/MS-Methode, kann anhand der Masse der Peptide eine Sequenzaufklärung stattfinden. Die gewonnenen AS-Sequenzen der Peptide sind anschließend über einen Datenbank-Abgleich identifizierbar, wenn das Protein in der Datenbank vorhanden ist [182, 183]. Bereits bekannte Proteine, die noch nicht als Interaktionsproteine für β -Catenin beschrieben wurden, können so identifiziert werden. Zumeist werden AK verwendet, jedoch ist auch hier ein Einsatz der Nbs denkbar, um neue Interaktionsproteine zu finden. Es ist nur selten beschrieben, dass konventionelle AK auch Kavitäten binden können. Außerdem macht die Größe der AK es wahrscheinlich, dass eine Maskierung der Epitope für Interaktionsproteine stattfindet. Nbs sind einerseits um ein Zehnfaches kleiner, und durch die konvexe fingerartige Struktur der CDR3 können auch Epitope, wie Kavitäten, gebunden werden, die für AK nicht oder nur schwer zugänglich sind [118]. Deshalb wäre es interessant die Nbs auch für die Massenspektrometrie einzusetzen. Besonders für β -Catenin könnten so möglicherweise neue Interaktionsproteine aufgedeckt werden und zur Entdeckung von neuen ‚Drug-targets‘ für die Medizin führen oder unser Verständnis über die Vernetzung des Wnt/ β -Catenin-Signalwegs verbessern. Ebenfalls wäre in diesem Sinne auch die Adressierung von Interaktionskomplexen intrazellulär interessant, was mit BC1 möglich wäre (Abbildung 16).

7. Fazit und Ausblick

Der Wnt/ β -Catenin-Signalweg spielt in einer Vielzahl von zellulären Prozessen, wie der Homöostase und Zellentwicklung eine wichtige Rolle [19]. Gerade darum ist der Signalweg bei Deregulation auch mit einer hohen Anzahl verschiedener humaner Erkrankungen assoziiert [7, 184]. Es wird jetzt und in Zukunft eine große Herausforderung von Medizin und Forschung bleiben die Vernetzung des Wnt/ β -Catenin-Signalwegs weiter zu entschlüsseln.

In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass durch die Anwendung von Nbs eine Vielzahl von Fragestellungen adressiert werden können. Es wurde gezeigt, dass die Anwendung der Nbs selbst in komplexen Signalwegen, wie dem des Wnt/ β -Catenin-Signalwegs möglich ist. Im Besonderen ein so stark reguliertes Protein wie β -Catenin zu adressieren, welches im adulten Zustand der Zelle nur in geringen Konzentrationen zu finden ist [185].

Die Charakterisierung der Nbs legte offen, dass Nbs vereinzelt lineare Strukturen erkennen können und es möglich ist diese Strukturen, als Affinitätstag im Zusammenhang mit dem entsprechenden Nb, zu verwenden. Dies konnte in der weitergehenden Arbeit von Braun et al mit dem Nb BC2 und dem Peptidtag, gewonnen aus der N-Terminalen Sequenz von β -Catenin, gezeigt werden [169]. Ebenfalls konnte die Adressierung verschiedener Strukturen/Domänen von β -Catenin durch die beschriebenen Nbs (BC1, -2, -6, -9, -13) beobachtet werden. Diese ermöglichte die Diversifizierung der Nbs auf unterschiedliche Aufgaben. So ergaben die Eigenschaften die für BC1 ermittelt wurden, wie intrazelluläre Expression, Zytotoxizität, und Stabilität, sowie β -Catenin-Spezifität mit geringer Interferenz des Wnt/ β -Catenin-Signalwegs und die vorwiegende Adressierung aktiven (nicht-phosphorylierten) β -Catenins, das mit BC1 ein potentieller intrazellulärer Nb gegen β -Catenin gefunden wurde. Als Fusion dieses Nbs mit einem Fluoreszenzprotein wie GFP konnte in der Arbeit von Tränkle et al erstmalig die β -Catenin-Dynamik in Echtzeit beobachtet werden [98]. Dadurch eröffnet sich die Möglichkeit den BC1-Cb durch Fusion mit einem GSK3-sensitiven GFP-Sensorprotein zu sensitivieren. Durch die Modifikation von GFP mit drei aufeinanderfolgenden GSK3-Phosphorylierungsstellen und einem E3-Ligase-Erkennungsmotiv konnte anhand der Fluoreszenz das stimulieren und inhibieren des Wnt/ β -Catenin-Signalwegs beobachtet werden [186, 187]. Durch die Fusion des Nbs mit diesem Sensor-GFP könnte der Cb im gleichen Maße wie β -Catenin Wnt-abhängig abgebaut oder stabilisiert werden. Dies ermöglicht eventuell eine sensitivere und spezifischere Beobachtung der Proteindynamik von β -Catenin durch den BC1-Cb.

Ebenfalls könnte die intrazelluläre Adressierung von Interaktionskomplexen durch den BC1-Cb für die MS interessant sein. Wie bereits mehrmalig beschrieben können Nbs durch die fingerartige Struktur der CDRs besonders Kavitäten in Oberflächen als Epitop verwenden, ganz im Gegensatz zu den meisten AKs [116-118]. Dadurch eröffnet sich die Möglichkeit neue

Interaktionskomplexe/Interaktionsproteine von β -Catenin zu präzipitieren. Diese könnten dann durch MS und darauffolgender Datenbankrecherche identifiziert werden. Dies würde weiter zum Verständnis über die Vernetzung und Funktion von β -Catenin, innerhalb und außerhalb des Wnt/ β -Catenin-Signalwegs und eventuell zur Entdeckung neuer ‚Drug-targets‘ beitragen. Des Weiteren wurde in dieser Arbeit über die inhibitorischen Fähigkeiten der Cbs BC6 und -9 auf den Wnt/ β -Catenin-Signalweg berichtet. Dadurch zeigt sich das Nbs auch ein möglicher Ersatz für Inhibitoren wie siRNA, chemische Inhibitoren oder antagonistische Proteine sein können. Die Weiterentwicklung dieser Fähigkeit ermöglicht es eventuell diese als Medikamente oder günstige Inhibitoren in biochemischen oder zellbiologischen Anwendungen einzusetzen.

Es wurde ebenfalls untersucht ob sich die Nbs in diagnostischen Assays einsetzen lassen. Der Einsatz war prinzipiell möglich und zeigte sich als robust. Allerdings ließ die Sensitivität noch Entwicklungsspielraum nach oben erkennen. Dennoch könnten Nbs, bei Ersatz von AK, die Anwendung von diagnostischen Assays in Medizin und Analytik kosteneffizienter machen. Dies dürfte die Anwendung in Ländern mit geringen ökonomischen Ressourcen erleichtern.

Generell konnte in dieser Arbeit die variablen und flexiblen Einsatzmöglichkeiten von Nbs, die ein komplex reguliertes Protein wie β -Catenin adressieren gezeigt werden. Es ist zu erwarten, dass auch in Zukunft die Anwendung der Nbs weiter diversifiziert und so zu einem noch wichtigeren Werkzeug für die Biochemie, Pharmazie und Medizin werden wird.

8. Danksagungen

Ganz herzlich möchte ich mich bei denen bedanken, die bei der Ausgestaltung dieser Arbeit mitgewirkt haben. Großer Dank gebührt Björn Tränkle für seine harte Arbeit bei der Korrekturhilfe, meinen Vater Rolf Emele für die mühsame Fehlersuche, sowie Prof. Dr. Ulrich Rothbauer, Philipp Koch, Michael Braun und Bart van den Berg für das Überlassen von Bildern und der Erlaubnis diese zu modifizieren. Ganz herzlichen Dank auch meiner ganzen Arbeitsgruppe: Philipp Kaiser, Julia Maier und Björn Tränkle für moralische Unterstützung und großartige 3 Jahre. Ebenso dankbar bin ich Prof. Dr. Ulrich Rothbauer für die Chance an einem spannenden Projekt mit allen Höhen und Tiefen mitarbeiten zu dürfen und für seine Anregungen bei der Bearbeitung dieser Arbeit. Ganz besonders möchte ich mich auch bei Prof. Dr. Peter Grünberger bedanken, welcher innerhalb eines Tages diese Arbeit noch einmal durchgelesen und korrigiert hat.

Ebenfalls will ich meiner Familie aus ganzem Herzen danken, dass sie immer für mich da war und auch in schweren Zeiten den richtigen Umgang mit mir gefunden hat.

Nicht vergessen möchte ich auch die vielen Kollegen die mit Hilfsbereitschaft, Feierabendbier oder Kletterabenden die Zeit am NMI mitgestaltet und wesentlich am Abschluss dieser Arbeit und verschiedener Nebenprojekte beteiligt waren: Cornelia Sommersdorf, Oliver Pötz, Nicola Groll, Bart van den Berg, Vivianna Carcamo, Anna Maier, Benedikt Lang, Kerstin Pohl, Simon Kling, Lena-Marie Grunewald, Simone Beuter und Jennifer Wuchter. Vielen lieben Dank diesen großartigen Personen.

9. Publikationsliste

1. Kaiser PD, Maier J, Traenkle B, Emele F, Rothbauer U. **Recent progress in generating intracellular functional antibody fragments to target and trace cellular components in living cells.** *Biochim Biophys Acta*. 2014 Nov;1844(11):1933-1942. doi: 10.1016/j.bbapap.2014.04.019. Epub 2014 May 2. Review. PubMed PMID: 24792387.
2. Traenkle B, Emele F, Anton R, Poetz O, Haeussler RS, Maier J, Kaiser PD, Scholz AM, Nueske S, Buchfellner A, Romer T, Rothbauer U. **Monitoring interactions and dynamics of endogenous beta-catenin with intracellular nanobodies in living cells.** *Mol Cell Proteomics*. 2015 Mar;14(3):707-23. doi: 10.1074/mcp.M114.044016. Epub 2015 Jan 16. PubMed PMID: 25595278; PubMed Central PMCID: PMC4349989.
3. Groll N, Emele F, Poetz O, Rothbauer U. **Towards multiplexed protein-protein interaction analysis using protein tag-specific nanobodies.** *J Proteomics*. 2015 Sep 8;127(Pt B):289-99. doi: 10.1016/j.jprot.2015.04.017. Epub 2015 May 1. PubMed PMID: 25937269.
4. Braun MB, Traenkle B, Koch PA, Emele F, Weiss F, Poetz O, Stehle T, Rothbauer U. **Peptides in headlock--a novel high-affinity and versatile peptide-binding nanobody for proteomics and microscopy.** *Sci Rep*. 2016 Jan 21; 6:19211. doi: 10.1038/srep19211. PubMed PMID: 26791954; PubMed Central PMCID: PMC4726124.

10. Eidesstattliche Erklärung

Ich erkläre hiermit, dass ich die zur Promotion eingereichte Arbeit mit dem Titel: **„Charakterisierung und Funktionalisierung von β -Catenin-spezifischen Einzeldomänen-Antikörperfragmenten“** selbständig verfasst, nur die angegebenen Quellen und Hilfsmittel verwendet und wörtlich oder inhaltlich übernommene Stellen als solche gekennzeichnet habe. Ich erkläre, dass die Richtlinien zur Sicherung guter wissenschaftlicher Praxis der Universität Tübingen (Beschluss des Senats vom 25.5.2000) beachtet wurden. Ich versichere an Eides statt, dass diese Angaben wahr sind und dass ich nichts verschwiegen habe. Mir ist bekannt, dass die falsche Abgabe einer Versicherung an Eides statt mit Freiheitsstrafe von bis zu drei Jahren oder mit Geldstrafe bestraft wird.

Kirchentellinsfurt den, 24. Juni 2017 _____

Felix Emele

11. Referenzen

1. Ozawa, M., H. Baribault, and R. Kemler, *The cytoplasmic domain of the cell adhesion molecule uvomorulin associates with three independent proteins structurally related in different species*. EMBO J, 1989. **8**(6): p. 1711-7.
2. Wieschaus, E., C. Nusslein-Volhard, and H. Kluding, *Kruppel, a gene whose activity is required early in the zygotic genome for normal embryonic segmentation*. Dev Biol, 1984. **104**(1): p. 172-86.
3. McCrea, P.D., C.W. Turck, and B. Gumbiner, *A homolog of the armadillo protein in Drosophila (plakoglobin) associated with E-cadherin*. Science (New York, N.Y.), 1991. **254**(5036): p. 1359-1361.
4. Peifer, M. and E. Wieschaus, *The segment polarity gene armadillo encodes a functionally modular protein that is the Drosophila homolog of human plakoglobin*. Cell, 1990. **63**(6): p. 1167-1176.
5. Orsulic, S. and M. Peifer, *An in vivo structure-function study of armadillo, the beta-catenin homologue, reveals both separate and overlapping regions of the protein required for cell adhesion and for wingless signaling*. J Cell Biol, 1996. **134**(5): p. 1283-300.
6. Riggelman, B., P. Schedl, and E. Wieschaus, *Spatial expression of the Drosophila segment polarity gene armadillo is posttranscriptionally regulated by wingless*. Cell, 1990. **63**(3): p. 549-560.
7. Clevers, H., *Wnt/beta-catenin signaling in development and disease*. Cell, 2006. **127**(3): p. 469-80.
8. Huber, A.H., W.J. Nelson, and W.I. Weis, *Three-dimensional structure of the armadillo repeat region of beta-catenin*. Cell, 1997. **90**(5): p. 871-82.
9. Fang, D., et al., *Phosphorylation of beta-catenin by AKT promotes beta-catenin transcriptional activity*. J Biol Chem, 2007. **282**(15): p. 11221-9.
10. Poy, F., et al., *Structure of a human Tcf4-beta-catenin complex*. Nat Struct Biol, 2001. **8**(12): p. 1053-7.
11. Ha, N.C., et al., *Mechanism of phosphorylation-dependent binding of APC to beta-catenin and its role in beta-catenin degradation*. Mol Cell, 2004. **15**(4): p. 511-21.
12. Xing, Y., et al., *Crystal structure of a full-length beta-catenin*. Structure, 2008. **16**(3): p. 478-87.
13. Megy, S., et al., *Solution structure of a peptide derived from the oncogenic protein beta-Catenin in its phosphorylated and nonphosphorylated states*. Peptides, 2005. **26**(2): p. 227-41.
14. Megy, S., et al., *STD and TRNOESY NMR studies for the epitope mapping of the phosphorylation motif of the oncogenic protein beta-catenin recognized by a selective monoclonal antibody*. FEBS Lett, 2006. **580**(22): p. 5411-22.
15. Winston, J.T., et al., *The SCFbeta-TRCP-ubiquitin ligase complex associates specifically with phosphorylated destruction motifs in IkappaBalpha and beta-catenin and stimulates IkappaBalpha ubiquitination in vitro*. Genes Dev, 1999. **13**(3): p. 270-83.
16. Liu, C., et al., *beta-Trcp couples beta-catenin phosphorylation-degradation and regulates Xenopus axis formation*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1999. **96**(11): p. 6273-8.
17. Wu, G. and X. He, *Threonine 41 in beta-catenin serves as a key phosphorylation relay residue in beta-catenin degradation*. Biochemistry, 2006. **45**(16): p. 5319-23.
18. Liu, C., et al., *Control of beta-catenin phosphorylation/degradation by a dual-kinase mechanism*. Cell, 2002. **108**(6): p. 837-47.
19. Valenta, T., G. Hausmann, and K. Basler, *The many faces and functions of beta-catenin*. EMBO J, 2012. **31**(12): p. 2714-36.
20. Mo, R., et al., *The terminal region of beta-catenin promotes stability by shielding the Armadillo repeats from the axin-scaffold destruction complex*. J Biol Chem, 2009. **284**(41): p. 28222-31.

21. Solanas, G., et al., *beta-Catenin and plakoglobin N- and C-tails determine ligand specificity*. J Biol Chem, 2004. **279**(48): p. 49849-56.
22. Gottardi, C.J. and B.M. Gumbiner, *Distinct molecular forms of beta-catenin are targeted to adhesive or transcriptional complexes*. J Cell Biol, 2004. **167**(2): p. 339-49.
23. Choi, H.J., A.H. Huber, and W.I. Weis, *Thermodynamics of beta-catenin-ligand interactions: the roles of the N- and C-terminal tails in modulating binding affinity*. J Biol Chem, 2006. **281**(2): p. 1027-38.
24. Piedra, J., et al., *Regulation of beta-catenin structure and activity by tyrosine phosphorylation*. J Biol Chem, 2001. **276**(23): p. 20436-43.
25. van Veelen, W., et al., *-catenin tyrosine 654 phosphorylation increases Wnt signalling and intestinal tumorigenesis*. Gut, 2011. **60**(9): p. 1204-1212.
26. Taurin, S., et al., *Phosphorylation of beta-catenin by cyclic AMP-dependent protein kinase*. J Biol Chem, 2006. **281**(15): p. 9971-6.
27. Mosimann, C., G. Hausmann, and K. Basler, *Beta-catenin hits chromatin: regulation of Wnt target gene activation*. Nat Rev Mol Cell Biol, 2009. **10**(4): p. 276-86.
28. Meng, W. and M. Takeichi, *Adherens junction: molecular architecture and regulation*. Cold Spring Harb Perspect Biol, 2009. **1**(6): p. a002899.
29. Stepniak, E., G.L. Radice, and V. Vasioukhin, *Adhesive and signaling functions of cadherins and catenins in vertebrate development*. Cold Spring Harb Perspect Biol, 2009. **1**(5): p. a002949.
30. Huber, A.H., et al., *The cadherin cytoplasmic domain is unstructured in the absence of beta-catenin. A possible mechanism for regulating cadherin turnover*. J Biol Chem, 2001. **276**(15): p. 12301-9.
31. Hinck, L., et al., *Dynamics of cadherin/catenin complex formation: novel protein interactions and pathways of complex assembly*. J Cell Biol, 1994. **125**(6): p. 1327-40.
32. Huber, A.H. and W.I. Weis, *The structure of the beta-catenin/E-cadherin complex and the molecular basis of diverse ligand recognition by beta-catenin*. Cell, 2001. **105**(3): p. 391-402.
33. Pokutta, S. and W.I. Weis, *Structure of the dimerization and beta-catenin-binding region of alpha-catenin*. Mol Cell, 2000. **5**(3): p. 533-43.
34. Benjamin, J.M., et al., *AlphaE-catenin regulates actin dynamics independently of cadherin-mediated cell-cell adhesion*. J Cell Biol, 2010. **189**(2): p. 339-52.
35. Yamada, S., et al., *Deconstructing the cadherin-catenin-actin complex*. Cell, 2005. **123**(5): p. 889-901.
36. Najdi, R., R.F. Holcombe, and M.L. Waterman, *Wnt signaling and colon carcinogenesis: beyond APC*. J Carcinog, 2011. **10**: p. 5.
37. Archbold, H.C., et al., *How do they do Wnt they do?: regulation of transcription by the Wnt/beta-catenin pathway*. Acta Physiol (Oxf), 2012. **204**(1): p. 74-109.
38. Clevers, H. and R. Nusse, *Wnt/beta-catenin signaling and disease*. Cell, 2012. **149**(6): p. 1192-205.
39. Kimelman, D. and W. Xu, *beta-catenin destruction complex: insights and questions from a structural perspective*. Oncogene, 2006. **25**(57): p. 7482-91.
40. Roberts, D.M., et al., *Deconstructing the sscatenin destruction complex: mechanistic roles for the tumor suppressor APC in regulating Wnt signaling*. Mol Biol Cell, 2011. **22**(11): p. 1845-63.
41. Xing, Y., et al., *Crystal structure of a beta-catenin/axin complex suggests a mechanism for the beta-catenin destruction complex*. Genes Dev, 2003. **17**(22): p. 2753-64.
42. Dajani, R., et al., *Structural basis for recruitment of glycogen synthase kinase 3beta to the axin-APC scaffold complex*. EMBO J, 2003. **22**(3): p. 494-501.
43. Su, Y., et al., *APC is essential for targeting phosphorylated beta-catenin to the SCFbeta-TrCP ubiquitin ligase*. Mol Cell, 2008. **32**(5): p. 652-61.
44. Hart, M., et al., *The F-box protein beta-TrCP associates with phosphorylated beta-catenin and regulates its activity in the cell*. Curr Biol, 1999. **9**(4): p. 207-10.
45. Latres, E., D.S. Chiaur, and M. Pagano, *The human F box protein beta-Trcp associates with the Cul1/Skp1 complex and regulates the stability of beta-catenin*. Oncogene, 1999. **18**(4): p. 849-54.

46. Bilic, J., et al., *Wnt induces LRP6 signalosomes and promotes dishevelled-dependent LRP6 phosphorylation*. *Science*, 2007. **316**(5831): p. 1619-22.
47. Schwarz-Romond, T., C. Metcalfe, and M. Bienz, *Dynamic recruitment of axin by Dishevelled protein assemblies*. *J Cell Sci*, 2007. **120**(Pt 14): p. 2402-12.
48. Li, V.S., et al., *Wnt signaling through inhibition of beta-catenin degradation in an intact Axin1 complex*. *Cell*, 2012. **149**(6): p. 1245-56.
49. Zeng, X., et al., *Initiation of Wnt signaling: control of Wnt coreceptor Lrp6 phosphorylation/activation via frizzled, dishevelled and axin functions*. *Development*, 2008. **135**(2): p. 367-75.
50. Sharma, M., et al., *Specific armadillo repeat sequences facilitate beta-catenin nuclear transport in live cells via direct binding to nucleoporins Nup62, Nup153, and RanBP2/Nup358*. *J Biol Chem*, 2012. **287**(2): p. 819-31.
51. Henderson, B.R. and F. Fagotto, *The ins and outs of APC and beta-catenin nuclear transport*. *EMBO Rep*, 2002. **3**(9): p. 834-9.
52. Stadel, R., R. Hoffmann, and K. Basler, *Transcription under the control of nuclear Arm/beta-catenin*. *Curr Biol*, 2006. **16**(10): p. R378-85.
53. Reya, T. and H. Clevers, *Wnt signalling in stem cells and cancer*. *Nature*, 2005. **434**(7035): p. 843-50.
54. Komiya, Y. and R. Habas, *Wnt signal transduction pathways*. *Organogenesis*, 2008. **4**(2): p. 68-75.
55. Levchenko, A., et al., *Beta-catenin in schizophrenia: Possibly deleterious novel mutation*. *Psychiatry Res*, 2015. **228**(3): p. 843-8.
56. Cancer Genome Atlas, N., *Comprehensive molecular characterization of human colon and rectal cancer*. *Nature*, 2012. **487**(7407): p. 330-7.
57. Duval, A., et al., *Frequent frameshift mutations of the TCF-4 gene in colorectal cancers with microsatellite instability*. *Cancer Res*, 1999. **59**(17): p. 4213-5.
58. Sparks, A.B., et al., *Mutational analysis of the APC/beta-catenin/Tcf pathway in colorectal cancer*. *Cancer Res*, 1998. **58**(6): p. 1130-4.
59. Kitaeva, M.N., et al., *Mutations in beta-catenin are uncommon in colorectal cancer occurring in occasional replication error-positive tumors*. *Cancer Res*, 1997. **57**(20): p. 4478-81.
60. Groden, J., et al., *Identification and characterization of the familial adenomatous polyposis coli gene*. *Cell*, 1991. **66**(3): p. 589-600.
61. Frayling, I.M., et al., *The APC variants I1307K and E1317Q are associated with colorectal tumors, but not always with a family history*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1998. **95**(18): p. 10722-7.
62. Half, E., D. Bercovich, and P. Rozen, *Familial adenomatous polyposis*. *Orphanet J Rare Dis*, 2009. **4**: p. 22.
63. Rubinfeld, B., et al., *Binding of GSK3beta to the APC-beta-catenin complex and regulation of complex assembly*. *Science*, 1996. **272**(5264): p. 1023-6.
64. Korinek, V., *Constitutive Transcriptional Activation by a beta -Catenin-Tcf Complex in APC-/- Colon Carcinoma*. *Science*, 1997. **275**(5307): p. 1784-1787.
65. Mazzone, S.M. and E.R. Fearon, *AXIN1 and AXIN2 variants in gastrointestinal cancers*. *Cancer Lett*, 2014. **355**(1): p. 1-8.
66. Webster, M.T., et al., *Sequence variants of the axin gene in breast, colon, and other cancers: an analysis of mutations that interfere with GSK3 binding*. *Genes Chromosomes Cancer*, 2000. **28**(4): p. 443-53.
67. Liu, W., et al., *Mutations in AXIN2 cause colorectal cancer with defective mismatch repair by activating beta-catenin/TCF signalling*. *Nat Genet*, 2000. **26**(2): p. 146-7.
68. Matsuzaki, K., et al., *The relationship between global methylation level, loss of heterozygosity, and microsatellite instability in sporadic colorectal cancer*. *Clin Cancer Res*, 2005. **11**(24 Pt 1): p. 8564-9.
69. Grant, S.F., et al., *Variant of transcription factor 7-like 2 (TCF7L2) gene confers risk of type 2 diabetes*. *Nat Genet*, 2006. **38**(3): p. 320-3.
70. Bass, A.J., et al., *Genomic sequencing of colorectal adenocarcinomas identifies a recurrent VTI1A-TCF7L2 fusion*. *Nat Genet*, 2011. **43**(10): p. 964-8.

71. Morin, P.J., et al., *Activation of beta-catenin-Tcf signaling in colon cancer by mutations in beta-catenin or APC*. Science, 1997. **275**(5307): p. 1787-90.
72. Rubinfeld, B., et al., *Stabilization of beta-catenin by genetic defects in melanoma cell lines*. Science, 1997. **275**(5307): p. 1790-2.
73. Lammi, L., et al., *Mutations in AXIN2 cause familial tooth agenesis and predispose to colorectal cancer*. Am J Hum Genet, 2004. **74**(5): p. 1043-50.
74. Kalluri, R. and R.A. Weinberg, *The basics of epithelial-mesenchymal transition*. J Clin Invest, 2009. **119**(6): p. 1420-8.
75. Thiery, J.P., et al., *Epithelial-mesenchymal transitions in development and disease*. Cell, 2009. **139**(5): p. 871-90.
76. Zeisberg, M. and E.G. Neilson, *Biomarkers for epithelial-mesenchymal transitions*. J Clin Invest, 2009. **119**(6): p. 1429-37.
77. Heuberger, J. and W. Birchmeier, *Interplay of cadherin-mediated cell adhesion and canonical Wnt signaling*. Cold Spring Harb Perspect Biol. **2**(2): p. a002915.
78. Yang, J., et al., *Twist, a master regulator of morphogenesis, plays an essential role in tumor metastasis*. Cell, 2004. **117**(7): p. 927-39.
79. Conacci-Sorrell, M., et al., *Autoregulation of E-cadherin expression by cadherin-cadherin interactions: the roles of beta-catenin signaling, Slug, and MAPK*. J Cell Biol, 2003. **163**(4): p. 847-57.
80. Barrallo-Gimeno, A. and M.A. Nieto, *The Snail genes as inducers of cell movement and survival: implications in development and cancer*. Development, 2005. **132**(14): p. 3151-61.
81. Sanchez-Tillo, E., et al., *beta-catenin/TCF4 complex induces the epithelial-to-mesenchymal transition (EMT)-activator ZEB1 to regulate tumor invasiveness*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2011. **108**(48): p. 19204-9.
82. Kahn, M., *Can we safely target the WNT pathway?* Nat Rev Drug Discov, 2014. **13**(7): p. 513-32.
83. Aberle, H., et al., *beta-catenin is a target for the ubiquitin-proteasome pathway*. EMBO J, 1997. **16**(13): p. 3797-804.
84. Damalas, A., et al., *Excess beta-catenin promotes accumulation of transcriptionally active p53*. EMBO J, 1999. **18**(11): p. 3054-63.
85. Bahmanyar, S., et al., *beta-Catenin is a Nek2 substrate involved in centrosome separation*. Genes Dev, 2008. **22**(1): p. 91-105.
86. Kuphal, S. and A.K. Bosserhoff, *Phosphorylation of beta-catenin results in lack of beta-catenin signaling in melanoma*. Int J Oncol, 2011. **39**(1): p. 235-43.
87. Faunes, F., et al., *A membrane-associated beta-catenin/Oct4 complex correlates with ground-state pluripotency in mouse embryonic stem cells*. Development, 2013. **140**(6): p. 1171-83.
88. Cattaneo, A. and S. Biocca, *The selection of intracellular antibodies*. Trends Biotechnol, 1999. **17**(3): p. 115-21.
89. Biocca, S., M.S. Neuberger, and A. Cattaneo, *Expression and targeting of intracellular antibodies in mammalian cells*. EMBO J, 1990. **9**(1): p. 101-8.
90. Marasco, W.A., W.A. Haseltine, and S.Y. Chen, *Design, intracellular expression, and activity of a human anti-human immunodeficiency virus type 1 gp120 single-chain antibody*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1993. **90**(16): p. 7889-93.
91. Kaiser, P.D., et al., *Recent progress in generating intracellular functional antibody fragments to target and trace cellular components in living cells*. Biochim Biophys Acta, 2014. **1844**(11): p. 1933-1942.
92. Milch, C., et al., *Vedolizumab, a monoclonal antibody to the gut homing alpha4beta7 integrin, does not affect cerebrospinal fluid T-lymphocyte immunophenotype*. J Neuroimmunol, 2013. **264**(1-2): p. 123-6.
93. Iqbal, S. and H.J. Lenz, *Angiogenesis inhibitors in the treatment of colorectal cancer*. Semin Oncol, 2004. **31**(6 Suppl 17): p. 10-6.
94. Wilson, I.A. and R.L. Stanfield, *Antibody-antigen interactions: new structures and new conformational changes*. Curr Opin Struct Biol, 1994. **4**(6): p. 857-67.

95. Giannini, A.L., M.M. Vivanco, and R.M. Kypta, *Analysis of beta-catenin aggregation and localization using GFP fusion proteins: nuclear import of alpha-catenin by the beta-catenin/Tcf complex*. *Exp Cell Res*, 2000. **255**(2): p. 207-20.
96. Kriehhoff, E., J. Behrens, and B. Mayr, *Nucleo-cytoplasmic distribution of beta-catenin is regulated by retention*. *J Cell Sci*, 2006. **119**(Pt 7): p. 1453-63.
97. Johnson, M., et al., *Regulation of beta-catenin trafficking to the membrane in living cells*. *Cell Signal*, 2009. **21**(2): p. 339-48.
98. Traenkle, B., et al., *Monitoring interactions and dynamics of endogenous beta-catenin with intracellular nanobodies in living cells*. *Mol Cell Proteomics*, 2015.
99. Groll, N., et al., *Towards multiplexed protein-protein interaction analysis using protein tag-specific nanobodies*. *J Proteomics*, 2015. **127**(Pt B): p. 289-99.
100. Michaelson, D. and M. Philips, *The use of GFP to localize Rho GTPases in living cells*. *Methods Enzymol*, 2006. **406**: p. 296-315.
101. Koide, A., et al., *The fibronectin type III domain as a scaffold for novel binding proteins*. *J Mol Biol*, 1998. **284**(4): p. 1141-51.
102. Binz, H.K., P. Amstutz, and A. Pluckthun, *Engineering novel binding proteins from nonimmunoglobulin domains*. *Nat Biotechnol*, 2005. **23**(10): p. 1257-68.
103. Meyer, C., U. Hahn, and A. Rentmeister, *Cell-specific aptamers as emerging therapeutics*. *J Nucleic Acids*, 2011. **2011**: p. 904750.
104. Choi, K.H., et al., *Intracellular expression of the T-cell factor-1 RNA aptamer as an intramer*. *Mol Cancer Ther*, 2006. **5**(9): p. 2428-34.
105. Padlan, E.A., *Anatomy of the antibody molecule*. *Mol Immunol*, 1994. **31**(3): p. 169-217.
106. Kabat, E.A., *Antibody complementarity and antibody structure*. *J Immunol*, 1988. **141**(7 Suppl): p. S25-36.
107. Eyer, L. and K. Hruska, *Single-domain antibody fragments derived from heavy-chain antibodies: a review*. *Vet Med*, 2012.
108. Bird, R.E., et al., *Single-chain antigen-binding proteins*. *Science*, 1988. **242**(4877): p. 423-6.
109. Ohage, E. and B. Steipe, *Intrabody construction and expression. I. The critical role of VL domain stability*. *J Mol Biol*, 1999. **291**(5): p. 1119-28.
110. Visintin, M., et al., *The intracellular antibody capture technology (IACT): towards a consensus sequence for intracellular antibodies*. *J Mol Biol*, 2002. **317**(1): p. 73-83.
111. Tanaka, T. and T.H. Rabbitts, *Protocol for the selection of single-domain antibody fragments by third generation intracellular antibody capture*. *Nat Protoc*, 2010. **5**(1): p. 67-92.
112. Kontermann, R. and S. Dübel, *Antibody Engineering Volume*. *Antibody Engineering Volume*, 2010.
113. Hamers-Casterman, C., et al., *Naturally occurring antibodies devoid of light chains*. *Nature*, 1993. **363**(6428): p. 446-8.
114. Greenberg, A.S., et al., *A new antigen receptor gene family that undergoes rearrangement and extensive somatic diversification in sharks*. *Nature*, 1995.
115. Meyer, D.T., S. Muyldermans, and A. Depicker, *Nanobody-based products as research and diagnostic tools*. *Trends in biotechnology*, 2014.
116. De Genst, E., et al., *Molecular basis for the preferential cleft recognition by dromedary heavy-chain antibodies*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2006. **103**(12): p. 4586-91.
117. Muyldermans, S., et al., *Sequence and structure of VH domain from naturally occurring camel heavy chain immunoglobulins lacking light chains*. *Protein Eng*, 1994. **7**(9): p. 1129-35.
118. Muyldermans, S., *Nanobodies: natural single-domain antibodies*. *Annu Rev Biochem*, 2013. **82**: p. 775-97.
119. Desmyterl, A., T.R. Transuei, and M.A. Ghahroudil, *Crystal structure of a camel single—domain VH antibody fragment in complex*. *Nature structural ...*, 1996.
120. Barthelemy, P.A., et al., *Comprehensive analysis of the factors contributing to the stability and solubility of autonomous human VH domains*. *J Biol Chem*, 2008. **283**(6): p. 3639-54.

121. Dumoulin, M., et al., *Single-domain antibody fragments with high conformational stability*. *Protein Sci*, 2002. **11**(3): p. 500-15.
122. Dolk, E., V.M. Vaart, and D.L. Hulsik, *Isolation of llama antibody fragments for prevention of dandruff by phage display in shampoo*. *Applied and ...*, 2005.
123. Dolk, E., et al., *Induced refolding of a temperature denatured llama heavy-chain antibody fragment by its antigen*. *Proteins: Structure, Function, and Bioinformatics*, 2005. **59**(3).
124. Liu, J.L., et al., *Thermal stability and refolding capability of shark derived single domain antibodies*. *Molecular ...*, 2014.
125. Hussack, G., et al., *Engineered single-domain antibodies with high protease resistance and thermal stability*. *PLoS One*, 2011. **6**(11): p. e28218.
126. Makvandi-Nejad, S. and T. Fjällman, *Selection and expression of recombinant single domain antibodies from a hyper-immunized library against the hapten azoxystrobin*. *Journal of ...*, 2011.
127. Frenzel, A., M. Hust, and T. Schirrmann, *Expression of recombinant antibodies*. *Front Immunol*, 2013. **4**: p. 217.
128. Ezzine, A., et al., *Efficient expression of the anti-Aahl' scorpion toxin nanobody under a new functional form in a Pichia pastoris system*. *Biotechnol Appl Biochem*, 2012. **59**(1): p. 15-21.
129. Gorlani, A., et al., *Llama Antibody Fragments Have Good Potential for Application as HIV Type 1 Topical Microbicides*. *AIDS Research and Human Retroviruses*, 2012. **28**(2).
130. Rothbauer, U., et al., *A versatile nanotrap for biochemical and functional studies with fluorescent fusion proteins*. *Mol Cell Proteomics*, 2008. **7**(2): p. 282-9.
131. Ryckaert, S., et al., *Isolation of antigen-binding camelid heavy chain antibody fragments (nanobodies) from an immune library displayed on the surface of Pichia pastoris*. *Journal of biotechnology*, 2010.
132. Yau, K.Y.F., et al., *Selection of hapten-specific single-domain antibodies from a non-immunized llama ribosome display library*. *Journal of ...*, 2003.
133. Cortez-Retamozo, V., et al., *Efficient tumor targeting by single-domain antibody fragments of camels*. *Int J Cancer*, 2002. **98**(3): p. 456-62.
134. Abulrob, A., et al., *The blood-brain barrier transmigrating single domain antibody: mechanisms of transport and antigenic epitopes in human brain endothelial cells*. *J Neurochem*, 2005. **95**(4): p. 1201-14.
135. Li, T., et al., *Cell-penetrating anti-GFAP VHH and corresponding fluorescent fusion protein VHH-GFP spontaneously cross the blood-brain barrier and specifically recognize astrocytes: application to brain imaging*. *FASEB J*, 2012. **26**(10): p. 3969-79.
136. Conrath, K.E., et al., *Emergence and evolution of functional heavy-chain antibodies in Camelidae*. *Dev Comp Immunol*, 2003. **27**(2): p. 87-103.
137. Lauwereys, M., et al., *Potent enzyme inhibitors derived from dromedary heavy-chain antibodies*. *EMBO J*, 1998. **17**(13): p. 3512-20.
138. Decanniere, K., et al., *A single-domain antibody fragment in complex with RNase A: non-canonical loop structures and nanomolar affinity using two CDR loops*. *Structure*, 1999. **7**(4): p. 361-70.
139. Rothbauer, U., et al., *Targeting and tracing antigens in live cells with fluorescent nanobodies*. *Nat Methods*, 2006. **3**(11): p. 887-9.
140. Jobling, S.A., et al., *Immunomodulation of enzyme function in plants by single-domain antibody fragments*. *Nat Biotechnol*, 2003. **21**(1): p. 77-80.
141. Korinek, V., et al., *Constitutive transcriptional activation by a beta-catenin-Tcf complex in APC-/- colon carcinoma*. *Science*, 1997. **275**(5307): p. 1784-7.
142. Braeuning, A., et al., *Serum components and activated Ha-ras antagonize expression of perivenous marker genes stimulated by beta-catenin signaling in mouse hepatocytes*. *FEBS J*, 2007. **274**(18): p. 4766-77.
143. Poetz, O., et al., *Microsphere-based co-immunoprecipitation in multiplex*. *Anal Biochem*, 2009. **395**(2): p. 244-8.

144. Tikunova, N.V. and V.V. Morozova, *Phage display on the base of filamentous bacteriophages: application for recombinant antibodies selection*. Acta Naturae, 2009. **1**(3): p. 20-8.
145. Tan, C., et al., *Wnt Signalling Pathway Parameters for Mammalian Cells*. PLoS ONE, 2012. **7**(2).
146. Sievers, S., et al., *Absolute beta-catenin concentrations in Wnt pathway-stimulated and non-stimulated cells*. Biomarkers, 2006. **11**(3): p. 270-8.
147. Gottardi, C.J. and M. Peifer, *Terminal regions of beta-catenin come into view*. Structure, 2008. **16**(3): p. 336-8.
148. Castano, J., et al., *Beta-catenin N- and C-terminal tails modulate the coordinated binding of adherens junction proteins to beta-catenin*. J Biol Chem, 2002. **277**(35): p. 31541-50.
149. MacDonald, B.T., K. Tamai, and X. He, *Wnt/beta-catenin signaling: components, mechanisms, and diseases*. Dev Cell, 2009. **17**(1): p. 9-26.
150. Behrens, J., et al., *Functional interaction of beta-catenin with the transcription factor LEF-1*. Nature, 1996. **382**(6592): p. 638-42.
151. van Noort, M., et al., *Wnt signaling controls the phosphorylation status of beta-catenin*. J Biol Chem, 2002. **277**(20): p. 17901-5.
152. Trinidad, J.C., et al., *Global identification and characterization of both O-GlcNAcylation and phosphorylation at the murine synapse*. Mol Cell Proteomics, 2012. **11**(8): p. 215-29.
153. Jamieson, C., M. Sharma, and B.R. Henderson, *Regulation of beta-catenin nuclear dynamics by GSK-3beta involves a LEF-1 positive feedback loop*. Traffic, 2011. **12**(8): p. 983-99.
154. Bennett, C.N., et al., *Regulation of Wnt signaling during adipogenesis*. J Biol Chem, 2002. **277**(34): p. 30998-1004.
155. Liu, C., et al., *Control of β -Catenin Phosphorylation/Degradation by a Dual-Kinase Mechanism*. Cell, 2004. **108**(6).
156. Chowdhury, T.K., *Concanavalin A: an introduction*. Adv Exp Med Biol, 1975. **55**: p. 1-12.
157. Leon, M.A., *Modification of the biological activities of concanavalin A by anti-concanavalin A*. Adv Exp Med Biol, 1975. **55**: p. 261-71.
158. Tomana, M., et al., *Affinity chromatography of glycopeptides using concanavalin A*. Anal Biochem, 1976. **72**: p. 389-99.
159. Ilyas, M., et al., *Beta-catenin mutations in cell lines established from human colorectal cancers*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1997. **94**(19): p. 10330-4.
160. Zolghadr, K., et al., *A fluorescent two-hybrid assay for direct visualization of protein interactions in living cells*. Mol Cell Proteomics, 2008. **7**(11): p. 2279-87.
161. Panza, P., et al., *Live imaging of endogenous protein dynamics in zebrafish using chromobodies*. Development, 2015. **142**(10): p. 1879-84.
162. Manna, L., et al., *Production of Monoclonal Antibodies in Serum-free Media*. Monoclon Antib Immunodiagn Immunother, 2015. **34**(4): p. 278-88.
163. Luckert, K., et al., *Snapshots of protein dynamics and post-translational modifications in one experiment--beta-catenin and its functions*. Mol Cell Proteomics, 2011. **10**(5): p. M110 007377.
164. Newnham, L.E., et al., *Functional inhibition of beta-catenin-mediated Wnt signaling by intracellular VHH antibodies*. MAbs, 2015. **7**(1): p. 180-91.
165. Paalanen, M., et al., *The development of activating and inhibiting camelid VHH domains against human protein kinase C epsilon*. European Journal of Pharmaceutical Sciences, 2011. **42**(4): p. 332-339.
166. van Noort, M., M. van de Wetering, and H. Clevers, *Identification of two novel regulated serines in the N terminus of beta-catenin*. Exp Cell Res, 2002. **276**(2): p. 264-72.
167. Sayat, R., et al., *O-GlcNAc-glycosylation of beta-catenin regulates its nuclear localization and transcriptional activity*. Exp Cell Res, 2008. **314**(15): p. 2774-87.

168. Yang, J., et al., *Adenomatous polyposis coli (APC) differentially regulates beta-catenin phosphorylation and ubiquitination in colon cancer cells*. J Biol Chem, 2006. **281**(26): p. 17751-7.
169. Braun, M.B., et al., *Peptides in headlock - a novel high-affinity and versatile peptide-binding nanobody for proteomics and microscopy*. Scientific reports, 2016. **6**: p. 19211.
170. Kirchhofer, A., et al., *Modulation of protein properties in living cells using nanobodies*. Nat Struct Mol Biol, 2010. **17**(1): p. 133-8.
171. Jahnichen, S., et al., *CXCR4 nanobodies (VHH-based single variable domains) potently inhibit chemotaxis and HIV-1 replication and mobilize stem cells*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2010. **107**(47): p. 20565-70.
172. Summanen, M.M.I., *VHH Activators and Inhibitors for Protein Kinase C Epsilon*. VHH Activators and Inhibitors for Protein Kinase C Epsilon, 2012.
173. Ring, D.B., et al., *Selective glycogen synthase kinase 3 inhibitors potentiate insulin activation of glucose transport and utilization in vitro and in vivo*. Diabetes, 2003. **52**(3): p. 588-95.
174. Davies, S.P., et al., *Specificity and mechanism of action of some commonly used protein kinase inhibitors*. The Biochemical journal, 2000. **351**(Pt 1): p. 95-105.
175. Coghlan, M.P., et al., *Selective small molecule inhibitors of glycogen synthase kinase-3 modulate glycogen metabolism and gene transcription*. Chem Biol, 2000. **7**(10): p. 793-803.
176. Ward, W.W. and S.H. Bokman, *Reversible denaturation of Aequorea green-fluorescent protein: physical separation and characterization of the renatured protein*. Biochemistry, 1982. **21**(19): p. 4535-4540.
177. Cody, C.W., et al., *Chemical structure of the hexapeptide chromophore of the Aequorea green-fluorescent protein*. Biochemistry, 1993. **32**(5): p. 1212-1218.
178. Graham, T.A., et al., *Crystal structure of a beta-catenin/Tcf complex*. Cell, 2000. **103**(6): p. 885-96.
179. Eklof Spink, K., S.G. Fridman, and W.I. Weis, *Molecular mechanisms of beta-catenin recognition by adenomatous polyposis coli revealed by the structure of an APC-beta-catenin complex*. EMBO J, 2001. **20**(22): p. 6203-12.
180. Luckert, K., et al., *A dual array-based approach to assess the abundance and posttranslational modification state of signaling proteins*. Sci Signal, 2012. **5**(206): p. p11.
181. Xu, W. and D. Kimelman, *Mechanistic insights from structural studies of beta-catenin and its binding partners*. J Cell Sci, 2007. **120**(Pt 19): p. 3337-44.
182. Wu, S.L., et al., *Targeted proteomics of low-level proteins in human plasma by LC/MSn: using human growth hormone as a model system*. J Proteome Res, 2002. **1**(5): p. 459-65.
183. Ackermann, B.L. and M.J. Berna, *Coupling immunoaffinity techniques with MS for quantitative analysis of low-abundance protein biomarkers*. Expert Rev Proteomics, 2007. **4**(2): p. 175-86.
184. Coombs, G.S., T.M. Covey, and D.M. Virshup, *Wnt signaling in development, disease and translational medicine*. Curr Drug Targets, 2008. **9**(7): p. 513-31.
185. Tan, C.W., et al., *Wnt signalling pathway parameters for mammalian cells*. PLoS One, 2012. **7**(2): p. e31882.
186. Taelman, V.F., et al., *Wnt signaling requires sequestration of glycogen synthase kinase 3 inside multivesicular endosomes*. Cell, 2010. **143**(7): p. 1136-48.
187. Acebron, S.P., et al., *Mitotic wnt signaling promotes protein stabilization and regulates cell size*. Mol Cell, 2014. **54**(4): p. 663-74.