

Die Ubiquitinierung humaner Nitrilase 1

Dissertation zur Erlangung des akademischen Grades
doctor medicinae dentariae (Dr. med. dent)

vorgelegt dem Rat der medizinischen Fakultät
der Friedrich-Schiller-Universität Jena

von Zahnärztin Bettina Baumann
geboren am 17.01.1990 in Würzburg

Gutachter

- 1. Prof. Dr. Otmar Huber, Institut für Biochemie II, Jena**
- 2. Prof. Dr. Dr. Bernd W. Sigusch, Poliklinik für konservierende Zahnheilkunde und Parodontologie, Jena**
- 3. Prof. Dr. Oliver Krämer, Institut für Toxikologie, Mainz**

Tag der öffentlichen Verteidigung: 06.09.2016

**„Nur wenige wissen, wie viel man wissen
muss, um zu wissen, wie wenig man weiß.“**

(Werner Heisenberg)

Inhaltsverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis.....	6
Zusammenfassung	9
Einleitung.....	1
1.1 Humane Nitrilase 1.....	1
1.2 Der kanonische Wnt-Signalweg	3
1.3 Ubiquitinierung – eine posttranslationale Modifikation	5
2. Ziele der Arbeit.....	8
3. Material und Methoden	9
3.1 Chemikalien	9
3.2 Materialien für Zellkultur	10
3.3 Zelllinien.....	10
3.4 Verbrauchsmaterialien.....	10
3.5 Geräte	11
3.6 Molekulargewichtsstandards für Proteine und DNA.....	12
3.7 Antikörper	12
3.7.1 Primär-Antikörper	12
3.7.2 Sekundär-Antikörper	13
3.8 Enzyme.....	13
3.9 Kits.....	13
3.10 Vektoren	14
3.11 Bakterienstämme	14
3.12 Oligonukleotide.....	15
4. Methoden	16
4.1 Zellbiologische Methoden.....	16
4.1.1 Zellkultur.....	16
4.1.2 Calciumphosphat-Transfektion.....	16
4.1.3 Erzeugung von konditioniertem Wnt 3a-Medium.....	17
4.2 Molekularbiologische Methoden	17
4.2.1 Agarose-Gelelektrophorese	17
4.2.2 DNA-Spaltung durch Restriktionsendonukleasen.....	17
4.2.3 SAP (shrimp alkaline phosphatase) – Behandlung.....	17

4.2.4	Ligation von DNA-Fragmenten.....	18
4.2.5	Amplifikation von Plasmid-DNA in E.coli.....	18
4.2.6	Isolation von Plasmid-DNA aus E.coli.....	19
4.2.7	Gerichtete PCR.....	20
4.2.8	Ortsspezifische Mutagenese.....	20
4.2.9	DNA-Sequenzierung.....	21
4.2.10	Konzentrationsbestimmung der DNA.....	21
4.3	Proteinbiochemische Methoden.....	22
4.3.1	SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-Page).....	22
4.3.2	Western Blot.....	23
4.3.3	Co-Immunopräzipitation (Co-IP).....	25
4.3.4	Dual-Luciferase Reporterassays.....	26
5.	Ergebnisse.....	29
5.1	Nachweis einer Ubiquitinierung von Nit1.....	29
5.2.	Analyse von humaner Nitrilase1 in UbPred und PhosphoSitePlus®.....	29
5.3	Mutagenese.....	31
5.4	Nachweis von Nitrilase1-Ubiquitin-Konjugaten.....	32
5.5	Vergleich der Lokalisation von Nit1-Ubi und Nit1-K125R.....	34
5.6	Bedeutung der Nit1-Ubiquitinierung.....	36
5.6.1	Beeinflussung der Nit1-Ubiquitinierung durch Wnt-Aktivierung.....	36
5.6.2	Der Einfluss von oxidativem Stress.....	38
5.7	Subzelluläre Lokalisation von Nit1-Ubi Konjugaten.....	40
5.7.1	Einfluss von Wasserstoffperoxid auf die Nit1-Lokalisation.....	40
5.7.2	Lokalisation von Nit1-Ubi unter Einfluss von Wasserstoffperoxid.....	41
5.8	Proteasomaler Abbau.....	42
5.8.1	Untersuchung des Einflusses von MG132.....	42
5.8.2	Untersuchung des Einflusses von MG132 auf Nit1-Ubi Konjugate.....	44
5.9	Nachweis der spezifischen Ubiquitin- E3- Ligase für humane Nit1.....	45
5.9.1	Interaktion von Nit1 und der Ubiquitin-E3-Ligase Itch.....	45
5.9.2	Itch verstärkt die Ubiquitinierung von Nit1.....	46
5.10	Lokalisierung von Nit1-Ubiquitin unter Einfluss von Importazol.....	47
6.	Diskussion.....	48
6.1	Beeinflussung des Wnt-Signalweges durch Ubiquitinierung von Nit1.....	48

6.2 Translokation oder proteasomaler Abbau von Nit1-Ubiquitin durch oxidativen Stress	49
6.3 Ist Itch – die E3-Ligase von humaner Nit 1?	51
7. Schlussfolgerung	52
8. Literaturverzeichnis	A
9. Anhang	F
9.1 Tabellenverzeichnis	F
9.2 Abbildungsverzeichnis	G
9.3 Ehrenwörtliche Erklärung	I
9.4 Tabellarischer Lebenslauf	J
Persönliche Daten	J
Schulbildung	J
Hochschulbildung	J
9.5 Danksagung	K

Abkürzungsverzeichnis

Abb.	Abbildung
AK	Antikörper
Amp	Ampicillin
APS	Ammoniumpersulfat
Aqua dest.	Destilliertes Wasser
ATP	Adenosintriphosphat
BSA	<i>Bovine serum albumin</i>
bzw.	beziehungsweise
CaCl ₂	Calciumchlorid
DMSO	Dimethylsulfoxid
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle Medium
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTPs	Desoxyribonucleosidtriphosphat
DTT	Dithiothreitol
E.coli	Escherichia coli
EDTA	Ethylendiaminotetraessigsäure
EGTA	Ethylenglycoltetraessigsäure
Fw	<i>Forward primer</i>
GAPDH	Glycerinaldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase
HECT	<i>homologous to E6AP Carboxy-Terminus</i>
HEPES	2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperaziny)-ethansulfonsäure
IB	Immunoblot
Ig	Immunglobulin
IP	Immunpräzipitation
IPBA	4-Iodophenylboronsäure

IPZ	Importazol
K ₃ PO ₄	Kaliumphosphat
KCl	Kaliumchlorid
MgCl ₂	Magnesiumchlorid
HCl	Chlorwasserstoff
NaCl	Natriumchlorid
NaF	Natriumfluorid
NaOH	Natriumhydroxid
NaN ₃	Natriumazid
Na ₂ HPO ₄	Dinatriumhydrogenphosphat
Na ₃ VO ₄	Natriumorthovanadat
Nit1	Nitrilase 1
NP40	4-Nonylphenyl-polyethylen-glycol
PBS	<i>phosphate buffered saline</i>
PCR	<i>Polymerase chain reaction</i>
PNK	Polynukleotidkinase
PVDF	Polyvinylidenfluorid
RING	<i>Really Interesting New Gene 1</i>
Rev	<i>Reverse-primer</i>
RT	Raumtemperatur
SAP	<i>shrimp alkaline phosphatase</i>
SDS	<i>Sodiumdodecylsulfate</i>
SDS-Page	Sodium-Dodecylsulfat- Polyacrylamid-Gelelektrophorese
Tab.	Tabelle
TEMED	Tetramethylethylendiamin
TST	Tris-gepufferte Salzlösung-Tween
Tween 20	Polyoxyethylensorbitanmonolaurat

Ubi	Ubiquitin
ÜKS	Überkopfschüttler
Upm	Umdrehung pro Minute
UV	Ultraviolett
(v/v)	Volumenanteil am Gesamtvolumen
(w/v)	Gewichtsanteil am Gesamtvolumen
WB	Western Blot

Einheiten

sek	Sekunde
min	Minute
h	Stunde
ng	Nanogramm
µg	Mikrogramm
mg	Milligramm
mM	millimolar (Millimol pro Liter)
ml	Milliliter
µl	Mikroliter
Da	Dalton
kDa	Kilo-Dalton
bp	Basenpaare
A	Ampere
V	Volt
%	Prozent

Zusammenfassung

Die Entdeckung der humanen Nitrilasen folgte aus der Charakterisierung des Tumorsuppressorproteins Fhit und des NitFhit-Fusionsproteins aus Invertebraten (Pekarsky et al., 1998). Bisher gibt es nur wenige Publikationen zur Rolle und Funktion humaner Nitrilasen. In der eigenen Arbeitsgruppe konnte gezeigt werden, dass Nitrilase 1 (Nit1) mit β -Catenin interagiert und als Repressor der β -Catenin-vermittelten Transkription im kanonischen Wnt-Signalweges fungiert (Mittag et al., 2016). Der Wnt-Signalweg spielt eine wichtige Rolle in Entwicklungsprozessen und ist in einer Vielzahl von Krebserkrankungen fehlreguliert. Wie Nit1 in den Kern transloziert, ist bisher noch nicht geklärt worden. Durch posttranslationale Modifikationen (PTMs) werden Proteine nach ihrer Synthese in Struktur, Funktion und auch Lokalisation beeinflusst. Bei der Ubiquitinierung wird das in eukaryontischen Zellen ubiquitär vorkommende Polypeptid Ubiquitin kovalent an das Zielprotein gebunden. Diese Verknüpfung erfolgt durch eine von 3 Enzymgruppen katalysierte sequentielle Abfolge von Reaktionen (Hershko und Ciechanover, 1998; Pickart 2001). Je nachdem, wie viele und in welcher Art die Ubiquitin-Moleküle am Zielprotein gebunden sind, können die Halbwertszeit, Aktivität/Funktion oder Lokalisation des Proteins durch die Ubiquitinierung beeinflusst werden. Man unterscheidet Mono-, Multi (multiple Monoubiquitinierung)- und Poly-Ubiquitinierungen (u.a. Haglund und Dikic, 2005).

Daher sollte in dieser Arbeit untersucht werden, ob Nit1 durch Ubiquitinierung modifiziert wird und welchen Einfluss diese Modifikation auf die Lokalisation und Funktion von Nit1 hat. Ausgehend von einem positiven Befund sollten potentielle Ubiquitinierungsstellen in Nit1 identifiziert und anschließend durch ortsspezifische Mutagenese verändert werden. Für diese Untersuchungen wurden als Methoden Co-Immunpräzipitationsexperimente, Kern-/Cytoplasma-Fraktionierungen, Western Blots und Reporterassays durchgeführt. Die Ergebnisse dieser Arbeit zeigen, dass humane Nit1 ubiquitiniert wird und dass das Lysin an Position 125 eine Ubiquitinierungsstelle darstellt. Als mögliche physiologische Auswirkungen dieser posttranslationalen Modifikation im Falle von Nit1 konnten eine Beeinflussung auf die Repressorfunktion im Wnt-Signalweg und eine verstärkte Kerntranslokation beobachtet werden. Weiterhin wurde die E3-Ligase Itch als eine potentielle Ubiquitin-Ligase von humaner Nit1 identifiziert. Insgesamt stellt diese Arbeit einen weiteren Schritt zum besseren Verständnis der an der Regulation von humaner Nit1 beteiligten Mechanismen dar.

Einleitung

1.1 Humane Nitrilase 1

Aus der Charakterisierung des Tumorsuppressorproteins Fhit und des NitFhit-Fusionsproteins aus Invertebraten folgte die Entdeckung der humanen Nitrilasen, die anhand von Sequenzanalysen in Nit1 und Nit2 unterteilt wurden. Das 3,2 kb umfassende humane Nit1-Gen wurde erstmals von Y. Pekarsky kloniert und charakterisiert. Es existieren fünf Splicevarianten, wobei das 1,4 kb große Nit1 Haupttranskript für ein 327 Aminosäuren umfassendes Protein codiert, welches eine mitochondriale targeting Sequenz besitzt (Pekarsky et al., 1998). Humane Nit1 besitzt 90% Aminosäuresequenz-Identität zum Maus Nit1-Protein, 50% zur Nitrilase-Domäne des *C. elegans* Fusionsproteins und 48% zur Nitrilase-Domäne des Drosophila NitFhit Fusionproteins (BLAST p 2.2.25 (Altschul et al., 1997)).

```

hu_Fhit      1  ~~~~~
mu_Fhit      1  ~~~~~
hu_Nit1     1  MLGFITRPPHRLSLLCPGLRIPQLSVLCAQPRPRMISSESCLEPLAVCOMTSTPDRQONEKTCABELVREARLGCACAFLEBAFDF
mu_Nit1     1  MLGFITRPPHQ..LLCTGYRLLRTPVLCTQPRPRMS.SSTSWELPLAVCOMTSTPDRQONEKTCABELVREARLGCACAFLEBAFDF
dr_Nitfhit  1  ~~~~~
ce_Nitfhit  1  ~~~~~-MLSTVTRRERMATGRHFVAVCOMTSDNDLEKKNQAARKNTERAQRKKECVFLPECCDF

hu_Fhit      1  ~~~~~
mu_Fhit      1  ~~~~~
hu_Nit1     91  IARRPAAEHLLESEPFGCKLWEEEMTCHARECGWLSLGGFHERGQDWEQTONIYNCHVLLNSKGAIVVAIVYRRTHECDVETIPGQGMRESNS
87  IARRPAAEHLLESEPFGCKLWEEEMTCHARECGWLSLGGFHERGQDWEQTONIYNCHVLLNSKGAIVVAIVYRRTHECDVETIPGQGMRESNY
38  YGESRTCHLELSEGDGRLMAQVRELAACKNKIWLSTGGVHER..NDQKI...NAHVLLNEKGEIAAVYRRLHMPDVITK.EVRRRESDT
ce_Nitfhit  59  IGLNKNPGLDAMATDCVMEKVRLEAKKNIWLSTGGLHHE..DPSDAANPNTHPTTSDGVTFRABYNKRLHEPDEETIPKVRRESEF

hu_Fhit      1  ~~~~~
mu_Fhit      1  ~~~~~
hu_Nit1     181  KMPGPELSEPVSTPAGKGLAVCYDWRFPFLSHTAAQAAGALTYPYSAFGSITCPAHWEVLLRARAIENOCYVVAQAOCGRHEKRSYSG
177  KMPGPELSEPVSTPAGKGLAVCYDWRFPFLSHTAAQAAGALTYPYSAFGSVTCPAHWEVLLRARAIENOCYVVAQAOCGRHEKRSYSG
dr_Nitfhit  122  VTPGCTLEPPEVSTPAGKGLAVCYDWRFPFLSHTAAQAAGALTYPYSAFGSITCPAHWEVLLRARAIENOCYVVAQAOCGRHEKRSYSG
ce_Nitfhit  147  KKAETEMTPEVDTEIGRGLSICCYDWRFPFLSHTAAQAAGALTYPYSAFGSITCPAHWEVLLRARAIENOCYVVAQAOCGRHEKRSYSG

hu_Fhit      1  ~~~~~
mu_Fhit      1  ~~~~~
hu_Nit1     271  HSMVVDPWGTVVARCSEGP.GHCLARIDNYRQLRRHIVVQHRRPDIYGNLGHPTIS~~~~-MSFRDQGHITKPSVVLKPELSPALVN
267  HSMVVDPWGTVVARCSEGP.GHCLARIDNYRQLRRHIVVQHRRPDIYGNLGHPTIS~~~~-MSFRDQGHITKPSVVLKPELSPALVN
dr_Nitfhit  212  HSMVVDPWGTVVARCSEGLDNGTAEVDLSVLOSITQTEPCVHRRNDIYALTYNIRSKPEPTQDRPFAATNVDKRTTEYSEHCFATFN
ce_Nitfhit  237  HSMVVDPWGTVVARCSEGLDNGTAEVDLSVLOSITQTEPCVHRRNDIYALTYNIRSKPEPTQDRPFAATNVDKRTTEYSEHCFATFN

hu_Fhit      28  RKEVVPCHVLYCCLLPVVEFHDLRPDEVDLLQTTQNVCTVYFKHGHGTSITPFRKODGPEAGQTVKHHVHVHVLPRKAGDFPNDNLYDDE
mu_Fhit      28  RKEVVPCHVLYCCLLPVVEFHDLRPDEVDLLQTTQNVCTVYFKHGHGTSITPFRKODGPEAGQTVKHHVHVHVLPRKAGDFPNDNLYDDE
hu_Nit1     328  ~~~~~
mu_Nit1     324  ~~~~~
dr_Nitfhit  302  LKGVYKGHVLYSTRVTPRLCGDCAEMADMPFTVCLVQRTEPKIKYTTSAVVEVDGAQAGQVVPVHVFHMPERRLGDFGENDQIVYK
ce_Nitfhit  324  LKGVYKGHVLYSTRVTPRLCGDCAEMADMPFTVCLVQRTEPKIKYTTSAVVEVDGAQAGQVVPVHVFHMPERRLGDFGENDQIVYK

hu_Fhit      118  QKHDK..DFPAWRSEEMRAEAAARVYFQ-
mu_Fhit      118  QKHDREEDSDFWRSEEMRAEAAARVYFQA
hu_Nit1     328  ~~~~~
mu_Nit1     324  ~~~~~
dr_Nitfhit  392  ..DNMAEKKPPEIIEERIQAQIYRKFLLDIS-
ce_Nitfhit  413  ASHDKEPERRRNEQMAEAVVYRNFM-----

```

Abb.1: Aminosäure-Sequenzvergleich von Nit und Fhit Proteinen

Dargestellt ist ein Aminosäure-Sequenzvergleich von humanen, murinen, *Drosophila* und *C. elegans* Nit und Fhit Proteinen (Pekarsky et al., 1998). Identische Aminosäuren sind schwarz unterlegt, ähnliche Aminosäuren grau markiert. Die in dieser Arbeit untersuchten potentiellen Ubiquitinierungsstellen sind rot markiert. Die in grün hervorgehobene Stelle markiert den Startpunkt ohne mitochondriale targeting-Sequenz.

Nit1 und Nit2 wurden zusammen mit dem NitFhit Fusionsprotein dem zehnten Zweig der hochkonservierten Nitrilase-Superfamilie zugewiesen. Von den insgesamt 13 Zweigen der Nitrilase-Superfamilie besitzt nur ein Zweig Nitril-Hydrolase Aktivität, acht Zweige eine Amid-Hydrolase- oder Amid-Kondensations-Aktivität (Pace und Brenner, 2001). In Ihrer Gesamtheit sind Nitrilasen an unterschiedlichsten Biosynthesen und posttranslationalen Modifikationen zahlreicher Organismen beteiligt. Für humane Nit1 wurde bisher nur ein synthetisches Substrat beschrieben (Barglow und Cravatt, 2006). Nit2 konnte hingegen als Omega-Amidase identifiziert werden (Jaisson et al., 2009; Krasnikov et al., 2009a; Krasnikov et al., 2009b). Humane Nitrilase2 ist in seiner Aminosäuresequenz zu 37% identisch zu humaner Nitrilase1 (Altschul et al., 1997).

Die ersten biologischen Effekte von Nit1 in der Maus wurden von Semba et al. im Jahre 2006 beschrieben (Semba et al., 2006). Dabei zeigte sich, dass die Nit1-Expression in den meisten Geweben mit der Fhit-Expression korreliert. Der Knockout von Nit1 in Mäusen zeigte zum Fhit-Knockout ähnliche Effekte. Bei den Nit1-Knockout Mäusen wurde keine

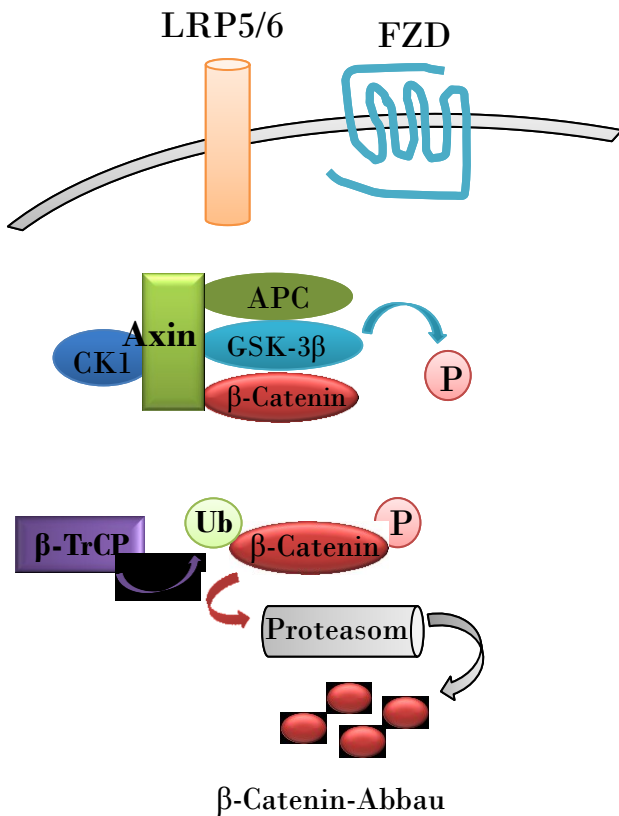
Beeinträchtigung der Entwicklung beobachtet. Allerdings erhöhte sich im Vergleich zur Wildtyp-Maus die Tumorraten nach Gabe einer karzinogenen Substanz. In Nit1-negativen, murinen Nierenzellen war das Zellwachstum beschleunigt und die Cyclin D1-Expression erhöht. Zudem konnte eine Induktion von Caspase-3-abhängiger Apoptose nach Überexpression von Nitrilase1 *in vitro* nachgewiesen werden. Somit weist auch Nit1 eine tumorsupprimierende Wirkung auf. Nit1 ist hauptsächlich im Cytoplasma, teilweise im Kern und in den Mitochondrien lokalisiert. Bisher gibt es nur wenige Publikationen zu humaner Nit1. In der eigenen Arbeitsgruppe konnte gezeigt werden, dass Nit1 mit β -Catenin interagiert und als Repressor des kanonischen Wnt-Signalweges fungiert (Mittag et al., 2016).

1.2 Der kanonische Wnt-Signalweg

Der Wnt-Signalweg spielt eine wichtige Rolle in Entwicklungsprozessen und ist in einer Vielzahl von Krebserkrankungen fehlreguliert.

Der Begriff „Wnt“ bildet die Kombination zweier Gen-Bezeichnungen (Wingless und Int). Das Wingless-Gen wurde im Zuge der Untersuchung einer Drosophila-Mutante identifiziert. Die Mutation des Gens führte zu einem starken Eingriff in die Entwicklung der Flügel (Sharma und Chopra, 1976). Die Entdeckung des Int-1-Gen (Integrator-1) folgte im Jahre 1982. Es wurde im Zusammenhang mit der Induktion von Milchdrüsen-Tumoren in Mäusen beschrieben (Nusse und Varmus, 1982).

A) Inhibierung des Wnt-Signalweges



B) Kanonischer Wnt-Signalweg

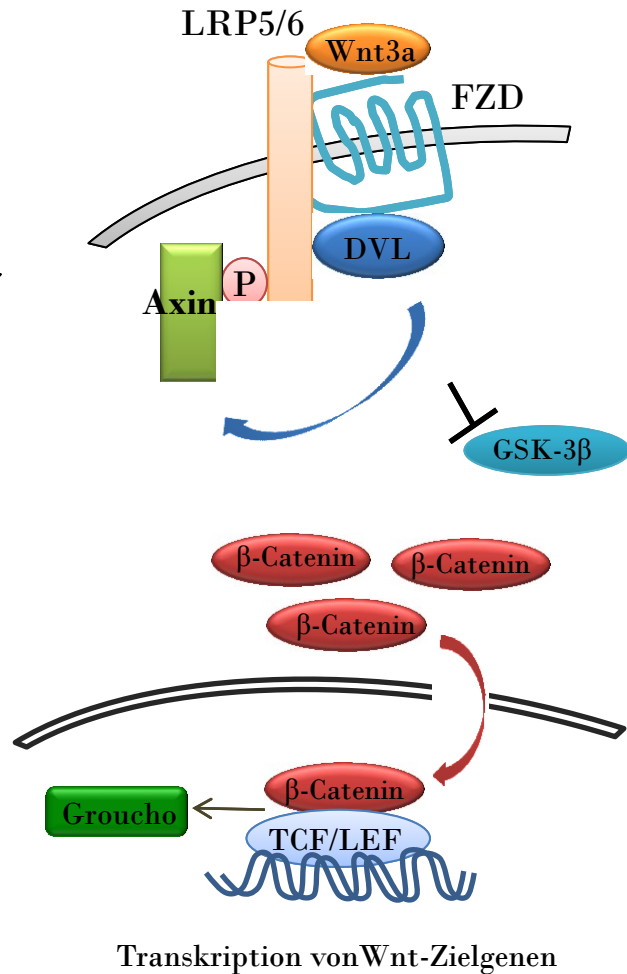


Abb. 2: Der kanonische Wnt-Signalweg

A: In Abwesenheit von Wnt befindet sich nur eine geringe Menge an β -Catenin in der Zelle. Dieses liegt in einem Komplex mit Axin, APC (Adenomatous Polyposis Coli), GSK3 β (Glykogen Synthase Kinase 3 β) und CK1 (Casein Kinase 1) gebunden vor. Daraus resultiert die Phosphorylierung von β -Catenin, das mit Hilfe der E3-Ligase β -TrCP (β -Transducing repeat containing protein) polyubiquitiniert und somit proteasomal abgebaut wird. **B:** Bindet Wnt an den aus LRP5/6 (Low-density lipoprotein receptor-related protein) und FZD (Frizzled) bestehenden Rezeptorkomplex erfolgt die Aktivierung des Signalweges. Axin wandert durch Interaktion mit DVL (Dishevelled) zum LRP5/6-Rezeptor. Die durch Axin induzierte Phosphorylierung von β -Catenin entfällt, was in dessen Anreicherung im Cytoplasma resultiert. Es kommt zur Translokation von β -Catenin in den Zellkern. Dort interagiert es nach Verdrängung des Co-Repressors Groucho mit TCF (T-Cell Factor)/LEF (Lymphoid enhancer-binding factor) Transkriptionsfaktoren und führt zur Transkription von Wnt-Zielgenen.

Das Schema in Abb. 2 zeigt vereinfacht den Ablauf und die Komponenten des Wnt-Signalweges.

Findet keine Bindung von Wnt-Liganden am Rezeptor statt, kommt es zum proteasomalen Abbau von β -Catenin (Aberle et al., 1997). Dieser wird durch eine Komplexbildung des

Tumorsuppressors APC mit Axin, GSK3 β und CK1 mit anschließender sequenzieller Phosphorylierung von β -Catenin durch CK1 und GSK3 β und der Ubiquitinierung von β -Catenin durch die E3-Ligase β -TrPC vermittelt (Kimelman und Xu, 2006).

Nach Bindung eines Wnt-Liganden an den LRP5/6-Frizzled (FZD)-Co-Rezeptorkomplex induziert FZD die Rekrutierung von Dishevelled (DVL). Außerdem erfolgt die Phosphorylierung von LRP5/6 durch CK1 γ und GSK3 β , was insgesamt zur Anlagerung von Axin an LRP5/6 führt (Bilic et al., 2007; Davidson et al., 2005). In dieser Form gebunden entfällt die Bildung eines Destruktionskomplexes, der normalerweise zum Abbau von β -Catenin führt. Dieses akkumuliert im Cytoplasma und transloziert anschließend in den Nucleus, wo es durch Verdrängung von Co-Repressoren wie Groucho und Bindung an TCF/LEF die Transkription von Wnt-Zielgenen wie Axin2 (Jho et al., 2002) und Cyclin D1 (Tetsu und McCormick, 1999) einleitet.

1.3 Ubiquitinierung – eine posttranslationale Modifikation

Durch posttranslationale Modifikationen (PTMs) werden Proteine nach ihrer Synthese in ihrer Struktur und Funktion beeinflusst. Zum einen gibt es die proteolytische Modifizierung, bei der ein Teil des Proteins abgespalten wird und dies zur Regulation der Enzymaktivität führt. Ein bekanntes Beispiel dafür stellen die Enzyme der Blutgerinnungskaskade dar. Zum anderen können Proteine durch nicht enzymatisch (z.B. Glykierungen) oder enzymatisch ablaufende Reaktionen chemisch modifiziert werden. Zu den letzteren gehören unter anderem das Anknüpfen von Zuckern (Glykosylierungen), Phosphatgruppen (Phosphorylierung), Hydroxylgruppen (Hydroxylierungen), Methyl- und Acetylgruppen (Methylierungen und Acetylierungen), Ubiquitin (Ubiquitinierung) und SUMO (SUMOylierungen). An ein und demselben Protein können verschiedene PTMs erfolgen, die sich ergänzen oder in Konkurrenz zueinander stehen. Im Folgenden soll die Ubiquitinierung näher erläutert werden.

Bei der Ubiquitinierung wird das in eukaryontischen Zellen ubiquitär vorkommende, 76 Aminosäuren lange Polypeptid Ubiquitin über sein C-terminales Glycin (G76) kovalent an das Zielprotein gebunden. Die Ubiquitinierung findet am Protein meistens an einem Lysin, seltener auch an Serin oder Threonin-Resten oder am N-Terminus des Proteins statt. Die kovalente Verknüpfung des Ubiquitins an das Zielprotein erfolgt durch eine von 3 Enzymgruppen katalysierte sequentielle Abfolge von Reaktionen (Hershko und Ciechanover, 1998; Pickart 2001). Zunächst wird Ubiquitin in einer ATP-abhängigen Reaktion über eine Thioesterbindung zwischen einem Cystein des E1-Enzyms (ubiquitin

activating enzym) und der C-terminalen Carboxylgruppe des Ubiquitins gebunden und aktiviert. Anschließend wird Ubiquitin auf ein E2-Enzym (ubiquitin carrier protein) übertragen. Ein E3-Enzym (ubiquitin protein ligase) verknüpft abschließend Ubiquitin kovalent mit dem Zielprotein über eine Isopeptidbindung zwischen der C-terminalen Carboxylgruppe des Glycins von Ubiquitin und der ϵ -Aminogruppe des Lysins im Zielprotein.

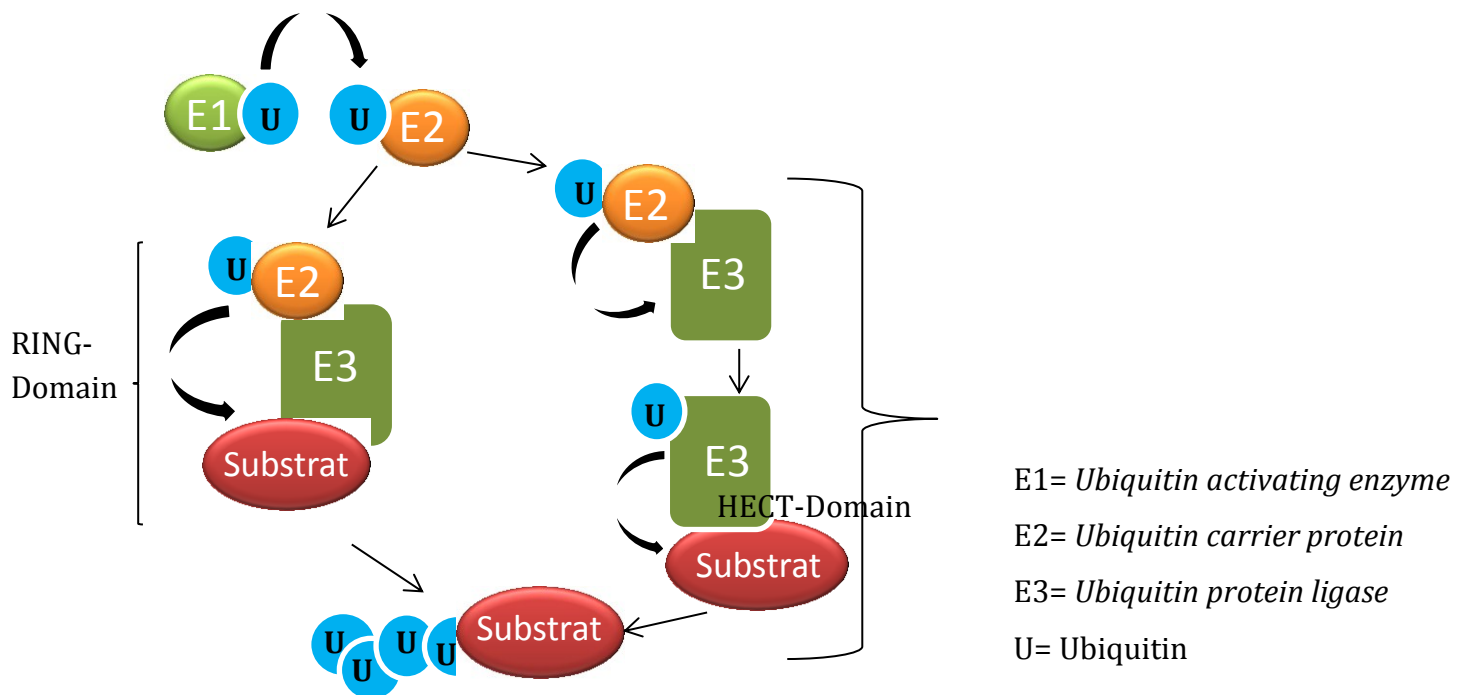


Abb.3: Schema des Reaktionsweges der Ubiquitinierung

Während nur 2 E1-Enzyme - UBE1 und UBE1L2 – (McGrath, 1991; Pelzer et al., 2007) für Ubiquitin bekannt sind, kann das Ubiquitin danach auf mehrere verschiedene E2-Enzyme übertragen werden. Das E2-Enzym kann jeweils spezifisch mit einem oder mehreren E3-Enzymen interagieren. Die größte Diversität gibt es jedoch bei den E3-Enzymen, deren Bindung zum Zielprotein sich durch eine hohe Spezifität auszeichnet, aber zusätzlich auch über Ligase-assoziierte Faktoren reguliert werden kann. Die E3-Enzyme werden in 3 Unterfamilien eingeteilt: HECT-, RING- und U-Box Proteine (Lorick, 1999; Joazeiro, 2000; Hatakeyama, 2001). Während die HECT-Ubiquitin-Ligasen ein katalytisch aktives Cystein zur Bildung eines Thioesters mit Ubiquitin besitzen, zeichnen sich die RING-Ubiquitin-Ligasen sowohl durch acht konservierte Cystein- und Histidinreste in der RING-Finger Domäne, als auch durch die Möglichkeit zwei Zink-Ionen zu komplexieren aus. Die RING-E3-Ligasen vermitteln dabei die Übertragung des vom E2-

Enzym gebundenen Ubiquitin auf das Zielprotein ohne eine direkte Verknüpfung mit dem Ubiquitin einzugehen.

Je nachdem wie viele und in welcher Art die Ubiquitin-Moleküle am Zielprotein gebunden sind können die Halbwertszeit, Aktivität/Funktion oder Lokalisation des Proteins durch die Ubiquitinierung beeinflusst werden.

Man unterscheidet Mono-, Multi (multiple Monoubiquitinierung)- und Poly-Ubiquitinierungen (u.a. Haglund und Dikic, 2005)

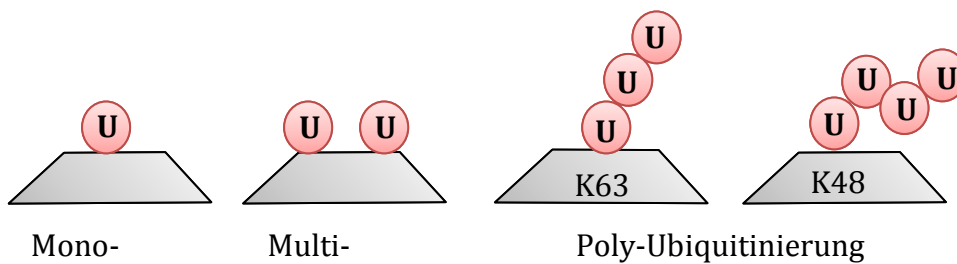


Abb. 4: *Verschiedene Arten der Ubiquitinierung,*

U: Ubiquitin, K63/K48: Ubiquitin-Ketten, verknüpft über Lysin 63/48

Dabei haben verschiedene Ubiquitinierungsarten eine unterschiedliche physiologische Relevanz. So führt die Mono-Ubiquitinierung des Zielproteins oft zur Veränderung seiner subzellulären Lokalisation, Konformation, Aktivität oder Interaktion mit anderen Proteinen. Sowohl die Mono- als auch Multi-Ubiquitinierung von Rezeptoren ist wichtig für deren Endocytose. Bei der Poly-Ubiquitinierung unterscheidet man zusätzlich über welches Lysin im Ubiquitin sich Ubiquitinketten ausbilden. Während die Markierung eines Proteins mit K48 verknüpften Ubiquitinketten meist zum proteasomalen Abbau des Proteins führt, resultiert die Modifikation mit K63 verknüpften Ubiquitinketten in einer veränderten Lokalisation, Funktion oder Interaktion und spielt oft eine wichtige Rolle bei DNA-Reparatur und Endozytose-Vorgängen sowie der Aktivierung von Protein-Kinasen (Haglund und Dikic, 2005). Allerdings können innerhalb eines Proteins auch an mehreren Lysinen verschiedene Arten der posttranslationalen Modifikationen stattfinden, was wiederum unterschiedliche Effekte beispielsweise auf die Bindung an Interaktionspartner und Proteinlokalisierung zur Folge hat. Ein Tumorsuppressorprotein, das vielfältig modifiziert wird, ist p53 (Gu und Zhu, 2012). Hinsichtlich der Ubiquitinierung wird p53 hauptsächlich von der Ubiquitin E3-Ligase MDM2 modifiziert. Hohe zelluläre Konzentrationen von MDM2 und Ubiquitin führen zur Poly-Ubiquitinierung von p53 und dessen proteasomalem Abbau, wohingegen geringe Konzentrationen von MDM2 und Ubiquitin zur Mono-Ubiquitinierung von p53 und in

dessen nukleärem Export resultieren (Shmueli und Oren, 2004). Bisher sind für p53 zwanzig Ubiquitin E3-Ligasen identifiziert worden (Hock und Vousden, 2014).

2. Ziele der Arbeit

Im Vergleich zu Fhit und anderen Tumorsuppressorproteinen wurden humane Nitrilasen bisher noch wenig erforscht. So sind bislang auch keinerlei posttranslationale Modifikationen für humane Nitrilasen beschrieben. Um eine Ubiquitinierung nachzuweisen sollte zunächst nach Überexpression von Nit1 und Ubiquitin in HEK-293-Zellen mittels Co-Immunopräzipitation die kovalente Verknüpfung beider nachgewiesen werden.

Durch Mutation von zwei durch Vorhersageprogramme definierten Lysinen in der cytosolischen Variante von Nit1-K72 und -K125 zu Arginin sollte überprüft werden, ob es sich um spezifische, tatsächlich genutzte Ubiquitinierungsstellen handelt. Im Falle einer Bestätigung der Ubiquitinierungsstelle sollte die Frage nach der physiologischen Relevanz dieser Modifikation bearbeitet werden.

Hierbei stehen der proteasomale Abbau, eine veränderte Lokalisation von Nit1 innerhalb der Zelle und eine potentielle veränderte Beeinflussung des Wnt-Signalweges im Vordergrund. Darüber hinaus sollte untersucht werden, ob die Ubiquitin E3-Ligase Itch mit Nit1 interagiert und im Falle einer Ubiquitinierung als E3-Ligase von Nit1 in Frage kommt. Ein proteasomaler Abbau sollte über Verwendung des Proteasomeninhibitor MG132 analysiert werden. Die vermeintliche Auswirkung auf die Lokalisation von Nit1 sollte mit Hilfe einer Kern-/Cyto-Fraktionierung (siehe 4.3.5) von transient transfizierten HEK-293-Zellen ermittelt werden. Potentielle Veränderungen der Repressorfunktion von Nit1 auf den Wnt-Signalweg sollten mittels Co-Immunopräzipitation (siehe 4.3.3) und Reporterassay (siehe 4.3.4) detektiert werden.

3. Material und Methoden

3.1 Chemikalien

- Agarose (Sigma)
- APS (Serva)
- β -Mercaptoethanol (Roth)
- Bromphenolblau (Roth)
- CaCl_2 (Roth)
- DMSO (Roth)
- EDTA (Roth)
- EGTA (Serva)
- Ethanol (Echter Nordhäuser Spirituosen)
- Hefeextrakt (Roth)
- HEPES (Serva)
- Imidazol (Roth)
- Importazol (Sigma)
- IPBA (Sigma)
- Kaliumphosphat (Sigma)
- KCl (Roth)
- Glycin (Roth)
- Glycerin (Roth)
- HCl (Roth)
- Luminol (Roth)
- Methanol (Merck)
- NaCl (Roth)
- NaF (VEB)
- Na_2HPO_4 (Merck/Roth)
- NaOH (Roth)
- Na_3VO_4 (Sigma)
- Protein A Sepharose (GE Healthcare)
- Pyronin G (Sigma)
- Rotiphorese® (30% (w/v) Acrylamid, 0,8% (w/v) Bisacrylamid) (Roth)
- Saccharose (Roth)

- SDS (Roth)
- TEMED (Roth)
- Tris (Roth)
- Triton X-100 (Merck)
- Tween 20% (Roth)
- Wasserstoffperoxid 30% (Merck)

3.2 Materialien für Zellkultur

- Dulbecco's Modified Eagle Medium (Sigma)
- Penicillin/Steptomycin (Sigma)
- Sera plus (PAN Biotech)
- Dulbecco's PBS mit Calcium und Magnesium (Sigma)
- Trypsin/EDTA (Sigma)

3.3 Zelllinien

- HEK-293: humane, embryonale Nierenzelllinie
- LM(TK) - Wnt3a
- LM(TK) + Wnt3a
- HeLa-Zellen

3.4 Verbrauchsmaterialien

- Filterpapier WHATMAN R 3 MM (Whatman)
- PVDF -Transfermembran Roti® (Roth)
- Multiwell-Zellkulturplatten, 6-well (Greiner Bio-one)
- Multiwell-Zellkulturplatten, 24-well (Greiner Bio-one)
- 10 cm Zellkulturschalen (Greiner Bio-one)
- Serologische Pipetten 5 ml/10 ml (Greiner Bio-one)
- Nitrilhandschuhe weiß (Braun)
- PCR-Reaktionsgefäße (Biozym)
- PCR-Strips 0,2 ml 8er Reihe (Biozym)
- PS Steril Tube 4,5 ml (Greiner Bio-one)

- PP Tube steril 14 ml (Greiner Bio-one)
- Falcons 15 ml/50 ml (Greiner Bio-one)
- Pipettenspitzen (Greiner Bio-one)
- Reaktionsgefäße 0,5 ml/1,5 ml/2 ml (Eppendorf)
- Mikroröhre 1,5 ml mit Verschluss (Sarstedt)
- Zellschaber (Sarstedt)

3.5 Geräte

- Absaugvorrichtung (Medela)
- Analog Heizblock (VWR, Darmstadt, DE)
- Autoklav (Thermo Scientific/Syntec)
- Casy® (Innovatis)
- CO₂-Inkubator (Binder)
- Eismaschine (Scotsman)
- Elektrophorese- Apparaturen (Bio-Rad)
- Gasbrenner (Schütt Phoenix)
- Gefrierschrank Forma 900 Series (Thermo Scientific)
- Gefrierschränke premium no frost (Liebherr)
- Gelapparatur für Agarosegele (Eigenanfertigung)
- Glo-Max® Luminometer (Promega)
- Inkubator Incu-Line (VWR)
- Kühlschränke Profiline (Liebherr)
- Lichtmikroskop AE21 Series (Motic)
- Magnetrührgerät MR Hei-Mix S (Heidolph)
- Mikroliterspritzen (Hamilton)
- Mikrowelle MW81W (Samsung)
- NanoDrop® 2000 Spectrophotometer (PEQ Lab)
- Netzgerät Biometra Standard Power Pack P25 (Biometra)
- Pipetten Discovery autoclavable (Abimed HT)
- Pipettus (Hirschmann Laborgeräte)
- pH-Meter 761 Calimatic (Knick)
- Reinstwasseranlage Milli Q (Millipore)
- Rotary Mischer digital (A.Hartenstein)

- Schüttler Polymax 2040 (Heidolph)
- Semi-Dry Transfer Cell Trans Blot SD (Bio-Rad)
- Sterile Werkbank Hera Safe HS 12 (Heraeus)
- Schüttler GFL 3016 (Gesellschaft für Labortechnik mbH)
- Syngene G-Box (VWR)
- Thermal cycler 2720 (Applied Biosystems)
- Thermomixer Comfort (Eppendorf)
- Vortex Schüttler (VWR)
- Waage TE612 (Sartorius)
- Waage LC621-OCE (Sartorius)
- Mikro 220 R (Hettich Zentrifugen)
- Rotenta/AP (Hettich Zentrifugen)
- Rotina 420 R (Hettich Zentrifugen)
- Sprout Tischzentrifuge (BioEnzym)
- Rotina 380 (Hettich Zentrifugen)
- Mini ProteanR Tetra System (BioRad Laboratories GmbH)
- Standard Power Pack P25 (Biometra)
- Trans Blot R SD Semi-Dry Transfer Cell (BioRad Laboratories GmbH)
- UV-Transluminator blue light (Biostep)
- UP 100 H Ultrasonic Processor (Hielscher Ultrasound Technology)

3.6 Molekulargewichtsstandards für Proteine und DNA

- Gene Ruler 1 kB DNA Ladder (Fermentas)
- Page Ruler™ Prestained Protein Ladder (Thermo)

3.7 Antikörper

3.7.1 Primär-Antikörper

Name	Herkunft	Hersteller	Lagerung	Verdünnung/Konzentration
Anti-GAPDH	mouse	Millipore	4°C	WB: 1:1000
Anti - FLAG M2	mouse	Sigma	4°C	WB: 1:10000 IP: 0,5µg
Anti-Lamin A/C	mouse	BD Biosciences	-20°C	WB: 1:1000

Anti-HA	rat	Roche	-20°C	WB: 1:1000
Anti-β-Catenin	mouse	BD Biosciences	-20°C	WB: 1:1000
Anti-Nit1 (Fr.2+6)	rabbit	Eigene Herstellung	4°C	WB: 1:500 IP: 3μg

Tab.1: Verwendete Primär-Antikörper

3.7.2 Sekundär-Antikörper

Name	Herkunft	Hersteller	Lagerung	Verdünnung
anti-mouse	goat	Sigma	4°C	1:10000
anti-rabbit	goat	Sigma	4°C	1:10000
anti-rat	goat	Sigma	4°C	1:5000
anti-mouse light chain	goat	Dianova	4°C	1:10000

Tab.2: Verwendete Sekundär-Antikörper

3.8 Enzyme

- Restriktionsenzyme Fast Digest (Fermentas)
- *Shrimp alkaline phosphatase* [SAP] (Roche)
- Taq DNA-Polymerase (New England Biolabs)
- Quick-Ligase (New England Biolabs)
- RNase A (Macherey-Nagel)
- Polynukleotidkinase (Life Technologies)

3.9 Kits

- Zymoclean Gel DNA Recovery Kit (Zymo Research)
- Plasmid DNA purification (Macherey-Nagel)
- Pwo-Master (Roche)

3.10 Vektoren

Name	Beschreibung
pCS2+	eukaryotische Expressionsvektoren (wurden freundlicherweise von Dr. R. Rupp, Max-Planck Institut für Entwicklungsbiologie, Tübingen, zur Verfügung gestellt)
pFLAG-CMV4	eukaryotischer Expressionsvektor (Sigma, Taufkirchen)
P3xFLAG-CMV10	eukaryontischer Expressionsvektor, codiert für ein N-terminales 3x'FLAG-Tag
pcDNA3-HA	eukaryontischer Expressionsvektor, codiert für ein N-terminales HA-tag
pHRL-Null	Codiert für konstitutiv exprimierte Renilla-Luziferase
pGL3-basic OT	Topflash

Tab.3: Verwendete Vektoren

3.11 Bakterienstämme

Bakterienstamm	Genotyp
<i>Escherichia coli</i> XL1-Blue (<i>E.coli</i>)	supE44, hsdR17, recA1, end A1, gyrA96, thi, relA1, lacF,,[proAB+, lacq, lacZ supE44, hsdR17, recA1, end A1, gyrA96, thi, relA1, lacF,,[proAB+, lacq, lacZ, M15, Tn10(tetr)]M15, Tn10(tetr)]

Tab.4: Verwendete Bakterienstämme

3.12 Oligonukleotide

Name	Bezeichnung	Orientierung	Sequenz
ON1145	hNit1 K108R mutagenesis Ubi	fw	TCT GAA CCA CTG GGT GGG AGA CTT TTG GAA GAA TAC ACC
ON1146	hNit1 K161R mutagenesis Ubi	fw	GTA GTG GCC ACT TAC AGG AGG ACA CAT CTG TGT GAC GTA G
ON1166	hNit1 Y143A mutagenesis phosphorylation	fw	GAG CAG ACT CAG AAA ATC GCC AAT TGT CAC GTG CTG CTG
ON1167	hNit1 Y143F mutagenesis phosphorylation	fw	GAG CAG ACT CAG AAA ATC TTC AAT TGT CAC GTG CTG CTG
SP6		rev	5'-ATT TAG GTG ACA CTA TAG-3'
FLAG-fw		fw	5'-ACG GTG GGA GGT CTA TAT AAG- 3'

Tab.5: Verwendete Oligonukleotide

4. Methoden

4.1 Zellbiologische Methoden

4.1.1 Zellkultur

Jegliche Arbeitsschritte wurden zur Vermeidung von Kontaminationen unter sterilen Bedingungen durchgeführt.

Die Kultivierung der Zellen erfolgte in DMEM mit 10 % (v/v) hitzeinaktiviertem FCS und 100 U/ml Penicillin/ 100 µg/ml Streptomycin in 10 cm Zellkulturschalen bei 37 °C, 5 % CO₂ und 95 % Luftfeuchtigkeit im Brutschrank.

4.1.1.1 Passagieren und Aussäen der Zellen

Die konfluent gewachsenen Zellen einer 10 cm-Schale wurden nach Abnahme des Mediums mit PBS+/+ gewaschen und anschließend mit 1 ml Trypsin/EDTA bei 37 °C inkubiert.

Nach Ablösung der Zellen wurden diese in 9 ml DMEM aufgenommen und in einem Falcon bei 800 Upm für 4 min zentrifugiert. Es folgte die Resuspendierung in 10 ml frischem DMEM und die Passagierung im Verhältnis 1:10.

Für das Aussäen der Zellen im Falle einer Co-IP bzw. Kern-/Cyto-Fraktionierung wurden 8x10⁵ HEK-293-Zellen pro Ansatz in einer 6-well-Platte verwendet, bei einer Reporteranalyse 2x10⁵ in einer 24-well-Platte.

Die Bestimmung der Zellzahl erfolgte mit Casy® Cell Counter and Analyser System der Firma Innovatis.

4.1.2 Calciumphosphat-Transfektion

2 x HBS	CaCl ₂ -Lösung
55 mM HEPES/NaOH pH 7,03	2,5 M CaCl ₂
274 mM NaCl	
1,5 mM Na ₂ HPO ₄	

Tab.6: Zusammensetzung der Komponenten für Calciumphosphat-Transfektion

Nach der Zugabe der zu transfizierenden DNA zu einer 250 mM CaCl₂-Lösung erfolgte die tropfenweise Vermischung dieses Ansatzes mit derselben Menge 2xHBS auf dem Vortex-Schüttler in einem Polystyrene-Röhrchen.

Anschließend wurde eine Inkubationszeit von 10 min eingehalten, bevor 200 µl Transfektionsansatz pro Well tropfenweise auf die Zellen gegeben wurde.

Es folgte eine Inkubation im Brutschrank bei 37 °C für 48 h.

4.1.3 Erzeugung von konditioniertem Wnt 3a-Medium

Es wurden 1×10^6 LM(TK-) Zellen-Wnt3a sowie $0,25 \times 10^6$ LM(TK-) Zellen +Wnt3a in 15 ml Medium jeweils in 10 cm Zellschalen ausgesät. Nach 5 Tagen wurde das Medium in ein Falcon überführt und 5 min bei 2500 Upm zentrifugiert. Anschließend folgten die vorsichtige Abnahme des Überstandes und die sterile Filtration.

Mit Hilfe eines Reporterassays (siehe 4.3.4) ließ sich eine Kontrolle des Stimulationsfaktors vornehmen.

4.2 Molekularbiologische Methoden

4.2.1 Agarose-Gelelektrophorese

DNA- Loadingpuffer (6x)	1x TAE
40 % (v/v) Glycerin	40 mM Tris/HCl
10 mM EDTA pH 7,5	2 mM EDTA
50 mM Tris/HCl pH 7,5	auf pH 8,0 einstellen
Orange G (Spatelspitze)	

Tab.7: Zusammensetzung von DNA-Loadingpuffer (6x) und 1xTAE

Zur Herstellung eines 0,8 %igen Agarose-Gels wurde die entsprechende Menge Agarose in 1xTAE-Puffer durch Erhitzung gelöst. Die Zugabe des Fluoreszenzfarbstoffes RedSafe® nach Herstellerangaben ermöglichte die Sichtbarkeit der DNA unter UV-Licht. Die Proben wurden mit 6x DNA-Loadingpuffer vermischt, in die Geltaschen pipettiert und bei 90 V für ca. 20 min aufgetrennt.

4.2.2 DNA-Spaltung durch Restriktionsendonukleasen

Der Restriktionsverdau von Plasmiden wurde unter Verwendung der FastDigest® Enzyme der Firma Fermentas laut Herstellerangaben durchgeführt. Die Inkubation von je 1 µg Plasmid erfolgte bei 37 °C für 5 min.

4.2.3 SAP (shrimp alkaline phosphatase) – Behandlung

Dieser Prozess dient der Dephosphorylierung der freien Vektorenden und soll somit eine Religierung verhindern.

Nach dem Restriktionsverdau wurde das entsprechende Restriktionsenzym durch eine 10-minütige Hitzebehandlung bei 65 °C inaktiviert. Im Anschluss fand die einstündige SAP-

Behandlung mit Hilfe von 10x SAP-Puffer und SAP-Enzym bei 37 °C statt. Die erneute Hitzebehandlung diente der Inaktivierung des SAP-Enzyms.

Anschließend erfolgte die Auftrennung in einem 0,8%igen Agarose-Gel und die Aufreinigung der DNA-Bande mit Hilfe des Zymoclean™ Gel DNA Recovery Kits.

4.2.4 Ligation von DNA-Fragmenten

Vektor und Insert wurden im Verhältnis 1:2 in Quick-Ligase-Puffer und 0,5 µl Quick-T4-DNA-Ligase für 5 min bei Raumtemperatur ligiert.

Anschließend erfolgte eine Transformation in *E. coli* (s. 4.2.5). Die Plasmid-DNA wurde aus einzelnen Kolonien isoliert (s. 4.2.6) und anschließend eine Kontrolle des Einbaus sowie der richtigen Orientierung des Inserts mit Hilfe von Restriktionsverdau und/oder gerichteter PCR (s. 4.2.7) durchgeführt.

4.2.5 Amplifikation von Plasmid-DNA in E.coli

LB-Medium	LB-AMP-Agar	Ampicillin-Endkonzentration
1 % (w/v) Bacto-Tryptone	1,5 % (w/v) Agar in LB-Medium	50 µg/ml Ampicillin
5 % (w/v) Bacto-Yeast Extract		
86 mM NaCl		

Tab.8: Zusammensetzung der LB-Medien

Für die Transformation von Plasmid-DNA wurden im Falle einer Re-Transformation 10 µl kompetente *E.coli* XL1-blue und 100 ng Plasmid-DNA verwendet. Bei einer Ligation wurden 150 µl Bakterien zum Ligationsansatz gegeben. Auf die Zugabe der Bakterien folgten eine Inkubation auf Eis für 15 min und der Hitzeschock bei 42 °C für 1 min. Anschließend wurden 300 µl LB-Medium hinzugefügt und der Transformationsansatz bei 37 °C für 45 min inkubiert. Der Zentrifugation bei 5000 Upm für 1 min folgten die Abnahme von 200 µl LB-Medium und das Resuspendieren der Bakterienzellen. Im Anschluss wurden 20 µl bzw. bei einer Ligation der gesamte Ansatz auf einer LB-Agar-Platte mit entsprechendem Antibiotikum ausplattiert.

4.2.6 Isolation von Plasmid-DNA aus *E.coli*

P1 (Resuspensionspuffer)	P2 (Lyse-Puffer)	P3 (Neutralisationspuffer)	0,1 TE-Puffer
50 mM Tris pH 8,0	200 mM NaOH;	3 M Kaliumacetat	1 mM EDTA
10 mM EDTA	1 % (w/v) SDS	11,5 % Eisessig pH 5,5	10 mM Tris/HCl pH 8,0
100 µg/ml RNase A			

Tab.9: Puffer für Mini-Plasmid-Präparation

Nach der Transformation in *E.coli* XL-1-blue und deren Ausplattierung (s. 4.2.5) wurde die Plasmid-DNA folgendermaßen isoliert:

Ausgehend von einzelnen Kolonien wurden 3 ml LB-Amp-Medium (Mini-Präparation) angeimpft und über Nacht bei 37 °C in einem Schüttler inkubiert. Die Bakterien wurden durch eine Zentrifugation bei 5000 Upm für 3 min pelletiert. Anschließend wurden die Bakterienpellets in Puffer P1 resuspendiert und durch Zugabe von jeweils 150 µl P2 und P3 lysiert. Durch erneute Zentrifugation (10000 Upm, 4 °C, 10 min) wurden unlösliche Zellbestandteile sedimentiert. Im abgenommenen Überstand erfolgte die Präzipitation der Plasmid-DNA durch Zugabe von 90 % (v/v) Ethanol. Die Zentrifugation bei 14000 Upm, 4 °C für 10 min diente der Ausfällung der DNA, die anschließende Zugabe von 70 % (v/v) Ethanol der Entfernung von ausgefallenen Salzen. Abschließend folgten die Trocknung der DNA und deren Resuspendierung in 0,1x TE-Puffer.

Im Falle einer geplanten Midi-Präparation wurde eine Lösung mit 100 ml LB-Amp-Medium angesetzt und das Plasmid DNA purification Kit von Macherey-Nagel laut Herstellerangaben verwendet.

4.2.7 Gerichtete PCR

Der Vorgang der gerichteten PCR diente der Überprüfung der Orientierung des DNA-Inserts im Vektor. Dabei wurde folgender Ansatz verwendet:

20µl Ansatz	Programm
2 µl 10x Taq-Puffer	2 min 94°C
0,4 µl dNTPs	10 sek 94°C
1 µl SP6 Primer	10 sek 58°C
1 µl Nit1 rev Primer	10 sek 72°C
0,2 µl Taq-DNA-Polymerase	20 sek 72°C
14,4 µl Aqua dest.	∞ 15°C
1 µl isolierte Plasmid-DNA	

} 35 Zyklen

Tab.10: Ansatz und Programm der gerichteten PCR

Anschließend wurden die PCR-Ansätze auf ein Agarose-Gel aufgetragen (s. 4.2.1).

4.2.8 Ortsspezifische Mutagenese

Mit Hilfe einer Mutagenese-PCR wurde eine gezielte Punktmutation innerhalb der Basensequenz einer Plasmid-DNA vorgenommen. Die Auswahl der Oligonukleotide erfolgte komplementär zur Basensequenz des jeweiligen DNA-Abschnittes mit Ausnahme der Abweichung an der zu mutierenden Stelle.

Die verwendeten Oligonukleotide wurden vor der Mutagenese-PCR wie folgt phosphoryliert:

20µl Ansatz	Programm
10,7 µl nuklease-freies Wasser	30 min, 37 °C
0,8 µl MgSO ₄ (25 mM)	15 min, 65 °C
4 µl ATP (10 mM)	
2 µl Oligonukleotid (100 pmol/µl)	
2 µl PNK-Buffer	
0,5 µl PNK	

Tab.11: Phosphorylierung von Oligonukleotiden

Die im Anschluss folgende PCR setzte sich zusammen aus:

50µl Ansatz	Programm
19 µl Aqua dest.	2 min, 95 °C
2 µl Oligonukleotid 1 (10 pmol/µl)	30 sek, 95 °C
2 µl Oligonukleotid 2 (10 pmol/µl)	30 sek, 60 °C
2 µl Template-Vektor (1 µg/µl)	15 min, 68 °C
25 µl PWO-Master	15 min, 68 °C
	∞ 4 °C

Tab.12: Ansatz und Programm der Mutagenese-PCR

Der PCR-Ansatz wurde einem Restriktionsverdau mit DpnI (10 µl Mutagenese-PCR Ansatz + 1 µl DpnI für 2 h bei 37 °C) unterzogen. Anschließend wurde dieser in *E. coli* XL-1 blue transfiziert (s. 4.2.5). Nach Isolierung der Plasmid-DNA (s. 4.2.6) wurde anhand von DNA-Sequenzierung (s. 4.2.9) der Erfolg der ortsspezifischen Mutagenese kontrolliert.

4.2.9 DNA-Sequenzierung

Die Ermittlung von Nukleotidsequenzen zur Kontrolle einiger Klonierungsschritte erfolgte durch die Firma GATC mittels der Sequenzierungsmethode nach Sanger. Hierfür wurden der FLAG-fw-Primer sowie die von GATC geforderte Konzentration der DNA verwendet.

4.2.10 Konzentrationsbestimmung der DNA

Hierfür wurde das UV-Spektrometer NanoDrop® der Firma Peqlab verwendet. Die Messung von 2 µl der jeweiligen Probe erfolgte photometrisch bei 280 nm.

4.3 Proteinbiochemische Methoden

4.3.1 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-Page)

Lösungen	2x Trenngel	2x Sammelgel
Aqua dest.	3,96 ml	1,57 ml
1,5 M Tris/HCl pH 8,8	2,5 ml	
0,5 M Tris/HCl pH 6,8		0,83 ml
30 % (w/v) Acrylamid	3,33 ml	0,53 ml
10 % (w/v) SDS	100 µl	33,3 µl
10 % (w/v) APS	100 µl	33,3 µl
TEMED	13,4 µl	6,7 µl

Tab.13: Herstellung von 10% SDS-PAGE-Gelen

SDS-Elektrophorese-Puffer	2x SDS-Probenpuffer
24,8 mM Tris/HCl	65 mM Tris/HCl pH 6,8
192 mM Glycerin	3 % (w/v) SDS
0,01 % (w/v) SDS	30 % (v/v) Glycerin
	5 % (v/v) Mercaptoethanol
	4 mg/ml Bromphenolblau
	4 mg/ml Pyronin G

Tab.14: Zusammensetzung von SDS-Elektrophorese-Puffer und 2xSDS-Probenpuffer

Nachdem die aufzutragenden Proben mit 2xSDS-Probenpuffer versetzt wurden, folgte deren Erhitzung bei 95 °C im Heizblock für 5 min und das Auftragen in die Geltaschen mit Hilfe einer Mikroliterspritze.

Während der Konzentrierung der Proteine im Sammelgel erfolgte die Elektrophorese bei 80 V, bevor die Auftrennung der Proteine anschließend bei 130-180 V stattfindet.

Es wurden die Apparaturen der Firma BioRad verwendet.

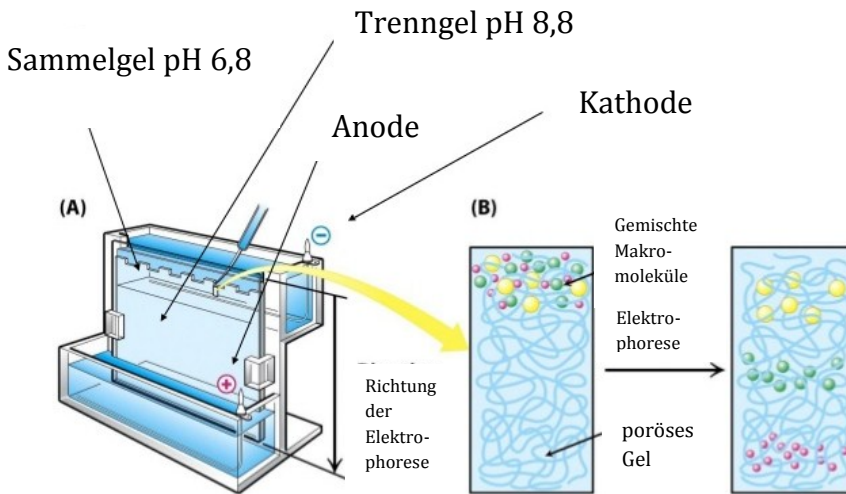


Abb. 5: Aufbau (A) und Verlauf (B) einer SDS-PAGE

Modifiziert nach Quelle: <http://image.slidesharecdn.com/sdspagelecture-140903131303-phapp01/95/sds-page-lecture-2-638.jpg?cb=1409750635>

4.3.2 Western Blot

4.3.2.1 Elektrotransfer von Proteinen auf PVDF-Membranen

Semi-Dry Puffer
25 mM Tris
192 mM Glycin
10% (v/v) Ethanol

Tab.15: Zusammensetzung des Semi-Dry-Puffers

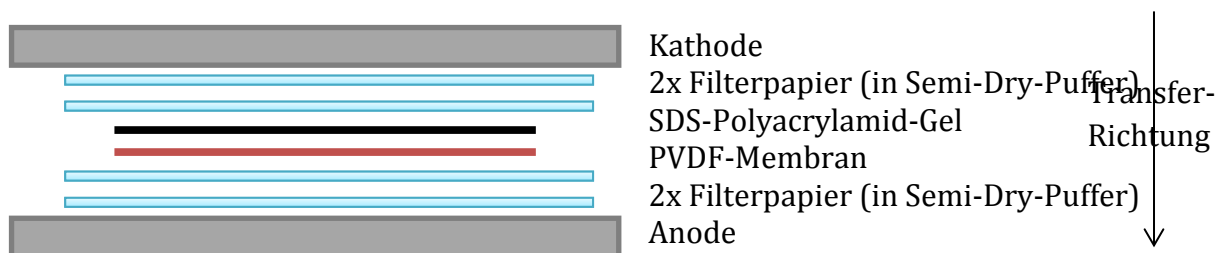


Abb. 6 : Schematischer Aufbau des Semi-Dry-Blot-Verfahrens

Die PVDF-Membran wurde vor Gebrauch mit Methanol aktiviert und anschließend in Semi-Dry-Puffer äquilibriert.

Mit Hilfe des Semi-Dry-Verfahrens wurden die Proteine vom SDS-Polyacrylamid-Gel auf eine PVDF-Membran übertragen. Dabei erfolgte der Transfer bei 20 V für 1 h.

4.3.2.2 Immunologischer Nachweis von Proteinen auf PVDF-Membranen

ECL-Lösung
100 mM Tris pH 8,8
1,25 mM Luminol
2 mM IPBA

Tab.16: Inhaltsstoffe ECL-Lösung

TST-Puffer
150 mM NaCl
10 mM Tris/HCl pH 7,5
0,1 % (v/v) Tween

Tab.17: Inhaltsstoffe TST-Puffer

Nach erfolgreichem Elektrotransfer wurde die Membran für 1 h in TST-Puffer blockiert. Die Inkubation mit Primär-Antikörper erfolgte über Nacht. Nach 15-minütigem Waschen in TST-Puffer wurde die Membran mit dem entsprechenden Peroxidase-gekoppelten Sekundär-Antikörper inkubiert und anschließend erneut für 15 min mit TST-Puffer gewaschen.

Zur Detektion wurde pro Membran 1 ml ECL Lösung und 0,53 μ l Wasserstoffperoxid verwendet. Die durch die Chemilumineszenz-Reaktion entstehenden Lichtsignale wurden mit einer Geldokumentationsanlage (G-Box von Syngene) detektiert.

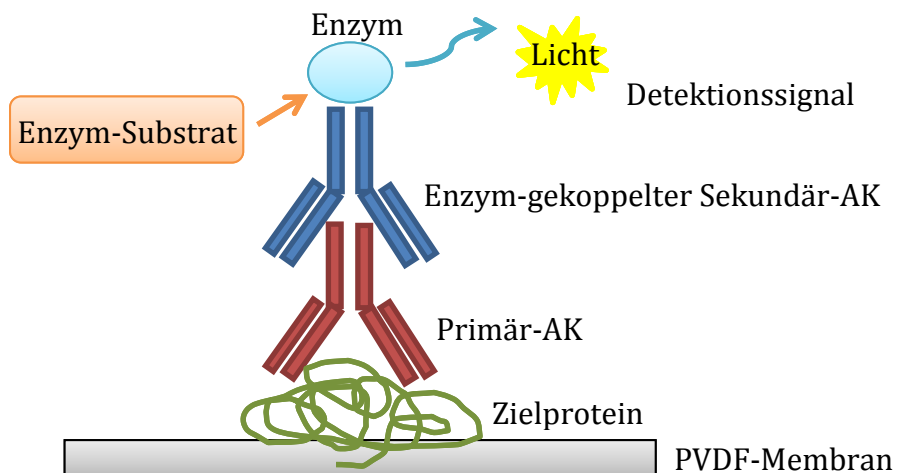


Abb.7: Detektion im Western Blot

4.3.3 Co-Immunopräzipitation (Co-IP)

Lysis A Puffer	Imidazol-Puffer
20 mM Imidazol pH 6,8	20 mM Imidazol (pH 8,0)
300 mM Sucrose	300 mM Sucrose
100 mM KCl	150 mM NaCl
2 mM MgCl ₂	2 mM MgCl ₂
0,2 % (v/v) Triton-100	0,2% (v/v) Triton
10 mM EDTA pH 8,0	
1 mM NaF	
1 mM Na ₃ VO ₄	

Tab.18: Zusammensetzung von Lysis A- und Imidazolpuffer

Die Methode der Co-Immunopräzipitation wurde angewandt, um die Anwesenheit von Proteinkomplexen in Zellysaten sichtbar zu machen.

Bei dieser Methode wird ein Protein durch einen spezifischen Antikörper aus einem Proteingemisch isoliert. Die an das isolierte Protein gebundenen Proteine werden co-präzipitiert und lassen sich nach der Auftrennung in der SDS-PAGE mit Hilfe eines Immunblots detektieren.

HEK-293-Zellen wurden in 6-Well-Platten ausgesät (8×10^5 pro Well) und nach 24 h mit den entsprechenden Plasmiden mit Hilfe der Calciumphosphat-Methode transfiziert.

Nach 48 h wurden die Zellen durch Zugabe von 200 μ l des entsprechenden Lysepuffers lysiert und nach einer 20-minütigen Inkubation im Kühlschrank bei 14.000 Upm und 4 $^{\circ}$ C für 10 min zentrifugiert. Vom Überstand wurden für die Kontrolle der Transfektion jeweils 20 μ l mit 20 μ l 2xSDS-Probenpuffer vermischt, auf ein SDS-Polyacrylamid-Gel aufgetragen (s. 4.3.1) und mittels Western Blot die entsprechenden Proteine nachgewiesen (s. 4.3.2.2).

Das restliche Lysat (ca. 300 μ l, entspricht ca. 250 μ g Gesamtprotein) wurde daraufhin mit 40 μ l im jeweiligen Lysepuffer äquilibrierter Protein-A-Sepharose für 20 min im Überkopfschüttler bei 4 $^{\circ}$ C inkubiert (Preclearing). Nach einer Zentrifugation (2700 Upm, 5 min, 4 $^{\circ}$ C) wurde der Überstand mit je 30 μ l Protein-A-Sepharose versetzt. Diese wurde über Nacht mit dem spezifischen Antikörper (pro Ansatz 0,5 μ g) gekoppelt. Es folgte eine erneute Inkubationszeit von 1 h unter denselben Bedingungen. Hierauf wurden die Proben dreimal jeweils bei 2700 Upm und 4 $^{\circ}$ C für 3 min zentrifugiert, der Überstand abgesaugt und 200 μ l Lyse-Puffer zugegeben.

4.3.4 Dual-Luciferase Reporterassays

Substrat A (Firefly) pH 7,8 (KOH)		Substrat B (Renilla) pH 5,1 (H ₃ PO ₄)	
Tricine	20 mM	NaCl	1,1 M
MgSO ₄	2,67mM	K ₂ KPO ₄	220 mM
EDTA	100 µM	Na-EDTA	2,2 mM
ATP	530 µM	BSA	6,58 µM
DTT	33,3 mM	Coelenterazin	1,43 µM
Coenzym A	270 µM	NaN ₃	270 µM
D-Luziferin	470 µM	D-Luziferin	1,3 mM

Tab.19: Zusammensetzung der Substrate A und B für den Reporterassay

PPBT-Puffer
100 mM K ₃ PO ₄
0,2 % (v/v) Triton-X 100

Tab.20: Zusammensetzung des PPBT-Puffers

Für diese Methode wurden 2×10^5 HEK-293-Zellen pro Well in 24-Well Platten ausgesät, nach 24 h mit den entsprechenden Plasmiden transfiziert (siehe 4.1.2) und nach weiteren 24 h mit je 150 µl PPBT-Puffer pro Well lysiert. Im Falle einer gewünschten Induktion des Wnt-Signalweges erfolgte eine Stimulation mit Wnt3a-konditioniertem Medium ca. 8 h nach der Transfektion. Anschließend wurden pro Lysat 2x20 µl in eine 96well-Platte pipettiert und mit Hilfe des Glo-Max® Luminometer der Firma Promega und den in Tab.19 beschriebenen Substraten die Lumineszenz gemessen.

In Reporteranalysen kann die Beeinflussung der transkriptionellen Regulation bestimmter Promotoren durch Effektoren untersucht werden.

Hierfür wurde ein Reporter-Konstrukt verwendet, das sowohl eine Promotorregion mit TCF/LEF-Bindungsstellen als auch den Genabschnitt für die Luciferase des *Photinus pyralis* Leuchtkäfers (Firefly-Luciferase) enthält.

Demnach erfolgt die Expression der Luciferase in Abhängigkeit zur Promotorregulation.

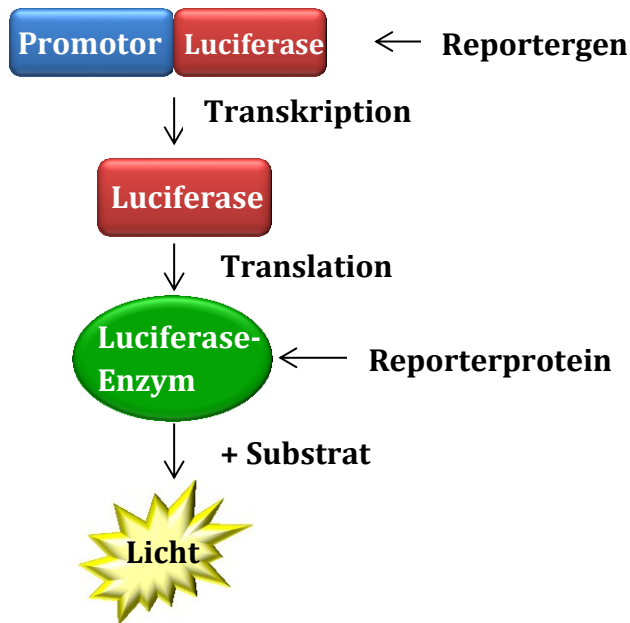


Abb.8: Schema des Ablaufs im Reporter gen assay

Die Messung des Umsatzes von Luciferin in Substrat A und B gibt Aufschluss über die Luciferase-Aktivität. Bei dieser auftretenden Biolumineszenz-Reaktion (s. Abb.9) wird Licht emittiert. Die Intensität ist dabei proportional zur Aktivität der Luciferase und wird in einem Luminometer ermittelt.

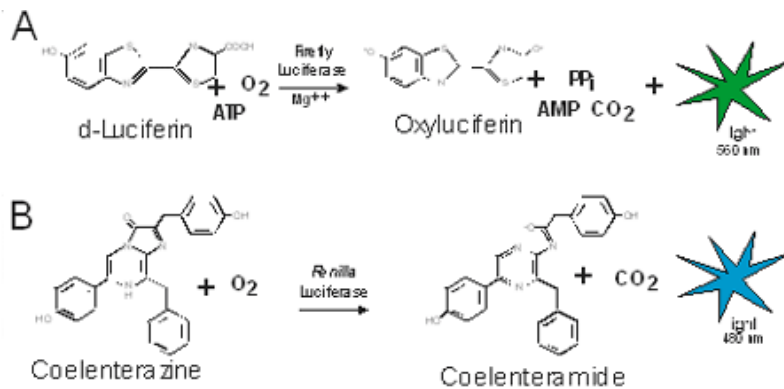


Abb.9: Biolumineszenz-Reaktionen von Substrat A und B (Quelle: Biotek Instruments Inc.)

Es wurde ein dualer Reporter gen assay durchgeführt, der eine Kontrolle gleichmäßiger Transfektion und Zellzahl ermöglicht. Hierbei wird sowohl die Firefly-Luziferase als auch eine Renilla-Luziferase eingesetzt, die für die Normalisierung des Luziferase-Signals verwendet wurde.

4.3.5 Kern/Cyto- Fraktionierung (nach Gonzalez-Mariscal)

RIPA-SDS-Puffer	Nucleus-Cyto (NC)-Puffer
2 mM EDTA	10 mM Tris/HCl pH 7,4
150 mM NaCl	10 mM NaCl
0,2 % (w/v) SDS	3 mM MgCl ₂
1 % (v/v) Triton-100	0,5 % (v/v) NP-40
0,5 % (w/v) Na-Desoxycholsäure	
10 % (v/v) Glycerol	

Tab.21: Zusammensetzung des RIPA-SDS-Puffers und NC-Puffers

Zur Untersuchung der Lokalisation von Proteinen innerhalb einer Zelle wurde eine Kern/Cyto-Fraktionierung nach Gonzalez-Mariscal (Islas et al., 2002) durchgeführt.

Hierfür wurden in 6-Well-Platten HEK-293-Zellen (8×10^5 pro Well) ausgesät, nach 24 h mit entsprechenden Plasmiden transfiziert und 48 h nach Transfektion mit 200 μ l NC-Puffer lysiert.

Das Lysat wurde in Eppendorf-Gefäße überführt, 30 sek geschüttelt und anschließend bei 4000 Upm und 4 °C für 3 min zentrifugiert. Der Überstand stellt die Cyto-Fraktion des Lysats dar, wurde abgenommen und bei -20 °C gelagert.

Daraufhin wurde das Kernpellet dreimal mit je 200 μ l NC-Buffer gewaschen. Nachdem der Überstand abgesaugt wurde, erfolgte die Zugabe von 200 μ l RIPA-SDS-Puffer und die Lagerung auf Eis für 5 min. Die Ultraschall-Behandlung (40 % Amplitude/0,5 s Zyklus/10 sek) bildete den letzten Schritt.

5. Ergebnisse

5.1 Nachweis einer Ubiquitinierung von Nit1

Aufgrund der bisher fehlenden Untersuchungen von posttranslationalen Modifikationen humaner Nitrilase 1 (Nit1) stellte sich die Frage, ob diese ubiquitiniert werden kann. Die Untersuchung dieser Fragestellung erfolgte mit Hilfe einer Co-IP, bei der sowohl FLAG-Nit1 als auch HA-Ubiquitin in HEK-293-Zellen überexprimiert und anschließend die Präzipitation mit anti-FLAG M2-Antikörper vorgenommen wurde. Bei der Analyse der Western Blots mittels Geldokumentation wurde eine Bande bei ca. 50 kDa sichtbar, was der Größe eines kovalent verknüpften Komplexes von FLAG-Nit1 und HA-Ubiquitin entspricht (Abb. 10).

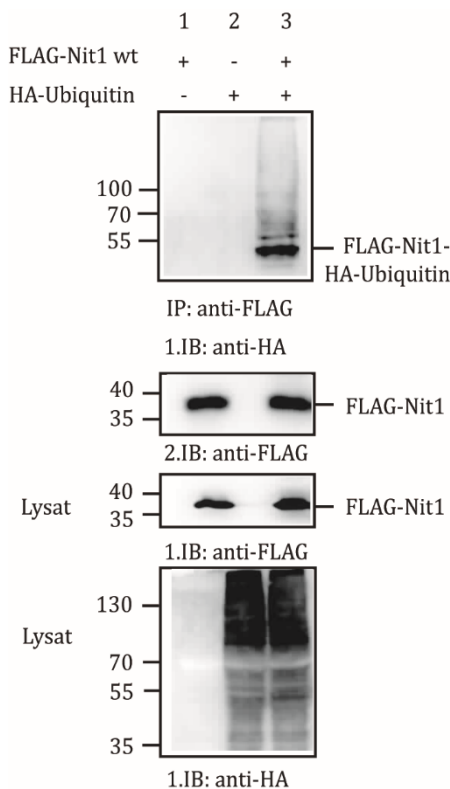


Abb.10: Nachweis einer Ubiquitinierung von Nit1

Die Transfektion von HEK-293-Zellen erfolgte mit je 2 μ g pCMV4-FLAG-Nit1-wt und 4 μ g pcDNA3-HA-Ubiquitin. Die Zellen wurden 48 h später lysiert und die Ansätze einer Co-IP mit anti-FLAG M2-Antikörper unterzogen. Nach erfolgreicher Proteintrennung mittels SDS-PAGE wurden die Proben im Western Blot untersucht. Bei der Detektion mit anti-HA-Antikörper zeigte sich deutlich eine Bande des Nit1-Ubiquitin-Konjugats. Im Anschluss erfolgten die Detektion mit anti-FLAG M2-Antikörper und die Untersuchung der Lysate mittels anti-FLAG M2- und anti-HA-Antikörper. Damit wurden die Verwendung gleicher Proteinnengen sowie eine erfolgreiche Transfektion nachgewiesen.

Dieser Versuch wurde mehrfach ($n>3$) reproduziert.

5.2. Analyse von humaner Nitrilase1 in UbPred und PhosphoSitePlus®

Nachdem eine Ubiquitinierung von Nit1 nachweisbar war, sollte untersucht werden, welche/r Lysinrest/e die Ubiquitinierungsstelle/n in Nit1 darstellt/en. Zunächst wurde die Aminosäuresequenz von Nit1 mit dem Ubiquitinierungsstellen-Vorhersageprogramm, UbPred, analysiert (Radivojac et al., 2010). Dabei wurde keines der Lysine in humaner Nit1 als potentielle Ubiquitinierungsstelle vorhergesagt. Zum Vergleich wurde auch humanes

p53 untersucht. Es zeigte sich beim Vergleich mit experimentell nachgewiesenen Ubiquitinierungsstellen für p53, dass sowohl von UbPred vorhergesagte Lysine mit einem hohen Score (> 0.62), als auch Lysine mit einem geringeren Score (< 0.62) tatsächlich ubiquitiniert werden. Die Ergebnisse aus der Analyse in UbPred sind in Tabelle 22 zusammengefasst.

AS	Score	Ubi	AS	Score	Ubi	Publiziert
K60	0.55	No	K24	0.73	Medium	
K65	0.28	No	K101	0.60	No	
K108	0.56	No	K120	0.58	No	
K141	0.34	No	K132	0.30	No	
K152	0.29	No	K139	0.45	No	
K161	0.38	No	K164	0.27	No	
K197	0.41	No	K291	0.81	Medium	
K265	0.52	No	K292	0.90	High	
			K305	0.81	Medium	
			K319	0.51	No	+
			K320	0.54	No	+
			K321	0.66	Low	+
			K351	0.78	Medium	+
			K357	0.93	High	+
			K370	0.19	No	+
			K372	0.17	No	+
			K373	0.13	No	+
			K381	0.13	No	+
			K382	0.13	No	+
			K386	0.74	Medium	+

Tab. 22: Analyse von humaner Nit1 (links) und hp53 (rechts) in dem Ubiquitinierungsstellen-Vorhersageprogramm UbPred. Score: 0.62-0.69 geringe, 0.69-0.84 mittlere und 0.84-1.00 hohe Wahrscheinlichkeit für die Ubiquitinierung. AS = Aminosäure, + = Ubiquitinierung dieser Lysinreste ist in der Literatur beschrieben (Quelle: Gu und Zhu, 2012).

Nachdem die Ergebnisse für humane Nit1 aus dem Vorhersageprogramm nicht weiterführend waren, wurde PhosphoSitePlus® verwendet (Hornbeck et al., 2012). Hier werden nur PTMs eines bestimmten Proteins aufgelistet, die in experimentellen Hochdurchsatz-Untersuchungen gefunden wurden. Dabei wurde in Massenspektrometrie-basierten Experimenten im humanen Nit1-Protein das Lysin an Position 108 und im murinen Protein an Position 157 (im Mensch 161) als ubiquitiniert detektiert (Wagner et al., 2012 und Kim et al., 2011). Diese potentiellen Ubiquitinierungsstellen sollten daher in der vorliegenden Arbeit untersucht werden. In der dabei verwendeten humanen Nit1 isoform CRA_a [Accession: EAW52657], die der Nit1 Isoform 1 ohne mitochondriale Lokalisationssequenz entspricht und nur 291 Aminosäuren umfasst (siehe Abb. 1) entspricht dies den Lysinresten K72 und K125.

5.3 Mutagenese

Um die Bedeutung der Lysinreste K72 und K125 weiter zu untersuchen, wurden in einem nächsten Schritt die potentiellen Ubiquitinylierungsstellen K72 bzw. K125 durch ortsspezifische Mutagenese zu Arginin (K72R und K125R) ausgetauscht. Die erfolgreiche Mutagenese wurde über Sequenzierungen bestätigt. Anschließend wurden Nit1-K72R und Nit1-K125R in den Vektor pCS2+ umklontiert.

5.4 Nachweis von Nitrilase1-Ubiquitin-Konjugaten

Im Folgenden sollte untersucht werden, ob durch Mutagenese von K72 und K125 tatsächlich die Ubiquitinierung von Nit1 verhindert werden kann. Dazu erfolgte nach Überexpression von FLAG-Nit1-wt (-Wildtyp), -K72R bzw. -K125R allein oder in Kombination mit HA-Ubiquitin in HEK-293-Zellen eine Co-Immunopräzipitation (Co-IP) mit anti-FLAG M2-Antikörper sowie die Analyse der Proteinkomplexe in SDS-Gelelektrophorese und Western Blot. Dabei zeigte sich ein eindeutiges Signal für ein FLAG-Nit1-HA-Ubiquitin Konjugat bei ca. 50 kDa für Nit1-wt und Nit1-K72R. Im Falle der K125R Mutante war dagegen eine deutlich geringere Signalstärke der Shift-Bande bei 50 kDa detektierbar (Abb. 11A,B). Die Lysatkontrollen zeigen, dass vergleichbare Mengen an Nit1-Konstrukt (36 kDa) und HA-Ubiquitin eingesetzt wurden. Damit wurde K125 als eine potenzielle Ubiquitinierungsstelle von Nit1 identifiziert.

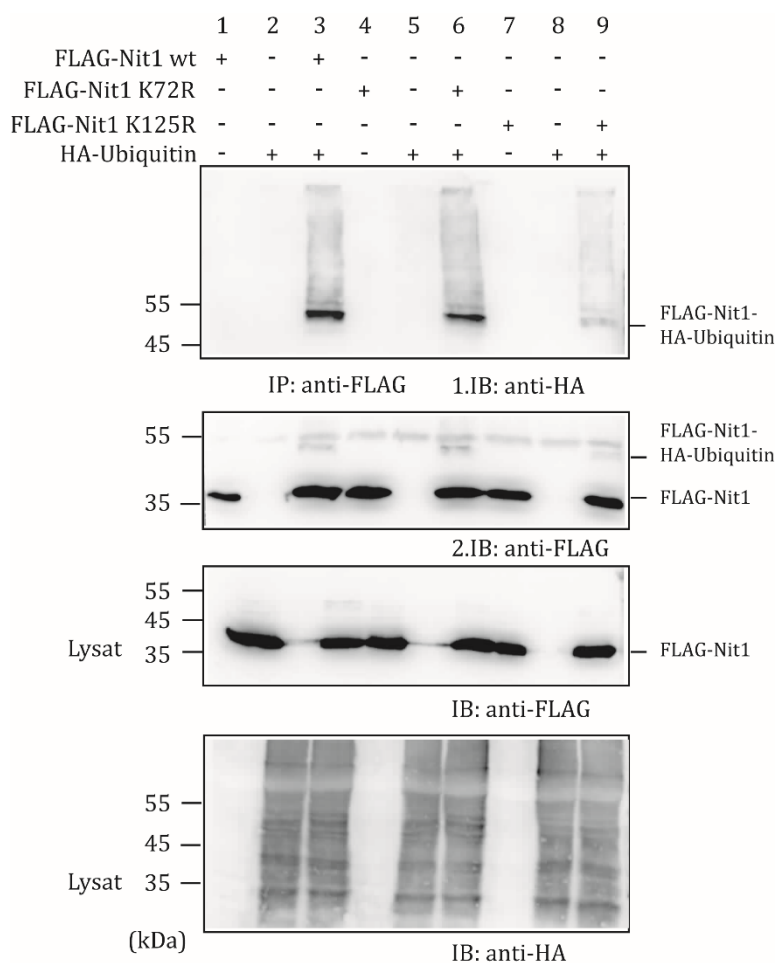


Abb. 11A: Identifizierung von K125 als Ubiquitinierungsstelle in Nit1

HEK-293-Zellen wurden mit jeweils 2 µg pCMV4-FLAG-Nit1 und 4 µg pcDNA3-HA-Ubiquitin transfiziert. Nach 48h wurden die Zellen lysiert und eine Co-IP mit anti-FLAG M2-Antikörper durchgeführt. Die Proteinkomplexe wurden über SDS-PAGE aufgetrennt und mittels Immunblot analysiert. Zunächst wurde der Western Blot der Co-IP mit anti-HA-Antikörper detektiert, anschließend mit anti-FLAG M2-Antikörper. Die unteren beiden Blots zeigen die Lysatkontrollen zum Nachweis erfolgreicher und vergleichbarer Transfektionen (Lysat). Es wurde deutlich, dass Ubiquitin kovalent an Nit1 bindet, wobei im Falle der K125R Mutante die Signale im anti-HA Blot schwächer waren. Vergleichbare Ergebnisse wurden in 4 unabhängigen Experimenten erzielt.

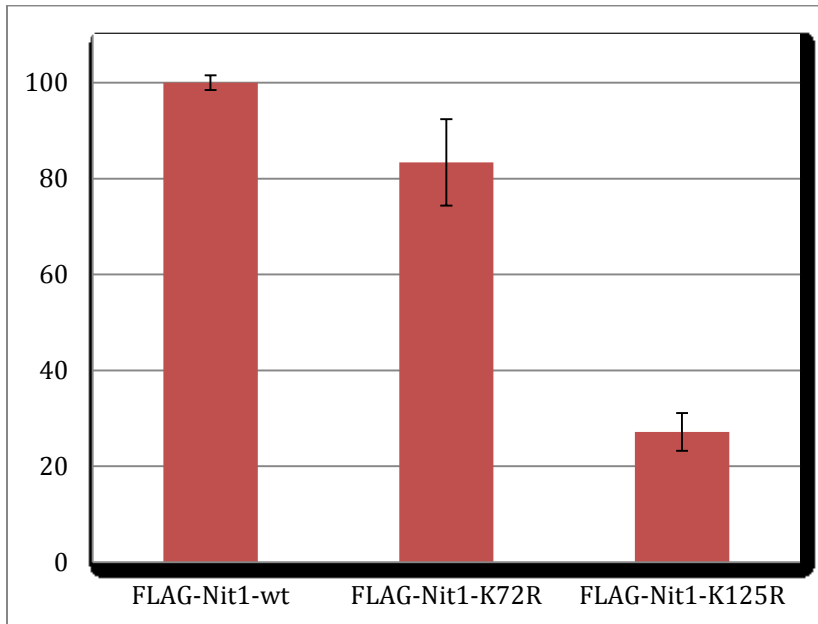
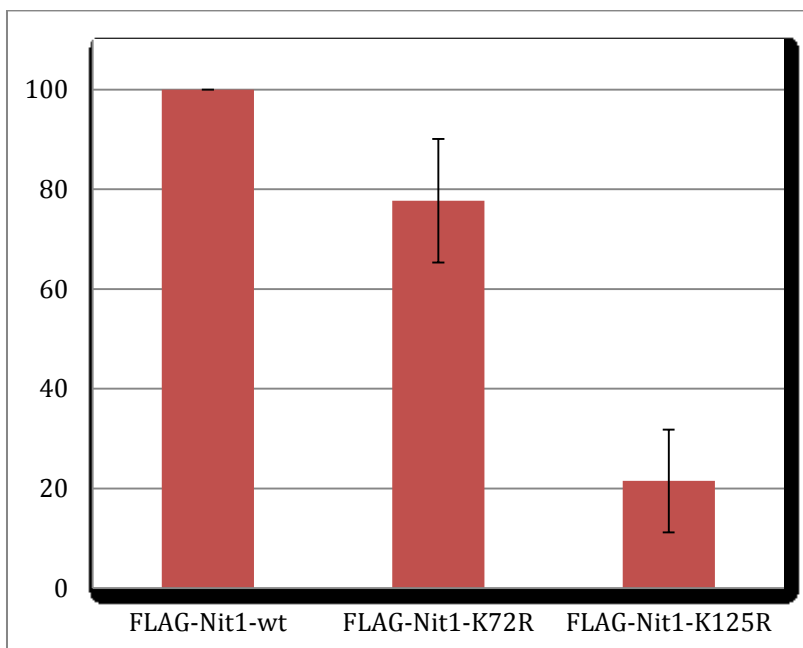


Abb. 11B: *Quantifizierung der Nit1-Ubi-Konjugate*

Zur Quantifizierung der Signale in den Western Blots wurde das Software-Programm ImageJ verwendet. Die Werte der Co-IP-Signale wurden gegen die des jeweiligen Kontrollblots normalisiert und die erhaltenen Quotienten anschließend auf FLAG-Nit1-wt bezogen. Die Werte aus zwei unabhängig voneinander dargestellten Experimenten sind repräsentativ dargestellt.



5.5 Vergleich der Lokalisation von Nit1-Ubi und Nit1-K125R

Im nächsten Schritt sollte untersucht werden, ob ein Unterschied in der Lokalisation von ubiquitiniertem Nit1-wt und der Nit1-K125R Mutante, bei der die vorher identifizierte Ubiquitinierungsstelle durch Mutation blockiert ist, besteht. In HEK-293-Zellen wurde FLAG-Nit1-wt bzw. FLAG-Nit1-K125R allein oder in Kombination mit HA-Ubiquitin überexprimiert. In den Western Blots der Kern/Cytoplasma-Fraktionierung sieht man, dass in der Kernfraktion eine Ubiquitinierung nur für FLAG-Nit1-wt, aber kaum für die Mutante zu detektieren ist (Abb. 12). Dieses Experiment bestätigt, dass Lysin K125 eine potentielle Ubiquitinierungsstelle in Nit1 darstellt.

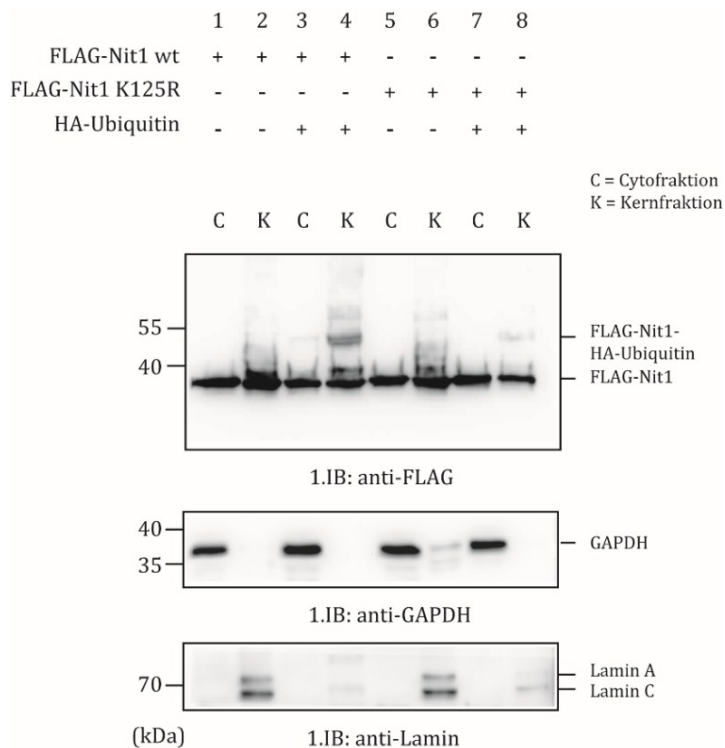


Abb. 12A: Kern/Cyto-Fraktionierung von Nit-wt-Ubi und Nit1-K125R

Nach der Transfektion von HEK-293-Zellen mit FLAG-Nit1-wt bzw. FLAG-Nit1-K125R und HA-Ubiquitin und anschließender Lyse nach 48 h wurde eine Kern/Cyto-Fraktionierung durchgeführt. Die im Western Blot detektierbare Ubiquitinbande in der Kernfraktion zeigt sich im Falle der Mutante deutlich schwächer. Anschließend erfolgten Detektionen weiterer Blots mit anti-GAPDH- und anti-Lamin-Antikörpern. Dieses Ergebnis war in 3 voneinander unabhängigen Experimenten reproduzierbar.

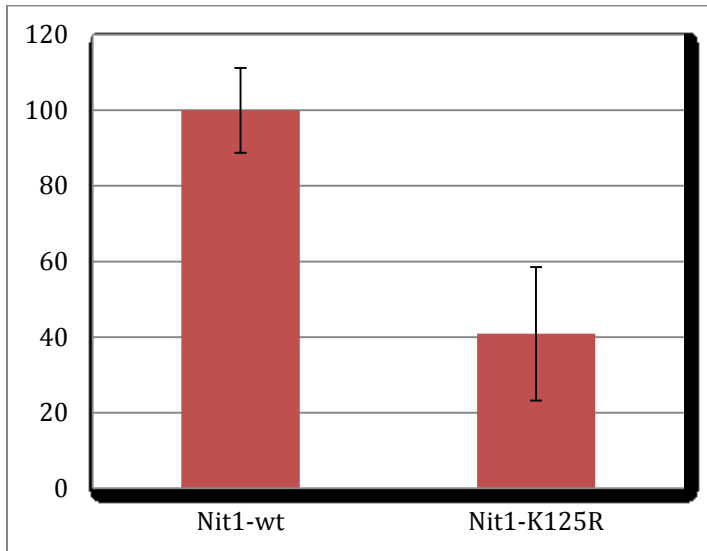


Abb.12B: *Quantifizierung Kern/Cyto-Fraktionen von Nit1-Ubi*

Zur Quantifizierung der Signale in den Western Blots wurde das Software-Programm ImageJ verwendet. Die Werte der Ubiquitin-Banden-Signale wurden gegen die des jeweiligen Nit1-Signals normalisiert und die erhaltenen Quotienten anschließend auf FLAG-Nit1-wt bezogen. Die Werte aus drei unabhängig voneinander dargestellten Experimenten sind repräsentativ dargestellt.

5.6 Bedeutung der Nit1-Ubiquitinierung

5.6.1 Beeinflussung der Nit1-Ubiquitinierung durch Wnt-Aktivierung

In vorangegangenen Untersuchungen der eigenen Arbeitsgruppe konnte gezeigt werden, dass sowohl Fhit als auch humane Nit1 als Repressoren des kanonischen Wnt-Signalweges wirken (Weiske, 2007; Mittag et al., 2016). Daher sollte untersucht werden, ob eine Wechselwirkung der Nit1-Ubiquitinierung auf den Wnt-Signalweg vorliegt.

Zunächst wurde erforscht, ob die Stimulation des Wnt-Signalweges einen Einfluss auf die Nit1-Ubiquitinierung hat. Hierfür wurde eine Co-Immunpräzipitation durchgeführt, nachdem die mit je 2 µg pCMV4-FLAG-Nit1 und 2,5 µg pcDNA3-HA-Ubiquitin transfizierten HEK-293-Zellen für 24 h mit Wnt3a-konditioniertem Medium stimuliert wurden. Die Verdünnung des Wnt3a-konditionierten Mediums in DMEM betrug dabei 1:3. Bei der Analyse des Western Blots konnte eine Verringerung der Signalstärke für das FLAG-Nit1-HA-Ubiquitin-Konjugat beobachtet werden (Abb. 13).

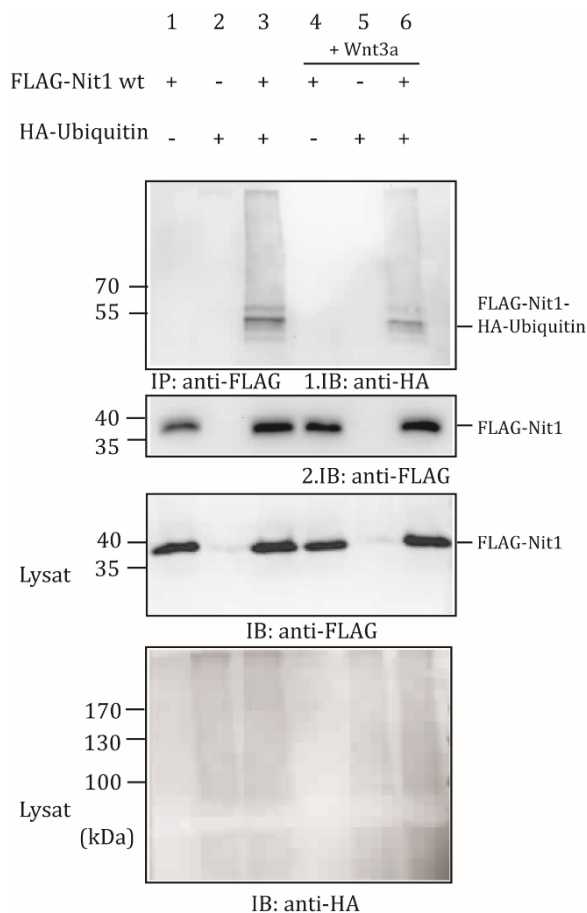


Abb.13: *Beeinflussung der Nit1-Ubiquitinierung durch Wnt3a-Stimulation*

Hier wurden HEK-293-Zellen wie im Schema gezeigt transfiziert und nach 24 h für weitere 24 h mit Wnt3a-konditioniertem Medium oder Kontrollmedium inkubiert. Anschließend wurden die Zellen lysiert und eine Co-IP mit anti-FLAG M2-Antikörper durchgeführt. Der Western Blot der Co-IP wurde erst mit anti-HA-Antikörper und anschließend mit dem anti-FLAG M2-Antikörper detektiert. Die Lysatkontrollen zeigten, dass vergleichbare Mengen exprimiert wurden (Lysat). Dieses Experiment wurde einmal wiederholt und zeigte dabei ein vergleichbares Ergebnis.

In einem weiteren Experiment wurde analysiert, ob die Ubiquitinierung einen Einfluss auf den reprimierenden Effekt von Nit1 auf den Wnt-Signalweg hat. Hierfür wurden Firefly- bzw. Renilla-Luziferase Reportergenkonstrukte, humane Nit1 und HA-Ubiquitin in HEK-293-Zellen exprimiert, die Zellen nach 24 h lysiert und die Expression der Luziferasen im Luminometer gemessen. Dabei wurden die mit Wnt3a stimulierten Ansätze relativ zu den unstimulierten Kontrollansätzen dargestellt. Normiert wurde jeweils auf die Leervektorkontrolle (1,4). Die Auswertung zeigt erneut, dass Nit1 einen Repressor des Wnt-Signalweges darstellt. Der repressive Einfluss nimmt bei Anwesenheit von Ubiquitin weiter zu. Sichtbar ist auch, dass diese Wirkung des Ubiquitins im Falle der K125R Mutante deutlich reduziert ist (Abb. 14).

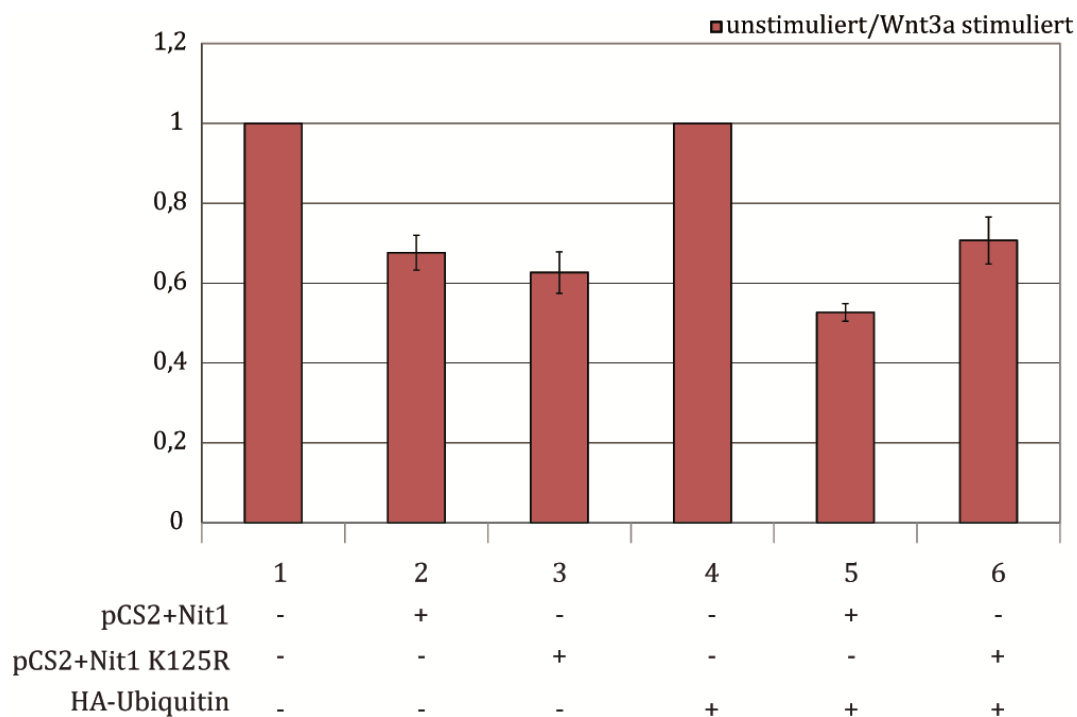


Abb.14: *Repression der relativen Transkriptionsaktivität durch Nit1 mit Einfluss von Ubiquitin*

Für dieses Experiment wurden 2×10^5 HEK-293-Zellen ausgesät und nach 24 h pro Ansatz mit $1 \mu\text{g}$ Topflash, $0,1 \mu\text{g}$ pHRL-Null, $2 \mu\text{g}$ Nit1-wt bzw. -K125R und $1 \mu\text{g}$ HA-Ubiquitin transfiziert. Weitere 8 h später erfolgte die Stimulation der Ansätze mit Wnt3a-konditioniertem Medium. Dieses verblieb für 16 h auf den Zellen, bevor diese lysiert wurden. Die Luziferase-Einheiten der Firefly-Aktivität wurden gegen die Renilla-Aktivität normalisiert und die erhaltenen Quotienten relativ zu Ansatz 1 bzw. 4, die neben den Reporterkonstrukten nur Leervektoren bzw. Ubiquitin enthalten, normiert. Die Werte aus 4 unabhängigen Experimenten sind repräsentativ dargestellt.

5.6.2 Der Einfluss von oxidativem Stress

Oxidativer Stress kann zur Veränderung der Ubiquitinierung von Proteinen führen (Silva et al., 2015). Einige Proteine werden verstärkt ubiquitiniert und proteasomal abgebaut. Bei anderen Proteinen wird die Ubiquitinierung meist über inhibierende Phosphorylierung der spezifischen Ubiquitin-E3-Ligase gehemmt. Dadurch wird die Translokation des modifizierten Proteins in den Kern und Aktivierung der Transkription ermöglicht. Letzteres wurde zum Beispiel für die Transkriptionsfaktoren p53 und Nrf2 nachgewiesen (Marinho et al., 2014).

In einem nächsten Experiment sollte der Einfluss von durch Wasserstoffperoxid-Behandlung hervorgerufenem oxidativen Stress auf die Ubiquitinierung von Nit1 untersucht werden. Hierfür wurden je 3 µg pCMV4-FLAG-Nit1 und 4 µg pcDNA3-HA-Ubiquitin in HEK-293 Zellen transfiziert, nach 45 h für 3 h bzw. nach 47 h für 1 h mit je 10 mM H₂O₂ stimuliert und dann lysiert. Bei der Kontrollgruppe erfolgte lediglich ein Mediumwechsel. Nach Co-IP mit anti-FLAG M2-Antikörper und der Auftrennung der Proben in der SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese konnte im Western Blot ein schwächeres Signal für das über 3 h behandelte Nit1-Ubi-Konjugat detektiert werden (Abb. 15). Nach einer Stunde war dagegen kein Effekt gegenüber der unbehandelten Kontrollgruppe (0 h) sichtbar. Die Lysatkontrollen zeigten vergleichbare Expressionen von FLAG-Nit1 und HA-Ubiquitin.

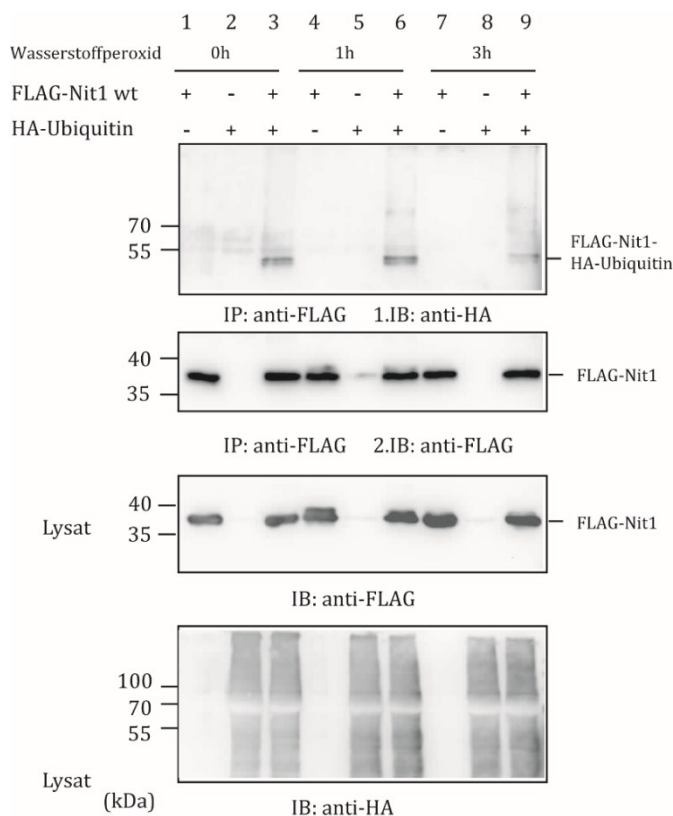


Abb. 15A: Beeinflussung der Nit1-Ubiquitinierung durch Wasserstoffperoxid

Nach der Transfektion der HEK-293-Zellen mit FLAG-Nit1 und HA-Ubiquitin allein oder in Kombination erfolgte eine 1- oder 3- stündige Behandlung mit 10 mM Wasserstoffperoxid vor der Lyse der Zellen. Nach Co-IP und Western Blot zeigte sich eine Abnahme der Bandenintensität für das Nit1-Ubiquitin-Konjugat bei 3 h H₂O₂-Behandlung. In den beiden unteren Blots sind die Lysatkontrollen gezeigt. Dieses Ergebnis konnte in insgesamt 3 unabhängig voneinander durchgeführten Co-IPs nachgewiesen werden.

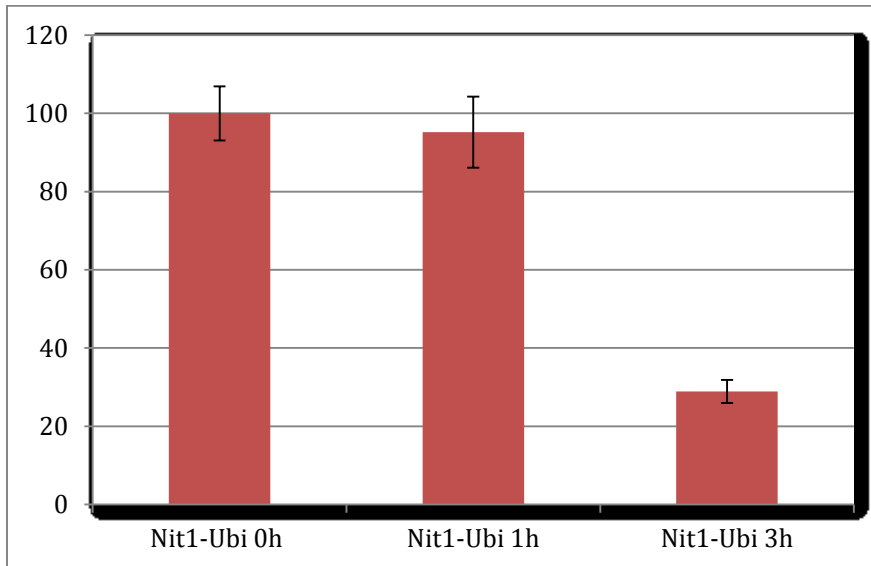


Abb.15B: Quantifizierung der Co-IP Nit1-Ubi +/- H₂O₂

Zur Quantifizierung der Signale in den Western Blots wurde das Software-Programm ImageJ verwendet. Die Werte der Co-IP-Signale wurden gegen die des jeweiligen Kontrollblots normalisiert und die erhaltenen Quotienten anschließend auf unstimuliertes FLAG-Nit1-Ubi bezogen. Die Werte aus drei unabhängig voneinander dargestellten Experimenten sind repräsentativ dargestellt.

5.7 Subzelluläre Lokalisation von Nit1-Ubi Konjugaten

5.7.1 Einfluss von Wasserstoffperoxid auf die Nit1-Lokalisation

Die abnehmende Signalstärke des Nit1-Ubi-Konjugates unter Einfluss von Wasserstoffperoxid (siehe 5.6.2), bei dem hauptsächlich der cytoplasmatische Teil untersucht wurde, wirft die Frage auf, ob auch Nit1 wie andere Proteine durch oxidativen Stress eine verstärkte nukleäre Akkumulation zeigt. Um dieser Frage nachzugehen, wurden HEK-293-Zellen mit je 1 µg pCMV4-FLAG-Nit1-wt bzw. 1 µg pCMV4-FLAG-Nit1-K125R transfiziert und 3 h vor Lyse mit 10 mM Wasserstoffperoxid behandelt. Das Medium der Kontrollgruppe (0 h) wurde dabei ohne Zugabe von Stimulanzen erneuert. Nach der Zelllyse erfolgte die Auftrennung der Lysate in die Cyto- bzw. Kernfraktion nach dem Protokoll von Gonzalez-Mariscal (siehe 4.3.5). Anschließend wurden die Proben mittels SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese aufgetrennt und über Western Blot analysiert. Dabei ist in den Kernfraktionen eine Shiftbande bei ca. 40 kDa auffällig, die durch die H₂O₂-Stimulation von Nit1-wt verstärkt wird. Das Signal im Falle der K125R-Mutante ist dagegen geringer (Abb.16). Die molekulare Masse der beobachteten Shift-Bande deutet weniger auf einen Ubiquitinierungs-abhängigen Molekulargewichtsshift, sondern eher auf ein Phosphorylierungsereignis hin. Zudem ist für FLAG-Nit1-wt unter oxidativem Stress ein typischer Ubiquitin-Schmier in der Kernfraktion sichtbar. Insgesamt konnte eine Verstärkung des FLAG-Nit1-wt Signals im Kern durch H₂O₂-Stimulation verzeichnet werden.

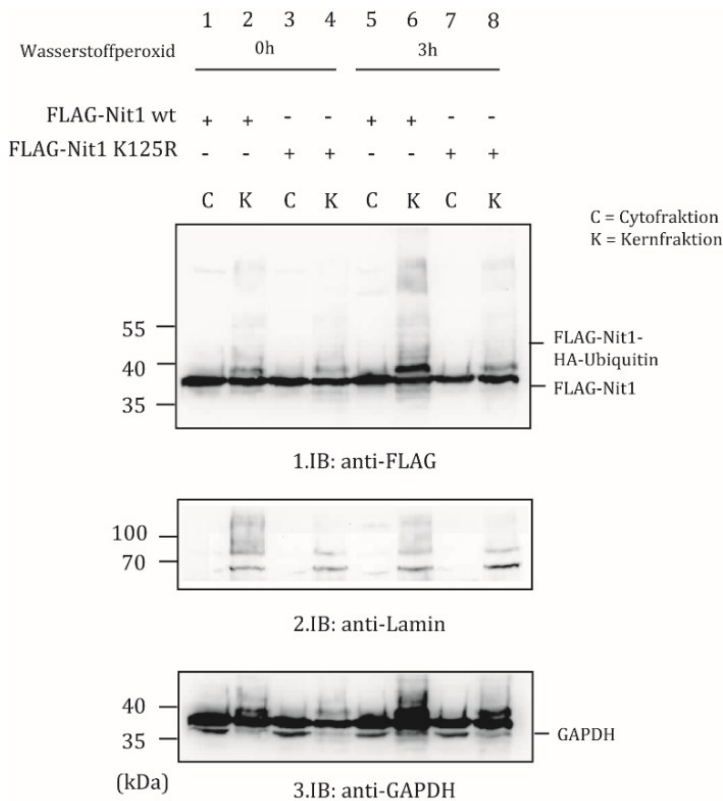


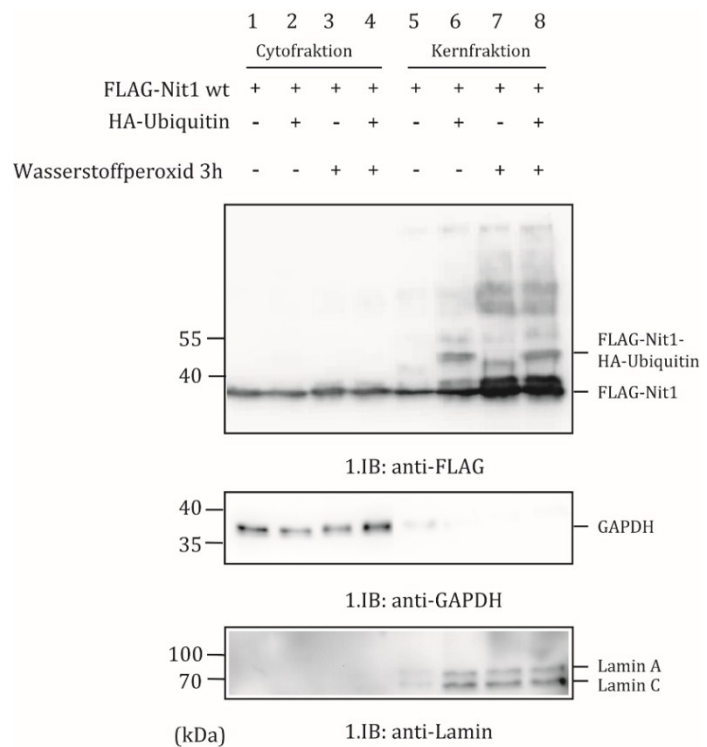
Abb. 16: Kern/Cyto-Fraktionierung von Nit1 unter Einfluss von H₂O₂

Die transfizierten HEK-293-Zellen wurden nach 48 h in einer Cyto/Kernfraktionierung analysiert. Nach SDS-PAGE und Western Blot konnte eine niedermolekulare Shift-Bande in der Kernfraktion detektiert werden, die bei H₂O₂-Behandlung die stärkste Intensität aufwies (Spur 7). Der Blot wurde anschließend mit anti-Lamin- bzw. anti-GAPDH-Antikörper detektiert, um eine vergleichbare Proteinmenge innerhalb der Proben bzw. eine vollständige Auftrennung der Fraktionen nachzuweisen. Dieses Experiment wurde dreimal unabhängig voneinander wiederholt und zeigte dabei vergleichbare Ergebnisse.

5.7.2 Lokalisation von Nit1-Ubi unter Einfluss von Wasserstoffperoxid

Mit dem folgenden Experiment sollte zum einen untersucht werden, ob die Co-Expression von Ubiquitin Einfluss auf die Nit1-Lokalisation hat und zum anderen, ob die durch H₂O₂-Behandlung beobachtete Shiftbande beeinflusst wird. Auch hier wurden HEK-293-Zellen mit je 1 µg pCMV4-FLAG-Nit1 und 1 µg pcDNA3-HA-Ubiquitin transfiziert. Die Inkubation mit 10 mM Wasserstoffperoxid erfolgte 3 h vor Lyse, wobei im Falle der Kontrollansätze nur ein Mediumwechsel vorgenommen wurde. Zur Zellyse wurde eine Kern- und Cytoplasmafraktionierung durchgeführt. Es folgten SDS-PAGE und Western Blot. Bei Co-Expression von HA-Ubiquitin war im anti-FLAG M2-Blot eine zusätzliche Bande bei rund 50 kDa in der Kernfraktion zu detektieren (Abb. 17, Spur 6). Die Behandlung der Zellen mit H₂O₂ führte wie zuvor beobachtet zu einer zusätzlichen niedermolekularen Bande und einem höhermolekularen Schmier (Abb. 17, Spur 7). Auch hier nimmt die Bandenintensität für FLAG-Nit1 in der Kernfraktion durch oxidativen Stress zu. Bei Co-Expression von FLAG-Nit1 mit HA-Ubiquitin und Behandlung mit H₂O₂ war keine Veränderung der zuvor beobachteten Banden zu detektieren (Abb. 17, Spur 8).

Abb. 17: Kern/Cyto-Fraktionierung von Nit1-Ubi unter Einfluss von H₂O₂ HEK-293-Zellen wurden mit FLAG-Nit1 allein oder in Kombination mit HA-Ubiquitin transfiziert und/oder mit H₂O₂ behandelt. In der Kernfraktion sind sowohl bei Co-Expression von HA-Ubiquitin, als auch für Behandlung mit Wasserstoffperoxid zusätzliche Banden detektierbar, die aber bei gleichzeitiger Anwendung unverändert bleiben. Die Detektion der weiteren Blots mit anti-GAPDH- und anti-Lamin-Antikörpern bestätigt die erfolgreiche Kern/Cytoplasmafraktionierung. Dieses Ergebnis konnte zweimal reproduziert werden.



5.8 Proteasomaler Abbau

5.8.1 Untersuchung des Einflusses von MG132

Viele Proteine werden durch Ubiquitinierung für den proteasomalen Abbau markiert (Haglund und Dikic, 2005). Auch wenn es dazu einer Polyubiquitinierung bedarf, die in den vorangegangenen Experimenten nicht beobachtet werden konnte, sollte überprüft werden, ob Nit1 durch Ubiquitinierung abgebaut werden kann. Dazu wurde der Proteasomen-Inhibitor MG132 eingesetzt. Um das Zeitfenster für eine Stimulation mit MG132 zu ermitteln, wurden HEK-293-Zellen ausgesät, mit je 1,5 µg pCMV4-FLAG-Nit1 und 2 µg pcDNA3-HA-Ubiquitin transfiziert und 6, 3 bzw. 1,5 h vor Zellyse mit MG132 behandelt. Nachdem die Proteine durch SDS-PAGE aufgetrennt wurden, erfolgte ihre Analyse mittels Western Blot. Für β-Catenin ist bekannt, dass es durch Ubiquitin proteasomal abgebaut wird. Hier zeigte sich bei ca. 6 h eine Stabilisation des Proteins durch MG132. Für Nit1 zeigte sich bei 1,5 h MG132 ein Unterschied in der Signalstärke (Abb.18).

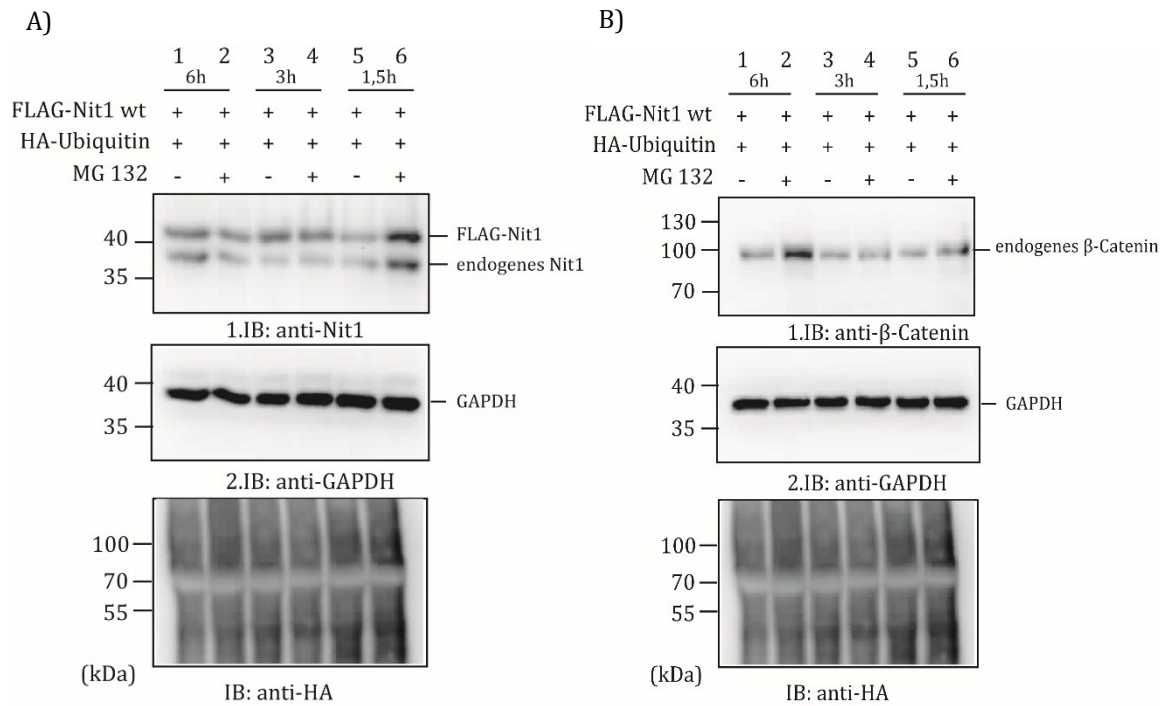


Abb. 18: Behandlung von HEK-293-Zellen mit MG132

In HEK-293-Zellen wurde FLAG-Nit1 überexprimiert und für 1,5 h, 3 h oder 6 h vor der Zellyse mit 25 μ M MG132 behandelt. Anschließend erfolgte die SDS-PAGE und Western Blot mit anti-Nit1- (A) und anti- β -Catenin-Antikörper (B) untersucht. Dabei zeigte sich für Nit1 eine Verstärkung der Bandenintensität mit MG132 bei 1,5 h und für β -Catenin bei 6 h.

Vergleichbare Ergebnisse konnten in drei unabhängig voneinander durchgeführten Experimenten erzielt werden.

5.8.2 Untersuchung des Einflusses von MG132 auf Nit1-Ubi Konjugate

Nachfolgend sollte der Einfluss von MG132 auf das Nit1-Ubi-Konjugat in Co-IPs untersucht werden. Vor der Lyse der transfizierten HEK-293-Zellen erfolgte eine 1,5-stündige Behandlung mit MG132. Die in einer Co-IP mit anti-FLAG M2-Antikörper präzipitierten Proteinkomplexe wurden über SDS-PAGE und Western Blot untersucht. Die Behandlung mit MG132 führte nicht zur Veränderung der Bandenintensität der FLAG-Nit1-Ubiquitin Bande (Abb.19).

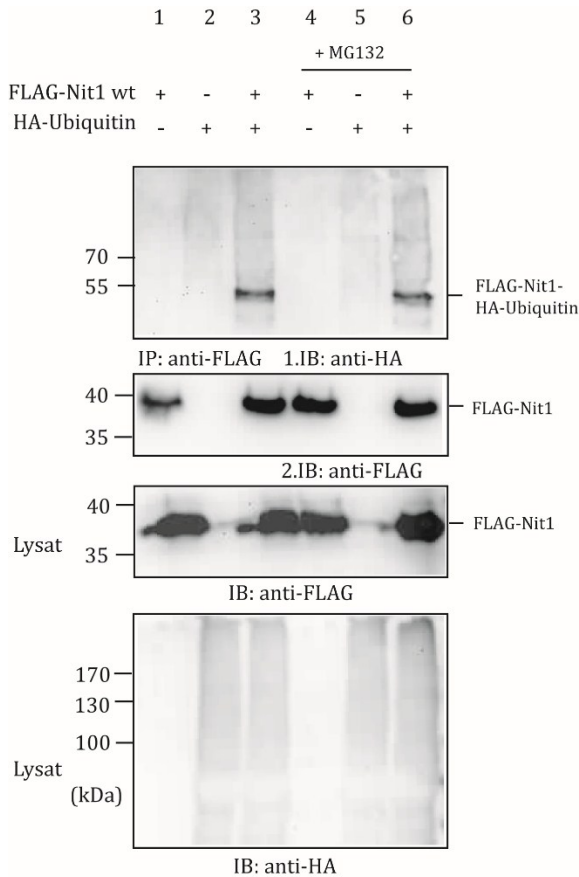


Abb.19: *Effekt von MG132 auf Nit1-Ubi Konjugate*

HEK-293-Zellen wurden mit pCMV4-FLAG-Nit1 und pcDNA3-HA-Ubiquitin allein oder in Kombination transfiziert und 1,5 h vor der Lyse mit 25 μ M MG132 behandelt. Die Kontrollgruppe wurde mit DMSO behandelt. Anschließend wurde eine Co-IP mit anti-FLAG M2-Antikörper durchgeführt. Der Western Blot der Co-IP zeigte deutliche Signale für FLAG-Nit1-Ubi Konjugate. Allerdings war keine Veränderung der Bandenintensität durch MG132 Behandlung zu verzeichnen. Die Lysatkontrollen zeigten eine vergleichbare Expression von FLAG-Nit1 und HA-Ubiquitin. Diese Co-IP wurde einmal wiederholt und wies dabei ein vergleichbares Ergebnis auf.

5.9 Nachweis der spezifischen Ubiquitin- E3- Ligase für humane Nit1

In der Publikation "Itch: a HECT-type E3-ligase regulating immunity, skin and cancer" (Melino, 2008) wird Itch als spezifische Ubiquitin-Ligase von Substraten beschrieben, die mit der Regulation von Apoptose und malignen Prozessen in Verbindung gebracht werden. Auf Grundlage dessen sollte nun überprüft werden, ob Itch auch eine spezifische Ubiquitin-Ligase von humaner Nit1 darstellt.

5.9.1 Interaktion von Nit1 und der Ubiquitin-E3-Ligase Itch

Zur Kontrolle einer möglichen Komplexbildung wurde Nit1 allein oder zusammen mit FLAG-Itch in HEK-293-Zellen überexprimiert. Die Zellen wurden über eine Kern/Cyto-Fraktionierung lysiert und mit der Kernfraktion anschließend eine Co-IP mit anti-FLAG M2-Antikörper durchgeführt. Die Ausbildung eines FLAG-Itch-Nit1-Komplex konnte durch eine Detektion mit anti-Nit1-Antikörper im Western Blot sichtbar gemacht werden. Das bedeutet, dass die Ubiquitin-E3-Ligase Itch eine spezifische Ligase für Nit1 darstellen könnte (Abb.20). Darüber hinaus wurde in der Cyto-Fraktion in Spur 2 eine unspezifische Bande deutlich, die vermutlich dem niedrigen Salzgehalt des Lysepuffers geschuldet ist. Nach Veränderung der Pufferbedingungen tritt diese Bande nicht erneut auf (persönliche Mitteilung von Dr. Sonnhild Mittag).

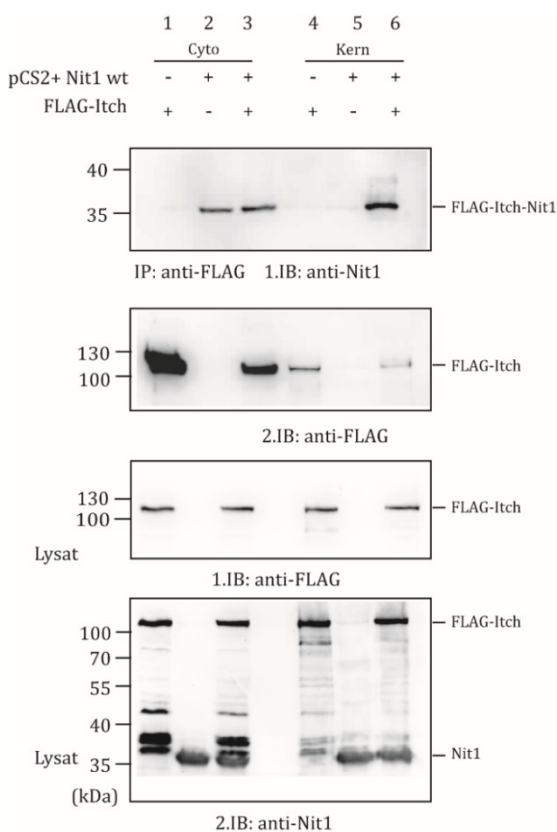


Abb. 20: Interaktion von Nit1 und FLAG-Itch
HEK-293-Zellen wurden mit je 2 µg pCS2+-Nit1 allein oder in Kombination mit pCMV10-FLAG-Itch transfiziert und nach 48 h eine Kern/Cyto-Fraktionierung mit anschließender Co-Immünpräzipitation mittels anti-FLAG M2-Antikörper durchgeführt. Die Co-IP wurde über SDS-PAGE und Western Blot mit anti-Nit1 und anti-FLAG M2-Antikörper analysiert. Es konnte dabei nachgewiesen werden, dass Nit1 mit FLAG-Itch co-präzipitiert wurde. Abschließend zeigten die mit anti-FLAG M2- und anti-Nit1-Antikörper detektierten Lysatkontrollen (Lysat) eine erfolgreiche und vergleichbare Transfektion. Eine Reproduktion dieses Ergebnisses erfolgte zweimal in unabhängig voneinander durchgeführten Experimenten.

5.9.2 Itch verstärkt die Ubiquitinierung von Nit1

Da im vorherigen Versuch gezeigt werden konnte, dass Nit1 mit Itch interagieren kann, sollte nun untersucht werden, ob Itch die Ubiquitinierung von Nit1 verstärken kann. HEK-293-Zellen wurden mit pCMV4-FLAG-Nit1-wt, pCMV10-FLAG-Itch und pcDNA3-HA-Ubiquitin transfiziert und die Lysate nach Kern/Cyto-Fraktionierung und SDS-PAGE mittels anti-FLAG M2-Antikörper im Western Blot analysiert. Es zeigte sich eine deutliche Verstärkung der Bande des Nit1-Ubi-Konjugates bei Co-Expression von FLAG-Itch (Abb.21). Dies ist ein weiterer Beweis dafür, dass Nit1 ein Substrat der E3-Ubiquitin-Ligase Itch darstellt.

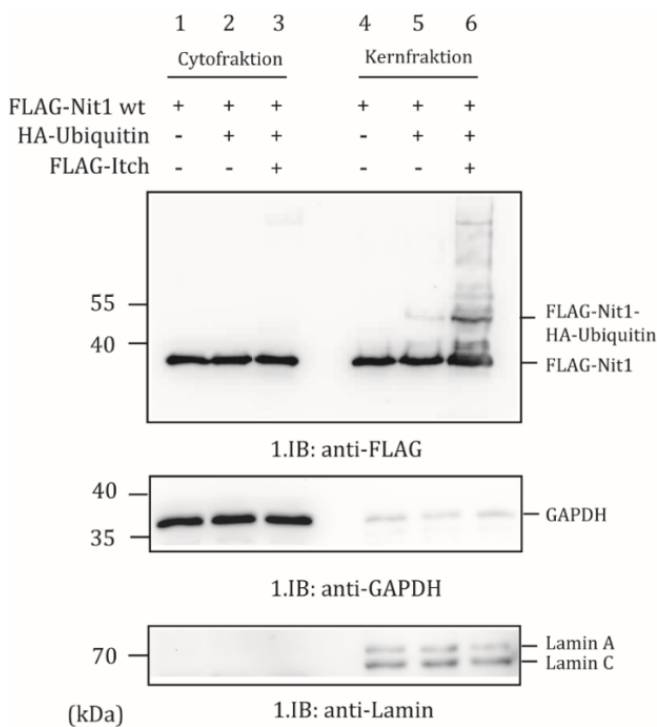


Abb. 21: Einfluss von Itch auf die Nit1-Ubiquitinierung

HEK-293-Zellen wurden mit 2 µg pCMV4-FLAG-Nit1-wt, 2 µg pCMV10-FLAG-Itch und 2 µg pcDNA3-HA-Ubiquitin wie im Transfektionsschema gezeigt transfiziert. Nach 48 h wurden eine Kern/Cytoplasma-Fraktionierung durchgeführt und die Lysate über SDS-PAGE und Western Blot überprüft. Die in der Kernfraktion detektierte Nit1 Ubiquitinierung wird durch Co-Expression von Itch verstärkt.

Eine Detektion mit anti-GAPDH- und anti-Lamin-Antikörpern weist auf vergleichbare Proteinmengen in den Cytoplasma- und Kernfraktion hin. Das Ergebnis ist repräsentativ für drei unabhängig voneinander durchgeführte Experimente.

5.10 Lokalisierung von Nit1-Ubiquitin unter Einfluss von Importazol

In einem weiteren Experiment wurden HeLa-Zellen mit hNit1, HA-Ubiquitin und FLAG-Itch transfiziert. Nach 22h erfolgte die Stimulation der Ansätze mit 40 μ M Importazol (IPZ), eine Substanz, die den Importin- β -abhängigen Kernimport blockiert (Soderholm et al., 2011). Der zweistündigen Behandlung mit IPZ schlossen sich die Lyse der Zellen, das Auftrennen der Proben in SDS-PAGE und Western Blot an. Bei der Detektion war auffällig, dass es unter Einfluss des Kernimportinhibitors trotz Anwesenheit von Ubiquitin zu keiner Verstärkung der Nit1-Bande im Kern kommt, die bei der unstimulierten Kontrollgruppe allerdings deutlich sichtbar ist.

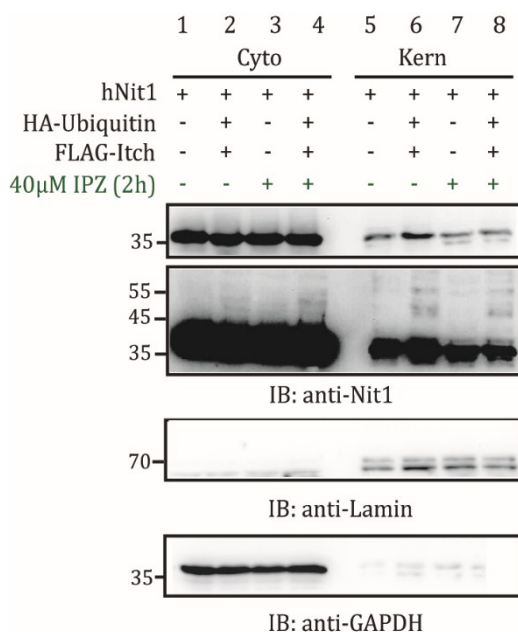


Abb.22: Lokalisierung von Nit1-Ubi unter Einfluss von Importazol

HeLa-Zellen wurden transfiziert und mit Importazol (IPZ) behandelt. Anschließend erfolgte eine Kern/Cytoplasma-Fraktionierung und Analyse über SDS-PAGE und Western Blot. Die Detektion mit anti-Nit1-Antikörper macht deutlich, dass es innerhalb der Kernfraktion zu einer Verstärkung der Nit1-Bande kommt, sobald Ubiquitin und Itch anwesend sind. Diese Zunahme ist unter Einfluss von Importazol nicht erkennbar. Die übrigen Blots wurden mit anti-Lamin bzw. anti-GAPDH entwickelt und zeigen vergleichbare Proteinmengen bzw. eine vollständige Auftrennung der Fraktionen. Dieses Experiment stellt einen Vorversuch dar und muss reproduziert werden.

6. Diskussion

In der vorliegenden Arbeit konnte erstmalig eine Ubiquitinierung des Tumorsuppressors humane Nitrilase1 (Nit1) nachgewiesen werden. Zwei potentielle Akzeptor-Lysin-Reste in Nit1 wurden mutiert und eines der Lysine (K125) konnte als Ubiquitinierungsstelle identifiziert werden. Weitere Lysine in Nit1 sind darüber hinaus zu analysieren. Ubiquitinierungen können das Zielprotein in seiner Lokalisation und Funktion beeinflussen oder zum proteasomalen Abbau führen. Die Frage nach der Rolle der Ubiquitinierung für Nit1 in Hinsicht auf Funktion, proteasomalen Abbau und Translokation wurde untersucht und soll im Folgenden diskutiert werden.

6.1 Beeinflussung des Wnt-Signalweges durch Ubiquitinierung von Nit1

Basierend auf Arbeiten der eigenen Arbeitsgruppe, wonach humane Nit1 mit β -Catenin und auch TCF/LEF interagieren kann und als Repressor des Wnt-Signalweges fungiert (Mittag et al., 2016), wurde in der vorliegenden Arbeit untersucht, ob sich die Nit1-Ubiquitinierung durch Wnt-Aktivierung verändert oder die Interaktion von Nit1 zu FLAG-TCF-4 durch Ubiquitin Co-Expression und Wnt-Aktivierung beeinflusst wird.

In der Abb. 13 dargestellten Co-IP führte eine Behandlung mit Wnt3a zur Abschwächung des Signals für das Nit1-Ubiquitin-Konjugat. Bei der Interpretation des Ergebnisses muss jedoch beachtet werden, dass dieses Experiment nur zweimal durchgeführt wurde und reproduziert werden muss. Zudem wurde nur die Ubiquitinierung der cytoplasmatisch lokalisierten Nit1 untersucht. Die Abnahme der Nit1-Ubiquitinierung nach Wnt3a-Stimulation könnte auf eine Deubiquitinierung oder verringerten Aktivität einer für Nit1 spezifischen Ubiquitin-E3-Ligase in der cytoplasmatischen Fraktion hindeuten, aber auch aus einer Kerntranslokation von Nit1 resultieren. Für den im Wnt-Signalweg wichtigen Co-Repressor Groucho/TLE konnte gezeigt werden, dass dessen Mono-Ubiquitinierung durch die Ubiquitin-E3-Ligase XIAP nach Wnt-Aktivierung in einer verringerten Affinität zu TCF/LEF resultiert (Hanson et al., 2012). Dabei wurde zwar keine Wnt-abhängige Verstärkung der Groucho/TLE-Ubiquitinierung gezeigt, aber eine verstärkte Interaktion von TLE3 mit der Ubiquitin-E3-Ligase XIAP nach Wnt-Aktivierung nachgewiesen (Hanson et al., 2012). Da im späteren Verlauf der hier vorgelegten Arbeit festgestellt wurde, dass der Großteil ubiquitiniertes Nit1 im Kern lokalisiert ist, sollten in Zukunft weitere Untersuchungen zur Wnt-Abhängigkeit in Hinblick auf die nukleäre Lokalisierung von Nit1 vorgenommen werden.

Es könnte analysiert werden, ob die Nit1-Ubiquitinierung im Kern durch Wnt3a-Stimulation verstärkt wird und die Interaktion mit Itch oder einer anderen Ubiquitin-E3-Ligase durch Wnt-Aktivierung beeinflusst wird. Zudem sollte überprüft werden, ob Nit1 nach Wnt-Aktivierung durch Ubiquitin markiert, proteasomal abgebaut wird und deshalb weniger Nit1-Ubi-Konjugat detektiert wurde.

In einem Vorversuch wurde der Einfluss von Ubiquitin auf die Nit1/TCF-4-Interaktion mit und ohne Wnt3a-Stimulation untersucht. Allerdings wurde dieses Ergebnis nur einmal erhalten und muss reproduziert werden. In dem vorliegenden Experiment zeigte sich sowohl ohne als auch mit Wnt-Aktivierung eine Abnahme der Nit1/TCF-4-Interaktion durch Ubiquitin-Co-Expression. Um nachzuweisen, dass die Verringerung der Interaktion auf der Ubiquitinierung von Nit1 beruht, müsste die Ubiquitinierungs-Mutante Nit1-K125R parallel betrachtet werden. Eine Verringerung der Interaktion von Nit1 mit TCF-4 durch Ubiquitinierung würde mit den Beobachtungen von Hanson et al. für Groucho/TLE korrelieren. Allerdings war keine weitere Verringerung der Interaktion durch Wnt-Aktivierung zu sehen.

In den Reporteranalysen zeigte sich, dass Nit1 bei Co-Expression von Ubiquitin die Transkriptionsaktivität stärker reprimiert als ohne Überexpression von Ubiquitin. Dies könnte aus einer in den Kern/Cytoplasma-Fraktionierungen beobachteten verstärkten Kerntranslokation resultieren. Die Nit1-K125R Mutante führte hingegen bei Co-Expression von Ubiquitin zu einer im Vergleich zu Nit1-wt signifikant geringeren Repression der Transkriptionsaktivität. Somit konnte ein Einfluss der Ubiquitinierung auf die Funktion von Nit1 als Repressor im Wnt-Signalweg beobachtet werden, der allerdings noch intensiver untersucht werden muss.

6.2 Translokation oder proteasomaler Abbau von Nit1-Ubiquitin durch oxidativen Stress

Die zelluläre Konzentration verschiedener Proteine wird neben der transkriptionellen Ebene auch über proteasomalen Abbau geregelt. So wird z.B. auch der Tumorsuppressor p53 über die Ubiquitin-E3-Ligase MDM2 ubiquitiniert und proteasomal abgebaut (Shmueli und Oren, 2004). Auch β -Catenin wird ohne Wnt-Aktivierung durch Ubiquitin markiert und proteasomal abgebaut. In der vorliegenden Arbeit wurde analysiert, ob Nit1 durch Co-Expression von Ubiquitin proteasomal abgebaut wird. Durch Behandlung mit dem Proteasomeninhibitor MG132 sollte ein möglicher Abbau geblockt und das Protein stärker detektierbar sein. Als Positivkontrolle wurde endogenes β -Catenin detektiert. Eine

Anreicherung für Nit1 durch Behandlung mit MG132 war nach 1,5 Stunden zu beobachten, was auf einen proteasomalen Abbau hinweisen würde. Diese Anreicherung war allerdings nach 3 oder 6 Stunden nicht mehr sichtbar. Dieses Experiment sollte ohne und mit Überexpression von Ubiquitin wiederholt werden.

Yamamoto et al. konnte zeigen, dass p53 durch oxidativen Stress in den Kern transloziert (Yamamoto et al., 2007). Da auch Nit1 als Tumorsuppressor fungiert und wie p53 Apoptose induziert, sollte untersucht werden, ob Nit1 durch oxidativen Stress beeinflusst wird. In der Co-IP von Nit1-Ubiquitin-Konjugaten zeigte sich eine Reduktion des Signals durch Behandlung mit Wasserstoffperoxid (siehe 5.6.2). Einer möglichen Deubiquitinierung von Nit1 steht die potentielle Translokalisierung bzw. der proteasomale Abbau gegenüber.

Für die Untersuchung einer Translokalisierung von Nit1 unter Einfluss von Wasserstoffperoxid wurde gezeigt, dass die Menge an Nit1 im Kern unter einer 3-stündigen H₂O₂-Stimulation zunimmt (siehe 5.7.1 und 5.7.2). Allerdings konnte keine Mengenabnahme von Nit1 im Cytoplasma beobachtet werden wie im Fall von p53 (Yamamoto et al., 2007). In diesem Zusammenhang sollte auch noch untersucht werden, ob die Menge an Nit1 mRNA durch oxidativen Stress beeinflusst wird. Dazu sollten nach Behandlung mit H₂O₂ eine RNA-Isolation mit anschließender cDNA-Synthese und quantitativer RT-PCR durchgeführt werden. Der Keap/Nrf-2-Signalweg steuert die Expression von über 600 Genen, die für cytoprotektive Proteine codieren, wie z.B. Hämoxxygenase1 (Taguchi et al., 2011). Es ist denkbar, dass auch Nit1 hochreguliert wird. Die nach oxidativem Stress beobachtete, zusätzliche Bande für FLAG-Nit1 könnte einer Phosphorylierung entsprechen. Dies müsste über Behandlung mit Phosphatasen jedoch erst verifiziert werden. Für die FLAG-Nit1-K125R Mutante, die zuvor eine verminderte Ubiquitinierung zeigte, konnte durch H₂O₂-Behandlung eine verminderte Modifizierung beobachtet werden. Daher wurde anschließend untersucht, ob die Co-Expression von Ubiquitin einen Einfluss auf die durch oxidativen Stress verursachte Modifizierung hat. Die Behandlung mit Wasserstoffperoxid hatte auf die Ubiquitinierung von FLAG-Nit1 allerdings keinen sichtbaren Einfluss. Bei gleichzeitiger Co-Expression von Ubiquitin und Behandlung mit H₂O₂ waren sowohl die Ubiquitin-Shift-Bande als auch die potentielle Phospho-Shift Bande im Western Blot zu detektieren. In den hierzu durchgeführten Kern/Cytoplasma-Fraktionierungen konnte ein Nit1-Ubiquitin-Konjugat ohne vorherige Co-IP in der Kernfraktion detektiert werden. Das bedeutet, dass der Großteil ubiquitiniertes Nit1 im Kern lokalisiert zu sein scheint. Postulieren könnte man, dass Nit1 im Cytosol ubiquitiniert und dadurch verstärkt in den Kern transportiert wird.

Der Block der Kernimportmaschinerie über Importazol führte zu einer verminderten Menge an Nit1-Ubi im Kern. Dieser Befund würde diese Hypothese stützen, muss aber reproduziert werden. Neben der Kern/Cytoplasma-Fraktionierung könnte auch die Immunfluoreszenzmikroskopie herangezogen werden, um eine Kerntranslokation zu analysieren.

Es ist anzumerken, dass bisher alle Experimente mit überexprimierter Nitrilase durchgeführt wurden. Interessant wäre die Untersuchung der endogenen Nitrilase. Allerdings ist dies deutlich schwieriger, da nach Lyse der Zellen endogene Deubiquitinasen aktiv sind. Zudem finden posttranslationalen Modifikationen meist nicht an allen, sondern oft nur an einem Bruchteil der in der Zelle vorhandenen Proteinmoleküle statt. Daher ist die Detektion von PTMs von überexprimierten Proteinen auf Grund der höheren Proteinmenge und dadurch auch erhöhten Menge an modifiziertem Protein einfacher.

Aufgrund des Postulats von Haglund und Dikic 2005, das besagt, dass die physiologische Wirkungsweise je nach Art der Ubiquitinierung stark variiert, sollte eine Untersuchung auf Mono- bzw. Poly- Ubiquitinierung vorgenommen werden. Dies lässt sich z.B. mit Hilfe einer Massenspektrometrie oder einem gegen K48- oder K63-verknüpfte Ubiquitin-Ketten gerichtete Antikörper realisieren. Die bisher erhaltenen Ergebnisse lassen auf eine Mono- oder Multi-Ubiquitinierung schließen, da nur eine Shift-Bande bei rund 50 kDa beobachtet wurde. Bei einer Poly-Ubiquitinierung müssten mehrere Shift-Banden auftreten. Der Befund, dass Nit1 durch die Ubiquitinierung verstärkt im Kern lokalisiert zu sein scheint, spricht auch für eine Mono-Ubiquitinierung und nicht für eine Poly-Ubiquitinierung, die meist vor dem proteasomalem Abbau erfolgt. Allerdings wurde durch Behandlung mit Wasserstoffperoxid ein typischer Ubiquitinschmier detektierbar, der auf eine Poly-Ubiquitinierung hindeuten könnte.

6.3 Ist Itch – die E3-Ligase von humaner Nit 1?

Itch gehört zur Familie der HECT-Typ Ubiquitin-E3-Ligasen und ist spezifisch für verschiedenste Proteine, die an der Induktion von Apoptose beteiligt sind. Als Beispiele zu nennen sind p63 und p73, die eine funktionale Ähnlichkeit zu p53 aufweisen und daher unter anderem auch die Einleitung von Zellzyklusarrest verantworten (Melino, 2008). In Co-Immunpräzipitationen konnte eine Interaktion von Nit1 mit Itch nachgewiesen werden. In GST (Glutathion-S-Transferase)-Pull-down-Assays mit affinitätschromatographisch aufgereinigten Fusionproteinen könnte zudem untersucht werden, ob diese Interaktion direkt erfolgt. In Kern/Cytoplasma-Fraktionierungen von Zellen, in denen FLAG-Nit1,

Ubiquitin mit Itch co-exprimiert wurden, zeigte sich eine deutliche Verstärkung der Nit1-Ubiquitin Shift-Bande. Die Interaktion zeigt sich dabei im Kern wesentlich deutlicher. Ein Nit1-Itch-Komplex kann allerdings auch in der Cytoplasma-Fraktion beobachtet werden. Abschließend resultiert aus diesen Ergebnissen die starke Vermutung, dass Itch eine spezifische E3-Ligase von humaner Nit1 darstellt. Für p53 wurden bisher zwanzig Ubiquitin-E3-Ligasen beschrieben (Hock und Vousden, 2014). Daher ist auch von der Beteiligung weiterer Ligasen an der Ubiquitinierung von Nit1 auszugehen.

7. Schlussfolgerung

In Summe betrachtet kann festgestellt werden, dass humane Nit1 ubiquitiniert wird, K125 ein Akzeptor-Lysin darstellt und dass die Ubiquitinierung zur verstärkten Kerntranslokation von Nit1 führt. Ein Einfluss der Ubiquitinierung auf die Funktion von Nit1 als Co-Repressor im Wnt-Signalweg ist zu postulieren, muss aber noch weiter untersucht werden. Bisher zeigte sich durch Wnt-Aktivierung eine Abnahme von Nit1-Ubiquitin im Cytosol. Die Kernfraktion wurde jedoch noch nicht analysiert. Ein proteasomaler Abbau kann in diesem Fall nicht ausgeschlossen werden und muss auch noch untersucht werden. Nicht nur eine Ubiquitinierungsstelle, sondern auch eine spezifische Ubiquitin-E3-Ligase konnte in der vorliegenden Arbeit identifiziert werden. Nit1 interagiert mit Itch und die Nit1-Ubiquitinierung wird durch Co-Expression von Itch verstärkt. Abschließend können die Ergebnisse dieser Arbeit als ein Beitrag zur Charakterisierung des Proteins humane Nitrilase 1 gewertet werden. Dabei stand hier die posttranslationale Modifikation der Ubiquitinierung im Vordergrund. Eine genauere Identifizierung der Wirkungsweise von Nit1 trägt zum besseren Verständnis seiner Funktion als Tumorsupressor bei und kann dadurch auch zur Entwicklung von Krebstherapien in Frage kommen.

8. Literaturverzeichnis

- (1) Aberle H, Bauer A, Stappert J, Kispert A, Kemler R. 1997. Beta-catenin is a target for the ubiquitin-proteasome pathway. *EMBO Journal*, 16(13): 3797–3804.
- (2) Altschul SF, Madden TL, Schäffer AA, Zhang J, Zhang Z, Miller W, Lipman DJ. 1997. Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. *Nucleic Acids Research*, 25(17): 3389–3402.
- (3) Barglow KT and Cravatt BF. 2006. Substrate Mimicry in an Activity-Based Probe That Targets the Nitrilase Family of Enzymes. *Angewandte Chemie International Edition*, 45(44): 7408-11.
- (4) Bilic J, Huang YL, Davidson G, Zimmermann T, Cruciat CM, Bienz M, Niehrs C. 2007. Wnt Induces LRP6 Signalosomes and Promotes Dishevelled-Dependent LRP6 Phosphorylation. *Science*, 316 (5831): 1619-1622.
- (5) Davidson G, Wu W, Shen J, Fenger U, Stannek P, Glinka A, Niehrs C. 2005. Casein kinase 1 γ couples Wnt receptor activation to cytoplasmic signal transduction. *Nature*, 438: 867-872.
- (6) Gu B and Zhu WG. 2012. Surf the post-translational modification network of p53 regulation. *International Journal Biological Sciences.*, 8(5): 672–684.
- (7) Haglund K and Dikic I. 2005. The role of ubiquitylation in receptor endocytosis and endosomal sorting. *Journal of Cell Science*, 125: 265–275.
- (8) Hanson AJ, Wallace HA, Freeman TJ, Beauchamp RD, Lee LA, Lee E. 2012. XIAP mono-ubiquitylates Groucho/TLE to promote canonical Wnt signaling. *Molecular Cell.*, 45(5): 619–628.

- (9) Hatakeyama S, Yada M, Matsumoto M, Ishida N, Nakayama KI . 2001. U box proteins as a new family of ubiquitin-protein ligases. *The Journal of Biological Chemistry*, 276, 35: 33111–33120.
- (10) Hershko A and Ciechanover A. 1998. The Ubiquitin System. *Annual Reviews of Biochemistry*, 67: 425–79.
- (11) Hock AK and Vousden KH. 2014. The role of ubiquitin modification in the regulation of p53. *Biochimica et Biophysica Acta – Molecular Cell Research*, 1843 (1): 137-149.
- (12) Hornbeck PV, Zhang B, Murray B, Kornhauser JM, Latham V, Skrzypek E. 2015. PhosphoSitePlus, 2014: mutations, PTMs and recalibrations. *Nucleic Acids Research*, 43: D512-20.
- (13) Islas S, Vega J, Ponce L, Gonzalez-Mariscal L. 2002. Nuclear localization of the tight junction protein ZO-2 in epithelial cells. *Experimental Cell Research*, 274: 138 –148.
- (14) Jaisson S, Veiga-da-Cunha M, Van Schaftingen E. 2009. Molecular identification of ω -amidase, the enzyme that is functionally coupled with glutamine transaminases, as the putative tumor suppressor Nit2. *Biochimie*, 91, 9: 1066–1071.
- (15) Jho EH, Zhang T, Domon C, Joo CK, Freund JN, Costantini F. 2002. Wnt/ β -Catenin/Tcf Signaling Induces the Transcription of Axin2, a Negative Regulator of the Signaling Pathway. *Mol Cell Biol.*, 22 (4): 1172–1183.
- (16) Joazeiro CAP and Weissman AM. 2000. RING Finger Proteins: Minireview Mediators of Ubiquitin Ligase Activity. *Cell*, 102 (5): 549–552.
- (17) Kim W, Bennett EJ, Huttlin EL, Guo A, Li J, Possemato A, Sowa ME, Rad R, Rush J, Comb MJ, Harper JW, Gysi SP. 2011. Systematic and quantitative assessment of the ubiquitin-modified proteome. *Molecular Cell*, 44 (2): 325-40.
- (18) Kimelman D and Xu W. 2006. β -Catenin destruction complex: insights and questions from a structural perspective. *Oncogene*, 25: 7482-7491.

- (19) Krasnikov BF, Nostramo R, Pinto JT, Cooper AJL. 2009. Assay and purification of ω -amidase/Nit2, a ubiquitously expressed putative tumor suppressor, that catalyzes the deamidation of the α -keto acid analogues of glutamine and asparagine. *Analytical Biochemistry*, 391 (2): 144-50.
- (20) Krasnikov BF, Chien CH, Nostramo R, Pinto JT, Nieves E, Callaway M, Sun J, Huebner K, Cooper AJ. 2009. Identification of the putative tumor suppressor Nit2 as omega-amidase, an enzyme metabolically linked to glutamine and asparagine transamination. *Biochimie*, 91(9): 1072–1080.
- (21) Lorick KL, Jensen JP, Fang S, Ong AM, Hatakeyama S, Weissman AM. 1999. RING fingers mediate ubiquitin-conjugating enzyme (E2)-dependent ubiquitination. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA*, 96 (20): 11364–9
- (22) Marinho HS, Real C, Cyrne L, Soares H, Antunes F. 2014. Hydrogen peroxide sensing, signaling and regulation of transcription factors. *Redox Biology*, 2: 535–562.
- (23) McGrath JP, Jentsch S, Varshavsky A. 1991. UBA 1: an essential yeast gene encoding ubiquitinactivating enzyme. *The EMBO Journal*, 10 (1): 227-236.
- (24) Melino G, Gallagher E, Aqeilan RI, Knight R, Peschiaroli A, Rossi M, Scialpi F, Malatesta M, Zocchi L, Browne G, Ciechanover A, Bernassola F. 2008. Itch: a HECT-type E3 ligase regulating immunity, skin and cancer. *Cell Death and Differentiation*, 15 (7): 1103–12.
- (25) Mittag S, Valenta T, Weiske J, Bloch L, Klingel S, Gradl D, Wetzelschaefer F, Chen Y, Petersen I, Basler K, Huber O. 2016. A novel role for the tumour suppressor Nitrilase1 modulating the Wnt/ β -catenin signalling pathway. *Cell Discovery* - in press
- (26) Nusse R and Varmus HE. 1982. Many tumors induced by the mouse mammary tumor virus contain a provirus integrated in the same region of the host genome. *Cell*, 31(1): 99-109.

- (27) Pace HC and Brenner C. 2001. The nitrilase superfamily: classification, structure and function. *Genome Biology*, 2 (1): reviews0001.1–reviews0001.9.
- (28) Pekarsky Y, Campiglio M, Saprashvili Z, Druck T, Sedkov Y, Tillib S, Draganescu A, Wermuth P, Rothman JH, Huebner K, Buchberg AM, Mazo A, Brenner C, Croce CM. 1998. Nitrilase and Fhit homologs are encoded as fusion proteins in *Drosophila melanogaster* and *Caenorhabditis elegans*. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA*, 95 (15): 8744–8749.
- (29) Pelzer Ch, Kassner I, Matentzoglou K, Singh RK, Wollscheid HP, Scheffner M, Schmidtke G, Groettrup M. 2007. UBE1L2, a Novel E1 Enzyme Specific for Ubiquitin. *The Journal of Biological Chemistry*, 282 (32): 23010–23014.
- (30) Pickart CM. 2001. Mechanisms underlying ubiquitination. *Annual Reviews of Biochemistry*, 70: 503–33.
- (31) Radivojac P, Vacic V, Haynes C, Cocklin RR, Mohan A, Heyen JW, Goebel MG, Iakoucheva LM. 2010. Identification, analysis, and prediction of protein ubiquitination sites. *Proteins*, 78 (2): 365–380.
- (32) Semba S, Han SY, Qin HR, McCorkell KA, Iliopoulos D, Pekarsky Y, Druck T, Trapasso F, Croce CM, Huebner K. 2006. Biological Functions of Mammalian Nit1, the Counterpart of the Invertebrate NitFhit Rosetta Stone Protein, a Possible Tumor Suppressor. *The Journal of Biological Chemistry*, 281 (38): 28244–28253.
- (33) Sharma RP and Chopra VL. 1976. Effect of the wingless mutation on wing and haltere development in *Drosophila melanogaster*. *Developmental Biology*, 48: 461–465.
- (34) Shmueli A and Oren M. 2004. Regulation of p53 by Mdm2: Fate is in the Numbers. *Molecular Cell*, 13, 1: 4–5.
- (35) Silva GM, Finley D, Vogel Ch. 2015. K63 polyubiquitination is a new modulator of the oxidative stress response. *Nature Structural & Molecular Biology*, 22: 116–123.

(36) Soderholm JF, Bird SL, Kalab P. 2011. Importazole, a small molecule inhibitor of the transport receptor importin- β . *ACS Chemical Biology*, 6(7): 700–708.

(37) Taguchi K, Motohashi H, Yamamoto M. 2011. Molecular mechanisms of the Keap1–Nrf2 pathway in stress response and cancer evolution. *Genes to Cells*, 16 (2): 123–140.

(38) Tetsu O and McCormick F. 1999. Beta-catenin regulates expression of cyclin D1 in colon carcinoma cells. *Nature*, 398: 422-426.

(39) Wagner SA, Beli P, Weinert BT, Schölz Ch, Kelstrup CD, Young C, Nielsen ML, Olsen JV, Brakebusch C, Choudhary C. 2012. Proteomic analyses reveal divergent ubiquitylation site patterns in murine tissues. *Molecular and Cellular Proteomics*, 11: 1578-85.

(40) Weiske J, Albring KF, Huber O. 2007. The tumor suppressor Fhit acts as a repressor of beta-catenin transcriptional activity. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA*, 104 (51): 20344–20349.

(41) Yamamoto H, Ozaki T, Nakanishi M. 2007. Oxidative stress induces p53-dependent apoptosis in hepatoblastoma cell through its nuclear translocation. *Genes to Cells*, 12, 4: 461–471.

9. Anhang

9.1 Tabellenverzeichnis

Tab.1: Verwendete Primär-Antikörper

Tab.2: Verwendete Sekundär-Antikörper

Tab.3: Verwendete Vektoren

Tab.4: Verwendete Bakterienstämme

Tab.5: Verwendete Oligonukleotide

Tab.6: Zusammensetzung der Komponenten für Calciumphosphat-Transfektion

Tab.7: Zusammensetzung von DNA-Loadingpuffer (6x) und 1xTAE

Tab.8: Zusammensetzung der LB-Medien

Tab.9: Puffer für Mini-Plasmid-Präparation

Tab.10: Ansatz und Programm der gerichteten PCR

Tab.11: Phosphorylierung von Oligonukleotiden

Tab.12: Ansatz und Programm der Mutagenese-PCR

Tab.13: Herstellung von 10% SDS-PAGE-Gelen

Tab.14: Zusammensetzung von SDS-Elektrophorese-Puffer und 2xSDS-Probenpuffer

Tab.15: Zusammensetzung des Semi-Dry-Puffers

Tab.16: Inhaltsstoffe ECL-Lösung

Tab.17: Inhaltsstoffe TST-Puffer

Tab.18: Zusammensetzung Lysis A- und Imidazolpuffer

Tab.19: Zusammensetzung der Substrate A und B für den Reportergenassay

Tab.20: Zusammensetzung des PPBT-Puffers

Tab.21: Zusammensetzung des RIPA-SDS-Puffers und NC-Puffers

Tab.22: Analyse von hNit1 und hp53 in UbPred

9.2 Abbildungsverzeichnis

Abb.1: Aminosäure-Sequenzvergleich von Nit1 und Fhit Proteinen

Abb.2: Der kanonische Wnt-Signalweg

Abb.3: Schema des Reaktionsweges der Ubiquitinierung

Abb.4: Verschiedene Arten der Ubiquitinierung

Abb.5: Aufbau und Verlauf einer SDS-PAGE

Abb.6: Schematischer Aufbau des Semi-Blot Verfahrens

Abb.7: Detektion im Western Blot

Abb.8: Schema des Ablaufs im Reportergenassay

Abb.9: Biolumineszenz-Reaktionen von Substrat A und B

Abb.10: Nachweis einer Ubiquitinierung von Nit1

Abb.11A: Identifizierung von K125 als Ubiquitinierungsstelle in Nit1

Abb.11B: Quantifizierung der Nit1-Ubi-Konjugate

Abb.12A: Kern/Cyto-Fraktionierung von Nit-wt-Ubi und Nit1-K125R

Abb.12B: Quantifizierung Kern/Cyto-Fraktionen von Nit1-Ubi

Abb.13: Beeinflussung der Nit1-Ubiquitinierung durch Wnt3a-Stimulation

Abb.14: Repression der relativen Transkriptionsaktivität durch Nit1 mit Einfluss von Ubiquitin

Abb.15A: Beeinflussung der Nit1-Ubiquitinierung durch Wasserstoffperoxid

Abb.15B: Quantifizierung der Co-IP Nit1-Ubi +/- H₂O₂

Abb.16: Kern/Cyto-Fraktionierung von Nit1 unter Einfluss von H₂O₂

Abb.17: Kern/Cyto-Fraktionierung von Nit1-Ubi unter Einfluss von H₂O₂

Abb.18: Behandlung von HEK-293-Zellen mit MG132

Abb.19: Effekt von MG132 auf Nit1-Ubi Konjugate

Abb.20: Interaktion von Nit1 und FLAG-Itch

Abb.21: Einfluss von Itch auf die Nit1-Ubiquitinierung

Abb.22: Lokalisierung von Nit1-Ubi unter Einfluss von Importazol

9.3 Ehrenwörtliche Erklärung

Hiermit erkläre ich, dass mir die Promotionsordnung der Medizinischen Fakultät der Friedrich-Schiller-Universität bekannt ist,
ich die Dissertation selbst angefertigt habe und alle von mir benutzten Hilfsmittel, persönlichen Mitteilungen und Quellen in meiner Arbeit angegeben sind,
mich folgende Personen bei der Auswahl und Auswertung des Materials sowie bei der Herstellung des Manuskripts unterstützt haben: Prof. Dr. Otmar Huber, Dr. Sonnhild Mittag
die Hilfe eines Promotionsberaters nicht in Anspruch genommen wurde
und dass Dritte weder unmittelbar noch mittelbar geldwerte Leistungen von mir für Arbeiten erhalten haben, die im Zusammenhang mit dem Inhalt der vorgelegten Dissertation stehen,
dass ich die Dissertation noch nicht als Prüfungsarbeit für eine staatliche oder andere wissenschaftliche Prüfung eingereicht habe und
dass ich die gleiche, eine in wesentlichen Teilen ähnliche oder eine andere Abhandlung nicht bei einer anderen Hochschule als Dissertation eingereicht habe.

Ort, Datum

Unterschrift des Verfassers

9.4 Tabellarischer Lebenslauf

Persönliche Daten

Name: Baumann
Vorname: Bettina
Geburtsdatum: 17. Januar 1990
Geburtsort: Würzburg
Familienstand: ledig



Schulbildung

1996-2000 Besuch der Grundschule Kitzingen-Siedlung
2000-2009 Besuch des Armin-Knab-Gymnasiums Kitzingen mit Abschluss des Abiturs

Hochschulbildung

2009-2014 Studium der Zahnmedizin an der Friedrich-Schiller-Universität Jena
2014-2016 Promotion am Institut für Biochemie II der FSU Jena

9.5 Danksagung

An allererster Stelle möchte ich Herrn Prof. Dr. Otmar Huber, Direktor des Instituts für Biochemie II, für die Ermöglichung meiner Forschungsarbeit und seine kontinuierliche Unterstützung danken, die besonders in schwierigen Phasen der Arbeit immer sehr hilfreich und motivierend war.

Außerdem bedanke ich mich bei meiner gesamten Arbeitsgruppe für die äußerst freundschaftliche Atmosphäre und die stetige Hilfestellung.

Besonders hervorheben möchte ich an dieser Stelle meine Betreuerin Frau Dr. Sonnhild Mittag, die mir stets mit Rat und Tat zur Seite stand und auf diese Weise einen sehr großen Beitrag zur Durchführbarkeit meiner Arbeit geleistet hat.

Weiterhin danke ich Herrn Prof. Dr. Dr. Bernd W. Sigusch, der sich freundlicherweise bereit erklärte meine Zweitbetreuung zu übernehmen.

Darüber hinaus wäre eine solche Arbeit ohne die Unterstützung meines privaten Umfeldes nicht möglich gewesen. Daher danke ich meinen Eltern für Ihr großes Vertrauen in mich und meine Arbeit, sowie für Ihre moralische und finanzielle Hilfestellung.

Außerdem möchte ich mich bei meinem Freund Christian bedanken, der stets ein offenes Ohr für mich hatte und mich bei Rückschlägen wieder aufbaute.

Zuletzt vielen Dank an alle Freunde, die meine Vorliebe für Grundlagenforschung stets unterstützten und damit zur Aufrechterhaltung meiner Motivation beitrugen.
