

**Identifizierung und funktionelle Charakterisierung
der SUMOylierung des Tight Junction-Proteins
*Zona occludens-2 (ZO-2)***

Dissertation
zur Erlangung des akademischen Grades

doctor rerum naturalium (Dr. rer. nat)

**vorgelegt dem Rat der Medizinischen Fakultät
der Friedrich-Schiller-Universität Jena**

**von Diplom-Biologin Franziska Wetzel
geboren am 10.02.1984 in Lutherstadt Eisleben**

Gutachter

- 1. Prof. Dr. Otmar Huber, Jena**
- 2. Prof. Dr. Aria Baniahmad, Jena**
- 3. Prof. Dr. Salah Amasheh, Berlin**

Tag der öffentlichen Verteidigung: 02.02.2016

Inhaltsverzeichnis

I. Abkürzungsverzeichnis

II. Zusammenfassung

1 Einleitung	1
1.1 Adherens Junctions und Desmosomen	1
1.2 Gap Junctions	3
1.3 Tight Junctions	3
1.3.1 Funktionen der Tight Junctions	5
1.3.2 Die Tight Junction-Proteine	5
1.3.3 Die <i>Zonula occludens</i> -Proteine	7
1.3.4 Das Tight Junction-Protein ZO-2	8
1.3.4.1 Die Lokalisation von ZO-2	9
1.3.4.2 Das ZO-2-Interaktom	11
1.3.4.3 Funktionen von ZO-2	12
1.3.4.4 ZO-2 und Krankheiten	14
1.4 Posttranslationale Modifikation	15
1.4.1 SUMOylierung als posttranslationale Modifikation	16
1.4.2 Der SUMOylierungszyklus	17
1.4.3 Mechanismen und Bedeutung der SUMOylierung	19
1.4.4 SUMOylierung von Tight Junction-Proteinen	21
1.5 Ziele der Arbeit	22
2 Material	23
2.1 Chemikalien	23
2.2 Verbrauchsmaterialien	25
2.3 Geräte	25
2.4 Molekularbiologische Materialien	27
2.4.1 cDNAs	27
2.4.2 Expressionsvektoren	27
2.4.3 Oligonukleotide	29

2.4.4	<i>Escherichia coli</i> -Stämme	30
2.5	Zellbiologische Materialien	31
2.5.1	Zelllinien	31
2.5.2	Zellkulturmaterialien	31
2.5.3	Transfektionsreagenzien	31
2.6	Proteinbiochemische Materialien	31
2.6.1	Antikörper	31
2.6.2	Enzyme	33
2.6.3	Protein- und DNA-Molekulargewichtsstandards	33
2.7	Reaktionskits	33
3	Methoden	34
3.1	Molekularbiologische Methoden	34
3.1.1	Pwo-PCR	34
3.1.2	Restriktionsverdau von DNA	34
3.1.3	Elektrophoretische Auftrennung von DNA	34
3.1.4	SAP-Behandlung	35
3.1.5	Ligation von DNA-Inserts in Vektoren	35
3.1.6	Transformation von Plasmid-DNA in <i>E. coli</i>	36
3.1.7	Isolierung von Plasmid-DNA aus <i>E. coli</i>	36
3.1.8	Ortsspezifische Mutagenese	37
3.1.9	DNA-Sequenzierung	38
3.2	Zellbiologische Methoden	38
3.2.1	Kultivierung von Zellen	38
3.2.2	Einfrieren und Auftauen von Zellen	38
3.2.3	Transiente Transfektion eukaryontischer Zellen	39
3.2.4	Indirekte Immunfluoreszenz	39
3.2.5	Kern-Cytoplasma-Fraktionierung	40
3.2.6	Kern-Rekrutierungs-Assay	40
3.2.7	Dual-Luciferase-Reportergen-Assay	41
3.2.8	Duolink Assay	42
3.3	Proteinbiochemische Methoden	42
3.3.1	Proteinbestimmung nach Bennett (modifizierte LOWRY-Methode)	42

3.3.2	SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)	43
3.3.3	Western Blot und Immundetektion	43
3.3.4	Coomassie-Färbung von Proteinen in SDS-Polyacrylamidgelen	44
3.3.5	Expression und Aufreinigung rekombinanter Proteine	44
3.3.5.1	Induktion der Proteinexpression	44
3.3.5.2	Affinitätschromatographische Aufreinigung rekombinanter Proteine	45
3.3.5.3	Dialyse von GST-Fusionsproteinen	46
3.3.6	<i>In vitro</i> Assoziationsassay (GST-Pull-down)	46
3.3.7	Co-Immunpräzipitation	46
4	Ergebnisse	48
4.1	SUMO-Konsensus-Motive und potenzielle SUMO-Akzeptor-Lysine im ZO-2-Protein	48
4.2	Interaktion von ZO-2 mit der SUMOylierungsmaschinerie	50
4.2.1	Interaktion von ZO-2 und Sentrin-spezifischen Proteasen	50
4.2.2	Interaktion von ZO-2 und Ubc9	51
4.3	Untersuchung der SUMOylierung von ZO-2	52
4.3.1	<i>In vivo</i> SUMOylierung von ZO-2	52
4.3.1.1	Ubc9 fusion-dependent SUMOylation (UFDS) Assay	52
4.3.1.2	Proximity Ligation Assay (PLA)	57
4.3.2	<i>In vitro</i> SUMOylierung von ZO-2	58
4.4	Identifikation der SUMOylierungsstelle von ZO-2	59
4.4.1	Ubc9 fusion-dependent SUMOylation (UFDS) Assay	59
4.4.2	Proximity Ligation Assay (PLA)	61
4.5	Funktionelle Charakterisierung der SUMOylierung von ZO-2	62
4.5.1	Einfluss der SUMOylierung auf die subzelluläre Lokalisation von ZO-2	63
4.5.1.1	Kern-Cytoplasma-Fraktionierung	64
4.5.1.2	Kern-Rekrutierungs-Assay	65
4.5.2	Modulation des kanonischen Wnt-Signalwegs durch die SUMOylierung von ZO-2	66
4.5.2.1	Einfluss der SUMO-Fusionsproteine auf die β -Catenin/TCF-4-vermittelte Transkriptionsaktivität	67
4.5.2.2	Interaktion des SUMO-Fusionsproteins mit Occludin	68

4.5.2.3	Einfluss der SUMO-defizienten Mutante auf die β -Catenin/TCF-4-vermittelte Transkriptionsaktivität	70
4.5.3	Modulation des kanonischen Wnt-Signalwegs durch die gezielte Akkumulation von ZO-2 im Kern	71
4.5.3.1	Indirekte Immunfluoreszenz-Färbung	71
4.5.3.2	Der Einfluss von ZO-2-NLS auf die β -Catenin/TCF-4-vermittelte Transkriptionsaktivität	72
4.5.3.3	Interaktion von ZO-2 und β -Catenin	73
4.5.3.4	β -Catenin-Unabhängigkeit der durch ZO-2-NLS vermittelten Transkriptionsrepression	75
4.5.3.5	Interaktion von ZO-2 und GSK3 β	76
5	Diskussion	79
5.1	Die SUMOylierung von ZO-2	79
5.2	ZO-2 wird kovalent an Lysin 730 SUMOyliert	82
5.3	Die physiologische Bedeutung der SUMOylierung von ZO-2	83
5.3.1	Die SUMOylierung verändert die subzelluläre Lokalisation von ZO-2	84
5.3.2	Die SUMOylierung von ZO-2 moduliert die β -Catenin/TCF-4-vermittelte Transkriptionsaktivität	86
5.3.3	Die nukleäre Akkumulation von ZO-2 führt zur verstärkten Repression der β -Catenin/TCF-4-vermittelten Transkriptionsaktivität und dieser Effekt ist unabhängig von β -Catenin	87
6	Schlussfolgerung	89
7	Literaturverzeichnis	91
8	Anhang	102
8.1	Abbildungsverzeichnis	102
8.2	Tabellenverzeichnis	103
9	Danksagung	105

I. Abkürzungsverzeichnis

Abb.	Abbildung
Amp	Ampicillin
APC	Adenomatous polyposis coli
APS	Ammoniumpersulfat
AS	Aminosäure
ATP	Adenosin-5`-triphosphat
BSA	bovine serum albumin
DAPI	4',6-Diamidino-2-phenylindol
dH ₂ O	destilliertes Wasser
DMEM	Dulbecco`s Modified Eagle Medium
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoxyribonukleosidtriphosphat
DTT	Dithiothreitol
ECL	enhanced chemiluminescence
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EGFP	enhanced green fluorescent protein
FKS	fetales Kälberserum
GSK3 β	Glycogensynthase-Kinase-3 β
GST	Glutathion-S-Transferase
GuK	Guanylatkinase
h	hours; Stunde
HEK	human embryonic kidney
IB	Immunblot
IF	Immunfluoreszenz
Ig	Immunglobulin
IP	Immunpräzipitation
IPTG	Isopropyl- β -D-thiogalactopyranosid
JAM	Junctional Adhesion Molecule
Kana	Kanamycin
kb	Kilobasen
kDa	Kilodalton
LEF	lymphocyte enhancer factor

M	Molarität (mol/l)
MBP	Maltose-Bindungsprotein
MDCK	Madin-Darby canine kidney
MEM	Minimum Essential Medium
min	Minute
mRNA	messenger RNA
OD	Optische Dichte
ON	Oligonukleotid
ORF	open reading frame
PAA	Polyacrylamid
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PBS	phosphate buffered saline
PCR	polymerase-chain-reaction; Polymerase-Kettenreaktion
PDZ	PSD-95/disc-large/ <i>Zonula occludens-1</i>
PKA	cAMP-dependent protein kinase A
PNK	Polynukleotid Kinase
PVDF	Polyvinylidenfluorid
RNA	Ribonukleinsäure
RT	Raumtemperatur
s	Sekunde
SAP	shrimp alkaline phosphatase
SDS	Sodium dodecyl sulfate; Natriumdodecylsulfat
SH3	Src-homology-3
t	time; Zeit
TCF	T-cell factor
TEMED	Tetramethylethylendiamin
TEER	Transepithelial electrical resistance
TJ	Tight Junction
Tris	Tris (hydroxymethyl)-aminomethan
U	units; Einheiten
WB	Western Blot
ZO	<i>Zonula occludens</i>
(v/v)	Volumenanteil im Verhältnis zum Volumen
(w/v)	Gewichtsanteil im Verhältnis zum Volumen

II. Zusammenfassung

Die Aufrechterhaltung und Integrität von Tight Junctions (TJs) in Endothelien und Epithelien ist von zentraler Bedeutung. TJs regulieren den parazellulären Transport von Ionen und Molekülen, tragen zur Aufrechterhaltung der Zellpolarität bei und sind, neben der rein physikalischen Barriere- und Zaunfunktion, an einer Vielzahl von Signalwegen beteiligt. Zu den Adapter-Proteinen der TJs zählt das *Zona occludens-2*-Protein (ZO-2), welches als Gerüstprotein die integralen Tight Junction-Proteine mit dem Aktin-Cytoskelett verbindet und dort zur Ausbildung des cytoplasmatischen Plaques beiträgt. ZO-2 ist ein dual-lokalisiertes Nacos (nuclear and adhesion complexes)-Protein, das in konfluenten Zellen an der Plasmamembran und in dünn ausgesäten Zellen vorrangig im Kern zu finden ist. Das intrazelluläre Pendeln von ZO-2 wird durch mehrere konservierte Kernimport- und Kernexport-Signale sowie posttranslationalen Modifikationen u.a. innerhalb dieser Motive reguliert. Im Rahmen dieser Arbeit wurden im humanen ZO-2 mehrere evolutionär hochkonservierte potenzielle SUMOylierungsstellen identifiziert. Da die SUMOylierung von Proteinen häufig mit der Veränderung der subzellulären Lokalisation einhergeht, war es Ziel dieser Arbeit, die SUMOylierung von ZO-2 und die daraus resultierende funktionelle Konsequenz zu analysieren.

Zunächst konnte die Interaktion von ZO-2 mit Teilen der SUMOylierungsmaschinerie, speziell der SUMO-spezifischen Protease SENP1 und dem einzig bekannten SUMO-konjugierenden Enzym Ubc9 gezeigt werden. Die SUMOylierung von ZO-2 wurde endogen sowie mit überexprimierten Proteinen *in vivo* nachgewiesen und konnte ebenfalls mit rekombinantem Protein *in vitro* bestätigt werden. Mit Hilfe von Mutationsanalysen wurde Lysin 730 als mögliche SUMO-Akzeptorstelle identifiziert. Zur Untersuchung der physiologischen Bedeutung der SUMOylierung von ZO-2 wurde eine durch SUMO-Fusion konstitutiv SUMOylierte ZO-2-Variante (SUMO-ZO-2) und eine SUMOylierungs-defiziente ZO-2-Mutante (ZO-2-K730R) genutzt. Mittels Kern-Cytoplasma-Fraktionierungen und Kern-Rekrutierungs-Assays wurde analysiert, inwieweit sich die SUMOylierung auf die subzelluläre Lokalisation von ZO-2 auswirkt. Dabei wurde gezeigt, dass das SUMO-ZO-2-Fusionsprotein vermehrt im Cytoplasma lokalisiert ist. Die SUMOylierungs-defiziente ZO-2-K730R-Mutante weist im Kern-Rekrutierungs-Assay und in der Kern-Cytoplasma-Fraktionierung ein etwas unterschiedliches Verhalten auf. Im Kern-Rekrutierungs-Assay zeigte sich eine vorrangig nukleäre Lokalisation, wohingegen in der Kern-Cytoplasma-Fraktionierung kein

Unterschied im Vergleich zum wildtypischen ZO-2 zu beobachten war. In früheren Studien war gezeigt worden, dass die Überexpression von ZO-2 zur Repression der β -Catenin/TCF-4-vermittelten Transkriptionsaktivität führt. Durch Reporteranalysen wurde untersucht, ob die veränderte subzelluläre Lokalisation einen Einfluss auf die β -Catenin/TCF-4-vermittelte Transkriptionsaktivität hat. Dabei zeigte sich, dass das SUMO-ZO-2-Fusionsprotein entsprechend seiner veränderten Lokalisierung keine transkriptionsreprimierende Funktion mehr besitzt. Für die SUMOylierungs-defiziente ZO-2-K730R-Mutante konnte kein Effekt beobachtet werden. Weiterhin konnte mit Reporteranalysen gezeigt werden, dass die gezielte Akkumulation von ZO-2 im Kern zur verstärkten Repression der β -Catenin/TCF-4-vermittelten Transkriptionsaktivität führt. In diesem Zusammenhang wurde eine Interaktion von ZO-2 und β -Catenin nachgewiesen. Zudem konnte festgestellt werden, dass die durch ZO-2 verursachte Repression der Transkriptionsaktivität unabhängig von β -Catenin ist. Aus der Literatur ist bekannt, dass die inhibitorische Phosphorylierung von GSK3 β an Ser9 durch die Überexpression von ZO-2 über einen noch unbekanntem Mechanismus reduziert wird. Diesbezüglich konnte in der vorliegenden Arbeit eine Interaktion von GSK3 β und ZO-2 beobachtet werden.

Zusammenfassend kann festgestellt werden, dass durch die SUMOylierung die intrazelluläre Lokalisation von ZO-2 reguliert und dadurch die Transkription von Genen moduliert wird, die an der Zellwachstums- und Proliferationsregulation z.B. im Rahmen des Wnt/ β -Catenin-Signalwegs beteiligt sind.

1 Einleitung

Endothelien und Epithelien sind in vielzelligen Organismen essentiell, um Organe und Gewebe untereinander und gegen die äußere Umgebung abzugrenzen. Sie bilden somit selektive, physiologische Barrieren, die den Transport von Ionen, Soluten, Proteinen und Zellen regulieren. Während Endothelien das Lumen von Blut- und Lymphgefäßen auskleiden, bedecken Epithelien die Körperoberfläche, wie z.B. die Haut, oder kleiden das Innere von Organen wie Niere, Darm und Leber aus. Polare Epithelzellen sind über ihre apikale Oberfläche der Umwelt bzw. einem Lumen und basal über die Basallamina dem angrenzenden Gewebe zugewandt. Die lateralen Membranen benachbarter Zellen stehen über spezifische Zell-Zell-Kontakte in Verbindung, die anhand von Aufbau und Funktion in drei Grundtypen eingeteilt werden können: in verschließende (Tight Junctions), verankernde (Adherens Junctions, Desmosomen) und kommunizierende Verbindungen (Gap Junctions). In polarisierten Epithel- und Endothelzellen befinden sich die Tight Junctions am weitesten apikal, darunter liegen die für die mechanische Verbindung verantwortlichen Adherens Junctions sowie Desmosomen und zudem befinden sich im basalen Bereich die kommunizierenden Gap Junctions (Abb. 1; B und C).

1.1 Adherens Junctions und Desmosomen

Adherens Junctions (AJs) und Desmosomen sind Zell-Zell-Kontakte, die dem interzellulären Zusammenhalt und der mechanischen Formerhaltung epithelialer Gewebe dienen. Im Gegensatz zu den direkt unter den Tight Junctions (TJs) lokalisierten AJs, die die Zellen gürtelförmig umschließen, stellen die Desmosomen punktförmige Zell-Zell-Kontakte der basolateralen Zellmembran dar. In beiden Kontaktstrukturen vermitteln Ca^{2+} -abhängige Transmembranproteine der Cadherin-Superfamilie die Adhäsion zwischen den benachbarten Zellen (van Roy und Berx 2008), wobei in den AJs von Endothelien VE (vascular endothelial)-Cadherin und in Epithelien bevorzugt E (epithelial)-Cadherin vorliegt. Obwohl in AJs als auch in Desmosomen Cadherine die zentralen Adhäsionsmoleküle darstellen, unterscheiden sich die Adhäsionskomplexe doch grundlegend. In den AJs sind die Cadherine über die Catenine (α -, β -, γ -Catenin) und weitere Ankerproteine wie α -Actinin, Vinculin oder Eplin mit dem Aktin-Cytoskelett verknüpft, wohingegen die desmosomalen Cadherine (Desmoglein 1-4 und Desmocollin 1-3) mit dem Intermediärfilamentsystem in

Verbindung stehen. Zudem unterscheiden sich die Desmosomen hinsichtlich der mit den cytosolischen Domänen der desmosomalen Cadherine assoziierten Adapterproteine, Desmoplakin, Plakoglobin (γ -Catenin) und den Plakophilinen (Garrod und Chidgey 2008). Vielen dieser Adapterproteinen werden Signalfunktionen zugeschrieben, z.B. den Armadillo-Repeat Proteinen β - und γ -Catenin und den Plakophilinen.

β -Catenin ist nicht nur ein Bestandteil des Cadherin-Catenin-Komplexes in den Adherens Junctions, sondern spielt auch eine zentrale Rolle im Wnt-Signalweg. Ein funktioneller Zusammenhang dieser dualen Rolle von β -Catenin ist bis jetzt nur ansatzweise verstanden. Die Menge an cytoplasmatischem β -Catenin wird durch den β -Catenin-Degradationskomplex, bestehend aus APC (Adenomatous polyposis coli), Axin, GSK3 β (Glykogensynthase-Kinase-3 β) sowie CK1 α (Casein-Kinase 1 α), reguliert. Die aufeinanderfolgende Phosphorylierung von β -Catenin durch CK1 α sowie GSK3 β markiert das Protein für den proteasomalen Abbau (Daugherty und Gottardi 2007). Wird die Phosphorylierung durch die Aktivierung des Wnt-Signalwegs, eine Mutation in Komponenten des Degradationskomplexes oder in den β -Catenin-Phosphorylierungsstellen unterbunden, kann β -Catenin nicht abgebaut werden, akkumuliert im Cytoplasma und transloziert in den Kern. Dort kann es über die Interaktion mit LEF-1/TCF-4-Transkriptionsfaktoren (Lymphoid enhancer-binding factor-1/ T-cell factor 4) Zielgene aktivieren, die in Proliferation, Differenzierung und Körperachsendetermination involviert sind (Stadeli et al. 2006). Neben dem soeben beschriebenen kanonischen Wnt-Signalweg existiert außerdem der nicht-kanonische planare Zellpolaritätsweg sowie der Wnt/ Ca^{2+} -Weg.

1.2 Gap Junctions

Gap Junctions erlauben durch die Bildung von Poren den Durchtritt von anorganischen Ionen, kleinen Molekülen (< 1 kDa) sowie chemischen und elektrischen Signalen. Das von sechs transmembranen Connexinen gebildete Connexon durchspannt als Halbkanal die Plasmamembran und interagiert zur Porenbildung mit einem Connexon der gegenüberliegenden Zelle.

1.3 Tight Junctions

Tight Junctions bilden die am weitesten apikal befindlichen Zell-Zell-Kontakte, die, wie man in Gefrierbruchaufnahmen gut erkennen kann, in Strängen gürtelförmig um die Zelle lokalisiert sind (Abb. 1A). Der ansonsten 15-20 nm breite Interzellularspalt ist an den sogenannten „kissing points“ der lateralen Zellmembran nicht mehr vorhanden und wird von den Tight Junctions vollkommen abgedichtet (Abb. 1B) (Farquhar und Palade 1963, Staehelin 1973).

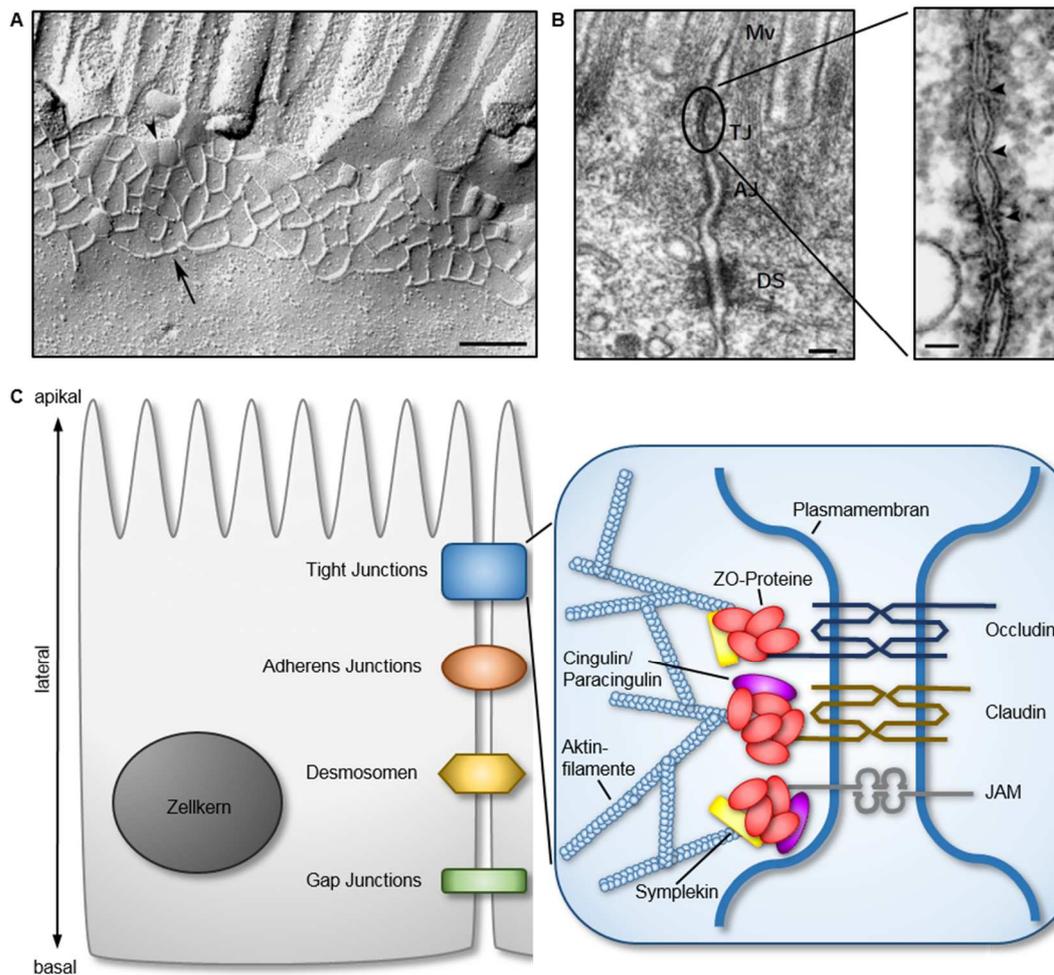


Abb. 1: Lokalisation von Zell-Zell-Verbindungen und Aufbau der Tight Junctions.

(A) Gefrierbruch-Aufnahme von Tight Junctions in Maudarm-Epithelzellen. Es sind perlschnurartige TJ-Stränge auf der P-Seite (Protoplasten-Seite; Pfeil) und komplementäre Rillen auf der E-Seite (extrazelluläre Seite; Pfeilspitze) zu erkennen. Der Maßstabsbalken entspricht 200 nm (Furuse 2010). (B) Links: Elektronenmikroskopische Ultradünnschnitt-Aufnahmen der junctionalen Komplexe in Maudarm-Epithelzellen. (Mv, Mikrovilli; TJ, Tight Junctions; AJ, Adherens Junctions; DS, Desmosomen). Der Maßstabsbalken entspricht 200 nm. Rechts: Elektronenmikroskopische Ultradünnschnitt-Aufnahme von TJs. Die „kissing points“, an denen der Interzellularraum aufgrund der Assoziation der Tight Junctions benachbarter Zellen nicht mehr vorhanden ist, sind mit Pfeilspitzen gekennzeichnet. Der Maßstabsbalken entspricht 50 nm (Tsukita et al. 2001). (C) Links: Schematische Darstellung einer epithelialen Darmzelle mit verschiedenen Zell-Zell-Verbindungen. TJs sind am weitesten apikal befindliche junctionale Komplexe, die eine Barriere- und Zaun-Funktion ausüben. Darunter liegen die für die mechanische Verbindung verantwortlichen Adherens Junctions sowie Desmosomen und zudem die kommunizierenden Gap Junctions. Rechts: In den TJs gewähren integrale Transmembranproteine wie Occludin, die Claudine und die JAMs (junctional adhesion molecule) über ihre extrazellulären Domänen die Zell-Zell-Interaktion und dichten den Interzellularraum ab, während die Gerüstproteine wie z.B. die *Zonula occludens* (ZO)-Proteine, Symplekin sowie Cingulin/Paracingulin als Brücke zwischen den integralen Transmembranproteinen und dem Aktin-Cytoskelett fungieren und eine Plattform für Signalmoleküle bilden.

1.3.1 Funktionen der Tight Junctions

Während AJs und Desmosomen die angrenzenden Zellen mechanisch miteinander verbinden und Gap Junctions über Porenbildung eine direkte Kommunikation zwischen Zellen ermöglichen, besitzen Tight Junctions neben der Aufgabe der mechanischen Stabilisierung zusätzlich eine Barriere- und Zaun-Funktion.

Die Barriere-Funktion reguliert den parazellulären Transport von Ionen und Molekülen und ist somit wichtig für den Aufbau und die Erhaltung eines speziellen internen und externen Milieus in Geweben und Organen (Balda und Matter 2008, Furuse 2010, Luissint et al. 2012). Beim parazellulären Transport passieren gelöste Stoffe über wässrige Poren innerhalb der Tight Junctions passiv den Interzellularraum. Ein weiterer Transportweg epithelialer Barrieren ist der transzelluläre Transport (Transcytose) direkt durch die Zelle, der über Kanäle, Transporter und Pumpen sowie durch rezeptorvermittelte Endo- bzw. Exocytose gewährleistet wird.

Durch die Zaun-Funktion der Tight Junctions wird die Aufrechterhaltung der Zellpolarität unterstützt, da sie die Diffusion von integralen Membranproteinen und Lipiden zwischen apikalen und basolateralen Membranen verhindern (Mandel et al. 1993, Matter und Balda 2003a, van Meer et al. 1986, van Meer und Simons 1986). In den letzten Jahren hat sich jedoch gezeigt, dass ein Großteil der junctionalen Proteine neben der rein physikalischen Barriere- und Zaun-Funktion außerdem die Signale, die an der apikalen Plasmamembran ankommen und von ihr ausgehen, koordinieren und transduzieren können.

1.3.2 Die Tight Junction-Proteine

Tight Junctions bestehen aus integralen Transmembranproteinen (z.B. Occludin, Tricellulin, Claudinen und JAMs) und Adapter-Proteinen (z.B. den ZO-Proteinen, Symplekin, Cingulin, Paracingulin) (González-Mariscal et al. 2003). Die extrazellulären Domänen der integralen Transmembranproteine gewährleisten die Zell-Zell-Interaktionen, die den Interzellularraum abschließen und sind somit für die parazelluläre Ionenselektivität verantwortlich. Innerhalb der Zelle befindet sich ein cytoplasmatischer Plaque, welcher aus einer Ansammlung von cytosolischen Adapter-Proteinen besteht, die die molekulare Verbindung zwischen der intrazellulären Domäne der integralen Transmembranproteine und dem Cytoskelett herstellen (Abb. 1C).

Occludin, Tricellulin (MARVELD2) und MARVELD3 gehören zu den integralen TAMPs (TJ-associated MARVEL proteins), deren vier Transmembranhelices die MARVEL-

Domänen (MAL and related proteins for vesicle trafficking and membrane link) bilden, die wiederum charakteristisch für Membrananlagerungs- und Fusionsprozesse sind (Sanchez-Pulido et al. 2002). Occludin ist ein 65 kDa großes Protein, welches als erstes integrales Tight Junction-Protein identifiziert wurde (Furuse et al. 1993). Es besitzt zwei extrazelluläre Loops ähnlicher Größe, die mit den integralen Tight Junction-Proteinen der gegenüberliegenden Zelle interagieren. Occludin assoziiert über seinen cytoplasmatischen C-Terminus mit den ZO-Proteinen (Furuse et al. 1994, Haskins et al. 1998, Itoh et al. 1999a), Cingulin und Symplekin (Gonzalez-Mariscal et al. 2003). Der cytoplasmatische C-Terminus interagiert außerdem mit der E3 Ubiquitin-Ligase Itch, die die Ubiquitinierung und den proteasomalen Abbau von Occludin katalysiert (Traweger et al. 2002). Occludin ist Ziel einiger Kinasen und wird an Serin/Threonin- und Tyrosin-Resten phosphoryliert, was einen wichtigen Mechanismus für die Bildung, Aufrechterhaltung und Regulation der Tight Junctions darstellt (Dörfel und Huber 2012). Tricellulin (MARVELD2) ist vorrangig in Dreizellkontakten lokalisiert (Ikenouchi et al. 2005). MARVELD3 ist ein alternativ gespleißtes Protein, welches co-lokalisiert mit Occludin an den Tight Junctions in Epithel- und Endothelzellen vorliegt (Steed et al. 2009).

Claudine sind transmembrane Tetraspanine und stellen die wichtigste Hauptstrukturkomponente der Tight Junctions dar. Sie besitzen einen größeren und einen kleineren extrazellulären Loop sowie kurze N- und C-terminale Domänen, deren Länge abhängig von der jeweiligen Claudin-Isoform ist. In Säugern wurden ca. 27 Claudine identifiziert, deren Größe von 21-28 kDa variiert und die ein gewebespezifisches Expressionsmuster aufweisen (Gunzel und Yu 2013). Sie sind für den passiven parazellulären Transport kleiner Ionen verantwortlich und in der Lage Poren zu bilden. Claudine werden an Serin- oder Threonin-Resten phosphoryliert, wodurch deren Funktion und zelluläre Lokalisation beeinflusst wird (Ishizaki et al. 2003, D'Souza et al. 2005, Ikari et al. 2006, Aono und Hirai 2008).

JAMs (junctional adhesion molecules) sind ebenfalls integrale Tight Junction-Proteine mit einem Molekulargewicht von ca. 40 kDa. Sie besitzen eine kleine cytoplasmatische Domäne, eine Transmembrandomäne und der extrazelluläre Teil zeichnet sich durch zwei Immunglobulin-ähnliche Loops aus. Speziell JAM-A agiert als Orientierungspunkt bei der Tight Junction-Bildung und wird sehr früh während der Entstehung der Zell-Zell-Kontakte rekrutiert (Eckert und Fleming 2008).

Zu den cytoplasmatischen Adapter-Proteinen gehören u.a. das 137 kDa große Symplekin, eine Komponente der Polyadenylierungsmaschinerie, die an der Prozessierung der 3'-UTRs der mRNA beteiligt ist (Keon et al. 1996) sowie Cingulin und dessen Paralog Paracingulin, welche mit dem Aktin- und Mikrotubuli-Cytoskelett interagieren (Ohnishi et al. 2004, Yano et al. 2013). Die größte Gruppe dieser Gerüstproteine wird jedoch von den MAGUK-Proteinen (membrane-associated guanylate kinase) repräsentiert, welche anhand ihrer modularen Struktur und Sequenz in sieben Untergruppen unterteilt werden können (te Velthuis et al. 2007). An dieser Stelle soll jedoch nur auf die am besten untersuchten MAGUK-Proteine, die *Zonula occludens* (ZO)-Proteine, eingegangen werden.

1.3.3 Die *Zonula occludens*-Proteine

ZO ist das Akronym für „*Zonula occludens*“, wobei es sich um die lateinische Bezeichnung für „verschließende Gürtel“ handelt. Als erstes ZO-Protein wurde ZO-1 (220 kDa) 1986 entdeckt (Stevenson et al. 1986), während ZO-2 (160 kDa) (Gumbiner et al. 1991) und ZO-3 (130 kDa) (Haskins et al. 1998) später mit Hilfe von Co-Immunpräzipitationsstudien identifiziert wurden. Die ZO-Proteine stellen Gerüstproteine dar, die mit den integralen TJ-Proteinen assoziieren und eine direkte Verbindung zum Aktin-Cytoskelett ausbilden. Dort rekrutieren sie unterschiedlichste Proteine an die cytoplasmatische Seite der TJs und tragen zur Entstehung des cytoplasmatischen Plaques bei. ZO-Proteine assoziieren neben TJs auch mit Cadherin-basierten AJs (Howarth et al. 1992) und Gap Junctions (Kausalya et al. 2001, Li et al. 2004, Singh et al. 2005), was auf eine generelle Rolle bei der Ausbildung interzellulärer Kontakte und Kommunikation hinweist. ZO-1 und ZO-2 werden in Epithel- und Endothelzellen exprimiert und sind unentbehrlich für die TJ-Bildung (Umeda et al. 2006, Katsuno et al. 2008), wohingegen ZO-3 nur auf Epithelzellen beschränkt und weniger wichtig für die TJs scheint (Adachi et al. 2006, Xu et al. 2008a).

Die ZO-Proteine sind modular aufgebaut. Sie besitzen drei PDZ-Domänen und weitere Proteinbindedomänen wie eine SH3- (Src homology 3), eine GuK- (Guanylate kinase) Domäne (Funke et al. 2005) und eine prolinreiche Domäne (Gonzalez-Mariscal et al. 2000). Der Begriff PDZ-Domäne wurde von den ersten drei Proteinen abgeleitet, in denen diese Domäne identifiziert wurde: PSD-95 (post synaptic density protein-95), Dlg (Drosophila discs large protein) und ZO-1 (*Zona occludens-1*) (Chi et al. 2012, Jelen et al. 2003). ZO-Proteine interagieren direkt mit der C-terminalen Domäne der

meisten Transmembranproteine wie Occludin (Furuse et al. 1994, Fanning et al. 1998), einem Großteil der Claudine (Itoh et al. 1999b), den JAMs (Bazzoni et al. 2000, Ebnet et al. 2000, Itoh et al. 2001) und Tricellulin (Cohen et al. 2001, Ebnet et al. 2000, Itoh et al. 1999b, Müller et al. 2005, Riazuddin et al. 2006, Schmidt et al. 2004, Itoh et al. 1999a) sowie peripheren cytoplasmatischen Proteinen z.B. Aktin- und Myosin-bindende Proteine wie Cingulin (D'Atri et al. 2002) und Shroom (Etournay et al. 2007), Signalmolekülen und Transkriptionsregulatoren wie der Serin-Kinase ZAK (ZO-1 associated kinase-1) (Balda et al. 1996), p120-Catenin (Wittchen et al. 2003), der G-Protein α -Untereinheit $G\alpha_{12}$ (Meyer et al. 2002) und Scribble (Metais et al. 2005). ZO-Proteine sind über ihre PDZ-Domänen in der Lage Homodimere auszubilden und speziell ZO-1 formt Heterodimere mit ZO-2 und ZO-3 (Utepbergenov et al. 2006). ZO-Proteine besitzen untereinander einen hohen Identitätsgrad der Aminosäuresequenz (ZO-1 und ZO-2 44%, ZO-1 und ZO-3 sowie ZO-2 und ZO-3 40%). Daraus lässt sich schließen, dass diese Proteine funktionell redundant sind. Es zeigt sich jedoch, dass die einzelnen ZO-Proteine auch spezifische Funktionen erfüllen. Die Interaktion mit Proteinen, die in die Zellzyklus-Progression und die Regulation der Genexpression involviert sind, deutet darauf hin, dass ZO-Proteine eine „duale Funktion“ besitzen und nicht nur als rein strukturelle Komponenten agieren. Dies ist durch mehrere konservierte Kernimport- (NLS, nuclear localisation sequences) und Kernexport-Signale (NES, nuclear export sequences) möglich, die den Transport der Proteine zwischen Cytoplasma und Kern regulieren (Islas et al. 2002, Jaramillo et al. 2004, Traweger et al. 2003, Gottardi et al. 1996). Allerdings konnte eine Kernlokalisierung bisher nur für ZO-1 und ZO-2 nachgewiesen werden (Gonzalez-Mariscal et al. 2006, Gottardi et al. 1996). Aufgrund der hohen Homologie der ZO-Proteine mit dem Drosophila Tumorsuppressorprotein Dlg (discs large) (Willott et al. 1993, Woods und Bryant 1991), wird davon ausgegangen, dass die ZO-Proteine auch in Zellwachstum und Proliferation involviert sind.

1.3.4 Das Tight Junction-Protein ZO-2

ZO-2 ist ein 160 kDa großes Protein, welches erstmals im Jahr 1991 in einem ZO-1-Immunpräzipitat identifiziert wurde (Gumbiner et al. 1991). Es enthält charakteristische Proteinbinde-Domänen, die es ermöglichen, als Gerüstprotein mit integralen Transmembran-, Adapter- und Signalproteinen zu interagieren. Es besitzt im N-terminalen Bereich drei PDZ-Domänen, im mittleren Segment ein SH3-Modul und eine GuK-Domäne. Der C-Terminus ist durch saure und prolinreiche Bereiche

gekennzeichnet, wobei die letzten drei Aminosäuren TEL ein zusätzliches PDZ-Bindemotiv darstellen. Die Linker-Regionen zwischen den genannten Domänen werden als Unique-Regionen (U) bezeichnet (Abb. 2). Humanes ZO-2 enthält zwei Kernimport- und Kernexport-Signale (Oka et al. 2010).

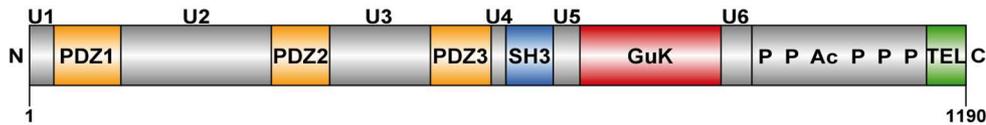


Abb. 2: Schematische Darstellung des modularen Aufbaus von ZO-2. Erläuterungen siehe Text.

1.3.4.1 Die Lokalisation von ZO-2

ZO-2 ist ein Nacos (nuclear and adhesion complexes) Protein, dessen subzelluläre Lokalisation abhängig von der Zelldichte ist. In konfluenten und dichten Zellen ist ZO-2 hauptsächlich an der Plasmamembran lokalisiert und an der Bildung und Aufrechterhaltung der Zell-Zell-Kontakte beteiligt, wobei es in dünn ausgesäten Zellkulturen vorrangig im Kern lokalisiert und in die Regulation der Transkription involviert ist (Islas et al. 2002). Dieser Effekt ist Zellzyklus-gesteuert, denn ZO-2 transloziert während der späten G1-Phase des Zellzyklus in den Zellkern und verlässt diesen während der Mitose durch die Auflösung der Kernmembran (Tapia et al. 2009). Dies erklärt wiederum auch, warum in konfluenten oder hungernden Zellen die sich in der G0-Phase befinden, kein ZO-2 im Kern detektiert werden kann, wohingegen in subkonfluenten und proliferierenden Zellen ZO-2 im Kern lokalisiert vorliegt (Tapia et al. 2009). Es wurde von Quiros *et al.* gezeigt, dass neu synthetisiertes ZO-2 in dünn ausgesäten Zellen zuerst in den Zellkern und dann zur Plasmamembran wandert, während es in dichten Zellen direkt zur Plasmamembran transloziert (Quiros et al. 2013). Weiterhin wurde beobachtet, dass ZO-2 vorwiegend bei chemischem Stress und Hitze im Kern vorkommt (Traweger et al. 2003). Nukleär lokalisiertes ZO-2 befindet sich in sogenannten „Nuclear speckles“ (Islas et al. 2002), was von einer intakten PDZ1-Domäne abhängig ist (Jaramillo et al. 2004) und durch Interaktion mit SAF-B/HET (scaffold attachment factor-B/HSP27 estrogen response element-TATA box-binding protein) induziert werden kann (Traweger et al. 2003). „Nuclear speckles“ sind Interchromatin-Cluster, in denen mRNA-Spleißfaktoren und andere Proteine, die

an der mRNA-Produktion beteiligt sind, angereichert sind. Das intrazelluläre Pendeln von ZO-2 wird durch Kernimport- bzw. Kernexport-Signale und deren posttranslationale Modifikationen reguliert (Abb. 3).

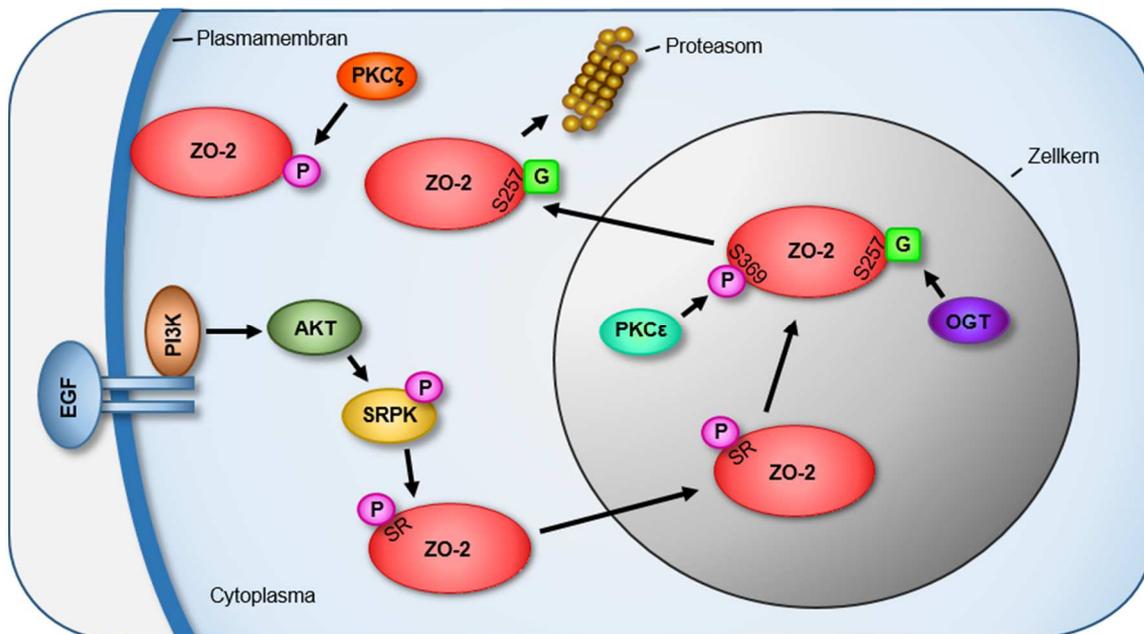


Abb. 3: Schematische Darstellung der Regulation des nucleocytoplasmatischen Transports von ZO-2 durch posttranslationale Modifikationen. Erläuterungen siehe Text. EGF, Epidermal Growth Factor Receptor; PI3K, Phosphoinositid-3-Kinase; SRPK, SR Protein-Kinase 1; SR, Serin/Arginin-Wiederholungen; PKC ϵ , Protein-Kinase C ϵ ; OGT, O-GlcNac-Transferase; PKC ζ , Protein-Kinase C ζ ; P, Phosphorylierung; G, O-GlcNac (nach Quiros *et al.* 2013).

Im ZO-2 des Hundes (canine ZO-2, cZO-2) existieren zwei zweigeteilte und eine Standard-NLS, die am Ende der PDZ1 und am Anfang der U1-Region lokalisiert sind. Allerdings konnte für die zweigeteilte NLS2 keine Funktionalität nachgewiesen werden (Jaramillo *et al.* 2004, Quiros *et al.* 2013). Die U2-Domäne von ZO-2 enthält außerdem 16 Serin/Arginin-Wiederholungen, während die Standard-NLS eine Bindestelle für die SR Protein-Kinase 1 darstellt. ZO-2 interagiert nach Stimulation mit EGF, vermittelt durch den AKT-Signalweg, mit der SR Protein-Kinase 1, wird daraufhin an den Serinresten phosphoryliert, was den Kernimport des Proteins auslöst (Quiros *et al.* 2013). Weiterhin besitzt cZO-2 vier NES, wovon sich zwei in der PDZ2 und zwei innerhalb der GuK-Domäne befinden. Es wurde nachgewiesen, dass jede der vier NES funktionell ist (Gonzalez-Mariscal *et al.* 2006). Die Phosphorylierung von Ser369 der NES1 von cZO-2 durch PKC ϵ ist für den Kernexport des Proteins nötig (Chamorro *et al.* 2009). Die Modifikation mit O-glykosidisch gebundenem N-Acetylglucosamin (O-GlcNAc) an Ser257, welches in der zweigeteilten NLS2 lokalisiert ist, induziert

ebenfalls den Kernexport sowie zusätzlich den proteasomalen Abbau von ZO-2. Ein nicht mit O-glykosidisch gebundenem N-Acetylglucosamin modifiziertes ZO-2 erreicht die Plasmamembran und wird von PKC ζ an Ser257 phosphoryliert, sobald die TJs ausgebildet sind (Quiros et al. 2013).

1.3.4.2 Das ZO-2-Interaktom

Die zuvor beschriebenen konservierten Proteinbinde-Domänen des ZO-2-Proteins ermöglichen die Interaktion mit Transmembran-, Adapter- und Signalproteinen.

Über die erste PDZ-Domäne wird die Interaktion mit den integralen Transmembranproteinen Claudin 1-8 (Itoh et al. 1999b), dem DNA-Bindeprotein SAF-B (scaffold attachment factor B), welches als Basis für den Zusammenbau des Transkriptosoms dient (Traweger et al. 2003), dem transkriptionellen Coaktivator TAZ (transcriptional coactivator with PDZ binding motif) (Remue et al. 2010) und dessen Paralog YAP (Yes kinase-associated protein), einem Effektor des Hippo-Signalweges, welcher die Größe von Organen durch Proliferation und Apoptose reguliert (Oka et al. 2010) und dem Gap Junction-Protein Connexin 36 (Li et al. 2009) vermittelt.

Die zweite PDZ-Domäne ermöglicht die Homo- bzw. Heterodimerisierung der ZO-Proteine (Itoh et al. 1999a, Utepbergenov et al. 2006). Auch das Gap Junction-Protein Connexin 43 (Singh et al. 2005) und Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphat (Meerschaert et al. 2009) assoziieren mit ZO-2 über die zweite PDZ-Domäne.

Für die dritte PDZ-Domäne konnte eine Interaktion mit dem neu entdeckten Protein ZASP (ZO-2 associated speckle protein), welches in „Nuclear speckles“ lokalisiert ist und die inhibitorische Aktivität von ZO-2 auf CD1 blockiert, nachgewiesen werden (Lechuga et al. 2010). Die SH3- und GuK-Domäne fungieren zusammen mit den Linkerregionen U5 und U6 als funktionelles Modul, an welches Occludin und α -Catenin binden (Wittchen et al. 1999). Der prolinreiche C-Terminus von ZO-2 interagiert hauptsächlich mit Proteinen, die mit dem Cytoskelett assoziiert sind, u.a. dem Aktinbindeprotein 4.1R (Mattagajasingh et al. 2000) und F-Aktin (Wittchen et al. 1999). Für die PDZ-bindende Domäne am äußersten C-Terminus (TEL) wurde die Assoziation mit Scribble (Metais et al. 2005), einem Tumorsuppressorprotein, das in die Regulation der Zellpolarität und Zellmigration involviert ist, nachgewiesen. Des Weiteren interagieren die Segmente der drei PDZ-Domänen mit dem Armadillo-Repeat Protein ARVCF (Armadillo repeat protein deleted in velo-cardio-facial syndrome) (Kausalya et al. 2004) und der Nicht-Rezeptor-Tyrosinkinase Jak-1 (Janus kinase 1) (Tkachuk et al. 2011). Für die saure und prolinreiche Region im C-Terminus

des Proteins konnte die Bindung mit den Transkriptionsfaktoren Jun, Fos und C/EBP (CCAAT/Enhancer-binding-protein) gezeigt werden (Betanzos et al. 2004). Interaktionen mit Proteinkinasen wie der Tyrosin-Kinase c-Scr (cellular sarcoma) und deren negativem Regulator Csk (C-terminal Src kinase) (Saito et al. 2008), der Serin/Threonin-Kinase PKA und den PKC-Isoformen λ , ζ , ϵ (Avila-Flores et al. 2001), Strukturmolekülen wie Cingulin (Cordenonsi et al. 1999), einem Regulator des RhoA-Signalwegs, Myosin 2 (Yamazaki et al. 2008) und Lamin B1 (Jaramillo et al. 2004) sowie weiteren regulatorischen Proteinen wie SC-35 (Islas et al. 2002), c-Myc (Huerta et al. 2007) und KyoT2 (Huang et al. 2002) komplettieren u.a. das ZO-2-Interaktom, wobei deren präzise Bindestellen im ZO-2-Protein bis jetzt nicht abschließend geklärt werden konnten. Einige der eben beschriebenen Interaktionspartner von ZO-2 sind nukleär lokalisiert. Neben Transkriptionsfaktoren sind dies u.a. Lamin B1, Aktin, SC-35, SAF-B und Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphat.

1.3.4.3 Funktionen von ZO-2

Die beschriebenen Interaktionen von ZO-2 lassen erkennen, dass die Aufgaben von ZO-2 über die rein physiologische Funktion der Bildung und Aufrechterhaltung von Tight Junctions hinausgehen. Erste Hinweise, dass ZO-2 in Zellwachstum und Proliferation involviert ist, gaben die große Homologie mit dem Tumorsuppressor Dlg aus *Drosophila*, einem Protein dessen Mutation zu tumorösen Wucherungen der Imaginalscheiben führt (Willott et al. 1993, Woods und Bryant 1991) und die nachgewiesenen Interaktionen von ZO-2 mit Proteinen, die nukleär lokalisiert und/oder an der Progression des Zellzyklus sowie an der Regulation der Transkription beteiligt sind.

Die Arbeiten bezüglich des Einflusses von ZO-2 auf die Zellproliferation, in denen ZO-2 herunterreguliert bzw. deletiert sowie überexprimiert wurde, sind jedoch kontrovers. Der exogene Knock-down von ZO-2 in MDCKII-Zellen mit Hilfe von siRNA (small interfering RNA) bewirkte Veränderungen der charakteristischen Barriere-Funktion durch erhöhten parazellulären Fluss und verringerten transepithelialen elektrischen Widerstand (TEER) sowie der Zaun-Funktion durch eine nicht-polarisierte Lokalisation von E-Cadherin. Des Weiteren reduzierte der ZO-2 Knock-down die Expression von Occludin und E-Cadherin, verursachte eine untypische Architektur des Monolayers, mehrschichtige Zellschichten und eine Veränderung des Aktin-Musters. Dabei konnte jedoch kein Effekt auf die Zellproliferation oder Apoptose nachgewiesen werden (Hernandez et al. 2007). Ein Knock-down von ZO-1 mittels shRNA (small hairpin RNA)

in MDCKII-Zellen verursachte eine erhöhte Permeabilität für große Solute, morphologische Veränderungen und eine veränderte Organisation von Aktin und Myosin. Überraschenderweise zeigte der Knock-down von ZO-2 durch shRNA keine vergleichbaren Effekte, was darauf hinweist, dass die Funktionen von ZO-1 und ZO-2 nur teilweise redundant sind (Van Itallie et al. 2009). ZO-2 ist in die Entwicklung des Blastocoels involviert, da die Mikroinjektion von ZO-2 siRNA in Zygoten oder Zwei-Zell-Embryos eine verspätete Bildung des Blastocoel-Hohlraums verursacht, aber kein Effekt auf die Zellproliferation nachweisbar war (Sheth et al. 2008). Studien mit Knock-out Mäusen haben gezeigt, dass ein ZO-3 Knock-out keinen auffälligen Phänotyp bewirkt, wohingegen Embryonen, in denen ZO-2 ausgeknockt war, kurz nach der Implantation aufgrund verminderter Proliferation und verstärkter Apoptose starben (Xu et al. 2008a). Interessanterweise verursacht die nukleäre Akkumulation von ZO-2 durch die Fusion mit drei exogenen Kernlokalisierungssignalen des SV40-Virus in Epithel- und Endothelzellen eine erhöhte Proliferationsaktivität sowie eine verstärkte Expression der Pyruvatkinase M2, welche als Tumormarker fungiert (Traweger et al. 2008). Im Gegensatz dazu wird in den Arbeiten von Tapia *et al.* und Huerta *et al.* beschrieben, dass die Überexpression von ZO-2 die Proteinmenge von Cyclin D1 reduziert (Tapia et al. 2009). Dabei wird die Transkription von Cyclin D1 durch Interaktion mit dem Transkriptionsfaktor c-Myc, welcher eine E-Box (Enhancer Box) im Cyclin D1-Promotor erkennt, in Kooperation mit HDAC1 verringert (Huerta et al. 2007) und dadurch die Zellproliferation inhibiert. Dieser inhibitorische Effekt von ZO-2 wird durch die Bindung von ZASP (ZO-2 associated speckle protein) an die PDZ3 von ZO-2 blockiert (Lechuga et al. 2010). Ein weiterer Mechanismus, über den ZO-2 die Zellproliferation beeinflussen kann, ist die Interaktion mit YAP2, einem Effektor des Hippo-Signalwegs, welcher die Regulation der Proliferation und Apoptose während der Säuger-Organogenese kontrolliert (Oka et al. 2010). ZO-2 bildet einen tripartiten Komplex mit YAP und AmotL1, einem Mitglied der Angiomotin-Familie. Dabei handelt es sich um Proteine, die durch das PPXY-Motiv an die WW-Domäne von YAP binden. AmotL1 inhibiert die pro-apoptotische Funktion und die nukleäre Lokalisation von YAP, wohingegen ZO-2 diese verstärkt (Oka et al. 2012).

Zudem wirkt ZO-2 als Repressor des Wnt-Signalwegs. Tapia *et al.* haben beobachtet, dass die Überexpression von ZO-2 die inhibitorische Phosphorylierung von GSK3 β an Ser9 über einen noch unbekanntem Mechanismus reduziert. Daraus resultiert eine gesteigerte Aktivität des β -Catenin-Degradationskomplexes, die zu einer

dosisabhängigen Repression der β -Catenin-vermittelten Transkriptionsaktivität in Reporter-gen-Assays und der Expression von endogenen Zielgenen führte (Tapia et al. 2009). Die Inhibierung des Wnt-Signalwegs durch ZO-2 konnte ebenfalls im Maus-Modell bestätigt werden. Die hydrodynamische Transfektion von ZO-2 in Mäusen, in denen Nephrose durch das Antibiotikum Adriamycin induziert wurde, verhinderte die Podocyten-Verletzung durch eine erhöhte Phosphorylierung von β -Catenin und eine daraus resultierende verminderte Expression von Wnt-Zielgenen (Bautista-Garcia et al. 2013).

Darüber hinaus wurde gezeigt, dass ZO-2 mit c-Jun, c-Fos und C/EBP interagiert und die Transkription von Reporter-genen unter Promotoren mit AP1-Bindungsstelle dosisabhängig inhibiert (Betanzos et al. 2004). Da die Lokalisation der Transkriptionsfaktoren c-Jun, c-Fos und C/EBP ebenfalls abhängig von der Zelldichte ist (Betanzos et al. 2004), könnte man davon ausgehen, dass ZO-2 am Export von Transkriptionsfaktoren aus dem Kern beteiligt ist und dies einen Mechanismus darstellt, über den ZO-2 die Herunterregulierung der Transkription von Genen bewirkt. Die Funktion von ZO-2 als Kern-Shuttle konnte für YAP-2 (Oka et al. 2010) und ARVCF (Kausalya et al. 2004) nachgewiesen werden.

Durch die komplexen Interaktionen und die daraus resultierenden Funktionen von ZO-2 kann festgestellt werden, dass sowohl membranassoziiertes als auch nukleäres ZO-2 eine Gerüst-Funktion besitzt, welche den Transport assoziierter Proteine in und aus dem Kern vermittelt und dadurch direkt oder indirekt die Zellproliferation, Apoptose und Transkription beeinflusst.

1.3.4.4 ZO-2 und Krankheiten

Krebs

Aufgrund der großen Homologie der ZO-Proteine mit dem Tumorsuppressorprotein Dlg aus *Drosophila*, der inhibitorischen Wirkung von ZO-2 auf den Wnt-Signalweg und auf die Zellproliferation sowie dessen pro-apoptische Funktion könnte man davon ausgehen, dass ZO-2 als Tumorsuppressor wirkt. Zusätzlich wurden in einigen Tumoren, u.a. in Plattenepithel- und Adenokarzinomen der Lunge, erniedrigte RNA-Level von ZO-2 nachgewiesen (Paschoud et al. 2007). Es ist bisher jedoch nicht geklärt, ob die Reduktion von ZO-2 und anderen TJ-Proteinen eine Konsequenz oder der Auslöser von Tumorerkrankungen ist.

Familiäre Hypercholämie

Die Mutation V48A im humanen ZO-2 führt zu einer Konformationsänderung der PDZ1, welche eine verminderte Bindung an die Claudine-1, -2, -3, -5 und -7 nach sich zieht. Diese Mutation wird mit familiärer Hypercholämie in Verbindung gebracht. Die Krankheit ist durch erhöhte Konzentration von Gallensäure im Serum, Juckreiz und Malabsorption von Fetten gekennzeichnet. Warum diese Mutation nur die TJs der Gallengänge und nicht alle epithelialen TJs betrifft muss noch untersucht werden (Carlton et al. 2003).

Nicht-syndromale progressive Schwerhörigkeit

Altersbedingter Hörverlust wird hauptsächlich durch Apoptose der Haarzellen des Innenohrs ausgelöst. ZO-2 wird im menschlichen Ohr vorrangig im Corti-Organ an der Membran zwischen Haar- und Stützzellen exprimiert. In der Studie von Walsh *et al.* wurde gezeigt, dass in Patienten eine invertierte genomische Duplikation eines 270 kb langen Fragmentes, welches das komplette ZO-2 Wildtyp Gen enthält, zur Überexpression von ZO-2 führt und nicht-syndromalen progressiven Gehörverlust verursacht (Op de Beeck et al. 2011, Walsh et al. 2010). In Zellen der betroffenen Patienten wurde die Überexpression von ZO-2 und eine daraus resultierende Reduktion der inhibitorischen Phosphorylierung von GSK3 β an Ser9, die auch schon *in vitro* gezeigt wurde (Tapia et al. 2009), nachgewiesen. Dies führt zu einer veränderten Expression von Apoptose-regulierenden Proteinen wie z.B. Bcl2L11 oder von IL-6. Daher wird davon ausgegangen, dass diese genomische Duplikation einhergehend mit der Überexpression von ZO-2, der reduzierten Phosphorylierung von GSK3 β und der verstärkten Expression pro-apoptotischer Proteine die Apoptose der Haarzellen auslöst und dadurch Schwerhörigkeit verursacht.

1.4 Posttranslationale Modifikation

Eine Vielzahl von Proteinen wird nach der Translation modifiziert. Dies ermöglicht eukaryontischen Zellen, kurzfristig auf externe Signale zu reagieren und die Funktion, Stabilität, Lokalisation und Aktivität von Zielproteinen zu regulieren. Des Weiteren wird durch diese Modifikationen die Variabilität des Proteoms beträchtlich erhöht. Es lassen sich grundsätzlich zwei Typen von Modifikationen unterscheiden: zum einen die kovalente Addition funktioneller Gruppen oder kleiner Proteine an Aminosäure-Seitenketten und zum anderen die Spaltung des Polypeptidrückgrates durch

spezifische Proteasen. Letztere kann z.B. eine aktivierende proteolytische Spaltung wie bei der Zymogenaktivierung oder der Blutgerinnung sein. Die Modifikationen der Aminosäure-Seitenketten sind reversibel oder von dauerhafter Natur. Dauerhafte Modifikationen wie z.B. Glykosylierungen oder Hydroxylierungen sind in der Lage die Struktur und Funktion von Proteinen zu beeinflussen. Phosphorylierung, Acetylierung, Methylierung, Ubiquitylierung und SUMOylierung sind reversible posttranslationale Modifikationen, die die Aktivität, Funktion, Lokalisation und den Abbau von Proteinen regulieren können.

1.4.1 SUMOylierung als posttranslationale Modifikation

SUMO ist die Abkürzung für „small ubiquitin like modifier“ und wurde erstmals als posttranslationale Modifikation des Kernporen-Proteins RanGAP1 (Ran GTase activating protein 1) beschrieben (Matunis et al. 1996, Mahajan et al. 1997). SUMO-Proteine besitzen eine molekulare Masse von ca. 10 kDa und ähneln in ihrer dreidimensionalen Struktur dem Ubiquitin-Protein (Bayer et al. 1998). Jedoch besitzen die SUMO-Isoformen weniger als 20% Aminosäuresequenz-Identität mit Ubiquitin und unterscheiden sich zusätzlich durch einen 10-25 AS längeren N-Terminus, der für die Bildung von SUMO-Ketten verantwortlich ist. Im menschlichen Organismus gibt es vier SUMO-Paraloga (SUMO1-4). SUMO2 und SUMO3 unterscheiden sich voneinander nur durch drei N-terminale Aminosäurereste und werden daher oft als SUMO2/3 zusammengefasst, besitzen aber nur ca. 48% Aminosäuresequenz-Identität mit SUMO1 (Kamitani et al. 1998). Im Unterschied zu SUMO1 ist SUMO-2/3 fähig, SUMO-Ketten durch interne Lysinreste auszubilden (Tatham et al. 2001). SUMO1-Ketten sind bisher nur *in vitro* beobachtet worden (Yang et al. 2006a). Es scheint, als ob SUMO1 *in vivo* als Terminator für die SUMO2/3-Ketten fungiert (Matic et al. 2008). Die SUMO4-Isoform besitzt 87% Aminosäuren-Ähnlichkeit zu SUMO2/3 und wurde bei DNA-Sequenzanalysen identifiziert. Die Konjugation einer exogenen, prozessierten Form konnte jedoch nur bei extremem zellulären Stress nachgewiesen werden (Wei et al. 2008). Darüber hinaus fehlen dem SUMO4-Gen Introns, was darauf hinweisen könnte, dass es sich um ein Pseudogen handelt (Bohren et al. 2004). SUMO1-3 werden ubiquitär exprimiert, wobei für SUMO4 codierende mRNA nur in der Niere, den Lymphknoten und der Milz gefunden wurde, aber kein endogenes SUMO4-Protein nachgewiesen werden konnte (Bohren et al. 2004, Guo et al. 2004).

1.4.2 Der SUMOylierungszyklus

Bei der SUMOylierung werden die SUMO-Proteine in einem dreistufigen Prozess enzymatischer Reaktionen, die denen der Ubiquitylierung sehr ähnlich sind, kovalent an Lysinreste in Zielproteinen gebunden (Abb. 4).

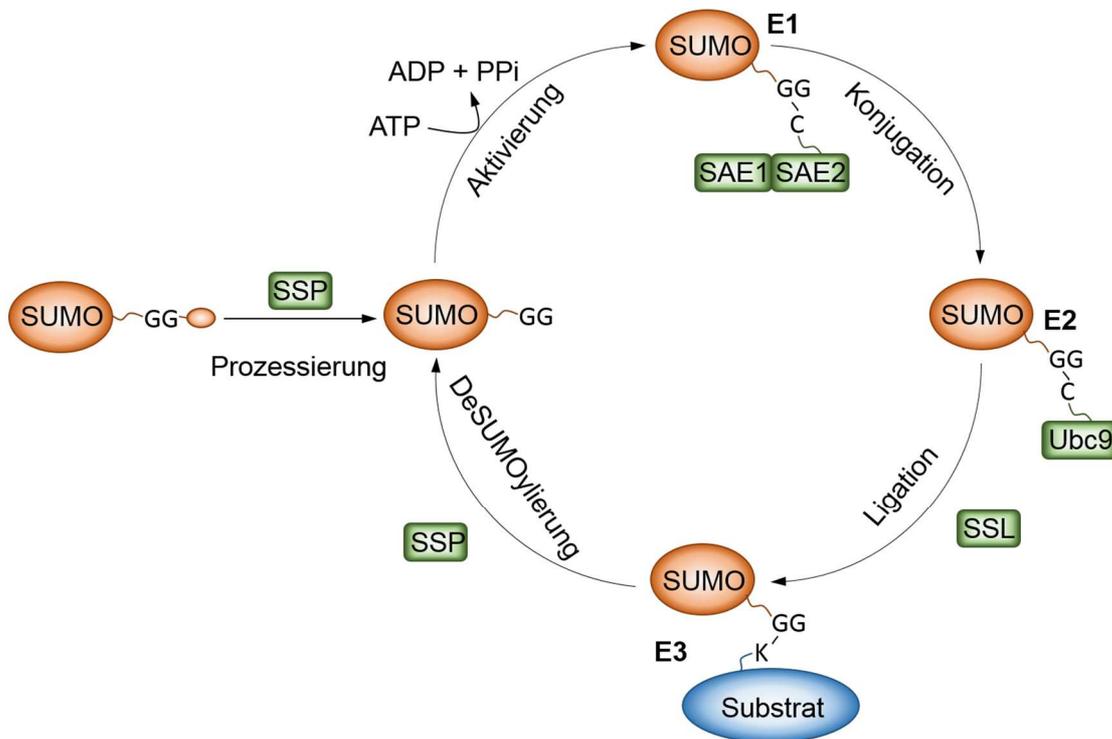


Abb. 4: Vereinfachte schematische Darstellung des SUMOylierungszyklus. Das SUMO-Vorläuferprotein wird durch SUMO-spezifische Proteasen (SSP; SENP-Proteine) C-terminal prozessiert, um das C-terminale Di-Glycin-Motiv freizulegen. Anschließend wird SUMO in einer ATP-abhängigen Reaktion aktiviert und über das Di-Glycin-Motiv an das SUMO-aktivierende Enzym, einem Heterodimer aus dem SAE1/SAE2-Protein (SUMO-aktivierende enzyme; E1), gebunden. SUMO wird dann zum SUMO-konjugierenden Enzym Ubc9 (Ubiquitin-conjugating enzyme 9; E2) transferiert, welches mit Hilfe von SUMO-spezifischen Ligasen (SSL; E3) die Modifikation des Substrats katalysiert. Die DeSUMOylierung wird ebenfalls von SUMO-spezifischen Proteasen (SSP; SENP-Proteine) vermittelt. Das abgespaltene SUMO kann danach für weitere SUMOylierungszyklen verwendet werden (modifiziert nach Geiss-Friedlander und Melchior 2007).

Die SUMO-Proteine werden als inaktive Vorstufen exprimiert. Spezifische Cysteinproteasen, die SENP-Proteine (Sentrin-specific protease), katalysieren anschließend die C-terminale Hydrolyse, die zum Freiwerden des für die SUMO-Konjugation essentiellen C-terminalen Di-Glycin-Motivs führt. Die prozessierten SUMO-Proteine werden nun zuerst in einer ATP-abhängigen Reaktion durch das E1-Enzym, welches in Säugern aus einem Heterodimer aus SAE1 (SUMO-aktivierende

enzyme 1) und SAE2 (SUMO-activating enzyme 2) besteht, aktiviert (Gong et al. 1999). Dies geht mit einer Thioester-Bindung des Cysteins im aktiven Zentrum von SAE2 und dem C-terminalen Glycinrest von SUMO einher. In einem zweiten Schritt wird SUMO ebenfalls über eine Thioesterbindung auf das Cystein des aktiven Zentrums des SUMO-E2-Enzyms Ubc9 (Ubiquitin-conjugating 9) übertragen (Johnson und Blobel 1997, Gong et al. 1997, Desterro et al. 1997, Schwarz et al. 1998, Saitoh et al. 1998, Lee et al. 1998). Während bei der Ubiquitylierung über 30 konjugierende E2-Enzyme die Substratspezifität vermitteln (Lorick et al. 2005), ist an der SUMOylierung nur das einzig bekannte SUMO-konjugierende Enzym Ubc9 beteiligt. Ubc9 selbst bindet dabei direkt an das SUMO-Konsensus-Motiv (ψ KxD/E, wobei ψ eine hydrophobe und x eine beliebige Aminosäure repräsentiert). Obwohl 75% aller bekannten SUMOylierungssubstrate innerhalb der spezifischen Konsensus-Sequenz SUMOyliert werden (Xu et al. 2008b), können auch Lysine außerhalb dieses Motivs modifiziert werden und nicht alle Konsensus-Sequenzen werden zwangsläufig SUMOyliert. Bei der SUMOylierung können ein oder mehrere Lysine in einem Zielprotein gleichzeitig modifiziert werden. Neben dieser Mono- oder Multi-SUMOylierung gibt es auch die Möglichkeit der Poly-SUMOylierung, bei der SUMO-Ketten ausgebildet werden (Tatham et al. 2001, Yang et al. 2006a). Neben dem klassischen Konsensus-Motiv wurden auch ein invertiertes (E/DXK ψ), hydrophobes ($\psi\psi$ KXE) (Matic et al. 2010), ein phosphorylierungsabhängiges (ψ KXEXX(pS)P) (Hietakangas et al. 2006) und ein von der Anwesenheit von negativen Aminosäuren abhängiges Motiv (ψ KXEXXEEEE) (Yang et al. 2006b) als SUMO-Akzeptorstellen identifiziert. Im dritten und letzten Schritt des SUMOylierungszyklus agieren die E3-Enzyme (SUMO-Ligasen) als Gerüstproteine. Sie bringen das mit SUMO-beladene Ubc9 in die Nähe des Substrats und verstärken somit die SUMOylierung. Dabei wird die finale Isopeptidbindung zwischen der ϵ -Aminogruppe des Lysinrests des Substrats und der C-terminalen Carboxylgruppe von SUMO ausgebildet. *In vitro* ist die SUMOylierung jedoch auch ohne E3-Ligasen möglich.

SUMOylierung ist ein reversibler und sehr dynamischer Prozess. Aufgrund der hohen Dynamik der SUMOylierungs- und DeSUMOylierungsprozesse liegen weniger als 5% der Substratproteine in SUMOylierter Form vor. Da nur ein geringer Teil an Substratproteinen im steady-state Zustand modifiziert ist, stellt sich die Frage, wie die SUMOylierung die beobachteten starken Effekte auslösen kann. Eine mögliche Erklärung ergibt sich durch die schnellen Zyklen zwischen SUMOylierung und

DeSUMOylierung, durch die der gesamte Pool eines Substratproteins in einem kurzen Zeitfenster modifiziert werden kann (Geiss-Friedlander und Melchior 2007).

In Säugern wurden drei Klassen spezifischer Cysteinproteasen identifiziert, die für die Spaltung der kovalenten Bindung zwischen SUMO und dem Substrat-Protein verantwortlich sind. Die erste Klasse repräsentieren die SENP-Enzyme, die neben ihrer für die Prozessierung des SUMO-Vorläufers benötigten C-terminalen Hydrolase-Aktivität zusätzlich eine Isopeptidase-Aktivität für die Abspaltung von SUMO vom Zielprotein besitzen (Li und Hochstrasser 1999). Es existieren insgesamt sechs SENP-Proteine, SENP1-3 und SENP5-7, welche sich in ihrer zellulären Lokalisation, der SUMO-Paralog-Spezifität und der Fähigkeit zur Prozessierung der SUMO-Vorläufer-Proteine bzw. von SUMO-Ketten unterscheiden. Die SENP-Proteine können in drei Gruppen unterteilt werden. SENP1 und SENP2 sind SUMO1- und SUMO2/3-spezifisch und können diese auch prozessieren und dekonjugieren (Gong et al. 2000, Hang und Dasso 2002, Zhang et al. 2002). SENP3 und SENP5 sind für die Dekonjugation von SUMO2/3-Monomeren verantwortlich (Nishida et al. 2000, Di Bacco et al. 2006, Gong und Yeh 2006). SENP6 und SENP7 präferieren ebenfalls SUMO2/3, aber scheinen nicht in die Prozessierung und nur wenig in die Dekonjugation von SUMO2/3-Monomeren involviert zu sein (Mukhopadhyay et al. 2006, Shen et al. 2009). Interessanterweise wurde gezeigt, dass SENP1 selbst mit SUMO1 modifiziert werden kann, jedoch ist über die Funktion dieser Modifikation noch nichts bekannt (Bailey und O'Hare 2004). Die zweite und dritte Klasse vor kurzem identifizierter SUMO-Proteasen sind DeSi 1 und DeSi 2 (DeSUMOylating Isopeptidase 1+2) (Shin et al. 2012) sowie USPL1 (Ubiquitin-specific protease-like 1) (Schulz et al. 2012), auf die an dieser Stelle nicht weiter eingegangen werden soll.

1.4.3 Mechanismen und Bedeutung der SUMOylierung

Die Konsequenzen der SUMOylierung sind vielfältig und abhängig vom Substratprotein. Es können jedoch auf molekularer Ebene drei Mechanismen, die sich nicht gegenseitig ausschließen müssen, unterschieden werden. Zum einen kann die SUMOylierung Interaktionen verhindern, indem die entsprechende Interaktionsfläche maskiert wird. Die Aktivität des Ubiquitin-konjugierenden Enzyms E2-25K wird z.B. durch die SUMOylierung beeinflusst, da die Ausbildung der Thioester-Bindung mit Ubiquitin verhindert wird (Pichler et al. 2005). Zugleich kann die SUMOylierung neue Bindungsstellen im Substratprotein schaffen, welches dadurch in der Lage ist andere Effektorproteine in einer SUMOylierungs-abhängigen Weise zu rekrutieren. Ein

Beispiel dafür wäre die Rekrutierung des Transkriptionsrepressors Daxx durch SUMOylierte Transkriptionsfaktoren (Lin et al. 2006). Dieser Mechanismus wird durch SUMO-Bindemotive vermittelt, die die nicht kovalente Bindung von SUMO oder SUMO-Ketten ermöglichen. Diese SIMs (SUMO interaction motifs) zeichnen sich durch eine kurze Abfolge hydrophober Aminosäuren [(V/I) – X – (V/I) – (V/I) oder (V/I) – (V/I) – X – (V/I)] aus, die N- oder C-terminal von sauren Aminosäuren oder phosphorylierbaren Serinresten umgeben sind (Song et al. 2004, Minty et al. 2000). Der dritte mögliche Effekt ist, dass die SUMOylierung eine Konformationsänderung bewirkt, die die Aktivität des Substratproteins beeinflusst oder eine zuvor verdeckte Bindungsstelle freilegt. Eine solche Konformationsänderung durch die Modifikation mit SUMO ist für das DNA-Reparaturenzym TDG (Thymine-DNA-Glykosylase) beschrieben (Hardeland et al. 2002). Die SUMOylierung spielt außerdem eine entscheidende Rolle im nucleocytoplasmatischen Transport, da die subzelluläre Lokalisation einiger Substratproteine durch die Modifikationen mit SUMO verändert werden kann (Geiss-Friedlander und Melchior 2007). Der Kernimport und Kernexport kann durch die Modifikation stimuliert oder inhibiert werden (Willson 2009).

Der Crosstalk von SUMO mit anderen posttranslationalen Modifikationen ist komplex. Lysinreste können, neben der Modifikation mit SUMO, auch Ziel von Ubiquitylierung, Acetylierung oder Methylierung sein. Daher ist ein antagonistischer-Crosstalk der Modifikationen wie z.B. bei I κ B α (inhibitory κ B α), bei dem SUMO und Ubiquitin um einen Lysinrest konkurrieren, möglich (Desterro et al. 1998). Jedoch kann auch die Substratphosphorylierung, abhängig vom Zielprotein, die SUMOylierung inhibieren oder verstärken.

Die Bedeutung der SUMOylierung in Säugern wurde durch Knock-out-Studien von Ubc9 bestätigt. Da Ubc9 für jede SUMOylierungsreaktion essentiell ist, wird durch die Deletion von Ubc9 jede SUMOylierung unterbunden. Es wurde beobachtet, dass Ubc9-Knock-out Mäuse aufgrund von Defekten in der chromosomalen Segregation in der Mitose und einer anomalen Kern-Organisation im frühen Embryonalstadium sterben (Nacerddine et al. 2005). SUMO1 Knock-out Mäuse hingegen sind lebensfähig und zeigen einen relativ normalen Phänotyp (Zhang et al. 2008, Evdokimov et al. 2008). Beobachtungen zeigten, dass RanGAP1, welches eine Präferenz für SUMO1 besitzt, eine verstärkte Modifikation mit SUMO2/3 in embryonalen SUMO1 Knock-down Gesamtzellextrakten aufweist (Evdokimov et al. 2008). Deshalb wird

angenommen, das SUMO2/3 den Verlust von SUMO1 unter diesen extremen Umständen kompensieren kann.

SUMOylierung wird auch mit verschiedenen Krankheiten wie Krebs, neurodegenerativen oder Herz-Erkrankungen in Verbindung gebracht. Die Störung der Funktion von SUMO1 wird bei einigen humanen Tumoren, speziell bei Mammakarzinomen beobachtet. BRCA1 (breast cancer 1) ist Teil der DNA-Schadensantwort, fungiert als Ubiquitin-Ligase und wird mit SUMO, ausgelöst durch genotoxischem Stress, modifiziert (Morris et al. 2009). Die Modifikation mit SUMO1 verstärkt die Ubiquitin-Ligase-Aktivität von BRCA1. In diesem Zusammenhang wurde schon 2006 von Morris und Kollegen gezeigt, dass der Verlust der Ligase-Aktivität die Anfälligkeit gegenüber Brustkrebs erhöht (Morris et al. 2006). Im Gegensatz dazu kann eine gesteigerte Aktivität der SUMOylierungsmaschinerie zur Karzinogenese führen, da die Überexpression von Ubc9 in verschiedenen humanen Krebsarten, u.a. Eierstock-, Brust- und Lungenkrebs beobachtet wurde (Mo et al. 2005, Wu et al. 2009). Auch einige Proteine, die in die Ausbildung von neurodegenerativen Erkrankungen wie Huntington, Parkinson oder Alzheimer involviert sind, werden SUMOyliert. Das Huntingtin-Protein wird am selben Lysinrest ubiquitinyliert und SUMOyliert. Während die Ubiquitinylierung zum Abbau des Proteins führt und somit die Neurodegeneration verhindert, wird es durch die SUMOylierung stabilisiert (Steffan et al. 2004). Zhang und Sarge zeigten, dass das Protein Lamin A, welches eine wichtige Rolle bei der Aufrechterhaltung der Kernstruktur- und Funktion spielt, SUMOyliert wird. Diese Modifikation ist für die normale subzelluläre Lokalisation verantwortlich, da die SUMOylierungs-defiziente Mutante eine anomale Lokalisation aufweist, die mit familiären Kardiomyopathien in Zusammenhang steht (Zhang und Sarge 2008).

1.4.4 SUMOylierung von Tight Junction-Proteinen

Das einzig bisher bekannte SUMO-Substratprotein der TJs ist Claudin-2 (Van Itallie et al. 2012). In einem Yeast-Two-Hybrid Screen wurde die Interaktion der C-terminalen Domäne des humanen Claudin-2 mit dem SUMO-konjugierenden Enzym Ubc9 und der SUMO-Ligase PIAS identifiziert, was auf eine SUMOylierung von Claudin-2 hinweist. Mit Hilfe von *in vitro* SUMOylierungsassays konnte die SUMOylierung bestätigt und das SUMO-Akzeptor-Lysin definiert werden. Weiterhin wurde in dieser Studie beobachtet, dass die Überexpression von SUMO in MDCKII die Proteinmenge von Claudin-2 über einen bisher noch unbekanntem Mechanismus reduziert.

1.5 Ziele der Arbeit

TJs sind essentielle Zell-Zell-Verbindungen in Epithelien und Endothelien vielzelliger Organismen. Diese Strukturen bilden eine Barriere für den parazellulären Transport von Ionen und Molekülen, sind für die Aufrechterhaltung der Zellpolarität verantwortlich und darüber hinaus in zahlreiche Signalwege involviert. ZO-2 stellt ein Adapterprotein der TJs dar, das die integralen TJ-Proteine mit dem Cytoskelett verbindet. Es ist ein typisches Nacos (nuclear and adhesion complexes) Protein und an Zell-Zell-Kontakten sowie im Zellkern lokalisiert. Seine subzelluläre Lokalisation ist von der Zelldichte abhängig, d.h. in konfluenten Zellen befindet sich ZO-2 an der Plasmamembran, wohingegen es in dünn ausgesäten Zellen vorrangig im Kern lokalisiert ist. Die Kern-Cytoplasma-Translokation von ZO-2 wird durch mehrere konservierte Kernimport- und Kernexport-Sequenzen und deren posttranslationale Modifikationen reguliert, ist aber noch nicht hinreichend verstanden. Nachdem mit Hilfe von Vorhersage-Programmen potenzielle SUMO-Akzeptor-Lysine im ZO-2-Protein identifiziert werden konnten und diese Motive evolutionäre Konservierung zeigten, sollten in der vorliegenden Arbeit folgende Fragestellungen genauer analysiert werden:

- **Interagiert ZO-2 mit Komponenten der SUMOylierungsmaschinerie?**
- Ist eine Interaktion mit Sentrin-spezifischen Proteasen (SENPs-Proteinen) nachweisbar?
- Kann eine direkte Interaktion von ZO-2 mit Ubc9 bestätigt werden?

- **Ist ZO-2 ein SUMOylierungssubstrat?**
- Ist die SUMOylierung von überexprimiertem und endogenem ZO-2 nachweisbar?
- Kann rekombinantes ZO-2 *in vitro* SUMOyliert werden?

- **Welcher Aminosäurerest in ZO-2 wird SUMOyliert?**
- Welche/s Lysin/e im ZO-2-Protein wird/werden mit SUMO modifiziert?

- **Welche physiologische Bedeutung hat die SUMOylierung von ZO-2?**
- Wird die subzelluläre Lokalisation von ZO-2 durch eine SUMOylierung beeinflusst?
- Wirkt sich die SUMOylierung auf die β -Catenin/TCF-4-vermittelte Transkriptionsaktivität aus?

2 Material

2.1 Chemikalien

- › 2-Mercaptoethanol (Roth)
- › Adenosintriphosphat (Sigma-Aldrich)
- › Acrylamid, Rotiphorese® GEL 30 (Roth)
- › Agar (Difco Laboratories)
- › Agarose (Invitrogen)
- › Ammoniumchlorid (Merck)
- › Ammoniumpersulfat (Roth)
- › Ampicillin, Natriumsalz (Ratiopharm)
- › Amylose-Resin (New England Biolabs)
- › Bromphenolblau (Merck)
- › BSA Fraktion V (PAA Laboratories)
- › Calciumchlorid (Roth)
- › Coelenterazin (pjk GmbH)
- › Coenzym A (APIChem Technology)
- › Complete-EDTA (Roche Applied Science)
- › Coomassie Blue R250 (Serva)
- › DAPI (Sigma-Aldrich)
- › Desoxycholsäure Natriumsalz (Roth)
- › Dimethylsulfoxid (Roth)
- › Dinatriumhydrogenphosphat (Roth)
- › Dithiothreitol (ABCR)
- › D-Luziferin (Roth)
- › EDTA (Roth)
- › Essigsäure (Roth)
- › Glukose (Roth)
- › Glutathion (Sigma-Aldrich)
- › Glutathion-Agarose (Sigma-Aldrich)
- › Glycerol (Roth)
- › Imidazol (Roth)
- › Iodophenylborsäure (Sigma-Aldrich)
- › Isopropyl- β -D-thiogalactopyranosid (AppliChem)
- › Kaliumacetat (Roth)
- › Kaliumdihydrogenphosphat (Merck)
- › Kaliumphosphat (Sigma-Aldrich)
- › Kanamycindisulfat (Merck)
- › Kupfersulfat (Laborchemie Apolda)

- › Luminol (Roth)
- › Magnesiumchlorid (Merck)
- › Magnesiumsulfat (Roth)
- › Maltose (Roth)
- › Mowiol 4-88 (Roth)
- › Natriumcarbonat (Roth)
- › Natriumchlorid (Roth)
- › Natriumfluorid (Fluorwerke Donna)
- › Natriumhydroxid (Roth)
- › Natriummolybdat-Dihydrat (Roth)
- › Natriummonovanadat (Merck)
- › Nonidet P40 – MP40 (Roche Applied Science)
- › Nucleotide Solution Mix – dNTPs (New England Biolabs)
- › Orange G (Roth)
- › Paraformaldehyd (Roth)
- › Pepton (Roth)
- › Phosphorsäure (Merck)
- › Protein A-Sepharose CL-4B (GE Healthcare)
- › Pyronin Y (Sigma-Aldrich)
- › RedSafe (Intron Biotechnology)
- › Saccharose (Roth)
- › Sodiumdodecylsulfat (Merck)
- › TEMED (Sigma-Aldrich)
- › Tricine (Sigma-Aldrich)
- › Tris-Base (Sigma-Aldrich)
- › Triton X-100 (Roche Applied Science)
- › Trypton (Roth)
- › Tween 20 (Roth)
- › Xylencyanol (Roth)
- › Yeast Extract (Roth)

Nicht aufgelistete Chemikalien wurden von den Firmen Sigma-Aldrich, Merck und Roth bezogen.

2.2 Verbrauchsmaterialien

- › 0,2 ml PCR-Reaktionsgefäße (Biozym)
- › 14 ml PP-Röhrchen (Greiner)
- › Dialyseschlauch Visking, Ausschlussgröße 14 kDa (Roth)
- › Einwegpipetten [2 ml, 5 ml, 10 ml, 25 ml] (Injekt)
- › Einwegspritzen [10 ml, 20 ml] (Greiner)
- › Filterpapier Whatman 3MM (Biometra)
- › Kanülen (Sterican)
- › Reaktionsgefäße [0,5 ml, 1,5 ml, 2 ml] (Eppendorf; Sarstedt)
- › Roti-PVDF Membranen (Roth)
- › Schraubdeckelröhrchen [15 ml, 50 ml] (Greiner)
- › Sterilfilter Filtropur S 0.2 (Sarstedt)
- › Ultrafree®-MC Zentrifugationsfilter, 5000 NMWL (Millipore)
- › Zellkulturschalen [10 cm, 6-Well, 12-Well, 24-Well] (Greiner)
- › Zellschaber (Costar)

2.3 Geräte

Tab. 1: Übersicht über verwendete Geräte und deren Hersteller.

Gerät	Hersteller
Agarosegelelektrophoresekammern	Eigenbau
Analog Heat Block	VWR
Bakterienschüttler Ecotron	Infors HT
CASY Cellcounter	Innovatis AG
Feinwaage 960111M	Sartorius
Fluoreszenzmikroskop Axio Observer.Z1 Apotome	Zeiss
G-Box Chemi XL	Syngene
G-Box EF	Syngene
Gel Dryer Model 583	BioRad
GloMax Luminometer	Promega
Inkubator INCU-Line	VWR
Magnetrührer mit Heizplatte VMS-A	VWR
Mikroskop Motic AE21	Motic
MilliQ Advantage A10	Millipore

Gerät	Hersteller
Mini Protean Tetra Cell Electrophoresis Module	BioRad
Mithras Mikrotiterplattenreader	Berthold Technologies
NanoDrop2000	Peqlab
Nicool LM10	Air Liquide
ph-Meter 761 Calimatic	Knick
Photometer	Eppendorf
Schüttler 3016	GFL (VWR)
Standard Power Pack P25	Biometra
Taumel-Schüttler Polymax 2040	Heidolph
Thermal Cycler 2720	Applied Biosystems
Thermomixer Comfort	Eppendorf
Trans Blot Cell	BioRad
UltraSonic Prozessor UP100H	Hielscher
UV-Tansilluminator	biostep
Vortex Mixer	VWR
Waage LC621P	Sartorius
Waage TE412	Sartorius
Schüttelwasserbad Typ 1086	GFL
Sprout Minizentrifuge	Biozym Diagnostik
Zellkulturbrutschrank	Binder
Zellkultursterilbank HeraSafe	Thermo Scientific
Zentrifuge Mikro 220 R	Hettich
Zentrifuge Rotina 380 R	Hettich
Zentrifuge Rotina 420 R	Hettich

2.4 Molekularbiologische Materialien

2.4.1 cDNAs

Tab. 2: Übersicht über verwendete cDNA.

cDNA	Spezies	Referenz
ZO-2	<i>Homo sapiens</i>	Freundlicherweise von Dr. M. Sudol (Institute of Molecular and Cell Biology, Singapur) zur Verfügung gestellt.
Ubc9	<i>Mus musculus</i>	Freundlicherweise von Dr. R. Niedenthal (Institut für Physiologische Chemie, Medizinische Hochschule Hannover) zur Verfügung gestellt.
SUMO1/ SUMO2/3	<i>Homo sapiens</i>	Freundlicherweise von Dr. R. Niedenthal (Institut für Physiologische Chemie, Medizinische Hochschule Hannover) zur Verfügung gestellt.
GSK3 β	<i>Homo sapiens</i>	Freundlicherweise von Dr. M. Krohn (BRAIN AG, Zwingenberg) zur Verfügung gestellt.

2.4.2 Expressionsvektoren

Tab. 3: Übersicht der verwendeten Expressionsvektoren.

Expressionsvektor	Eigenschaften	Referenz
pCS2+ pCS2+-myc6 pCS2+-FLAG	Eukaryontische Vektoren für die Expression von ungetaggten oder C-terminal 6xmyc- bzw. FLAG-getaggten Proteinen.	Freundlicherweise von Dr. R. Rupp (Adolf Butenandt Institut, LMU München) zur Verfügung gestellt.
pCS2+-NLS	Eukaryontischer Vektor für die Expression von Proteinen mit C-terminalem Kernlokalisierungssignal.	Freundlicherweise von Dr. R. Rupp (Adolf Butenandt Institut, LMU München) zur Verfügung gestellt.
pCMV2/4-FLAG	Eukaryontischer Vektor für die Expression von N-terminal FLAG-getaggten Proteinen.	Sigma-Aldrich
p3xFLAG-CMV-10	Eukaryontischer Vektor für die Expression von N-terminal 3xFLAG-getaggten Proteinen.	Sigma-Aldrich
pGEX-4T1	Prokaryontischer Vektor zur Expression von rekombinanten GST (Glutathion-S-Transferase)-Fusionsproteinen in <i>E. coli</i> .	Amersham Pharmacia Biotech
pMAL-p2X	Prokaryontischer Vektor zur Expression von rekombinanten MBP (Maltose-Bindungsprotein)-Fusionsproteinen in <i>E. coli</i> .	New England Biolabs

Expressionsvektor	Eigenschaften	Referenz
pCU/pNU	Eukaryontische Vektoren zur Expression von Ubc9-Fusionsproteinen.	Freundlicherweise von Dr. R. Niedenthal (Institut für Physiologische Chemie, Medizinische Hochschule Hannover) zur Verfügung gestellt.
pEGFP-C1-Occludin	Eukaryontischer Vektor zur Expression von N-terminal EGFP-getagtem Occludin.	In dieser Arbeitsgruppe von Dr. M. Dörfel konstruiert.
pcDNA-TCF-4	Eukaryontischer Vektor zur Expression von TCF-4.	Freundlicherweise von Prof. H. Clevers (Hubrecht Institute, Utrecht) zur Verfügung gestellt.
pEGFP-C2-SUMO1/SUMO2/3	Eukaryontischer Vektor zur Expression von EGFP-SUMO1/-SUMO2/3.	Freundlicherweise von Dr. R. Niedenthal (Institut für Physiologische Chemie, Medizinische Hochschule Hannover) zur Verfügung gestellt.
pCMV2-FLAG-SENP1-wt/-mut	Eukaryontischer Vektor zur Expression von FLAG-SENP1-wt/FLAG-SENP1-mut.	Freundlicherweise von Dr. Tobias Wagner (Zentrum für molekulare Biomedizin, Universität Jena) zur Verfügung gestellt.
p3xFLAG-CMV-10-ZO-2	Eukaryontischer Vektor zur Expression von N-terminal 3xFLAG-getagtem ZO-2.	Freundlicherweise von Dr. M. Sudol (Institute of Molecular and Cell Biology, Singapur) zur Verfügung gestellt.
pCS2+- β -Catenin	Eukaryontischer Vektor zur Expression von β -Catenin.	Huber et al. 1996
pCS2+- β -Catenin-S33A-myc ₆	Eukaryontischer Vektor zur Expression von stabilisiertem, C-terminal 6xmyc-getagtem β -Catenin.	Aberle et al. 1997
pCS2+- Δ NLEF-1-VP16	Eukaryontischer Vektor zur Expression von Δ NLEF-1-VP16.	Aoki et al. 1999
pGL3-S01234/pGL3-S Siamois5/0	Luciferase-Reportergenkonstrukt mit Promotorbereich aus dem Wnt-Zielgen, Siamois, der fünf LEF-1/TCF-4-Bindungsstellen aufweist bzw. bei dem die Bindungsstellen mutiert sind .	Freundlicherweise von Prof. D. Kimelman (University of Washington, Seattle) zur Verfügung gestellt.
pGL3-OT/pGL3-OF TOPFlash/FOPFlash	Luciferase-Reportergenkonstrukt mit artifiziellem Promotorbereich, in dem sich drei künstliche LEF-1/TCF-4-Bindestellen befinden bzw. mutiert sind.	Freundlicherweise von Dr. B Vogelstein (John Hopkins University, Baltimore) zur Verfügung gestellt.

2.4.3 Oligonukleotide

Tab. 4: Übersicht der verwendeten Oligonukleotide (Metabion) für Klonierungen. Restriktionsschnittstellen sind in der Sequenz unterstrichen.

Primer	Bezeichnung	Schnittstellen	Sequenz
ON 953	hSumo1 for BamHI BgIII Kozak	BamHI BgIII	GCG <u>GGA TCC AGA TCT</u> GCC GCC ATG TCT GAC CAG GAG GCA AAA C
ON954	hSumo1 rev processed +stop+BamHI	BamHI	GCG <u>GGA TCC</u> CTA ACC CCC CGT TTG TTC CTG
ON958	hSumo2/3 for BamHI BgIII Kozak	BamHI BgIII	GCG <u>GGA TCC AGA TCT</u> GCC GCC ATG TCC GAG GAG AAG CCC AAG
ON959	hSumo2/3 rev processed +stop+BamHI	BamHI	GCG <u>GGA TCC</u> CTA ACC TCC CGT CTG CTG CTG
ON961	mUbc9 for BamHI Kozak	BamHI	GCG <u>GGA TCC</u> GCC GCC ATG TCG GGG ATC GCC CTC AGC
ON962	mUbc9 rev +stop BamHI	BamHI	GCG <u>GGA TCC</u> TTA TGA GGG GGC AAA CTT CTT C
ON974	hSumo1DGG rev BamHI +stop	BamHI	GCG <u>GGA TCC</u> CTA CGT TTG TTC CTG ATA AAC TTC
ON975	hZO-2 for EcoRI Kozak	EcoRI	GCG <u>GAA TTC</u> GCC GCC ATG CCG GTG CGA GGA GAC
ON976	hZO-2 rev EcoRI +stop	EcoRI	GCG <u>GAA TTC</u> CTA TAA TTC TGT GTC CCG G
ON977	hZO-2 rev EcoRI -stop	EcoRI	GCG <u>GAA TTC</u> TAA TTC TGT GTC CCG GTA TC
ON1007	hSumo1DGG rev -stop BamHI	BamHI	GCG <u>GGA TCC</u> CGT TTG TTC CTG ATA AAC TTC
ON1039	hZO-2 for BamHI Kozak	BamHI	GCG <u>GGA TCC</u> GCC GCC ATG CCG GTG CGA GGA GAC
ON1040	hZO-2 rev BamHI +stop	BamHI	GCG <u>GGA TCC</u> CTA TAA TTC TGT GTC CCG G
ON1041	hZO-2 rev BamHI -stop	BamHI	GCG <u>GGA TCC</u> TAA TTC TGT GTC CCG GTA TC
ON1064	hZO-2-DN forw EcoRI Kozak I598	EcoRI	GCG <u>GAA TTC</u> GCC GCC ATG ATC CTG GCT TGT GGC AGA GGG
ON1074	hSumo1DGG rev BgIII BamHI +stop	BamHI BgIII	GCG <u>GGA TCC AGA TCT</u> CTA CGT TTG TTC CTG ATA AAC TTC
ON1084	hSUMO1 forw BamHI Kozak	BamHI	GCG <u>GGA TCC</u> GCC GCC ATG TCT GAC CAG GAG GCA AAA C

Primer	Bezeichnung	Schnittstellen	Sequenz
ON1204	hGSK3b forw EcoRI BglII Kozack	EcoRI BglII	GCG <u>GAA TTC AGA TCT</u> GCC GCC ATG TCA GGG CGG CCC AGA
ON1206	hGSK3b rev EcoRI BglII -stop	EcoRI BglII	GCG <u>GAA TTC AGA TCT</u> GGT GGA GTT GGA AGC TG

Tab. 5: Übersicht der verwendeten Oligonukleotide (Metabion) für ortsspezifische Mutagenese. Die mutierten Nukleotide sind in der Sequenz unterstrichen.

Primer	Bezeichnung	Sequenz
ON920	hZO-2 K759R mutagenesis	GAC TGG TTT CAA ACT GCT <u>AGA</u> ACG GAA CCA AAA GAT GCA GGA
ON921	hZO-2 K992R mutagenesis	AGC CCG CCC CCA GCA TTC <u>AGG</u> CCA GAG CCG CCC AAG GCC
ON1019	mUbc9 K14R mutagenesis	CGC CTT GCG CAG GAA AGG <u>AGA</u> GCC TGG AGG AAG GAC CAC C
ON1029	hSUMO2/3 Q89P mutagenesis	C ATC GAC GTG TTC CAG CAG <u>C₂G</u> ACG GGA GGT TAG GGA TCC
ON1042	hZO-2 K117 mutagenesis	AAG GTC GCT GCT ATT GTG GTC <u>AGG</u> AGG CCC CGG AAG GTC CAG GTG
ON1063	hZO-2 K730 mutagenesis	CTG CGA GAA GCT GGT TTC <u>AGG</u> AGA CCT GTG GTC TTA TTC

2.4.4 *Escherichia coli*-Stämme

Tab. 6: Übersicht über verwendete *E. coli* Stämme mit entsprechendem Genotyp.

<i>E. coli</i> -Stamm	Genotyp
BL21 DE3	F ⁻ ompT gal dcm lon hsdS _B (R _B ⁻ m _B ⁻) λ(DE3 [lacI lacUV5-T7 gene 1 ind1 sam7 nin5])
BL21 DE3 Rosetta	F ⁻ ompT hsdS _B (R _B ⁻ m _B ⁻) gal dcm λ(DE3 [lacI lacUV5-T7 gene 1 ind1 sam7 nin5]) pLysSRARE (Cam ^R)
XL1-Blue	endA1 gyrA96(nal ^R) thi-1 recA1 relA1 lac glnV44 F ['] [::Tn10 proAB ⁺ lacI ^q Δ(lacZ)M15] hsdR17(r _K ⁻ m _K ⁺)

2.5 Zellbiologische Materialien

2.5.1 Zelllinien

Tab. 7: Übersicht über verwendete Zelllinien.

Name	Spenderorganismus	Organ/Gewebe
HEK-293	human	Embryonale Nierenzellen
MDCKII	canin	Epithelzellen aus Hundenieren
MDCKII kd ZO-2	canin	Epithelzellen aus Hundenieren [Freundlicherweise von Dr. C. van Itallie (National Heart, Lung and Blood Institute; Bethesda) zur Verfügung gestellt]

2.5.2 Zellkulturmaterialien

- › DMEM (Dulbecco's Modified Eagle's Medium) High Glucose (Sigma-Aldrich)
- › MEM (Minimum Essential Medium Eagle) High Glucose (Sigma-Aldrich)
- › Sera Plus (Pan Biotech)
- › Dulbecco's Phosphate Buffered Saline With MgCl₂ and CaCl₂ (PBS^{+/+})(Sigma-Aldrich)
- › Penicillin/Streptomycin (Sigma-Aldrich)
- › Trypsin-EDTA (Sigma-Aldrich)

2.5.3 Transfektionsreagenzien

- › PEI (Polysciences Inc.)

2.6 Proteinbiochemische Materialien

2.6.1 Antikörper

Tab. 8: Übersicht der für Western Blots (WB), Immunpräzipitation (IP), Immunfluoreszenzen (IF) und Proximity Ligation Assays (PLA) verwendeten Primär- und Sekundärantikörper.

Antikörper	Verdünnung/ Konzentration	Typ	Referenz
Primärantikörper			
anti-β-Catenin	PLA: 1:300	Maus; monoklonal	BD Transduction Laboratories
anti-FLAG	PLA: 1:300	Kaninchen; polyklonal	Sigma-Aldrich
anti-FLAG-M2	WB: 1:10000 IP: 2 µg	Maus; monoklonal	Sigma-Aldrich
anti-GAPDH	WB: 1:1000	Maus; monoklonal	Millipore
anti-GFP	WB: 1:5000	Maus; monoklonal	Clonetech

Antikörper	Verdünnung/ Konzentration	Typ	Referenz
Primärantikörper			
anti-GSK3β	PLA: 1:300	Maus; monoklonal	BD Transduction Laboratories
anti-GST	WB: 1:10000	Kaninchen; polyklonal	J. Wienands, Universität Bielefeld
anti-Lamin A/C	WB: 1:1000	Maus; monoklonal	BD Transduction Laboratories
anti-MBP	WB: 1:4000	Maus; monoklonal	Sigma-Aldrich
anti-myc (Klon 9E10)	WB: 1:4000 IP: 2 µg	Maus; monoklonal	I. Petzold, gereinigt aus Hybridoma-Überstand
anti-P5D4	PLA: 1:300	Maus; monoklonal	AG Friedrich, Universitätsklinikum Jena
anti-SUMO1	PLA: 1:100	Maus; monoklonal	Santa Cruz Biotechnology
anti-SUMO1	WB: 1:4000 PLA: 1:100	Kaninchen; polyklonal	SUMOLink Kit, Active Motif
anti-Ubc9	WB: 1:500	Maus; monoklonal	BD Transduction Laboratories
anti-ZO-2	WB: 1 µg/ml IF: 1:300 PLA: 1:300	Kaninchen; polyklonal	Invitrogen
Sekundärantikörper			
anti-Maus IgG; sekundär	1:10000	Ziege; POD-gekoppelt	Dianova
anti-Kaninchen IgG; sekundär	1:10000	Ziege; POD-gekoppelt	Dianova
Fluorophor-konjugierte Sekundärantikörper			
Alexa Fluor® 488 anti-Maus IgG	1:1000	Ziege	Life Technologies
Alexa Fluor® 594 anti-Kaninchen IgG	1:1000	Ziege	Life Technologies

2.6.2 Enzyme

- › Pwo-DNA-Polymerase (Roche Applied Science)
- › Quick-T4-DNA-Ligase (New England Biolabs)
- › Restriktionsenzyme (New England Biolabs und Roche Applied Science)
- › RNase A (Roth)
- › Shrimp Alkaline Phosphatase - SAP (Fermentas)
- › T4-Polynukleotid-Kinase (New England Biolabs)
- › Taq-DNA-Polymerase (New England Biolabs)

2.6.3 Protein- und DNA-Molekulargewichtsstandards

- › 1 kb Ladder (Fermentas)
- › Page Ruler™ Prestained Protein Ladder (Thermo Scientific)
- › Page Ruler™ Unstained Protein Ladder (Thermo Scientific)

2.7 Reaktionskits

- › Change-IT Multiple Mutation Site Directed Mutagenesis Kit (USB)
- › NucleoBond® PC100 und NucleoBond® Xtra Midi-Kits (Macherey-Nagel)
- › Quick Ligation Kit (New England Biolabs)
- › Zymoclean™ DNA Recovery Kit (Zymo Research)
- › Duolink *in situ* Kit (Olink Bioscience)
- › SUMOlink SUMO1 Kit (Active Motif)

3 Methoden

3.1 Molekularbiologische Methoden

3.1.1 Pwo-PCR

Für die PCR-Amplifikation von Inserts wurde die thermostabile Pwo-DNA-Polymerase mit 3'→5' Exonuklease Korrekturlesefunktion verwendet.

<u>PCR-Ansatz</u>	<u>Programm</u>	
> 25 µl 2 × Pwo Master	95°C 2 min	} 30 Zyklen
> 2 µl Primer I (10 pmol/µl)	95°C 30 sec	
> 2 µl Primer II (10 pmol/µl)	55-70°C 30 sec	
> 500ng DNA-Template	72°C 1-3 min	
> ad 20 µl dH ₂ O	72°C 5 min	
> 15°C ∞		

3.1.2 Restriktionsverdau von DNA

Für den Restriktionsverdau wurden Typ II Restriktionsendonukleasen verwendet, die exakt an 4 bis 8 Basenpaare langen, palindromischen Erkennungssequenzen schneiden.

Restriktionsverdau-Ansätze:

	Vektor	Plasmid-Insert	Pwo-PCR
10x Puffer	2 µl	2 µl	2 µl
DNA	5 µg	5 µg	17 µl
Restriktionsenzym	1 µl	1 µl	1 µl
dH₂O	ad 20 µl	ad 20 µl	ad 20 µl

Die Ansätze wurden nach Angaben des Herstellers inkubiert und nach Bedarf hitzeinaktiviert.

3.1.3 Elektrophoretische Auftrennung von DNA

1x TAE-Puffer: 40 mM Tris; 20 mM Essigsäure; 1 mM EDTA

6x DNA-Probenpuffer: 40% (w/v) Glycerol; 10 mM EDTA; 50 mM Tris/HCl pH 7,5; 0,01% (w/v) Xylencyanol; 0,05% (w/v) Orange G

Zur elektrophoretischen Auftrennung von DNA aus Pwo-PCR und Restriktionsverdau wurde die Agarose-Gelelektrophorese genutzt. Je nach Größe der aufzutrennenden Fragmente wurden Agarose-Konzentrationen von 0,8 - 2% (w/v) eingesetzt. Zum Anfärben der Nukleinsäuren wurde RedSafe™ (1:50000) verwendet. Die Nukleinsäuren wurden mit 6x DNA-Probenpuffer versetzt und auf einem Agarosegel elektrophoretisch aufgetrennt. Als Größenstandard wurde der GeneRuler™ 1 kb genutzt. Die DNA-Fragmente gewünschter Größe wurden aus dem Gel ausgeschnitten und über das Zymoclean™ Gel DNA Recovery Kit nach den Angaben des Herstellers aufgereinigt.

3.1.4 SAP-Behandlung

Um eine Religation des linearisierten Vektors bei der Ligation weitgehend zu verhindern, wurden 5`-Phosphatgruppen freier DNA-Enden mit dem Enzym SAP (shrimp alkaline phosphatase) hydrolytisch abgespalten.

SAP-Ansatz

- > 2 µl 10x SAP-Puffer
- > x µl Vektor
- > 1 µl SAP
- > ad 20 µl dH₂O

Die Ansätze wurden 1h bei 37°C inkubiert und bei Bedarf hitzeinaktiviert.

3.1.5 Ligation von DNA-Inserts in Vektoren

Für die Ligation von Inserts in Zielvektoren wurde die T4-DNA-Ligase verwendet. Diese katalysiert die kovalente Verknüpfung von 3`-Hydroxylgruppen des Vektors mit den 5`-Phosphatgruppen des Inserts.

Ligations-Ansatz

- > 5 µl 2x Quick-Ligase-Puffer
- > 0,5 µl Vektor
- > 3,5 µl Insert
- > 1 µl Quick-T4-DNA-Ligase
- > ad 10 µl dH₂O

Die Ansätze wurden 5 min bei Raumtemperatur inkubiert und anschließend in *E. coli* XL1-Blue transformiert.

3.1.6 Transformation von Plasmid-DNA in *E. coli*

LB-Medium: 1% (w/v) Bacto-Trypton; 5% (w/v) Bacto-Yeast Extract; 86 mM NaCl

LB-Amp-Agar: 1,5% (w/v) Agar in LB-Medium; 50 µg/ml Ampicillin

LB-Amp/Kana-Agar: 1,5% (w/v) Agar in LB-Medium; 50 µg/ml Ampicillin; 33,3 µg/ml Kanamycin

Zur Aufnahme von Plasmid-DNA in kompetente Bakterien (Transformation) wurde die Hitzeschock-Methode verwendet (Hanahan 1983). Im Anschluss an die Ligationsreaktion wurden der Ligationsansatz auf 150 µl kompetente *E. coli* XL1-Blue gegeben und 15 min auf Eis inkubiert. Danach erfolgte der Hitzeschock durch Inkubation der Zellen für 1 min bei 42°C. Der Transformationsansatz wurde mit 500 µl LB-Medium versetzt, für 45-60 min bei 37°C inkubiert und anschließend auf einer LB-Agarplatte ausplattiert. Diese wurden für 12-16 h bei 37°C im Brutschrank kultiviert. Für die Transformation von Plasmid-DNA aus Mini- oder Midi-Präparationen wurden 200-500 ng Plasmid in 20 µl kompetente Zellen transformiert. Die Hitzeschock-Transformation erfolgte für 1 min (*E. coli* XL1-Blue) bzw. 2 min für den *E. coli* Stamm BL21 DE3/BL21 DE3 Rosetta. Es wurden 30 µl des Transformationsansatzes mit entsprechenden Antibiotika ausplattiert und bei 37°C im Brutschrank kultiviert.

3.1.7 Isolierung von Plasmid-DNA aus *E. coli*

LB-Amp-Medium: 1% (w/v) Bacto-Tryptone; 5% (w/v) Bacto-Yeast Extract; 86 mM NaCl; 50 µg/ml Ampicillin

P1-Puffer (Resuspensionspuffer): 50 mM Tris/HCl pH 8,0; 100 µg/ml RNase A; 10 mM EDTA

P2-Puffer (Lysepuffer): 200 mM NaOH; 1% (w/v) SDS

P3-Puffer (Neutralisationspuffer): 3 M Kaliumacetat pH 5,5

TE-Puffer: 1 mM EDTA; 10 mM Tris/HCl pH 8,0

Zur Isolation von Plasmid-DNA wurden *E. coli* des Stammes XL1-Blue verwendet und mit dem gewünschten Plasmid transformiert. Für eine Mini-Präparation von Plasmid-DNA wurden die Bakterien einer alkalischen Lyse unterzogen. Dazu wurde eine 2 ml Übernachtkultur der zuvor transformierten Klone, bei 5000 Upm für 3 min bei Raumtemperatur abzentrifugiert. Anschließend wurde die Bakterien mit 150 µl P1-Puffer resuspendiert, mit 150 µl P2-Puffer lysiert, mit 150 µl P3-Puffer neutralisiert und unlösliche Zellbestandteile sedimentiert (10 min, 4°C, 14000 Upm). Der Überstand wurde erneut abzentrifugiert (5 min, 4°C, 14000 Upm) und die Plasmid-DNA anschließend mit 900 µl eiskaltem Ethanol gefällt (10 min, 4°C, 14000 Upm). Das DNA-

Pellet wurde mit 70% (v/v) Ethanol gewaschen, bei Raumtemperatur getrocknet und in 20 µl TE-Puffer aufgenommen.

Zur Isolation größerer Mengen Plasmid-DNA wurde das NucleoBond® Xtra Midi Kit (Macherey-Nagel) nach Angaben des Herstellers verwendet.

3.1.8 Ortsspezifische Mutagenese

Die Mutagenese erfolgte mit dem Change-IT™ Multiple Mutation Site Directed Mutagenesis Kit (USB) entsprechend den Angaben des Herstellers. Damit ist es möglich einzelne Basen in der Ziel-DNA auszutauschen und somit die Aminosäuresequenz des Proteins zu verändern. Für die Mutagenese-PCR wurden die Oligonukleotide zunächst wie folgt phosphoryliert:

Phosphorylierungs-Ansatz

- › 5 µl 10 × PNK-Puffer
- › 5 µl Oligonukleotid (100 pmol/µl)
- › 5 µl ATP (10 mM)
- › 0,5 µl T4-PNK
- › ad 50 µl dH₂O

Die Ansätze wurden für 30 min bei 37°C inkubiert und anschließend für 10 min bei 65°C hitzeinaktiviert.

Mutagenese-PCR:

- › 2 µl 10 × Change-IT Puffer
- › 0,5 µl Oligo I (10 pmol/µl)
- › 0,5 µl Oligo II reverse Primer (10 pmol/µl)
- › 1 µl Vektor (10 ng/µl)
- › 0,8 µl Change-IT Enzym
- › ad 20 µl dH₂O

Programm:

95°C 2 min	} 25 Zyklen
95°C 30 sec	
60°C 30 sec	
68°C 15 min	
68°C 15 min	
4°C ∞	

Der Ansatz wurde mit DpnI verdaut, in *E. coli* XL1-Blue transformiert, die Plasmid-DNA isoliert und anschließend sequenziert.

3.1.9 DNA-Sequenzierung

Um klonierte oder mutierte DNA-Sequenzen zu sequenzieren, wurde die Didesoxymethode nach Sanger genutzt (Sanger et al. 1977). Dazu wurden 100 ng/ μ l der aufgereinigten Plasmid-DNA und 5 μ M Primer an die Firma GATC gesendet.

3.2 Zellbiologische Methoden

3.2.1 Kultivierung von Zellen

Für die Experimente wurden HEK-293- und MDCKII-Zellen verwendet. HEK-293-Zellen wurden in DMEM (High Glucose, Dulbecco's Modified Eagle Medium, PAA) Medium mit 10% (v/v) hitzeinaktiviertem FKS (Sera Plus, Pan-Biotech), 100 U/ml Penicillin (PAA) und 100 μ g/ml Streptomycin (PAA) in 10 cm Zellkulturschalen bei 37°C, 5% CO₂ und 95% Luftfeuchtigkeit im Begasungsbrutschrank kultiviert. Alle Arbeiten wurden unter einer sterilen Werkbank durchgeführt und ausschließlich steril verpackte Einwegprodukte bzw. autoklavierte Materialien verwendet. Die Zellen wurden 2x pro Woche passagiert, indem sie mit Trypsin-EDTA-Lösung (PAA) inkubiert und in einer 1:2-1:10 Verdünnung neu ausgesät wurden. Die Zelldichte wurde mit dem CASY® Cell Counter nach Angaben des Herstellers bestimmt und die gewünschte Zellzahl ausgesät.

3.2.2 Einfrieren und Auftauen von Zellen

Gefriermedium: 10% (v/v) DMSO; 20% (v/v) FCS; 70% (v/v) Medium

Die Zellen wurden mit Trypsin/EDTA (PAA) abgelöst, bei 800 Upm für 5 min pelletiert und der Überstand verworfen. Anschließend wurden die Zellen in 1 ml Gefriermedium resuspendiert, in Kryo-Röhrchen überführt und zunächst auf Stufe 3 für 30 min und anschließend für 10 min auf Stufe 10 in dem Einfriergerät Nicool LM10 im Stickstoffdampf eingefroren. Die Zellen wurden bis zum weiteren Gebrauch in einem Stickstoff-Kryotank gelagert.

Die eingefrorenen Zellen wurden zügig im Wasserbad bei 37°C aufgetaut, in Medium aufgenommen und 5 min bei 800 Upm pelletiert. Der Überstand wurde verworfen, die Zellen in 10 ml frischem Medium resuspendiert und in einer 10 cm Schale im Inkubator für 24 h kultiviert. Anschließend wurden die Zellen mit PBS^{+/+} gewaschen und nach Bedarf weiter passagiert.

3.2.3 Transiente Transfektion eukaryontischer Zellen

Zur transienten Transfektion eukaryontischer Zellen wurde Polyethylenimin (PEI, Polysciences Inc.) verwendet. Dazu wurde ein Transfektionsmix aus Medium (ohne FKS und Antibiotikum), Vektor-DNA und PEI (1 mg/ml) (Verhältnis DNA: PEI 1:4) hergestellt und 30 min bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wurde der Transfektionsansatz tropfenweise auf die Zellen gegeben und 24-48 h im Brutschrank kultiviert.

3.2.4 Indirekte Immunfluoreszenz

Fixierlösung: 2% (w/v) Paraformaldehyd in PBS^{+/+}

Permeabilisierungslösung: 0,5% (v/v) Triton X-100 in PBS^{+/+}

Blockierungslösung: 1% (w/v) BSA Fraktion V in PBS^{+/+}

Für die indirekte Immunfluoreszenzmikroskopie wurden $0,5 \times 10^6$ MDCK-Zellen je 6-Well auf 18×18 mm großen Deckgläschen, die zuvor mit Ethanol abgeflammt wurden, ausgesät. Die Zellen wurden 24 h später transient transfiziert, nach weiteren 24 h dreimal mit PBS^{+/+} gewaschen und durch Inkubation mit 2 ml Fixierlösung für 30 min bei 4°C fixiert. Durch Inkubation mit 2 ml Permeabilisierungslösung für 15 min bei Raumtemperatur wurden die Zellen zusätzlich permeabilisiert. Nach dreimaligem Waschen mit PBS^{+/+} wurden unspezifische Bindungen durch Inkubation der Deckgläschen für 30 min mit 100 µl Blockierungslösung abgesättigt. Die Zellen wurden mit 100 µl Primärantikörper für 1–2 h in einer feuchten Kammer inkubiert, fünfmal mit PBS^{+/+} gewaschen und für 1 h bei Raumtemperatur unter Lichtausschluss mit 100 µl Sekundärantikörper und 4',6-Diamidino-2-phenylindol (DAPI)-Lösung (0,1 µg/ml) zur Färbung der Zellkerne inkubiert. Die Fixierung, Permeabilisierung, Blockierung und Inkubation mit Primär- und Sekundärantikörpern der Zellen fand in einer feuchten Kammer statt. Nach fünfmaligem Waschen mit PBS^{+/+} wurden die Zellen in Mowiol 4-88 auf Objektträgern eingebettet. Die Analyse erfolgte an einem inversen Fluoreszenzmikroskop ApoTome (Zeiss).

3.2.5 Kern-Cytoplasma-Fraktionierung

Fraktionierungspuffer: 10 mM Tris/HCl pH 7,4; 10 mM NaCl; 3 mM MgCl₂; 0,5% (v/v) NP-40

RIPA-Puffer: 50 mM Tris/HCl pH 8,0; 150 mM NaCl; 0,1% (v/v) SDS; 1% (v/v) NP-40; 0,5% Natriumdesoxycholat

Zur Zellfraktionierung wurden 1×10^6 MDCKII-Zellen pro Well in 6 well-Platten ausgesät und 24 h später mit den entsprechenden Plasmiden mit PEI transfiziert. Die Zellyse erfolgte 24 h nach Transfektion. Dazu wurden die Zellen nach zweimaligem Waschen mit PBS^{+/+} mit jeweils 200 µl Fraktionierungspuffer lysiert, für 30 sec gevortext und anschließend die Zellkerne sedimentiert (5 min, 4°C, 4000 Upm). Der Überstand wurde als Cytoplasma-Fraktion abgenommen. Das Kernpellet wurde dreimal mit Fraktionierungspuffer gewaschen und jeweils 30 sec gevortext. Der Überstand wurde abgenommen, das Kernpellet in 200 µl RIPA-Puffer 5 min auf Eis inkubiert und die Kerne mit 2x 15 Pulsen Ultraschall (Intensität 80%, Cycle 0,5) aufgeschlossen. Die Kern- und Cytoplasma-Fraktion wurde mit SDS-Probenpuffer versetzt, die Proteine über eine SDS-PAGE aufgetrennt und mit spezifischen Antikörpern analysiert.

3.2.6 Kern-Rekrutierungs-Assay

Fixierlösung: 2% (w/v) Paraformaldehyd in PBS^{+/+}

Permeabilisierungslösung: 0,5% (v/v) Triton X-100 in PBS^{+/+}

Blockierungslösung: 1% (w/v) BSA Fraktion V in PBS^{+/+}

Für den Kern-Rekrutierungs-Assay wurden MDCKII-Zellen transient mit Lipofectamin 2000 (Invitrogen), entsprechend den Angaben des Herstellers, transfiziert. Die Zellen wurden wie in 3.2.4 fixiert bzw. permeabilisiert und unspezifische Bindungen durch Inkubation mit Blockierungslösung für 30 min abgesättigt. Die Zellen wurden mit Primärantikörper (F3165, Sigma-Aldrich; Verdünnung 1:50) über Nacht inkubiert, fünfmal mit PBS^{+/+} gewaschen und für 1 h bei Raumtemperatur unter Lichtausschluss mit Sekundärantikörper Alexa Fluor® 488 goat anti-mouse (A11001, Life Technologies; Verdünnung 1:300) und 4',6-Diamidino-2-phenylindol (DAPI)-Lösung inkubiert. Nach dreimaligem Waschen mit PBS^{+/+} wurden die Zellen in antifade Reagent Vectashield (H-1000, Vector Laboratories) auf Objektträgern eingebettet. Die Analyse erfolgte an einem Eclipse E600 Mikroskop (Nikon) unter Verwendung eines 63x Objectivs.

3.2.7 Dual-Luciferase-Reportergen-Assay

PPBT-Lysepuffer: 100 mM K₃PO₄; 0,2% (v/v) Triton-X 100

Lösung 1 (Firefly): 20 mM Tricine; 2,67 mM MgSO₄; 100 µM EDTA; 530 µM ATP; 33,3 mM DTT; 270 µM Coenzym A; 470 µM D-Luziferin pH 7,8 (KOH)

Lösung 2 (Renilla): 1,1 M NaCl; 220 mM K₂HPO₄; 2,2 mM Na-EDTA; 6,58 mM BSA; 1,43 µM Coelenterazin; 1,3 mM NaN₃ pH 5,3 (H₃PO₄)

Um den Einfluss von ZO-2 Konstrukten auf die von β -Catenin/TCF-4 vermittelte Transkriptionsaktivität zu analysieren, wurde ein dualer Reportergen-Assay genutzt. Hierbei ist es möglich die Aktivität von zwei Luciferasen zu vermessen, da diese eine unterschiedliche Substratspezifität besitzen und somit die Biolumineszenzreaktionen unterschieden werden können. Zum einen die Expression einer regulierbaren Firefly-Luciferase, ein Enzym des Leuchtkäfers (*Photinus pyralis*), und zum anderen die konstitutiv aktive Renilla-Luciferase, ein Enzym der Seefeder (*Renilla reniformis*). Da die Expression der Renilla-Luciferase konstitutiv erfolgt und dadurch unabhängig von der Transfektionseffizienz ist, kann diese als interner Standard genutzt werden. Es wurden die Luciferase-Reportergen-Konstrukte TOPFlash und Siamois5 genutzt. Als Kontrolle wurden die entsprechenden Reportergenkonstrukte mit mutierten LEF-1/TCF-4-Bindungsstellen verwendet (FOPFlash und Siamois0). Es wurden 2 x 10⁵ Zellen pro Well in 24-Well Schalen ausgesät, 24 h später transfiziert und nach weiteren 24 h mit 100 µl PPBT-Puffer pro Well lysiert. Die Messung der Biolumineszenzreaktionen erfolgte am GloMax Luminometer (Promega) oder am Mithras Mikroplattenreader (Berthold Technologies). Zur Transfektionskontrolle wurde jeweils ein Aliquot des Zelllysats mit 2x SDS-Probenpuffer versetzt, mit einer SDS-PAGE elektrophoretisch aufgetrennt, ein Western Blot durchgeführt und mit spezifischen Antikörpern detektiert. Es wurde für alle Proben eine Doppelbestimmung durchgeführt. Die Aktivität der Firefly-Luciferase wurde durch Zugabe von 50 µl Lösung 1 für 5 sec gemessen. Anschließend wurde in einer zweiten Messung die Aktivität der Renilla-Luciferase durch Zugabe von 50 µl Lösung 2 für 5 sec vermessen. Die in Lösung 2 enthaltenen Substanzen stoppen die Firefly-Reaktion und leiten durch eine Änderung des pH-Wertes und Zugabe des Substrates Coelenterazin die Renilla-Reaktion ein. Der Quotient aus Firefly- und Renilla-Werten wurde auf den verwendeten Kontrollansatz normiert.

3.2.8 Duolink Assay

Um Protein-Protein-Interaktionen und Protein-Modifikationen unter dem Mikroskop sichtbar zu machen, wurde ein Proximity Ligation Assay (PLA) mit Hilfe des Duolink *in situ* Kits der Firma Olink Bioscience durchgeführt. MDCKII-Zellen wurden wie unter 3.2.4 ausgesät, fixiert und permeabilisiert. Anschließend wurde der Assay entsprechend den Angaben des Herstellers durchgeführt. Dabei wurden die Zellen zuerst mit spezifischen Primär-Antikörpern und nach Waschen mit Oligonukleotid-(PLA-Probes) konjugierten Sekundär-Antikörpern inkubiert. Die Oligonukleotide wurden in einem nächsten Schritt in einer Ligationsreaktion zu einem Ring hybridisiert, welche nur möglich ist, wenn sich die Proteine in räumlicher Nähe befinden (<40 nm). Durch Zugabe von Nukleotiden und fluoreszenzmarkierten Oligonukleotiden sowie einer Polymerase startet eine Rolling circle amplification (RCA), welche ein konkatemeres Produkt generiert. Die fluoreszenzmarkierten Oligonukleotide hybridisieren mit dem RCA-Produkt. Die Signale wurden als distinkte Fluoreszenz-Punkte in Z-Stapel-Aufnahmen an einem inversen Fluoreszenzmikroskop ApoTome (Zeiss) analysiert.

3.3 Proteinbiochemische Methoden

3.3.1 Proteinbestimmung nach Bennett (modifizierte LOWRY-Methode)

Lösung A: 20 g/l Na_2CO_3 ; 4 g/l NaOH; 1,6 g/l Na-Tartrat x $2\text{H}_2\text{O}$; 10 g/l SDS

Lösung B: 4% (w/v) $\text{CuSO}_4 \times 5\text{H}_2\text{O}$

Für die Bestimmung des Proteingehalts wurde die nach LOWRY modifizierte Bennett-Methode genutzt. Dazu wurde die Probe mit 50 μl Natrium-Desoxycholat versetzt, 1 ml 10% (v/v) Trichloressigsäure zugegeben, 30 sec geschüttelt und 2 min bei 6000 Upm bei Raumtemperatur zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen, das Sediment mit 1 ml Lösung A+B (100 Teile A + 1 Teil B) versetzt und geschüttelt bis das Protein vollständig gelöst ist. Anschließend wurden 100 μl Folin-Ciocalteu-Phenolreagenz (Merk) zugegeben und nach 30 min erfolgte die Messung der Absorption bei 750 nm gegen den verwendeten Lysepuffer als Leerwert. Parallel erfolgte die Erstellung einer Eichgerade, indem definierte BSA-Mengen im entsprechenden Puffer vermessen wurden.

3.3.2 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)

1x SDS-Laufpuffer: 24,8 mM Tris; 192 mM Glycin; 0,01% (w/v) SDS

2x SDS-Probenpuffer: 65 mM Tris/HCl pH 6,8; 3% (w/v) SDS; 30% (v/v) Glycerol; 5% (v/v) β -Mercaptoethanol; 4 mg/ml Bromphenolblau; 4 mg/ml Pyronin Y

Trenngelpuffer : 1,5 M Tris/HCl pH 8,8

Sammelgelpuffer: 0,5 M Tris/HCl pH 6,8

Tab. 9: Zusammensetzung von zwei 0,75 mm dicken PAA-Gelen.

Acrylamid-Konzentration	Trenngel			Sammelgel
	7,5%	10%	12%	4,5%
30% Acrylamid	2,5 ml	3,33 ml	4 ml	0,8 ml
Tris/HCl pH 8,8	2,5 ml	2,5 ml	2,5 ml	–
Tris/HCl pH 6,8	–	–	–	1,3 ml
dH ₂ O	4,8 ml	3,97 ml	3,3 ml	2,8 ml
10% SDS	100 μ l	100 μ l	100 μ l	50 μ l
10% APS	100 μ l	100 μ l	100 μ l	50 μ l
TEMED	13,4 μ l	13,4 μ l	13,4 μ l	10,2 μ l

Zur elektrophoretischen Auftrennung von Proteinen wurde eine diskontinuierliche SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese durchgeführt. Es wurde ein vertikales System der Firma Bio-Rad mit Gelen der Größe 80 × 85 × 0,75 mm bzw. 80 × 85 × 1 mm verwendet. Das Sammelgel enthielt eine Acrylamid-Konzentration von 4,5%, die Konzentration der Trenngele betrug, abhängig von den aufzutrennenden Proteinen, 7,5%–12%. Die Proben wurden im Verhältnis 2:1 mit 2x SDS-Probenpuffer versetzt, 2-5 min bei 96°C aufgeköcht und 15-20 μ l aufgetragen. Die Gelelektrophorese wurde mit 70 V gestartet und anschließende Auftrennung erfolgte bei 120-200 V.

3.3.3 Western Blot und Immundetektion

1x Tankblotpuffer: 25 mM Tris; 192 mM Glycin; 10% (v/v) Ethanol (vergällt)

Tris-buffered Saline Tween (TBST): 10 mM Tris/HCl pH 7,5; 150 mM NaCl; 0,1% (v/v) Tween 20

ECL-Lösung: 100 mM Tris/HCl pH 8,8; 12,5 mM Luminol; 2 mM IPBA (Iodophenylboronic acid)

Die durch die SDS-PAGE aufgetrennten Proteine wurden mit Elektrotransfer unter Nutzung des Tankblot-Verfahrens für 1 h bei 100 V auf eine PVDF- (Polyvinylidenfluorid) Membran geblottet. Die Membran wurde 1 h bei

Raumtemperatur oder über Nacht bei 4°C blockiert und die übertragenen Proteine mit spezifischen primären Antikörpern für 1 h bei Raumtemperatur oder über Nacht bei 4°C detektiert. Unspezifisch gebundene Antikörper wurden durch Waschen für 15 min mit TBST entfernt und die Membran mit Peroxidase-gekoppeltem Sekundärantikörper 1 h bei Raumtemperatur inkubiert. Nach 15-minütigem Waschen mit TBST erfolgte die Detektion mit ECL-Lösung (1 ml ECL-Lösung und 0,53 µl H₂O₂) und die Dokumentation der Signale in der G-Box (Syngene).

3.3.4 Coomassie-Färbung von Proteinen in SDS-Polyacrylamidgelen

Coomassie-Färbelösung: 0,2% (w/v) Coomassie R250; 50% (v/v) Methanol; 5% (v/v) Essigsäure

Entfärbelösung: 40% (v/v) Ethanol; 10% (v/v) Essigsäure

Zur Färbung von Proteinen wurden die SDS-Polyacrylamidgele 1 h in Coomassie-Färbelösung bei Raumtemperatur inkubiert und nach Bedarf entfärbt.

3.3.5 Expression und Aufreinigung rekombinanter Proteine

LB-Medium: 1% (w/v) Pepton; 0,5% (w/v) Hefeextrakt; 1% NaCl, pH 7.5

M9 Minimal-Medium: 47,7 mM Na₂HPO₄; 22 mM KH₂PO₄; 18,8 mM NH₄Cl; 8,5 mM NaCl; 2 mM MgSO₄; 0,1 mM CaCl₂; 0,4% (w/v) Glukose

Ampicillin Endkonzentration: 50 µg/ml

3.3.5.1 Induktion der Proteinexpression

Die für den *in vitro* Assoziationsassay und die *in vitro* SUMOylierung verwendeten rekombinanten Proteine, wurden jeweils in den *E. coli* Stämmen XL1-Blue, BL21 DE3 und BL21 DE3 Rosetta exprimiert und anschließend aufgereinigt. Dazu wurden spezielle Expressionssysteme genutzt, in denen der *tac*-Promotor durch den *Lac*-Repressor inhibiert wird. Die Zugabe von IPTG (Isopropyl-β-D-thiogalactopyranosid) und die daraus resultierende Konformationsänderung und Dissoziation des Repressors führt zur Promotor-Aktivierung und der Transkription der Gensequenz.

Zunächst wurden die entsprechenden Vektoren in *E. coli* transformiert, eine Einzelkolonie in 50 ml LB-Medium mit dem jeweiligen Antibiotikum angeimpft und als Vorkultur für 16-18 h bei 37°C und 190 Upm im Inkubationsschüttler inkubiert. Die Hauptkultur [400 ml LB-Medium mit 1% (w/v) Glukose] wurde mit 20 ml der Vorkultur angeimpft und bei 37°C und 190 Upm bis zur OD₅₇₈ 0,5-0,8 kultiviert. Die Expression der MBP-Fusionsproteine wurde in *E. coli* XL1-Blue bei einer OD₅₇₈ von 0,5-0,8 mit 1 mM IPTG für 1 h bei 37°C im Inkubationsschüttler (190 Upm) induziert. GST-ZO-2

wurde in *E. coli* BL21 DE3 bei einer OD₅₇₈ von 0,6 abzentrifugiert (15 min, 4°C, 4500 Upm), in 10 ml M9-Minimal-Medium resuspendiert und in 400 ml M9-Minimal-Medium für 1 h bei 37°C inkubiert. Anschließend erfolgte die Induktion mit 1 mM IPTG für 16–18 h bei 17°C im Inkubationsschüttler (190 Upm). Für die Expression von GST-ΔNZO-2 wurden *E. coli* BL21 DE3 Rosetta bei einer OD₅₇₈ von 0,5-0,8 mit 1 mM IPTG für 1 h bei 37°C im Inkubationsschüttler (190 Upm) induziert.

3.3.5.2 Affinitätschromatographische Aufreinigung rekombinanter Proteine

Für GST- und MBP-Fusionsproteine wurden folgende Säulenmaterialien, Lyse-, Wasch- und Elutionspuffer verwendet.

GST-Fusionsproteine:

Säulenmaterial:	Glutathion-Agarose-Beads
Lysepuffer:	PBS ^{+/+}
Waschpuffer:	PBS ^{+/+}
Elutionspuffer:	100 mM NaCl, 40 mM Tris/HCl pH 8,0; 20 mM Glutathion

MBP-Fusionsproteine:

Säulenmaterial:	Amylose-Resin
Lysepuffer:	100 mM NaCl, 40 mM Tris/HCl pH 8,0
Waschpuffer:	100 mM NaCl, 40 mM Tris/HCl pH 8,0
Elutionspuffer:	100 mM NaCl, 40 mM Tris/HCl pH 8,0; 20 mM Maltose

Nach der Induktion wurden die Bakterien pelletiert (15 min, 4°C, 4500 Upm), das Pellet in 5 ml Lysepuffer resuspendiert und mit CompleteTM-EDTA versetzt. Die Bakterien wurden auf Eis mit der Sonotrode MS7 (7 mm), durch 3 x 15 Ultraschall-Pulse (Intensität 80%, Cycle 0,5) aufgeschlossen. Die unlöslichen Zellbestandteile wurden nach Aufschluss der Bakterien durch Zentrifugation (30 min, 4°C, 14000 Upm) abzentrifugiert. Der Überstand wurde auf Säulen (Bio-Rad Poly-Prep® Chromatography Column) mit dem jeweiligen Säulenmaterial (1 ml Säulenvolumen) gegeben, die zuvor mit 10 ml Lysepuffer äquilibriert wurden. Die Säule wurde zweimal mit einem Säulenvolumen gewaschen und die Fusionsproteine mit 10 ml Elutionspuffer in 0,5 ml Fraktionen eluiert. Alle Schritte der Aufreinigung wurden bei 4°C durchgeführt, um eine Denaturierung der Proteine zu verhindern. Zur Kontrolle der Proteinexpression wurden die ersten 9 Fraktionen in einer SDS-PAGE aufgetrennt und durch Coomassie-Färbung detektiert.

3.3.5.3 Dialyse von GST-Fusionsproteinen

Dialysepuffer: 50 mM NaCl; 20 mM Tris/HCl pH 8.0

Die protein-enthaltenden Fraktionen wurden in 2 l Dialysepuffer bei 4°C für 20-24 h, unter Verwendung von Dialyseschläuchen mit einer Ausschlussgröße von 14 kDa, dialysiert.

3.3.6 *In vitro* Assoziationsassay (GST-Pull-down)

Puffer A: 20 mM Tris/HCl pH 8,5; 100 mM NaCl; 1 mM EDTA; 0,25% (v/v) NP-40; 10% (w/v) Glycerol

Um die direkte Protein-Protein-Interaktion von Ubc9 und ZO-2 *in vitro* zu untersuchen, wurde GST-ZO-2 und MBP-Ubc9 rekombinant in *E. coli* exprimiert und aufgereinigt. Anschließend wurden jeweils ca. 2 µg MBP und MBP-Fusionsprotein bzw. GST und GST-Fusionsprotein eingesetzt und auf 200 µl mit Puffer A aufgefüllt. Um unlösliche Proteine zu pelletieren, wurden die Ansätze im Überkopfschüttler vorinkubiert (20 min, 4°C, 5 Upm) und abzentrifugiert (10 min, 4°C, 14000 Upm). Der Überstand wurde mit 35 µl äquilibrierten GSH-Beads versetzt, eine Stunde bei 4°C im Überkopfschüttler inkubiert und die GSH-Beads sedimentiert (2 min, 4°C, 2700 Upm). Der Überstand wurde abgenommen und die GSH-Beads 4 x mit 200 µl Puffer A gewaschen. Nach dem letzten Waschschrift wurde 40 µl 2x SDS-Probenpuffer zugegeben, jeweils 20 µl in einer SDS-PAGE aufgetrennt und die PVDF-Membran nach Elektroblob mit anti-GST- und anti-MBP- Antikörper detektiert.

3.3.7 Co-Immunpräzipitation

RIPA-Puffer: 50 mM Tris/HCl pH 8,0; 150 mM NaCl; 0,1% (v/v) SDS; 1% (v/v) NP-40; 0,5% Natriumdesoxycholat

Lysis-A-Puffer: 10 mM Imidazol pH 6,8; 100 mM NaCl; 300 mM Saccharose; 2 mM MgCl₂; 0,2% (v/v) Triton; 10 mM EDTA pH 8,0; 1 mM NaF; 1 mM Na₂MoO₄; 1 mM Na₃VO₄

Zur Untersuchung der Protein-Protein-Interaktion in Zellen wurden Co-Immunpräzipitationen durchgeführt. Die Co-Immunpräzipitationen zur Analyse der Interaktion von ZO-2 und den SUMO-spezifischen Proteasen sowie SUMO1ΔGG-ZO-2 und Occludin wurden mit RIPA-Puffer durchgeführt. Für Co-Immunpräzipitationsexperimente zur Untersuchung der Interaktion von ZO-2 und GSK3β bzw. β-Catenin wurde Lysis-A-Puffer verwendet. Dazu wurden 1 x 10⁶ HEK-293 Zellen pro Well in 6 well-Platten ausgesät und 24 h später mit den entsprechenden

Plasmiden mit PEI transfiziert. Die Zellyse erfolgte 48 h nach Transfektion. Dazu wurden die Zellen nach zweimaligem Waschen mit PBS^{+/+} mit jeweils 200 µl RIPA-Puffer für 20 min bei 4°C inkubiert und anschließend unlösliche Zellbestandteile sedimentiert (10 min, 4°C, 14000 Upm). Die Antikörper, die für die Isolation der Proteinkomplexe genutzt werden sollten, wurden über Nacht an Protein A Sepharose™-Beads (PAS) vorgekoppelt. Darauffolgend wurden 300 µl des Zellysats mit 35 µl PAS und 2 µg des vorgekoppelten Antikörpers versetzt und 1 h im Überkopfschüttler bei 4°C inkubiert. Die PAS wurde sedimentiert (2 min, 4°C, 2700 Upm) und der Überstand abgenommen. Es folgten 3–4 Waschschrte mit jeweils 300 µl RIPA-Puffer und zuletzt wurden die Beads mit 20 µl 2x SDS-Probenpuffer versetzt. Parallel dazu wurden als Transfektionskontrolle Aliquots des Zellysats abgenommen und 2x SDS-Probenpuffer zugegeben. Jeweils 20 µl der Co- Immunpräzipitation und der Transfektionskontrolle wurden über SDS-PAGE aufgetrennt und nach Elektroblot mit den spezifischen Antikörpern detektiert.

4 Ergebnisse

4.1 SUMO-Konsensus-Motive und potenzielle SUMO-Akzeptor-Lysine im ZO-2-Protein

Bei der posttranslationalen SUMOylierung wird SUMO kovalent an Lysinreste spezifischer Zielproteine gebunden. Aus dem Vergleich der SUMOylierungsmotive verschiedener Zielproteine konnten Konsensusmotive für die SUMOylierung und davon abgeleitete Algorithmen ermittelt werden, die als Grundlage für Vorhersageprogramme genutzt werden, um potenzielle SUMO-Akzeptor-Lysine in Zielproteinen zu identifizieren.

Um auch für das humane *Zona occludens-2*-Protein (ZO-2) (Accession number: NP_004808) eine Vorhersage potenzieller SUMOylierungsstellen machen zu können, wurde dessen Aminosäuresequenz mit Hilfe des SUMOplot™ - Programms (<http://www.abgent.com/SUMOplot>) analysiert (Abb. 5A). Dabei wurden mehrere Sequenzmotive für die Modifikation mit SUMO identifiziert und mit jeweiligen Score-Werten versehen, die die unterschiedlichen Wahrscheinlichkeiten einer SUMOylierung ausdrücken. Das Score-System (0-1) des SUMOplot™ - Programms basiert auf zwei Kriterien: zum einen auf der direkten Übereinstimmung der Aminosäurefolge mit dem SUMO-Konsensus-Motiv und zum anderen auf der Substitution einzelner Aminosäurereste im Konsensus-Motiv durch ähnlich hydrophobe Aminosäuren. Aus den durch das Programm identifizierten Sequenzmotiven wurden vier Lysinreste aufgrund ihrer hohen Wahrscheinlichkeit für eine Modifikation mit SUMO für weitere Analysen ausgewählt. Bei den Motiven der Lysine 992 und 759 handelt es sich um typische SUMO-Konsensus-Sequenzen. Die Lysine 117 und 730 sind hingegen in Nicht-Konsensus-Motiven lokalisiert, wobei der Score auch hier auf eine hohe Wahrscheinlichkeit der SUMOylierung hinweist.

Ob diese Motive auch in anderen Spezies vorliegen und konserviert sind, wurde über einen Vergleich der Aminosäuresequenzen von ZO-2 aus Mensch, Maus, Ratte, Hund, Huhn und Zebrafisch unter Nutzung des multiplen Sequenzalignment Programms PRALINE (<http://www.ibi.vu.nl/programs/pralinewww/>) analysiert (Abb. 5B). Der Sequenzvergleich zeigte, dass die identifizierten Motive evolutionär hochkonserviert sind und mit identischer oder ähnlicher Sequenz vorliegen.

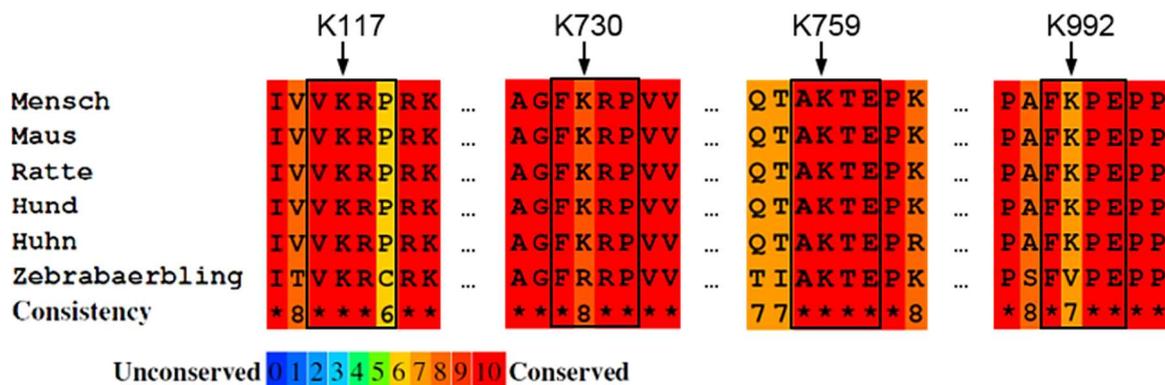
Zur besseren Übersicht der Position der potenziellen SUMO-Akzeptor-Lysine im ZO-2-Protein wurde ein schematisches Diagramm mit der Domain Graph 2.0 Software (<http://dog.biocuckoo.org/>) angefertigt (Abb. 5C).

Das Lysin 117 befindet sich am Ende der ersten PDZ-Domäne innerhalb der NLS1, wohingegen Lysin 730 und 759 in der Guanylat-Kinase-Domäne in der Nähe der NES2 und Lysin 992 am C-Terminus von ZO-2 lokalisiert ist.

A

Nr.	Position	Sequenz	Typ	Score
1	K992	SPPPA FKPE PPKAK	Konsensus-Sequenz ψ KxD/E	0.85
2	K117	VAAIV VKRP RQVQV	Nicht-Konsensus-Sequenz	0.82
3	K759	DWFQT AKTE PKDAG	Konsensus-Sequenz ψ KxD/E	0.79
4	K730	LREAG FKRP VVLFQ	Nicht-Konsensus-Sequenz	0.74

B



C

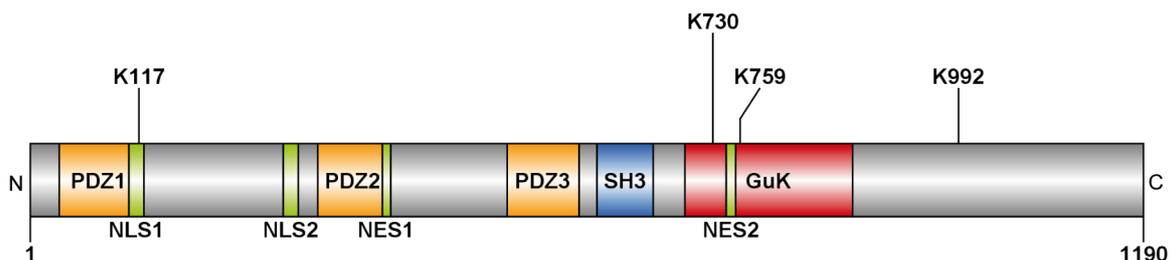


Abb. 5: Die potenziellen SUMOylierungsstellen im ZO-2-Protein sind evolutionär konserviert.

(A) Mit Hilfe des SUMOplot™-Programms wurden potenzielle SUMOylierungsstellen in der Aminosäuresequenz von ZO-2 *in silico* identifiziert und ein Ranking anhand der SUMOylierungswahrscheinlichkeit erstellt. (B) Vergleich der Aminosäureabfolge der potenziellen SUMOylierungsmotive im ZO-2 von sechs verschiedenen Spezies mit Hilfe des multiplen Sequenzalignment Programms PRALINE, wobei blau bzw. 0 die am wenigsten konservierten und rot bzw. 10 die am stärksten konservierten Bereiche darstellen. Das jeweilige Akzeptor-Lysin im Sequenzmotiv ist mit einem Pfeil markiert. (C) Schema des humanen ZO-2-Proteins mit Darstellung der konservierten Domänen, den NLS- bzw. NES-Motiven und der Position der vier ausgewählten potenziellen SUMO-Akzeptor-Lysine.

4.2 Interaktion von ZO-2 mit der SUMOylierungs- maschinerie

Wie in der Einleitung bereits detailliert beschrieben wurde, interagieren SUMO-Substratproteine mit der SUMOylierungsmaschinerie. Die Interaktion von Proteinen mit einer oder mehreren Komponenten dieser Maschinerie ist ein deutlicher Hinweis auf deren potenzielle SUMOylierung. Daher sollte zunächst untersucht werden, ob ZO-2 mit den Sentrin-spezifischen Proteasen SENP1 bzw. SENP3 und dem einzig bekannten SUMO-konjugierenden Enzym Ubc9 interagieren kann.

4.2.1 Interaktion von ZO-2 und Sentrin-spezifischen Proteasen

Zur Untersuchung dieser Interaktion wurden Co-Immunpräzipitationsexperimente mit überexprimiertem ZO-2 und FLAG-getaggttem SENP1 bzw. SENP3 durchgeführt. In den Kontrollansätzen, in denen pCS2+-ZO-2 bzw. pCMV2-FLAG-SENP1 oder pCMV2-FLAG-SENP3 allein transfiziert wurde, konnte kein Signal detektiert werden (Abb. 6; Spur 2, 3, 5). Ein deutliches ZO-2-Signal konnte nur im Ansatz beobachtet werden, in dem ZO-2 mit FLAG-SENP1 co-exprimiert wurde (Abb. 6; Spur 4). Auch für SENP3 konnte ein schwaches, aber spezifisches Signal nachgewiesen werden (Abb. 6; Spur 6). Der Nachweis von ZO-2/FLAG-SENP1/3-Komplexen gibt einen starken Hinweis, dass ZO-2 in der Tat SUMOyliert wird.

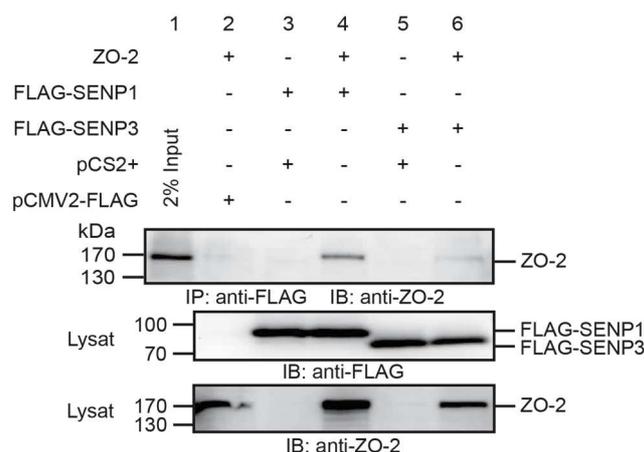


Abb. 6: Nachweis von ZO-2/SENP1-Komplexen in HEK-293-Zellen. HEK-293-Zellen wurden transient mit pCS2+-ZO-2, pCMV2-FLAG-SENP1, pCMV2-FLAG-SENP3 und den entsprechenden Leervektoren in den angegebenen Kombinationen transfiziert. Die Immunpräzipitation von FLAG-SENP1 bzw. FLAG-SENP3 wurde mit jeweils 2 µg anti-FLAG-Antikörper durchgeführt. Nach Auftrennung der präzipitierten Proteine in einem 10%-igen SDS-PAA-Gel und Western Blot erfolgte die Detektion mit anti-ZO-2-Antikörper. Vom Zelllysat wurden 2% als Input aufgetragen. Als Transfektionskontrolle wurde Zelllysat mit anti-ZO-2- und anti-FLAG-Antikörper detektiert. Der dargestellte Western Blot stellt ein repräsentatives Beispiel von drei unabhängigen Experimenten dar.

4.2.2 Interaktion von ZO-2 und Ubc9

Wenn ZO-2 tatsächlich ein SUMOylierungssubstrat darstellt, dann sollte das SUMO-konjugierende Enzym Ubc9 mit ZO-2 interagieren können. Daher wurde in einem nächsten Schritt mit einem *in vitro* Assoziationsassay überprüft, ob eine Bindung von Ubc9 an ZO-2 nachweisbar ist. Dazu wurde ZO-2 als GST- und Ubc9 als MBP-Fusionsprotein rekombinant exprimiert und affinitätschromatographisch aufgereinigt. Als Kontrollen wurde GST (Glutathion-S-Transferase) und MBP (Maltose-Bindungsprotein) eingesetzt. Die Proteine wurden, wie in Abb. 7 gezeigt, miteinander inkubiert und die entstandenen Proteinkomplexe mit Hilfe von Glutathion (GSH)-Agarose präzipitiert. Die Kontrollen, in denen GST und MBP allein, sowie GST und MBP-Ubc9 oder GST-ZO-2 und MBP inkubiert wurden, zeigten keine unspezifischen Bindungen (Abb. 7; Spur 1, 2, 3). Im Ansatz mit GST-ZO-2 und MBP-Ubc9 konnte hingegen eine spezifische Bande für MBP-Ubc9 detektiert werden (Abb. 7; Spur 4). Das Coomassie-Gel zeigt, dass vergleichbare Mengen an Protein eingesetzt wurden. Aus dem vorliegenden GST-Pull-down Experiment lässt sich schließen, dass ZO-2 und das einzig bekannte SUMO-konjugierende Enzym Ubc9 direkt miteinander interagieren.

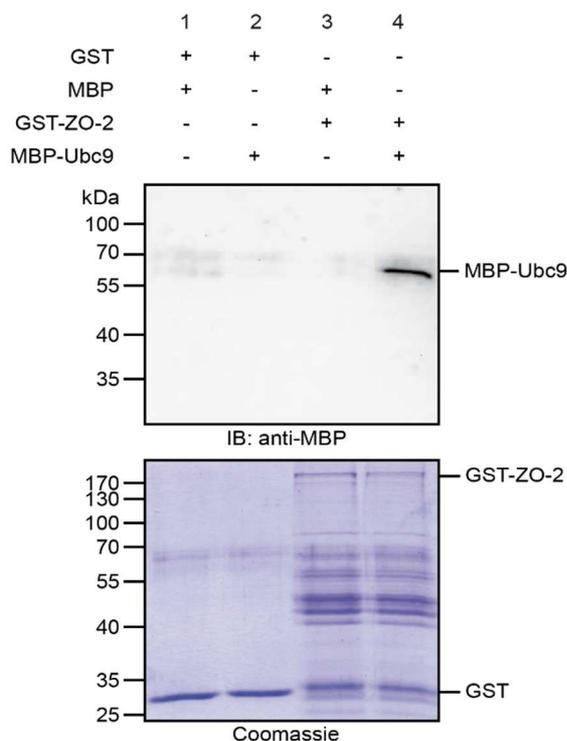


Abb. 7: ZO-2 und Ubc9 interagieren direkt miteinander. *In vitro* Assoziationsexperiment mit rekombinant exprimiertem GST-ZO-2- sowie MBP-Ubc9-Fusionsprotein und GST oder MBP als Kontrolle. Nach Pull-down sowie Auftrennung der präzipitierten Proteine in 10%-igen SDS-PAA-Gelen und anschließendem Western Blot erfolgte die Detektion mit anti-MBP-Antikörper. Zur Kontrolle der Vergleichbarkeit der eingesetzten Proteinmengen wurde ein SDS-PAA-Gel mit Coomassie Brilliant Blue gefärbt. Die direkte Interaktion von ZO-2 und Ubc9 wurde in vier unabhängigen Versuchen analysiert.

4.3 Untersuchung der SUMOylierung von ZO-2

4.3.1 *In vivo* SUMOylierung von ZO-2

4.3.1.1 Ubc9 fusion-dependent SUMOylation (UFDS) Assay

Im Gleichgewichtszustand (steady-state) sind *in vivo* nur ungefähr 5% der Substratproteine SUMOyliert. Daher ist es extrem schwierig die SUMOylierung potenzieller Zielproteine zu detektieren und zu charakterisieren. Aus diesem Grund wurde der Ubc9 fusion-dependent SUMOylation Assay genutzt, der eine effizientere SUMOylierung des zu untersuchenden Zielproteins ermöglicht. In dem Assay wird das SUMO-konjugierende Enzym Ubc9 an das N- oder C-terminale Ende des Zielproteins fusioniert exprimiert, wodurch die Anwesenheit spezifischer SUMO-Ligasen nicht erforderlich ist. Die SUMOylierung kann mit Hilfe dieses Assays bis zu 40% verstärkt werden (Jakobs et al. 2007).

Zunächst wurde die cDNA von ZO-2 upstream des ORF von Ubc9 kloniert und das Fusionsprotein ZO-2-Ubc9 in HEK-293-Zellen exprimiert. In Abb. 8B ist exemplarisch ein Western Blot der Testexpression des ZO-2-Ubc9-Fusionsproteins gezeigt. Das Protein wird wie erwartet exprimiert und von den spezifischen Antikörpern detektiert.

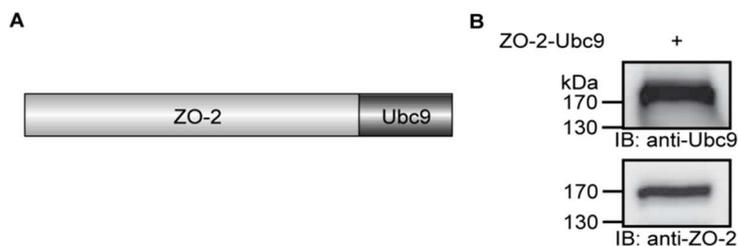


Abb. 8: Nachweis der Expression des ZO-2-Ubc9-Fusionsproteins. (A) Schematische Darstellung des ZO-2-Ubc9-Fusionsproteins. (B) HEK-293-Zellen wurden transient mit pCU-ZO-2-Ubc9 transfiziert. Nach Zelllyse und Western Blot erfolgte die Detektion mit anti-Ubc9- und anti-ZO-2-Antikörper.

Um nun die SUMOylierung des ZO-2-Ubc9-Fusionsproteins zu analysieren, wurde pCU-ZO-2-Ubc9 mit EGFP- oder FLAG-getaggttem SUMO1 bzw. SUMO2/3 in den angegebenen Kombinationen transient in HEK-293-Zellen transfiziert.

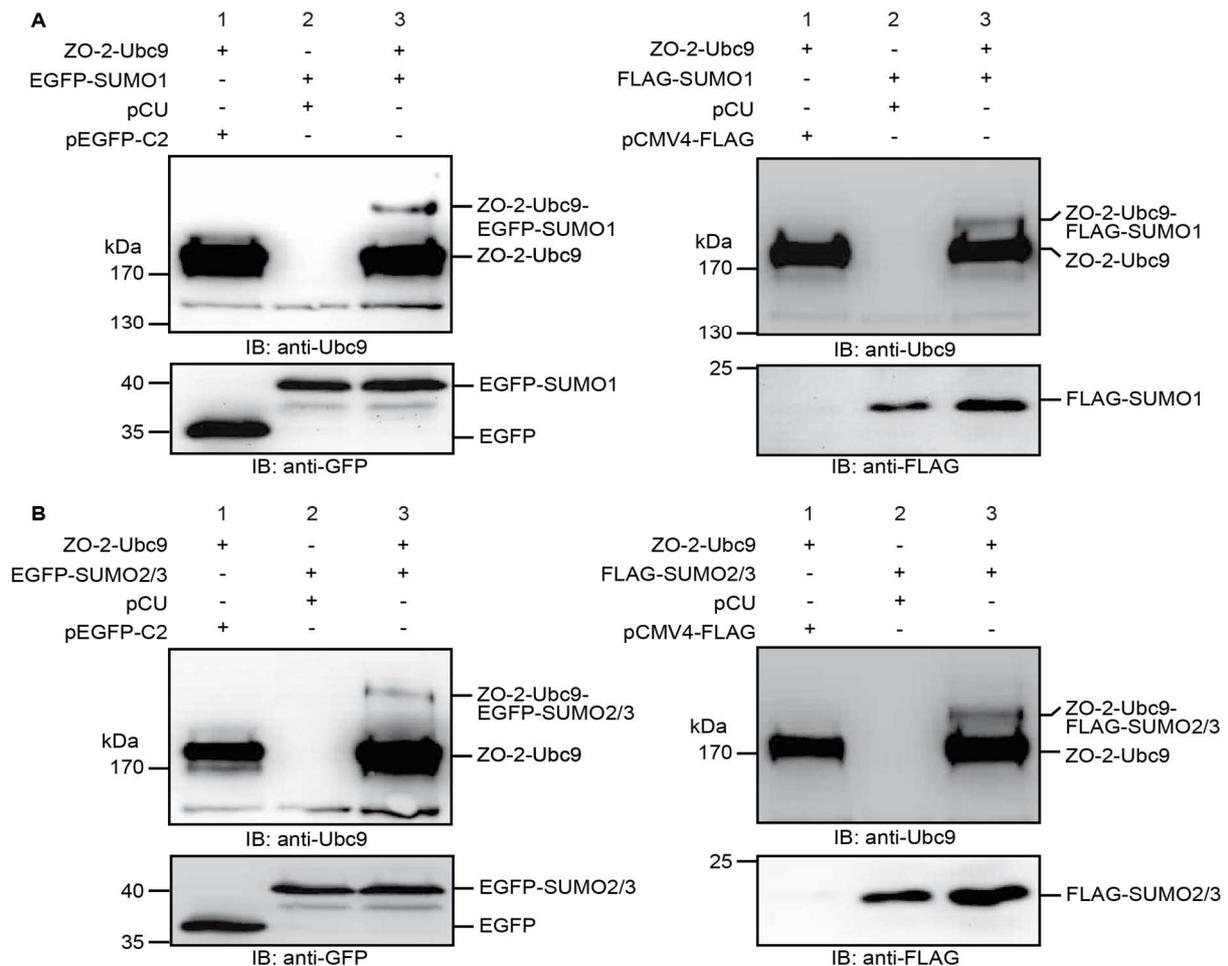


Abb. 9: ZO-2 wird im Ubc9 fusion-dependent SUMOylation Assay SUMOyliert. HEK-293-Zellen wurden transient mit pCU-ZO-2-Ubc9 und mit pEGFP-C2-SUMO1 bzw. pCMV4-FLAG-SUMO1 (**A**) oder mit pEGFP-C2-SUMO2/3 bzw. pCMV4-FLAG-SUMO2/3 (**B**) sowie den entsprechenden Leervektoren in den angegebenen Kombinationen transfiziert. Die Proteine wurden in 7,5%- bzw. 12%-igen SDS-PAA-Gelen aufgetrennt und im Western Blot mit anti-Ubc9-Antikörper detektiert. Die Lysatkontrollen sind unten dargestellt. Dieses Experiment ist repräsentativ für mindestens fünf unabhängig durchgeführte Versuche.

Zur Kontrolle wurden pCU-ZO-2-Ubc9, pEGFP-C2-SUMO1 oder pCMV4-FLAG-SUMO1 mit den entsprechenden Leervektoren co-transfiziert (Abb. 9A; jeweils Spur 1 und 2). Werden ZO-2-Ubc9 und EGFP- oder FLAG-SUMO1 zusammen exprimiert, lässt sich eine höhermolekulare Proteinbande detektieren, welche SUMOyliertes ZO-2-Ubc9 darstellt (Abb. 9A; jeweils Spur 3). Der ZO-2-Ubc9-EGFP-SUMO1-Proteinkomplex besitzt im Vergleich zu ZO-2-Ubc9-FLAG-SUMO1 eine höhere molekulare Masse, was auf den Unterschied im Molekulargewicht des EGFP-Tags (29 kDa) im Vergleich zum FLAG-Tag (ca. 1 kDa) zurückzuführen ist. Vergleichbare höhermolekulare SUMOylierungsbanden sind ebenfalls für die EGFP- und FLAG-getagten SUMO2/3-Varianten zu beobachten (Abb. 9B). Zusammenfassend kann

festgestellt werden, dass ZO-2 *in vivo* sowohl mit SUMO1 als auch mit SUMO2/3 modifiziert werden kann.

Eine Auto-SUMOylierung von Ubc9 wurde erstmals *in vitro* in Hefe mit hohen Konzentrationen von Ubc9 beobachtet (Bencsath et al. 2002), jedoch ist unklar, ob diese Modifikation auch *in vivo* physiologisch relevant ist. Weitere Proteom-Studien haben gezeigt, dass Ubc9 ebenfalls in Säugern SUMOyliert wird (Wohlschlegel et al. 2004, Zhou et al. 2004, Zhao et al. 2004). In der Arbeit von Knipscheer *et al.* wurde mit Hilfe von *in vitro* SUMOylierungsassays, gefolgt von massenspektrometrischen Analysen, Lysin 14 als SUMO-Akzeptor von Ubc9 in Säugern identifiziert (Knipscheer et al. 2008). Diese Auto-SUMOylierung beeinflusst nicht die SUMO-Thioester-Bildung, aber verändert die Fähigkeit von Ubc9, spezielle SUMO-Substrate zu modifizieren.

Um auszuschließen, dass die höhermolekularen SUMOylierungsbanden von ZO-2-Ubc9 im UFDS-Assay auf die Auto-SUMOylierung von Ubc9 zurückzuführen sind, wurde Lysin 14 im Ubc9 des pCU-Vektors durch ortsspezifische Mutagenese zu Arginin mutiert. Nachfolgend wurden pCU-ZO-2-Ubc9 bzw. pCU-ZO-2-Ubc9-K14R sowie pEGFP-C2-SUMO2/3 mit den entsprechenden Leervektoren transient in HEK-293-Zellen transfiziert.

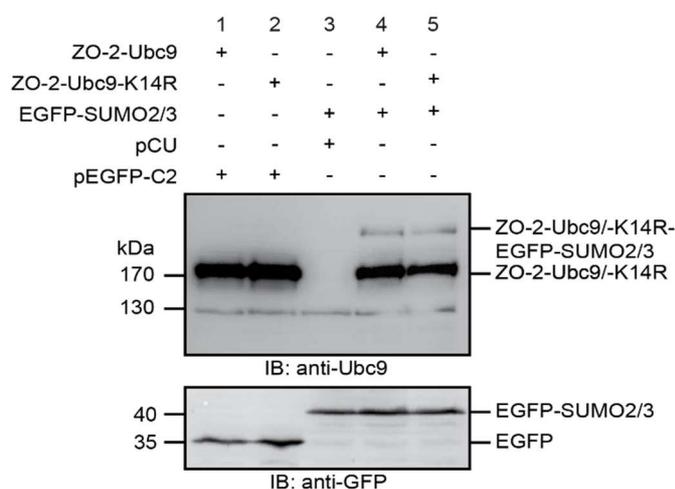


Abb. 10: ZO-2-Ubc9 und ZO-2-Ubc9-K14R werden im UFDS-Assay vergleichbar mit SUMO2/3 modifiziert. Repräsentativer Western Blot aus mindestens drei unabhängigen Experimenten, in denen HEK-293-Zellen transient mit pCU-ZO-2-Ubc9 oder pCU-ZO-2-Ubc9-K14R und pEGFP-C2-SUMO2/3 dem Schema entsprechend transfiziert wurden. Nach Lyse der Zellen wurden die Proteine in 7,5%- oder 12%-igen SDS-PAA-Gelen aufgetrennt und nach Western Blot mit anti-Ubc9-Antikörper detektiert. Zur Transfektionskontrolle von EGFP bzw. EGFP-SUMO2/3 wurde Zelllysat mit anti-GFP-Antikörper analysiert.

In Abb. 10 ist exemplarisch ein Western Blot eines derartigen UFDS-Assays gezeigt. Wurden pCU-ZO-2-Ubc9 bzw. pCU-ZO-2-Ubc9-K14R sowie pEGFP-C2-SUMO2/3 mit den entsprechenden Leervektoren co-transfiziert, ließ sich keine Shiftbande im Western Blot nachweisen (Abb. 10; Spur 1, 2, 3). Die Co-Expression von ZO-2-Ubc9 bzw. ZO-2-Ubc9-K14R und EGFP-SUMO2/3 zeigt vergleichbare höhermolekulare SUMOylierungsbanden für Wildtyp-Ubc9 und die SUMOylierungs-defiziente Mutante

Ubc9-K14R (Abb. 10; Spur 4 und 5). Damit lässt sich ausschließen, dass die Shiftbande von ZO-2-Ubc9 aus der Auto-SUMOylierung von Ubc9 resultiert.

Zur weiteren Verifizierung der SUMOylierung von ZO-2-Ubc9 im UFDS-Assay wurde eine nicht-konjugierbare SUMO1-Variante erzeugt (SUMO1 Δ GG), deren C-terminales Di-Glycin-Motiv, welches essentiell für die Konjugation von SUMO ist, deletiert wurde. Als zusätzliche Kontrolle wurde über PCR-basierte ortsspezifische Mutagenese eine SUMO2/3-Variante generiert, bei der der Aminosäurerest Glutamin 89 (Q) zu Prolin (P) mutiert wurde und die dadurch resistenter gegen eine SENP-abhängige Abspaltung von SUMO-Resten ist (Mukherjee et al. 2009).

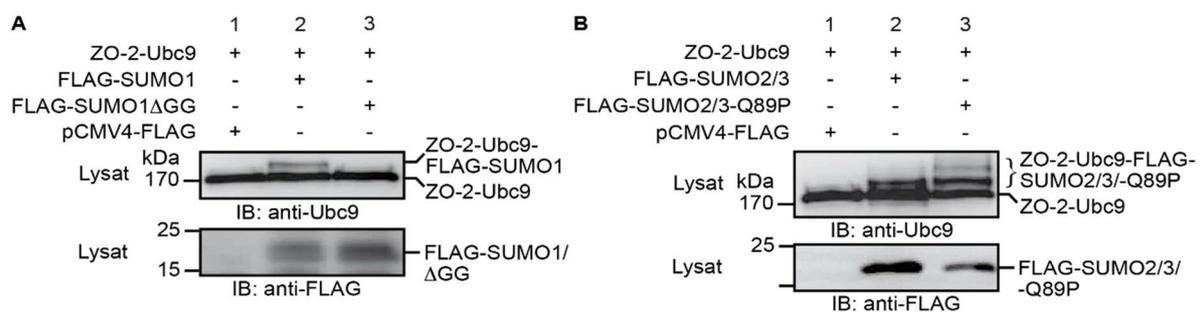


Abb. 11: Die Deletion des SUMO-Di-Glycin-Motivs verhindert bzw. SUMO2/3-Q89P verstärkt die SUMOylierung von ZO-2 im UFDS-Assay. HEK-293-Zellen wurden transient mit pCU-ZO-2-Ubc9 und pCMV4-FLAG-SUMO1 bzw. pCMV4-FLAG-SUMO1 Δ GG (**A**) oder mit pCMV4-FLAG-SUMO2/3 bzw. pCMV4-FLAG-SUMO2/3-Q89P (**B**) und den Leervektoren dem Schema entsprechend transfiziert. Die Zellen wurden lysiert und die Proteine in 7,5%- bzw. 12%-igen SDS-PAA-Gelen aufgetrennt. Nach Western Blot erfolgte die Detektion mit anti-Ubc9-Antikörper. Die erfolgreiche Expression der SUMO-Proteine wurde mit anti-FLAG-Antikörper kontrolliert. Es ist ein repräsentativer Western Blot von mindestens drei unabhängig durchgeführten Experimenten dargestellt.

Die Co-Transfektion von pCU-ZO-2-Ubc9 und dem Leervektor pCMV4-FLAG diente als Kontrolle (Abb. 11A und 11B; jeweils Spur 1). Bei Co-Expression von ZO-2-Ubc9 und FLAG-SUMO1 konnte eine höhermolekulare SUMOylierungsbande beobachtet werden (Abb. 11A; Spur 2). Diese war jedoch nicht detektierbar, wenn ZO-2-Ubc9 und die nicht konjugierbare FLAG-SUMO1 Δ GG-Variante co-exprimiert wurden (Abb. 11A; Spur 3). Wurden hingegen ZO-2-Ubc9 und die Protease-resistentere FLAG-SUMO2/3-Q89P-Variante co-exprimiert, war eine deutliche Verstärkung der SUMOylierung im Vergleich zum wildtypischen FLAG-SUMO2/3 zu verzeichnen (Abb. 11B; Spur 2 und 3). Der vorliegende Assay bestätigt, dass die bisher beobachtete ZO-2-Ubc9-Shiftbande auf eine SUMOylierung von ZO-2 zurückzuführen ist.

Ein weiterer Beweis für eine tatsächliche SUMOylierung des ZO-2-Ubc9-Fusionsproteins sollte durch die Co-Expression einer SUMO-spezifischen Protease

(SEN1) erbracht werden. Erwartet wurde dabei eine DeSUMOylierung und demzufolge der Verlust der geschifteten Bande. Zur Anwendung kam die SUMO-spezifische Protease SENP1, deren Interaktion mit ZO-2 bereits mittels Co-Immunpräzipitation nachgewiesen wurde. Zusätzlich wurde als Kontrolle eine katalytisch inaktive SENP1-Mutante (R630L, K631M) eingesetzt.

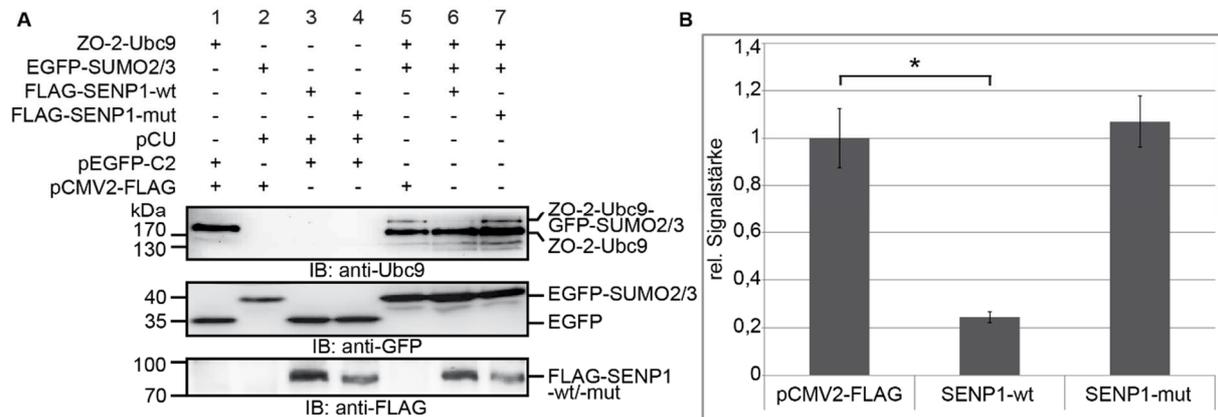


Abb. 12: Co-Expression von SENP1 vermindert die SUMOylierung von ZO-2-Ubc9 im UFDS-Assay. (A) HEK-293-Zellen wurden transient mit pCU-ZO-2-Ubc9 und pEGFP-C2-SUMO2/3 sowie pCMV2-FLAG-SEN1-wt oder pCMV2-FLAG-SEN1-mut und den Leervektoren in den angegebenen Kombinationen transfiziert. Die Proteine wurden nach Zellyse in 7,5%- bzw. 12%-igen SDS-PAA-Gelen aufgetrennt und ein Western Blot mit anti-Ubc9-Antikörper durchgeführt. Zur Kontrolle der Transfektion von EGFP bzw. EGFP-SUMO2/3 und FLAG-SEN1-wt bzw. FLAG-SEN1-mut wurde Zellysat mit anti-GFP- und anti-FLAG-Antikörper analysiert. **(B)** Densitometrische Auswertung des Western Blots. Die Proteinbanden wurden quantifiziert, die SUMOylierung von ZO-2-Ubc9 gegen die Expression von ZO-2-Ubc9 normalisiert und die erhaltenen Quotienten relativ zur Kontrolle, in der nur der Leervektor pCMV2-FLAG co-transfiziert wurde, normiert. Die SUMOylierung wurde in sechs unabhängigen Experimenten mit Hilfe der GeneTools-Software (Syngene) analysiert. Die Daten sind als Mittelwerte \pm SEM dargestellt. Die Signifikanz (p) wurde mit dem t -Test ermittelt (* $p \leq 0,05$).

In Abb. 12A ist exemplarisch ein Western Blot des UFDS-Assays mit Co-Expression von FLAG-SEN1-wt oder FLAG-SEN1-mut gezeigt. pCU-ZO-2-Ubc9, pEGFP-C2-SUMO2/3, pCMV2-FLAG-FLAG-SEN1-wt oder pCMV2-FLAG-FLAG-SEN1-mut wurden zur Kontrolle mit den entsprechenden Leervektoren co-transfiziert (Abb. 12; Spur 1-4). Die Co-Expression von ZO-2-Ubc9 und EGFP-SUMO2/3 zeigt eine klare höhermolekulare Proteinbande, die jedoch bei Co-Expression der SUMO-spezifischen Protease SENP1 nicht mehr detektierbar war (Abb. 12; Spur 5 und 6). Dieser Effekt ist nicht zu beobachten, wenn die katalytisch inaktive Variante von SENP1 co-exprimiert wurde (Abb. 12; Spur 7). Die densitometrische Auswertung der Western Blots zeigte einen nicht signifikanten Anstieg der SUMOylierung durch Co-Expression von FLAG-SEN1-mut ($p > 0,05$), jedoch eine signifikante Reduktion der Shiftbande um ca. 75%, wenn FLAG-SEN1-wt co-exprimiert wurde (Abb. 12B). Dies ist ein weiterer Beweis

dafür, dass es sich bei den Banden höheren Molekulargewichts, nach Co-Expression von SUMO, um SUMOyliertes ZO-2-Ubc9 handelt.

4.3.1.2 Proximity Ligation Assay (PLA)

Basierend auf den vorigen Beobachtungen im UFDS-Assay mit transient überexprimiertem ZO-2 sollte nun untersucht werden, ob sich die SUMOylierung auch für endogenes ZO-2 in der Zelle nachweisen lässt. Dies wurde mit Hilfe eines Proximity Ligation Assays (Duolink Assay) analysiert. Dieser Assay erlaubt die Detektion, Quantifikation und Lokalisation von Protein-Protein-Interaktionen sowie von Protein-Modifikationen in einem Experiment. Durch die hohe Sensitivität des Assays lassen sich auch sehr schwache und transiente Modifikationen nachweisen. Hierfür wurden MDCKII- und als Kontrolle MDCKII-Zellen mit einem stabilen Knock-down von ZO-2 (Van Itallie et al. 2009) verwendet. Nach Fixierung und Permeabilisierung der Zellen wurde die SUMOylierung von ZO-2 mit spezifischen anti-ZO-2- und anti-SUMO1-Antikörpern im Duolink Assay analysiert. Als technische Negativ-Kontrolle dienten MDCKII-Zellen, die nur mit den PLA-Probes-konjugierten sekundären Antikörpern inkubiert wurden. Anschließend wurden konfokale Z-Stapel-Aufnahmen angefertigt und die PLA-Signale quantifiziert. In Abb. 13A sind exemplarisch Aufnahmen des Duolink Assays gezeigt. Es sind eindeutige Signale für SUMOyliertes ZO-2 in MDCKII-Zellen vorrangig im Cytoplasma, vereinzelt auch im Zellkern, zu beobachten (Abb. 13A; obere Reihe). Eine deutliche Abnahme der PLA-Signale zeigt sich in den MDCKII ZO-2-Knock-down Zellen (Abb. 13A; mittlere Reihe). Als Kontrolle für Hintergrund-Signale wurden MDCKII-Zellen ohne Inkubation mit Primärantikörper mitgeführt (Abb. 13A; untere Reihe). Die quantitative Auswertung veranschaulicht die PLA-Signale bezogen auf die Zellzahl und zeigt den sehr stark signifikanten Unterschied zwischen der Kontrolle mit MDCKII ZO-2-Knock-down Zellen und den wildtypischen MDCKII-Zellen (Abb. 13B). Die *in situ*-Immunfluoreszenz-Aufnahmen des Duolink Assays bestätigen, dass ZO-2 *in vivo* SUMOyliert wird.

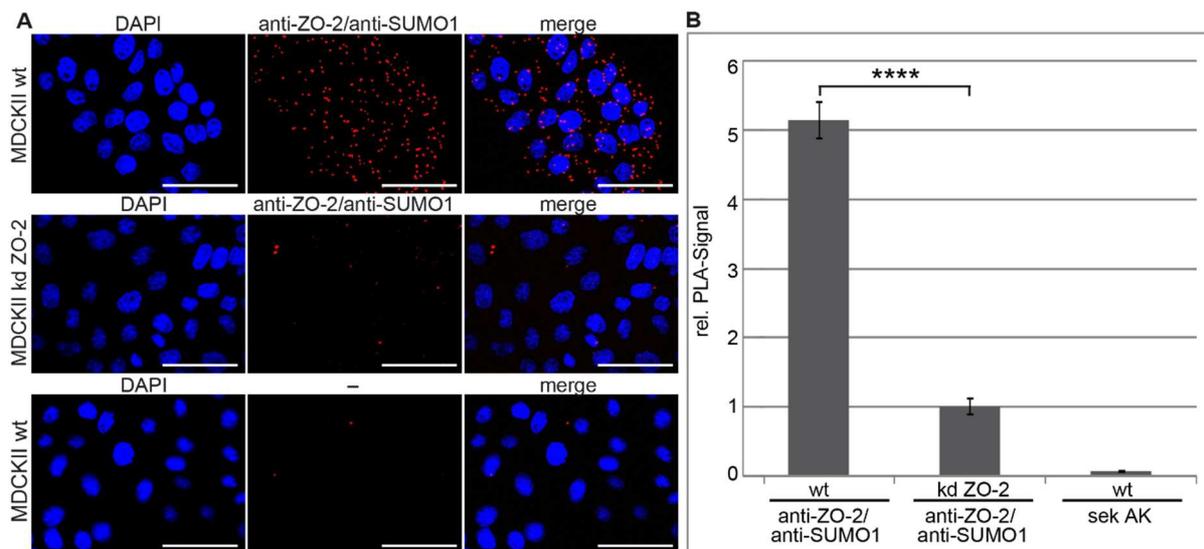


Abb. 13: Endogenes ZO-2 wird *in vivo* SUMOyliert. (A) Konfokale *in situ*-Immunfluoreszenz-Aufnahmen von MDCKII- (wt) bzw. MDCKII ZO-2-Knock-down Zellen (kd ZO-2) die mit anti-ZO-2- und anti-SUMO1-Antikörper oder nur mit den PLA-Probes-konjugierten sekundären Antikörpern inkubiert wurden. Die Zellkerne wurden mit DAPI (blau) angefärbt und die roten Punkte (Proximity Ligation Assay Signal = PLA-Signal) stellen SUMOyliertes ZO-2 dar. Die Merge-Darstellung vereint die DAPI-Färbung und die PLA-Signale. Es wurden Z-Stapel-Aufnahmen mit Hilfe der Fiji Software zu einer Maximumintensitätsprojektion verarbeitet. Der Maßstabsbalken entspricht 50 μ m. (B) Quantitative Auswertung der PLA-Signale. Die Signale wurden auf die Zellanzahl bezogen und auf die Kontrolle mit MDCKII ZO-2-Knock-down Zellen normiert. Die SUMOylierung wurde in drei unabhängigen Experimenten mit Hilfe der Fiji Software ausgewertet. Die Daten sind als Mittelwerte \pm SEM dargestellt. Die Signifikanz (p) wurde mit dem *t*-Test ermittelt (**** $p < 0,0001$).

4.3.2 *In vitro* SUMOylierung von ZO-2

In der vorliegenden Arbeit wurde gezeigt, dass transient überexprimiertes und endogenes ZO-2 *in vivo* SUMOyliert werden kann. Daher sollte in einem nächsten Schritt untersucht werden, ob SUMO *in vitro* ebenfalls an das rekombinante Protein konjugiert werden kann. Da es sehr schwierig war, ZO-2-Vollängen-Protein zu exprimieren, wurde nur der C-Terminus von ZO-2 (AS 598-1190) als GST-Fusionsprotein in *E. coli* exprimiert und mit Hilfe von GSH-Agarose aufgereinigt. Neben GST- Δ NZO-2 wurden für die *in vitro* SUMOylierung die Komponenten des SUMOLink Kits genutzt, welches wildtypisches SUMO1 (wt), die nicht konjugierbare SUMO1 Δ GG-Variante (mut) als Kontrolle sowie das heterodimere SUMO-aktivierende Enzym SAE1/SAE2 (E1) und das SUMO-konjugierende Enzym Ubc9 (E2) beinhaltet.

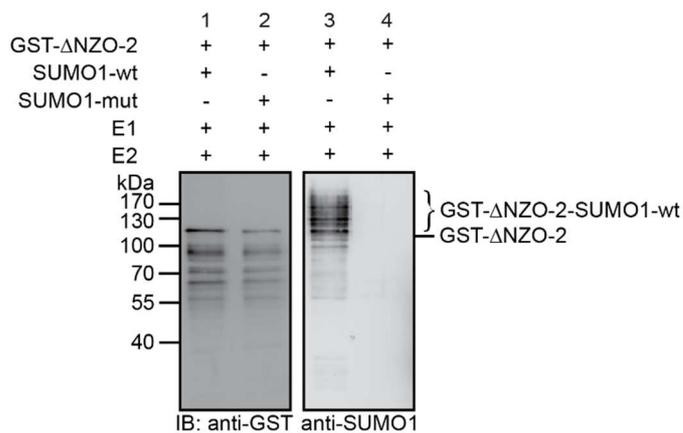


Abb. 14: Rekombinantes Δ NZO-2 wird *in vitro* SUMOyliert. GST- Δ NZO-2 wurde mit SUMO1-wt oder SUMO1-mut, sowie SAE1/SAE2 (E1) und Ubc9 (E2) inkubiert. Anschließend wurden Proteinkomplexe mit GSH-Agarose präzipitiert und der Reaktionsansatz aufgeteilt. Die präzipitierten Proteine wurden über eine 10%-ige SDS-PAGE aufgetrennt und ein Western Blot durchgeführt. Die Detektion erfolgte mit anti-GST- oder anti-SUMO1-Antikörper. Die *in vitro* SUMOylierung von GST- Δ NZO-2 wurde in zwei unabhängigen Experimenten analysiert.

Wie aus der Detektion mit anti-GST-Antikörper hervorgeht, sind vergleichbare Mengen des rekombinanten GST- Δ NZO-2 eingesetzt worden (Abb. 14; Spur 1 und 2). Bei der Inkubation mit wildtypischem SUMO1 war für GST- Δ NZO-2 eine Multi- oder Poly-SUMOylierung erkennbar (Abb. 14; Spur 3). In der Kontrolle mit der nicht konjugierbaren SUMO1 Δ GG-Variante konnten keine höhermolekularen Proteine detektiert werden (Abb. 14; Spur 4). Dieses Experiment zeigt, dass ZO-2 auch *in vitro* SUMOyliert werden kann.

4.4 Identifikation der SUMOylierungsstelle von ZO-2

4.4.1 Ubc9 fusion-dependent SUMOylation (UFDS) Assay

Mit den bisher dargestellten Ergebnissen konnte gezeigt werden, dass ZO-2 ein Zielprotein für eine posttranslationale SUMO-Modifikation darstellt. Um nun die potenziellen SUMO-Akzeptor-Lysine experimentell zu ermitteln, wurden die zuvor identifizierten Lysinreste (K) 117, 730, 759 und 992 durch Arginin-Reste (R) mittels PCR-basierter, ortsspezifischer Mutagenese in den SUMO-Motiven substituiert und somit SUMOylierungs-defiziente Einzelmutanten generiert. Als Grundlage für die folgenden Experimente wurde ebenfalls der UFDS-Assay genutzt. Aufgrund der ähnlichen SUMOylierung von ZO-2-Ubc9 mit SUMO1 und SUMO2/3 wurde auf die Co-Expression von EGFP-SUMO1 verzichtet.

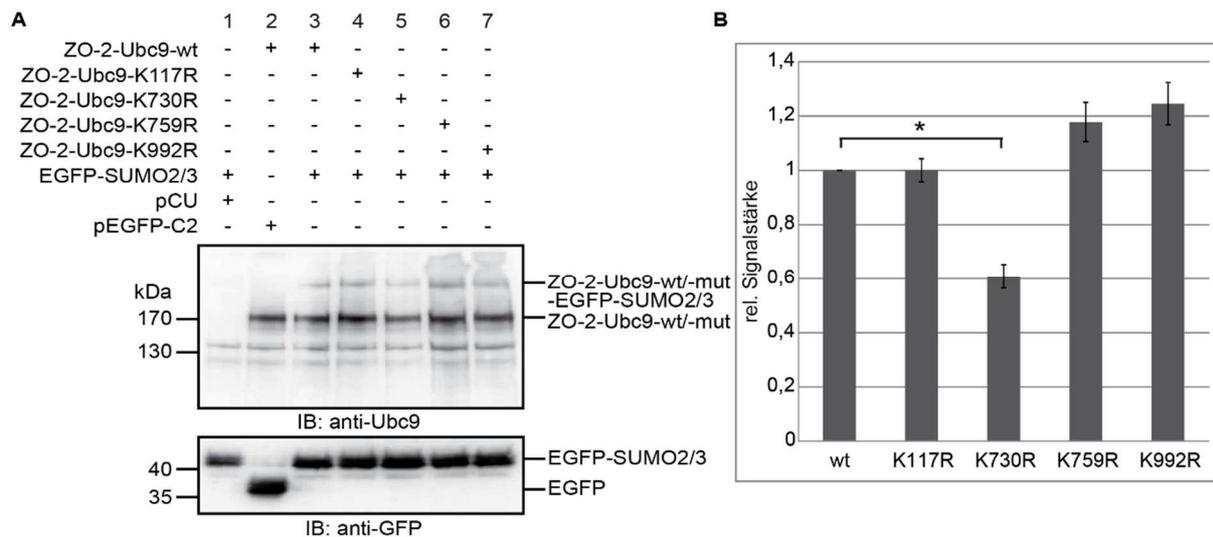


Abb. 15: ZO-2-Ubc9-K730R wird im UFDS-Assay vermindert mit SUMO2/3 modifiziert. (A) HEK-293-Zellen wurden transient mit pCU-ZO-2-Ubc9 oder den pCU-ZO-2-Ubc9-Mutanten und pEGFP-C2-SUMO2/3 sowie den Leervektoren dem Schema entsprechend transfiziert. Nach Zellyse wurden die Proteine in 7,5%-igen bzw. 12%-igen SDS-PAA-Gelen aufgetrennt und ein Western Blot durchgeführt. Die Detektion erfolgte mit anti-Ubc9-Antikörper. Zur Kontrolle der Transfektion von EGFP bzw. EGFP-SUMO2/3 wurde Zellysate mit anti-GFP-Antikörper analysiert. **(B)** Densitometrische Auswertung sechs unabhängig durchgeführter Western Blots mit Hilfe der GeneTools-Software (Syngene). Nach Quantifizierung der Signale wurde die SUMOylierung von ZO-2-Ubc9 gegen die Expression von ZO-2-Ubc9 normalisiert und die erhaltenen Quotienten relativ zur Kontrolle, in der ZO-2-Ubc9-wt co-transfiziert wurde, normiert. Die Daten sind als Mittelwerte \pm SEM dargestellt. Die Signifikanz (p) wurde mit dem t -Test ermittelt (* $p \leq 0,05$).

Wie im Western Blot zu sehen ist, wurde wildtypisches ZO-2-Ubc9 und die Mutanten in vergleichbarer Menge exprimiert, wobei die ZO-2-Ubc9-K730R-Mutante eine gering schwächere Expression aufwies. Dies kann jedoch vernachlässigt werden, da bei der densitometrischen Auswertung des Western Blots die SUMOylierungsbande auf die Expression von ZO-2-Ubc9 bzw. der ZO-2-Ubc9-Mutanten bezogen wurde. In Spur 1 und 2 wurde als Kontrolle pEGFP-C2-SUMO2/3 und der pCU-Leervektor oder pCU-ZO-2-Ubc9-wt und der pEGFP-C2-Leervektor co-transfiziert. Der Vergleich der höhermolekularen SUMOylierungsbanden von wildtypischem ZO-2-Ubc9 und den Einzelmutanten zeigt, dass alle Mutanten weiterhin mit EGFP-SUMO2/3 modifiziert wurden (Abb. 15A; Spur 3-7). Bei der Mutation von Lysin 730 ist jedoch eine Proteinbande mit deutlich schwächerer Intensität zu beobachten (Abb. 15A; Spur 5). Die quantitative Auswertung der Bandenintensitäten ergab eine signifikante Reduktion der SUMOylierung der ZO-2-Ubc9-K730R-Mutante um ca. 40% im Vergleich zu ZO-2-Ubc9-wt (Abb. 15B). Der Vergleich der Signale für die SUMOylierung von ZO-2-Ubc9-K117R, -K759R und -K992R mit Wildtyp ZO-2-Ubc9 ergab keinen signifikanten Unterschied.

4.4.2 Proximity Ligation Assay (PLA)

Ob die SUMOylierung von ZO-2 an Lysin 730 ebenfalls im Duolink Assay nachgewiesen werden kann, sollte im nächsten Experiment überprüft werden. Hierfür wurde entweder wildtypisches p3xFLAG-CMV-10-ZO-2 oder die SUMOylierungsdefiziente Mutante p3xFLAG-CMV-10-ZO2-K730R transient in MDCKII-Zellen transfiziert. Nach Fixierung und Permeabilisierung der Zellen wurde die SUMOylierung mit spezifischen anti-FLAG- (anti-Kaninchen) und anti-SUMO1-Antikörpern (anti-Maus) im Duolink Assay analysiert. Um zusätzlich die mit 3xFLAG-ZO-2 bzw. 3xFLAG-ZO-2-K730R transfizierten Zellen detektieren zu können, wurde der Monolayer im Anschluss an den Duolink Assay mit Alexa Fluor® 488 (anti-Kaninchen) inkubiert.

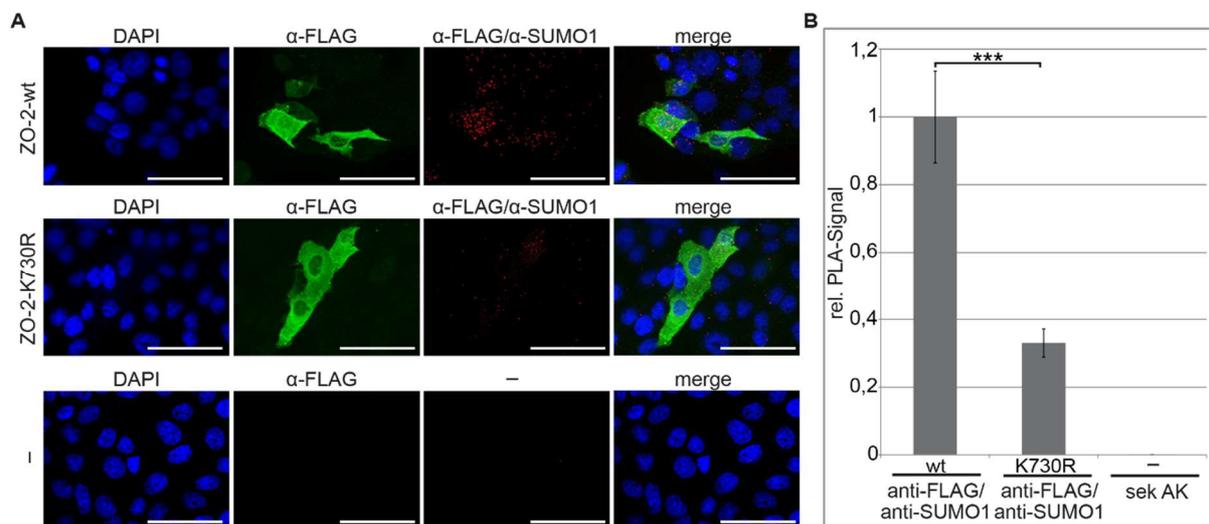


Abb. 16: Abnahme der Modifikation mit SUMO1 durch Mutation von Lysin 730 im Duolink Assay. (A) Konfokale Z-Stapel-Aufnahmen von MDCKII-Zellen die transient mit p3xFLAG-CMV-10-ZO2 oder p3xFLAG-CMV-10-ZO2-K730R transfiziert wurden. Der Duolink Assay wurde zur Detektion der SUMOylierung von 3xFLAG-ZO-2 oder 3xFLAG-ZO-2-K730R mit spezifischen anti-FLAG- (anti-Kaninchen) und anti-SUMO1- Antikörpern (anti-Maus) durchgeführt. Die Zellkerne wurden mit DAPI (blau) angefärbt und die roten Signale stellen SUMOyliertes ZO-2 dar. Im Anschluss an den Duolink Assay wurden die Zellen mit Alexa Fluor® 488 (anti-Kaninchen) inkubiert, um spezifisch die transfizierten Zellen anzufärben. Als technische Negativ-Kontrolle wurden MDCKII-Zellen nur mit den PLA-Probes-konjugierten sekundären Antikörpern inkubiert. Die Merge-Darstellung vereint die DAPI- und Antikörperfärbung sowie die PLA-Signale. Die Z-Stapel-Aufnahmen wurden mit Hilfe der Fiji Software zu einer Maximumintensitätsprojektion verarbeitet. Der Maßstabsbalken entspricht 50 μ m. (B) Quantitative Auswertung der PLA-Signale. Die Signale wurden auf die Fläche der transfizierten Zellen bezogen und auf die Kontrolle mit ZO-2-wt normiert. Die SUMOylierung wurde in drei unabhängigen Experimenten mit Hilfe der Fiji Software ausgewertet. Die Daten sind als Mittelwerte \pm SEM dargestellt. Die Signifikanz (p) wurde mit dem t-Test ermittelt (***) $p \leq 0,001$.

In Abb. 16A sind exemplarisch Aufnahmen des Duolink Assays dargestellt. Die Expression von 3xFLAG-ZO-wt und der SUMOylierungs-defiziente Mutante 3xFLAG-ZO2-K730R ist deutlich zu erkennen (Abb. 16A; Spalte 2 oben und Mitte). Die PLA-Signale für SUMOyliertes ZO-2 sind hingegen für 3xFLAG-ZO2-K730R im Vergleich

mit dem wildtypischen 3xFLAG-ZO-2 erkennbar schwächer (Abb. 16A; Spalte 3 oben und Mitte). Dies bestätigt auch die quantitative Auswertung der Z-Stapel-Aufnahmen, in der die stark signifikante Reduktion der SUMOylierung von ZO-2-K730R um ca. 70% veranschaulicht ist (Abb. 16B). Als Kontrolle für Hintergrund-Signale wurden MDCKII-Zellen ohne Inkubation mit Primärantikörper mitgeführt (Abb. 16A; untere Reihe). Die *in situ*-Immunfluoreszenz-Aufnahmen des Duolink Assays bestätigen, dass ZO-2 *in vivo* an Lysin 730 SUMOyliert wird.

Mit Hilfe der vorliegenden Mutationsanalysen wurde Lysin 730 als mögliche SUMO-Akzeptorstelle im ZO-2-Protein identifiziert. Die SUMOylierungs-defiziente-Mutante ZO-2-K730R kann zur funktionellen Charakterisierung der SUMOylierung von ZO-2 genutzt werden.

4.5 Funktionelle Charakterisierung der SUMOylierung von ZO-2

Aus den vorigen Analysen dieser Arbeit ist hervorgegangen, dass SUMO über Lysin 730 an ZO-2 konjugiert wird. Um neben einer SUMOylierungs-defizienten-Mutante auch eine konstitutiv und irreversibel SUMOylierte ZO-2-Variante nutzen zu können, wurden SUMO-Fusionsproteine generiert. Mit Hilfe dieser SUMO-Fusionsproteine können indirekte Effekte, die durch die Co-Expression von SUMO1 und Ubc9 entstehen, eliminiert werden. Diese Art der stabilen Modifikation mit SUMO wurde auch in anderen Arbeiten u.a. bei der Untersuchung der SUMOylierung von Pontin, einer Komponente ATP-abhängiger Chromatin-Remodellierungskomplexe (Kim et al. 2007) oder bei der Charakterisierung der SUMO1-Modifikation des Transkriptionsfaktors Sp3 beschrieben (Ross et al. 2002). Um die Erkennung und Abspaltung von SUMO1 durch die SUMOylierungsmaschinerie zu verhindern, wurde SUMO1 Δ GG (AS 1-96) ohne die fünf C-terminalen Aminosäuren (97-101), welche das Di-Glycin-Motiv enthalten, verwendet. Die cDNA von SUMO1 Δ GG wurde an den N- bzw. C-Terminus von ZO-2 im pCS2+-FLAG-Vektor mit C-terminalem FLAG-Tag sowie in den p3xFLAG-CMV-10-Vektor mit N-terminalem FLAG-Tag kloniert. Anschließend wurde die Expression mittels Western Blot überprüft. Die N-terminal FLAG-getaggten (Abb. 17A) sowie die C-terminal FLAG-getaggten SUMO-Fusionsproteine von ZO-2 (Abb. 17B) werden effizient exprimiert und wurden als distinkte Banden des erwarteten Molekulargewichts von den spezifischen Antikörpern detektiert. Die SUMO-Fusion wird zudem in einem Molekulargewichtsshift der

Proteinbande im Vergleich zum 3xFLAG-ZO-2 bzw. ZO-2-FLAG deutlich. Für die folgenden Experimente wurde nur das N-terminale SUMO-Fusionsprotein (SUMO1 Δ GG-ZO-2) verwendet.

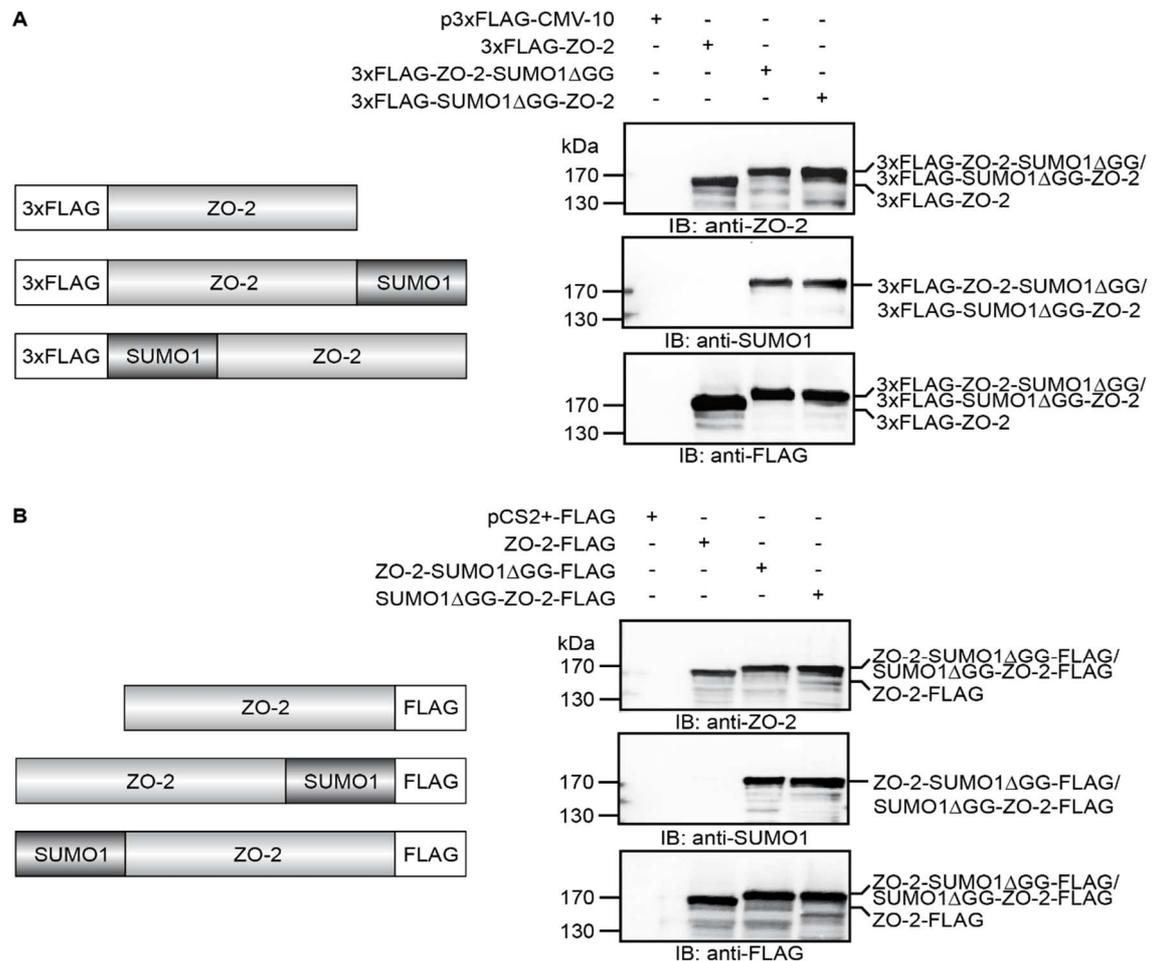


Abb. 17: Expression der SUMO-Fusionsproteine von ZO-2. (A) Schematische Darstellung der SUMO-Fusionsproteine mit N- oder C-terminal fusioniertem SUMO1 Δ GG und N-terminalem FLAG-Tag. HEK-293-Zellen wurden transient mit p3xFLAG-CMV-10-Leervektor, p3xFLAG-CMV-10-ZO2, p3xFLAG-CMV-10-ZO-2-SUMO1 Δ GG oder p3xFLAG-CMV-10-SUMO1 Δ GG-ZO-2 transfiziert. (B) Schematische Darstellung der SUMO-Fusionsproteine mit N- oder C-terminal fusioniertem SUMO1 Δ GG und C-terminalem FLAG-Tag. HEK-293-Zellen wurden transient mit pCS2+-FLAG-Leervektor, pCS2+-ZO-2-FLAG, pCS2+-ZO-2-SUMO1 Δ GG-FLAG oder pCS2+-SUMO1 Δ GG-ZO-2-FLAG transfiziert. Die Zellen wurden lysiert, die Proteine in 7,5%-igen SDS-PAA-Gelen aufgetrennt und der Western Blot mit anti-FLAG-, anti-ZO-2- und anti-SUMO1-Antikörper detektiert.

4.5.1 Einfluss der SUMOylierung auf die subzelluläre Lokalisation von ZO-2

In den nachfolgenden Experimenten sollte untersucht werden, wie sich die konstitutive SUMOylierung von ZO-2 (SUMO-Fusionsprotein) oder umgekehrt die Blockierung der SUMOylierung von ZO-2 (ZO-2-K730R) auf die subzelluläre Lokalisation von ZO-2 im

Vergleich zum Wildtypprotein auswirkt. Hierzu wurden Kern-Cytoplasma-Fraktionierungen und Kern-Rekrutierungs-Assays durchgeführt.

4.5.1.1 Kern-Cytoplasma-Fraktionierung

Es wurden MDCKII-Zellen transient mit p3xFLAG-CMV-10-ZO-2-wt, p3xFLAG-CMV-10-ZO-2-K730R oder p3xFLAG-CMV-10-SUMO1 Δ GG-ZO-2 transfiziert. Nachfolgend wurden die Zellen lysiert und Kern- bzw. Cytoplasma-Fractionen isoliert.

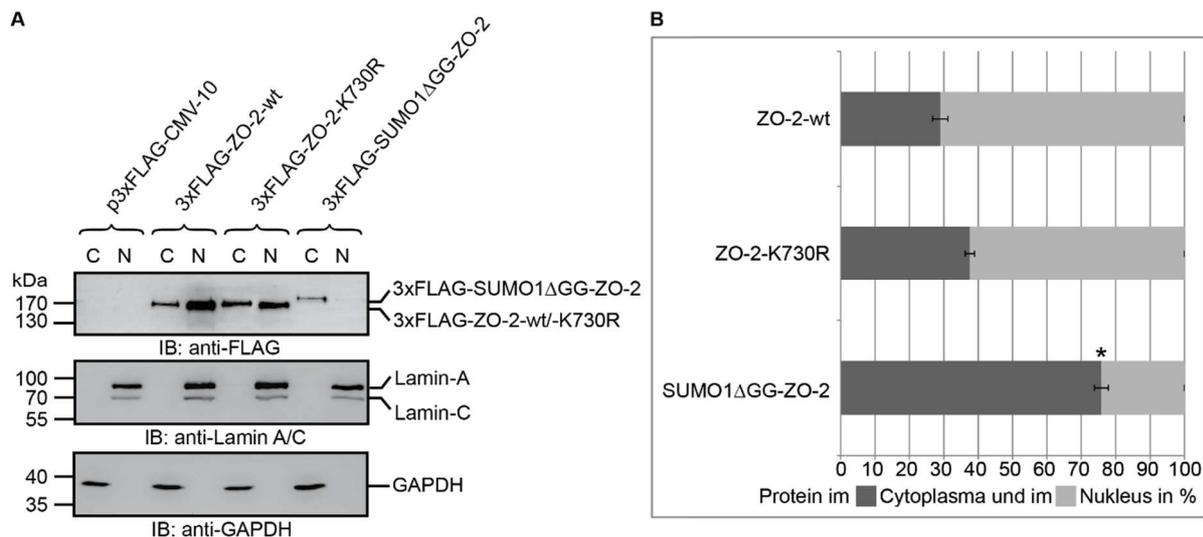


Abb. 18: SUMO1 Δ GG-ZO-2 ist vorrangig im Cytoplasma lokalisiert. (A) MDCKII-Zellen wurden transient mit dem Leervektor p3xFLAG-CMV10, p3xFLAG-CMV-10-ZO-2, p3xFLAG-CMV-10-ZO-2-K730R oder p3xFLAG-CMV-10-SUMO1 Δ GG-ZO-2 transfiziert. Die Proteine der verschiedenen Fraktionen wurden in 10%-igen SDS-PAA-Gelen aufgetrennt. Nach Western Blot erfolgte die Detektion mit anti-FLAG-Antikörper. Als Kontrolle für die erfolgreiche Zellfraktionierung wurde Zelllysat mit anti-Lamin A/C-Antikörper für die Identifikation der Kernfraktion, und anti-GAPDH-Antikörper als Ladekontrolle und cytosolischer Marker, verwendet. **(B)** Quantifizierung der Bandenintensitäten der Kern- bzw. Cytoplasma-Fraktion. Um eventuelle Unterschiede in der Expressionsstärke der einzelnen Konstrukte zu berücksichtigen, entsprechen Cytoplasma- und Kernfraktion zusammen 100%. Die Lokalisation der Proteine wurde in drei unabhängigen Experimenten analysiert. Die Daten sind als Mittelwerte \pm SEM dargestellt. Die Signifikanz (p) wurde mit dem t -Test ermittelt (* $p \leq 0,05$).

Erwartungsgemäß konnte in dem mit dem Leervektor transfizierten Ansatz kein Protein mit anti-FLAG-Antikörper detektiert werden. Bei der Fraktionierung von wildtypischem 3xFLAG-ZO-2 befand sich der Großteil des Proteins im Kern und nur ein geringerer Teil im Cytoplasma. Im Vergleich dazu zeigte die SUMOylierungs-defiziente Mutante 3xFLAG-ZO-2-K730R eine leicht vermehrte Lokalisation im Cytoplasma. Eine deutliche Translokation vom Kern ins Cytoplasma war hingegen für das 3xFLAG-SUMO1 Δ GG-ZO-2-Protein zu beobachten (Abb. 18A). Aus der densitometrischen Quantifizierung der Signale dreier unabhängiger Experimente geht hervor, dass 29% des wildtypischen 3xFLAG-ZO-2 im Cytoplasma und 71% des Proteins im Nucleus

lokalisiert sind. Die Erhöhung der cytoplasmatischen Fraktion von 3xFLAG-ZO-2-K730R auf 37% im Vergleich zum Wildtyp erwies sich als nicht signifikant. Durch die konstitutive SUMOylierung von ZO-2 ergab sich eine signifikante Umverteilung der subzellulären Lokalisation einhergehend mit einer Erhöhung des cytoplasmatischen Anteils auf 76% und einem dementsprechend geringeren Anteil von nur 24% im Kern (Abb. 18B).

4.5.1.2 Kern-Rekrutierungs-Assay

Um die Befunde aus der Kern-Cytoplasma-Fraktionierung zu bestätigen wurde in Kooperation mit der Gruppe von Dr. Lorenza Gonzáles-Mariscal [Center for Research and Advanced Studies of the National Polytechnic Institute (Cinvestav); Department of Physiology, Biophysics and Neuroscience; Mexico] ein Kern-Rekrutierungs-Assay mit den oben beschriebenen Konstrukten durchgeführt. Die Verteilung der verschiedenen Konstrukte ist in Abb. 19 als Liniendiagramm dargestellt. Wildtypisches ZO-2 verhält sich wie in den Arbeiten von Gonzalez-Mariscal beschrieben (Chamorro et al. 2009). Vier Stunden nach der Transfektion sind ca. 75% des wildtypischen ZO-2-Proteins im Kern lokalisiert. In den nachfolgenden Stunden nimmt die Menge sukzessive ab, bis ZO-2-wt nach 24 h fast vollständig im Cytoplasma oder der Plasmamembran beobachtet werden kann (Abb. 19; Kreis). Interessanterweise sind ca. 55%-65% des SUMOylierungs-defizienten ZO-2 (3xFLAG-ZO-2-K730R) über den kompletten Zeitraum der Analyse im Kern der Zellen lokalisiert (Abb. 19; Quadrat), wohingegen nur ca. 15%-20% des SUMO-Fusionsproteins (SUMO1 Δ GG-ZO-2-FLAG) nukleär lokalisiert sind (Abb. 19; Dreieck). Dieser Assay zeigt, dass die fehlende SUMOylierung im Fall der SUMOylierungs-defizienten Mutante 3xFLAG-ZO-2-K730R zu einer Akkumulation im Kern und die konstitutive SUMOylierung im Fall der SUMO1 Δ GG-ZO-2-FLAG-Variante zur Verschiebung der subzellulären Lokalisation ins Cytoplasma bzw. an die Plasmamembran führt. Die zu beobachtenden Unterschiede in der zellulären Verteilung der getesteten ZO-2-Konstrukte bestätigen somit im Wesentlichen die Ergebnisse der Kern-Cytoplasma-Fraktionierungen.

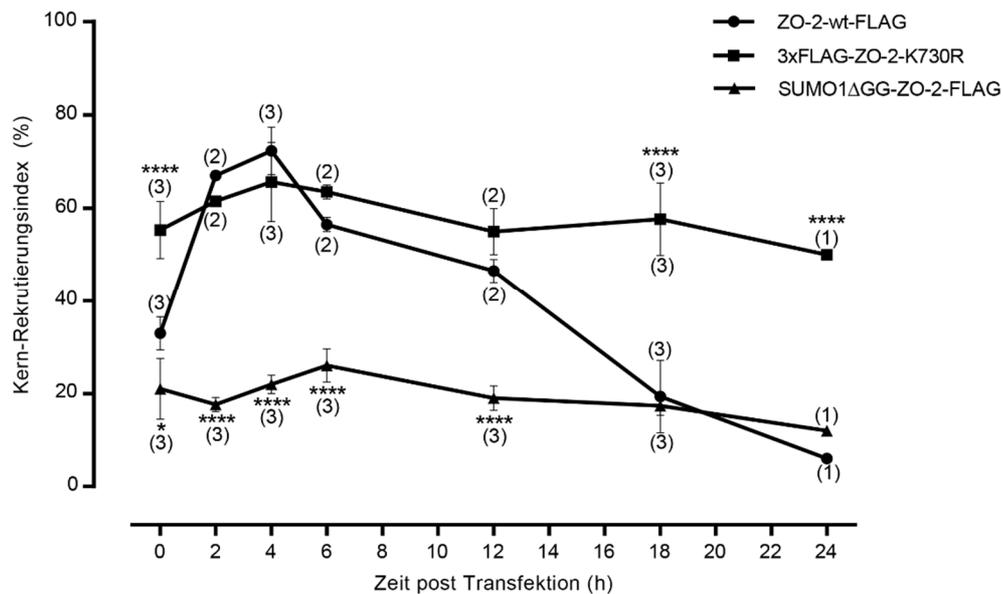


Abb. 19: Beeinflussung der subzellulären Lokalisation von ZO-2 durch dessen SUMOylierung. Dargestellt ist der Anteil der Zellen mit nukleärem ZO-2 als eine Funktion der Zeit. MDCKII-Zellen wurden transient mit pCS2+-ZO-2-wt-FLAG (Kreis), p3xFLAG-CMV-10-FLAG-K730R (Quadrat) und pCS2+-SUMO1ΔGG-ZO-2-FLAG (Dreieck) transfiziert. Die Monolayer wurden an den angegebenen Zeitpunkten fixiert (Zeitpunkt 0 entspricht 6 h nach Transfektion). Anschließend wurde eine Immunfluoreszenz-Färbung mit anti-FLAG-Antikörper durchgeführt. An jedem der genannten Zeitpunkte wurde die Verteilung der FLAG-getaggtten ZO-2-Proteine in 100 Zellen bezüglich der Lokalisation mikroskopisch analysiert. Die Zellen wurden abhängig von der vorherrschenden Lokalisation in folgende Gruppen kategorisiert: Nukleus (N), Membran (M), Cytoplasma (C), Membran und Cytoplasma (M+C), Membran und Nukleus (M+N), Cytoplasma und Nukleus (C+N) und Cytoplasma, Nukleus und Membran (C+N+M). Der Kern-Rekrutierungsindex bezieht sich auf transfizierte Zellen, die eine Kernfärbung zeigen. In Klammern ist die Zahl der unabhängig durchgeführten Experimente angegeben. Die Daten sind als Mittelwerte \pm SEM dargestellt. Für die statistische Analyse wurde der Bonferroni's multiple comparisons test verwendet (* $p=0,032$; **** $p<0,0001$).

4.5.2 Modulation des kanonischen Wnt-Signalwegs durch die SUMOylierung von ZO-2

Tapia *et al.* haben gezeigt, dass die Überexpression von ZO-2 die β -Catenin/TCF-4-vermittelte Transkriptionsaktivität dosisabhängig reprimiert (Tapia *et al.* 2009). In dieser Studie wurden verschiedene Wnt-Luciferase-Reporterkonstrukte genutzt. Zum einen wurde ein Konstrukt mit artifiziellem Promotorbereich verwendet, in dem sich drei künstliche LEF-1/TCF-4-Bindestellen befinden und als Kontrolle ein Konstrukt in dem diese Stellen mutiert sind (pGL3-OT/pGL3-OF) (Shih *et al.* 2000). Zum anderen wurde ein Reporterplasmid eingesetzt, das den natürlichen Promotorbereich des Wnt-Zielgens *Siamois* enthält, der fünf LEF-1/TCF-4-Bindestellen aufweist und ein Kontrollkonstrukt, in dem diese Stellen mutiert sind (pGL3-S01234/pGL3-S) (Brannon *et al.* 1997). In dem nachfolgendem Assay sollte untersucht werden, welchen Einfluss

die konstitutiv SUMOylierte Variante von ZO-2 (SUMO-Fusionsproteine) und die SUMO-defiziente-Variante (ZO-2-K730R) auf die β -Catenin/TCF-4-vermittelte Transkriptionsaktivität haben.

4.5.2.1 Einfluss der SUMO-Fusionsproteine auf die β -Catenin/TCF-4-vermittelte Transkriptionsaktivität

Dazu wurden in einem ersten Experiment die N- bzw. C-terminal FLAG-getaggten SUMO-Fusionsproteine in einem Dual-Luciferase-Reporter-Gen-Assay analysiert. Die relative Luciferaseaktivität ist in Abb. 20 als Balkendiagramm dargestellt. Ohne Überexpression von TCF-4/ β -Catenin ist keine Aktivierung der β -Catenin/TCF-4-vermittelten Transkriptionsaktivität zu beobachten. Die Co-Expression von TCF-4/ β -Catenin führt wie erwartet nicht zur Aktivierung der Reporter-Gen-Konstrukte mit mutierten LEF-1/TCF-4-Bindungsstellen (FOPFlash und Siamois0), jedoch zur Aktivierung des TOPFlash- und Siamois5-Reporter-Gen-Konstrukts. Durch die Überexpression von 3xFLAG-ZO-2 konnte eine Repression der β -Catenin/TCF-4-vermittelten Transkriptionsaktivität beobachtet werden. Die N-terminale SUMO-Fusion an das ZO-2-Protein (3xFLAG-SUMO1 Δ GG-ZO-2) zeigte interessanterweise keine reprimierende Wirkung (Abb. 20A links). Um diese Ergebnisse zu verifizieren wurden die N-terminal FLAG-getaggten SUMO-Fusionskonstrukte ebenfalls im natürlichen Siamois-Reporter-Gen-Assay getestet (Abb. 20A rechts). Hier war eine generell schwächere Aktivierung, welche auf das nicht artifiziell verstärkte Reportersystem zurückzuführen ist, zu beobachten. Jedoch trat der gleiche Effekt der N-terminalen SUMO-Fusion wie im TOPFlash-Reporter-Gen-Assay auf.

Um zu untersuchen, ob die Orientierung des FLAG-Tags einen Einfluss auf die oben beschriebenen Beobachtungen hat, wurden in weiteren Reporter-Gen-Experimenten C-terminal FLAG-getaggte ZO-2 Konstrukte verwendet (Abb. 20B). Die fehlende reprimierende Wirkung von 3xFLAG-SUMO1 Δ GG-ZO-2 konnte dabei ebenfalls für SUMO1 Δ GG-ZO-2-FLAG im TOPFlash- und Siamois-Reporter-Gen-Assay beobachtet werden. Damit konnten die Daten der ersten Analyse bestätigt und zugleich ausgeschlossen werden, dass die Orientierung des FLAG-Tags einen Einfluss auf den Effekt der konstitutiven SUMOylierung von ZO-2 hat. Die vorliegenden Daten zeigen, dass die N-terminale SUMO-Fusion an das ZO-2-Protein und die damit einhergehende konstitutive SUMOylierung keine Repression auf die β -Catenin/TCF-4-vermittelte Transkriptionsaktivität bewirkt.

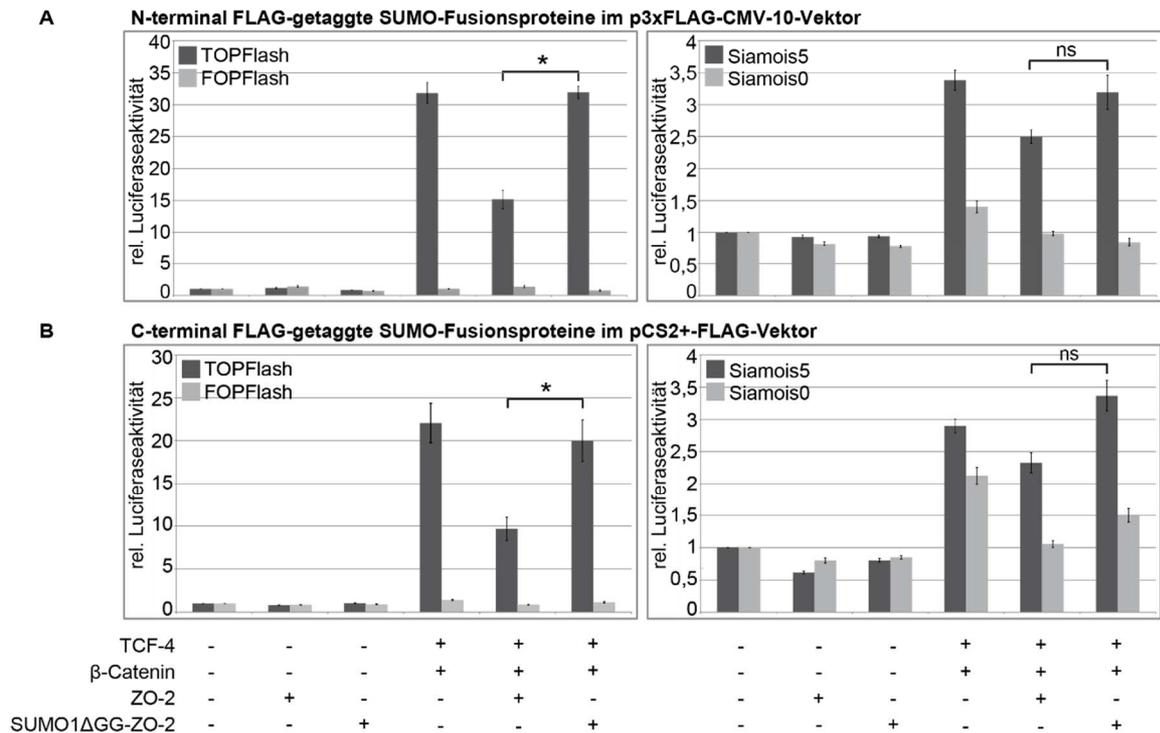


Abb. 20: Konstitutive SUMOylierung von ZO-2 hemmt die Repression der β -Catenin/TCF-4-vermittelten Transkriptionsaktivität. (A) p3xFLAG-CMV-10 basierte Konstrukte. HEK-293-Zellen wurden transient mit pGL3-TOPFlash/-FOPFlash- oder pGL3-S01234 (Siamois5)/-S (Siamois0)-Firefly-Luciferase-Reporterergenkonstrukten, phRL-Null Renilla-Luciferase-Reporterergenkonstrukt, pCS2+- β -Catenin, pcDNA-TCF-4, p3xFLAG-CMV-10-ZO-2, p3xFLAG-CMV-10-SUMO1 Δ GG-ZO-2 und Leervektoren dem Schema entsprechend transfiziert. (B) pCS2+-FLAG basierte Konstrukte. HEK-293-Zellen wurden transient mit pGL3-TOPFlash/-FOPFlash- oder pGL3-S01234 (Siamois5)/-S (Siamois0)-Firefly-Luciferase-Reporterergenkonstrukten, phRL-Null Renilla-Luciferase-Reporterergenkonstrukt, pCS2+- β -Catenin, pcDNA-TCF-4, pCS2+-ZO-2-FLAG, pCS2+-SUMO1 Δ GG-ZO-2-FLAG und Leervektoren in den angegebenen Kombinationen transfiziert. Vierundzwanzig Stunden nach Transfektion wurde die Luciferaseaktivität in einer Doppelbestimmung am Luminometer vermessen. Es wurde der Quotient aus Firefly- und Renilla-Luciferaseaktivität berechnet und auf die jeweilige Leervektor-Kontrolle ohne TCF-4/ β -Catenin Co-Transfektion normiert. Es sind die Messungen von mindestens drei unabhängigen Experimenten dargestellt. Die Daten sind als Mittelwerte \pm SEM dargestellt. Die Signifikanz (p) wurde mit dem t-Test ermittelt (* $p \leq 0,05$; ns = nicht signifikant).

4.5.2.2 Interaktion des SUMO-Fusionsproteins mit Occludin

Nachdem beobachtet wurde, dass die N-terminale SUMO-Fusion an das ZO-2-Protein keine Repression in den Reporter-Gen-Assays zeigte, stellte sich die Frage, ob dieses Fusionsprotein noch funktionell ist oder Konformationsänderungen bzw. Proteinfehlfaltungen zum Funktionsverlust führen. Aus diesem Grund wurde die Bindung des SUMO-ZO-2-Fusionsproteins an das TJ-Protein Occludin untersucht, dessen Interaktion mit ZO-2 bereits beschrieben wurde (Wittchen et al. 1999). Zur Analyse der Assoziation wurden Co-Immunpräzipitationsexperimente mit überexprimierten FLAG-getaggttem ZO-2 bzw. SUMO1 Δ GG-ZO-2 und EGFP-getaggttem Occludin durchgeführt. Bei der alleinigen Transfektion von p3xFLAG-CMV-

10-ZO-2 bzw. p3xFLAG-CMV-10-SUMO1 Δ GG-ZO-2 sowie pEGFP-C1-Occludin, konnten keine unspezifischen Bindungen detektiert werden (Abb. 21; Spur 1, 2, 3). EGFP-Occludin konnte nur in den Ansätzen, in denen 3xFLAG-ZO-2 oder 3xFLAG-SUMO1 Δ GG-ZO-2 co-exprimiert wurden, co-präzipitiert werden (Abb. 21; Spur 4 und 5). Das heißt, dass hinsichtlich der Bindung an Occludin von einem funktionellen SUMO1-ZO-2-Fusionsprotein ausgegangen werden kann.

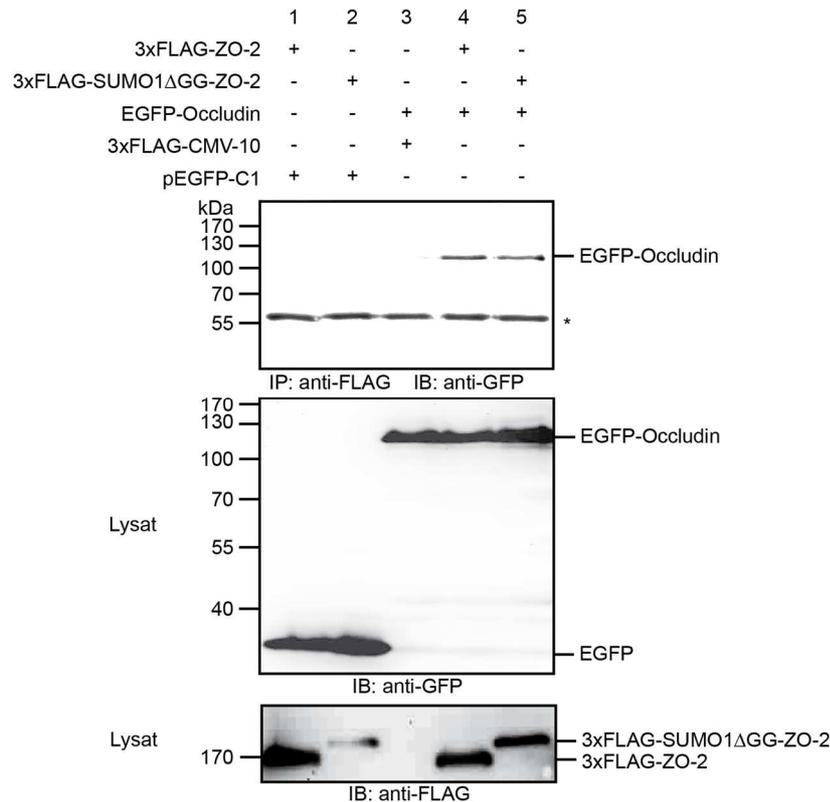


Abb. 21: Nachweis von SUMO1-ZO-2/Occludin-Komplexen in HEK-293-Zellen. p3xFLAG-CMV-10-ZO-2, p3xFLAG-CMV-10-SUMO1 Δ GG-ZO-2, pEGFP-C1-Occludin und die entsprechenden Leervektoren wurden transient in HEK-293-Zellen transfiziert. 3xFLAG-ZO-2 bzw. 3xFLAG-SUMO1 Δ GG-ZO-2 wurden mit 2 μ g anti-FLAG-Antikörper immunpräzipitiert und die Proteinkomplexe in 10%-igen SDS-PAA-Gelen aufgetrennt. Der Nachweis der Interaktion in mindestens drei unabhängigen Experimenten erfolgte im Western Blot mit anti-FLAG-Antikörper. Als Transfektionskontrolle wurde Zelllysat mit anti-GFP- und anti-FLAG-Antikörper detektiert (* schwere Kette des präzipitierenden Antikörpers).

4.5.2.3 Einfluss der SUMO-defizienten Mutante auf die β -Catenin/TCF-4-vermittelte Transkriptionsaktivität

In einem nächsten Experiment sollte untersucht werden, ob die Mutation des SUMO-Akzeptor-Lysins 730 einen Effekt auf die Funktion von ZO-2 als Repressor der β -Catenin/TCF-4 vermittelten Transkriptionsaktivität hat. Hierfür wurden wiederholt Dual-Luciferase-Reporter-Gen-Assays durchgeführt.

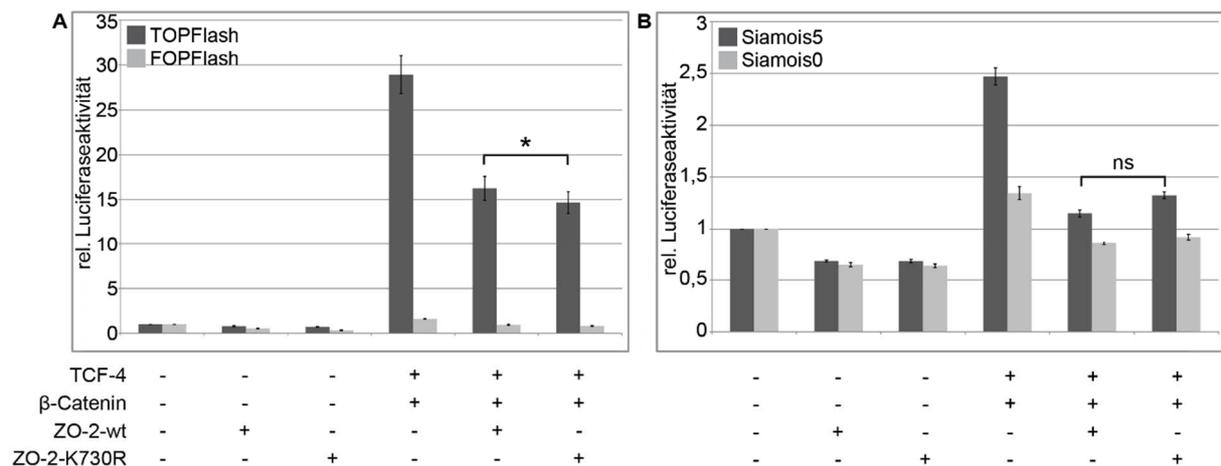


Abb. 22: Nicht SUMOylierbares 3xFLAG-ZO-2-K730R reprimiert weiterhin die β -Catenin/TCF-4-vermittelte Transkriptionsaktivität. HEK-293-Zellen wurden transient mit pGL3-TOPFlash/FOPFlash- (A) oder pGL3-S01234 (Siamois5)/ pGL3-S (Siamois0)-Firefly-Luciferase-Reporter-Genkonstrukten (B) transfiziert. In beiden Reporter-Gen-Assays wurde pHRL-Null Renilla-Luciferase-Reporter-Genkonstrukt, pCS2+- β -Catenin, pcDNA-TCF-4, p3xFLAG-CMV-10-ZO-2-wt, p3xFLAG-CMV-10-ZO-2-K730R und Leervektoren dem Schema entsprechend co-transfiziert. Der Quotient aus Firefly- und Renilla-Luciferaseaktivität aus drei unabhängigen Messungen wurde auf die jeweilige Leervektor-Kontrolle ohne TCF-4/ β -Catenin Co-Transfektion normiert. Die Daten sind als Mittelwerte \pm SEM dargestellt. Die Signifikanz (p) wurde mit dem *t*-Test ermittelt (* $p \leq 0,05$; ns = nicht signifikant).

Für den TOPFlash-Reporter ist ein deutlicher Anstieg der Transkriptionsaktivität durch die Expression von TCF-4/ β -Catenin zu verzeichnen. Wie schon in den vorigen Reporter-Gen-Assays beobachtet wurde, reprimiert die Co-Transfektion von 3xFLAG-ZO-2 die β -Catenin/TCF-4 vermittelte Transkriptionsaktivität. Zudem war eine geringe, jedoch signifikante Reduktion der Transkriptionsaktivität der 3xFLAG-ZO-2-K730R-Mutante im Vergleich zum wildtypischen 3xFLAG-ZO-2 zu beobachten (Abb. 22A). Da es sich beim TOPFlash/FOPFlash-Reporter um einen artifiziellen Promotor handelt, sollte nun analysiert werden, ob sich der Effekt auch auf dem Promotor des Wnt-Zielgens Siamois zeigt (Abb. 22B). Dabei wurde eine nicht signifikante höhere β -Catenin/TCF-4-vermittelte Transkriptionsaktivität durch die Co-Expression von 3xFLAG-ZO-2-K730R im Vergleich zum wildtypischen 3xFLAG-ZO-2 beobachtet.

Zusammenfassend kann man sagen, dass die Blockierung der SUMOylierung von ZO-2 an Lysin 730 keinen oder nur einen sehr geringen Einfluss auf die β -Catenin/TCF-4-vermittelte Transkriptionsaktivität hat.

4.5.3 Modulation des kanonischen Wnt-Signalwegs durch die gezielte Akkumulation von ZO-2 im Kern

4.5.3.1 Indirekte Immunfluoreszenz-Färbung

In den vorangegangenen Experimenten zeigte sich, dass das SUMO-Fusionsprotein SUMO1 Δ GG-ZO-2 keinen Effekt auf die β -Catenin/TCF-4-vermittelte Transkriptionsaktivität hat und zudem kaum im Kern, sondern hauptsächlich im Cytoplasma lokalisiert ist. In einem nächsten Experiment sollte untersucht werden, wie sich die gezielte Verstärkung der Kern-Lokalisation von ZO-2 auf die β -Catenin/TCF-4-vermittelte Transkriptionsaktivität auswirkt. Dazu wurde ein Konstrukt generiert, in dem ein Kernlokalisierungssignal (NLS) des Simian-Virus 40 (SV-40) C-terminal an ZO-2 fusioniert wurde. Mit dieser Fusion werden die endogenen Kernexportsignale (NES) übergangen und ZO-2 akkumuliert im Kern. Dies wurde bereits in einer Studie von Traweger *et al.* beschrieben. Dort wurde zudem gezeigt, dass diese Modifikation von ZO-2 zu einer verstärkten Proliferationsaktivität und einer verminderten junctionalen Stabilität führt (Traweger et al. 2008).

Vorab wurde mit Hilfe von indirekten Immunfluoreszenz-Färbungen getestet, ob das neu generierte ZO-2-NLS Konstrukt tatsächlich verstärkt im Kern lokalisiert ist. In Abb. 23 sind exemplarisch Aufnahmen der Immunfluoreszenz-Färbung gezeigt. Das wildtypische ZO-2 ist wie erwartet nach Überexpression in MDCKII-Zellen im Cytoplasma und im Kern zu beobachten (Abb. 23; obere Reihe). Ein deutliches Signal im Kern zeigt sich für das neu generierte ZO-2-NLS-Fusionsprotein (Abb. 23; mittlere Reihe). Die Kontrolle von MDCKII-Zellen, die ohne Primär-Antikörper inkubiert wurden, zeigte kaum unspezifische Färbungen (Abb. 23; untere Reihe). Aus diesen Aufnahmen kann man schlussfolgern, dass die C-terminale Fusion eines Kernlokalisierungssignals zur konstitutiven Kern-Akkumulation von ZO-2 führt, das damit offensichtlich den in der Einleitung beschriebenen Regulationsmechanismen entzogen wird.

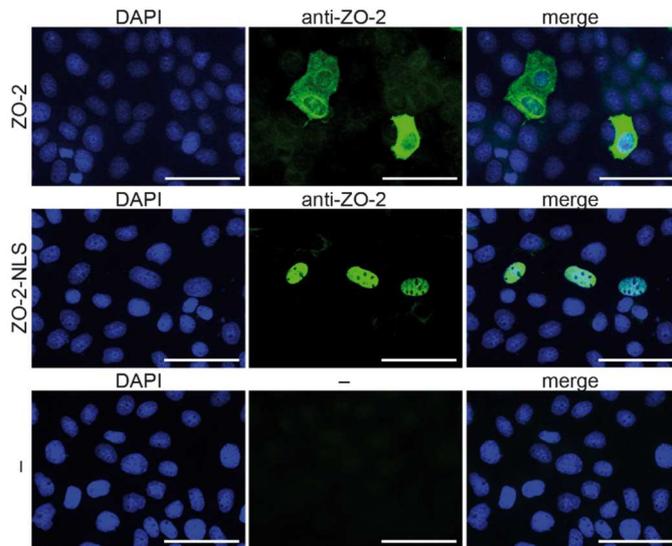


Abb. 23: ZO-2-NLS ist im Zellkern lokalisiert. MDCKII ZO-2-Knock-down Zellen wurden transient mit pCS2+-ZO-2 oder pCS2+-ZO-2-NLS transfiziert. Die transfizierten Zellen wurden mit anti-ZO-2-Antikörper (grün) und die Zellkerne mit DAPI (blau) angefärbt. Zur Kontrolle der Hintergrundsignale wurden Zellen nur mit Sekundär-Antikörper inkubiert. Die Mergedarstellung vereint die DAPI- und die Antikörper-Färbung. Es wurden konfokale Aufnahmen mit einem Fluoreszenz-Mikroskop (Zeiss Apotome) angefertigt. Der Maßstabsbalken entspricht 50 μm .

4.5.3.2 Der Einfluss von ZO-2-NLS auf die β -Catenin/TCF-4-vermittelte Transkriptionsaktivität

In dem nachfolgenden Dual-Luciferase-Reportergen-Assay wurde nun untersucht, welchen Einfluss ZO-2-NLS auf den kanonischen Wnt-Signalweg hat. Überraschenderweise zeigt ZO-2-NLS einen deutlich stärker reprimierenden Effekt im Vergleich zu wildtypischem ZO-2 (Abb. 24A). Um diesen Effekt zu verifizieren, wurde der gleiche Assay mit dem natürlichen Siamois-Reporter durchgeführt (Abb. 24B). Hier war zwar wie in den vorigen Siamois-Reporter-Gen-Assays eine generell schwächere Aktivierung zu verzeichnen, jedoch war ein vergleichbarer, sehr signifikanter Effekt von ZO-2-NLS wie im TOPFlash-Reporter-System zu beobachten. Zusammenfassend lässt sich feststellen, dass die verstärkte Kernlokalisierung von ZO-2, die hier durch Überexpression von ZO-2-NLS induziert wurde, zu einer verstärkten Repression der β -Catenin/TCF-4-vermittelten Transkriptionsaktivität im Vergleich zu wildtypischem ZO-2 führt.

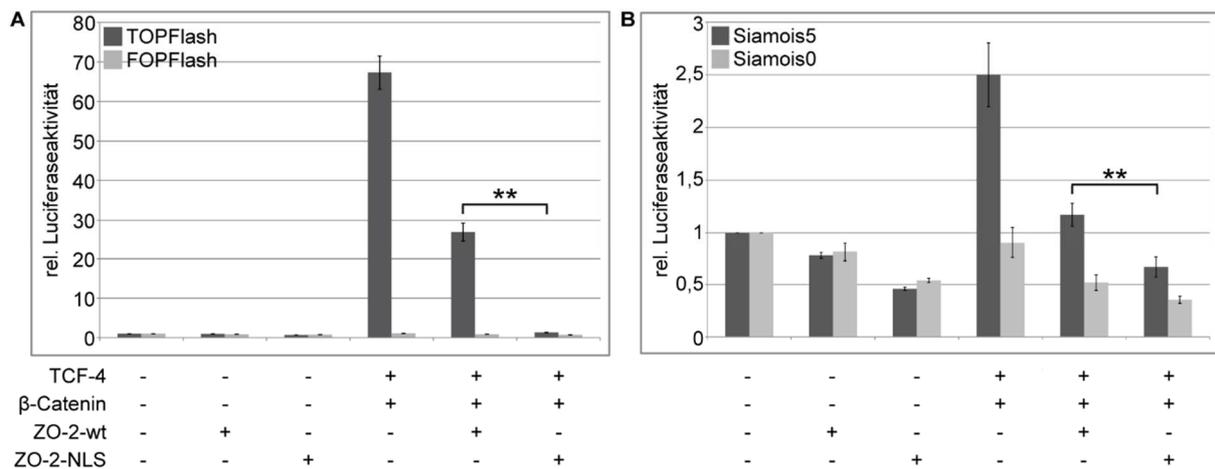


Abb. 24: ZO-2-NLS verstärkt die Repression der β -Catenin/TCF-4-vermittelten Transkriptionsaktivität. HEK-293-Zellen wurden transient in **(A)** mit pGL3-TOPFlash/-FOPFlash- oder in **(B)** mit pGL3-S01234 (Siamois5)/- pGL3-S (Siamois0)-Firefly-Luciferase-Reporterergenkonstrukten transfiziert. In beiden Reporterergen-Assays wurde phRL-Null Renilla-Luciferase-Reporterergenkonstrukt, pCS2+ β -Catenin, pcDNA-TCF-4, pCS2+ZO-2 bzw. pCS2+ZO-2-NLS und die Leervektoren in den angegebenen Kombinationen co-transfiziert. Es wurde der Quotient aus Firefly- und Renilla-Luciferaseaktivität berechnet und auf die jeweilige Leervektor-Kontrolle ohne TCF-4/ β -Catenin Co-Transfektion normiert. Dargestellt sind Messungen von mindestens drei unabhängigen Experimenten als Mittelwerte \pm SEM. Die Signifikanz (p) wurde mit dem *t*-Test ermittelt (** $p \leq 0,01$).

4.5.3.3 Interaktion von ZO-2 und β -Catenin

Die Überexpression von ZO-2 reprimiert die β -Catenin/TCF-4-vermittelte Transkriptionsaktivität (Tapia et al. 2009). Die vorangegangenen Analysen zeigen, dass die gezielte Akkumulation von ZO-2 im Nukleus die Repression der Transkriptionsaktivität um ein Vielfaches verstärkt. Aus diesem Grund sollte nun untersucht werden, ob ZO-2 und β -Catenin miteinander interagieren. Eine Interaktion von *Zonula occludens*-Proteinen mit β -Catenin ist derzeit nur für ZO-1 beschrieben (Rajasekaran et al. 1996). Um die Assoziation zu analysieren, wurde eine Co-Immunpräzipitation mit überexprimierten Proteinen sowie ein Duolink Assay mit endogenen Proteinen durchgeführt.

Abbildung 25 zeigt exemplarisch einen Western Blot der Co-Immunpräzipitation. Es konnten keine unspezifischen Bindungen beobachtet werden, wenn 3xFLAG-ZO-2 bzw. β -Catenin-S33A-myc₆ allein exprimiert wurde (Abb. 25; Spur 1 und 2). Jedoch konnte 3xFLAG-ZO-2 in dem Ansatz co-präzipitiert werden, in dem β -Catenin-S33A-myc₆ exprimiert wurde (Abb. 25; Spur 3). Aus dieser Co-Immunpräzipitation kann man schließen, dass sich ZO-2/ β -Catenin-Komplexe nach Überexpression in HEK-293-Zellen ausbilden können.

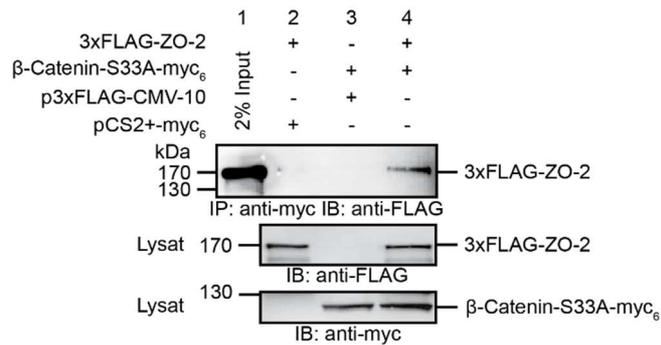


Abb. 25: Nachweis von ZO-2/ β -Catenin-Komplexen in HEK-293-Zellen. p3xFLAG-CMV-10-ZO-2 sowie pCS2+- β -Catenin-S33A-myc₆ wurden allein oder in Kombination transient in HEK-293-Zellen transfiziert und eine Immunpräzipitation mit anti-myc-Antikörper durchgeführt. Zum Nachweis des co-präzipitierten 3xFLAG-ZO-2 in mindestens drei unabhängigen Versuchen wurden die Proteinkomplexe in 10%-igen SDS-PAA-Gelen aufgetrennt und im Western Blot mit anti-FLAG-Antikörper analysiert. Als Transfektionskontrolle wurden die exprimierten Proteine im Zelllysat mit anti-FLAG- und anti-myc-Antikörper detektiert.

Um dieses Ergebnis *in vivo* mit endogenen Proteinen zu verifizieren, kam ein Proximity Ligation Assay zur Anwendung. Hierfür wurden MDCKII- und als Kontrolle MDCKII ZO-2-Knock-down Zellen verwendet. Nach Fixierung und Permeabilisierung der Zellen fand eine Analyse der Interaktion von ZO-2 und β -Catenin mit spezifischen anti-ZO-2- und anti- β -Catenin-Antikörpern im Duolink Assay statt.

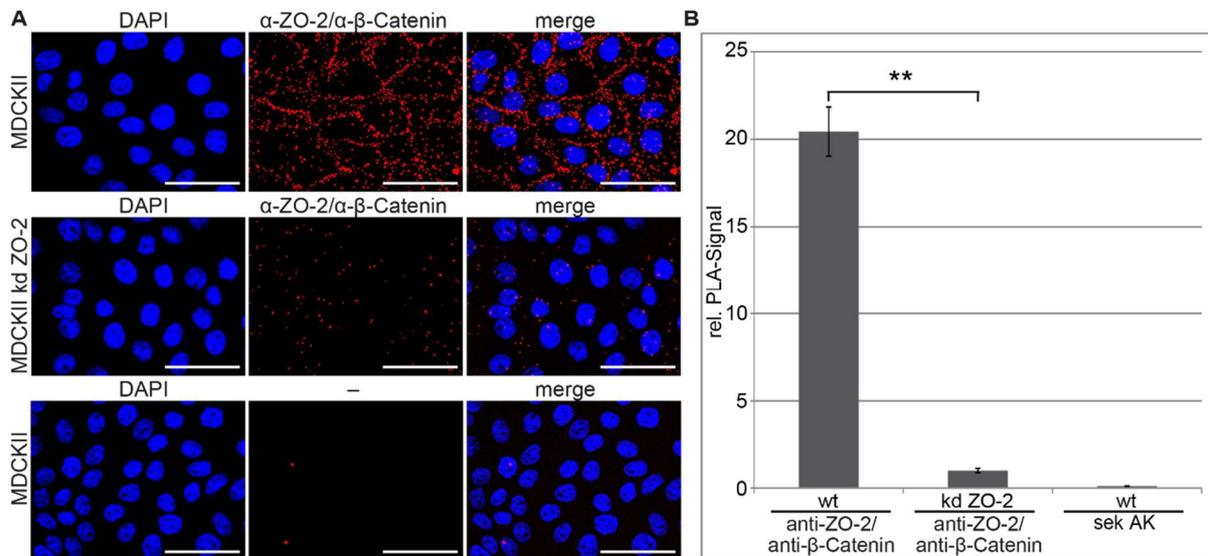


Abb. 26: ZO-2 und β -Catenin interagieren an der Plasmamembran. (A) Konfokale immunfluoreszenzmikroskopische Aufnahmen von MDCKII- oder MDCKII ZO-2-Knock-down-Zellen, die mit anti-ZO-2- und anti- β -Catenin-Antikörper oder als technische Negativ-Kontrolle, nur mit den PLA-Probes konjugierten sekundären Antikörpern inkubiert wurden. Die Zellkerne wurden mit DAPI (blau) angefärbt und die roten Punkte stellen die Interaktion von ZO-2 und β -Catenin dar. Die Mergedarstellung vereint die DAPI- und die PLA-Signale. Die Z-Stapel-Aufnahmen wurden mit Hilfe der Fiji Software zu einer Maximumintensitätsprojektion verarbeitet. Der Maßstabsbalken entspricht 50 μ m. (B) Quantitative Auswertung der Signale die auf die Zellzahl bezogen und auf die Kontrolle mit MDCKII ZO-2-Knock-down-Zellen normiert wurden. Die Interaktion von ZO-2 und β -Catenin wurde in drei unabhängigen Experimenten mit Hilfe der Fiji Software analysiert. Die Daten sind als Mittelwerte \pm SEM dargestellt. Die Signifikanz (p) wurde mit dem *t*-Test ermittelt (** $p \leq 0,01$).

Der Proximity Ligation Assay liefert spezifische Signale, die eine Interaktion von ZO-2 und β -Catenin in MDCKII-Zellen nachweisen. Ein großer Vorteil des Assays ist, dass neben der detektierten Interaktion auch deren Lokalisation sichtbar gemacht wird. In diesem Fall ist sehr deutlich zu erkennen, dass die ZO-2/ β -Catenin-Interaktion an der Plasmamembran lokalisiert ist (Abb. 26A; obere Reihe). Eine signifikante Abnahme der PLA-Signale zeigte sich, wenn anstelle der wildtypischen MDCKII-Zellen, MDCKII ZO-2-Knock-down-Zellen verwendet wurden (Abb. 26A; mittlere Reihe). Es wurden kaum unspezifische Hintergrund-Färbungen beobachtet (Abb. 26A; untere Reihe). Die Quantifizierung der Signale macht den sehr signifikanten Unterschied zwischen der Kontrolle mit wildtypischen MDCKII-Zellen und MDCKII ZO-2-Knock-down-Zellen deutlich (Abb. 26B). Der Assay bestätigt somit auch eine Interaktion für endogenes ZO-2 und β -Catenin. Jedoch zeigen die immunfluoreszenzmikroskopischen Bilder, dass diese Komplexe bevorzugt im Bereich der Plasmamembran lokalisiert sind.

4.5.3.4 β -Catenin-Unabhängigkeit der durch ZO-2-NLS vermittelten Transkriptionsrepression

Die bisherigen Untersuchungen zeigten eindeutig, dass ZO-2 und β -Catenin miteinander interagieren können. Die Ergebnisse des Duolink Assays weisen aber darauf hin, dass diese Interaktion hauptsächlich in membranassoziierten Komplexen stattfindet. Daher sollte im nachfolgenden Experiment analysiert werden, ob der transkriptionsrepressive Effekt von ZO-2-NLS durch β -Catenin vermittelt wird oder auch unabhängig davon beobachtet werden kann. Dafür wurde ein Δ NLEF-1-VP16-Konstrukt verwendet, in dem der N-Terminus von LEF-1 deletiert wurde und dem somit die β -Catenin-bindende Domäne fehlt. Durch die Fusion mit der Transaktivierungsdomäne des Herpes Simplex Virus-Proteins VP16 ist dieses Konstrukt konstitutiv aktiv (Aoki et al. 1999). Damit kann eine Aktivierung unabhängig von β -Catenin erfolgen. Ein Repressor, der seine Funktion über die Interaktion mit β -Catenin ausübt, dürfte somit keinen repressiven Effekt hervorrufen. Es wurden daher Dual-Luciferase-Reporter-Gen-Assays mit dem Δ NLEF-1-VP16-Konstrukt durchgeführt.

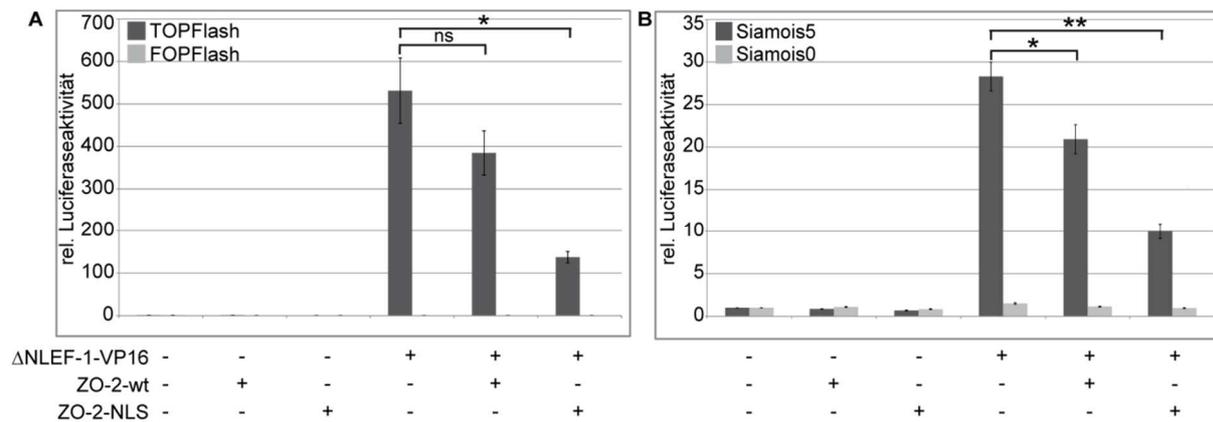


Abb. 27: Die Transkriptionsrepression durch ZO-2 oder ZO-2-NLS ist unabhängig von β -Catenin. HEK-293-Zellen wurden transient in (A) mit pGL3-TOPFlash/-FOPFlash- oder in (B) mit pGL3-S01234 (Siamois5)/ pGL3-S(Siamois0)-Firefly-Luciferase-Reporterergenkonstrukten transfiziert. In beiden Reporterergen-Assays wurde phRL-Null Renilla-Luciferase-Reporterergenkonstrukt, pCS2+- Δ NLEF-1-VP16, pCS2+-ZO-2 oder pCS2+-ZO-2-NLS mit den entsprechenden Leervektoren co-transfiziert. Es sind die relativen Luciferaseaktivitäten als Mittelwerte (\pm SEM) von mindestens drei unabhängigen Experimenten dargestellt. Die Signifikanz (p) wurde mit dem *t*-Test ermittelt (* $p \leq 0,05$; ** $p \leq 0,01$; ns = nicht signifikant).

Die Überexpression von Δ NLEF-1-VP16 führte erwartungsgemäß zu einer sehr starken Aktivierung im Reporterergen-Assay. Diese wird durch Co-Expression von ZO-2 bzw. ZO-2-NLS im TOPFlash- und Siamois5-Reportersystem gehemmt (Abb. 27A und B). Daraus kann man schließen, dass die verstärkte Repression der β -Catenin/TCF-4-vermittelten Transkriptionsaktivität durch die Überexpression von ZO-2 oder ZO-2-NLS über einen von der Interaktion mit β -Catenin unabhängigen Mechanismus abläuft.

4.5.3.5 Interaktion von ZO-2 und GSK3 β

Aufgrund dieser Ergebnisse stellt sich natürlich die Frage, wie ZO-2 die β -Catenin-vermittelte Transkription reprimieren kann. Eine mögliche Erklärung dieses Effektes könnte die Beeinflussung der GSK3 β -Funktion sein. Es wurde gezeigt, dass die inhibitorische Phosphorylierung von GSK3 β an Ser9 durch die Überexpression von ZO-2 über einen noch unbekanntem Mechanismus reduziert wird (Tapia et al. 2009). Dadurch wird die Aktivität des β -Catenin-Abbau-Komplexes erhöht und β -Catenin vermehrt proteasomal abgebaut. In diesem Zusammenhang ist aber bisher nicht bekannt, ob ZO-2 diesen Effekt durch eine Interaktion mit GSK3 β vermittelt.

Es wurden Co-Immünpräzipitationsexperimente mit überexprimierten FLAG-getaggetem ZO-2 und myc-getaggetem GSK3 β durchgeführt.

In den Kontrollansätzen, in denen 3xFLAG-ZO-2 oder GSK3 β -myc₆ allein exprimiert wurde, konnten keine unspezifischen Signale beobachtet werden (Abb. 28; Spur 1 und 2). Eine Co-Immunpräzipitation von p3xFLAG-ZO-2 konnte nur in Lysaten von HEK-293-Zellen beobachtet werden, die mit p3xFLAG-CMV-10-ZO-2 und pCS2+-GSK3 β -myc₆ transfiziert wurden. (Abb. 28; Spur 3). Somit konnte die Bildung von ZO-2/GSK3 β -Komplexen nach Überexpression in HEK-293-Zellen nachgewiesen werden.

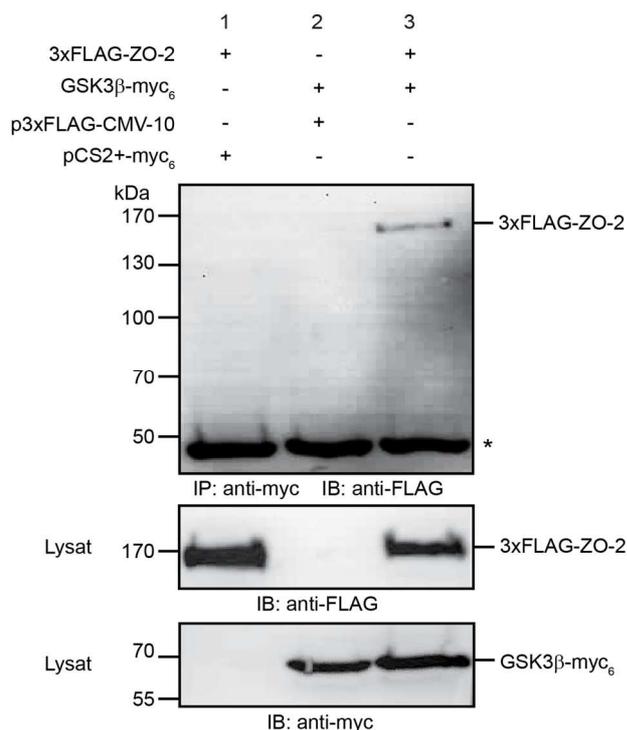


Abb. 28: Nachweis von ZO-2/GSK3 β -Komplexen in HEK-293-Zellen. HEK-293-Zellen wurden transient mit p3xFLAG-CMV-10-ZO-2 sowie pCS2+-GSK3 β -myc₆ und den entsprechenden Leervektoren transfiziert. Die Immunpräzipitation wurde mit jeweils 2 μ g anti-myc-Antikörper durchgeführt. Die präzipitierten Proteinkomplexe wurden in 10%-igen SDS-PAA-Gelen aufgetrennt. Nach Western Blot erfolgte die Detektion mit anti-FLAG-Antikörper. Als Transfektionskontrolle wurde Zelllysat mit anti-FLAG- und anti-myc-Antikörper detektiert (* schwere Kette des präzipitierenden Antikörpers). Es ist exemplarisch ein Western Blot von mindestens drei unabhängig durchgeführten Co-Immunpräzipitationen dargestellt.

Die Komplexbildung von endogenem ZO-2 und GSK3 β wurde in einem Proximity Ligation Assay untersucht. Die Immunfluoreszenz-Aufnahmen der MDCKII-Zellen zeigen spezifische PLA-Signale für die Interaktion von ZO-2 und GSK3 β (Abb. 29A; obere Reihe). Eine Abnahme der Duolink Spots zeigte sich, wenn anstelle des spezifischen anti-GSK3 β -Antikörpers der non-target-Antikörper P5D4 verwendet wurde (Abb. 29A; mittlere Reihe). Die Quantifikation der Signale verdeutlicht den signifikanten Unterschied zwischen der Inkubation mit spezifischem anti-ZO-2- und GSK3 β -Antikörper bzw. der Kontrolle mit anti-ZO-2- und P5D4-Antikörper (Abb. 29B). Diese hier vorliegenden *in situ*-Immunfluoreszenz-Aufnahmen zeigen, dass ZO-2 mit GSK3 β *in vivo* interagiert.

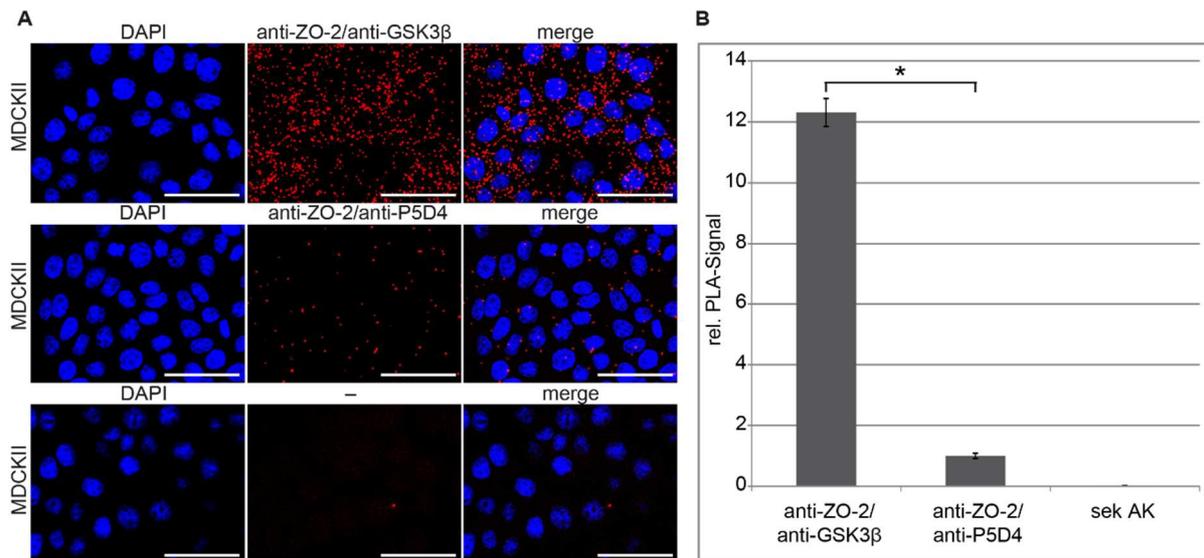


Abb. 29: ZO-2 interagiert *in vivo* mit GSK3β. (A) Konfokale Immunfluoreszenzmikroskopie-Aufnahmen von MDCKII-Zellen die mit anti-ZO-2- und anti-GSK3β-Antikörper, mit anti-ZO-2- und dem non-target-Antikörper P5D4 oder nur mit den PLA-Probes-konjugierten sekundären Antikörpern inkubiert wurden. Die Zellkerne wurden mit DAPI (blau) angefärbt und die roten Punkte entsprechen der Interaktion von ZO-2 und GSK3β. Die Merge-Darstellung vereint die DAPI-Färbung und die PLA-Signale. Die Z-Stapel-Aufnahmen wurden mit Hilfe der Fiji Software zu einer Maximumintensitätsprojektion verarbeitet. Der Maßstabsbalken entspricht 50 μm. (B) Quantitative Auswertung der Duolink Spots in drei unabhängigen Experimenten. Die Signale wurden auf die Zellzahl bezogen und auf die Kontrolle mit dem non-target-Antikörper P5D4 normiert (Mittelwerte; ± SEM). Die Analyse der Z-Stapel-Aufnahmen erfolgte mit der Fiji Software. Die Signifikanz (p) wurde mit dem *t*-Test ermittelt (* $p \leq 0,05$).

5 Diskussion

TJs sind im apikalen Bereich der lateralen Zellmembran lokalisierte Zell-Zell-Kontakte, die neben der Regulation des parazellulären Transports und der Aufrechterhaltung der Zellpolarität in zahlreiche Signalwege involviert sind (Matter und Balda 2003b). ZO-2 ist ein für die Ausbildung der TJ-Stränge essentielles Multidomänen-Protein (Umeda et al. 2006), welches als Gerüstprotein die integralen TJ und GAP Junction-Proteine mit dem Aktin-Cytoskelett verbindet und dort durch die Interaktion mit weiteren Adapter- und Signalmolekülen zur Ausbildung des cytoplasmatischen Plaques beiträgt. Es ist ein dual-lokalisiertes Nacos (nuclear and adhesion complexes) Protein, dessen subzelluläre Lokalisation von der Zelldichte abhängig ist. In konfluenten und dichten Zellen ist ZO-2 an der Plasmamembran lokalisiert, wohingegen es in dünn ausgesäten Zellen vorrangig im Kern zu finden ist (Islas et al. 2002). Das intrazelluläre Pendeln von ZO-2 wird durch den Zellzyklus gesteuert (Tapia et al. 2009) und durch Kernimport- bzw. Kernexport-Signale und deren posttranslationale Modifikationen reguliert (Quiros et al. 2013). Da im Rahmen dieser Arbeit mittels computergestützter Aminosäuresequenzanalyse mehrere evolutionär hochkonservierte potenzielle SUMOylierungsstellen im humanen ZO-2 identifiziert wurden und die SUMOylierung von Proteinen häufig mit der Veränderung der subzellulären Lokalisation assoziiert ist, war es von großem Interesse, die SUMOylierung von ZO-2 und die daraus resultierende funktionelle Konsequenz zu analysieren. Die Ergebnisse dieser Arbeit sollen nun diskutiert und mit Beobachtungen bisheriger Publikationen verglichen werden.

5.1 Die SUMOylierung von ZO-2

Bei der SUMOylierung wird SUMO in einem dreistufigen Prozess enzymatischer Reaktionen kovalent an Lysinreste in Zielproteinen gebunden. Das SUMO-Vorläuferprotein wird durch die SENP-Proteine C-terminal prozessiert, um das C-terminale Di-Glycin-Motiv zu exponieren. SUMO wird anschließend in einer ATP-abhängigen Reaktion aktiviert und über das Di-Glycin-Motiv an das SUMO-aktivierende Enzym, einem Heterodimer aus dem SAE1/SAE2-Protein, gebunden. Es wird nachfolgend zum SUMO-konjugierenden Enzym Ubc9 transferiert, welches mit

Hilfe von SUMO-spezifischen Ligasen die Modifikation des Substrats katalysiert. Die DeSUMOylierung wird ebenfalls von SENP-Proteinen vermittelt.

In der vorliegenden Arbeit wurde die Interaktion von ZO-2 mit der SUMO-spezifischen Protease SENP1 durch Co-Immunpräzipitationsexperimente nachgewiesen. SENP1 ist die einzige SUMO-spezifische Protease, die beide SUMO-Isoformen, SUMO1 und SUMO2/3, gleichermaßen präferiert (Gong et al. 2000). Dies stimmt wiederum mit den Ergebnissen des UFDS-Assays überein, nach denen ZO-2 sowohl mit SUMO1 als auch mit SUMO2/3 modifiziert werden kann. Des Weiteren ist SENP1 zur Prozessierung des SUMO-Vorläuferproteins und der Dekonjugation von SUMO, jedoch nicht zur Editierung von SUMO-Ketten befähigt, was auf eine Mono- oder Multi-SUMOylierung von ZO-2 hindeutet.

Da Ubc9 das bisher einzig bekannte SUMO-konjugierende Enzym darstellt, sollte seine Interaktion mit ZO-2 analysiert werden. Mit Hilfe von GST-Pull-down Assays konnte eine direkte Interaktion von ZO-2 und Ubc9 bestätigt werden. Eine Interaktion mit Ubc9 konnte für eine Vielzahl von klassischen SUMO-Substraten wie z.B. dem ersten identifizierten SUMO-Target RanGAP1 (Lee et al. 1998), p53 (Shen et al. 1996) oder PIAS (Kahyo et al. 2001) nachgewiesen werden.

Aufgrund der meist schwachen und transienten Modifikationen mit SUMO und der daraus resultierenden geringen Menge an spezifisch SUMOylierten Proteinen (< 5%) wurden zum Nachweis der *in vivo* SUMOylierung von ZO-2 der Ubc9 fusion-dependent SUMOylation (UFDS)-Assay und der Duolink Assay genutzt.

Die Fusion von Ubc9 an den N-Terminus von ZO-2 (pNU-Ubc9-ZO-2) zeigte keine höhermolekularen Shiftbanden bei Co-Expression von SUMO1 oder SUMO2/3 (nicht gezeigt), wohingegen bei C-terminaler Fusion (pCU-ZO-2-Ubc9) die SUMOylierung von ZO-2 mit beiden SUMO-Varianten nachgewiesen werden konnte. Eine mögliche Ursache dafür könnte die Existenz eines aus drei Glycinresten bestehenden Linkers im pCU-Vektor sein, der im pNU-Vektor nicht vorhanden ist. Dieser Linker könnte für eine erhöhte Flexibilität des fusionierten Ubc9-Proteins verantwortlich sein. Zusätzlich könnte diese Beobachtung auf die Lokalisation der SUMOylierungsstelle am C-Terminus hinweisen, was mit dem identifizierten SUMO-Akzeptor-Lysin 730 im C-terminalen Bereich des ZO-2-Proteins übereinstimmt. In der Arbeit von Jakobs *et al.* wurde am Beispiel der gut untersuchten SUMO-Substrate p53 und STAT1 auch eine Modifikation der Ubc9-Fusionsproteine durch endogenes SUMO beschrieben, welche als schwächere höhermolekulare Bande im Vergleich zu den bei der Co-Expression

von SUMO erhaltenen Signalen sichtbar wurde (Jakobs et al. 2007). Für das ZO-2-Ubc9-Fusionsprotein konnte keine endogene SUMOylierung detektiert werden. Das kann mehrere Gründe haben. Zum einen kann dies auf unzureichende Auftrennung der SDS-PAGE aufgrund des hohen Molekulargewichts von ZO-2 (160 kDa) zurückzuführen sein. Zum anderen könnte die endogene SUMOylierung von ZO-2-Ubc9 auch zu schwach sein, um im Western Blot detektiert zu werden. Inwieweit die endogene SUMOylierung im UFDS-Assay ein Zeichen für eine physiologische SUMOylierung ist, bleibt zu klären. Die durch die SUMOylierung hervorgerufene Molekulargewichtsverschiebung ist meist größer als das Molekulargewicht des SUMO-Proteins von ca. 11 kDa und beträgt oft 20 kDa. Darüber hinaus ist die Molekulargewichtsverschiebung abhängig von der Lokalisation der SUMOylierung innerhalb des Substratproteins. Es wurde beobachtet, dass die Modifikation mit SUMO am N- oder C-Terminus eines Proteins einen geringeren Shift als die kovalente Bindung von SUMO an einem zentral gelegenen Lysin verursacht. Zur weiteren Verifikation der mit dem UFDS-Assay identifizierten Modifikation mit SUMO wurde eine von Jakobs *et al.* empfohlene Co-Immünpräzipitation des ZO-2-Ubc9-Proteins durchgeführt, in der co-exprimiertes SUMO nachgewiesen werden konnte (nicht gezeigt). Die Auto-SUMOylierung von Ubc9 im UFDS-Assay wurde durch die Mutation des SUMO-Akzeptor-Lysins 14 ausgeschlossen. Die verstärkte SUMOylierung durch Co-Expression der Protease-resistenteren SUMO2/3-Variante (SUMO2/3-Q89P) zeigt im Vergleich zur Co-Expression von wildtypischen SUMO2/3 zwei bis drei höhermolekulare Banden. Dies spricht für eine sequentielle Multi- oder, da SUMO2/3 zudem fähig ist SUMO-Ketten durch interne Lysinreste zu bilden, Poly-SUMOylierung des ZO-2-Proteins. Um die SUMOylierung diesbezüglich zu differenzieren, könnte das für die Ausbildung von SUMO-Ketten verantwortliche Lysin 11 im SUMO2/3 mutiert und mit ZO-2-Ubc9 co-exprimiert werden. Des Weiteren konnte die SUMOylierung von ZO-2 durch die Co-Expression der SUMO-spezifischen Protease SENP1, deren Interaktion mit ZO-2 auch mittels Co-Immünpräzipitation nachweisbar war, im UFDS-Assay reduziert werden.

Mit Hilfe des Duolink Assays, mit dem man transiente und schwache Protein-Modifikationen detektieren und quantifizieren kann, konnte die endogene SUMOylierung von ZO-2 mit SUMO1 nachgewiesen werden. Bei dieser Methode entsteht nur ein Fluoreszenz-Signal, wenn sich die Proteine in räumlicher Nähe befinden. Die durchgeführten Z-Stack Aufnahmen, wobei Bilder in einem definierten

Abstand vertikal durch die Zelle aufgenommen werden, gewährleisten, dass die Fluoreszenz-Signale aller Ebenen detektiert werden. Ein weiterer Vorteil des Duolink Assays ist, dass die Lokalisation der Interaktion direkt ersichtlich ist. Die SUMOylierung von ZO-2 ist sowohl im Cytoplasma als auch im Kern zu detektieren, wobei der Großteil der Duolink Spots im Cytoplasma lokalisiert ist. Dies stützt die Daten der Kern-Cytoplasma-Fraktionierungs- und Kern-Rekrutierungs-Assays, in denen eine deutlich verstärkte cytoplasmatische Lokalisation des SUMO-ZO-2-Fusionsproteins nachgewiesen werden konnte. Zudem wäre es interessant herauszufinden, ob ZO-2 im Cytoplasma oder im Kern SUMOyliert wird. Einen Hinweis auf die Lokalisation der SUMOylierung von ZO-2 könnte die Nutzung eines Kernexport-Inhibitors mit anschließendem Proximity Ligation Assay zur Detektion der SUMOylierung von ZO-2 geben.

Eine SUMOylierung von ZO-2 konnte ebenfalls durch *in vitro* SUMOylierung von rekombinantem ZO-2 nachgewiesen werden. Da es schwierig war, Vollängen-ZO-2 rekombinant zu exprimieren und aufzureinigen, wurde nur der C-Terminus des ZO-2-Proteins für den Assay genutzt. Es konnten keine einzelne, höhermolekulare Bande, sondern ein über einen breiteren Molekulargewichtsbereich verteiltes Signal detektiert werden, was auf eine sequentielle Multi- oder Poly-SUMOylierung des Substrats ZO-2 hinweist. Die Kettenbildung von SUMO1 konnte bis jetzt nur *in vitro* für die humane DNA Topoisomerase I beobachtet werden (Yang et al. 2006a) und ist möglicherweise auf die große Menge frei verfügbarer SUMO1-Moleküle im Reaktionsansatz zurückzuführen. Die detektierte SUMOylierung deutet darauf hin, dass die SUMOylierungsstelle im C-Terminus von ZO-2 lokalisiert ist, was durch die folgenden Studien bezüglich der Identifikation des SUMO-Akzeptor-Lysins bestätigt wurde.

Ob endogenes und rekombinantes ZO-2 auch mit SUMO2/3 modifiziert werden kann, müsste mittels Duolink Assay mit spezifischem SUMO2/3-Antikörper sowie mit rekombinantem SUMO2/3 im SUMOlink Assay überprüft werden.

5.2 ZO-2 wird kovalent an Lysin 730 SUMOyliert

In der Aminosäuresequenz des humanen ZO-2-Proteins existieren insgesamt 66 Lysine, die potenziell SUMOyliert werden könnten. Mit Hilfe der computergestützten Aminosäuresequenzanalyse des SUMOplot™-Programms wurden mehrere mit hoher Wahrscheinlichkeit genutzte, potenzielle SUMOylierungsstellen im humanen ZO-2-Protein identifiziert. Aufgrund dessen wurden die Lysinreste 117, 730, 759 und 992

durch Arginin-Reste mittels PCR-basierter ortsspezifischer Mutagenese in den SUMO-Motiven substituiert und potenziell SUMOylierungs-defiziente Einzelmutanten generiert. Diese wurden zunächst im UFDS-Assay auf eine signifikante Reduktion der höhermolekularen SUMOylierungsbande hin analysiert. Eine deutliche Reduktion der SUMOylierung konnte nur für die ZO-2-K730R-Ubc9-Mutante im Vergleich zum wildtypischen ZO-2-Ubc9 beobachtet werden. Die evolutionäre Konservierung dieses Lysinrests spricht für eine mögliche funktionelle Relevanz. Es ist jedoch eine Rest-SUMOylierung der Mutante detektierbar, was möglicherweise auf die Existenz weiterer SUMO-Akzeptor-Lysine hinweist. Auch die artifiziell verstärkte SUMOylierung von ZO-2 durch die Fusion von Ubc9 könnte ein Grund für die Rest-SUMOylierung sein. In der Arbeit von Jakobs *et al.* ist für die SUMOylierungs-defiziente p53-Mutante im UFDS-Assay ebenfalls eine Rest-SUMOylierung des Proteins beschrieben (Jakobs *et al.* 2007). Eine kombinierte Mutation von drei (K117R, K759R, K992R) bzw. vier Lysinresten (K117R, K730R, K759R, K992R) in ZO-2, die ebenfalls als potenzielle SUMOylierungsstellen vorhergesagt wurden, zeigte eine geringe, aber signifikante Reduktion der durch SUMOylierung hervorgerufenen Bande in Versuchen mit dem vierfach mutierten ZO-2, die auch die Mutation K730R enthielt. Es war jedoch kein Unterschied der dreifach mutierten Variante im Vergleich zu ZO-2-Ubc9-wt erkennbar (nicht gezeigt). Dies spricht erneut für eine SUMOylierung von Lysin 730 und konnte ebenfalls im Duolink Assay verifiziert werden. Dabei zeigte sich eine signifikante Abnahme der PLA-Signale für ZO-2-K730R im Vergleich zu wildtypischem ZO-2. Die in dem Assay mit ZO-2-K730R noch zu beobachtenden Signale sind möglicherweise ebenfalls auf die Existenz weiterer SUMOylierungsstellen im ZO-2-Protein zurückzuführen.

Weitere SUMO-Akzeptor-Lysine könnten, aufgrund der großen Anzahl an Lysinen im ZO-2-Protein, effizienter mittels Massenspektrometrie identifiziert werden.

5.3 Die physiologische Bedeutung der SUMOylierung von ZO-2

Zur funktionellen Charakterisierung der SUMOylierung von ZO-2 wurden neben der SUMOylierungs-defizienten Mutante (ZO-2-K730R) auch SUMO-ZO-2-Fusionsproteine getestet. In verschiedenen Publikationen wurde gezeigt, dass durch eine Fusion von SUMO an das Zielprotein eine konstitutive SUMOylierung nachgeahmt werden kann. Diese stabile Modifikation mit SUMO beschrieben

ursprünglich Ross und Kollegen für die Charakterisierung der SUMO1-Modifikation des Transkriptionsfaktors Sp3 (Ross et al. 2002).

5.3.1 Die SUMOylierung verändert die subzelluläre Lokalisation von ZO-2

Neben der Vielzahl von Effekten der SUMOylierung auf Substratproteine kann durch diese Modifikation auch die Lokalisation von Proteinen beeinflusst werden. Die SUMOylierung kann dabei den Kernimport bzw. Kernexport von Proteinen inhibieren oder stimulieren. Es gibt mehrere Untersuchungen, die z.B. für die Tumorsuppressorproteine p53 (Carter et al. 2007) sowie TEL (Wood et al. 2003) oder das Signalmolekül Smad3 (Sma- and MAD-related protein 3) (Imoto et al. 2008) eine Stimulation des Kernexports durch die Modifikation mit SUMO beschreiben. Jedoch ist es auch möglich, dass der Kernimport inhibiert wird. Dies wurde u.a. für den Transkriptionsfaktor ATF7 (activating transcription factor 7) (Hamard et al. 2007) und das Proto-Onkogen c-Myb (myeloblastosis) (Morita et al. 2005) beobachtet. Im Rahmen der vorliegenden Dissertation wurde mittels eines Kern-Rekrutierungs-Assays und einer Kern-Cytoplasma-Fraktionierung gezeigt, dass das SUMO-ZO-2-Fusionsprotein im Vergleich zu wildtypischem ZO-2 vorrangig im Cytoplasma lokalisiert ist. Für die SUMOylierungs-defiziente ZO-2-Variante (ZO-2-K730R) konnte im Kern-Rekrutierungs-Assay eine vorrangig nukleäre Lokalisation beobachtet werden, wohingegen die Kern-Cytoplasma-Fraktionierung keinen Effekt der Mutante im Vergleich zum wildtypischen ZO-2 aufweist. Auf eine mögliche Erklärung dieser Beobachtung wird in der Schlussfolgerung näher eingegangen.

Das intrazelluläre Pendeln von ZO-2 wird durch mehrere konservierte Kernimport- bzw. Kernexport-Signale und posttranslationale Modifikationen innerhalb dieser Motive reguliert. Die Phosphorylierung von Serin 369 in der NES1 von cZO-2 durch PKC ϵ sowie die Modifikation mit O-glykosidisch gebundenem N-Acetylglucosamin (O-GlcNAc) an Serin 257 innerhalb der bipartiten NLS2 sind essentiell für den Kernexport (Chamorro et al. 2009, Quiros et al. 2013). Das SUMO-Akzeptor-Lysin 730 ist im humanen ZO-2-Protein in der Nähe der NES2 (AS 744-754) innerhalb der GuK-Domäne lokalisiert (Abb. 5C). Im ZO-2 des Hundes befindet sich das Lysin 730 sogar direkt innerhalb der NES2 (AS 728-738). Gonzalez-Mariscal *et al.* haben gezeigt, dass alle vier NES im ZO-2 des Hundes funktionell sind (Gonzalez-Mariscal et al. 2006).

Daher ist es denkbar, dass die posttranslationale Modifikation mit SUMO in der Nähe der NES2 in humanem ZO-2 oder innerhalb der NES2 im ZO-2 des Hundes den Kernexport fördert oder der Kernimport dadurch inhibiert wird.

Die SUMOylierung von ZO-2 könnte eine Konformationsänderung bewirken, wodurch die NES exponiert und der Kernexport verstärkt wird. Dies wurde in ähnlicher Weise für den Kernexport von p53 beobachtet. Die E3-Ubiquitin-Protein-Ligase MDM2 (mouse double minute 2 homolog) monoubiquitiniert p53 (Li et al. 2003). Eine dadurch ausgelöste Konformationsänderung führt zur Exposition der zuvor verdeckten NES und MDM2 initiiert die SUMOylierung von p53 durch die Rekrutierung der E3-SUMO-Ligase PIASy (protein inhibitor of activated STAT gamma). Durch die Modifikationen wird die Bindungsaffinität von MDM2 zu p53 verringert, wodurch p53 nicht polyubiquitiniert und proteasomal abgebaut werden kann. In der monoubiquitinierten und SUMOylierten Form bleibt die NES exponiert, es wird ein Export-Komplex mit CRM1 gebildet und p53 transloziert ins Cytoplasma (Carter et al. 2007).

Durch SUMOylierung kann die Bildung eines CRM1-Substrat-Exportkomplexes auch direkt stabilisiert werden, wie es im Fall des BPV E1-Enzyms (bovine papilloma virus E1 enzyme) beschrieben wurde. Der CRM1-BPV E1-Exportkomplex wird bis zum Eintritt in den NPC (nuclear pore complex) stabilisiert, gefolgt von der DeSUMOylierung durch eine NPC-assoziierte DeSUMOylase und dem anschließenden Zerfall des Komplexes im Cytoplasma (Rosas-Acosta und Wilson 2008).

Als Beispiele für die Inhibierung des Kernimports seien die SUMOylierung des Transkriptionsfaktors ATF7 und des Proto-Onkogen c-Myb genannt. Die Modifikation von ATF7 mit SUMO verändert dessen subzelluläre Lokalisation, indem der Eintritt in den Kern verzögert wird und das Protein daher vorrangig im Cytoplasma lokalisiert ist (Hamard et al. 2007). Des Weiteren zeigt eine Studie, dass SUMOyliertes c-Myb primär im Cytoplasma lokalisiert ist, wohingegen nicht-SUMOyliertes Protein vorrangig im Kern zu finden war (Morita et al. 2005).

Bezüglich der SUMOylierung ist zudem ein Crosstalk der SUMOylierung von ZO-2 mit anderen posttranslationalen Modifikationen wie Ubiquitinierung, Phosphorylierung, Methylierung oder Acetylierung möglich, der zur Veränderung der Lokalisation des Proteins führt. Um diese Frage zu klären, sind jedoch weitere Untersuchungen notwendig.

5.3.2 Die SUMOylierung von ZO-2 moduliert die β -Catenin/TCF-4-vermittelte Transkriptionsaktivität

Der Befund, dass die Überexpression von ZO-2 die inhibitorische Phosphorylierung von GSK3 β verringert und zu einer Inhibition der β -Catenin/TCF-4-vermittelten Transkriptionsaktivität führt (Tapia et al. 2009), ließ vermuten, dass die SUMOylierung von ZO-2 diesen Vorgang beeinflusst, insbesondere da SUMOyliertes ZO-2 bevorzugt im Cytoplasma vorliegt. In einer Studie von Walsh *et al.* wurde in Lymphoblasten-Zellen von Patienten mit einem progressiven Verlust des Gehörs (DFNA51) eine invertierte genomische Duplikation des vollständigen ZO-2 Wildtyp Gens identifiziert. Diese Duplikation führt zur Überexpression von ZO-2 und resultiert in einer Reduktion der inhibitorischen Phosphorylierung von GSK3 β an Ser9 (Walsh et al. 2010). Dieser Befund ließ vermuten, dass ZO-2 und GSK3 β miteinander interagieren, was bisher aber noch nicht gezeigt worden ist. In der vorliegenden Arbeit konnte diese Interaktion nun mit Hilfe von Co-Immunpräzipitationsexperimenten und auf der Ebene endogener Proteine durch einen Duolink Assay nachgewiesen werden. Dies stellt einen weiteren Schritt zur Aufklärung des Effekts der Reduktion der inhibitorischen Phosphorylierung von GSK3 β dar, erweitert das ZO-2-Interaktom und ermöglicht neue Einblicke in die damit verbundenen komplexen regulatorischen Netzwerke. Die erhöhte GSK3 β -Aktivität führt in einigen Zellen zur verstärkten Anfälligkeit gegenüber Apoptose (Beurel und Jope 2006), da GSK3 β direkt oder indirekt mehrere Schlüsselkomponenten des intrinsischen apoptotischen Weges reguliert. Daher bestätigt die Interaktion von GSK3 β und ZO-2 die pro-apoptische Funktion von ZO-2. Interessanterweise werden die Kinase-Aktivität, subzelluläre Lokalisation, Proteinstabilität und der damit verbundene Einfluss auf die Apoptose von GSK3 β selbst durch die Modifikation mit SUMO reguliert (Eun Jeoung et al. 2008).

In der vorliegenden Arbeit konnte durch Dual-Luciferase-Reporter-Gen-Assays nachgewiesen werden, dass die Überexpression des SUMO-ZO-2-Fusionsproteins im Vergleich zu wildtypischem ZO-2 keine Repression der β -Catenin/TCF-4-vermittelten Transkriptionsaktivität verursacht. Die SUMO-defiziente Mutante ZO-2-K730R zeigte nahezu keinen Unterschied in der Transkriptionsaktivität im Vergleich zu wildtypischem ZO-2, worauf in der Schlussfolgerung näher eingegangen werden soll. Ein naheliegender Grund für die fehlende reprimierende Eigenschaft des SUMO-ZO-2-Fusionsproteins auf die β -Catenin/TCF-4-Transkriptionsaktivität könnte sein, dass ZO-2 aufgrund der Fusion von SUMO durch Konformationsänderungen und

Proteinfehlfaltungen nicht mehr funktionell ist. Daher wurde in diesem Zusammenhang untersucht, ob das SUMO-Fusionsprotein noch in der Lage ist, mit Occludin zu interagieren (Itoh et al. 1999a). Mit Hilfe von Co-Immunpräzipitationsstudien konnte die Interaktion von SUMO-ZO-2 und Occludin bestätigt werden. Die Interaktion von ZO-2 und Occludin wird durch die U5-GuK-Region von ZO-2 und dem C-Terminus von Occludin vermittelt, sodass davon ausgegangen werden kann, dass die U5-GuK-Domänenregion von SUMO-ZO-2 funktionell ist. Eine weitere effektive Kontrolle zur Funktionalität des SUMO-ZO-2-Fusionsproteins wäre der Rescue eines endogenen ZO-2 Depletionsphänotyps durch das SUMO-ZO-2-Fusionsprotein.

Um den Effekt von SUMO-ZO-2 auf endogene Wnt-Zielgene z.B. Axin2 oder SP5 näher zu untersuchen, könnten quantitative RT-PCR-Analysen durchgeführt werden. Des Weiteren wäre es möglich, dass die SUMOylierung von ZO-2 einen Einfluss auf die inhibitorische Phosphorylierung von GSK3 β an Ser9 hat. Daher wäre es interessant, den Einfluss des SUMO-ZO-2-Fusionsproteins und der SUMO-defizienten Mutante ZO-2-K730R auf die Phosphorylierung von GSK3 β an Ser9 mit Hilfe eines spezifischen Phospho-GSK3 β -Ser9-Antikörpers im Western Blot zu untersuchen.

5.3.3 Die nukleäre Akkumulation von ZO-2 führt zur verstärkten Repression der β -Catenin/TCF-4-vermittelten Transkriptionsaktivität und dieser Effekt ist unabhängig von β -Catenin

ZO-2 enthält neben den konservierten Proteinbindedomänen mehrere NLS- und NES-Motive, die teilweise über posttranslationale Modifikationen reguliert werden. Den genauen Mechanismus, der zur nukleären Akkumulation führt, und die daraus resultierende physiologischen Konsequenzen sind bis zum jetzigen Zeitpunkt noch nicht hinreichend untersucht. Da die SUMOylierung von ZO-2 zur Veränderung der subzellulären Lokalisation von ZO-2 führt, wurde in dieser Arbeit untersucht, wie sich die gezielte Veränderung der Lokalisation von ZO-2 auf die β -Catenin/TCF-4-vermittelte Transkriptionsaktivität auswirkt. Dazu wurde ein Konstrukt generiert, in welchem ein Kernlokalisierungssignal (NLS) des Simian-Virus 40 (SV-40) C-terminal an humanes ZO-2 fusioniert wurde. Dies führt zu einer starken Akkumulation von ZO-2 im Kern, was darauf hinweist, dass durch diese Fusion die endogenen Kernexportsignale übergangen werden. Ein vergleichbarer Befund wurde schon für ein ZO-2-Protein des Hundes, das C-terminal mit drei SV40-NLS-Motiven fusioniert war,

beschrieben (Traweger et al. 2008). Dort wurde beobachtet, dass diese Fusion zur verstärkten Expression der Pyruvatkinase M2 (M2-PK), erhöhter Proliferationsaktivität und einer verminderten junktionalen Stabilität in MDCKII-Zellen führt. Die in der vorliegenden Arbeit durchgeführten Dual-Luciferase-Reporter-Gen-Assays zeigten, dass die Überexpression von ZO-2-NLS eine verstärkte Repression der β -Catenin/TCF-4-vermittelte Transkriptionsaktivität im Vergleich zu wildtypischem ZO-2 auslöst. Dies steht im Widerspruch zu dem Befund, dass β -Catenin/TCF-4-Aktivität eigentlich zu einer erhöhten Proliferation führt und eine Hemmung somit zu einer verringerten Proliferation führen sollte. Zudem wurde M2-PK als Catenin/TCF-4-reguliertes Zielgen beschrieben (Zulehner et al. 2010), dessen Transkription somit eigentlich reduziert werden sollte. Diese Diskrepanz kann im Moment nicht erklärt werden und bedarf weiterer Untersuchungen. Andererseits wurde gezeigt, dass die Überexpression von ZO-2 die Proteinmenge von Cyclin D1 durch eine verringerte Translation und den verstärkten proteasomalen Abbau des Proteins reduziert und dadurch die Zellproliferation inhibiert wird (Tapia et al. 2009). Die verstärkte Repression von ZO-2-NLS im Vergleich zu wildtypischem ZO-2 auf die β -Catenin/TCF-4-vermittelte Transkriptionsaktivität bestätigt die beobachtete Reduktion der Zellproliferation von Tapia und Kollegen.

Darüber hinaus konnte mit Hilfe von Co-Immunpräzipitationsstudien sowie mittels Duolink Assay eine Interaktion von ZO-2 und β -Catenin nachgewiesen werden. Eine Interaktion mit β -Catenin war bisher nur für ZO-1 beschrieben worden (Rajasekaran et al. 1996). Die Interaktion der beiden Nacos-Proteine ZO-2 und β -Catenin findet jedoch bevorzugt an der Plasmamembran statt. Im Reporter-Gen-Assay wurde allerdings auch die β -Catenin-unabhängige, durch Δ NLEF1-VP16 aktivierte Promotoraktivität durch die Überexpression von wildtypischem ZO-2 sowie ZO-2-NLS reprimiert. Beides deutet darauf hin, dass die Interaktion sowie Wechselwirkung von ZO-2 und β -Catenin auf die Plasmamembran beschränkt ist und möglicherweise noch andere, indirekte Mechanismen und Signalwege neben der Reduktion der inhibitorischen Phosphorylierung von GSK3 β an Ser9 an der Repression der Promotoraktivität beteiligt sind. Die zugrundeliegenden Mechanismen müssen in weiterführenden Experimenten noch abschließend geklärt werden.

6 Schlussfolgerung

In der vorliegenden Dissertation konnte die Interaktion von ZO-2 mit Teilen der SUMOylierungsmaschinerie sowie die SUMOylierung von ZO-2 *in vitro* und *in vivo* nachgewiesen werden. Darüber hinaus wurde Lysin 730 als SUMO-Akzeptor-Lysin identifiziert. Interpretiert man die Ergebnisse der Untersuchungen bezüglich der physiologischen Bedeutung der SUMOylierung, sind zwei Modelle vorstellbar. Da nicht abschließend geklärt ist, ob ZO-2 im Cytoplasma oder im Kern SUMOyliert wird, ist es zum einen möglich, dass die SUMOylierung von ZO-2 den Kernimport inhibiert oder andererseits der Kernexport stimuliert wird (Abb. 30A und B).

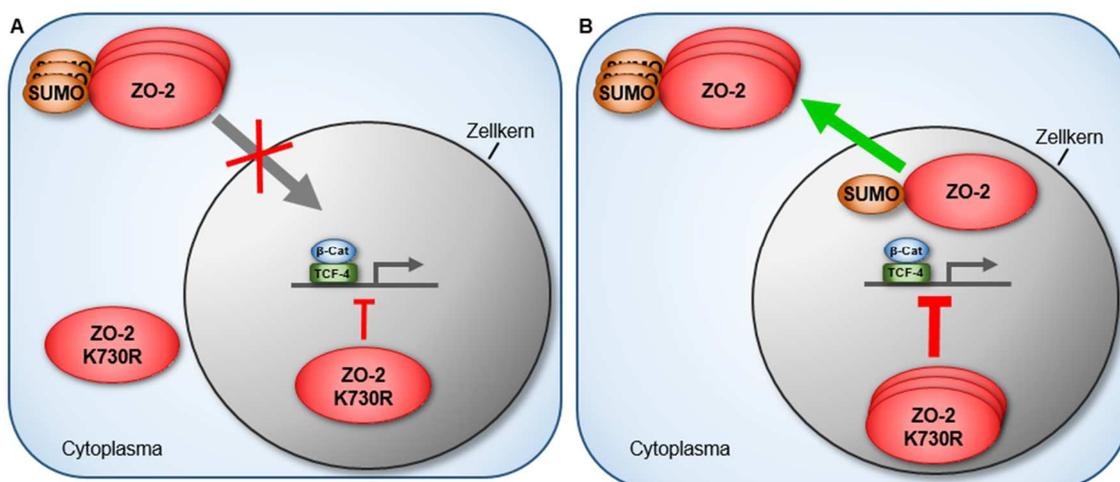


Abb. 30: Schematische Darstellung der möglichen funktionellen Konsequenz der SUMOylierung von ZO-2. Anhand der Ergebnisse der zur funktionellen Charakterisierung unternommenen Analysen ergeben sich zwei denkbare Modelle der physiologischen Bedeutung der SUMOylierung von ZO-2. **Modell (A)** Die SUMOylierung von ZO-2 inhibiert den Kernimport. **Modell (B)** Die Modifikation mit SUMO stimuliert den Kernexport von ZO-2. Es handelt sich um eine stark vereinfachte Skizzierung in Übereinstimmung mit den hier vorgelegten Resultaten zur Lokalisation der ZO-2-Konstrukte und deren Modulation des kanonischen Wnt-Signalwegs. Die nicht ausgeschlossene Modifikation von ZO-2 mit SUMO an weiteren Lysinresten und der mögliche Crosstalk mit anderen posttranslationalen Modifikationen des Proteins sind jedoch nicht berücksichtigt.

Modell A: Die SUMOylierung von ZO-2 inhibiert den Kernimport. In dieser Arbeit wurde mittels eines Kern-Rekrutierungs-Assays und einer Kern-Cytoplasma-Fraktionierung gezeigt, dass das SUMO-ZO-2-Fusionsprotein im Vergleich zu wildtypischem ZO-2 vorrangig im Cytoplasma lokalisiert ist. ZO-2 transloziert in der späten G1-Phase des Zellzyklus in den Kern, während der Kernimport von GSK3 β in der S-Phase erfolgt. Dort verringert ZO-2 die inhibitorische Phosphorylierung von GSK3 β an Ser9. GSK3 β ist dadurch aktiver und markiert β -Catenin durch

Phosphorylierung für den proteasomalen Abbau (Tapia et al. 2009). Durch die veränderte Lokalisation des vorrangig im Cytoplasma befindlichen SUMO-ZO-2-Fusionsproteins ist eine verstärkte inhibitorische Phosphorylierung von GSK3 β und somit eine schwächere Repression der β -Catenin/TCF-4-vermittelten Transkriptionsaktivität zu erwarten. Dies stimmt mit den in dieser Arbeit gewonnenen Daten der Dual-Luciferase-Reporter-Gen-Assays überein, in denen die Überexpression des SUMO-ZO-2-Fusionsproteins keine Repression der Promotoraktivität zeigte. Auch die Reporter-Gen-Analysen, in denen ZO-2-NLS überexprimiert wurde, zeigen eindeutig, dass nukleär lokalisiertes ZO-2 die Transkriptionsaktivität stark reprimiert. Orientiert man sich bezüglich der Lokalisation der SUMO-defizienten Mutante ZO-2-K730R an der Kern-Cytoplasma-Fraktionierung, in der kein Unterschied zu ZO-2-wt detektierbar ist, spricht dies ebenfalls für die Möglichkeit einer Inhibition des Kernimports von SUMOyliertem ZO-2. Denn die nicht SUMOylierbare ZO-2-K730R-Mutante kann, aufgrund der fehlenden Modifikation mit SUMO und der damit verbundenen fehlenden Inhibition wie wildtypisches ZO-2 im Kern und im Cytoplasma lokalisiert sein. Weiterhin wird dieses Modell durch die Dual-Luciferase-Reporter-Gen-Assays der SUMO-defizienten Mutante ZO-2-K730R bestätigt, die eine ähnliche Repression auf die Transkriptionsaktivität im Vergleich zum wildtypischen ZO-2 zeigen.

Modell B: Die SUMOylierung von ZO-2 stimuliert den Kernexport. Dieses Modell stützt sich ebenfalls auf die mittels Kern-Rekrutierungs-Assays und Kern-Cytoplasma-Fraktionierung gezeigte vorrangig cytoplasmatische Lokalisation des SUMO-ZO-2-Fusionsproteins und der daraus resultierenden fehlenden Repression der β -Catenin/TCF-4-vermittelten Transkriptionsaktivität. Orientiert man sich in diesem Modell an den Ergebnissen des Kern-Rekrutierungs-Assays, in dem ZO-2-K730R im Vergleich mit wildtypischem ZO-2 vermehrt im Kern lokalisiert ist, indiziert dies eine mögliche Stimulation des Kernexports. SUMO-ZO-2 ist vorrangig im Cytoplasma und die nicht SUMOylierbare Mutante ZO-2-K730R aufgrund der fehlenden Modifikation mit SUMO und der damit verbundenen fehlenden Stimulation im Kern lokalisiert. Daher wäre eine verstärkte Repression der Transkriptionsaktivität zu erwarten. Die Ergebnisse des Dual-Luciferase-Reporter-Gen-Assays der SUMO-defizienten Mutante ZO-2-K730R zeigen jedoch eine ähnliche Repression auf die β -Catenin/TCF-4-vermittelte Transkriptionsaktivität wie wildtypisches ZO-2.

Allerdings ist nicht geklärt, wie die SUMOylierung mit den anderen an der Regulation des Kernimports und Kernexports beteiligten Schritten wechselwirkt.

7 Literaturverzeichnis

- Aberle H, Bauer A, Stappert J, Kispert A, Kemler R. 1997. beta-catenin is a target for the ubiquitin-proteasome pathway. *EMBO J*, 16 (13):3797-3804.
- Adachi M, Inoko A, Hata M, Furuse K, Umeda K, Itoh M, Tsukita S. 2006. Normal establishment of epithelial tight junctions in mice and cultured cells lacking expression of ZO-3, a tight-junction MAGUK protein. *Mol Cell Biol*, 26 (23):9003-9015.
- Aoki M, Hecht A, Kruse U, Kemler R, Vogt PK. 1999. Nuclear endpoint of Wnt signaling: neoplastic transformation induced by transactivating lymphoid-enhancing factor 1. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 96 (1):139-144.
- Aono S, Hirai Y. 2008. Phosphorylation of claudin-4 is required for tight junction formation in a human keratinocyte cell line. *Exp Cell Res*, 314 (18):3326-3339.
- Avila-Flores A, Rendon-Huerta E, Moreno J, Islas S, Betanzos A, Robles-Flores M, Gonzalez-Mariscal L. 2001. Tight-junction protein zonula occludens 2 is a target of phosphorylation by protein kinase C. *Biochem J*, 360 (Pt 2):295-304.
- Bailey D, O'Hare P. 2004. Characterization of the localization and proteolytic activity of the SUMO-specific protease, SENP1. *J Biol Chem*, 279 (1):692-703.
- Balda MS, Matter K. 2008. Tight junctions at a glance. *J Cell Sci*, 121 (Pt 22):3677-3682.
- Balda MS, Anderson JM, Matter K. 1996. The SH3 domain of the tight junction protein ZO-1 binds to a serine protein kinase that phosphorylates a region C-terminal to this domain. *FEBS Lett*, 399 (3):326-332.
- Bautista-Garcia P, Reyes JL, Martin D, Namorado MC, Chavez-Munguia B, Soria-Castro E, Huber O, Gonzalez-Mariscal L. 2013. Zona occludens-2 protects against podocyte dysfunction induced by ADR in mice. *Am J Physiol Renal Physiol*, 304 (1):F77-87.
- Bayer P, Arndt A, Metzger S, Mahajan R, Melchior F, Jaenicke R, Becker J. 1998. Structure determination of the small ubiquitin-related modifier SUMO-1. *J Mol Biol*, 280 (2):275-286.
- Bazzoni G, Martinez-Estrada OM, Orsenigo F, Cordenonsi M, Citi S, Dejana E. 2000. Interaction of junctional adhesion molecule with the tight junction components ZO-1, cingulin, and occludin. *J Biol Chem*, 275 (27):20520-20526.
- Bencsath KP, Podgorski MS, Pagala VR, Slaughter CA, Schulman BA. 2002. Identification of a multifunctional binding site on Ubc9p required for Smt3p conjugation. *J Biol Chem*, 277 (49):47938-47945.
- Betanzos A, Huerta M, Lopez-Bayghen E, Azuara E, Amerena J, Gonzalez-Mariscal L. 2004. The tight junction protein ZO-2 associates with Jun, Fos and C/EBP transcription factors in epithelial cells. *Exp Cell Res*, 292 (1):51-66.
- Beurel E, Jope RS. 2006. The paradoxical pro- and anti-apoptotic actions of GSK3 in the intrinsic and extrinsic apoptosis signaling pathways. *Prog Neurobiol*, 79 (4):173-189.
- Bohren KM, Nadkarni V, Song JH, Gabbay KH, Owerbach D. 2004. A M55V polymorphism in a novel SUMO gene (SUMO-4) differentially activates heat shock transcription factors and is associated with susceptibility to type I diabetes mellitus. *J Biol Chem*, 279 (26):27233-27238.

- Brannon M, Gomperts M, Sumoy L, Moon RT, Kimelman D. 1997. A beta-catenin/XTcf-3 complex binds to the siamois promoter to regulate dorsal axis specification in *Xenopus*. *Genes Dev*, 11 (18):2359-2370.
- Carlton VE, Harris BZ, Puffenberger EG, Batta AK, Knisely AS, Robinson DL, Strauss KA, Shneider BL, Lim WA, Salen G, Morton DH, Bull LN. 2003. Complex inheritance of familial hypercholanemia with associated mutations in TJP2 and BAAT. *Nat Genet*, 34 (1):91-96.
- Carter S, Bischof O, Dejean A, Vousden KH. 2007. C-terminal modifications regulate MDM2 dissociation and nuclear export of p53. *Nat Cell Biol*, 9 (4):428-435.
- Chamorro D, Alarcon L, Ponce A, Tapia R, Gonzalez-Aguilar H, Robles-Flores M, Mejia-Castillo T, Segovia J, Bandala Y, Juaristi E, Gonzalez-Mariscal L. 2009. Phosphorylation of zona occludens-2 by protein kinase C epsilon regulates its nuclear exportation. *Mol Biol Cell*, 20 (18):4120-4129.
- Chi CN, Bach A, Stromgaard K, Gianni S, Jemth P. 2012. Ligand binding by PDZ domains. *Biofactors*, 38 (5):338-348.
- Cohen CJ, Gaetz J, Ohman T, Bergelson JM. 2001. Multiple regions within the coxsackievirus and adenovirus receptor cytoplasmic domain are required for basolateral sorting. *J Biol Chem*, 276 (27):25392-25398.
- Cordenonsi M, D'Atri F, Hammar E, Parry DA, Kendrick-Jones J, Shore D, Citi S. 1999. Cingulin contains globular and coiled-coil domains and interacts with ZO-1, ZO-2, ZO-3, and myosin. *J Cell Biol*, 147 (7):1569-1582.
- D'Atri F, Nadalutti F, Citi S. 2002. Evidence for a functional interaction between cingulin and ZO-1 in cultured cells. *J Biol Chem*, 277 (31):27757-27764.
- D'Souza T, Agarwal R, Morin PJ. 2005. Phosphorylation of claudin-3 at threonine 192 by cAMP-dependent protein kinase regulates tight junction barrier function in ovarian cancer cells. *J Biol Chem*, 280 (28):26233-26240.
- Daugherty RL, Gottardi CJ. 2007. Phospho-regulation of Beta-catenin adhesion and signaling functions. *Physiology (Bethesda)*, 22:303-309.
- Desterro JM, Thomson J, Hay RT. 1997. Ubch9 conjugates SUMO but not ubiquitin. *FEBS Lett*, 417 (3):297-300.
- Desterro JM, Rodriguez MS, Hay RT. 1998. SUMO-1 modification of I κ B α inhibits NF- κ B activation. *Mol Cell*, 2 (2):233-239.
- Di Bacco A, Ouyang J, Lee HY, Catic A, Ploegh H, Gill G. 2006. The SUMO-specific protease SENP5 is required for cell division. *Mol Cell Biol*, 26 (12):4489-4498.
- Dörfel MJ, Huber O. 2012. Modulation of tight junction structure and function by kinases and phosphatases targeting occludin. *J Biomed Biotechnol*, 2012:807356.
- Ebnet K, Schulz CU, Meyer Zu Brickwedde MK, Pendl GG, Vestweber D. 2000. Junctional adhesion molecule interacts with the PDZ domain-containing proteins AF-6 and ZO-1. *J Biol Chem*, 275 (36):27979-27988.
- Eckert JJ, Fleming TP. 2008. Tight junction biogenesis during early development. *Biochim Biophys Acta*, 1778 (3):717-728.
- Etournay R, Zwaenepoel I, Perfettini I, Legrain P, Petit C, El-Amraoui A. 2007. Shroom2, a myosin-VIIa- and actin-binding protein, directly interacts with ZO-1 at tight junctions. *J Cell Sci*, 120 (Pt 16):2838-2850.
- Eun Jeoung L, Sung Hee H, Jaesun C, Sung Hwa S, Kwang Hum Y, Min Kyoung K, Tae Yoon P, Sang Sun K. 2008. Regulation of glycogen synthase kinase 3 β functions by modification of the small ubiquitin-like modifier. *Open Biochem J*, 2:67-76.
- Evdokimov E, Sharma P, Lockett SJ, Lualdi M, Kuehn MR. 2008. Loss of SUMO1 in mice affects RanGAP1 localization and formation of PML nuclear bodies, but is

- not lethal as it can be compensated by SUMO2 or SUMO3. *J Cell Sci*, 121 (Pt 24):4106-4113.
- Fanning AS, Jameson BJ, Jesaitis LA, Anderson JM. 1998. The tight junction protein ZO-1 establishes a link between the transmembrane protein occludin and the actin cytoskeleton. *J Biol Chem*, 273 (45):29745-29753.
- Farquhar MG, Palade GE. 1963. Junctional complexes in various epithelia. *J Cell Biol*, 17:375-412.
- Funke L, Dakoji S, Brecht DS. 2005. Membrane-associated guanylate kinases regulate adhesion and plasticity at cell junctions. *Annu Rev Biochem*, 74:219-245.
- Furuse M. 2010. Molecular basis of the core structure of tight junctions. *Cold Spring Harb Perspect Biol*, 2 (1):a002907.
- Furuse M, Hirase T, Itoh M, Nagafuchi A, Yonemura S, Tsukita S, Tsukita S. 1993. Occludin: a novel integral membrane protein localizing at tight junctions. *J Cell Biol*, 123 (6 Pt 2):1777-1788.
- Furuse M, Itoh M, Hirase T, Nagafuchi A, Yonemura S, Tsukita S, Tsukita S. 1994. Direct association of occludin with ZO-1 and its possible involvement in the localization of occludin at tight junctions. *J Cell Biol*, 127 (6 Pt 1):1617-1626.
- Garrod D, Chidgey M. 2008. Desmosome structure, composition and function. *Biochim Biophys Acta*, 1778 (3):572-587.
- Geiss-Friedlander R, Melchior F. 2007. Concepts in sumoylation: a decade on. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 8 (12):947-956.
- Gong L, Yeh ET. 2006. Characterization of a family of nucleolar SUMO-specific proteases with preference for SUMO-2 or SUMO-3. *J Biol Chem*, 281 (23):15869-15877.
- Gong L, Li B, Millas S, Yeh ET. 1999. Molecular cloning and characterization of human AOS1 and UBA2, components of the sentrin-activating enzyme complex. *FEBS Lett*, 448 (1):185-189.
- Gong L, Millas S, Maul GG, Yeh ET. 2000. Differential regulation of sentrinized proteins by a novel sentrin-specific protease. *J Biol Chem*, 275 (5):3355-3359.
- Gong L, Kamitani T, Fujise K, Caskey LS, Yeh ET. 1997. Preferential interaction of sentrin with a ubiquitin-conjugating enzyme, Ubc9. *J Biol Chem*, 272 (45):28198-28201.
- Gonzalez-Mariscal L, Betanzos A, Avila-Flores A. 2000. MAGUK proteins: structure and role in the tight junction. *Semin Cell Dev Biol*, 11 (4):315-324.
- Gonzalez-Mariscal L, Betanzos A, Nava P, Jaramillo BE. 2003. Tight junction proteins. *Prog Biophys Mol Biol*, 81 (1):1-44.
- Gonzalez-Mariscal L, Ponce A, Alarcon L, Jaramillo BE. 2006. The tight junction protein ZO-2 has several functional nuclear export signals. *Exp Cell Res*, 312 (17):3323-3335.
- González-Mariscal L, Betanzos A, Nava P, Jaramillo BE. 2003. Tight junction proteins. *Progress in Biophysics and Molecular Biology*, 81 (1):1-44.
- Gottardi CJ, Arpin M, Fanning AS, Louvard D. 1996. The junction-associated protein, zonula occludens-1, localizes to the nucleus before the maturation and during the remodeling of cell-cell contacts. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 93 (20):10779-10784.
- Gumbiner B, Lowenkopf T, Apatira D. 1991. Identification of a 160-kDa polypeptide that binds to the tight junction protein ZO-1. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 88 (8):3460-3464.
- Gunzel D, Yu AS. 2013. Claudins and the modulation of tight junction permeability. *Physiol Rev*, 93 (2):525-569.

- Guo D, Li M, Zhang Y, Yang P, Eckenrode S, Hopkins D, Zheng W, Purohit S, Podolsky RH, Muir A, Wang J, Dong Z, Brusko T, Atkinson M, Pozzilli P, Zeidler A, Raffel LJ, Jacob CO, Park Y, Serrano-Rios M, Larrad MT, Zhang Z, Garchon HJ, Bach JF, Rotter JI, She JX, Wang CY. 2004. A functional variant of SUMO4, a new I kappa B alpha modifier, is associated with type 1 diabetes. *Nat Genet*, 36 (8):837-841.
- Hamard PJ, Boyer-Guittaut M, Camuzeaux B, Dujardin D, Hauss C, Oelgeschlager T, Vigneron M, Kedinger C, Chatton B. 2007. Sumoylation delays the ATF7 transcription factor subcellular localization and inhibits its transcriptional activity. *Nucleic Acids Res*, 35 (4):1134-1144.
- Hanahan D. 1983. Studies on transformation of *Escherichia coli* with plasmids. *J Mol Biol*, 166 (4):557-580.
- Hang J, Dasso M. 2002. Association of the human SUMO-1 protease SENP2 with the nuclear pore. *J Biol Chem*, 277 (22):19961-19966.
- Hardeland U, Steinacher R, Jiricny J, Schar P. 2002. Modification of the human thymine-DNA glycosylase by ubiquitin-like proteins facilitates enzymatic turnover. *EMBO J*, 21 (6):1456-1464.
- Haskins J, Gu L, Wittchen ES, Hibbard J, Stevenson BR. 1998. ZO-3, a novel member of the MAGUK protein family found at the tight junction, interacts with ZO-1 and occludin. *J Cell Biol*, 141 (1):199-208.
- Hernandez S, Chavez Munguia B, Gonzalez-Mariscal L. 2007. ZO-2 silencing in epithelial cells perturbs the gate and fence function of tight junctions and leads to an atypical monolayer architecture. *Exp Cell Res*, 313 (8):1533-1547.
- Hietakangas V, Ankar J, Blomster HA, Fujimoto M, Palvimo JJ, Nakai A, Sistonen L. 2006. PDSM, a motif for phosphorylation-dependent SUMO modification. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 103 (1):45-50.
- Howarth AG, Hughes MR, Stevenson BR. 1992. Detection of the tight junction-associated protein ZO-1 in astrocytes and other nonepithelial cell types. *Am J Physiol*, 262 (2 Pt 1):C461-469.
- Huang HY, Li R, Sun Q, Wang J, Zhou P, Han H, Zhang WH. 2002. [LIM protein KyoT2 interacts with human tight junction protein ZO-2-i3]. *Yi Chuan Xue Bao*, 29 (11):953-958.
- Huber O, Korn R, McLaughlin J, Ohsugi M, Herrmann BG, Kemler R. 1996. Nuclear localization of beta-catenin by interaction with transcription factor LEF-1. *Mech Dev*, 59 (1):3-10.
- Huerta M, Munoz R, Tapia R, Soto-Reyes E, Ramirez L, Recillas-Targa F, Gonzalez-Mariscal L, Lopez-Bayghen E. 2007. Cyclin D1 is transcriptionally down-regulated by ZO-2 via an E box and the transcription factor c-Myc. *Mol Biol Cell*, 18 (12):4826-4836.
- Ikari A, Matsumoto S, Harada H, Takagi K, Hayashi H, Suzuki Y, Degawa M, Miwa M. 2006. Phosphorylation of paracellin-1 at Ser217 by protein kinase A is essential for localization in tight junctions. *J Cell Sci*, 119 (Pt 9):1781-1789.
- Ikenouchi J, Furuse M, Furuse K, Sasaki H, Tsukita S, Tsukita S. 2005. Tricellulin constitutes a novel barrier at tricellular contacts of epithelial cells. *J Cell Biol*, 171 (6):939-945.
- Imoto S, Ohbayashi N, Ikeda O, Kamitani S, Muromoto R, Sekine Y, Matsuda T. 2008. Sumoylation of Smad3 stimulates its nuclear export during PIASy-mediated suppression of TGF-beta signaling. *Biochem Biophys Res Commun*, 370 (2):359-365.
- Ishizaki T, Chiba H, Kojima T, Fujibe M, Soma T, Miyajima H, Nagasawa K, Wada I, Sawada N. 2003. Cyclic AMP induces phosphorylation of claudin-5

- immunoprecipitates and expression of claudin-5 gene in blood-brain-barrier endothelial cells via protein kinase A-dependent and -independent pathways. *Exp Cell Res*, 290 (2):275-288.
- Islas S, Vega J, Ponce L, Gonzalez-Mariscal L. 2002. Nuclear localization of the tight junction protein ZO-2 in epithelial cells. *Exp Cell Res*, 274 (1):138-148.
- Itoh M, Morita K, Tsukita S. 1999a. Characterization of ZO-2 as a MAGUK family member associated with tight as well as adherens junctions with a binding affinity to occludin and alpha catenin. *J Biol Chem*, 274 (9):5981-5986.
- Itoh M, Furuse M, Morita K, Kubota K, Saitou M, Tsukita S. 1999b. Direct binding of three tight junction-associated MAGUKs, ZO-1, ZO-2, and ZO-3, with the COOH termini of claudins. *J Cell Biol*, 147 (6):1351-1363.
- Itoh M, Sasaki H, Furuse M, Ozaki H, Kita T, Tsukita S. 2001. Junctional adhesion molecule (JAM) binds to PAR-3: a possible mechanism for the recruitment of PAR-3 to tight junctions. *J Cell Biol*, 154 (3):491-497.
- Jakobs A, Koehnke J, Himstedt F, Funk M, Korn B, Gaestel M, Niedenthal R. 2007. Ubc9 fusion-directed SUMOylation (UFDS): a method to analyze function of protein SUMOylation. *Nat Methods*, 4 (3):245-250.
- Jaramillo BE, Ponce A, Moreno J, Betanzos A, Huerta M, Lopez-Bayghen E, Gonzalez-Mariscal L. 2004. Characterization of the tight junction protein ZO-2 localized at the nucleus of epithelial cells. *Exp Cell Res*, 297 (1):247-258.
- Jelen F, Oleksy A, Smietana K, Otlewski J. 2003. PDZ domains - common players in the cell signaling. *Acta Biochim Pol*, 50 (4):985-1017.
- Johnson ES, Blobel G. 1997. Ubc9p is the conjugating enzyme for the ubiquitin-like protein Smt3p. *J Biol Chem*, 272 (43):26799-26802.
- Kahyo T, Nishida T, Yasuda H. 2001. Involvement of PIAS1 in the sumoylation of tumor suppressor p53. *Mol Cell*, 8 (3):713-718.
- Kamitani T, Kito K, Nguyen HP, Fukuda-Kamitani T, Yeh ET. 1998. Characterization of a second member of the sentrin family of ubiquitin-like proteins. *J Biol Chem*, 273 (18):11349-11353.
- Katsuno T, Umeda K, Matsui T, Hata M, Tamura A, Itoh M, Takeuchi K, Fujimori T, Nabeshima Y, Noda T, Tsukita S, Tsukita S. 2008. Deficiency of zonula occludens-1 causes embryonic lethal phenotype associated with defected yolk sac angiogenesis and apoptosis of embryonic cells. *Mol Biol Cell*, 19 (6):2465-2475.
- Kausalya PJ, Reichert M, Hunziker W. 2001. Connexin45 directly binds to ZO-1 and localizes to the tight junction region in epithelial MDCK cells. *Febs Letters*, 505 (1):92-96.
- Kausalya PJ, Phua DC, Hunziker W. 2004. Association of ARVCF with zonula occludens (ZO)-1 and ZO-2: binding to PDZ-domain proteins and cell-cell adhesion regulate plasma membrane and nuclear localization of ARVCF. *Mol Biol Cell*, 15 (12):5503-5515.
- Keon BH, Schäfer S, Kuhn C, Grund C, Franke WW. 1996. Symplekin, a novel type of tight junction plaque protein. *J Cell Biol*, 134 (4):1003-1018.
- Kim JH, Lee JM, Nam HJ, Choi HJ, Yang JW, Lee JS, Kim MH, Kim SI, Chung CH, Kim KI, Baek SH. 2007. SUMOylation of pontin chromatin-remodeling complex reveals a signal integration code in prostate cancer cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 104 (52):20793-20798.
- Knipscheer P, Flotho A, Klug H, Olsen JV, van Dijk WJ, Fish A, Johnson ES, Mann M, Sixma TK, Pichler A. 2008. Ubc9 sumoylation regulates SUMO target discrimination. *Mol Cell*, 31 (3):371-382.

- Lechuga S, Alarcon L, Solano J, Huerta M, Lopez-Bayghen E, Gonzalez-Mariscal L. 2010. Identification of ZASP, a novel protein associated to Zona occludens-2. *Exp Cell Res*, 316 (19):3124-3139.
- Lee GW, Melchior F, Matunis MJ, Mahajan R, Tian Q, Anderson P. 1998. Modification of Ran GTPase-activating protein by the small ubiquitin-related modifier SUMO-1 requires Ubc9, an E2-type ubiquitin-conjugating enzyme homologue. *J Biol Chem*, 273 (11):6503-6507.
- Li M, Brooks CL, Wu-Baer F, Chen D, Baer R, Gu W. 2003. Mono- versus polyubiquitination: differential control of p53 fate by Mdm2. *Science*, 302 (5652):1972-1975.
- Li SJ, Hochstrasser M. 1999. A new protease required for cell-cycle progression in yeast. *Nature*, 398 (6724):246-251.
- Li X, Lu S, Nagy JI. 2009. Direct association of connexin36 with zonula occludens-2 and zonula occludens-3. *Neurochem Int*, 54 (5-6):393-402.
- Li XB, Olson C, Lu SJ, Nagy JI. 2004. Association of connexin36 with zonula occludens-1 in HeLa cells, beta TC-3 cells, pancreas, and adrenal gland. *Histochemistry and Cell Biology*, 122 (5):485-498.
- Lin DY, Huang YS, Jeng JC, Kuo HY, Chang CC, Chao TT, Ho CC, Chen YC, Lin TP, Fang HI, Hung CC, Suen CS, Hwang MJ, Chang KS, Maul GG, Shih HM. 2006. Role of SUMO-interacting motif in Daxx SUMO modification, subnuclear localization, and repression of sumoylated transcription factors. *Mol Cell*, 24 (3):341-354.
- Lorick KL, Jensen JP, Weissman AM. 2005. Expression, purification, and properties of the Ubc4/5 family of E2 enzymes. *Methods Enzymol*, 398:54-68.
- Luissint AC, Artus C, Glacial F, Ganeshamoorthy K, Couraud PO. 2012. Tight junctions at the blood brain barrier: physiological architecture and disease-associated dysregulation. *Fluids Barriers CNS*, 9 (1):23.
- Mahajan R, Delphin C, Guan T, Gerace L, Melchior F. 1997. A small ubiquitin-related polypeptide involved in targeting RanGAP1 to nuclear pore complex protein RanBP2. *Cell*, 88 (1):97-107.
- Mandel LJ, Bacallao R, Zampighi G. 1993. Uncoupling of the molecular 'fence' and paracellular 'gate' functions in epithelial tight junctions. *Nature*, 361 (6412):552-555.
- Matic I, Schimmel J, Hendriks IA, van Santen MA, van de Rijke F, van Dam H, Gnad F, Mann M, Vertegaal AC. 2010. Site-specific identification of SUMO-2 targets in cells reveals an inverted SUMOylation motif and a hydrophobic cluster SUMOylation motif. *Mol Cell*, 39 (4):641-652.
- Matic I, van Hagen M, Schimmel J, Macek B, Ogg SC, Tatham MH, Hay RT, Lamond AI, Mann M, Vertegaal AC. 2008. In vivo identification of human small ubiquitin-like modifier polymerization sites by high accuracy mass spectrometry and an in vitro to in vivo strategy. *Mol Cell Proteomics*, 7 (1):132-144.
- Mattagajasingh SN, Huang SC, Hartenstein JS, Benz EJ, Jr. 2000. Characterization of the interaction between protein 4.1R and ZO-2. A possible link between the tight junction and the actin cytoskeleton. *J Biol Chem*, 275 (39):30573-30585.
- Matter K, Balda MS. 2003a. Functional analysis of tight junctions. *Methods*, 30 (3):228-234.
- Matter K, Balda MS. 2003b. Signalling to and from tight junctions. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 4 (3):225-236.
- Matunis MJ, Coutavas E, Blobel G. 1996. A novel ubiquitin-like modification modulates the partitioning of the Ran-GTPase-activating protein RanGAP1 between the cytosol and the nuclear pore complex. *J Cell Biol*, 135 (6 Pt 1):1457-1470.

- Meerschaert K, Tun MP, Remue E, De Ganck A, Boucherie C, Vanloo B, Degeest G, Vandekerckhove J, Zimmermann P, Bhardwaj N, Lu H, Cho W, Gettemans J. 2009. The PDZ2 domain of zonula occludens-1 and -2 is a phosphoinositide binding domain. *Cell Mol Life Sci*, 66 (24):3951-3966.
- Metais JY, Navarro C, Santoni MJ, Audebert S, Borg JP. 2005. hScrib interacts with ZO-2 at the cell-cell junctions of epithelial cells. *FEBS Lett*, 579 (17):3725-3730.
- Meyer TN, Schwesinger C, Denker BM. 2002. Zonula occludens-1 is a scaffolding protein for signaling molecules. Galpha(12) directly binds to the Src homology 3 domain and regulates paracellular permeability in epithelial cells. *J Biol Chem*, 277 (28):24855-24858.
- Minty A, Dumont X, Kaghad M, Caput D. 2000. Covalent modification of p73alpha by SUMO-1. Two-hybrid screening with p73 identifies novel SUMO-1-interacting proteins and a SUMO-1 interaction motif. *J Biol Chem*, 275 (46):36316-36323.
- Mo YY, Yu YN, Theodosiou E, Ee PLR, Beck WT. 2005. A role for Ubc9 in tumorigenesis. *Oncogene*, 24 (16):2677-2683.
- Morita Y, Kanei-Ishii C, Nomura T, Ishii S. 2005. TRAF7 sequesters c-Myb to the cytoplasm by stimulating its sumoylation. *Mol Biol Cell*, 16 (11):5433-5444.
- Morris JR, Pangon L, Boutell C, Katagiri T, Keep NH, Solomon E. 2006. Genetic analysis of BRCA1 ubiquitin ligase activity and its relationship to breast cancer susceptibility. *Human Molecular Genetics*, 15 (4):599-606.
- Morris JR, Boutell C, Keppler M, Densham R, Weekes D, Alamshah A, Butler L, Galanty Y, Pangon L, Kiuchi T, Ng T, Solomon E. 2009. The SUMO modification pathway is involved in the BRCA1 response to genotoxic stress. *Nature*, 462 (7275):886-U877.
- Mukherjee S, Thomas M, Dadgar N, Lieberman AP, Iniguez-Lluhi JA. 2009. Small ubiquitin-like modifier (SUMO) modification of the androgen receptor attenuates polyglutamine-mediated aggregation. *J Biol Chem*, 284 (32):21296-21306.
- Mukhopadhyay D, Ayaydin F, Kolli N, Tan SH, Anan T, Kametaka A, Azuma Y, Wilkinson KD, Dasso M. 2006. SUSP1 antagonizes formation of highly SUMO2/3-conjugated species. *J Cell Biol*, 174 (7):939-949.
- Müller SL, Portwich M, Schmidt A, Utepbergenov DI, Huber O, Blasig IE, Krause G. 2005. The tight junction protein occludin and the adherens junction protein alpha-catenin share a common interaction mechanism with ZO-1. *J Biol Chem*, 280 (5):3747-3756.
- Nacerddine K, Lehembre F, Bhaumik M, Artus J, Cohen-Tannoudji M, Babinet C, Pandolfi PP, Dejean A. 2005. The SUMO pathway is essential for nuclear integrity and chromosome segregation in mice. *Dev Cell*, 9 (6):769-779.
- Nishida T, Tanaka H, Yasuda H. 2000. A novel mammalian Smt3-specific isopeptidase 1 (SMT3IP1) localized in the nucleolus at interphase. *Eur J Biochem*, 267 (21):6423-6427.
- Ohnishi H, Nakahara T, Furuse K, Sasaki H, Tsukita S, Furuse M. 2004. JACOP, a novel plaque protein localizing at the apical junctional complex with sequence similarity to cingulin. *J Biol Chem*, 279 (44):46014-46022.
- Oka T, Schmitt AP, Sudol M. 2012. Opposing roles of angiomin-like-1 and zona occludens-2 on pro-apoptotic function of YAP. *Oncogene*, 31 (1):128-134.
- Oka T, Remue E, Meerschaert K, Vanloo B, Boucherie C, Gfeller D, Bader GD, Sidhu SS, Vandekerckhove J, Gettemans J, Sudol M. 2010. Functional complexes between YAP2 and ZO-2 are PDZ domain-dependent, and regulate YAP2 nuclear localization and signalling. *Biochem J*, 432 (3):461-472.

- Op de Beeck K, Schacht J, Van Camp G. 2011. Apoptosis in acquired and genetic hearing impairment: the programmed death of the hair cell. *Hear Res*, 281 (1-2):18-27.
- Paschoud S, Bongiovanni M, Pache JC, Citi S. 2007. Claudin-1 and claudin-5 expression patterns differentiate lung squamous cell carcinomas from adenocarcinomas. *Mod Pathol*, 20 (9):947-954.
- Pichler A, Knipscheer P, Oberhofer E, van Dijk WJ, Korner R, Olsen JV, Jentsch S, Melchior F, Sixma TK. 2005. SUMO modification of the ubiquitin-conjugating enzyme E2-25K. *Nat Struct Mol Biol*, 12 (3):264-269.
- Quiros M, Alarcon L, Ponce A, Giannakouros T, Gonzalez-Mariscal L. 2013. The intracellular fate of zonula occludens 2 is regulated by the phosphorylation of SR repeats and the phosphorylation/O-GlcNAcylation of S257. *Mol Biol Cell*, 24 (16):2528-2543.
- Rajasekaran AK, Hojo M, Huima T, Rodriguez-Boulan E. 1996. Catenins and zonula occludens-1 form a complex during early stages in the assembly of tight junctions. *J Cell Biol*, 132 (3):451-463.
- Remue E, Meerschaert K, Oka T, Boucherie C, Vandekerckhove J, Sudol M, Gettemans J. 2010. TAZ interacts with zonula occludens-1 and -2 proteins in a PDZ-1 dependent manner. *FEBS Lett*, 584 (19):4175-4180.
- Riazuddin S, Ahmed ZM, Fanning AS, Lagziel A, Kitajiri S, Ramzan K, Khan SN, Chattaraj P, Friedman PL, Anderson JM, Belyantseva IA, Forge A, Riazuddin S, Friedman TB. 2006. Tricellulin is a tight-junction protein necessary for hearing. *Am J Hum Genet*, 79 (6):1040-1051.
- Rosas-Acosta G, Wilson VG. 2008. Identification of a nuclear export signal sequence for bovine papillomavirus E1 protein. *Virology*, 373 (1):149-162.
- Ross S, Best JL, Zon LI, Gill G. 2002. SUMO-1 modification represses Sp3 transcriptional activation and modulates its subnuclear localization. *Mol Cell*, 10 (4):831-842.
- Saito K, Enya K, Oneyama C, Hikita T, Okada M. 2008. Proteomic identification of ZO-1/2 as a novel scaffold for Src/Csk regulatory circuit. *Biochem Biophys Res Commun*, 366 (4):969-975.
- Saitoh H, Sparrow DB, Shiomi T, Pu RT, Nishimoto T, Mohun TJ, Dasso M. 1998. Ubc9p and the conjugation of SUMO-1 to RanGAP1 and RanBP2. *Curr Biol*, 8 (2):121-124.
- Sanchez-Pulido L, Martin-Belmonte F, Valencia A, Alonso MA. 2002. MARVEL: a conserved domain involved in membrane apposition events. *Trends Biochem Sci*, 27 (12):599-601.
- Sanger F, Nicklen S, Coulson AR. 1977. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 74 (12):5463-5467.
- Schmidt A, Utepbergenov DI, Mueller SL, Beyermann M, Schneider-Mergener J, Krause G, Blasig IE. 2004. Occludin binds to the SH3-hinge-GuK unit of zonula occludens protein 1: potential mechanism of tight junction regulation. *Cell Mol Life Sci*, 61 (11):1354-1365.
- Schulz S, Chachami G, Kozaczkiwicz L, Winter U, Stankovic-Valentin N, Haas P, Hofmann K, Urlaub H, Ovaas H, Wittbrodt J, Meulmeester E, Melchior F. 2012. Ubiquitin-specific protease-like 1 (USPL1) is a SUMO isopeptidase with essential, non-catalytic functions. *EMBO Rep*, 13 (10):930-938.
- Schwarz SE, Matuschewski K, Liakopoulos D, Scheffner M, Jentsch S. 1998. The ubiquitin-like proteins SMT3 and SUMO-1 are conjugated by the UBC9 E2 enzyme. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 95 (2):560-564.

- Shen LN, Geoffroy MC, Jaffray EG, Hay RT. 2009. Characterization of SENP7, a SUMO-2/3-specific isopeptidase. *Biochem J*, 421 (2):223-230.
- Shen Z, Pardington-Purtymun PE, Comeaux JC, Moyzis RK, Chen DJ. 1996. Associations of UBE2I with RAD52, UBL1, p53, and RAD51 proteins in a yeast two-hybrid system. *Genomics*, 37 (2):183-186.
- Sheth B, Nowak RL, Anderson R, Kwong WY, Papenbrock T, Fleming TP. 2008. Tight junction protein ZO-2 expression and relative function of ZO-1 and ZO-2 during mouse blastocyst formation. *Exp Cell Res*, 314 (18):3356-3368.
- Shih IM, Yu J, He TC, Vogelstein B, Kinzler KW. 2000. The beta-catenin binding domain of adenomatous polyposis coli is sufficient for tumor suppression. *Cancer Res*, 60 (6):1671-1676.
- Shin EJ, Shin HM, Nam E, Kim WS, Kim JH, Oh BH, Yun Y. 2012. DeSUMOylating isopeptidase: a second class of SUMO protease. *EMBO Rep*, 13 (4):339-346.
- Singh D, Solan JL, Taffet SM, Javier R, Lampe PD. 2005. Connexin 43 interacts with zona occludens-1 and-2 proteins in a cell cycle stage-specific manner. *Journal of Biological Chemistry*, 280 (34):30416-30421.
- Song J, Durrin LK, Wilkinson TA, Krontiris TG, Chen Y. 2004. Identification of a SUMO-binding motif that recognizes SUMO-modified proteins. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 101 (40):14373-14378.
- Stadeli R, Hoffmans R, Basler K. 2006. Transcription under the control of nuclear Arm/beta-catenin. *Curr Biol*, 16 (10):R378-385.
- Staehelein LA. 1973. Further observations on the fine structure of freeze-cleaved tight junctions. *J Cell Sci*, 13 (3):763-786.
- Steed E, Rodrigues NT, Balda MS, Matter K. 2009. Identification of MarvelD3 as a tight junction-associated transmembrane protein of the occludin family. *BMC Cell Biol*, 10:95.
- Steffan JS, Agrawal N, Pallos J, Rockabrand E, Trotman LC, Slepko N, Illes K, Lukacsovich T, Zhu YZ, Cattaneo E, Pandolfi PP, Thompson LM, Marsh JL. 2004. SUMO modification of Huntingtin and Huntington's disease pathology. *Science*, 304 (5667):100-104.
- Stevenson BR, Siliciano JD, Mooseker MS, Goodenough DA. 1986. Identification of ZO-1: a high molecular weight polypeptide associated with the tight junction (zonula occludens) in a variety of epithelia. *J Cell Biol*, 103 (3):755-766.
- Tapia R, Huerta M, Islas S, Avila-Flores A, Lopez-Bayghen E, Weiske J, Huber O, Gonzalez-Mariscal L. 2009. Zona occludens-2 inhibits cyclin D1 expression and cell proliferation and exhibits changes in localization along the cell cycle. *Mol Biol Cell*, 20 (3):1102-1117.
- Tatham MH, Jaffray E, Vaughan OA, Desterro JM, Botting CH, Naismith JH, Hay RT. 2001. Polymeric chains of SUMO-2 and SUMO-3 are conjugated to protein substrates by SAE1/SAE2 and Ubc9. *J Biol Chem*, 276 (38):35368-35374.
- te Velthuis AJ, Admiraal JF, Bagowski CP. 2007. Molecular evolution of the MAGUK family in metazoan genomes. *BMC Evol Biol*, 7:129.
- Tkachuk N, Tkachuk S, Patecki M, Kusch A, Korenbaum E, Haller H, Dumler I. 2011. The tight junction protein ZO-2 and Janus kinase 1 mediate intercellular communications in vascular smooth muscle cells. *Biochem Biophys Res Commun*, 410 (3):531-536.
- Traweger A, Fuchs R, Krizbai IA, Weiger TM, Bauer HC, Bauer H. 2003. The tight junction protein ZO-2 localizes to the nucleus and interacts with the heterogeneous nuclear ribonucleoprotein scaffold attachment factor-B. *J Biol Chem*, 278 (4):2692-2700.

- Traweger A, Fang D, Liu YC, Stelzhammer W, Krizbai IA, Fresser F, Bauer HC, Bauer H. 2002. The tight junction-specific protein occludin is a functional target of the E3 ubiquitin-protein ligase itch. *J Biol Chem*, 277 (12):10201-10208.
- Traweger A, Lehner C, Farkas A, Krizbai IA, Tempfer H, Klement E, Guenther B, Bauer HC, Bauer H. 2008. Nuclear Zonula occludens-2 alters gene expression and junctional stability in epithelial and endothelial cells. *Differentiation*, 76 (1):99-106.
- Tsukita S, Furuse M, Itoh M. 2001. Multifunctional strands in tight junctions. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2 (4):285-293.
- Umeda K, Ikenouchi J, Katahira-Tayama S, Furuse K, Sasaki H, Nakayama M, Matsui T, Tsukita S, Furuse M, Tsukita S. 2006. ZO-1 and ZO-2 independently determine where claudins are polymerized in tight-junction strand formation. *Cell*, 126 (4):741-754.
- Utepergenov DI, Fanning AS, Anderson JM. 2006. Dimerization of the scaffolding protein ZO-1 through the second PDZ domain. *J Biol Chem*, 281 (34):24671-24677.
- Van Itallie CM, Mitic LL, Anderson JM. 2012. SUMOylation of claudin-2. *Ann N Y Acad Sci*, 1258:60-64.
- Van Itallie CM, Fanning AS, Bridges A, Anderson JM. 2009. ZO-1 stabilizes the tight junction solute barrier through coupling to the perijunctional cytoskeleton. *Mol Biol Cell*, 20 (17):3930-3940.
- van Meer G, Simons K. 1986. The function of tight junctions in maintaining differences in lipid composition between the apical and the basolateral cell surface domains of MDCK cells. *EMBO J*, 5 (7):1455-1464.
- van Meer G, Gumbiner B, Simons K. 1986. The tight junction does not allow lipid molecules to diffuse from one epithelial cell to the next. *Nature*, 322 (6080):639-641.
- van Roy F, Berx G. 2008. The cell-cell adhesion molecule E-cadherin. *Cell Mol Life Sci*, 65 (23):3756-3788.
- Walsh T, Pierce SB, Lenz DR, Brownstein Z, Dagan-Rosenfeld O, Shahin H, Roeb W, McCarthy S, Nord AS, Gordon CR, Ben-Neriah Z, Sebat J, Kanaan M, Lee MK, Frydman M, King MC, Avraham KB. 2010. Genomic duplication and overexpression of TJP2/ZO-2 leads to altered expression of apoptosis genes in progressive nonsyndromic hearing loss DFNA51. *Am J Hum Genet*, 87 (1):101-109.
- Wei W, Yang P, Pang J, Zhang S, Wang Y, Wang MH, Dong Z, She JX, Wang CY. 2008. A stress-dependent SUMO4 sumoylation of its substrate proteins. *Biochem Biophys Res Commun*, 375 (3):454-459.
- Willott E, Balda MS, Fanning AS, Jameson B, Van Itallie C, Anderson JM. 1993. The tight junction protein ZO-1 is homologous to the Drosophila discs-large tumor suppressor protein of septate junctions. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 90 (16):7834-7838.
- Willson V, Hrsg. 2009. SUMO Regulation of Cellular Processes. Springer.
- Wittchen ES, Haskins J, Stevenson BR. 1999. Protein interactions at the tight junction. Actin has multiple binding partners, and ZO-1 forms independent complexes with ZO-2 and ZO-3. *J Biol Chem*, 274 (49):35179-35185.
- Wittchen ES, Haskins J, Stevenson BR. 2003. NZO-3 expression causes global changes to actin cytoskeleton in Madin-Darby canine kidney cells: linking a tight junction protein to Rho GTPases. *Mol Biol Cell*, 14 (5):1757-1768.
- Wohlschlegel JA, Johnson ES, Reed SI, Yates JR, 3rd. 2004. Global analysis of protein sumoylation in *Saccharomyces cerevisiae*. *J Biol Chem*, 279 (44):45662-45668.

- Wood LD, Irvin BJ, Nucifora G, Luce KS, Hiebert SW. 2003. Small ubiquitin-like modifier conjugation regulates nuclear export of TEL, a putative tumor suppressor. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 100 (6):3257-3262.
- Woods DF, Bryant PJ. 1991. The discs-large tumor suppressor gene of *Drosophila* encodes a guanylate kinase homolog localized at septate junctions. *Cell*, 66 (3):451-464.
- Wu FT, Zhu SM, Ding YN, Beck WT, Mo YY. 2009. MicroRNA-mediated Regulation of Ubc9 Expression in Cancer Cells. *Clinical Cancer Research*, 15 (5):1550-1557.
- Xu J, Kausalya PJ, Phua DC, Ali SM, Hossain Z, Hunziker W. 2008a. Early embryonic lethality of mice lacking ZO-2, but Not ZO-3, reveals critical and nonredundant roles for individual zonula occludens proteins in mammalian development. *Mol Cell Biol*, 28 (5):1669-1678.
- Xu J, He Y, Qiang B, Yuan J, Peng X, Pan XM. 2008b. A novel method for high accuracy sumoylation site prediction from protein sequences. *BMC Bioinformatics*, 9:8.
- Yamazaki Y, Umeda K, Wada M, Nada S, Okada M, Tsukita S, Tsukita S. 2008. ZO-1- and ZO-2-dependent integration of myosin-2 to epithelial zonula adherens. *Mol Biol Cell*, 19 (9):3801-3811.
- Yang M, Hsu CT, Ting CY, Liu LF, Hwang J. 2006a. Assembly of a polymeric chain of SUMO1 on human topoisomerase I in vitro. *J Biol Chem*, 281 (12):8264-8274.
- Yang SH, Galanis A, Witty J, Sharrocks AD. 2006b. An extended consensus motif enhances the specificity of substrate modification by SUMO. *EMBO J*, 25 (21):5083-5093.
- Yano T, Matsui T, Tamura A, Uji M, Tsukita S. 2013. The association of microtubules with tight junctions is promoted by cingulin phosphorylation by AMPK. *J Cell Biol*, 203 (4):605-614.
- Zhang FP, Mikkonen L, Toppari J, Palvimo JJ, Thesleff I, Janne OA. 2008. Sumo-1 function is dispensable in normal mouse development. *Mol Cell Biol*, 28 (17):5381-5390.
- Zhang H, Saitoh H, Matunis MJ. 2002. Enzymes of the SUMO modification pathway localize to filaments of the nuclear pore complex. *Mol Cell Biol*, 22 (18):6498-6508.
- Zhang YQ, Sarge KD. 2008. Sumoylation regulates lamin A function and is lost in lamin A mutants associated with familial cardiomyopathies. *J Cell Biol*, 182 (1):35-39.
- Zhao Y, Kwon SW, Anselmo A, Kaur K, White MA. 2004. Broad spectrum identification of cellular small ubiquitin-related modifier (SUMO) substrate proteins. *J Biol Chem*, 279 (20):20999-21002.
- Zhou W, Ryan JJ, Zhou H. 2004. Global analyses of sumoylated proteins in *Saccharomyces cerevisiae*. Induction of protein sumoylation by cellular stresses. *J Biol Chem*, 279 (31):32262-32268.
- Zulehner G, Mikula M, Schneller D, van Zijl F, Huber H, Sieghart W, Grasl-Kraupp B, Waldhor T, Peck-Radosavljevic M, Beug H, Mikulits W. 2010. Nuclear beta-catenin induces an early liver progenitor phenotype in hepatocellular carcinoma and promotes tumor recurrence. *Am J Pathol*, 176 (1):472-481.

8 Anhang

8.1 Abbildungsverzeichnis

Abb. 1: Lokalisation von Zell-Zell-Verbindungen und Aufbau der Tight Junctions.	4
Abb. 2: Schematische Darstellung des modularen Aufbaus von ZO-2.	9
Abb. 3: Schematische Darstellung der Regulation des nucleocytoplasmatischen Transports von ZO-2 durch posttranslationale Modifikationen.	10
Abb. 4: Vereinfachte schematische Darstellung des SUMOylierungszyklus.	17
Abb. 5: Die potenziellen SUMOylierungsstellen im ZO-2-Protein sind evolutionär konserviert.	49
Abb. 6: Nachweis von ZO-2/SENP1-Komplexen in HEK-293-Zellen.	50
Abb. 7: ZO-2 und Ubc9 interagieren direkt miteinander.	51
Abb. 8: Nachweis der Expression des ZO-2-Ubc9-Fusionsproteins.	52
Abb. 9: ZO-2 wird im Ubc9 fusion-dependent SUMOylation Assay SUMOyliert.	53
Abb. 10: ZO-2-Ubc9 und ZO-2-Ubc9-K14R werden im UFDS-Assay vergleichbar mit SUMO2/3 modifiziert.	54
Abb. 11: Die Deletion des SUMO-Di-Glycin-Motivs verhindert bzw. SUMO2/3-Q89P verstärkt die SUMOylierung von ZO-2 im UFDS-Assay.	55
Abb. 12: Co-Expression von SENP1 vermindert die SUMOylierung von ZO-2-Ubc9 im UFDS-Assay.	56
Abb. 13: Endogenes ZO-2 wird <i>in vivo</i> SUMOyliert.	58
Abb. 14: Rekombinantes Δ NZO-2 wird <i>in vitro</i> SUMOyliert.	59
Abb. 15: ZO-2-Ubc9-K730R wird im UFDS-Assay vermindert mit SUMO2/3 modifiziert.	60
Abb. 16: Abnahme der Modifikation mit SUMO1 durch Mutation von Lysin 730 im Duolink Assay.	61
Abb. 17: Expression der SUMO-Fusionsproteine von ZO-2.	63
Abb. 18: SUMO1 Δ GG-ZO-2 ist vorrangig im Cytoplasma lokalisiert.	64
Abb. 19: Beeinflussung der subzellulären Lokalisation von ZO-2 durch dessen SUMOylierung.	66
Abb. 20: Konstitutive SUMOylierung von ZO-2 hemmt die Repression der β -Catenin/TCF-4-vermittelten Transkriptionsaktivität.	68
Abb. 21: Nachweis von SUMO1-ZO-2/Occludin-Komplexen in HEK-293-Zellen.	69
Abb. 22: Nicht SUMOylierbares 3xFLAG-ZO-2-K730R reprimiert weiterhin die β -Catenin/TCF-4-vermittelte Transkriptionsaktivität.	70
Abb. 23: ZO-2-NLS ist im Zellkern lokalisiert.	72
Abb. 24: ZO-2-NLS verstärkt die Repression der β -Catenin/TCF-4-vermittelten Transkriptionsaktivität.	73
Abb. 25: Nachweis von ZO-2/ β -Catenin-Komplexen in HEK-293-Zellen.	74
Abb. 26: ZO-2 und β -Catenin interagieren an der Plasmamembran.	74
Abb. 27: Die Transkriptionsrepression durch ZO-2 oder ZO-2-NLS ist unabhängig von β -Catenin.	76
Abb. 28: Nachweis von ZO-2/GSK3 β -Komplexen in HEK-293-Zellen.	77
Abb. 29: ZO-2 interagiert <i>in vivo</i> mit GSK3 β .	78
Abb. 30: Schematische Darstellung der möglichen funktionellen Konsequenz der SUMOylierung von ZO-2.	89

8.2 Tabellenverzeichnis

Tab. 1: Übersicht über verwendete Geräte und deren Hersteller.	25
Tab. 2: Übersicht über verwendete cDNA.	27
Tab. 3: Übersicht der verwendeten Expressionsvektoren.	27
Tab. 4: Übersicht der verwendeten Oligonukleotide (Metabion) für Klonierungen.	29
Tab. 5: Übersicht der verwendeten Oligonukleotide (Metabion) für ortsspezifische Mutagenese.	30
Tab. 6: Übersicht über verwendete <i>E. coli</i> Stämme mit entsprechendem Genotyp.	30
Tab. 7: Übersicht über verwendete Zelllinien.	31
Tab. 8: Übersicht der für Western Blots (WB), Immunpräzipitation (IP), Immunfluoreszenzen (IF) und Proximity Ligation Assays (PLA) verwendeten Primär- und Sekundärantikörper.	31
Tab. 9: Zusammensetzung von zwei 0,75 mm dicken PAA-Gelen.	43

Lebenslauf

Persönliche Daten

Name: Franziska Wetzel
Geburtsdatum: 10.02.1984
Geburtsort: Lutherstadt Eisleben

Schulischer Werdegang

1990 – 1991 Robert-Büchner-Oberschule in Lutherstadt Eisleben
1991 – 1994 Grundschule am Schlossplatz in Lutherstadt Eisleben
1994 – 2003 Martin-Luther-Gymnasium in Lutherstadt Eisleben
Abschluss: Allgemeine Hochschulreife
Leistungskurse: Biologie und Englisch
Abitur mit der Note 2,7

Studium

10.2003 – 03.2010 Diplomstudium Biologie
Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg
06.2009 – 03.2010 Diplomarbeit am Institut für Genetik;
AG Molekulargenetik unter Betreuung von
Prof. Dr. Karin Breunig
Diplom mit der Note 1,2
11.2010 – dato Promotion am Institut für Biochemie II des
Universitätsklinikums Jena unter Betreuung von
Prof. Dr. Otmar Huber

9 Danksagung

An erster Stelle möchte ich mich bei Prof. Dr. Otmar Huber für die Möglichkeit bedanken meine Dissertation in seiner Arbeitsgruppe anfertigen zu können. Seine fortwährende Begeisterung und Diskussionsbereitschaft waren für diese Arbeit von sehr großer Bedeutung.

Ein großer Dank gilt Dr. Sonnhild Mittag für die tolle Betreuung und Zusammenarbeit, die Methoden, Tipps und Tricks, die ich von Ihr im Labor lernen durfte und das Korrekturlesen des Manuskripts.

Des Weiteren möchte ich mich bei meinen Kooperationspartnern bedanken.

Außerdem möchte ich mich für die sehr angenehme Arbeitsatmosphäre und die Hilfsbereitschaft im Labor der AG Huber sowie im gesamten Institut für Biochemie II bedanken.

Ganz besonders möchte ich meiner Familie, vor allem meinen Eltern, Marcel und meinen Freunden danken, die mich immer unterstützt und an mich geglaubt haben. Danke für Eure Hilfe, die aufmunternden Worte und das Interesse an dieser Arbeit.

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