



Universitätsklinikum
Hamburg-Eppendorf



Hochschule für Angewandte
Wissenschaften Hamburg
Hamburg University of Applied Sciences

Hochschule für Angewandte Wissenschaften Hamburg
Fakultät Life Sciences

Klonierung, heterologe Expression und subzelluläre Lokalisation von humanen Wildtyp- und vier FBXW11-Mutantenproteinen

BACHELORARBEIT
IM STUDIENGANG BIOTECHNOLOGIE

vorgelegt von

Liisa Knipp

Matrikelnummer: [REDACTED]

Hamburg, 05.06.2020

Erstgutachter: Prof. Dr. Oliver Ullrich
(HAW Hamburg)
Zweitgutachterin: Prof. Dr. Kerstin Kutsche
(Universitätsklinikum Hamburg-Eppendorf)

Die Bachelorarbeit wurde im Labor des Universitätsklinikums Hamburg-Eppendorf
am Institut für Humangenetik betreut und erstellt.

Danksagung

Ich möchte mich zuerst bei Prof. Dr. Kerstin Kutsche bedanken. Zum einen für die Möglichkeit meine Arbeit am Institut für Humangenetik durchzuführen, zum anderen für die Betreuung und die zahlreichen Ratschläge. Ein ebenso großer Dank gilt Pauline Schneeberger für die aufgebrauchte Zeit und Geduld im Laboralltag sowie für die stetige Unterstützung. Ihr hattet stets ein offenes Ohr für mich, vielen Dank!

Ich danke auch Prof. Dr. Oliver Ullrich für die Übernahme meiner Arbeit an der Fakultät Life Science an der Hochschule für Angewandte Wissenschaften Hamburg.

Für die stets angenehme Arbeitsatmosphäre, die schönen Mittagspausen und die interessanten und humorvollen Gespräche außerhalb des Laboralltags danke ich allen Mitgliedern der AG Kutsche und AG Rosenberger ganz herzlich.

Zudem bedanke ich mich bei meinen Freunden und meinen Eltern für die ganze Unterstützung während meines Studiums (und auch sonst). ❤️

Inhalt

Abkürzungsverzeichnis	I
I. Zusammenfassung	1
II. Einleitung	3
1. Das Ubiquitin-Proteasom-System (UPS)	3
1.1. Die Ubiquitinierung erfolgt durch eine Ubiquitinierungskaskade	3
1.2. Der SCF (SKP1, CUL1, F-Box) -Komplex als E3-Ubiquitin-Ligase	5
2. FBXW11 als eine Untereinheit des SCF-Ubiquitin-Ligase-Komplexes	7
2.1. <i>De novo</i> Missense-Mutationen in <i>FBXW11</i> führen zu unterschiedlichen Krankheitsbildern	9
III. Ziele der Arbeit und Arbeitshypothesen	11
IV. Material und Methoden	12
3. Material	12
3.1. Materialien für molekularbiologische Methoden	12
3.2. Materialien für proteinbiochemische Arbeiten	13
3.3. Materialien für zellbiologische Methoden	13
3.4. Sonstige Chemikalien.....	14
3.5. Geräte- und Verbrauchsmaterialien	14
3.6. Bakterienstämme und Zelllinien	16
3.7. Plasmide	17
3.7.1. Ausgangsvektoren zur Herstellung neuer Konstrukte	17
3.7.2. Hergestellte Konstrukte	17
3.7.3. Nicht in dieser Arbeit hergestellte Konstrukte	19
3.8. Antikörper	19
3.9. Oligonukleotide	21
3.9.1. Oligonukleotide für Klonierungen	21
3.9.2. Oligonukleotide für Sequenzierungen	22
3.10. Medien und Zusätze	22
3.10.1. Medien und Zusätze für molekularbiologische Arbeiten.....	22
3.10.2. Medien und Zusätze für zellbiologische Arbeiten	23
3.11. Puffer und Lösungen.....	23
3.11.1. Puffer und Lösungen für molekularbiologische Arbeiten.....	23
3.11.1.1. Isolierung von Plasmid-DNA aus <i>E. coli</i> (Mini-Präparation).....	23
3.11.1.2. Agarose-Gelelektrophorese.....	24
3.11.2. Puffer und Lösungen für proteinbiochemische Arbeiten	24
3.11.2.1. Zellyse	24
3.11.2.2. SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE)	25

3.11.2.3. Western-Blot.....	26
3.11.3. Puffer und Lösungen für zellbiologische Arbeiten	26
3.11.3.1. Zellkultur.....	26
3.11.3.2. Immunfluoreszenzanalysen.....	27
3.12. Software und Datenbanken.....	28
4. Methoden.....	29
4.1. Molekularbiologische Methoden	29
4.1.1. Transformation chemisch kompetenter <i>E. coli</i> -Zellen mit Plasmid-DNA.....	29
4.1.2. Anzucht von <i>E. coli</i> -Kulturen	29
4.1.3. Isolierung von Plasmid-DNA aus <i>E. coli</i>	30
4.1.3.1. Mini-Präparation	30
4.1.3.2. Maxi-Präparation	30
4.1.4. Photometrische Konzentrationsbestimmung von Plasmid-DNA	31
4.1.5. Polymerase-Kettenreaktion (PCR)	31
4.1.6. Agarose-Gelelektrophorese.....	32
4.1.7. Zyklische DNA-Sequenzierung nach Sanger	32
4.1.8. DNA-Restriktionsspaltung	34
4.1.9. Aufreinigung von PCR- und Restriktionsprodukten.....	35
4.1.10. Klonierungsstrategien zur Herstellung von Expressionskonstrukten	35
4.1.10.1. In-Fusion Klonierung	35
4.1.10.2. Ortsspezifische Mutagenese	37
4.1.10.3. Klonierung mittels der Gateway-Technologie	38
4.2. Proteinbiochemische Methoden	40
4.2.1. Herstellung von Zelllysaten	40
4.2.2. SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE).....	40
4.2.3. Western-Blot.....	41
4.2.4. Immunologische Detektion immobilisierter Proteine auf PVDF-Membranen	42
4.3. Zellbiologische Methoden.....	43
4.3.1. Zellkultur	43
4.3.1.1. Kulturbedingungen	43
4.3.1.2. Auftauen von Zellen	43
4.3.1.3. Passagieren von Zellen.....	43
4.3.2. Transiente Transfektion	44
4.3.2.1. Transiente Transfektion mittels TurboFect	44
4.3.2.2. Transiente Transfektion mittels Lipofectamine 2000	45
4.3.3. Immunfluoreszenz-Analysen	46
V. Ergebnisse	48
1. Herstellung von humanen EGFP- und HA-FBXW11-Fusionskonstrukten	48

1.1. Herstellung des HA-FBXW11-Fusionskonstrukts mit der Mutation c.1100C>T mittels In-Fusion-Technologie.....	51
1.2. Herstellung von HA-FBXW11-Fusionskonstrukten mit den Mutationen c.685G>C, c.1048C>T und c.1291G>A mittels ortsspezifischer Mutagenese ...	54
1.3. Herstellung von EGFP-FBXW11-Fusionskonstrukten für den Wildtyp und die vier Mutanten mittels Gateway-Technologie	56
2. Nachweis der heterologen Expression von EGFP- und HA-FBXW11-Fusionsproteinen in HEK293T-Zellen mittels Immunblottings	59
3. Nachweis der heterologen Expression von getaggten TWIST1-Proteinen in HEK293T-Zellen mittels Immunblottings	63
4. Untersuchung der subzellulären Lokalisation von EGFP- und HA-FBXW11-Fusionsproteinen in CHO-K1-Zellen mittels Immunfluoreszenz	65
4.1. Untersuchung der subzellulären Lokalisation von EGFP- und HA-FBXW11-Proteinvarianten in CHO-K1-Zellen.....	65
4.2. Untersuchung der subzellulären Lokalisation des myc-TWIST1-Fusionsproteins nach Koexpression von EGFP- bzw. HA-FBXW11-Proteinvarianten in CHO-K1-Zellen.....	70
VI. Diskussion.....	77
1. Nachweis von Wildtyp-FBXW11 und vier FBXW11-Mutantenproteinen sowie von getaggttem TWIST1 nach heterologer Expression in HEK293T-Zellen.....	77
2. Mutationen im <i>FBXW11</i> -Gen führen zu veränderten subzellulären Lokalisationen der kodierten Proteine nach Überexpression in CHO-K1-Zellen ...	79
Abbildungsverzeichnis	III
Tabellenverzeichnis.....	V
Literaturverzeichnis.....	VI
Eidesstattliche Erklärung.....	XI

Abkürzungsverzeichnis

°C	Grad Celsius
μ	Mikro
A	Adenin
AA	Acrylamid
ad	Auf
Amp	Ampicillin
ATCC	American Type Culture Collection
ATP	Adenosintriphosphat
BA	Bisacrylamid
Bp	Basenpaar(e)
BSA	Rinderserumalbumin („bovine serum albumin“)
C	Cytosin
ca.	Circa
CHO-K1	Eierstockzellen vom Chinesischen Hamster („Chinese hamster ovary“)
C-Terminus	Carboxyterminus, carboxylendständiger Aminosäure-Rest
Cy3	Cyanin3
DAPI	4',6-Diamidin-2-phenylindol
ddH ₂ O	Bidestilliertes Wasser („double-distilled water“)
ddNTP	2',3'-Dideoxyribonukleotide
DMEM	Kulturmedium für Zellen („Dulbecco's Modified Eagle Medium“)
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure („desoxyribonucleic acid“)
DNase	Desoxyribonuklease
dNTP	Desoxynukleosidtriphosphat
DSMZ	Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen
DTT	Dithiothreitol
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EGFP	Grün fluoreszierendes Protein („enhanced green fluorescent protein“)
et al.	Und andere (et altera)
F12	Kulturmedium für Zellen
FBS	Fetales Kälberserum („Fetal Bovine Serum“)
FITC	Fluoresceinisothiocyanat
G	Guanin
g, mg, μg	Gramm, Milligramm, Mikrogramm
GAPDH	Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase
h	Stunde („hour“)
HEK293T	Menschliche embryonale Nierenzellen („human embryonal kidney“)
HPLC	Chromatographieverfahren („high pressure liquid chromatography“)
HRP	Meerrettich-Peroxidase („horseradish peroxidase“)
IF	Immunfluoreszenz
kb	Kilobase(n)
kD	Kilodalton
Km	Kanamycin
L, mL, μL	Liter, Milliliter, Mikroliter
LV	Leervektor
m, cm, mm, μm, nm	Meter, Centimeter, Millimeter, Mikrometer, Nanometer
M, mM, μM	Molar (mol/L), Millimolar, Mikromolar
mA	Milliampere

MEM	Serumreduziertes Kulturmedium für Zellen („Minimal Essential Medium“)
min	Minute(n)
mol, mmol, µmol	Mol, Millimol, Mikromol
mTBST	Tris-gepufferte Kochsalzlösung + Milchpulver
NP-40	Nichtionisches Detergenz P40
N-Terminus	Aminoterminus
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PBS	Phosphat-gepufferte Saline Kochsalzlösung („phosphate Buffered Saline“)
PBST	Phosphat-gepufferte Saline + Tween 20 („phosphate Buffered Saline“)
PCR	Polymerase-Kettenreaktion (polymerase chain reaction“)
Pfu	<i>Pyrococcus furiosus</i>
pH	pH
RNA	Ribonukleinsäure („ribonucleic acid“)
rpm	Umdrehungen pro Minute („revolutions per minute“)
s	Sekunde(n)
SDS	Natriumdodecylsulfat („sodium dodecyl sulfate“)
T	Thymin
Taq	<i>Thermus aquaticus</i>
TBST	Tris-gepufferte Kochsalzlösung + Tween 20 („Tris-buffered saline“)
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylethylendiamin
Tris	Tris-(hydroxymethyl-)aminomethan
Tween 20	Polyoxyethylensorbitan-Monolaurat
U	Units (Enzymeinheit)
Ub	Ubiquitin
UPS	Ubiquitin-Proteasom-System
UV	Ultraviolett
V	Volt
v/v	Volumen pro Volumen („volume per volume“)
w/v	Gewicht pro Volumen („weight per volume“)
WB	Western-Blot
WT	Wildtyp

Ein- und Drei-Buchstaben-Code der Aminosäuren:

Alanin	Ala	A	Leucin	Leu	L
Arginin	Arg	R	Lysin	Lys	K
Asparagin	Asn	N	Methionin	Met	M
Asparaginsäure	Asp	D	Phenylalanin	Phe	F
Cystein	Cys	C	Prolin	Pro	P
Glutamin	Gln	Q	Tryptophan	Trp	W
Glutaminsäure	Glu	E	Serin	Ser	S
Glycin	Gly	G	Threonin	Thr	T
Histidin	His	H	Tyrosin	Tyr	Y
Isoleucin	Ile	I	Valin	Val	V

I. Zusammenfassung

Das Gen *FBXW11* kodiert für ein F-Box-Protein, das eine Komponente des SCF (SKP1, CUL1, E-Box)-Ubiquitin-Ligase-Komplexes ist. Dieser Komplex sorgt für die Ubiquitinierung zahlreicher Proteine (Substrate) und deren proteasomaler Degradation. *FBXW11* weist u.a. eine WD40-Repeat-Domäne auf, die maßgeblich an der Substraterkennung und -bindung sowie der subzellulären Lokalisation des Proteins beteiligt ist.

In der Arbeitsgruppe von Frau Prof. Kutsche wurde bei einem Patienten die *de novo* Missense-Mutation c.1100C>T/p.(Ser367Phe) im *FBXW11*-Gen identifiziert. Im Jahr 2019 wurden erstmalig sieben Patienten mit *de novo* Missense-Mutation im *FBXW11*-Gen beschrieben. Die Patienten zeigen diverse klinische Phänotypen, die durch kraniofaziale Dysmorphien, Entwicklungsverzögerung, Augen- und/oder skeletale Fehlbildungen charakterisiert sind. Die *FBXW11*-Variante c.1100C>T/p.(Ser367Phe) sowie drei der sieben publizierten Varianten, c.685G>C/p.(Gly229Arg), c.1048C>T/p.(Arg350Trp) und c.1291G>A/p.(Glu431Lys), wurden repräsentativ ausgewählt und in dieser Arbeit hinsichtlich ihres Einflusses auf die subzelluläre Lokalisation des kodierten Proteins untersucht. Die fünf Aminosäureaustausche befinden sich an unterschiedlichen Positionen der WD40-Repeat-Domäne.

Hierfür wurden EGFP- und HA-Fusionskonstrukte hergestellt, indem die *FBXW11*-Kodierregion (Wildtyp und die vier Mutanten) in eukaryotische Expressionsvektoren kloniert wurde. Die heterologe Proteinexpression in HEK293T-Zellen wurde durch Immunblotexperimente untersucht. Die Menge an getagtem *FBXW11*-Wildtyp-Protein unterschied sich quasi nicht von der an exprimierten HA- und EGFP-*FBXW11*-Mutantenproteinen.

Die subzelluläre Lokalisation von Wildtyp-*FBXW11* sowie der vier *FBXW11*-Mutantenproteine wurde durch Immunfluoreszenzexperimente in CHO-K1-Zellen analysiert. EGFP- und HA-*FBXW11*-Wildtyp waren primär im Nukleus, aber auch diffus im Zytoplasma verteilt. EGFP- und HA-getaggte *FBXW11*^{G229R}- und *FBXW11*^{S367F}-Fusionsproteine zeigten im Gegensatz dazu eine primär zytoplasmatische Verteilung. HA-*FBXW11*^{R350W} und HA-*FBXW11*^{E431K} befanden sich im Vergleich zum Wildtyp-Protein gleichmäßig verteilt im Nukleus und Zytoplasma oder primär im Zytoplasma (ohne Kernlokalisation). Im Gegensatz dazu wiesen EGFP-*FBXW11*^{R350W} und EGFP-*FBXW11*^{E431K} eine zum *FBXW11*-Wildtyp ähnliche Lokalisation auf. Zusätzlich wurde

für EGFP-FBXW11^{E431K} eine gleichmäßig diffuse Verteilung in Zytoplasma und Nukleus oder auch eine ausschließlich zytoplasmatische Lokalisation beobachtet. Durch die Koexpression mit einem FBXW11-Substratprotein, dem Transkriptionsfaktor TWIST1, wurde für HA und EGFP getaggte FBXW11^{R350W}- und FBXW11^{E431K}-Mutantenproteine eine zum Wildtyp-Protein vergleichbare Verteilung festgestellt. Die Lokalisation von FBXW11^{G229R}- und FBXW11^{S367F}-Fusionsproteinen änderte sich durch die TWIST1-Koexpression nicht.

Die Daten der Immunblotexperimente lassen vermuten, dass die FBXW11-Mutantenproteine ähnlich stabil wie Wildtyp-FBXW11 sind und die das jeweilige Protein exprimierende Zellen keinen Selektionsnachteil haben. Die veränderte subzelluläre Lokalisation einiger FBXW11-Mutantenproteine könnte mit einer veränderten Substratbindung (von z.B. TWIST1) zusammenhängen. Theoretisch ist denkbar, dass die verschiedenen Mutationen in der WD40-Repeat-Domäne die Bindung an unterschiedliche Substratproteine von FBXW11 beeinflussen, wodurch das breite Spektrum an klinischen Merkmalen der Betroffenen mit *FBXW11*-Mutation entstehen könnte.

II. Einleitung

1. Das Ubiquitin-Proteasom-System (UPS)

In einer Zelle werden Proteine kontinuierlich synthetisiert und wieder degradiert. Es gibt dabei verschiedene Gründe für den Abbau von Proteinen innerhalb der Zelle, z.B. wenn sie für die Zelle entbehrlich sind, nicht korrekt funktionieren oder die Zelle Nährstoffmangel hat. Durch verschiedene Signale werden diese Proteine dann zum Abbau freigegeben. Die Degradation von Proteinen und die Regulation der Synthese und des Abbaus ist ein wichtiger Teil des Lebenszyklus einer Zelle. Eine Fehlregulation der Abbausysteme kann u.a. zu Krebs oder neurodegenerativen Erkrankungen führen (Hirsch-Kauffmann et al. 2009).

Der Großteil der zellulären Proteine wird in einem ATP-abhängigen Prozess durch das Ubiquitin-Proteasom-System (UPS) abgebaut. Zu degradierende Proteine werden in einer Enzymkaskade durch die kovalente Anheftung des kleinen Polypeptides Ubiquitin markiert. Ubiquitin ist ein 8,5 kDa kleines, ubiquitär exprimiertes und hoch konserviertes Protein, das in allen eukaryotischen Zellen und Zelltypen vorkommt. Das mit einer Polyubiquitinkette markierte Protein wird vom Proteinase-Komplex, dem Proteasom, selektiv erkannt und ATP-abhängig abgebaut (Hirsch-Kauffmann et al. 2009). Proteasomen sind zylinderförmige Protein-Komplexe, die aus mehreren Untereinheiten bestehen und in eukaryotischen Zellen sowohl im Zytoplasma als auch im Zellkern vorkommen. Das UPS ist in zahlreiche zelluläre Prozesse involviert, dazu gehören u.a. die Signaltransduktion, DNA-Reparatur, Zelldifferenzierung sowie die Regulation der Transkription und Translation, indem es z.B. kurzlebige Transkriptionsfaktoren oder Signalproteine degradiert (Baloghova et al. 2019; Alberts et al. 2017).

1.1. Die Ubiquitinierung erfolgt durch eine Ubiquitinierungskaskade

Die Verknüpfung von Proteinen mit Polyubiquitinketten erfolgt durch verschiedene enzymatische Reaktionen, dargestellt in Abbildung 1. Im ersten Schritt wird das Carboxylende des Ubiquitins durch das Ubiquitin-aktivierende Enzym (E1) aktiviert. Dabei wird die Energie aus der ATP-Hydrolyse verwendet, um eine Thioesterbindung zwischen dem Ubiquitin und einem spezifischen Cysteinrest des E1-Enzyms zu bilden. E1 reicht das aktivierte Ubiquitin unter Bildung einer neuen Thioesterbindung an ein Cystein im aktiven Zentrum des Ubiquitin-konjugierenden Enzyms (E2) weiter und wird

freigesetzt (Fang und Weissman 2004; Baloghova et al. 2019). Durch ein Zusammenspiel von E2 und Ubiquitin-Ligasen (E3), die spezifische Abbausignale (sogenannte Degron-Motive (Varshavsky 1991)) in Proteinsubstraten erkennen, wird das Ubiquitin mit einem der Lysine des Zielproteins verbunden (Baloghova et al. 2019; Alberts et al. 2017).

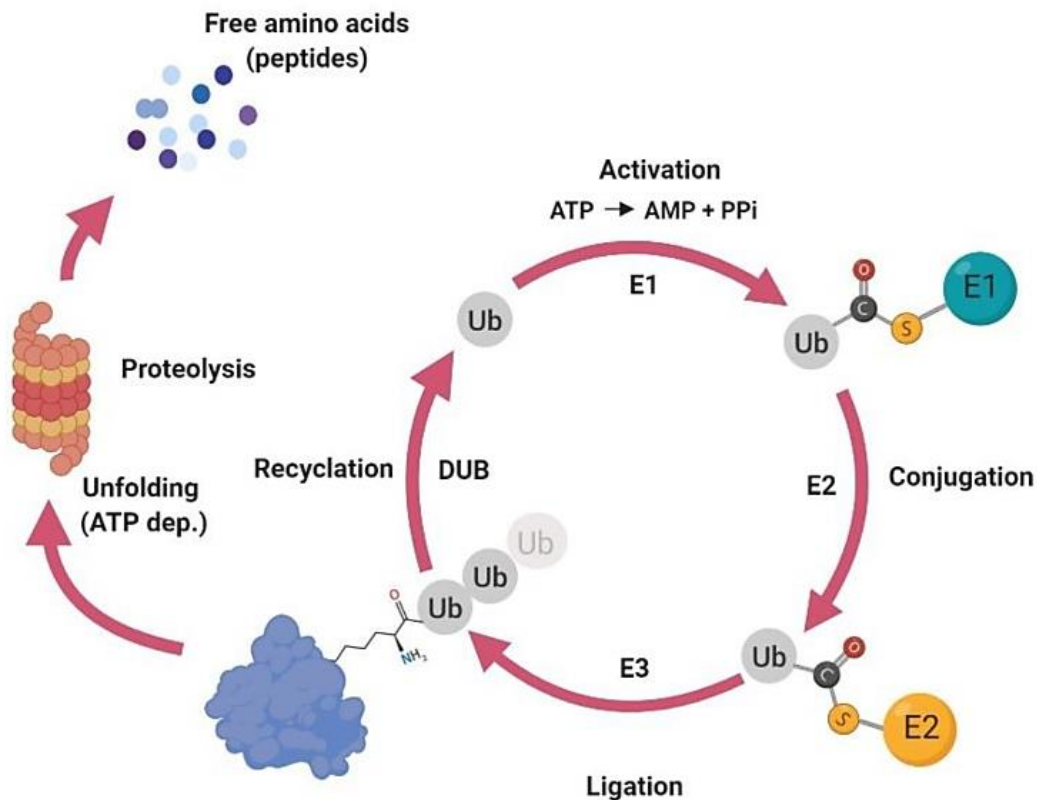


Abbildung 1: Die Ubiquitinierungskaskade des Ubiquitin-Proteasom-Systems

Ubiquitin wird unter ATP-Verbrauch durch eine Thioesterbindung an das Ubiquitin-aktivierende Enzym (E1) gebunden (*Activation*). Anschließend wird das Ubiquitin durch eine weitere Thioesterbindung an das Ubiquitin-konjugierende Enzym (E2) gebunden (*Conjugation*). Daraufhin erfolgt die Übertragung des Ubiquitins auf das Zielprotein mittels der Ubiquitin-Ligase (E3) (*Ligation*). Bei einer Mehrfachubiquitinierung wiederholt sich dieser Vorgang, und es erfolgt eine Polyubiquitinierung durch die E3-Ligase. Das Proteasom erkennt diese Ubiquitinkette, entfaltet das Zielprotein (*Unfolding*) und degradiert es proteolytisch in kleine Peptide oder freie Aminosäuren (*Proteolysis*). Die Ubiquitinketten vom degradierten Protein werden durch Deubiquitinasen (DUBs) recycelt und dem Ubiquitin-Proteasom-Kreislauf wieder zugeführt (*Recyclation*).

Quelle: Baloghova et al. (2019)

Bei einer Mehrfachubiquitinierung werden durch die E3-Ligase weitere Ubiquitine auf andere Lysine des Substrats oder auf schon gebundene Ubiquitinreste übertragen (Polyubiquitinierung). Ubiquitin besitzt in seiner Aminosäuresequenz sieben Lysine, an welche weitere Ubiquitinmoleküle angehängt werden können, sodass sich eine Ubiquitinkette bildet. Ubiquitinketten mit über Lys48 verknüpften Ubiquitinen markieren

Proteine hauptsächlich für den Abbau durch das Proteasom (Hershko und Ciechanover 1998; Fang und Weissman 2004; Swatek und Komander 2016). Proteine mit einer andersartig modifizierten Polyubiquitinkette (Verknüpfung über ein anderes Lysin) haben andere Funktionen für die Zelle, beispielsweise sind diese in die DNA-Reparatur oder in Signalkaskaden involviert oder markieren das Protein für den lysosomalen Abbau (Chen und Sun 2009; Swatek und Komander 2016). Im Menschen sind, im Gegensatz zu E1- und E2-Enzymen, deutlich mehr verschiedene E3-Enzyme bekannt, die dadurch eine hohe Substratspezifität gewährleisten und im Umkehrschluss auf eine große Vielfalt an Substratproteinen hinweisen, die durch das UPS reguliert werden (Fang und Weissman 2004; Pickart und Eddins 2004; Alberts et al. 2017; Baloghova et al. 2019).

1.2. Der SCF (SKP1, CUL1, F-Box) -Komplex als E3-Ubiquitin-Ligase

E3-Ligasen spielen also eine essenzielle Rolle bei der Ubiquitinierung von Zielproteinen, indem sie die Rekrutierung des E2-Enzyms und den Transfer des Ubiquitins vom E2-Enzym auf das Substrat vermitteln und dabei die Substratspezifität gewährleisten. E3-Enzyme kann man bezüglich ihrer strukturellen Gemeinsamkeiten in verschiedene Unterfamilien einteilen. Die größte E3-Ligasen-Familie stellen E3-Ligasen der RING (*really interesting new gene*)-Finger-Familie dar (Fang und Weissman 2004; Alberts et al. 2017). Zu diesen gehört u.a. der SCF (SKP1, CUL1, F-Box)-Komplex, dargestellt in Abbildung 2.

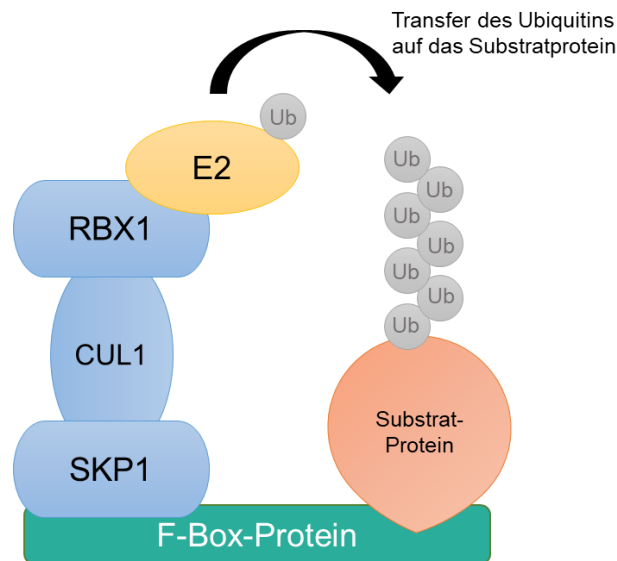


Abbildung 2: Schematische Darstellung des SCF-Ubiquitin-Ligase-Komplexes

Der SCF-Ubiquitin-Ligase-Komplex besteht aus dem Gerüst-Protein CUL1, dem RING-Finger Protein RBX1, dem Adapterprotein SKP1 und dem F-Box-Protein. Zusammen mit dem Ubiquitin-konjugierenden Enzym (E2) formt der C-förmige SCF-Komplex einen Super-Komplex. RBX1 interagiert mit CUL1 und bindet das E2-Enzym, um die Ubiquitinierung oder auch Polyubiquitinierung zu katalysieren. SKP1 bindet das F-Box-Protein, das das zu ubiquitinierende Substratprotein erkennt und bindet.

Darstellung in Anlehnung an Frescas und Pagano (2008)

Die größte Untereinheit des SCF-Komplexes bildet das Gerüst-Protein CUL1 (Cullin 1), das über den N-Terminus an SKP1 (*S phase kinase-associated protein 1*) und über den C-Terminus an RBX1 (*RING box protein 1*) bindet (Zheng et al. 2016; Alberts et al. 2017). RBX1 rekrutiert das E2-Enzym. SKP1 ist ein Adapterprotein, welches eine Verbindung zwischen CUL1 und einem der über 60 bekannten F-Box-Proteine schafft. Zu den F-Box-Proteinen gehört u.a. das in dieser Arbeit untersuchte Protein FBXW11 (*F-box and WD repeat domain containing 11*; alternativer Name: β TRCP2, *beta transducin repeat-containing protein 2*) (Frescas und Pagano 2008; Zheng et al. 2016).

2. FBXW11 als eine Untereinheit des SCF-Ubiquitin-Ligase-Komplexes

Das Gen *FBXW11* kodiert für ein F-Box-Protein, das eine Komponente des SCF-Ubiquitin-Ligase-Komplexes ist, und eine wichtige Rolle im Zellzyklus, in der Apoptose und bei der Zellmigration spielt (Putters et al. 2011; Zheng et al. 2016). *FBXW11* gehört zur *FBXW*-Unterfamilie der F-Box-Proteine. Die elf Mitglieder der *FBXW*-Familie weisen alle eine WD40-Repeat-Domäne auf, die das E3-Substrat erkennt und bindet (Xu und Min 2011). Die WD40-Repeat-Domäne besteht aus sieben WD40-Repeats (WD1-7), welche dreidimensional eine Art siebenflügelige Propellerstruktur ausbilden; die WD40-Repeat-Domäne befindet sich in der C-terminalen Region von *FBXW11* (Abbildung 3). Am N-Terminus von *FBXW11* befindet sich die F-Box-Domäne (ca. 50 Aminosäuren) (Kipreos und Pagano 2000; Ho et al. 2006; Xu und Min 2011). Die Domänenstruktur von *FBXW11* ist in Abbildung 3 dargestellt.

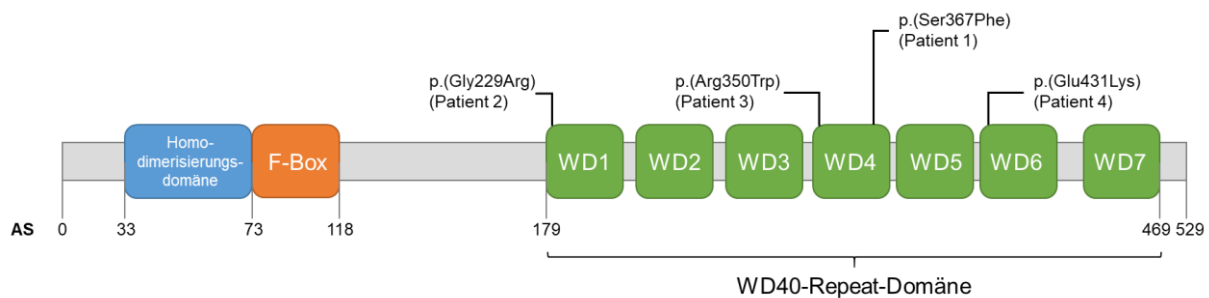


Abbildung 3: Schematische Darstellung der Domänenstruktur von FBXW11

Gezeigt ist die schematische Darstellung der Domänenstruktur des F-Box-Proteins *FBXW11*. *FBXW11* besitzt neben einer Homodimerisierungsdomäne (blau), die F-Box-Domäne (orange) und sieben WD40-Repeats (WD1-7, grün), welche die WD40-Repeat-Domäne bilden. Aminosäurepositionen (AS), u.a. für die verschiedenen Domänen, sind angegeben. Ebenfalls dargestellt sind die in dieser Arbeit untersuchten humanpathogenen Mutationen (siehe 2.1), die sich an unterschiedlichen Positionen in der WD40-Repeat-Domäne befinden.

Darstellung in Anlehnung an Holt et al. (2019)

Die *FBXW11*-prä-mRNA wird alternativ gespleißt, wodurch drei verschiedene Protein-Isoformen entstehen (α , β und γ) (Abbildung 4). Allerdings scheint endogenes *FBXW11* α kaum bzw. gar nicht exprimiert zu werden (Putters et al. 2011). In dieser Arbeit wurde mit der *FBXW11* β -Isoform gearbeitet.

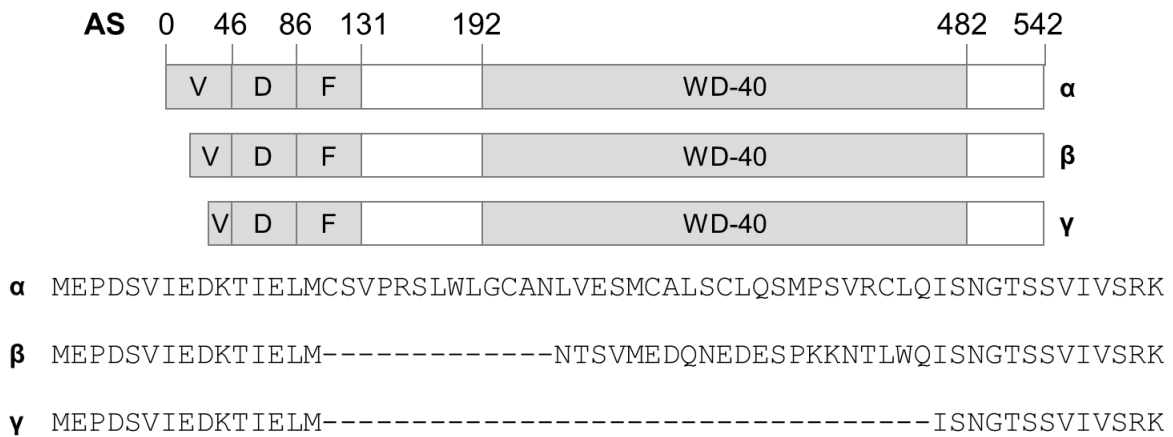


Abbildung 4: Schematische Darstellung der Domänenstruktur der drei verschiedenen FBXW11-Isoformen und partielle Aminosäuresequenzen in den sich unterscheidenden N-Termini

Die Abbildung zeigt die Domänenstruktur der drei Isoformen von FBXW11 (α , β und γ). Die darunter angegebenen Aminosäuresequenzen unterscheiden sich im N-Terminus (variable Domäne = V). Die Homodimerisierungsdomäne (D), F-Box (F) und WD40-Repeat-Domäne sind in allen Isoformen unverändert. Aminosäurepositionen (AS), u.a. für die verschiedenen Domänen, sind angegeben.

Darstellung in Anlehnung an Putters et al. (2011)

Endogenes FBXW11 lokalisiert sowohl im Zytoplasma als auch im Nukleus. Jedoch verhielten sich die beiden Isoformen FBXW11 β und FBXW11 γ unterschiedlich: Während FBXW11 γ ausschließlich im Zytoplasma lokalisiert ist, ist FBXW11 β ausschließlich im Nukleus lokalisiert (Putters et al. 2011). Weitere Versuche zeigten, dass FBXW11 α -Deletionsmutanten mit intakter WD40-Repeat-Domäne eine andere Verteilung in der Zelle haben (präferentielle Lokalisation im Nukleus) als FBXW11 α -Deletionsmutanten ohne WD40-Repeat-Domäne (Lokalisation in Nukleus und Zytoplasma). Dies zeigt zum einen, dass die WD40-Repeat-Domäne eine Rolle für die Lokalisation von FBXW11 innerhalb der Zelle spielt. Zum anderen wird vermutet, dass die Substraterkennung wichtig für die korrekte subzelluläre Lokalisation von FBXW11 ist. Vermutlich ist die subzelluläre Lokalisation von FBXW11 wichtig für dessen biologische Funktion (Putters et al. 2011).

Ein Substrat von FBXW11 als Teil des SCF-Ubiquitin-Ligase-Komplexes ist der Transkriptionsfaktor TWIST1 (Jiateng Zhong et al. 2013). TWIST1 ist u.a. ein Krankheitsgen für das autosomal-dominant erbliche Saethre-Chatzen-Syndrom, das sich durch eine Synostose der Kranznaht in Kombination mit kraniofazialen Dysmorphien, wie z.B. Ptosis, Hypertelorismus und kleinen Ohren, und skelettalen Fehlbildungen, wie Brachydaktylie, breite Zehen, partielle kutane Syndaktylie von Zeige- und Mittelfinger und duplizierte Endphalanx der Großzehen, auszeichnet. In

den meisten Fällen ist die Intelligenz der Betroffenen normal (el Ghouzzi et al. 1997; Howard et al. 1997; Ciurea und Toader 2009). TWIST1 spielt eine wichtige Rolle in der frühen embryonalen Entwicklung, indem es die Wanderung von Zellen im embryonalen Gewebe ermöglicht (Epithelial-Mesenchymal Transition) (Hotz et al. 2007; Barnes und Firulli 2009; Zhong et al. 2013).

2.1. *De novo* Missense-Mutationen in *FBXW11* führen zu unterschiedlichen Krankheitsbildern

Koolen et al. (2006) beschrieben einen Patienten mit Holoprosenzephalie, Krampfanfällen, Polydaktylie der Hand und einem Ventrikelseptumdefekt, bei welchem eine sieben Gene (inkl. *FBXW11*) umfassende *de novo* Duplikation diagnostiziert wurde. Es wurde vermutet, dass der Phänotyp durch die Duplikation von *FBXW11* verursacht worden sein könnte, da *FBXW11* eine bedeutende Rolle im Hedgehog-Signalweg spielt (Katoh und Katoh 2008). Eine Fehlregulation in diesem Signalweg wurde bereits mit anderen Erkrankungen mit Holoprosenzephalie und Polydaktylie in Verbindung gebracht (Cavodeassi et al. 2019). *FBXW11* ist des Weiteren ein Teil des Wnt/ β -Catenin-Signalweges (Kim et al. 2009; Nusse und Clevers 2017; Baloghova et al. 2019), der eine besondere Rolle während der Augen- (Fujimura 2016), Gehirn- (Noelanders und Vleminckx 2017) und Extremitäten-Entwicklung (Raspopovic et al. 2014) spielt.

Vor Beginn dieser Arbeit wurde im Rahmen eines Forschungsprojektes in der Arbeitsgruppe von Frau Prof. Kutsche bei einem Patienten eine *de novo* Missense-Mutation im *FBXW11*-Gen identifiziert (Abbildung 3, Patient 1). Die Mutation c.1100C>T/p.(Ser367Phe) betrifft das Ser367 am Ende des WD4-Repeats. Der bereits verstorbene Patient 1 hatte eine schwere Form der Kraniosynostose, die zu einem „kleeblattförmigen“ Schädel geführt hat, bei dem der Hirnschädel zu beiden Seiten und nach oben hin stark ausgebuchtet war. Der Patient hatte seit der Geburt Krampfanfälle. Zum weiteren klinischen Bild gehörten kraniofaziale Dismorphien, Aplasie der Kutis und faltige Haut, postaxiale Polysyndaktylie und Arthrogryposis.

Im Jahr 2019 wurden erstmalig sieben Patienten mit *de novo* Missense-Mutationen im *FBXW11*-Gen beschrieben (Holt et al. 2019). Von den sieben Patienten hatten drei Mutationen, die am Anfang des WD4-Repeats liegen. Weitere drei Patienten trugen Mutationen, die am Anfang des WD6-Repeats lokalisiert sind. Der siebte Patient trug

eine Variante am Anfang des WD1-Repeats. Aus jedem dieser drei Cluster wurde eine *FBXW11*-Variante repräsentativ ausgewählt und in dieser Arbeit untersucht (Abbildung 3). Die Patienten mit den ausgewählten Mutationen sind im Folgenden näher vorgestellt:

Patient 2 mit der Mutation c.685G>C/p.(Gly229Arg) zeigte einen komplexen Phänotyp, u.a. mit schwerer Entwicklungsverzögerung, strukturellen Gehirnanomalien, kraniofazialen Dysmorphien und einer Pulmonalstenose. Es wurde der Verdacht auf Noonan-Syndrom bei ihm geäußert (Individuum 7 in (Holt et al. 2019)).

Patientin 3 mit der Mutation c.1048C>T/p.(Arg350Trp) zeigte Augenfehlbildungen, wie z.B. ein okulares Kolobom und eine Ptose. Weitere klinische Merkmale waren eine mandibuläre Retrognathie und verschiedene Anomalien der Hände und Füße, z.B. Syndaktylie der Zehen, Polydaktylie am linken Fuß und Gelenkkontrakturen der Finger und Zehen (Individuum 1 in (Holt et al. 2019)).

Patientin 4 mit der Mutation c.1291G>A/p.(Glu431Lys) zeigte eine Entwicklungsverzögerung, kraniofaziale Dysmorphien, u.a. eine milde Ptose, eine malare Hypoplasie sowie eine Mikrognathie. Zudem hatte sie verschiedene Hand- und Fußanomalien (Individuum 4 in (Holt et al. 2019)).

Die Patienten zeigen ein breites Spektrum an klinischen Merkmalen, zu denen insbesondere kraniofaziale Dysmorphien, Augen- und skelettale Fehlbildungen gehören. Es stellt sich die Frage, wie Mutationen in diesem Gen diese relativ unterschiedlichen Krankheitsbilder verursachen.

III. Ziele der Arbeit und Arbeitshypothesen

Das vorrangige Ziel dieser Arbeit war die Untersuchung der Auswirkung der humanpathogenen *FBXW11*-Mutationen c.1100C>T/p.(Ser367Phe), c.685G>C/p.(Gly229Arg), c.1048C>T/p.(Arg350Trp) und c.1291G>A/p.(Glu431Lys) auf die subzelluläre Lokalisation des *FBXW11*-Proteins. Die vier Mutationen liegen in unterschiedlichen WD40-Repeats der WD40-Repeat-Domäne, die für Substrat-erkennung und subzelluläre Lokalisation verantwortlich ist, und könnten somit die Verteilung von *FBXW11* innerhalb der Zelle beeinflussen.

Diese Arbeit gliedert sich in drei Teile:

Im ersten Teil der Arbeit sollten zunächst verschiedene Fusionskonstrukte mit humanem Wildtyp-*FBXW11* und den vier mutierten Varianten (siehe oben) durch Klonierungen hergestellt werden. Dieser Teil der Arbeit diente vor allem der Vorbereitung für die nachfolgenden Untersuchungen.

Im zweiten Abschnitt sollte die Proteinexpression und -Menge des *FBXW11*-Wildtypproteins sowie der unterschiedlichen *FBXW11*-Mutantenproteine nach ektopischer Expression in HEK293T-Zellen durch Immunblotexperimente analysiert werden.

Im dritten Abschnitt der Arbeit sollte die subzelluläre Verteilung des *FBXW11*-Wildtypproteins und der verschiedenen mutierten *FBXW11*-Proteine nach Überexpression in CHO-K1-Zellen untersucht werden. Des Weiteren sollte analysiert werden, ob die Koexpression des Transkriptionsfaktors TWIST1 eine Auswirkung auf die subzelluläre Lokalisation von *FBXW11*-Wildtyp und/oder der vier *FBXW11*-Mutantenproteine hat.

IV. Material und Methoden

3. Material

3.1. Materialien für molekularbiologische Methoden

Tabelle 1: Verwendete Materialien für molekularbiologische Methoden und Angabe des Herstellers

1 Kb DNA-Leiter	Invitrogen (Karlsruhe)
100 bp DNA-Leiter	Invitrogen (Karlsruhe)
10x PfuUltra HF DNA-Polymerase Buffer	Agilent (Santa Clara)
Agar	Invitrogen (Karlsruhe)
Agarose UltraPure	Invitrogen (Karlsruhe)
Ampicillin-Natriumsalz ($C_{16}H_{18}N_3 \times NaO_4S$)	Sigma (Taufkirchen)
Bacto Tryptone	BD Pharmingen (Heidelberg)
Big Dye Terminator Cycle Sequencing Kit (inkl. BigDye Terminator v3.1 Ready Reaction Mix und BigDye sequencing buffer)	Applied Biosystems (Foster City)
Borsäure (H_3BO_3)	Merck (Darmstadt)
D-Glucose ($C_6H_{12}O_6$)	Sigma (Taufkirchen)
dNTPs	Invitrogen (Karlsruhe)
Eisessig (CH_3COOH)	Schuchart (Hohenbrunn)
FastDigest Green Buffer (10x)	Thermo Scientific (Bonn)
FastDigest Restriktionsendonukleasen	Thermo Scientific (Bonn)
Hefeextrakt	Invitrogen (Karlsruhe)
Hi-Di Formamid	Invitrogen (Karlsruhe)
In-Fusion HD Cloning Kit	Takara Bio (Kalifornien)
Kaliumacetat (CH_3CO_2K)	Carl Roth (Karlsruhe)
Kanamycin-Sulfat ($C_{18}H_{36}N_4O_{11} \times H_2SO_4$)	Fluka (Neu-Ulm)
Midori Green Advanced DNA Stain	Nippon Genetics Europe GmbH (Düren)
Natriumacetat ($C_2H_3NaO_2$)	Merck (Darmstadt)
NucleoSpin Gel and PCR Clean-up	Macherey-Nagel (Düren)
OneTaq QuickLoad® 2xMM w/Std Buffer	New England Biolabs (Ipswich)
Orange G	Sigma (Taufkirchen)
pENTR Directional TOPO Cloning Kit	Invitrogen (Karlsruhe)
PfuUltra HF DNA-Polymerase	Stratagene (Heidelberg)
Macherey-Nagel NucleoBond Xtra Maxi-Kits	Macherey-Nagel (Düren)
QuikChange II Site Directed Mutagenesis Kit	Agilent (Santa Clara)
RNase A	Invitrogen (Karlsruhe)
Taq Polymerase	PeqLab (Darmstadt)

3.2. Materialien für proteinbiochemische Arbeiten

Tabelle 2: Verwendete Materialien für proteinbiochemische Arbeiten und Angabe des Herstellers

Protease-Inhibitoren und Detergenzien

Complete Mini PhosSTOP Tabletten	Roche (Mannheim)
Complete Mini Protease Inhibitor Cocktail Tabletten	Roche (Mannheim)
Natrium-Deoxycholat (DOC)	Sigma (Taufkirchen)

SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE) / Western-Blot:

Acrylamid/Bisacrylamid (AA/BAA 30%; 37,5:1)	Biorad (München)
Ammoniumpersulfat (APS)	Sigma (Taufkirchen)
Bromphenolblau	Merck (Darmstadt)
Dithiothreitol (DTT)	Invitrogen (Karlsruhe)
Immobilon Western-Chemiluminescent HRPsubstrate	Merck (Darmstadt)
Isopropanol (C ₃ H ₈ O)	Merck (Darmstadt)
Magermilchpulver für Western-Blotting	Karl Roth (Karlsruhe)
Methanol (CH ₃ OH)	Merck (Darmstadt)
N,N,N',N'-Tetramethylethyldiamin (TEMED; C ₆ H ₁₆ N ₂)	Sigma (Taufkirchen)
PageRuler Plus Prestained Protein Ladder	Invitrogen (Karlsruhe)
Polyoxyethylen Sorbitan Monolaurat (Tween 20)	Sigma (Taufkirchen)
Restore™ Western-Blot Stripping Puffer	Thermo Scientific (Bonn)
Trans-Blot Turbo 5x Transfer Buffer	Biorad (München)

3.3. Materialien für zellbiologische Methoden

Tabelle 3: Verwendete Materialien für zellbiologische Methoden und Angabe des Herstellers

Zellkultur

Dulbecco's modifiziertes Eagle Medium (DMEM) mit L-Glutamin	Gibco (Karlsruhe)
F-12 Nutrient Mixture (Ham)	Gibco (Karlsruhe)
Fötales Rinderserum (FBS)	Sigma (Taufkirchen)
Kaliumchlorid (KCl)	Merck (Darmstadt)
Kaliumdihydrogenphosphat (KH ₂ PO ₄)	Merck (Darmstadt)
Natriumdihydrogenphosphat (Na ₂ HPO ₄)	Sigma (Taufkirchen)
Penicillin/Streptomycin (100 U/mL / 100 mg/mL)	Invitrogen (Karlsruhe)
TrypLE Express	Gibco (Karlsruhe)

Transfektion

Lipofectamine 2000	Invitrogen (Karlsruhe)
Opti-MEM I serumreduziertes Medium mit GlutaMAX I	Gibco (Karlsruhe)
TurboFect Transfection Reagent	Invitrogen (Karlsruhe)

Immunfluoreszenzfärbungen

Bovine Serum Albumin (BSA)	Invitrogen (Karlsruhe)
Molecular Probes NucBlue Fixed Cell ReadyProbes Reagenz (DAPI)	Invitrogen (Karlsruhe)
Paraformaldehyd (PFA)	Sigma (Taufkirchen)
Ziegen-Serum	Sigma (Taufkirchen)

3.4. Sonstige Chemikalien

Tabelle 4: Sonstige in dieser Arbeit verwendete Chemikalien

2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl)-ethansulfonsäure (HEPES)	Gibco (Karlsruhe)
Calciumchlorid (CaCl ₂)	Merck (Darmstadt)
Chlorwasserstoffsäure (HCl)	Merck (Darmstadt)
Ethanol (C ₂ H ₅ OH)	Merck (Darmstadt)
Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA)	Merck (Darmstadt)
Glycerol (C ₃ H ₈ O ₃)	Karl Roth (Karlsruhe)
Magnesiumchlorid (MgCl ₂)	Roth (Karlsruhe)
Magnesiumsulfat (MgSO ₄)	Merck (Darmstadt)
Natriumchlorid (NaCl)	Karl Roth (Karlsruhe)
Natriumhydroxid (NaOH)	Merck (Darmstadt)
Nonidet P-40 (NP-40)	ICN (Eschwege)
SDS (Natriumdodecylsulfat)	Karl Roth (Karlsruhe)
Trizma Base (Tris; C ₄ H ₁₁ NO ₃)	Sigma (Taufkirchen)

3.5. Geräte- und Verbrauchsmaterialien

Tabelle 5: Verwendete Gerätschaften und Verbrauchsmaterialien und Angabe des Herstellers

6-Well-Zellkulturschalen	Sarstedt (Nümbrecht)
Absaugsystem mit Vakuumpumpe VACUSAFE	INTEGRA Biosciences GmbH (Biebertal)
Autoklav <i>Evo 150</i>	MediTech Service GmbH (Norderstedt)
Brutschrank	Heraeus (Hanau)
ChemiDoc <i>MP Imaging System</i>	BioRad (Feldkirchen)
EPOCH Microplate Spectrophotometer	BioTek (Bad Friedrichshall)
Fluoreszenzmikroskop <i>ApoTome</i>	Carl Zeiss AG (Oberkochen)
Fluoreszenzmikroskop <i>Axiovert 40 CFL, HBO 50, MBQ 52 AC</i>	Carl Zeiss Microscopy GmbH (Göttingen)
Gelelektrophoresekammer <i>Sub-Cell GT</i>	BioRad (Feldkirchen)
Glasdeckgläschen	Marienfeld (Lauda-Königshofen)
Heizblock <i>Typ: 52526101</i>	Liebisch (Bielefeld)
Kühlzentrifuge <i>5417R</i>	Eppendorf (Hamburg)
Kunststoff-Tubes (1,5 mL Eppi)	Sarstedt (Nümbrecht)

Kunststoff-Tubes (15 mL und 50 mL Falcon)	Sarstedt (Nümbrecht)
Magnetrührer <i>Heidolph MR 3000</i>	Scientific Industries (New York)
Objekträger	Marienfeld (Lauda-Königshofen)
Parafilm	Bemis (Braine L'Alleud)
PCR-Cycler <i>Professional Thermocycler</i>	Biometra (Jena)
PCR-Cycler <i>Professional Trio Thermocycler</i>	Analytik Jena (Jena)
PCR-Tubes (0,5 mL)	Sarstedt (Nümbrecht)
Petrischalen	Sarstedt (Nümbrecht)
pH-Meter <i>pH 526</i>	WTW (Weilheim)
PIPETBOY <i>acu</i>	INTEGRA Biosciences GmbH (Biebertal)
Pipetten Finnpipetten	Thermo Labsystems (Mannheim)
Pipetten <i>Research Plus</i>	Eppendorf (Hamburg)
Polystyrol-Zellkulturschalen (Ø 10 cm)	Sarstedt (Nümbrecht)
Immun-Blot PVDF (Polyvinylidendifluorid) Membrane	Biorad (München)
Sequencer <i>3500 Genetic Analyzer</i>	Applied Biosystems (Foster City)
Spannungsgeber <i>Power Pac 300</i>	BioRad (Feldkirchen)
Sterilwerkbank <i>HERA safe Typ 12/2, 1995</i>	Heraeus (Hanau)
Sterilwerkbank <i>Lamin Air Instruments</i>	Heraeus (Hanau)
Thermomixer <i>compact</i>	Eppendorf (Hamburg)
Tischzentrifuge <i>Biofuge Pico</i>	Heraeus (Hanau)
Trans-Blot Turbo Blotter	BioRad (Feldkirchen)
Trans-Blot Turbo Midi-Size LF PVDF Membrane	Biorad (München)
Trans-Blot Turbo Midi-Size Transfer Stacks	Biorad (München)
Überkoprotator <i>RS-60 Tube Rotator</i>	BioSan (Riga)
UV-Transilluminator <i>UVT-28M</i>	Herolab (Wiesloch)
Vortex-Gerät <i>Vortex Genie 2 Heidolph Reax 2000</i>	Scientific Industries (New York)
Waage <i>PFB</i>	Kern (Balingen)
Wasserbad <i>GFL 1083</i>	GFL (Burgwedel)
Whatman-3MM-Chromatographie-Papier	Whatman (Kent)
Zentrifuge <i>Biofuge pico</i>	Heraeus (Hanau)

3.6. Bakterienstämme und Zelllinien

Tabelle 6: Auflistung der verwendeten Bakterienstämme und Zelllinien

Es sind jeweils die Bezeichnung, die Eigenschaften und die Herkunft der verwendeten Bakterienstämme und Zelllinien angegeben.

	Bezeichnung	Genotyp und Eigenschaften	Herkunft
Bakterienstämme	<i>E. coli</i> DH10B	F– mcrA Δ(mrr-hsdRMS-mcrBC) φ80lacZΔM15 ΔlacX74 recA1 endA1 araD139 Δ(ara-leu)7697 galU galK λ– rpsL(StrR) nupG	Invitrogen (Karlsruhe)
	<i>E. coli</i> TOP10	F– mcrA Δ(mrr-hsdRMS-mcrBC) φ80lacZΔM15 ΔlacX74 recA1 araD139 Δ(ara-leu)7697 galU galK λ– rpsL(StrR) endA1 nupG	Invitrogen (Karlsruhe)
	<i>E. coli</i> JM109	<i>endA1, recA1, gyrA96, thi, hsdR17</i> (rk–, mk+), <i>relA1, supE44, Δ(lac-proAB)</i> , [F' <i>traD36, proAB, lacIqZΔM15</i>]	Promega (Mannheim)
	<i>E. coli</i> XL1-Blue	<i>endA1 gyrA96(nalR) thi-1 recA1 relA1 lac</i> <i>glnV44 F'[::Tn10 proAB+ lacIq Δ(lacZ)M15]</i> <i>hsdR17(rK- mK+)</i>	Stratagene (Heidelberg)
Zelllinien	HEK293T	Humane embryonale Zellen aus der Niere, adhärent, epitheliale Morphologie, Derivat der HEK293 Zelllinie	ATCC (Manassas)
	CHO-K1	Adhärenente Fibroblasten (Chinesischer Hamster), Ovarien	DSMZ (Braunschweig)

3.7. Plasmide

3.7.1. Ausgangsvektoren zur Herstellung neuer Konstrukte

Tabelle 7: Verwendete Ausgangsvektoren zur Herstellung neuer Konstrukte für die Expression in eukaryotischen Zellen

Es sind jeweils der Name, die Eigenschaften und die Herkunft der verwendeten Ausgangsvektoren angegeben.

	Bezeichnung	Eigenschaften	Herkunft
Expression in Eukaryonten	pMT2SM-HA	Amp ^r , HA-Epitop	Reza M. Ahmadian (Düsseldorf)
	pFLAG-CMV4	Amp ^r , Neo ^r , FLAG-Epitope	Sigma (Taufkirchen)
	pRK5-myc	Amp ^r , myc-Epitop	AG Kutsche (Hamburg)
Gateway-Vektoren	pENTR/D-TOPO	Km ^r , <i>attL1</i> und <i>attL2</i> sites	Invitrogen (Karlsruhe)
	pFLAG-CMV4-Dest	Amp ^r , FLAG-Epitop, <i>attR1</i> und <i>attR2</i> sites	Georg Rosenberger (Hamburg)
	pRK5-myc-Dest	Amp ^r , myc-Epitop, <i>attR1</i> und <i>attR2</i> sites	AG Kutsche (Hamburg)
	pEGFP-C3-Dest	Km ^r , N-terminales EGFP-Fusionsprotein, <i>attR1</i> und <i>attR2</i> sites	AG Kutsche (Hamburg)

3.7.2. Hergestellte Konstrukte

Tabelle 8: Übersicht über die verwendeten Konstrukte für die Expression in eukaryotischen Zellen

Die Klonierung dieser Konstrukte erfolgte mittels der In-Fusion-Klonierung und der ortsspezifischen Mutagenese. Angegeben sind jeweils der Name des hergestellten Konstrukts, die zur Vervielfältigung durch eine PCR verwendeten Oligonukleotide und das Template für die PCR. Die Sequenzen der verwendeten Oligonukleotide sind in Kapitel 3.9.1 nachzulesen. Die enthaltene Kodierregion des klonierten Gens hat die mRNA-Referenznummer NM_033644.

Bezeichnung	Oligonukleotide	Template für die PCR	Herstellungsmethode
pMT2SM-HA-FBXW11 ^{G229R}	FBXW11_QC_G229R_F FBXW11_QC_G229R_R	pMT2SM-HA-FBXW11 ^{WT}	Ortsspezifische Mutagenese
pMT2SM-HA-FBXW11 ^{R350W}	FBXW11_QC_R350W_F FBXW11_QC_R350W_R	pMT2SM-HA-FBXW11 ^{WT}	
pMT2SM-HA-FBXW11 ^{E431K}	FBXW11_QC_E431K_F FBXW11_QC_E431K_R	pMT2SM-HA-FBXW11 ^{WT}	
pMT2SM-HA-FBXW11 ^{S367F}	FBXW11_InF-HA_F FBXW11_InF-HA_R	pEGFO-C1-FBXW11 ^{S367F}	In-Fusion-Klonierung

Tabelle 9: Übersicht über die mittels der Gateway-Technologie hergestellten Konstrukte für die Expression in eukaryotischen Zellen

Für die Eingangskonstrukte sind jeweils der Name des Konstrukts, die zur Vervielfältigung durch PCR verwendeten Oligonukleotide und das Template für die PCR angegeben. Die Sequenzen der Oligonukleotide sind in Kapitel 3.9.1 aufgeführt. Die PCR-Produkte wurden jeweils aufgereinigt und mit Hilfe einer Topoisomerasereaktion in den Vektor pENTR/D-TOPO kloniert (Eingangskonstrukte). Die Zielkonstrukte wurden über eine LR-Reaktion hergestellt. Es sind jeweils der Name und das Ausgangskonstrukt angegeben. Die enthaltene Kodierregion des klonierten Gens hat die mRNA-Referenznummer NM_033644.

	Bezeichnung	Herstellung	
		Oligonukleotide	Template (NCBI)
Eingangskonstrukte	pENTR/D-TOPO-FBXW11 ^{WT}	FBXW11_pENTR_F FBXW11_pENTR_R	pMT2SM-HA-FBXW11 ^{WT}
	pENTR/D-TOPO-FBXW11 ^{G229R}	FBXW11_pENTR_F FBXW11_pENTR_R	pMT2SM-HA-FBXW11 ^{G229R}
	pENTR/D-TOPO-FBXW11 ^{R350W}	FBXW11_pENTR_F FBXW11_pENTR_R	pMT2SM-HA-FBXW11 ^{R350W}
	pENTR/D-TOPO-FBXW11 ^{S367F}	FBXW11_pENTR_F FBXW11_pENTR_R	pMT2SM-HA-FBXW11 ^{S367F}
	pENTR/D-TOPO-FBXW11 ^{E431K}	FBXW11_pENTR_F FBXW11_pENTR_R	pMT2SM-HA-FBXW11 ^{E431K}

	Bezeichnung	Herstellung
Zielkonstrukte	pEGFP-C3-Dest- FBXW11 ^{WT}	LR-Reaktion zwischen pENTR/D-TOPO-FBXW11 ^{WT} und pEGFP-C3-Dest
	pEGFP-C3-Dest- FBXW11 ^{G229R}	LR-Reaktion zwischen pENTR/D-TOPO-FBXW11 ^{G229R} und pEGFP-C3-Dest
	pEGFP-C3-Dest- FBXW11 ^{R350W}	LR-Reaktion zwischen pENTR/D-TOPO-FBXW11 ^{R350W} und pEGFP-C3-Dest
	pEGFP-C3-Dest- FBXW11 ^{S367F}	LR-Reaktion zwischen pENTR/D-TOPO-FBXW11 ^{S367F} und pEGFP-C3-Dest
	pEGFP-C3-Dest- FBXW11 ^{E431K}	LR-Reaktion zwischen aus pENTR/D-TOPO-FBXW11 ^{E431K} und pEGFP-C3-Dest

3.7.3. Nicht in dieser Arbeit hergestellte Konstrukte

Tabelle 10: Übersicht über verwendete Konstrukte, welche nicht in dieser Arbeit hergestellt wurden

Angegeben sind jeweils der Name des Konstrukts, die Eigenschaften des Plasmids, die enthaltene Kodierregion des klonierten Gens mit mRNA-Referenznummer und die Herkunft.

Bezeichnung	Eigenschaften	Gen und mRNA-Referenznummer	Herkunft
pFLAG-CMV4-Dest-TWIST1	Amp ^r , FLAG-Epitop	NM_000474.4 Codonoptimiert (GeneArt)	AG Kutsche (UKE)
pRK5-myc-Dest-TWIST1	Amp ^r , myc-Epitop	NM_000474.4 Codonoptimiert (GeneArt)	AG Kutsche (UKE)
pEGFP-C1-FBXW11 ^{S367F}	Km ^r , N-terminales EGFP-Fusionsprotein	NM_033644.2	AG Kutsche (UKE)
pMT2SM-HA-FBXW11 ^{WT}	Amp ^r , HA-Epitop	NM_033644.2	AG Kutsche (UKE)

3.8. Antikörper

Tabelle 11: Übersicht über die in dieser Arbeit verwendeten Primär- und Sekundärantikörper

Es sind der jeweils der Name, das Immunogen, der Wirtsorganismus für die Herstellung des Antikörpers und die Bezugsfirma angegeben. Die jeweils verwendete Verdünnung ist für Western-Blot (WB) oder Immunfluoreszenz (IF) angegeben. Für Sekundärantikörper ist zusätzlich das Konjugat beschrieben.

	Bezeichnung	Antigen	Spezies	Eingesetzte Verdünnung	Hersteller und Produktnummer
Primärantikörper	Anti-GFP	GFP-Tag	Maus	WB 1:5000	BioLegend (San Diego) #902601
	Anti- α -Tubulin	α -Tubulin	Kaninchen	WB 1:10000	Abcam (Cambridge) #ab4074
	Anti-GAPDH	GAPDH	Maus	WB 1:10000	Abcam (Cambridge) #ab8245
	Anti-HA	Hämagglutinin des humanen Influenzavirus	Kaninchen	IF 1:300	Sigma (Taufkirchen) #H6908
	Anti-myc	myc-Tag	Maus	IF 1:5000	Cell Signaling Technology (Frankfurt am Main) #cs2276s

	Bezeichnung	Antigen	Konjugat	Hergestellt in	Eingesetzte Verdünnung	Hersteller
Sekundärantikörper	Anti-Maus-HRP	Maus Immunglobuline	Meerrettich-peroxidase	Schaf	WB 1:5000	Sigma (Taufkirchen)
	Anti-Kaninchen-HRP	Kaninchen Immunglobuline	Meerrettich-peroxidase	Ziege	WB 1:10000	Sigma (Taufkirchen)
	Anti-myc-HRP	myc-Tag	Meerrettich-peroxidase	Maus	WB 1:5000	Roche (Basel) #11814150001
	Anti-HA-HRP	Hämagglutinin des humanen Influenzavirus	Meerrettich-peroxidase	Ratte	WB 1:40000	Roche (Mannheim) #12013819001
	Anti-FLAG-HRP	Synthetisches FLAG-Peptid	Meerrettich-peroxidase	Ratte	WB 1:20000	Sigma (Taufkirchen) #A8592
	Alexa Fluor 546 (Anti-Maus)	Maus Immunglobuline	Alexa Fluor 546	Ziege	IF 1:1000	Invitrogen (Karlsruhe) #A11003
	Alexa Fluor 488 (Anti-Kaninchen)	Kaninchen Immunglobuline	Alexa Fluor 488	Ziege	IF 1:1000	Invitrogen (Karlsruhe) #A11008

3.9. Oligonukleotide

Die Oligonukleotide (Primer) wurden von der Firma Sigma (Taufkirchen) bezogen und haben eine Konzentration von 100 pmol/μL. Aliquots dieser Stammlösungen wurden anschließend auf 10 pmol/μL mit HPLC-H₂O verdünnt und in die PCR- und Klonierungsreaktionen eingesetzt.

3.9.1. Oligonukleotide für Klonierungen

Tabelle 12: Verwendete Oligonukleotide für Klonierungen

Es sind die Bezeichnung der Oligonukleotide, die Oligonukleotidsequenz und der Verwendungszweck angegeben.

	Bezeichnung	Oligonukleotidsequenz 5'→3'
Gateway-Klonierung	FBXW11_pENTR_F	CACCATGGAGCCCGACTCGGTGA
	FBXW11_pENTR_R	TTATCTAGAGATGTAAGTGTATGTTCTG
In-Fusion-Klonierung	FBXW11_InF-HA_F	TCGACCCGGGCGGCCGCTATGGAGCCCGACTCGGTGA
	FBXW11_InF-HA_R	TTCTCTAGACTCGAGGTACCTTATCTAGAGATGTAAGTGATG
Ortsspezifische Mutagenese	FBXW11_QC_G229R_F	GTAACAGTAGACACGTTTACTATTTTCAGAGCGGCACT
	FBXW11_QC_G229R_R	AGTGCCGCTCTGAAAATAGTAAACGTGTCTACTGTTTA
	FBXW11_QC_R350W_F	TGACGGCAGCCCAGTGGCCAACCAG
	FBXW11_QC_R350W_R	CTGGTTGGCCACTGGGCTGCCGTCA
	FBXW11_QC_E431K_F	GATGCATCGGACCAATTTTTCATGTCCCTCTAGGA
	FBXW11_QC_E431K_R	TCCTAGAGGGACATGAAAAATTGGTCCGATGCATC

3.9.2. Oligonukleotide für Sequenzierungen

Tabelle 13: Verwendete Oligonukleotide für Sequenzierungen

Es sind die Bezeichnung der Oligonukleotide sowie die Oligonukleotidsequenz angegeben.

Bezeichnung	Oligonukleotidsequenz 5'→3'
FBXW11_R1	CCTCTTTCTGGAGACGATCAC
FBXW11_R2	GTTCAATCAGCTTCTTCCAAAGC
FBXW11_F2	GACATATTA ACTCTTACCTGAAGC
FBXW11_F3	CAACTTGCAGAGGATTCAGTGC
FBXW11_F4	CTTTACGCCGTGTCCTGGTT
FBXW11_F5	CAGCAAGCACATTGTGTTTGCG

3.10. Medien und Zusätze

3.10.1. Medien und Zusätze für molekularbiologische Arbeiten

LB-Medium 10 g Bacto Tryptone
 5 g Hefeextrakt
 10 g NaCl
 ad 1 L mit ddH₂O, pH 7,0
 Je nach Bedarf Antibiotikum hinzugeben

LB-Agar 10 g Bacto Tryptone
 5 g Hefeextrakt
 10 g NaCl
 15 g Agar (für Festmedien)
 ad 1 L mit ddH₂O, pH 7,0
 Je nach Bedarf Antibiotikum hinzugeben

SOC-Medium 20 g Bacto Tryptone
 5 g Hefeextrakt
 0,5 g NaCl
 ad 970 mL mit ddH₂O auffüllen, pH 7,0
 + 10 mL 40% D-Glucose (steril filtriert)
 + 10 mL 1 M MgSO₄ (steril filtriert)
 + 10 mL 1 M MgCl₂ (steril filtriert)

Antibiotikakonzentrationen für *E. coli*-Medien
Ampicillin: 1 mL pro 1000 mL von Stocklösung (250 mg/mL in ddH₂O)
Kanamycin: 1 mL pro 1000 mL von Stocklösung (25 mg/mL in ddH₂O)

3.10.2. Medien und Zusätze für zellbiologische Arbeiten

Vollmedium DMEM oder F12-Medium
10% (v/v) FBS
1% (v/v) Penicillin/Streptomycin

3.11. Puffer und Lösungen

3.11.1. Puffer und Lösungen für molekularbiologische Arbeiten

3.11.1.1. Isolierung von Plasmid-DNA aus *E. coli* (Mini-Präparation)

Lösung I
50 mM D-Glucose
10 mM EDTA
25 mM Tris-HCl
pH 8,0 in ddH₂O

Lösung II
0,2 M NaOH
1 % (w/v) SDS
in ddH₂O

Lösung III
3 M Kaliumacetat
11,5 % (v/v) Eisessig
in ddH₂O

TE/RNase-Puffer 100 μ L/mL RNase A in 1x TE

1x TE
10 mM Tris
1 mM EDTA
pH 7,5, in ddH₂O

3.11.1.2. Agarose-Gelelektrophorese

10x TBE: 890 mM Tris
 890 mM Borsäure
 20 mM EDTA
 pH 8,0, in ddH₂O

Ladepuffer 25 mL 1x TBE
 25 mL Glycerol
 ~20 mg Orange G
 in ddH₂O

3.11.2. Puffer und Lösungen für proteinbiochemische Arbeiten

3.11.2.1. Zelllyse

**mRIPA-
Puffer** 50 mM HEPES pH 7,5
 150 mM NaCl
 1% (v/v) NP-40
 0,5 % (w/v) DOC (Natrium-Deoxycholat)
 0,05 % (w/v) SDS
 1 mM EDTA
 in ddH₂O
 +1 Tablette Complete Mini Protease Inhibitor
 Cocktail auf 10 mL Puffer
 +1 Tablette Complete Mini PhosSTOP auf 10 mL
 Puffer

1x PBS +/- 0,9 mM CaCl₂
 0,52 mM MgCl₂
 0,16 mM MgSO₄
 in 1x PBS -/-

3.11.2.2. SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE)

4x Trenngelpuffer	2 g	SDS
	91 g	Tris
	ad 500 mL ddH ₂ O, pH 8,8 mit H ₃ PO ₄ eingestellt	
4x Sammelgelpuffer	2 g	SDS
	30,3 g	Tris
	ad 500 mL ddH ₂ O, pH 6,8 mit H ₃ PO ₄ eingestellt	
4x Lämmli-puffer (Ladepuffer)	0,01 % (v/v)	Bromphenolblau
	33 % (v/v)	Glycerol
	6,7 % (w/v)	SDS
	0,3 M	DTT
	80 mM	Tris-HCl
		pH 6,8
10x SDS-Laufpuffer	288,4 g	Glycin
	40 g	SDS
	60,6 g	Tris
		ad 2 L ddH ₂ O, pH 8,3
Sammelgel (5%)	3,9 mL	ddH ₂ O
	1,7 mL	4x Sammelgelpuffer
	1,2 mL	30% Acrylamid/Bisacrylamid (37,5:1)
	6,3 µL	TEMED
	125 µL	10% (w/v) APS in ddH ₂ O

Trenngel (12,5%)	3,3 mL	ddH ₂ O
	2,5 mL	4x Sammelgelpuffer
	4,2 mL	30% Acrylamid/Bisacrylamid (37,5:1)
	6,3 µL	TEMED
	215 µL	10% (w/v) APS in ddH ₂ O

3.11.2.3. Western-Blot

Transferpuffer	25 mM	Tris
	150 mM	Glycin
	10 % (v/v)	Methanol
		in ddH ₂ O, pH 8,3

10x TBST	1,5 M	NaCl
	200 mM	Tris-HCl
		in ddH ₂ O, pH 7,4 (mit rauchender HCl einstellen)
	1 % (v/v)	Tween 20

1x mTBST (Blockierungslösung/ Antikörperlösung)	5% (w/v)	Milchpulver
		in 1x TBST

3.11.3. Puffer und Lösungen für zellbiologische Arbeiten

3.11.3.1. Zellkultur

10x PBS -/-	2 g	KCl
	2,4 g	KH ₂ PO ₄
	80 g	NaCl
	14,4 g	Na ₂ HPO ₄
		ad 1 L ddH ₂ O

3.11.3.2. Immunfluoreszenzanalysen

Hochsalz-PBS +/-	500 mM NaCl in PBS +/-
PFA-Lösung	4 % (w/v) Paraformaldehyd (PFA) in 1x PBS +/- sterilfiltrieren
Blockierungslösung	2 % (w/v) BSA 3 % (v/v) Ziegen-Serum 0,5 % (v/v) NP-40 in 1x PBS +/-
Antikörperlösung	3 % (v/v) Ziegen-Serum 0,1 % (v/v) NP-40 in 1x PBS +/-

3.12. Software und Datenbanken

Tabelle 14: Computerprogramme und bioinformatische Datenbanken

Die Anwendung der verwendeten Datenbanken und Software ist angegeben.

Datenbanken	Typ	Anwendung
ENSEMBLE (The European Bioinformatics Institute and Genome Research)	Datenbank	Sequenzabgleich
NCBI (National Center for Biotechnology Information) – PubMed, BLAST	Datenbank	Literaturrecherche, Sequenzabgleich
Image J	Software	Bildentwicklung für Western-Blot- und Immunfluoreszenz-Aufnahmen
EditSeq (Dnastar)	Software	Editieren von DNA-Sequenzen
SeqMan (Dnastar)	Software	Auswertung von DNA-Sequenzen
Chromas 2.3.	Software	Editieren von DNA-Sequenzchromatogrammen
DIGI CAM Digital Camera Control	Software	Dokumentation von Agarosegelen
Axiovision 4.8.2	Software	Fluoreszenzmikroskopie

4. Methoden

4.1. Molekularbiologische Methoden

4.1.1. Transformation chemisch kompetenter *E. coli*-Zellen mit Plasmid-DNA

Für die Transformation nach *E. coli* wurden 100 µL kompetente *E. coli*-Zellen langsam auf Eis aufgetaut und mit einer von der Klonierungs-Methode abhängigen Menge des Klonierungsansatzes versetzt. Es folgte eine 30-minütige Inkubation auf Eis, ein 90-sekündiger Temperaturschock bei 42°C und eine 5-minütige Abkühlung auf Eis. Hiernach wurden 700 µL SOC-Medium den Zellen hinzugefügt, und anschließend wurde die Suspension für 1 h bei 37°C (*E. coli* DH10B, XL1-Blue und TOP10) oder 30°C (*E. coli* JM109) im Thermomixer inkubiert. Danach wurde der gesamte Ansatz in unterschiedlichen Aliquots auf zwei selektive LB-Agarplatten ausplattiert: Erst wurden 100 µL der Suspension entnommen und ausplattiert. Die übrige Suspension wurde für eine Minute bei 14000 rpm zentrifugiert. Der Überstand wurde größtenteils verworfen. Das Pellet wurde in etwa 100 µL verbleibendem SOC-Medium resuspendiert, und anschließend wurde ein Vollausschlag auf selektiven LB-Agarplatten mit entsprechendem Antibiotikum durchgeführt und über Nacht bei 37°C (*E. coli* DH10B, XL1-Blue und TOP10) oder 30°C (*E. coli* JM109) im Brutschrank inkubiert.

4.1.2. Anzucht von *E. coli*-Kulturen

Für die Anzucht von *E. coli*-Kulturen wurden 2 mL LB-Medium mit dem entsprechenden Antibiotikum versetzt. Mit Hilfe einer sterilen Pipettenspitze wurde eine Einzelkolonie von einer Agar-Platte entnommen und durch Abwerfen in das Zellkulturrohrchen überführt. Diese Vorkultur wurde entweder ca. 6 h oder über Nacht bei 200 rpm im Schüttelinkubator inkubiert. Die Inkubation erfolgte für *E. coli* DH10B, XL1-Blue und TOP10 bei 37°C. Für *E. coli* JM109 erfolgte die Inkubation bei 30°C.

Für eine Maxi-Präparation diente die 2 mL-Vorkultur zur Animpfung von 200 oder 600 mL LB-Medium mit entsprechendem Antibiotikum. Diese Kultur wurde über Nacht in einem Schüttelkolben in einem Inkubator bei 37°C bzw. 30°C und 200 rpm inkubiert.

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

4.1.3.1. Mini-Präparation

Plasmid-DNA wurde für analytische Zwecke mittels der Mini-Präparations-Methode (Birnboim und Doly 1979) isoliert. Diese Methode beruht auf dem Prinzip der alkalischen Lyse. Für die Isolierung von Plasmid-DNA aus *E. coli* wurden 2 mL Übernachtskultur angezogen (Kapitel 4.1.2). 1,5 mL dieser Kultur wurden für 5 min bei 5000 rpm bei Raumtemperatur abzentrifugiert. Der Überstand wurde dekantiert und das Pellet in 100 µL Lösung I durch vortexen resuspendiert. Danach wurden 200 µL Lösung II hinzugegeben und die Lösung durch mehrmaliges Invertieren gemischt. Nach 5-minütiger Inkubation wurden 300 µL Lösung III hinzugegeben. Dies wurde gut vermischt und 10 min auf Eis inkubiert. Es folgte eine Zentrifugation für 5 min bei 14000 rpm bei Raumtemperatur. Der Überstand wurde in ein frisches Reaktionsgefäß überführt. Hiernach wurde die Plasmid-DNA durch Zugabe von 350 µL Isopropanol gefällt und erneut abzentrifugiert (5 min, 14000 rpm, Raumtemperatur). Der Überstand wurde verworfen. Um mitisolierte RNA abzubauen, wurde der Ansatz mit 100 µL TE/RNase-Puffer versetzt und 15 min bei 37°C inkubiert. Dann erfolgte eine erneute Präzipitation durch Zugabe von 120 µL 88% Isopropanol/0,2 M Kaliumacetat. Der Ansatz wurde gut geschüttelt und erneut zentrifugiert (5 min, 14000 rpm, Raumtemperatur). Der Überstand wurde sorgfältig abgenommen und das Pellet 10 min bei 37°C getrocknet. Die isolierte Plasmid-DNA wurde in 50 µL HPLC-H₂O resuspendiert und bei -20°C gelagert.

4.1.3.2. Maxi-Präparation

Zur Herstellung von größeren Mengen Plasmid-DNA mit höherem Reinheitsgrad als nach einer Mini-Präparation wurde das NucleoBond Xtra Maxi-Kit (Macherey-Nagel) verwendet. Die alkalische Lyse, Anionenaustauschchromatographie und DNA-Fällung wurde nach Herstellerangaben durchgeführt. Die verschiedenen Puffervolumina hingen dabei von den in Kapitel 4.1.2 beschriebenen verwendeten Kulturvolumina ab. Die gewonnene DNA wurde in ddH₂O gelöst, mit Hilfe des Epoch-Spektralphotometers auf eine Konzentration von 1 µg/µL eingestellt und anschließend bei -20°C gelagert.

4.1.4. Photometrische Konzentrationsbestimmung von Plasmid-DNA

Zum Überprüfen und Einstellen der Konzentration von Plasmid-DNA nach der Plasmidpräparation wurde diese im Epoch-Spektralphotometer (Biotek) durch Messung der Absorption bei 260 nm bestimmt. Die Messung erfolgte mit einer Take3-Multivolumenplatte, welche 16 Mikrosports für 2 μ L-Proben zur Mikrovolumenanalyse bereitstellt. Es wurde zudem die Absorption bei 280 nm bestimmt und der $A_{260/280}$ -Quotient bestimmt. Dieser gibt Aufschluss über die Reinheit der Präparation. Eine reine Präparation sollte einen Quotienten $A_{260/280}$ von etwa 1,8 aufweisen (A: Absorption).

4.1.5. Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

Die Polymerase-Kettenreaktion (PCR – *polymerase chain reaction*) ist ein *in vitro*-Verfahren, bei dem spezifische DNA-Abschnitte zyklisch synthetisiert werden. Die Spezifität wird erzielt durch die Hybridisierung von Starter-Oligonukleotiden (Primern), die jeweils zu einem Abschnitt der DNA revers komplementär sind. Mit Hilfe einer hitzestabilen DNA-Polymerase wird der komplementäre DNA-Strang hergestellt. Die PCR beruht auf einer Abfolge von repetitiven Reaktionszyklen: Bei der Denaturierung werden die DNA-Doppelstränge durch Hitze in einzelsträngige DNA-Stränge überführt. Es folgt die Hybridisierung (Annealing) der Oligonukleotid-Primer bei einer Annealing-Temperatur, die sich nach der Schmelztemperatur der Oligonukleotide richtet. Die Primer sind in ihrer Sequenz revers komplementär zu der 5'- bzw. 3'-Region des zu amplifizierenden DNA-Abschnitts. Während der Elongation bindet die DNA-Polymerase an die Primer und synthetisiert in 5'→3'-Richtung an beiden Einzelsträngen einen neuen Strang. Die Elongationszeit hängt dabei von der Größe des zu synthetisierenden DNA-Fragments ab. Anschließend werden die entstandenen Doppelstränge erneut denaturiert und es findet ein neuer Synthesezyklus statt. Die zu amplifizierende Sequenz wird so exponentiell angereichert.

Für die in dieser Arbeit durchgeführten Klonierungen wurden für die zu amplifizierenden Kodierregionen DNA-Polymerasen mit einer 3'-5'-Exonuklease-Aktivität verwendet, die dadurch eine Korrektoreigenschaft (*proofreading*) besitzen. Die für die einzelnen Klonierungstechniken verwendeten PCR-Reaktionsansätze und PCR-Programme sind unter der jeweiligen Klonierungstechnik in Kapitel 4.1.10 aufgeführt.

4.1.6. Agarose-Gelelektrophorese

Die Agarose-Gelelektrophorese ist eine Methode zur Trennung und Identifizierung von DNA-Fragmenten. Die DNA weist durch ihre Phosphatreste eine negative Gesamtladung auf und wandert dadurch im elektrischen Feld von der Kathode zur Anode. Die Wanderungsgeschwindigkeit ist dabei vom Agarosegehalt, der angelegten Spannung und der Fragmentgröße abhängig. Während große Moleküle sehr langsam durch das Gel ziehen, wandern kleinere Moleküle weit in das Gel hinein. Es besteht hierbei eine umgekehrte Proportionalität zum Logarithmus des Molekulargewichts. In dieser Arbeit wurden ausschließlich Agarosegele mit einer Konzentration von 1% (w/v) hergestellt. Hierfür wurde die benötigte Menge an Agarose in 1x TBE aufgekocht und unter stetigem Rühren abgekühlt, sodass der mit der DNA interkalierende Farbstoff Midori Green nach Herstellerangaben zur Detektion von Nukleinsäuren in Agarosegelen hinzugegeben werden konnte. Midori Green verstärkt die Emission in den Bereichen, in welchen sich die DNA befindet, wodurch diese später als Bande im Gel sichtbar wird. Das noch flüssige Gel wurde dann in einen mit Gelkämmen bestückten Gelschlitten gegossen, in dem es auspolymerisierte. Anschließend wurde das Gel in die Gelkammer gelegt, mit 1x TBE überflutet und die Gelkämme entfernt. Die entstehenden Geltaschen konnten nun mit Proben beladen werden. Dabei wurden diese mit einem Ladepuffer, der die Dichte der Proben so erhöht, dass diese tief in die Geltaschen sinken, versetzt. Bei Verwendung des 10x FastDigest Green Buffer musste kein zusätzlicher Ladepuffer hinzugegeben werden. Zudem wurde noch ein Größenstandard mit DNA-Fragmenten bekannter Größe in eine der Taschen aufgetragen. Es wurde eine Spannung angelegt, die von der Fragmentgröße und dem Agarosegehalt des Gels abhängt (hier: 160 V). Die Laufzeit belief sich auf ca. 1 h. Zum Schluss konnte die durch das Midori Green fluoreszierenden Nukleinsäuren im Gel unter UV-Licht sichtbar gemacht und ausgewertet werden. Die Größenbestimmung der aufgetrennten DNA-Fragmente erfolgte über einen Vergleich mit dem Größenstandard.

4.1.7. Zyklische DNA-Sequenzierung nach Sanger

Die DNA-Sequenzierung nach Sanger basiert auf der Kettenabbruchmethode (Sanger et al. 1977). Hierbei werden während der Sequenzierung eines DNA-Fragments neben dNTPs auch fluoreszenzmarkierte 2',3'-Dideoxyribonukleotide (ddNTPs) eingesetzt. ddNTPs fehlt im Gegensatz zu den dNTPs die 3'-Hydroxygruppe. Wird während der

DNA-Synthese ein ddNTP statt eines dNTPs in den entstehenden DNA-Strang eingebaut, so kann der Strang nicht weiter verlängert werden, da die 3'-Hydroxygruppe essenziell für die Ausbildung einer Phosphodiesterbrücke mit der Phosphatgruppe eines weiteren dNTPs oder ddNTPs wäre (Kettenabbruch). Der Einbau eines ddNTPs erfolgt zufällig, wodurch fluoreszenzmarkierte DNA-Fragmente unterschiedlicher Länge entstehen. Die vier ddNTPs sind hierbei mit verschiedenen Fluoreszenz-Farbstoffen markiert, die bei unterschiedlichen Wellenlängen Fluoreszenz emittieren. Die Fluoreszenz-Messung erfolgt elektronisch und wird digital zu einem Elektropherogramm verarbeitet. Die Sequenzierung diente in dieser Arbeit der Prüfung der Integrität von hergestellten Fusionskonstrukten und der Bestätigung von eingefügten Mutationen.

1x Sequenzierungs-Ansatz für Plasmid-DNA:

BigDye sequencing buffer	2 µL
BigDye Terminator v3.1 Ready Reaction Mix	1 µL
Plasmid-DNA	1 µL
Primer („Forward“)	0,5 µL
Primer („Reverse“)	0,5 µL
HPLC-H ₂ O	ad 10 µL

Die Sequenzierung läuft unter folgendem Programm im Thermocycler:

96°C	1 min	} 31 Zyklen
96°C	10 s	
55°C	5 s	
60°C	4 min	
72°C	4 min	

Die Sequenzierprodukte wurden anschließend durch eine Natriumacetat (NaAc)-Fällung aufgereinigt, um überschüssige dNTPs und ddNTPs zu entfernen.

1x Ansatz zur Aufreinigung des Sequenzierproduktes:

Ethanol (abs.)	125 µL
HPLC-H ₂ O	40 µL
Sequenzieransatz	20 µL
NaAc (3 M, pH 5,0-5,2)	5 µL

Dieser Ansatz wurde kurz gevortext und anschließend für 20 min bei 14000 rpm zentrifugiert. Der Überstand wurde dekantiert und das DNA-Pellet in 250 µL 70% Ethanol gewaschen. Es folgte eine fünfminütige Zentrifugation bei ebenfalls 14000 rpm. Der Überstand wurde verworfen und das Pellet bei 37°C für mindestens 10 min getrocknet. Abschließend wurden 20 µL Hi-Di Formamid zugegeben und das Sequenzierprodukt bei -20°C gelagert. Die Sequenzierung erfolgte mittels des Sequencer 3500 Genetic Analyzer (Applied Biosystems).

4.1.8. DNA-Restriktionsspaltung

Restriktionsendonukleasen binden an Erkennungssequenzen (meist an sogenannte palindromische DNA-Sequenzen), die je nach Enzym unterschiedlich sind. Typ-II-Restriktionsenzyme hydrolysieren die DNA unmittelbar in der Erkennungssequenz. Dabei erzeugen einige Restriktionsendonukleasen versetzte Schnitte mit kohäsiven Enden (*sticky ends*), andere hinterlassen nach der Spaltung glatte Enden (*blunt ends*). Im Rahmen dieses Projektes wurde Plasmid-DNA mit verschiedenen Restriktionsenzymen gespalten. Zum Nachweis des Inserts wurde ca. 1 µg Plasmid-DNA in den Restriktionsansatz eingesetzt.

1x Ansatz für die Restriktionsspaltung von Plasmid-DNA:

Plasmid-DNA (aus Mini-Präparation)	2 µL
10x FastDigest Green Buffer	2 µL
10x BSA	2 µL
Restriktionsenzym A	0,5 µL
Restriktionsenzym B	0,5 µL
HPLC-H ₂ O	ad 20 µL

Die Restriktionsspaltung erfolgte im Heizblock bei 37°C für die enzymespezifische Zeit nach Herstellerangaben. Es folgte gegebenenfalls eine Inaktivierung der Enzyme bei 80°C. In dieser Arbeit wurden Restriktionsendonukleasen zur Beurteilung des Spaltmusters und der Qualität der durch die DNA-Präparationen gewonnenen Plasmid-DNAs oder zur Linearisierung von Plasmiden für Klonierzwecke verwendet.

4.1.9. Aufreinigung von PCR- und Restriktionsprodukten

Um bei weiteren Arbeitsschritten störende Primer, Enzyme, Nukleotide oder kleinere DNA-Fragmente aus PCR- und Restriktionsprodukten zu entfernen, wurden die PCR- und Restriktionsprodukte mit Hilfe des NucleoSpin Gel und PCR Clean-up Kits (Macherey-Nagel) nach Herstellerangaben aufgereinigt. In dieser Arbeit wurden PCR-Produkte zunächst in einem Agarosegel auf Größe und Reinheit hin überprüft (5 µL PCR-Produkt + 5 µL Orange G). Der restliche Ansatz wurde direkt mit Hilfe des PCR-Clean-up Protokolls unter Herstellerangaben aufgereinigt. Restriktionsprodukte wurden dagegen in einem präparativen Agarosegel aufgetrennt und anschließend mit Hilfe des Gel Clean-up Protokolls aufgereinigt. Hierfür wurde die entsprechende Bande unter UV-Licht mit Hilfe eines Skalpellts ausgeschnitten. Anschließend wurde der Gelstreifen in einem Chaotrop unter Wärme aufgelöst. Die anschließende Aufreinigung von PCR- und Restriktionsprodukten basiert auf dem Prinzip der Adsorption der DNA an eine Silica-Membran unter Beisein von chaotropen Salzen, welche verhindern, dass die DNA in Lösung geht und die Bindung an die Matrix verstärken. Es folgten Waschschrirte mit ethanolischen und Hochsalz-Puffern. Die Elution der DNA erfolgte unter Niedrigsalzbedingungen.

4.1.10. Klonierungsstrategien zur Herstellung von Expressionskonstrukten

4.1.10.1. In-Fusion Klonierung

Mit Hilfe des In-Fusion HD Cloning Kits (Takara Bio) können über eine PCR generierte DNA-Fragmente in unterschiedliche Expressionsvektoren eingefügt werden. In dieser Arbeit diente ein Fusionskonstrukt mit gewünschtem Insert als Template für die PCR. Die zur Amplifikation des Inserts verwendeten Oligonukleotide besitzen einen ca. 15 bp langen Überhang am 5'-Ende, welcher revers komplementär zu den 3'-Enden des Zielvektors sind. Um die Ausbeute zu steigern, wurden zwei PCR-Ansätze angesetzt und nach der PCR-Reaktion zusammengeführt.

1x Ansatz für die PCR:

CloneAmp HiFi PCR Premix (1x)	12,5 µL
Primer („Forward“)	1 µL
Primer („Reverse“)	1 µL
Plasmid-DNA (~20 ng)	x µL
HPLC-H ₂ O	ad 25 µL

Die PCR läuft unter folgendem Programm im Thermocycler:

98°C	10 s	} 35 Zyklen
55°C	15 s	
72°C	2 min	

Der Zielvektor wurde währenddessen an der Insertionsstelle mit Hilfe von zwei Restriktionsendonukleasen linearisiert (Kapitel 4.1.8). Um die Ausbeute zu steigern, wurden drei Restriktionsansätze angesetzt und nach der Restriktionsspaltung zusammengeführt. Sowohl das PCR-Produkt als auch der linearisierte Zielvektor wurden elektrophoretisch auf Größe und Reinheit hin überprüft und anschließend mit Hilfe des NucleoSpin Gel und PCR Clean-up Kits (Macherey-Nagel) nach Herstellerangaben aufgereinigt. In der Klonierungsreaktion wurden die aufgereinigten DNAs (linearisierter Vektor und PCR-Produkt) zusammengeführt: Die 15 bp großen Überhänge werden vom im Kit enthaltenen In-Fusion Enzym (Rekombinase) erkannt und mit den komplementären Enden des Vektors fusioniert (Mülhardt 2013).

1x Ansatz für die InFusion-Klonierungsreaktion

5x In-Fusion HD Enzyme Premix	2 µL
Linearisierter Zielvektor (150 ng)	x µL
PCR-Produkt (50 ng)	x µL
HPLC-H ₂ O	Ad 10 µL

Die In-Fusion-Klonierungsreaktion wurde nach Herstellerangaben für 15 min auf Eis inkubiert. Es folgte eine Transformation des Klonierungsansatzes nach *E. coli*. Die aus Einzelklonen isolierte Plasmid-DNA wurde mittels Mini-Präparation und Restriktionsverdau sowie Sanger-Sequenzierung analysiert.

4.1.10.2. Ortsspezifische Mutagenese

Mit Hilfe des QuikChange II Site Directed Mutagenesis Kits (Agilent) wurde ein gezielter Austausch einer einzelnen Base in einer Wildtyp-Kodierregion nach Herstellerangaben durchgeführt. Hierfür diente ein Fusionskonstrukt mit Wildtyp-Insert als Template für die Mutagenese-PCR. Pro Mutation wurden zwei zueinander revers komplementäre, die zu mutierende Base umfassende Primer, welche die gewünschte Punktmutation aufweisen, erstellt. Die einzufügende Mutation lag dabei in der Mitte der Oligonukleotide, flankiert von ca. 10-15 Basen am 5'- und 3'-Ende. Durch die Komplementarität der Primer musste das gesamte Template-Konstrukt amplifiziert werden. Bei einem Einzelbasenaustausch umfasste die PCR nach Herstellerangaben 12 Zyklen, und die Dauer der Elongation war abhängig von der Größe des Plasmids. Demnach erfordert 1 kb Plasmid 1 Minute Elongation (hier für pMT2SM-HA-FBXW11^{WT}: 6,5 min).

1x Ansatz für die PCR:

10x PfuUltra HF DNA-Polymerase Buffer	5 µL
Primer („Forward“)	1,25 µL
Primer („Reverse“)	1,25 µL
dNTP Mix	1 µL
PfuUltra HF DNA-Polymerase	1 µL
Plasmid-DNA (~10 ng)	x µL
HPLC-H ₂ O	ad 50 µL

Die PCR läuft unter folgendem Programm im Thermocycler:

95°C	30 s	} 12 Zyklen
95°C	30 s	
55°C	1 min	
68°C	6,5 min	

Es entstehen das gesamte Template-Plasmid umfassende PCR-Produkte, die keine Methylgruppen tragen. Nach der Mutagenese-PCR wurde die methylierte, parentale Plasmid-DNA (Template-Konstrukt) mit Hilfe einer *DpnI*-Restriktionsspaltung gespalten, da dieses Restriktionsenzym methylierungssensitiv ist. Es folgte eine Transformation der neu amplifizierten Plasmid-DNA mit der gewünschten

Punktmutation nach *E. coli*. Die aus Einzelklonen isolierte Plasmid-DNA wurde mittels Mini-Präparation und Restriktionsverdau sowie Sanger-Sequenzierung analysiert.

4.1.10.3. Klonierung mittels der Gateway-Technologie

Die Klonierung mittels der Gateway-Technologie umgeht die Verwendung von Restriktionsenzymen und Ligasen. Die Methode beruht auf dem Rekombinationssystem des Bakteriophagen λ von *E. coli* (Landy 1989). Für die Klonierung mittels der Gateway-Technologie wurde das pENTR Directional TOPO Cloning Kit (Invitrogen) verwendet und nach Herstellerangaben durchgeführt.

In dieser Arbeit dienten Fusionskonstrukte mit dem gewünschten Insert als Template für die Erzeugung eines PCR-Produktes des zu klonierenden DNA-Fragmentes. Die zur Amplifikation des Inserts verwendeten PCR-Primer flankieren das Insert. Der Vorwärtsprimer besitzt jedoch noch vier zusätzliche Basen (CACC) am 5'-Ende. Diese vier Basen dienen als Erkennungssequenz für die Rekombination. Um die Ausbeute zu steigern, wurden drei PCR-Ansätze angesetzt und nach der PCR-Reaktion zusammengeführt.

1x Ansatz für die PCR:

10x PfuUltra HF DNA-Polymerase Buffer	2,5 μ L
Primer („Forward“)	1,0 μ L
Primer („Reverse“)	1,0 μ L
dNTP Mix	0,5 μ L
PfuUltra HF DNA-Polymerase	0,2 μ L
DNA-Template (30 μ g)	x μ L
HPLC-H ₂ O	ad 25 μ L

Die PCR läuft unter folgendem Programm im Thermocycler:

98°C	2 min	
98°C	10 s	} 35 Zyklen
55°C	15 s	
72°C	2 min	
72°C	4 min	

Die PCR-Produkte wurden durch eine Agarosegelelektrophorese auf Größe und Reinheit hin überprüft und anschließend mit Hilfe des NucleoSpin Gel oder PCR Clean-

up Kits (Macherey-Nagel) aufgereinigt. Es folgte das zielgerichtete Einfügen des PCR-Produktes (Inserts) mit CACC-Überhang zwischen die *attL*-Stellen des Gateway Entry-Vektors pENTR/D-TOPO. Das pENTR/D-TOPO-Plasmid wurde linearisiert und mit einer an den 3'-Phosphatgruppen kovalent gekoppelten Topoisomerase I vom Hersteller zur Verfügung gestellt. Wenn der Topoisomerase I-aktivierte Vektor mit dem PCR-Produkt inkubiert wird, vermittelt die Topoisomerase I die Rekombination und Ligation des PCR-Produktes in den Vektor. Hiernach wird die Topoisomerase I freigesetzt. Durch den CACC-Überhang wird das PCR-Produkt in gewünschter Orientierung eingefügt. Diese TOPO-Klonierungsreaktion fand nach Herstellerangaben für 20 min bei Raumtemperatur statt.

1x Ansatz für TOPO-Klonierungsreaktion:

PCR-Produkt	4,0 µL
TOPO-Vektor	1,0 µL
Salt Solution	1,0 µL

Es folgte eine Transformation des Ansatzes nach *E. coli*. Die aus Einzelklonen isolierte Plasmid-DNA wurde mittels Mini-Präparation und Restriktionsverdau sowie Sanger-Sequenzierung analysiert.

Aus dem Entry-Vektor pENTR/D-TOPO heraus ist die Rekombination des klonierten Inserts in verschiedene Zielvektoren mit entsprechenden *att*-Stellen über eine anschließende LR-Reaktion möglich. Hierbei werden die *attL*-Stellen der pENTR/D-TOPO-Konstrukte und die *attR*-Stellen des Destinationsvektors mittels der LR-Clonase II rekombiniert. Die LR-Rekombination wurde nach Herstellerangaben für 1 h bei 25°C im Heizblock inkubiert.

1x Ansatz für LR-Rekombination:

pENTR/D-TOPO	1,0 µL
pDest (Destinationsvektor)	1,0 µL
5x LR Clonase II Enzym Mix	2,0 µL
1x TE Puffer	6,0 µL

Anschließend wurde dem Reaktionsansatz 1 µL einer Proteinase K Lösung hinzugegeben. Es folgte eine Inkubation bei 37°C für 10 min. Neben dem Destinationsvektor mit dem gewünschten Insert können nach der LR-Clonase-

Reaktion noch nicht rekombinierte pENTR/D-TOPO-Plasmide vorliegen. Diese wurden im nächsten Schritt durch eine Restriktionsspaltung mit *EcoRV* eliminiert, da *EcoRV* ausschließlich im pENTR/D-TOPO schneidet. Es folgte eine Transformation nach *E. coli*. Die aus Einzelklonen isolierte Plasmid-DNA wurde mittels Mini-Präparation und Restriktionsverdau sowie Sanger-Sequenzierung analysiert.

4.2. Proteinbiochemische Methoden

4.2.1. Herstellung von Zelllysaten

HEK293T-Zellen wurden in 6-Well-Zellkulturschalen kultiviert, transfiziert und am nächsten Tag auf Eis mit 5 mL eiskaltem PBS+/+ gewaschen sowie anschließend mit 250 µL Lysepuffer (mRIPA) lysiert. Die Zellen wurden mit Hilfe eines Zellschabers von der Oberfläche abgeschabt, durch Pipettieren homogenisiert und in ein Reaktionsgefäß überführt. Es folgte eine Inkubationszeit von 10 Minuten auf Eis, um eine vollständige Lyse der Zellen zu erzielen. Anschließend wurden die Zelltrümmer und Zellkerne abzentrifugiert (14000 rpm, 4°C, 10 min). 75 µL des Überstandes wurden in ein frisches Reaktionsgefäß überführt, mit 25 µL 4x Lämmli-Ladepuffer versetzt und anschließend bei -20°C gelagert.

4.2.2. SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)

Die gelelektrophoretische Auftrennung von Proteinen nach ihrer Molekülmasse erfolgte unter denaturierenden Bedingungen mittels einer diskontinuierlichen, eindimensionalen Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (Laemmli 1970). Natriumdodecylsulfat (SDS) ist ein anionisches Detergens, welches die Zerstörung aller nicht-kovalenten Wechselwirkungen nativer Proteine und somit die Auflösung der Sekundär-, Tertiär- und Quartiärstruktur fördert. Zudem kommt es zur Ausbildung von SDS-Protein-Komplexen. Die stark negative Ladung des SDS ist proportional zum Molekulargewicht des Proteins und die spezifische Ladung der Proteine kann vernachlässigt werden. Als Trägermedium wird für das Gel Polyacrylamid verwendet. Durch Variation der Konzentration von Polyacrylamid können unterschiedliche Vernetzungsgrade des Gels erhalten werden. Die Wanderungsgeschwindigkeit der Proteine wird durch den Vernetzungsgrad des Gels und das Molekulargewicht des Proteins bestimmt. Zunächst wurde die Polyacrylamid-Lösung mit einer Konzentration von 12,5% angesetzt. Durch Zugabe des

Polymerisierungskatalysators TEMED und des Radikalbildners Ammoniumpersulfat (APS) polymerisiert die Lösung. Die Polyacrylamid-Lösung des Trenngels wurde zwischen zwei Glasplatten in einer Mini-Gelapparatur bis zu einer Höhe von ca. 4,5 cm gegossen und mit 200 µL Isopropanol beschichtet. Nach der Polymerisation wurde das Isopropanol sorgfältig entfernt und das Sammelgel bis zum Rand der Glasplatten gegossen und mit Probenkämme bestückt. Das weitporige Sammelgel dient der Fokussierung der Proteine vor der Auftrennung im Trenngel. Die Proteinproben (mit zugesetztem 4x Lämmli-Ladepuffer) wurden für 5 min bei 95°C aufgeköcht. Der Probenkamm wurde aus dem Sammelgel entfernt und 10-15 µL der Rohlysate in die entstehenden Taschen pipettiert. Um die Molekülmasse der Proteine in den Proben bestimmen zu können, wurde ein Proteingrößenstandard auf das Gel aufgetragen. Die anschließende elektrophoretische Auftrennung erfolgte in 1x SDS-Laufpuffer bei 90 V im Sammelgel und bei 160 V im Trenngel.

4.2.3. Western-Blot

Die Immobilisierung von Proteinen aus SDS-Gelen erfolgte auf eine Polyvinylidendifluorid- (PVDF) Membran (Western-Blot). Hierfür werden die negativ geladenen SDS-Protein-Komplexe durch ein elektrisches Feld (Elektroblot) aus dem Gel auf die Membran übertragen. Die PVDF-Membran wurde zunächst für etwa 30 s in 100%-igem Methanol aktiviert, um den Kontakt mit dem Transferpuffer (Trans-Blot Turbo 5x Transfer Buffer, Biorad) zu unterstützen und die Hydrophobie der Membran zu mindern. Anschließend wurde die Membran kurz im Transferpuffer äquilibriert und anschließend anodenseitig zwischen Whatman-Filterpapieren gelegt, die vorher ebenfalls in Transferpuffer getränkt wurden. Die Semi-Dry-Blot-Apparatur wurde folgendermaßen aufgebaut: Kathode – Whatman-Filterpapiere – SDS-Gel – PVDF-Membran – Whatman-Filterpapiere – Anode. Der Semi-Dry-Blot-Aufbau wurde zwischen zwei Graphit-Elektroden gelegt. Der Transfer erfolgte 30 min bei einer konstanten Stromstärke von 250 mA.

4.2.4. Immunologische Detektion immobilisierter Proteine auf PVDF-Membranen

Um unspezifische Proteinbindungsstellen auf der PVDF-Membran abzusättigen, wurde diese nach Durchführung des Western-Blots 1 h unter leichtem Schwenken in mTBST inkubiert. Die Inkubation aller verwendeten Antikörper erfolgte ebenfalls in mTBST. Zuerst erfolgte die Inkubation der Membran mit einem protein- bzw. peptidspezifischen Primärantikörper. Die Inkubation des Primärantikörpers erfolgte über Nacht bei 4°C auf einem Drehschüttler. Durch dreimaliges Waschen mit TBST für je 10 min wurden anschließend ungebundene Antikörper von der Membran entfernt. Es folgte die Inkubation mit einem Sekundärantikörper, der gegen den Primärantikörper gerichtet ist, für 1 h bei Raumtemperatur unter leichtem Schwenken. Anschließend wurde die Membran erneut jeweils dreimal in TBST für je 10 min gewaschen. Falls der Primärantikörper direkt Meerrettichperoxidase (HRP, „horseradish peroxidase“)-konjugiert war, wurde die Membran 1 h unter leichtem Schwenken bei Raumtemperatur mit diesem inkubiert und anschließend ebenfalls dreimal in TBST für je 10 min gewaschen. Die Identifikation der vom Antikörper markierten Proteine erfolgte über die Umsetzung eines Substrates durch HRP. Hierbei entsteht Chemilumineszenz. Das Substrat (Immobilon Western-Chemiluminescent HRP-substrate; ECL) wurde nach Anweisung des Herstellers direkt auf die Membran gegeben und die erzeugte Chemilumineszenz durch Exposition der Membran im ChemiDoc MP Imaging System dokumentiert.

In einigen Fällen mussten die Antikörper wieder von der Membran gewaschen werden. Dafür wurde die Membran 20 min mit TBST unter starkem Schwenken gewaschen, dann mit dem Restore Western-Blot Stripping Puffer für 20 min (ebenfalls unter starkem Schwenken) inkubiert und anschließend erneut 20 min in TBST unter leichtem Schwenken gewaschen. Auf diese Weise wurden gebundene Antikörper von der Membran entfernt und eine erneute Detektion durch andere Primär-Antikörper ermöglicht.

4.3. Zellbiologische Methoden

4.3.1. Zellkultur

4.3.1.1. Kulturbedingungen

HEK293T- und CHO-K1-Zellen wurden in sterilen Zellkulturschalen (\varnothing 10 cm) oder 6-Well-Zellkulturplatten in einem Begasungsbrutschrank bei konstanten 37°C, 5% CO₂-Zufuhr und 95% relativer Luftfeuchtigkeit kultiviert. Als Basis für die Nährstoffzufuhr diente den HEK293T-Zellen DMEM-Vollmedium und CHO-K1-Zellen F12-Vollmedium, um optimale Wachstumsbedingungen zu gewährleisten. Die Vollmedien wurden vor Benutzung in einem Wasserbad auf 37°C erwärmt. Um Kontaminationen möglichst zu vermeiden, erfolgte die Durchführung der zellbiologischen Methoden unter einer Sterilwerkbank. Die verwendeten Lösungen, Chemikalien und Materialien wurden steril bezogen oder bei 121°C autoklaviert. Vor der Verwendung unter der Sterilwerkbank wurden alle Materialien mit 70%-igem Ethanol desinfiziert. Vor der Durchführung aller zellbiologischer Methoden wurden die Zellen unter einem Phasenkontrastmikroskop auf Kontamination, Konfluenz und Vitalität untersucht.

4.3.1.2. Auftauen von Zellen

Sowohl HEK293T-Zellen als auch CHO-K1-Zellen wurden aus aliquotierten Kryokulturen (Lagerung bei -150°C) entnommen. Zum Auftauen wurden diese in einem Wasserbad bei 37°C erwärmt und in 8 mL vorgewärmtes Vollmedium überführt. Die Zellsuspension wurde für 5 min bei 300 rpm (Raumtemperatur) zentrifugiert. Der Überstand wurde abgesaugt und das Pellet in frischem Vollmedium (10 mL) resuspendiert und anschließend in eine Zellkulturschale überführt.

4.3.1.3. Passagieren von Zellen

Damit die Zellen für ihr Wachstum ausreichend Platz und Nährstoffe zur Verfügung haben, wurden die Zellen ab einer Konfluenz von ca. 80-90% etwa alle drei Tage in neue Zellkulturschalen überführt. Da die Zellen sich während der Kultivierung im Brutschrank am Boden der Zellkulturschale ab- und festsetzen, müssen die adhärennten Zellen mit Trypsin abgelöst werden. Trypsin ist eine Serinprotease, die die hydrolytische Spaltung von Proteinen und Peptiden katalysiert. Die Proteine, die die Anheftung von adhärennten Zellen an die Zellkulturschale und Zell-Zell-Kontakte vermitteln, werden durch Trypsin gespalten (Schmitz 2011). Zunächst wurden die

Zellen mit ca. 5 mL PBS-/- gewaschen, um abgestorbene Zellen zu entfernen, und durch Zugabe von 1 mL Trypsin bei 37°C abgelöst. Durch leichtes Klopfen wurden noch ungelöste Zellen ins Medium überführt. Die Reaktion wurde anschließend durch Zugabe von 9 mL Vollmedium gestoppt. Je nach gewünschter Verdünnung (zwischen 1:5 und 1:20) wurden die Zellen auf frische Zellkulturschalen mit Vollmedium verteilt.

4.3.2. Transiente Transfektion

Das vorübergehende Einbringen von fremder DNA in eukaryotische Wirtszellen, ohne dass die DNA in das Wirtsgenom eingebaut wird, wird als transiente Transfektion bezeichnet. Aufgrund der hohen Expressionsraten kommt die transiente Transfektion häufig zum Einsatz (Schmitz 2011). In dieser Arbeit wurden HEK293T-Zellen mittels TurboFect und CHO-K1-Zellen mittels Lipofectamine 2000 transfiziert. Beide Transfektionsmethoden beruhen auf dem Prinzip der Lipofektion. Bei den Transfektionsreagenzien handelt es sich um kationische Lipide, welche die negativ geladene DNA binden und Lipid-DNA-Komplexe bilden. Diese Komplexe werden mit den zu transformierenden Zellen inkubiert. Mittels Endozytose werden die Lipid-DNA-Komplexe von den Zellen aufgenommen, und die gewünschte Plasmid-DNA wird in die Zellen eingebracht. Die Plasmid-DNA wurde zum Transfektionsreagenz stets in einem Verhältnis von 1:2 ($\mu\text{g}:\mu\text{L}$) eingesetzt.

4.3.2.1. Transiente Transfektion mittels TurboFect

Transiente Transfektionen mittels TurboFect wurden in dieser Arbeit für den Nachweis der heterologen Expression mittels Immunblottings durchgeführt. Dafür wurden HEK293T-Zellen am Tag vor der Transfektion in 6-Well-Zellkulturschalen so ausgelegt, dass eine für die Transfektion optimale Konfluenz von 70-80% erreicht wurde. Am Tag der Transfektion wurden 250 μL Opti-MEM mit 1-2,5 μg Plasmid-DNA und 2-5 μL TurboFect vorbereitet. Dieser Ansatz wurde 20 min bei Raumtemperatur inkubiert. In dieser Zeit kommt es zur Bildung der Lipid-DNA-Komplexe. Währenddessen wurden die zu transfizierenden Zellen mit 1 mL PBS-/- gewaschen und 1 mL Opti-MEM pro Well vorgelegt. Nach Ablauf der Inkubationszeit wurde der Transfektionsansatz vorsichtig auf die Zellen gegeben und die 6-Well-Zellkulturschale vorsichtig geschwenkt, um die Lösung gleichmäßig zu verteilen. Hiernach wurden die Zellen ca. 5 h im Brutschrank inkubiert. Nach der Inkubationszeit wurde das Medium

von der Zellkulturschale abgesaugt und 2 mL DMEM-Vollmedium zu den Zellen gegeben. Es erfolgte eine weitere Inkubationszeit von ca. 16-20 h im Brutschrank.

4.3.2.2. Transiente Transfektion mittels Lipofectamine 2000

In dieser Arbeit wurden transiente Transfektionen mittels Lipofectamine 2000 für Immunfluoreszenzexperimente durchgeführt. Hierfür wurden CHO-K1-Zellen am Vortag der Transfektion in 6-Well-Zellkulturschalen auf Glasdeckgläschen so ausgelegt, dass eine für die Transfektion optimale Konfluenz von 70-80% erreicht wurde. Die Glasdeckgläschen wurden zuvor mit einer sterilen Pinzette entnommen und abgeflammt. Am nächsten Tag wurden zwei Transfektionsansätze vorbereitet: Transfektionsansatz I beinhaltet 100 µL Opti-MEM und 1-2,5 µg Plasmid-DNA; Transfektionsansatz II beinhaltet 100 µL Opti-MEM und 2-5 µL Lipofectamine 2000. Beide Ansätze wurden 5 min bei Raumtemperatur inkubiert, vermischt und für weitere 30 min bei Raumtemperatur inkubiert. In dieser Zeit kommt es zur Bildung der Lipid-DNA-Komplexe. Währenddessen wurden die zu transfizierenden Zellen mit 1 mL PBS-/- gewaschen und 1 mL Opti-MEM pro Well vorgelegt. Nach der Inkubationszeit wurde der Transfektionsansatz vorsichtig auf die vorbereiteten Zellen gegeben. Die 6-Well-Zellkulturschale wurde vorsichtig geschwenkt, um die Lösung gleichmäßig zu verteilen. Hiernach wurden die Zellen ca. 5 h im Brutschrank inkubiert. Nach der Inkubationszeit wurde das Medium von der Zellkulturschale abgesaugt und 2 mL F12-Vollmedium zu den Zellen gegeben. Es erfolgte eine weitere Inkubationszeit von ca. 16-20 h im Brutschrank.

4.3.3. Immunfluoreszenz-Analysen

Mittels Immunfluoreszenz-Analysen sollte die subzelluläre Lokalisation von Proteinen und die Kolo-kalisation zweier Proteine untersucht werden. CHO-K1-Zellen wurden hierfür auf vorher abgeflam- mte Glasdeckgläschen in 6-Well-Zellkulturschalen ausgesät und am darauffolgenden Tag mittels Lipofectamine 2000 transient transfiziert (Kapitel 4.3.2.2). Am nächsten Tag erfolgte die Immunfluoreszenzfärbung. Die Zellen wurden mit 1 mL eiskaltem PBS+/- gewaschen und zur Fixierung 10 min in 750 μ L PFA-Lösung bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend erfolgte ein dreimaliges Waschen mit PBS+/- unter leichtem Schwenken (jeweils 10 min, Raumtemperatur). Zum Abblocken unspezifischer Bindungsstellen folgte eine Inkubation unter leichtem Schwenken für 1 h bei Raumtemperatur in 500 μ L Blockierungslösung. Die Inkubation mit dem jeweiligen primären Antikörper in 70 μ L Antikörperlösung erfolgte für 3 h bei Raumtemperatur in einer dunklen, feuchten Kammer. Dafür wurde die Antikörperlösung (70 μ L) mit dem jeweiligen Antikörper auf einen in der feuchten Kammer liegenden Parafilm-Streifen gegeben und die Deckgläschen mit der Zellseite nach unten auf die Lösung gelegt. Das Glasdeckgläschen wurde nach Ablauf der Inkubationszeit zurück in die 6-Well-Zellkulturschale gelegt (mit der Zellseite nach oben) und zweimal mit 1 mL Hochsalz-PBS+/- und zweimal mit 1 mL PBS+/- für jeweils 10 min bei Raumtemperatur unter leichtem Schwenken gewaschen. Anschließend erfolgte die Inkubation mit dem entsprechenden Fluoreszenzfarbstoff-konjugierten sekundären Antikörper für 1 h bei Raumtemperatur in einer dunklen, feuchten Kammer. Die Deckgläschen wurden zurück in die 6-Well-Zellkulturschale gelegt und dreimal 10 min mit jeweils 1 mL PBS+/- gewaschen. Anschließend wurden die Glasdeckgläschen mit einer Pinzette kurz in H₂O getaucht und mit der Zellseite nach unten auf einem Objektträger mit DAPI eingebettet. Durch die Lichtempfindlichkeit der Fluorochrome sollten diese Arbeitsschritte und Inkubationszeiten im Dunkeln durchgeführt werden.

Wurden die Zellen ausschließlich mit EGFP-Fusionskonstrukten transfiziert, konnte nach der Fixierung mit PFA-Lösung direkt mit der Einbettung in DAPI auf einem Objektträger fortgefahren werden. Die simultane Darstellung von zwei Proteinen zur Untersuchung von Kolo-kalisationen wird durch die Verwendung von primären Antikörpern aus verschiedenen Spezies ermöglicht. Die Primärantikörper werden mit unterschiedlichen, Fluoreszenzfarbstoff-gekoppelten, sekundären Antikörpern detektiert. Die Auswertung erfolgte mittels eines Fluoreszenzmikroskops (Zeiss

ApoTome) mit einem 63x Plan-Apochromat-Objektiv unter Nutzung von Immersionsöl. Wurde für den Nachweis eines Proteins ein EGFP-Tag oder Alexa Fluor 488-konjugierter Antikörper verwendet, so wurde die entsprechende Fluoreszenz mit Hilfe eines FITC („Fluorescein isothiocyanate“)-Filters visualisiert und detektiert. Erfolgte der Nachweis des Proteins mit einem Alexa Fluor 546-konjugierten Antikörper, so wurde die entsprechende Fluoreszenz mit Hilfe eines Cy3-Filters visualisiert und detektiert. DAPI wurde mit Hilfe eines Blau-Filters visualisiert. In Tabelle 15 sind die Anregungs- und Emissionswellenlängen der verwendeten Farbstoffe dargestellt.

Tabelle 15: Anregungs- und Emissionswellenlängen der verwendeten Farbstoffe

Farbstoff	Filter	Anregungswellenlänge	Emissionswellenlänge
Alexa Fluor 488	FITC (grün)	495 nm	519 nm
EGFP	FITC (grün)	488 nm	509 nm
Alexa Fluor 546	Cy3 (rot)	556 nm	573 nm
DAPI	DAPI (blau)	358 nm	461 nm

V. Ergebnisse

1. Herstellung von humanen EGFP- und HA-FBXW11-Fusionskonstrukten

Vor Beginn dieser Arbeit wurde im Rahmen eines Forschungsprojektes bei einem Patienten die *de novo* Missense-Mutation c.1100C>T/p.(Ser367Phe) im *FBXW11*-Gen identifiziert. Während der ersten Vorarbeiten wurden drei weitere *de novo* Missense-Mutationen im *FBXW11*-Gen, die erstmalig in Holt et al. (2019) beschrieben wurden, in die Untersuchungen mit aufgenommen: c.685G>C/p.(Gly229Arg), c.1048C>T/p.(Arg350Trp) und c.1291G>A/p.(Glu431Lys). Die Phänotypen der vier Patienten unterscheiden sich voneinander.

In dieser Arbeit sollte die heterologe Proteinexpression und die subzelluläre Verteilung des FBXW11-Wildtypproteins sowie der unterschiedlichen FBXW11-Mutantenproteine durch Immunblot- und Immunfluoreszenzexperimente analysiert werden. Zu diesem Zweck mussten zunächst verschiedene FBXW11-Fusionskonstrukte hergestellt werden. Hierfür standen bereits vor Beginn des Projektes folgende FBXW11-Fusionskonstrukte zur Verfügung: pMT2SM-HA-FBXW11^{WT} und pEGFP-C1-FBXW11^{S367F}.

Ziel war es, EGFP-FBXW11-Fusionskonstrukte für den FBXW11-Wildtyp und die vier Mutanten herzustellen. Durch die Fusion mit EGFP ergibt sich die Möglichkeit, die Immunfluoreszenzexperimente zur Untersuchung der subzellulären Lokalisation von FBXW11 ohne Antikörperzugabe durchzuführen. Durch das nicht unerhebliche Molekulargewicht von 27 kDa von EGFP muss mit Hilfe von Kontrollexperimenten überprüft werden, ob EGFP die Lokalisation von FBXW11 in der Zelle beeinflusst. Daher wurden auch HA-FBXW11-Fusionskonstrukte für den FBXW11-Wildtyp und die vier Mutanten hergestellt.

Abbildung 5 zeigt das prinzipielle Vorgehen zur Herstellung aller in dieser Arbeit verwendeten Konstrukte. Der erste Schritt bestand darin, das Fusionskonstrukt pMT2SM-HA-FBXW11^{S367F} herzustellen. Mit Hilfe der In-Fusion-Technologie und dem Ausgangsplasmid pEGFP-C1-FBXW11^{S367F} wurde das Fusionskonstrukt pMT2SM-HA-FBXW11^{S367F} erzeugt.

Anschließend wurde mit der Herstellung der anderen HA-FBXW11-Fusionskonstrukte fortgefahren. Mittels einer ortsspezifischen Mutagenese auf Basis des pMT2SM-HA-FBXW11^{WT}-Fusionskonstrukts wurden die drei Mutantenkonstrukte pMT2SM-HA-FBXW11^{G229R}, pMT2SM-HA-FBXW11^{R350W} und pMT2SM-HA-FBXW11^{E431K} generiert.

Im Anschluss wurden die pEGFP-FBXW11-Fusionskonstrukte für den Wildtyp und die vier Mutationen p.(Gly229Arg), p.(Arg350Trp), p.(Glu431Lys) und p.(Ser367Phe) hergestellt. Hierfür wurde die Gateway-Klonierungstechnologie angewendet. Diese besteht aus zwei Schritten: Der zielgerichteten Klonierung der *FBXW11*-Kodierregion (Wildtyp und der vier mutierten Kodierregionen) aus den HA-FBXW11-Fusionskonstrukten in den Gateway Entry-Vektor pENTR/D-TOPO und der LR-Reaktion zwischen den pENTR/D-TOPO-Konstrukten und dem eukaryotischen Expressions- und Destinationsvektor pEGFP-C3-Dest.

Im Folgenden werden die Ergebnisse der einzelnen Klonierungsschritte detailliert beschrieben.

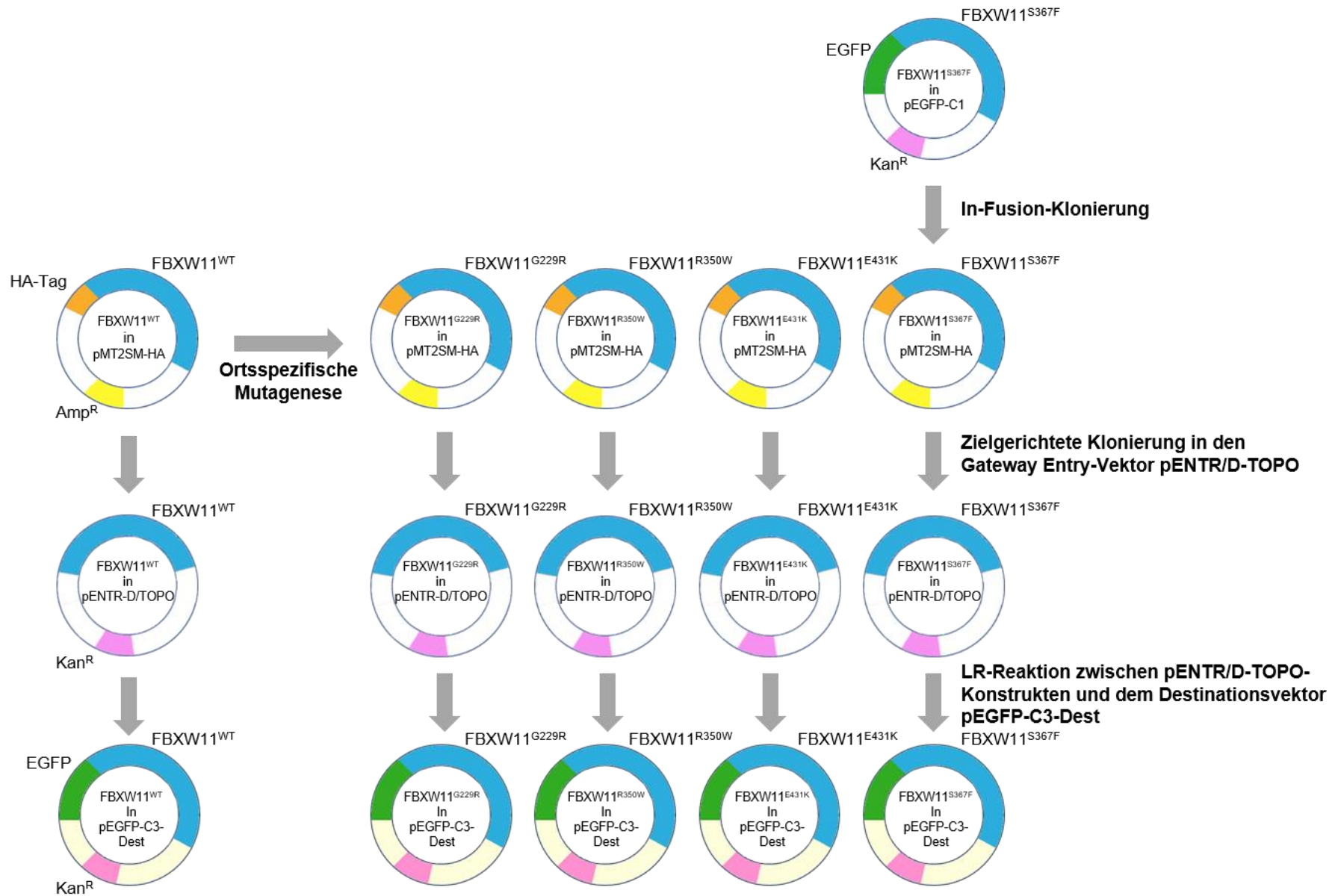


Abbildung 5: Übersicht über die wesentlichen Klonierungsschritte zur Herstellung von pEGFP-C3-Dest- und pMT2SM-HA-FBXW11-Fusionskonstrukten für FBXW11-Wildtyp und die vier Mutanten

Zur Herstellung von pEGFP-C3-Dest- und pMT2SM-HA-FBXW11-Fusionskonstrukten wurden verschiedene Klonierungstechniken verwendet: Mittels der In-Fusion-Technologie wurde aus dem bereits vorliegenden pEGFP-C1-FBXW11^{S367F}-Fusionskonstrukt das pMT2SM-HA-FBXW11^{S367F}-Fusionskonstrukt hergestellt. Das ebenfalls bereits vorliegende pMT2SM-HA-FBXW11^{WT}-Fusionskonstrukt diente als Ausgangsplasmid für die ortsspezifische Mutagenese, wodurch die Konstrukte pMT2SM-HA-FBXW11^{G229R}, pMT2SM-HA-FBXW11^{R350W} und pMT2SM-HA-FBXW11^{E431K} generiert wurden. Im nächsten Schritt wurde mit Hilfe der fünf pMT2SM-HA-Konstrukte eine zielgerichtete Klonierung in den Gateway-Entry-Vektor pENTR/D-TOPO durchgeführt. Zuletzt erfolgte die Herstellung von pEGFP-C3-Dest-FBXW11-Fusionskonstrukten für den FBXW11-Wildtyp und die vier Mutanten durch eine LR-Reaktion.

1.1. Herstellung des HA-FBXW11-Fusionskonstrukts mit der Mutation c.1100C>T mittels In-Fusion-Technologie

Wie in Abbildung 5 gezeigt, diente für die Herstellung des pMT2SM-HA-FBXW11^{S367F}-Fusionskonstrukts das pEGFP-C1-FBXW11^{S367F}-Fusionskonstrukt als Vorlage für die PCR zur Generierung eines Amplikons der *FBXW11*-Kodierregion (1590 bp) mit der Mutation c.1100C>T. Für die Amplifikation wurden Primer verwendet, welche einen 18 bzw. 20 bp großen Überhang aufweisen. Durch den zum Zielvektor pMT2SM-HA komplementären Überhang entstand ein 1628 bp großes *FBXW11*-Amplikon. Der Zielvektor pMT2SM-HA wurde mit den Restriktionsenzymen *NotI* und *KpnI* an der Insertionsstelle linearisiert. Das PCR-Produkt und der linearisierte Vektor (5040 bp) wurden anschließend auf ein 1%-iges Agarosegel aufgetragen und auf Größe und Reinheit hin überprüft (Abbildung 6).

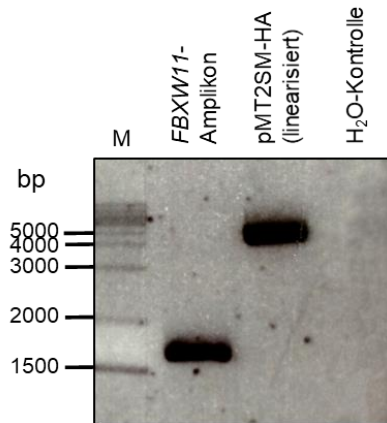


Abbildung 6: Darstellung eines Agarosegels mit dem Amplikon der *FBXW11*-Kodierregion mit der Mutation c.1100C>T und mit dem *NotI* und *KpnI* linearisierten Vektor pMT2SM-HA

Die Abbildung zeigt ein 1%-iges Agarosegel, auf welches das PCR-Produkt der *FBXW11*-Kodierregion mit der Mutation c.1100C>T (1628 bp in Spur 1) und die zugehörige H₂O-Kontrolle (Spur 3) aufgetragen wurden. In Spur 2 ist die mit *NotI*- und *KpnI*-linearisierte Plasmid-DNA des Expressionsvektors pMT2SM-HA aufgetragen (5040 bp). Eine 1 Kb-Leiter wurde links als Größenstandard aufgetragen (M); die Größe in bp ausgewählter Banden ist angegeben.

Anschließend wurden das PCR- und das Spaltprodukt aufgereinigt. Das erhaltene *FBXW11*-PCR-Produkt wurde mit Hilfe einer Rekombinase, welche die zum Vektor komplementären Enden mit dem Vektor rekombiniert, in den eukaryotischen Expressionsvektor pMT2SM-HA kloniert. Es erfolgte eine Transformation des Reaktionsansatzes nach *E. coli* DH10B. Am nächsten Tag wurden einige *E. coli*-Kolonien in 2 mL Kulturmedium überführt und über Nacht angezüchtet. Aus diesen wurde anschließend die Plasmid-DNA durch eine Mini-Präparation isoliert. Mittels einer Restriktionsspaltung der isolierten Plasmid-DNAs wurde das Insert (die *FBXW11*-Kodierregion) aus pMT2SM-HA herausgeschnitten. Nach *NotI*- und *KpnI*-Spaltung werden 1602 bp und 5040 bp große Fragmente erwartet. Mittels Agarosegelelektrophorese wurden die gespaltenen Plasmide auf ihr Spaltmuster hin überprüft. In Abbildung 7 sind in den Spuren 7, 8 und 9 DNA-Fragmente der erwarteten Größe von 5040 bp und 1602 bp zu sehen. In den Spuren 1 bis 6 ist präparierte Plasmid-DNA kaum zu erkennen.

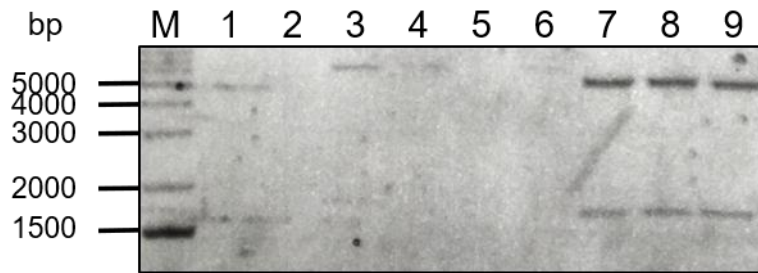


Abbildung 7: Darstellung eines Agarosegels mit der Restriktionsspaltung einiger Plasmide nach Klonierung der *FBXW11*-Kodierregion mit c.1100C>T-Mutation in pMT2SM-HA

Die Abbildung zeigt einen Ausschnitt eines 1%-igen Agarosegels, auf das einige *NotI*- und *KpnI*-gespaltene Plasmid-DNAs nach Klonierung des *FBXW11*-Amplikons in pMT2SM-HA aufgetragen wurden. Die drei Plasmide in den Spuren 7, 8 und 9 tragen das Insert, was sich durch eine 1602 bp und 5040 bp große Bande zeigt. Eine 1 Kb-Leiter wurde links als Größenstandard aufgetragen (M); die Größe in bp ausgewählter Banden ist angegeben.

Einige Plasmide, die das erwartete Spaltmuster gezeigt haben, wurden für eine Sequenzierung ausgewählt, um die Mutation c.1100C>T in der *FBXW11*-Kodierregion zu bestätigen (Abbildung 8).

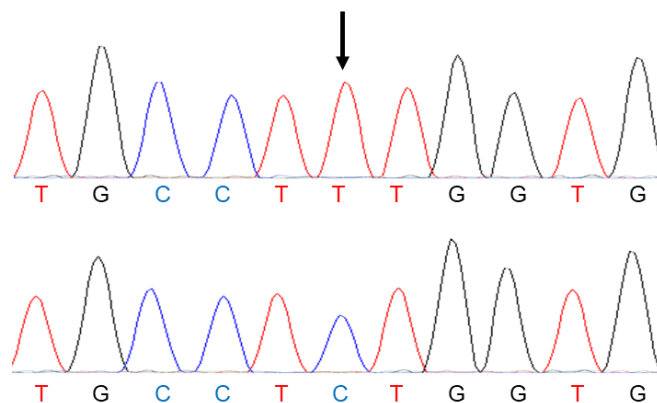


Abbildung 8: Ausschnitt aus dem Sequenzchromatogramm der *FBXW11*-Kodierregion mit der Mutation c.1100C>T nach Klonierung in pMT2SM-HA und der entsprechenden Wildtypsequenz

Die Abbildung zeigt einen Ausschnitt aus einem Sequenzchromatogramm der *FBXW11*-Kodierregion mit der Mutation c.1100C>T nach Herstellung des pMT2SM-HA-*FBXW11*^{S367F}-Fusionskonstrukts (oben) sowie die entsprechende Wildtypsequenz (unten). Der c.1100C>T-Austausch ist mit einem schwarzen Pfeil markiert. Jede Base ist durch einen Buchstaben gekennzeichnet (C – Cytosin, G – Guanin, T – Thymin) und wird durch die Peaks in verschiedenen Farben repräsentiert (C – blau, G – schwarz, T – rot).

Es erfolgte eine Maxi-Präparation eines sequenzierten Plasmids zur Präparation größerer Mengen an DNA. Zur Überprüfung der Integrität des Konstrukts pMT2SM-HA-*FBXW11*^{S367F} (nach Maxi-Präparation) wurde die gesamte *FBXW11*-Kodierregion sequenziert.

1.2. Herstellung von HA-FBXW11-Fusionskonstrukten mit den Mutationen c.685G>C, c.1048C>T und c.1291G>A mittels ortsspezifischer Mutagenese

Bei der ortsspezifischen Mutagenese diente das pMT2SM-HA-FBXW11^{WT}-Fusionskonstrukt als Vorlage für die Mutagenese-PCR zur Herstellung der drei Fusionskonstrukte pMT2SM-HA-FBXW11^{G229R}, pMT2SM-HA-FBXW11^{R350W} und pMT2SM-HA-FBXW11^{E431K}. Die Amplifikation erfolgte unter Zugabe von DMSO zur Steigerung der Spezifität und zur leichteren Amplifikation von GC-reichen Sequenzen (Mülhardt 2013). Nach der Amplifikation mit Primern, welche die gewünschte Punktmutation aufwiesen, wurde dem Mutagenese-PCR-Ansatz die Restriktionsendonuklease *DpnI* zugefügt. Dadurch wird das methylierte Ausgangsplasmid, welches sich noch im Mutagenese-PCR-Ansatz befindet, gespalten. Anschließend erfolgte neben der Transformation des Reaktionsansatzes nach *E. coli* DH10B auch eine Transformation nach *E. coli* XL1-Blue, da einige Konstrukte nicht nach *E. coli* DH10B transformiert werden konnten. Unter Verwendung des anderen Stamms konnten jedoch Ergebnisse erzielt werden. Am nächsten Tag wurden einige *E. coli*-Kolonien in 2 mL Kulturmedium überführt und über Nacht angezüchtet. Aus diesen wurden die Plasmid-DNAs durch eine Mini-Präparation isoliert, sequenziert und die Mutationen c.685G>C, c.1048C>T und c.1291G>A in der *FBXW11*-Kodierregion bestätigt (Abbildung 9).

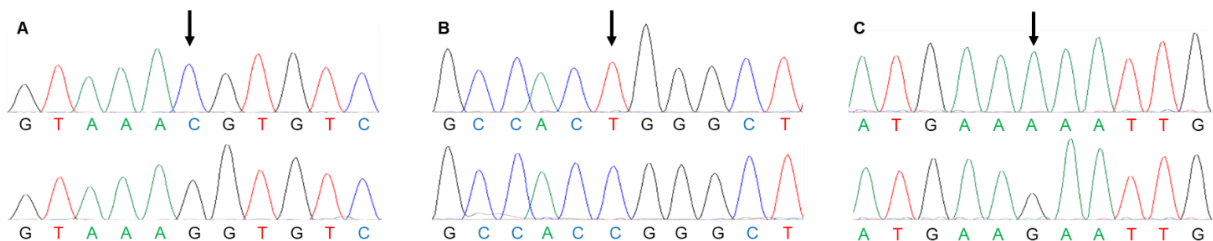


Abbildung 9: Ausschnitt aus Sequenzchromatogrammen der *FBXW11*-Kodierregion mit der Mutation c.685G>C, c.1048C>T bzw. c.1291G>A nach Herstellung von pMT2SM-HA-FBXW11-Fusionskonstrukten und Darstellung der entsprechenden Wildtypsequenzen

Die Abbildung zeigt Ausschnitte aus verschiedenen Sequenzchromatogrammen der *FBXW11*-Kodierregion nach Herstellung von verschiedenen pMT2SM-HA-Fusionskonstrukten (oben) sowie die entsprechende Wildtypsequenz (unten). Der c.685G>C- (A), c.1048C>T- (B) und der c.1291G>A-Austausch (C) ist mit einem schwarzen Pfeil markiert. Jede Base ist durch einen Buchstaben gekennzeichnet (A- Adenin, C – Cytosin, G – Guanin, T – Thymin) und wird durch die Peaks in verschiedenen Farben repräsentiert (A – grün, C – blau, G – schwarz, T – rot).

Es folgte eine Maxi-Präparation eines sequenzierten Plasmids zur Präparation größerer Mengen Plasmid-DNA. Zur Überprüfung der Integrität der hergestellten Konstrukte (pMT2SM-HA-FBXW11^{G229R}, pMT2SM-HA-FBXW11^{R350W} und pMT2SM-HA-FBXW11^{E431K}) wurde die gesamte *FBXW11*-Kodierregion sequenziert (nach Maxi-Präparation). In nachfolgenden Experimenten wurde eine Transformation der Plasmide nach *E. coli* JM109 und eine Maxi-Präparation mit 600 mL Kulturvolumen durchgeführt, um die Ausbeute der Maxi-Präparation zu steigern.

1.3. Herstellung von EGFP-FBXW11-Fusionskonstrukten für den Wildtyp und die vier Mutanten mittels Gateway-Technologie

Für die Erzeugung von pEGFP-C3-Dest-FBXW11-Fusionskonstrukten mittels der Gateway-Technologie wurden im ersten Schritt Amplikons der *FBXW11*-Kodierregion (Wildtyp und der vier mutierten Kodierregionen) mittels einer PCR generiert. Durch den 5'-CACC-Überhang am Vorwärtsprimer wurde eine Rekombinationsstelle für den Gateway Entry-Vektor pENTR/D-TOPO geschaffen und es entstand ein 1594 bp großes *FBXW11*-Amplikon. Das PCR-Produkt der *FBXW11*-Kodierregion wurde auf ein 1%-iges Agarosegel aufgetragen und auf Größe und Reinheit hin überprüft (Abbildung 10). Das Amplikon in Abbildung 10 ist repräsentativ für die *FBXW11*-Kodierregion mit den Mutationen c.685G>C, c.1048C>T und c.1291G>A und die *FBXW11*-Wildtyp-Kodierregion.

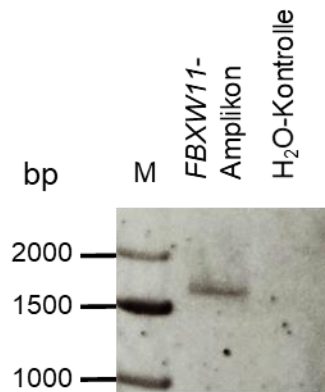


Abbildung 10: Darstellung eines Agarosegels mit dem Amplikon der *FBXW11*-Kodierregion mit der Mutation c.1100C>T

Die Abbildung zeigt ein 1%-iges Agarosegel, auf welches das Amplikon der *FBXW11*-Kodierregion mit der Mutation c.1100C>T (1594 bp in Spur 1) und die zugehörige H₂O-Kontrolle (Spur 2) aufgetragen wurden. Die Abbildung ist repräsentativ für alle hergestellten *FBXW11*-Amplikons mit den Mutationen c.685G>C, c.1048C>T und c.1291G>A und das *FBXW11*-Wildtyp-Amplikon. Eine 1 Kb-Leiter wurde links als Größenstandard aufgetragen (M); die Größe in bp ausgewählter Banden ist angegeben.

Anschließend wurde das PCR-Produkt aufgereinigt. Es folgte das zielgerichtete Einfügen des *FBXW11*-Amplikons in den Gateway Entry-Vektor pENTR/D-TOPO durch eine TOPO-Klonierungsreaktion. Anschließend erfolgte eine Transformation des Reaktionsansatzes nach *E. coli* TOP10. Einige *E. coli*-Kolonien wurden in 2 mL Kulturmedium überführt und über Nacht angezchtet. Aus diesen wurde anschließend die Plasmid-DNA durch eine Mini-Präparation isoliert. Mittels einer Restriktionsspaltung der isolierten Plasmid-DNA wurde das Insert (die *FBXW11*-Kodierregion) aus pENTR/D-TOPO herausgeschnitten. Nach *NotI*- und *EcoRV*-Spaltung wurden ein 1735 bp und ein 2433 bp großes Fragment erwartet. Mittels

Agarosegelelektrophorese wurden die gespaltenen Plasmide auf ihr Spaltmuster hin überprüft. In Abbildung 11 ist in den Spuren 7, 8 und 11 das erwartete Spaltmuster zu erkennen.

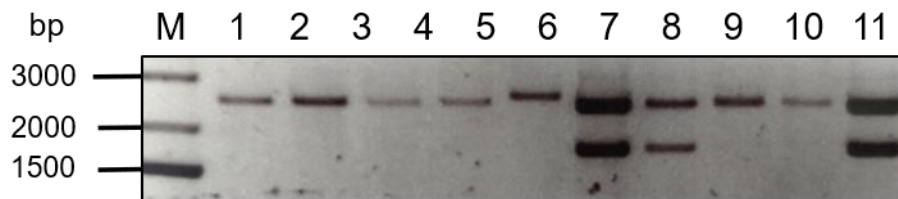


Abbildung 11: Darstellung eines Agarosegels mit der Restriktionsspaltung einiger Plasmide nach der zielgerichteten Klonierung der *FBXW11*-Wildtyp-Kodierregion in den Gateway Entry-Vektor pENTR/D-TOPO

Die Abbildung zeigt einen Ausschnitt eines 1%-igen Agarosegels, auf das einige *EcoRV*- und *NotI*-gespaltene Plasmid-DNAs nach Klonierung des *FBXW11*-Amplikons in pENTR/D-TOPO aufgetragen wurden. Von den gezeigten elf Plasmiden tragen drei das Insert (Spuren 7, 8 und 11). Es entstehen eine 1735 bp und eine 2433 bp große Bande. Die Abbildung ist repräsentativ für alle Restriktionsspaltungen nach der zielgerichteten Klonierung von den vier mutierten *FBXW11*-Kodierregionen. Eine 1 Kb-Leiter wurde links als Größenstandard aufgetragen (M); die Größe in bp ausgewählter Banden ist angegeben.

Einige Plasmide, die das erwartete Spaltmuster zeigten, wurden für eine Sequenzierung ausgewählt und die *FBXW11*-Kodierregion (Wildtyp und die vier mutierten Kodierregionen) auf ihre Korrektheit hin überprüft.

Im zweiten Schritt folgte die LR-Reaktion, bei der die *FBXW11*-Kodierregion in den Destinationsvektor pEGFP-C3-Dest kloniert wurde. Anschließend erfolgte eine Transformation des Reaktionsansatzes nach *E. coli* DH10B. Einige gewachsene Kolonien wurden in 2 mL Kulturmedium überführt und über Nacht angezchtet. Aus diesen wurde anschließend die Plasmid-DNA durch eine Mini-Präparation isoliert. Der Einbau der *FBXW11*-Kodierregion in den Destinationsvektor wurde ebenfalls mit Hilfe einer Restriktionsspaltung überprüft. Nach *HindIII*- und *HpaI*-Spaltung wurden ein 874 bp, ein 976 bp und ein 4561 bp großes Fragment erwartet.

Das Ergebnis einer für alle pEGFP-C3-Dest-*FBXW11*-Konstrukte repräsentativen Restriktionsspaltung ist in Abbildung 12 dargestellt, in welcher die Spuren 1, 2 und 4 das erwartete Spaltmuster aufwiesen.

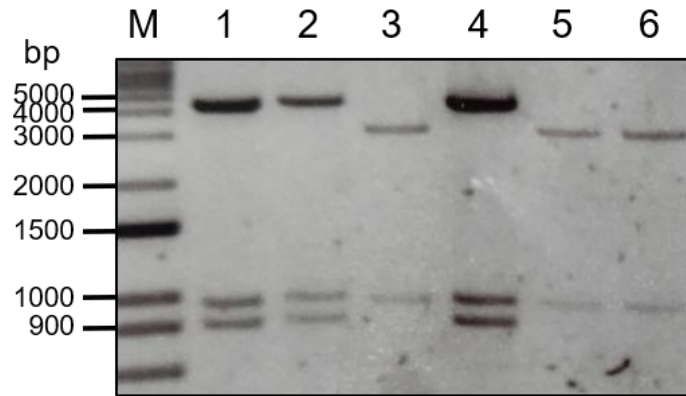


Abbildung 12: Darstellung eines Agarosegels mit der Restriktionsspaltung einiger Plasmide nach LR-Reaktion zwischen dem pENTR/D-TOPO-FBXW11^{WT}-Konstrukt und dem Gateway Destinationsvektor pEGFP-C3-Dest

Die Abbildung zeigt einen Ausschnitt eines 1%-igen Agarosegels, auf das einige *Hpa*I- und *Hind*III-gespaltene Plasmid-DNAs der pEGFP-C3-Dest-FBXW11-Fusionskonstrukte aufgetragen wurden. Von den gezeigten sechs Plasmiden zeigen drei das erwartete Spaltpattern von drei Banden mit Größen von 874 bp, 976 bp und 4561 bp (Spuren 1, 2 und 4). Eine 1 Kb-Leiter wurde links als Größenstandard aufgetragen (M); die Größe in bp ausgewählter Banden ist angegeben.

Zur Bestätigung der Mutationsstellen wurden einige Plasmide, die das erwartete Spaltpattern gezeigt haben, sequenziert. Anschließend erfolgte eine Maxi-Präparation je eines sequenzierten Plasmids zur Präparation größerer Mengen an DNA. Zur Überprüfung der Integrität der pEGFP-C3-Dest-FBXW11-Konstrukte (FBXW11-Wildtyp und drei Mutanten) wurde (nach Maxi-Präparation) die gesamte *FBXW11*-Kodierregion sequenziert.

2. Nachweis der heterologen Expression von EGFP- und HA-FBXW11-Fusionsproteinen in HEK293T-Zellen mittels Immunblottings

FBXW11 spielt als Teil des SKP1/Cullin/F-Box-Protein (SCF-) Komplexes bei der Ubiquitinierung und proteasomalen Degradation von verschiedenen Proteinen eine wichtige Rolle. Der Transkriptionsfaktor TWIST1 wurde als Substrat von FBXW11 identifiziert (Zhong et al. 2013; Bhatia et al. 2006). Die Funktionalität der in V.1 beschriebenen EGFP- und HA-FBXW11-Fusionskonstrukte wurde durch heterologe Proteinexpression in eukaryotischen Zellen überprüft. In Kapitel 3 wird die Proteinexpression von myc- und FLAG-getaggten TWIST1-Fusionsproteinen, deren Konstrukte bereits vor Beginn dieser Arbeit vorlagen, beschrieben. Die erwarteten molekularen Massen aller in dieser Arbeit überexprimierten Fusionsproteine sind in Abbildung 13 dargestellt.

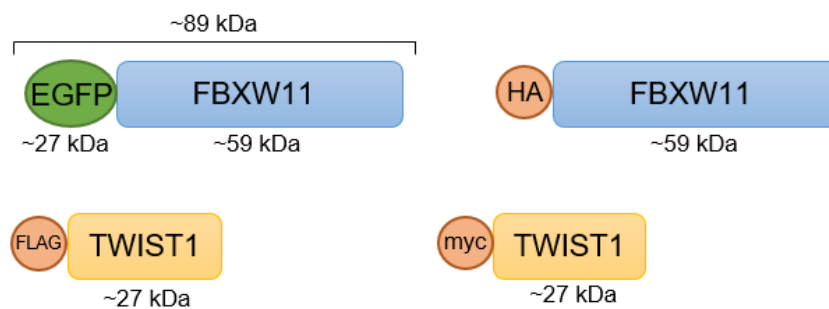


Abbildung 13: Schematische Darstellung der in dieser Arbeit untersuchten FBXW11- und TWIST1-Fusionsproteine

Zur heterologen Expression wurden die hier schematisch dargestellten Proteine in HEK293T-Zellen überexprimiert. Zur immunologischen Detektion wurden alle Proteine mit unterschiedlichen Tags versehen (EGFP, HA, FLAG bzw. myc). Die ungefähre molekulare Masse der Fusionsproteine ist in kDa angegeben.

HEK293T-Zellen wurden in 6-Well-Zellkulturplatten ausgesät und transient mit den EGFP-FBXW11-Fusionskonstrukten transfiziert und über Nacht kultiviert. Zum Nachweis der heterologen Expression der EGFP-FBXW11-Fusionsproteine wurde entweder 1,5 µg oder 2,5 µg DNA der Expressionskonstrukte für die Transfektion verwendet. Als Negativkontrolle wurden HEK293T-Zellen mit dem Leervektor pEGFP-C3-Dest transfiziert. Die Zellen wurden lysiert und die Proteine im Rohlysat in einem 12,5%-igen SDS-Gel elektrophoretisch aufgetrennt und anschließend auf einer PVDF-Membran immobilisiert. Danach erfolgte die Detektion von EGFP mit Hilfe eines primären Anti-GFP-Antikörpers und eines sekundären Meerrettich-Peroxidasegekoppelten Anti-Maus-Antikörpers. Das konstitutiv exprimierte Haushaltsprotein α

Tubulin diente als Ladekontrolle und wurde mit Hilfe eines primären Anti- α -Tubulin-Antikörpers und eines sekundären Meerrettich-Peroxidase-gekoppelten Anti-Kaninchen-Antikörpers in den Rohlysaten detektiert. Wie in Abbildung 14 (A und B) dargestellt, ist die detektierte α -Tubulin-Menge (ca. 55 kDa) in allen HEK293T-Rohlysaten in etwa gleich.

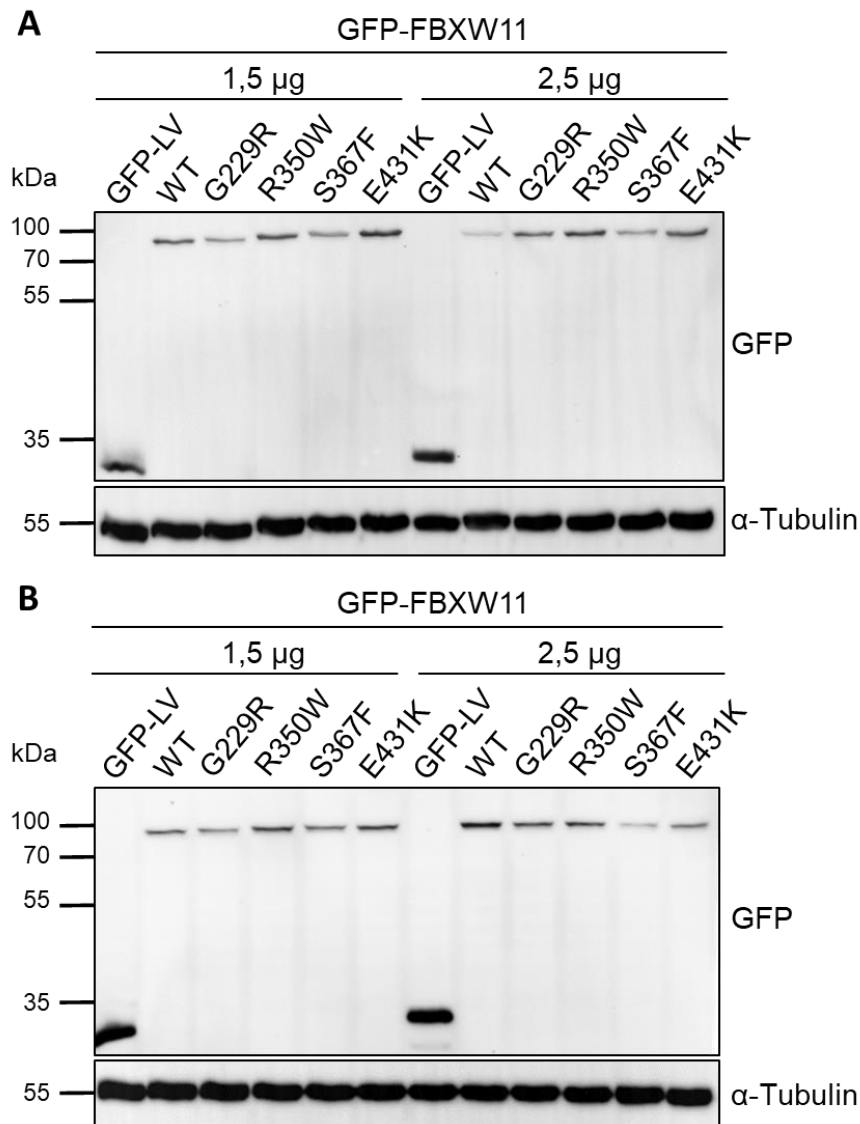


Abbildung 14: Nachweis der Expression von verschiedenen EGFP-FBXW11-Fusionsproteinen in HEK293T-Zellen mittels Immunblottings

HEK293T-Zellen wurden transient mit verschiedenen pEGFP-C3-Dest-FBXW11-Expressionskonstrukten (pEGFP-C3-Dest-FBXW11^{WT}, pEGFP-C3-Dest-FBXW11^{G229R}, pEGFP-C3-Dest-FBXW11^{R350W}, pEGFP-C3-Dest-FBXW11^{S367F} oder pEGFP-C3-Dest-FBXW11^{E431K}) bzw. dem Leervektor pEGFP-C3-Dest (GFP-LV) transfiziert. Dafür wurden entweder 1,5 µg oder 2,5 µg DNA der Expressionskonstrukte eingesetzt. Die Detektion der überexprimierten Proteine erfolgte mit einem Anti-GFP-Antikörper. Als Ladekontrolle wurde das Haushaltsprotein α -Tubulin in den Rohlysaten mit einem Anti- α -Tubulin-Antikörper detektiert. Links sind die Molekulargewichte des verwendeten Proteinstandards in kDa angegeben. **A** und **B** zeigen Ergebnisse zweier unabhängig voneinander durchgeführter Experimente mit gleicher Versuchsdurchführung. n=2.

Beide Immunblots in Abbildung 14 (A und B) zeigen, dass die überexprimierten Proteine EGFP-FBXW11^{WT}, EGFP-FBXW11^{G229R}, EGFP-FBXW11^{R350W}, EGFP-FBXW11^{S367F} und EGFP-FBXW11^{E431K} in allen HEK293T-Rohlysaten mit einer Masse von etwa 89 kDa nachgewiesen werden konnten. Auch das exprimierte EGFP der Negativkontrolle (GFP-LV) zeigte die erwartete Masse von 27 kDa. Die in Abbildung 14 (A und B) dargestellten Experimente zeigten für alle überexprimierten Proteine, unabhängig von der eingesetzten DNA-Menge, kaum Unterschiede in der Proteinexpression. In Abbildung 14 (A) ist in den mit 2,5 µg DNA transfizierten HEK293T-Zellen, verglichen mit den übrigen EGFP-FBXW11^{WT}-exprimierenden Zellen, eine verringerte Menge von EGFP-FBXW11^{WT} zu erkennen. Dieser Unterschied ist am ehesten durch Pipettierungenauigkeiten zu erklären. Im Vergleich zu EGFP-FBXW11^{WT} und den anderen Mutantenproteinen zeigten EGFP-FBXW11^{S367F}-exprimierende Zellen in allen vier Spuren eine Reduktion der Proteinmenge. Auch EGFP-FBXW11^{G229R}-exprimierende Zellen zeigten eine geringere Menge im Vergleich zu EGFP-FBXW11^{WT}. EGFP-FBXW11^{R350W} und EGFP-FBXW11^{E431K} zeigten kaum Unterschiede zu EGFP-FBXW11^{WT}-exprimierenden Zellen.

Zum Nachweis der heterologen Expression der HA-FBXW11-Fusionsproteine wurden 2,5 µg DNA der Expressionskonstrukte in die Transfektion eingesetzt. Als negative Kontrolle wurden HEK293T-Zellen mit dem Leervektor pMT2SM-HA transfiziert (HA-LV). Nach SDS-PAGE und Western-Blot erfolgte die Detektion des HA-Tags mit Hilfe eines Meerrettich-Peroxidase-gekoppelten Anti-HA-Antikörpers. Neben den HA-FBXW11-Fusionsproteinen wurde auch das Haushaltsprotein GAPDH mit Hilfe eines primären Anti-GAPDH-Antikörpers und eines sekundären Meerrettich-Peroxidase-gekoppelten Anti-Maus-Antikörpers als Ladekontrolle in den Rohlysaten detektiert.

Wie in Abbildung 15 (A und B) dargestellt, liegt GAPDH in allen HEK293T-Zellen in etwa gleicher Menge vor (36 kDa).

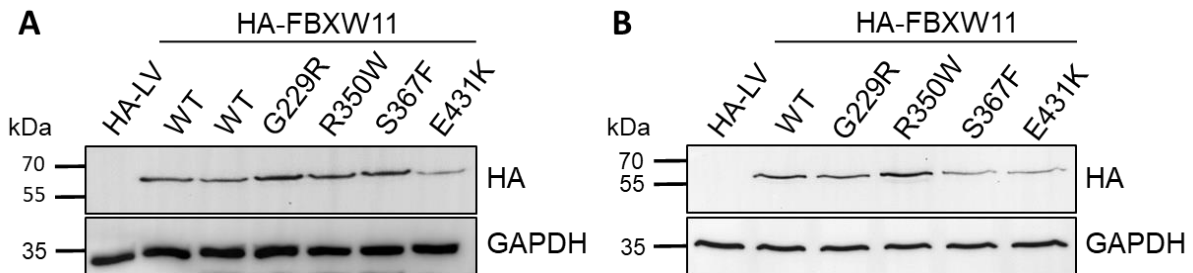


Abbildung 15: Nachweis der Expression von verschiedenen HA-FBXW11-Fusionsproteinen in HEK293T-Zellen mittels Immunblottings

HEK293T-Zellen wurden transient mit verschiedenen pMT2SM-HA-FBXW11-Expressionskonstrukten (pMT2SM-HA-FBXW11^{WT}, pMT2SM-HA-FBXW11^{G229R}, pMT2SM-HA-FBXW11^{R350W}, pMT2SM-HA-FBXW11^{S367F} oder pMT2SM-HA-FBXW11^{E431K}) bzw. dem Leervektor pMT2SM-HA (HA-LV) transfiziert. Die Detektion der überexprimierten Proteine erfolgte mit einem Anti-HA-Antikörper. Als Ladekontrolle wurde das Haushaltsprotein GAPDH in den Rohlysaten mit einem Anti-GAPDH-Antikörper detektiert. Links sind die Molekulargewichte des verwendeten Proteinstandards in kDa angegeben. **A** und **B** zeigen Ergebnisse zweier unabhängig voneinander durchgeführter Experimente mit gleicher Versuchsdurchführung. In **A** wurde das Rohlysat mit überexprimiertem HA-FBXW11^{WT} zweimal aufgetragen. n=2.

Die überexprimierten Fusionsproteine HA-FBXW11^{WT}, HA-FBXW11^{G229R}, HA-FBXW11^{R350W}, HA-FBXW11^{S367F} und HA-FBXW11^{E431K} konnten in beiden Experimenten in allen HEK293T-Zellen bei einer Masse von ca. 59 kDa nachgewiesen werden. In der Negativkontrolle wurden keine unspezifischen Signale detektiert. Die Proteinmenge in HA-FBXW11^{WT}-, HA-FBXW11^{G229R}-, HA-FBXW11^{R350W}-exprimierenden HEK293T-Zellen unterschied sich in beiden Experimenten kaum voneinander. Lediglich in HA-FBXW11^{E431K}-exprimierenden Zellen konnte in beiden Experimenten im Vergleich zu HA-FBXW11^{WT} eine geringere Proteinmenge festgestellt werden. Die beiden Experimente unterschieden sich lediglich in der detektierten Menge an HA-FBXW11^{S367F}: HA-FBXW11^{S367F} lag verglichen mit HA-FBXW11^{WT} einmal in etwa gleicher Menge (Abbildung 15 A) und einmal in geringerer Menge (Abbildung 15 B) vor.

3. Nachweis der heterologen Expression von getaggten TWIST1-Proteinen in HEK293T-Zellen mittels Immunblottings

Zusätzlich zu den EGFP- und HA-FBXW11-Fusionsproteinen sollte auch die heterologe Expression des Interaktionspartners von FBXW11, TWIST1, nachgewiesen werden. TWIST1 lag bereits vor Beginn des Projektes myc- und FLAG-getaggt vor. HEK293T-Zellen wurden in 6-Well-Zellkulturplatten ausgesät und mit den TWIST1-Fusionskonstrukten transient transfiziert. Dabei wurden unterschiedliche Mengen DNA der Expressionskonstrukte eingesetzt. Die Zellen wurden am nächsten Tag lysiert und die Proteine der Rohlysate in einem 12,5%-igen SDS-Gel elektrophoretisch aufgetrennt und anschließend auf einer PVDF-Membran immobilisiert. Die Detektion FLAG-getaggtter Fusionsproteine erfolgte mit Hilfe von Meerrettich-Peroxidase-gekoppelten Anti-FLAG-Antikörpern. Für die Detektion von myc-getaggtten Fusionsproteinen wurden Meerrettich-Peroxidase-gekoppelte Anti-myc-Antikörper verwendet. Die erwarteten molekulare Massen der überexprimierten Fusionsproteine FLAG-TWIST1 und myc-TWIST1 sind in Abbildung 13 dargestellt. Als Ladekontrolle wurde in allen Versuchen das Haushaltsprotein α -Tubulin verwendet, das mit Hilfe eines primären Anti- α -Tubulin-Antikörpers und eines sekundären Meerrettich-Peroxidase-gekoppelten Anti-Kaninchen-Antikörpers nachgewiesen wurde. Zum Nachweis von FLAG-TWIST1 und myc-TWIST1 wurden ebenfalls verschiedene Mengen an DNA (1,0 μ g bis 2,5 μ g) in die Transfektion eingesetzt. Für die FLAG-TWIST1-Fusionsproteine diente pFLAG-CMV4-Dest (FLAG-LV) und für die myc-TWIST1-Fusionsproteine diente pRK5-myc-Dest (myc-LV) als Negativkontrolle. α -Tubulin lag, wie in Abbildung 16 (A und B) dargestellt, in allen HEK293T-Rohlysaten in etwa gleicher Menge vor (55 kDa).

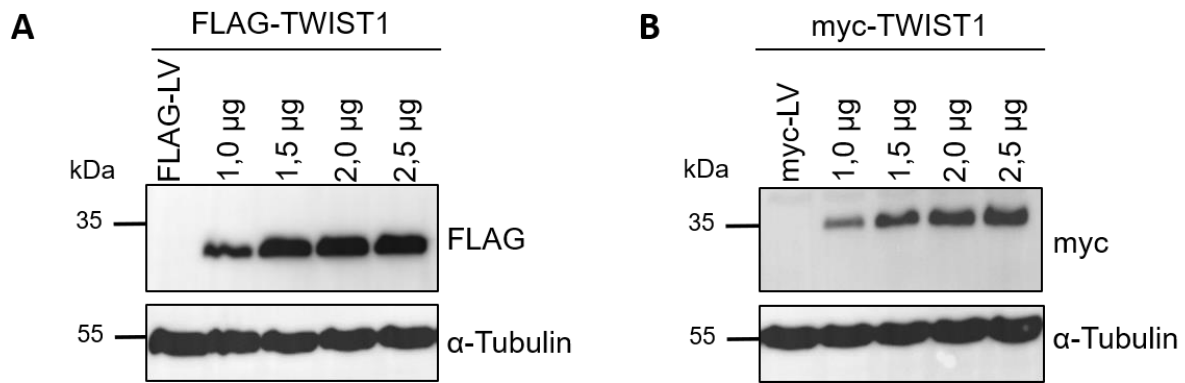


Abbildung 16: Nachweis der Expression von FLAG-TWIST1- und myc-TWIST1-Fusionsproteinen in HEK293T-Zellen mittels Immunblottings

HEK293T-Zellen wurden zum einen transient mit pFLAG-CMV4-Dest-TWIST1-Expressionskonstrukten bzw. dem Leervektor pFLAG-CMV4-Dest (FLAG-LV) (**A**) und zum anderen mit pRK5-myc-Dest-TWIST1-Expressionskonstrukten bzw. dem Leervektor pRK5-myc-Dest (myc-LV) (**B**) transfiziert. Dafür wurden verschiedene Mengen DNA eingesetzt (1,0, 1,5, 2,0 und 2,5 µg). Die Detektion der überexprimierten FLAG-TWIST1-Fusionsproteine erfolgte mit einem Anti-FLAG-Antikörper, während die Detektion der überexprimierten myc-TWIST1-Fusionsproteine mit einem Anti-myc-Antikörper erfolgte. Als Ladekontrolle wurde das Haushaltprotein α -Tubulin in den Rohlysaten mit einem Anti- α -Tubulin-Antikörper detektiert. Links sind die Molekulargewichte des verwendeten Proteinstandards in kDa angegeben. $n=2$.

In allen mit pFLAG-CMV4-Dest-TWIST1 und pRK5-myc-Dest-TWIST1 transfizierten HEK293T-Zellen konnte FLAG-TWIST1 und myc-TWIST1 nachgewiesen werden. Dabei wurde sowohl bei FLAG-TWIST1- als auch bei myc-TWIST1- exprimierenden Zellen eine Sättigung erreicht, denn es konnte sowohl in Abbildung 16 (A) als auch (B) ab einer Menge von 1,5 µg eingesetzter DNA kein Unterschied in der Menge an exprimiertem FLAG-TWIST1 oder myc-TWIST1 nachgewiesen werden. Die Negativkontrollen in Abbildung 16 (A und B) zeigten keine unspezifischen Signale. Auffällig jedoch ist, dass FLAG-TWIST1 und myc-TWIST1 nicht die gleichen Molekulargewichte aufweisen: Erwartet wurde eine Masse von etwa 27 kDa, wie auch in Abbildung 16 (A) gezeigt. Myc-TWIST1 in Abbildung 16 (B) hat jedoch ein Molekulargewicht von ca. 35 kDa.

Abbildung 16 zeigt repräsentative Blots von insgesamt zwei Experimenten.

4. Untersuchung der subzellulären Lokalisation von EGFP- und HA-FBXW11-Fusionsproteinen in CHO-K1-Zellen mittels Immunfluoreszenz

Wie bereits einführend erwähnt, konnte gezeigt werden, dass die WD40-Repeat-Domäne (WD1-7) für die zelluläre Lokalisation von FBXW11 eine große Bedeutung hat (Putters et al. 2011). Mittels Immunfluoreszenzexperimenten soll geprüft werden, ob die in dieser Arbeit untersuchten Missense-Mutationen, die sich in verschiedenen WD40-Repeats der WD40-Repeat-Domäne befinden, die Lokalisation von FBXW11 beeinflussen. Hierfür standen alle EGFP-FBXW11- und HA-FBXW11-Fusionskonstrukte zur Verfügung.

CHO-K1-Zellen wurden auf Deckgläschen in 6-Well-Zellkulturplatten ausgesät und am darauffolgenden Tag mit 2,0 µg DNA der Expressionskonstrukte transient transfiziert. Am nächsten Tag erfolgte die Immunfluoreszenzfärbung. Der N-terminale EGFP-Tag der exprimierten EGFP-FBXW11-Fusionsproteine erlaubte es, ohne Antikörperzugabe detektiert zu werden (grün), während für die exprimierten HA-FBXW11-Fusionsproteine ein primärer Anti-HA-Antikörper und ein sekundärer Alexa Fluor 488-konjugierter Antikörper verwendet wurden (grün). Die DNA wurde mit DAPI angefärbt (blau). Die Auswertung erfolgte mit einem Zeiss ApoTome. Als Negativkontrolle für die EGFP-FBXW11-Fusionsproteine diente der Leervektor pEGFP-C3-Dest; für die HA-FBXW11-Fusionsproteine diente der Leervektor pMT2SM-HA als Negativkontrolle.

4.1. Untersuchung der subzellulären Lokalisation von EGFP- und HA-FBXW11- Proteinvarianten in CHO-K1-Zellen

Abbildung 17 zeigt beispielhaft die subzelluläre Lokalisation von EGFP und aller EGFP-FBXW11-Proteinvarianten in CHO-K1-Zellen. EGFP lokalisierte gleichermaßen im Zytoplasma wie auch im Nukleus. Für EGFP-FBXW11^{WT} wurde eine vorwiegend nukleäre Lokalisation beobachtet, wobei sich auch ein Anteil diffus im Zytoplasma befindet. Auffällig ist, dass EGFP-FBXW11^{WT} in bestimmten Strukturen des Nukleus nicht vorliegt. Dies ist an der dunklen Schattierung dieser Areale zu erkennen. Eine ähnliche Lokalisation war auch für EGFP-FBXW11^{R350W} nachweisbar. Die Überexpression von EGFP-FBXW11^{G229R} und EGFP-FBXW11^{S367F} ergab jedoch ein etwas anderes Verteilungsmuster innerhalb der Zelle: Diese zeigten eine vorwiegend zytoplasmatische Lokalisation. EGFP-FBXW11^{E431K} zeigte verschiedene Verteilungsmuster, daher sind in Abbildung 17 EGFP-FBXW11^{E431K}-exprimierende

CHO-K1-Zellen zu sehen, die das Mutantenprotein in unterschiedlichen Regionen der Zelle zeigen: Zum einen befand sich EGFP-FBXW11^{E431K} diffus im Zytoplasma und im Nukleus (Abbildung 17, obere Reihe), zum anderen wurde für EGFP-FBXW11^{E431K}, dem Wildtyp ähnlich, eine hauptsächlich nukleäre Lokalisation mit einem diffusen Anteil im Zytoplasma beobachtet (Abbildung 17, mittlere Reihe). Es lagen jedoch auch Zellen vor, in welchen sich EGFP-FBXW11^{E431K} fast ausschließlich im Zytoplasma befand (Abbildung 17, untere und obere Reihe). Zudem lagen die mit pEGFP-FBXW11^{E431K} transfizierten Zellen vermehrt in apoptotischen oder nekrotischen Zuständen vor (Daten nicht gezeigt). Neben der subzellulären Lokalisation aller EGFP-Fusionsproteine ist in Abbildung 17 zudem eine Aufnahme von Zellen während der Zytokinese entstanden. Es ist deutlich zu erkennen, dass sich EGFP-FBXW11^{S367F} während der Zytokinese in der Region des Mittelkörpers befindet (Zelle ist mit einem Pfeil markiert).

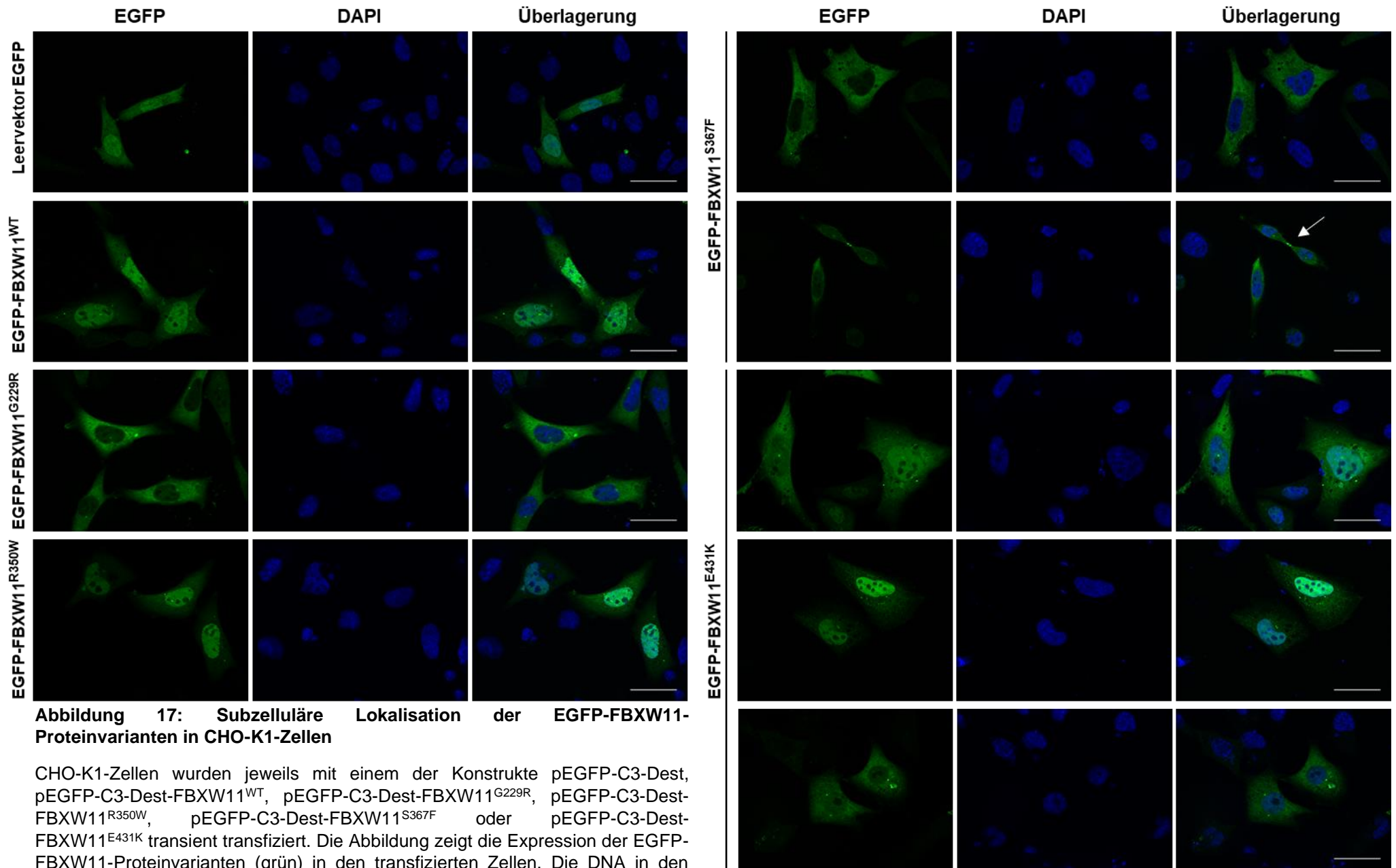


Abbildung 17: Subzelluläre Lokalisation der EGFP-FBXW11-Proteinvarianten in CHO-K1-Zellen

CHO-K1-Zellen wurden jeweils mit einem der Konstrukte pEGFP-C3-Dest, pEGFP-C3-Dest-FBXW11^{WT}, pEGFP-C3-Dest-FBXW11^{G229R}, pEGFP-C3-Dest-FBXW11^{R350W}, pEGFP-C3-Dest-FBXW11^{S367F} oder pEGFP-C3-Dest-FBXW11^{E431K} transient transfiziert. Die Abbildung zeigt die Expression der EGFP-FBXW11-Proteinvarianten (grün) in den transfizierten Zellen. Die DNA in den Zellkernen wurde mit DAPI angefärbt (blau). Die Bilder wurden mit einem Zeiss ApoTome aufgenommen. Der weiße Pfeil zeigt auf die Lokalisation von EGFP-FBXW11^{S367F} während der Zytokinese am Mittelkörper. Maßstab: 50 µm

Um zu untersuchen, ob der EGFP-Tag die Lokalisation der FBXW11-Fusionsproteine beeinflusst, wurden CHO-K1-Zellen mit verschiedenen HA-FBXW11-Fusionskonstrukten transient transfiziert. Abbildung 18 zeigt beispielhaft die subzelluläre Lokalisation aller HA-FBXW11-Proteinvarianten in CHO-K1-Zellen. Die mit dem Leervektor pMT2SM-HA transfizierten Zellen zeigten keine unspezifischen grünen Fluoreszenzsignale. Wie auch EGFP-FBXW11^{WT} konnte HA-FBXW11^{WT} überwiegend im Nukleus nachgewiesen werden, wobei sich auch hier ein Anteil diffus im Zytoplasma befindet. In einigen Strukturen innerhalb des Nukleus war HA-FBXW11^{WT} jedoch nicht lokalisiert. HA-FBXW11^{G229R} und HA-FBXW11^{S367F} zeigten ein Verteilungsmuster mit klarer Lokalisation im Zytoplasma. HA-FBXW11^{R350W} und HA-FBXW11^{E431K} lagen zum einen sowohl im Nukleus als auch im Zytoplasma vor. In anderen Zellen befanden sich die beiden Fusionsproteine eher nur im Zytoplasma. Die Auswertung der HA-FBXW11^{E431K}-exprimierenden Zellen wurde jedoch auch hier durch den hohen Anteil apoptotischer und nekrotischer Zellen erschwert (Daten nicht gezeigt).

Die Experimente zur Untersuchung von HA- und EGFP-FBXW11-Fusionsproteinen in CHO-K1-Zellen wurden ein zweites Mal durchgeführt und zeigten die gleichen Verteilungsmuster der verschiedenen FBXW11-Proteinvarianten (nicht gezeigt).

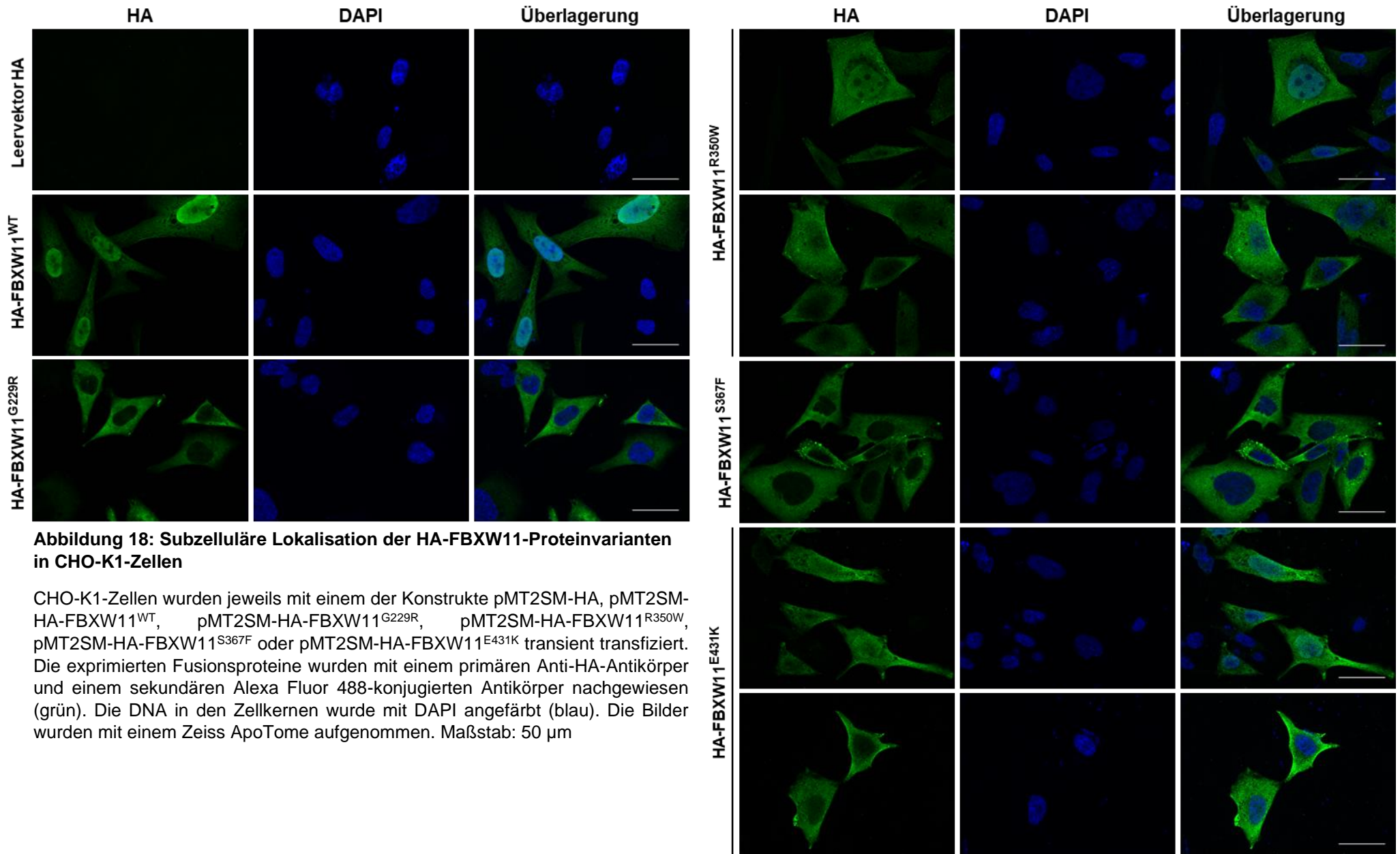


Abbildung 18: Subzelluläre Lokalisation der HA-FBXW11-Proteinvarianten in CHO-K1-Zellen

CHO-K1-Zellen wurden jeweils mit einem der Konstrukte pMT2SM-HA, pMT2SM-HA-FBXW11^{WT}, pMT2SM-HA-FBXW11^{G229R}, pMT2SM-HA-FBXW11^{R350W}, pMT2SM-HA-FBXW11^{S367F} oder pMT2SM-HA-FBXW11^{E431K} transient transfiziert. Die exprimierten Fusionsproteine wurden mit einem primären Anti-HA-Antikörper und einem sekundären Alexa Fluor 488-konjugierten Antikörper nachgewiesen (grün). Die DNA in den Zellkernen wurde mit DAPI angefärbt (blau). Die Bilder wurden mit einem Zeiss ApoTome aufgenommen. Maßstab: 50 µm

4.2. Untersuchung der subzellulären Lokalisation des myc-TWIST1-Fusionsproteins nach Koexpression von EGFP- bzw. HA-FBXW11-Proteinvarianten in CHO-K1-Zellen

Nach der Untersuchung der subzellulären Lokalisation von EGFP- und HA-FBXW11-Proteinvarianten durch Einzelexpression in CHO-K1-Zellen wurden Kollokalisationsexperimente von HA- bzw. EGFP-FBXW11-Fusionsproteinen mit myc-TWIST1-Fusionsproteinen durchgeführt. Zunächst sollte allerdings die subzelluläre Lokalisation von myc-TWIST1 in einer Einzelexpression untersucht werden. Dafür wurden CHO-K1-Zellen auf Deckgläschen in 6-Well-Zellkulturplatten ausgesät und am darauffolgenden Tag mit 2,0 µg DNA transient transfiziert. Am nächsten Tag erfolgte die Immunfluoreszenzfärbung.

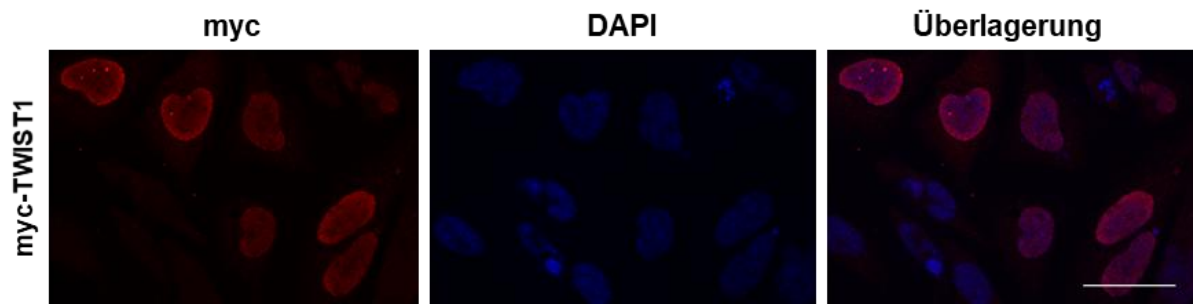


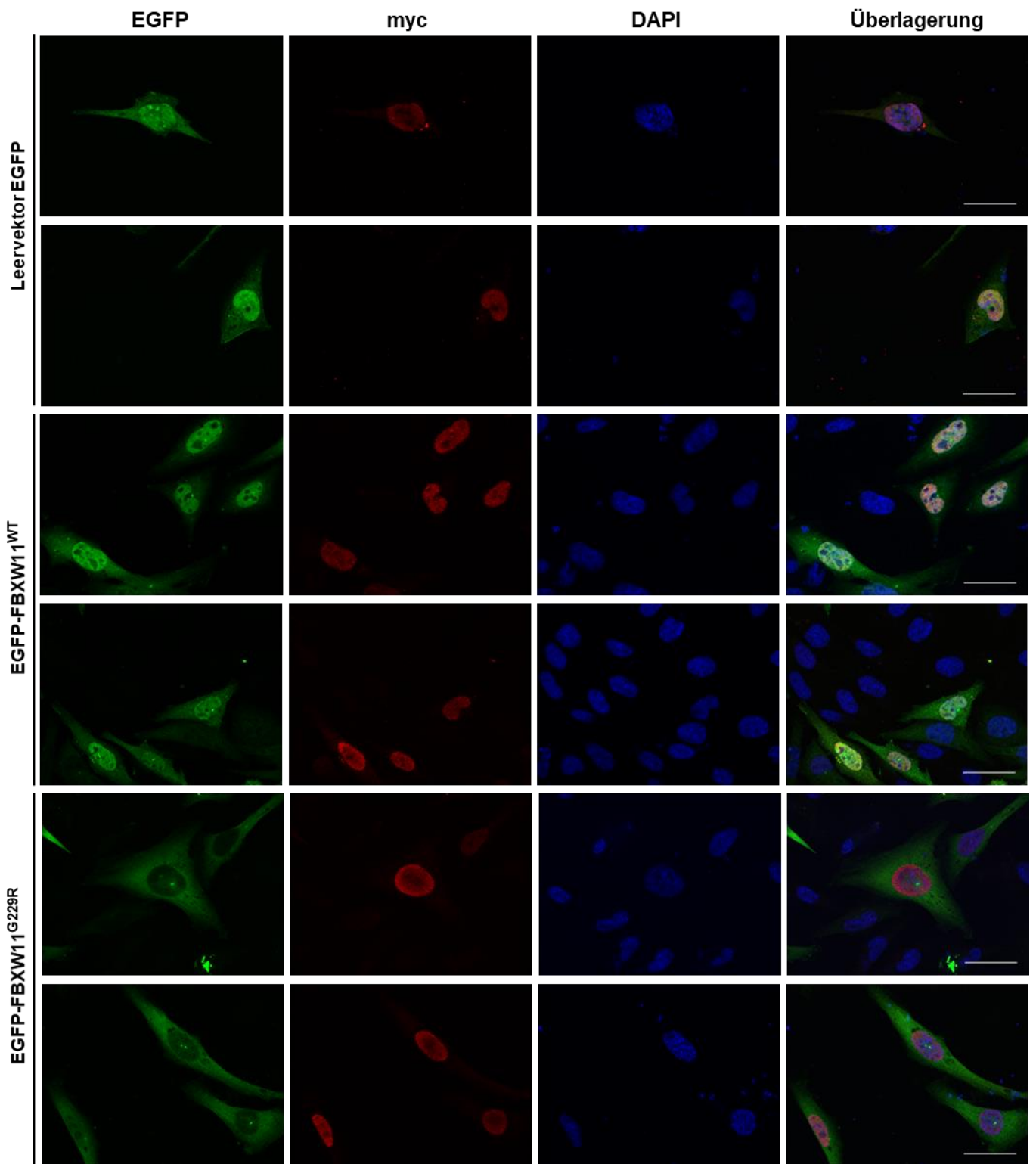
Abbildung 19: Subzelluläre Lokalisation von myc-TWIST1-Fusionsproteinen in CHO-K1-Zellen

CHO-K1-Zellen wurden mit pRK5-myc-Dest-TWIST1-Fusionskonstrukten transient transfiziert. Die exprimierten Fusionsproteine wurden anschließend mit einem Anti-myc-Primärantikörper und einem Alexa Fluor 546-konjugiertem Sekundärantikörper detektiert (rot). Die DNA in den Zellkernen wurde mit DAPI angefärbt (blau). Die Bilder wurden mit einem Zeiss ApoTome aufgenommen. Maßstab: 50 µm.

Der N-terminale myc-Tag konnte mit Hilfe eines primären Anti-myc-Antikörpers und eines sekundären Alexa Fluor 546-konjugierten Antikörpers detektiert werden (rot). Die DNA in den Zellkernen wurde mit DAPI angefärbt (blau). Für myc-TWIST1 wurde eine nukleäre Lokalisation beobachtet (Abbildung 19).

Für die Koexpression von verschiedenen FBXW11-Proteinvarianten mit myc-TWIST1 wurden erneut CHO-K1-Zellen auf Deckgläschen in 6-Well-Zellkulturplatten ausgesät. Am darauffolgenden Tag wurden diese mit 1,5 µg FBXW11- und 1,0 µg myc-TWIST1-Fusionskonstrukt-DNA transient transfiziert. Am nächsten Tag erfolgte die Immunfluoreszenzfärbung. Die Detektion der EGFP-FBXW11- und HA-FBXW11-Fusionsproteine erfolgte wie in Kapitel 4 beschrieben (grün). Myc-TWIST1 wurde wie oben beschrieben detektiert (rot). Die DNA wurde mit DAPI angefärbt (blau).

Abbildung 20 zeigt die subzelluläre Lokalisation von myc-TWIST1 nach Koexpression mit verschiedenen EGFP-FBXW11-Fusionsproteinen in CHO-K1-Zellen. EGFP lag gleichmäßig im Zytoplasma und im Nukleus vor. Myc-TWIST1 konnte auch bei Koexpression mit allen EGFP-FBXW11-Proteinvarianten im Nukleus lokalisiert werden. Die subzelluläre Verteilung der EGFP-FBXW11-Fusionsproteine veränderte sich nach Koexpression mit myc-TWIST1 nicht und ist mit dem Verteilungsmuster der Einzelexpressionen vergleichbar. Lediglich EGFP-FBXW11^{E431K}-exprimierenden Zellen zeigten nach Koexpression mit myc-TWIST1 eine Verschiebung der Lokalisation zum Kern hin, d.h. die Anzahl an Zellen, in denen sich EGFP-FBXW11^{E431K} diffus im Zytoplasma und prominent im Nukleus befindet, scheint erhöht zu sein. Nach Überlagerung der Aufnahmen kommt es aufgrund der Kolo­kalisierung von myc-TWIST1 und EGFP-FBXW11^{WT}, EGFP-FBXW11^{R350W} bzw. EGFP-FBXW11^{E431K} zu einer gelblich/bläulichen Färbung im Nukleus der CHO-K1-Zellen. Aufgrund der Abwesenheit von EGFP-FBXW11^{G229R} und EGFP-FBXW11^{S367F} im Nukleus ist diese Pseudofärbung in diesen Mutantenproteinen nicht zu erkennen. In diesem Fall nimmt der Zellkern eine purpurrote Farbe an.



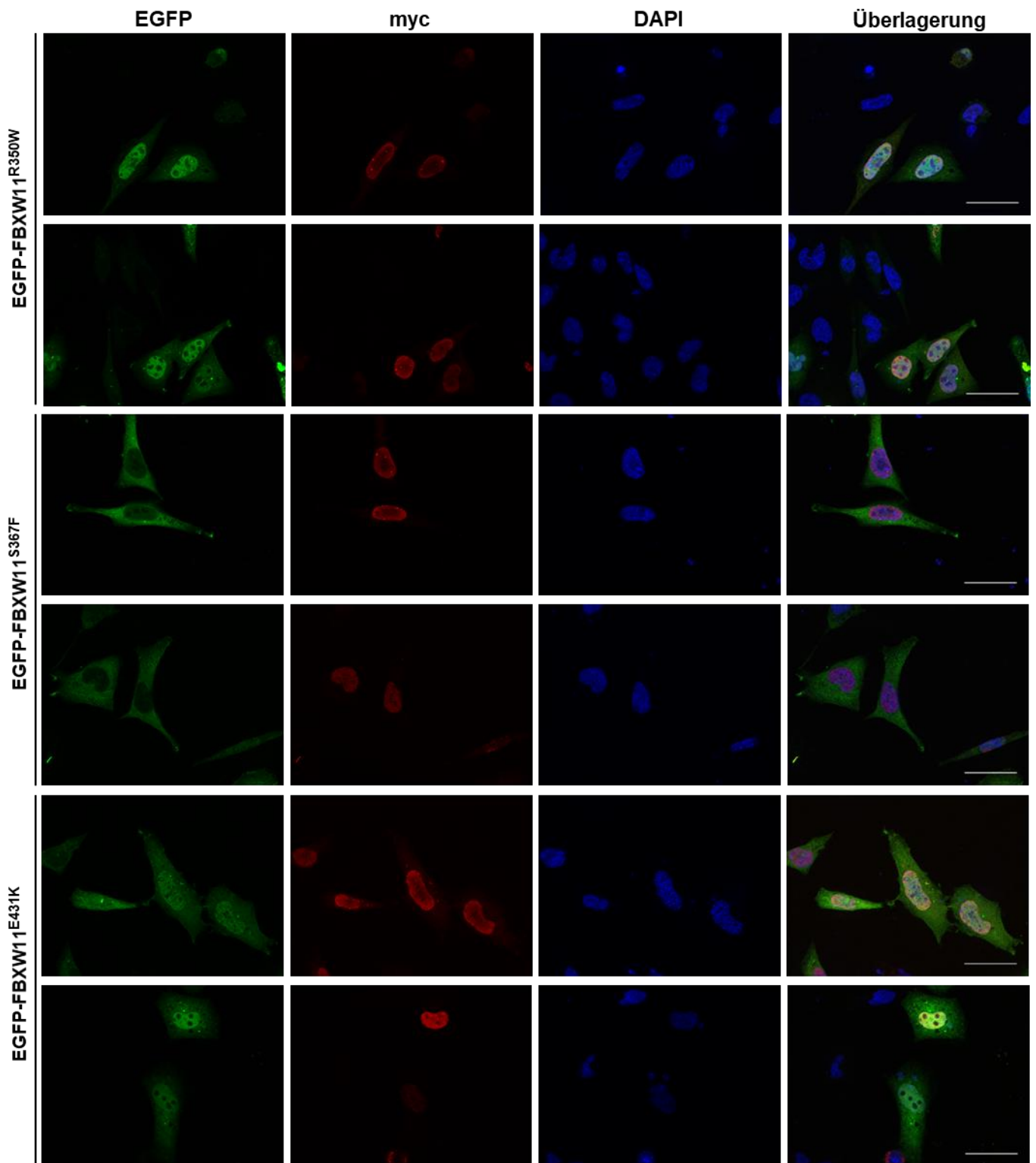
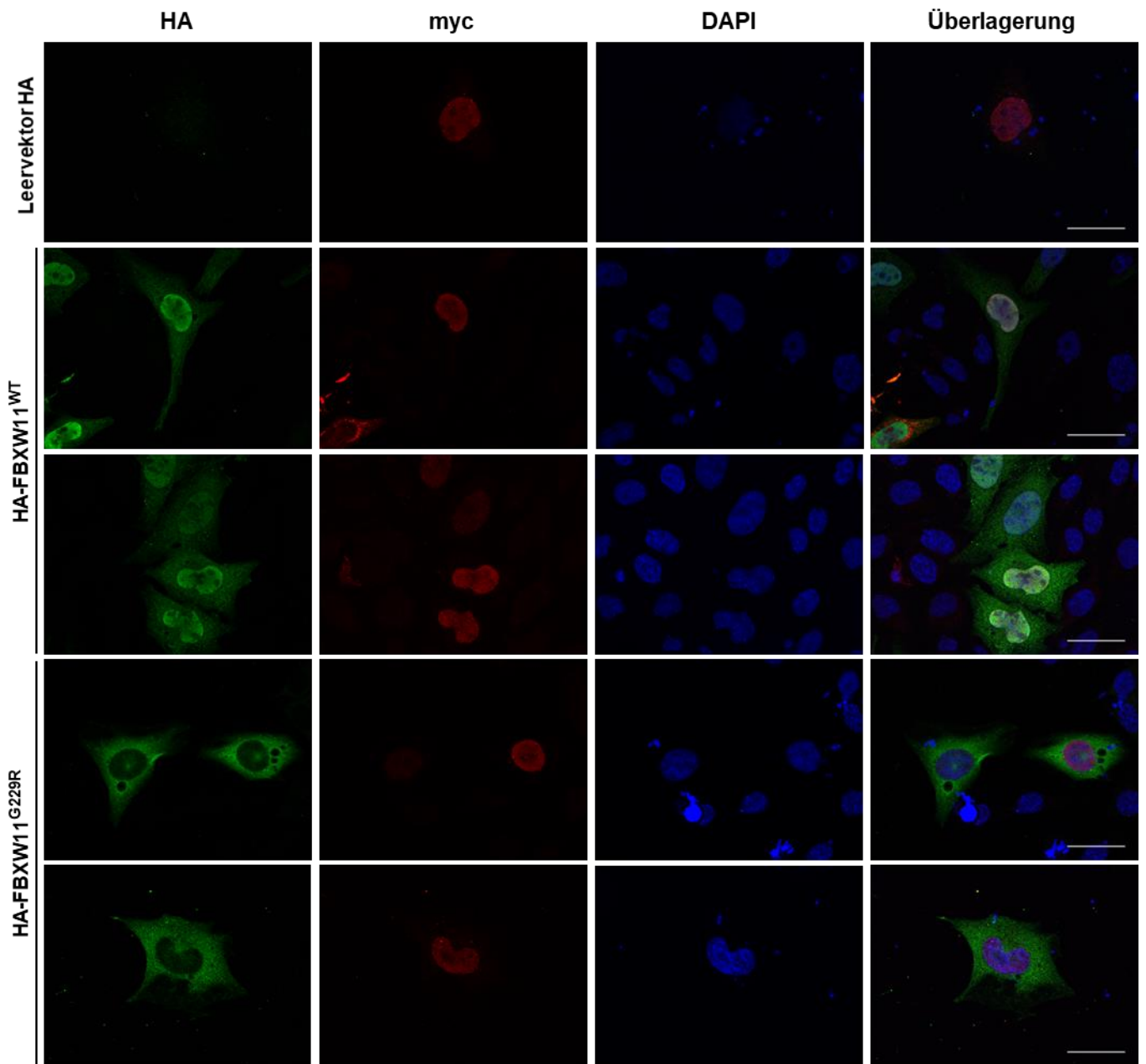


Abbildung 20: Kolokalisation von EGFP-FBXW11-Proteinvarianten mit myc-TWIST1-Fusionsproteinen in CHO-K1-Zellen

CHO-K1-Zellen wurden jeweils mit einem der Konstrukte pEGFP-C3-Dest, pEGFP-C3-Dest-FBXW11^{WT}, pEGFP-C3-Dest-FBXW11^{G229R}, pEGFP-C3-Dest-FBXW11^{R350W}, pEGFP-C3-Dest-FBXW11^{S367F} oder pEGFP-C3-Dest-FBXW11^{E431K} transient transfiziert. Zudem erfolgte eine Kotretransfektion mit pRK5-myc-Dest-TWIST1-Fusionskonstrukten. Die Abbildung zeigt die Expression der EGFP-FBXW11-Proteinvarianten (grün) in den transfizierten Zellen. Die Detektion des myc-TWIST1-Fusionsproteins erfolgte mit Hilfe eines Anti-myc-Primärantikörpers sowie eines Alexa-Fluor 546-konjugierten Sekundärantikörpers (rot). Die DNA in den Zellkernen wurde mit DAPI angefärbt (blau). Die Bilder wurden mit einem Zeiss ApoTome aufgenommen. Maßstab: 50 µm.

Abbildung 21 zeigt die subzelluläre Lokalisation von myc-TWIST1 nach Koexpression mit verschiedenen HA-FBXW11-Fusionsproteinen in CHO-K1-Zellen. Die mit dem Leervektor pMT2SM-HA transfizierten Zellen zeigten keine unspezifischen grünen Fluoreszenzsignale. Myc-TWIST1 konnte auch bei Koexpression mit allen HA-FBXW11-Proteinvarianten im Nukleus lokalisiert werden. Die subzelluläre Verteilung von HA-FBXW11^{WT}, HA-FBXW11^{G229R} und HA-FBXW11^{S367F} veränderte sich nach Koexpression mit myc-TWIST1 nicht und ist mit dem Verteilungsmuster der Einzelexpressionen vergleichbar. Lediglich HA-FBXW11^{R350W} und HA-FBXW11^{E431K} wiesen bei Koexpression mit myc-TWIST1 ein anderes Verteilungsmuster auf als zuvor in der Einzelexpression. Nach Einzelexpression waren sowohl HA-FBXW11^{R350W} als auch HA-FBXW11^{E431K} eher im Zytoplasma bzw. sowohl im Zytoplasma als auch im Zellkern lokalisiert. Bei Koexpression mit myc-TWIST1 zeigten HA-FBXW11^{R350W} und HA-FBXW11^{E431K} jedoch eine prominente Lokalisation im Zellkern, wenngleich sich die beiden Mutantenproteine auch weiterhin diffus im Zytoplasma befanden. Nach Überlagerung der Aufnahmen kommt es aufgrund der Kolo-kalisation von myc-TWIST1 und HA-FBXW11^{WT}, HA-FBXW11^{R350W} und HA-FBXW11^{E431K} zu einer gelblichen/bläulichen Färbung im Nukleus der CHO-K1-Zellen. Aufgrund der Abwesenheit von HA-FBXW11^{G229R} und EGFP-FBXW11^{S367F} im Nukleus ist diese Pseudofärbung nicht zu erkennen. Dann nimmt der Zellkern eine purpurrote Farbe an.



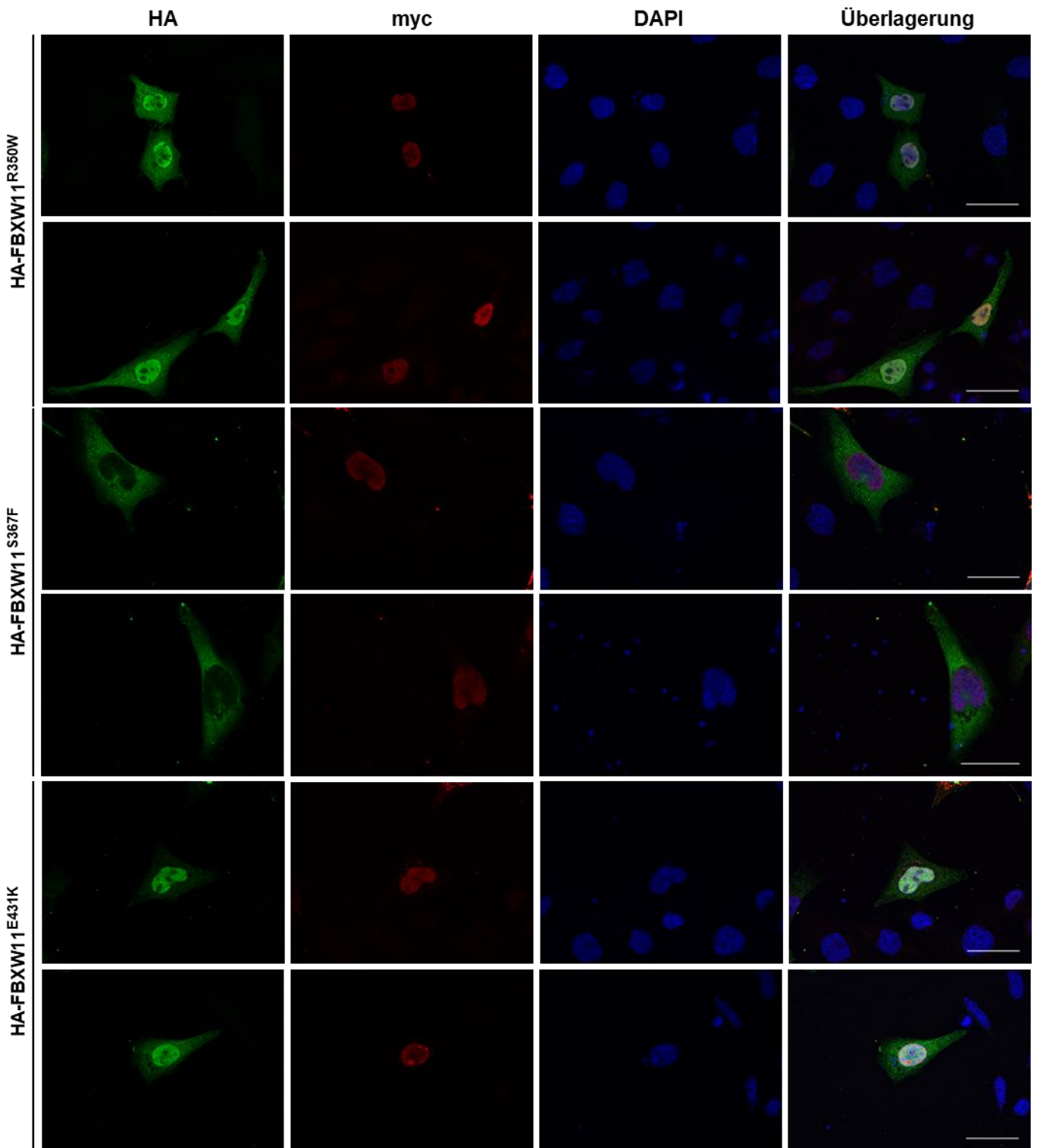


Abbildung 21: Kolokalisation von HA-FBXW11-Proteinvarianten mit myc-TWIST1-Fusionsproteinen in CHO-K1-Zellen

CHO-K1-Zellen wurden jeweils mit einem der Konstrukte pMT2SM-HA, pMT2SM-HA-FBXW11^{WT}, pMT2SM-HA-FBXW11^{G229R}, pMT2SM-HA-FBXW11^{R350W}, pMT2SM-HA-FBXW11^{S367F} oder pMT2SM-HA-FBXW11^{E431K} transient transfiziert. Zudem erfolgte eine Kotransfektion mit dem pRK5-myc-Dest-TWIST1-Fusionskonstrukt. Die exprimierten HA-Fusionsproteine wurden mit einem primären Anti-HA-Antikörper und einem sekundären Alexa-Fluor 488-konjugierten Antikörper nachgewiesen (grün). Die Detektion des myc-TWIST1-Fusionsproteins erfolgte mit Hilfe eines Anti-myc-Primärantikörpers und eines Alexa-Fluor 546-konjugierten Sekundärantikörpers (rot). Die DNA in den Zellkernen wurde mit DAPI angefärbt (blau). Die Bilder wurden mit einem Zeiss ApoTome aufgenommen. Maßstab: 50 µm.

VI. Diskussion

Im Rahmen eines Forschungsprojektes in der Arbeitsgruppe von Frau Prof. Kutsche wurde bei einem Patienten die *de novo* Missense-Mutation c.1100C>T/p.(Ser367Phe) im *FBXW11*-Gen identifiziert. Drei weitere krankheitsassoziierte *de novo* Missense-Mutationen im *FBXW11*-Gen wurden zudem erstmalig von Holt et al. (2019) beschrieben: c.685G>C/p.(Gly229Arg), c.1048C>T/p.(Arg350Trp) und c.1291G>A/p.(Glu431Lys). Im ersten Teil dieser Arbeit wurden verschiedene Fusionskonstrukte mit humanem Wildtyp-*FBXW11* und den oben beschriebenen vier Varianten durch verschiedene Klonierungsschritte hergestellt. Anschließend wurden HEK293T-Zellen mit diesen Konstrukten transient transfiziert und die *FBXW11*-Fusionsproteine heterolog exprimiert, um die Proteinexpression durch Immunblotting-Experimente zu analysieren. Zusätzlich wurden auch getaggte TWIST1-Proteine in HEK293T-Zellen heterolog exprimiert und ebenfalls mittels Immunblottings detektiert. Der dritte Teil dieser Arbeit beschäftigte sich mit der Untersuchung der subzellulären Verteilung der *FBXW11*-Proteinvarianten nach Überexpression in CHO-K1-Zellen. Abschließend wurde analysiert, ob sich die subzelluläre Lokalisation des Wildtyp-*FBXW11*-Proteins und/oder eines der vier *FBXW11*-Mutantenproteine durch eine Koexpression mit dem Transkriptionsfaktor TWIST1 verändert. Im Folgenden sollen nun die Versuchsergebnisse diskutiert und Rückschlüsse auf mögliche molekulare Mechanismen gezogen werden.

1. Nachweis von Wildtyp-*FBXW11* und vier *FBXW11*-Mutantenproteinen sowie von getaggttem TWIST1 nach heterologer Expression in HEK293T-Zellen

Nach der Herstellung von verschiedenen EGFP- und HA-Fusionskonstrukten mit humanem Wildtyp-*FBXW11* und den vier mutierten Varianten durch unterschiedliche Klonierungsstrategien konnten die Fusionskonstrukte durch eine heterologe Proteinexpression in HEK293T-Zellen und anschließendes Immunblotting auf ihre Funktionalität hin überprüft werden. Zudem konnte der Nachweis der Proteinmenge Hinweise auf die Proteinstabilität geben. Häufig führen Missense-Mutationen zu einer verringerten Proteinstabilität bzw. zu einer Erkennung des mutierten Proteins durch die Zelle. Ein vorzeitiger Abbau des Proteins durch zelleigene Prozesse geht dann mit dem Verlust der Funktion einher (Schaaf und Zschocke 2018). Die ektopische Expression der *FBXW11*-Proteinvarianten und die anschließende Detektion der

Proteinmenge könnte außerdem auf selektive Nachteile von FBXW11-Mutantenprotein-exprimierenden Zellen hindeuten, wenn neben einer geringeren Menge an FBXW11-Mutantenprotein auch eine geringere Proteinmenge der Ladekontrolle detektiert werden würde.

Sowohl die HA- als auch die EGFP-getaggten überexprimierten FBXW11-Wildtyp-Proteine und mutierten Proteinvarianten konnten mittels Immunblottings nachgewiesen werden. Die im ersten Teil dieser Arbeit hergestellten Fusionskonstrukte sind somit funktionsfähig und die FBXW11-Mutantenproteine werden nicht abgebaut und sind stabil. Die Proteinmenge der EGFP- und HA-Wildtypproteine variierte in allen Experimenten leicht. Die detektierte Proteinmenge der HA- bzw. EGFP-getaggten Mutantenproteine wiesen ebenfalls eine geringe Variabilität im Vergleich zu Wildtyp-Protein-exprimierenden Zellen auf. Die geringen Unterschiede sind am ehesten durch Pipettierfehler bei der Versuchsdurchführung zu erklären, und die Experimente sollten erneut durchgeführt werden. Die Proteinmenge der Ladekontrolle konnte ebenfalls in allen Experimenten gleichmäßig detektiert werden, und so kann auch ein selektiver Nachteil für FBXW11-Mutantenprotein-exprimierende Zellen eher ausgeschlossen werden.

Neben FBXW11-Fusionsproteinen wurde myc- und FLAG-getaggtetes TWIST1 ebenfalls heterolog in HEK293T-Zellen überexprimiert und die Proteinmenge anschließend mittels Immunblottings nachgewiesen. Für die Transfektion wurden verschiedene Mengen DNA der TWIST1-Fusionskonstrukte eingesetzt. Sowohl bei myc- als auch bei FLAG-getaggttem TWIST1 konnte ab einer DNA-Menge von 1,5 µg eine Sättigung beobachtet werden. Auffällig ist jedoch, dass myc- und FLAG-TWIST1 unterschiedliche Molekulargewichte aufwiesen: Erwartet wurde eine Masse von etwa 27 kDa, jedoch wies myc-TWIST1 ein Molekulargewicht von ca. 35 kDa auf. Eine Vermutung hierfür wäre, dass der myc- bzw. FLAG-Tag die Ubiquitinierung von TWIST1 beeinflusst. Ubiquitin besitzt ein Molekulargewicht von ca. 8,5 kDa und könnte das Laufverhalten des Proteins dementsprechend verändern. Diese Hypothese könnte durch die Zugabe eines Anti-Ubiquitin-Antikörpers auf die PVDF-Membran mit zuvor detektiertem myc- und FLAG-TWIST1 überprüft werden, um ubiquitiniertes TWIST1 nachzuweisen.

2. Mutationen im *FBXW11*-Gen führen zu veränderten subzellulären Lokalisationen der kodierten Proteine nach Überexpression in CHO-K1-Zellen

In dieser Arbeit wurden die Auswirkungen der vier bekannten Mutationen im *FBXW11*-Gen auf die subzelluläre Lokalisation des kodierten Proteins in CHO-K1-Zellen untersucht. Als Teil des SCF-Ubiquitin-Ligase-Komplexes ist *FBXW11* bei der Erkennung und Bindung der E3-Substratproteine involviert. Die vier oben beschriebenen Mutationen befinden sich in unterschiedlichen WD40-Repeats der Substratbindungsdomäne von *FBXW11*, der WD40-Repeat-Domäne. Eine Veränderung in dieser hoch konservierten und funktionell bedeutsamen Domäne könnte in einer Unfähigkeit münden, weiterhin Substratproteine zu binden. In Putters et al. (2011) wird beschrieben, dass die WD40-Repeat-Domäne durch die Substraterkennung die korrekte subzelluläre Lokalisation von *FBXW11* bestimmt. Die richtige Verteilung innerhalb der Zelle ist für die biologische Funktion von *FBXW11* bedeutend.

Ein entscheidendes Element der Proteinverteilung innerhalb einer Zelle bildet u.a. der Molekültransport zwischen Zytoplasma und Nukleus: Die Translation als Teil der Proteinbiosynthese findet an den Ribosomen im Zytoplasma statt; folglich befindet sich jedes Protein nach der Synthese zunächst im Zytoplasma. Proteine, die jedoch innerhalb des Nukleus benötigt werden, müssen durch die Kernporen in den Nukleus eingeschleust werden. Dabei gelangen kleine Moleküle und Proteine durch passive Diffusion in den Zellkern, während größere Proteine (ab etwa 60 kDa), wie z.B. Transkriptionsfaktoren und DNA-/RNA-Polymerasen, mit Hilfe von Importinen in den Nukleus transportiert werden müssen (Alberts et al. 2017). Importine erkennen spezifische Aminosäuresequenzen in den zu transportierenden Proteinen (sogenannte Kernlokalisations-signale), interagieren mit Proteinen an Kernporenkomplexen und geleiten so das zu transportierende Protein in den Nukleus hinein. Äquivalent dazu existieren auch Kernexportsignale sowie die dazugehörigen Exportine, welche Makromoleküle durch Kernexportrezeptoren aus dem Nukleus in das Zytosol geleiten (Hirsch-Kauffmann et al. 2009; Alberts et al. 2017). In einem Multikomponentenkomplex muss lediglich eines der Proteine das Kernlokalisations-/Kernexportsignal aufweisen, damit der gesamte Proteinkomplex in den Zellkern hinein oder aus dem Zellkern hinaus transportiert werden kann (Alberts et al. 2017).

Für die Untersuchung der subzellulären Lokalisation von Wildtyp-FBXW11 und der vier Mutantenproteine wurden sowohl pEGFP- als auch pMT2SM-HA-Fusionskonstrukte verwendet. CHO-K1-Zellen wurden mit diesen Konstrukten transient transfiziert und die FBXW11-Fusionsproteine heterolog exprimiert, sodass die subzelluläre Lokalisation durch Immunfluoreszenzexperimente untersucht werden konnte. Der EGFP-Tag ist im Vergleich zum HA-Tag mit etwa 27 kDa ein relativ großer Tag und kann dazu führen, dass die subzelluläre Lokalisation der Fusionsproteine beeinflusst wird. Die Untersuchung der zellulären Verteilung von FBXW11 mit Hilfe von HA-FBXW11-Fusionsproteinen diente daher u.a. als ein Kontroll- bzw. Vergleichsexperiment.

Sowohl EGFP-FBXW11^{WT} als auch HA-FBXW11^{WT} befanden sich vorwiegend im Nukleus, wobei auch ein Anteil diffus im Zytoplasma lokalisierte, der jedoch durch die Überexpression von FBXW11^{WT} hervorgerufen worden sein könnte. In Putters et al. (2011) wird für die hier verwendete Isoform FBXW11 β eine ausschließlich nukleäre Lokalisation beschrieben.

Die FBXW11-Proteinvarianten mit den verschiedenen Mutationen zeigten, verglichen mit dem Wildtyp-Protein, Verteilungsunterschiede innerhalb der Zelle. Dabei zeigten insbesondere EGFP- und HA-FBXW11^{G229R}- sowie EGFP- und HA-FBXW11^{S367F}-exprimierende Zellen eine stark veränderte subzelluläre Lokalisation: Beide Mutantenproteine wiesen eine prominente Lokalisation im Zytoplasma der CHO-K1-Zellen auf.

Auch HA-FBXW11^{R350W} zeigte Unterschiede in der subzellulären Verteilung und befand sich im Gegensatz zum Wildtyp-Protein oftmals gleichmäßig im Nukleus wie auch im Zytoplasma. In anderen Zellen befand sich HA-FBXW11^{R350W} hauptsächlich im Zytoplasma. Im Gegensatz dazu verhielten sich die EGFP-FBXW11^{R350W}-Fusionsproteine eher wie die Wildtyp-Proteine und waren vornehmlich nukleär mit einem Anteil im Zytoplasma lokalisiert. Die Lokalisationsunterschiede sind am ehesten durch die unterschiedlichen Tags zu erklären: Möglicherweise wurde die subzelluläre Lokalisation der Fusionsproteine durch den EGFP-Tag beeinflusst.

EGFP- und HA-FBXW11^{E431K}-exprimierende CHO-K1-Zellen zeigten gemischte Ergebnisse: HA-FBXW11^{E431K} lag zum einen sowohl im Nukleus als auch im Zytoplasma vor. In anderen Zellen befand sich das Fusionsprotein eher nur im

Zytoplasma. EGFP-FBXW11^{E431K} lag, dem Wildtyp ähnlich, hauptsächlich im Nukleus mit einem diffusen Anteil im Zytoplasma, oder auch diffus im Zytoplasma und im Nukleus vor. Es konnten jedoch auch Zellen beobachtet werden, in welchen EGFP-FBXW11^{E431K} fast ausschließlich im Zytoplasma vorlag. Sowohl HA- als auch EGFP-FBXW11^{E431K}-exprimierende Zellen lagen vermehrt in apoptotischen oder nekrotischen Zuständen vor (Daten nicht gezeigt). Wie auch bei EGFP- und HA-FBXW11^{R350W}-exprimierenden Zellen beobachtet, konnte die dem Wildtyp ähnliche Proteinverteilung innerhalb der Zelle ausschließlich bei EGFP-getaggten FBXW11^{E431K}-Fusionsproteinen festgestellt werden, was ebenfalls für eine Tag-spezifische Ursache spricht.

Davon ausgehend, dass die Substraterkennung die korrekte subzelluläre Lokalisation von FBXW11 bewirkt, kann im Umkehrschluss vermutet werden, dass die Substraterkennung durch die Mutationen in *FBXW11* für bestimmte Proteine gestört ist und dass dadurch die veränderte Lokalisation der FBXW11-Proteinvarianten mit den verschiedenen Mutationen bedingt wird. Für FBXW11 wurde kein Kernlokalisierungssignal beschrieben (Xu et al. 2019). Dennoch befindet sich Wildtyp-FBXW11 vornehmlich im Nukleus der Zelle. Die Vermutung liegt nahe, dass FBXW11 Substratproteine bindet, welche derartige Kernlokalisierungssignale aufweisen. Mit Hilfe dieser Substratproteine und der gebundenen Importine wird FBXW11 in den Nukleus eskortiert. Die WD40-Repeat-Domäne würde so die subzelluläre Lokalisation von FBXW11 durch die Bindung eines Substratproteins indirekt bestimmen. Ein vergleichbarer Zusammenhang wurde von Xu et al. (2019) beschrieben: FBXW11 sowie das FBXW11-Homolog FBXW1 wiesen nach Knock-Down des Substratproteins MEK, sowie nach Inhibierung der Kernporenkomplexe in Immunfluoreszenzanalysen eine veränderte Verteilung innerhalb der Zelle auf. Es wird vermutet, dass eine Translokation von MEK auch die Translokation von FBXW1/FBXW11 induziert, da MEK FBXW1/FBXW11 sonst in den Nukleus hinein bzw. aus dem Nukleus hinaus eskortieren würde.

Bevor Kolokalisationsexperimente mit HA- bzw. EGFP-FBXW11-Fusionsproteinen und dem Transkriptionsfaktor TWIST1 durchgeführt wurden, sollte zunächst die subzelluläre Lokalisation von myc-TWIST1 allein untersucht werden. Dafür wurde myc-TWIST1 heterolog exprimiert, sodass die subzelluläre Lokalisation mittels einer Immunfluoreszenzanalyse untersucht werden konnte. Dabei konnte für myc-TWIST1

eine ausschließlich nukleäre Lokalisation beobachtet werden, die auch in Qin et al. (2012) beschrieben wird.

Die Koexpression der HA-FBXW11-Proteinvarianten mit myc-TWIST1 in CHO-K1-Zellen ergab für HA-FBXW11^{WT}, HA-FBXW11^{G229R} und HA-FBXW11^{S367F} die gleichen zellulären Lokalisationen wie zuvor nach Einzelexpression der entsprechenden FBXW11-Proteinvarianten. HA-FBXW11^{R350W}- und HA-FBXW11^{E431K}-exprimierende Zellen zeigten nach Koexpression mit myc-TWIST1 jedoch, dem Wildtyp ähnlich, eine vorwiegend nukleäre Lokalisation mit diffusen Anteilen im Zytoplasma. Eine Koexpression mit myc-TWIST1 ergab für EGFP-FBXW11^{WT}, EGFP-FBXW11^{G229R}, EGFP-FBXW11^{R350W} und EGFP-FBXW11^{S367F} keine veränderte Proteinverteilung innerhalb der CHO-K1-Zellen. Lediglich EGFP-FBXW11^{E431K}-exprimierende Zellen zeigten bei Koexpression mit myc-TWIST1 eine primäre Lokalisation im Nukleus mit diffusem Anteil im Zytoplasma. Die Ergebnisse der Koloalisationsexperimente wiesen keine Unterschiede zwischen den HA-FBXW11- und EGFP-FBXW11-Proteinvarianten auf. Bei einer prominenten Lokalisation im Zellkern konnte zwischen den FBXW11-Proteinvarianten und TWIST1 nach Überlagerung der Mikroskopiebilder zudem eine Koloalisation festgestellt werden; dies ist der Fall bei EGFP- und HA-FBXW11^{WT}, EGFP- und HA-FBXW11^{R350W} und EGFP- und HA-FBXW11^{E431K}. EGFP- und HA-FBXW11^{G229R} sowie EGFP- und HA-FBXW11^{S367F} zeigten keinerlei Koloalitionen mit TWIST1.

TWIST1 ist ein Substratprotein von FBXW11 und wird durch den SCF-Ubiquitin-Ligase-Komplex degradiert. TWIST1 enthält zudem Kernlokalisierungssignale (Singh und Gramolini 2009; Qin et al. 2012; Zhong et al. 2013). Auf diese Weise wird TWIST1 nach der Translation aus dem Zytoplasma in den Nukleus transportiert (Zhong et al. 2013). FBXW11 bindet TWIST1 vermutlich im Zytoplasma und wird mit Hilfe von TWIST1 in den Nukleus eskortiert. Innerhalb des Nukleus könnte TWIST1 dann durch das UPS degradiert werden. Das UPS in der Rolle der zytoplasmatischen Proteindegradation ist zwar bisher am umfassendsten beschrieben, jedoch sind auch Regulationsfunktionen der Transkription durch das UPS innerhalb des Nukleus bekannt. Demnach hat das UPS u.a. Auswirkungen auf die Menge, die Aktivität und die Lokalisation vieler Transkriptionsfaktoren (Muratani und Tansey 2003; Collins und Tansey 2006; Mikecz 2006).

Eine andere Möglichkeit wäre, dass FBXW11 TWIST1 im Nukleus erkennt, bindet und aus dem Nukleus herausführt, im Zytoplasma den SCF-Ubiquitin-Ligase-Komplex rekrutiert und dort den proteasomalen Abbau induziert. Vergleichbares wurde auch von Guo et al. (2016) berichtet: Das FBXW11-Homolog FBXW1 sowie TWIST1 konnten dort in der Einzelexpression mittels Immunfluoreszenzexperimenten primär im Nukleus lokalisiert werden. Bei Inhibierung des Proteasoms mit dem Proteasom-Inhibitor MG132 kolokalisierten TWIST1 und FBXW1 nun nicht mehr ausschließlich im Zellkern, sondern konnten auch im Zytoplasma nachgewiesen werden. Bei Markierung der 20S-Untereinheit des Proteasoms konnte eine Kolokalisation von TWIST1, FBXW1 und der Proteasom-Untereinheit festgestellt werden (Guo et al. 2016) . Es empfiehlt sich, entsprechende Versuche auch mit FBXW11 durchzuführen, um auszuschließen, dass es sich um ein FBXW1-spezifisches Phänomen handelt. Denn auch, wenn FBXW1 und FBXW11 häufig als funktionell redundant beschrieben werden (Putters et al. 2011; Zheng et al. 2016; Kim et al. 2015), gibt es Beispiele, die belegen, dass FBXW1 und FBXW11 unterschiedliche Funktionen haben: So können einige Proteine entweder von FBXW1 oder von FBXW11 gebunden werden (Kim et al. 2015).

Vermutlich führen also die hier untersuchten *FBXW11*-Mutationen dazu, dass die Substraterkennung und -bindung durch die WD40-Repeat-Domäne von FBXW11 gestört ist, FBXW11 wird nicht mehr korrekt lokalisiert, und es kann keine Degradation des Substratproteins (z.B. TWIST1) durch das UPS stattfinden. Möglicherweise führt dies zu einer Akkumulation des Substratproteins (z.B. TWIST1) innerhalb der Zelle. Interessanterweise zeigten Zhong et al. (2013) ebenfalls, dass eine Verringerung oder ein Fehlen von FBXW11 zu einer Akkumulation von TWIST1 führen könnte. Die Auswirkungen einer vermutlich nicht funktionierenden Substraterkennung konnte insbesondere für die Lokalisation der *FBXW11*^{G229R}- und *FBXW11*^{S367F}-Fusionsproteine beobachtet werden. Sowohl in der Einzelexpression als auch bei einer Koexpression mit TWIST1 lokalisierten beide Mutantenproteine im Zytoplasma. Vermutlich ist eine Degradation eines oder mehrerer Substratproteine, wie z.B. TWIST1, somit nicht mehr möglich.

TWIST1 ist allerdings nur eines von vielen Substratproteinen, die von FBXW11 gebunden werden (Kim et al. 2015; Zheng et al. 2016). Defizite in der Substraterkennung und -bindung durch Mutationen in der WD40-Repeat-Domäne betreffen wahrscheinlich nicht ausschließlich nur TWIST1, sondern auch andere

Substratproteine von FBXW11. Die vier in dieser Arbeit untersuchten Mutationen könnten Bindungen zu unterschiedlichen Substratproteinen beeinflussen. Dies würde auch das breite Spektrum an klinischen Phänotypen der vier Patienten erklären, da die Ursache der klinischen Merkmale in verschiedenen, von FBXW11 beeinflussten Proteinen begründet sein könnte. Die Mutantenproteine FBXW11^{R350W} und FBXW11^{E431K} zeigten nach Koexpression mit TWIST1 eine dem FBXW11-Wildtyp ähnliche Lokalisation mit einer prominenten Lokalisation im Nukleus und Anteilen im Zytoplasma. Da sich dieses Bild von der Einzelexpression der Mutantenproteine unterscheidet, könnte vermutet werden, dass die Substraterkennung und -bindung in Bezug auf TWIST1 bei FBXW11^{R350W} und FBXW11^{E431K} intakt ist und TWIST1 FBXW11 in den Nukleus eskortiert. Da dies nicht nach Einzelexpression der beiden FBXW11-Mutantenproteine zu beobachten war, könnte dies durch fehlendes endogenes TWIST1 in CHO-K1-Zellen erklärbar sein. In nachfolgenden Immunfluoreszenz- und/oder Immunblotexperimenten sollte daher mit Hilfe eines Anti-TWIST1-Antikörpers die endogene Menge an TWIST1 in CHO-K1-Zellen bestimmt werden. Sollte sich herausstellen, dass in CHO-K1-Zellen kaum endogenes TWIST1 exprimiert wird, kann vermutet werden, dass die veränderte subzelluläre Lokalisation der Mutantenproteine FBXW11^{R350W} und FBXW11^{E431K} in diesen Zellen möglicherweise durch eine defizitäre Erkennung anderer Substratproteine (und nicht von TWIST1) verursacht wird.

Um methodisch bedingte Problematiken zu eliminieren und statistisch signifikante Ergebnisse zu erhalten, sollten die in dieser Arbeit durchgeführten Fluoreszenzexperimente erneut durchgeführt werden. Um die verschiedenen subzellulären Lokalisationen der FBXW11-Mutantenproteine genauer zu erfassen, sollte eine Kategorisierung der verschiedenen Lokalisationen erfolgen und ausreichend transfizierte Zellen diesbezüglich angeschaut, eingruppiert und gezählt werden.

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Die Ubiquitinierungskaskade des Ubiquitin-Proteasom-Systems	4
Abbildung 2: Schematische Darstellung des SCF-Ubiquitin-Ligase-Komplexes	6
Abbildung 3: Schematische Darstellung der Domänenstruktur von FBXW11	7
Abbildung 4: Schematische Darstellung der Domänenstruktur der drei verschiedenen FBXW11-Isoformen und partielle Aminosäuresequenzen in den sich unterscheidenden N-Termini	8
Abbildung 5: Übersicht über die wesentlichen Klonierungsschritte zur Herstellung von pEGFP-C3-Dest- und pMT2SM-HA-FBXW11-Fusionskonstrukten für FBXW11-Wildtyp und die vier Mutanten	51
Abbildung 6: Darstellung eines Agarosegels mit dem Amplikon der <i>FBXW11</i> -Kodierregion mit der Mutation c.1100C>T und mit dem <i>Nofl</i> und <i>KpnI</i> linearisierten Vektor pMT2SM-HA	52
Abbildung 7: Darstellung eines Agarosegels mit der Restriktionsspaltung einiger Plasmide nach Klonierung der <i>FBXW11</i> -Kodierregion mit c.1100C>T-Mutation in pMT2SM-HA	53
Abbildung 8: Ausschnitt aus dem Sequenzchromatogramm der <i>FBXW11</i> -Kodierregion mit der Mutation c.1100C>T nach Klonierung in pMT2SM-HA und der entsprechenden Wildtypsequenz	53
Abbildung 9: Ausschnitt aus Sequenzchromatogrammen der <i>FBXW11</i> -Kodierregion mit der Mutation c.685G>C, c.1048C>T bzw. c.1291G>A nach Herstellung von pMT2SM-HA-FBXW11-Fusionskonstrukten und Darstellung der entsprechenden Wildtypsequenzen	54
Abbildung 10: Darstellung eines Agarosegels mit dem Amplikon der <i>FBXW11</i> -Kodierregion mit der Mutation c.1100C>T	56
Abbildung 11: Darstellung eines Agarosegels mit der Restriktionsspaltung einiger Plasmide nach der zielgerichteten Klonierung der <i>FBXW11</i> -Wildtyp-Kodierregion in den Gateway Entry-Vektor pENTR/D-TOPO	57
Abbildung 12: Darstellung eines Agarosegels mit der Restriktionsspaltung einiger Plasmide nach LR-Reaktion zwischen dem pENTR/D-TOPO-FBXW11 ^{WT} -Konstrukt und dem Gateway Destinationsvektor pEGFP-C3-Dest	58
Abbildung 13: Schematische Darstellung der in dieser Arbeit untersuchten FBXW11- und TWIST1-Fusionsproteine	59
Abbildung 14: Nachweis der Expression von verschiedenen EGFP-FBXW11-Fusionsproteinen in HEK293T-Zellen mittels Immunblottings	60
Abbildung 15: Nachweis der Expression von verschiedenen HA-FBXW11-Fusionsproteinen in HEK293T-Zellen mittels Immunblottings	62
Abbildung 16: Nachweis der Expression von FLAG-TWIST1- und myc-TWIST1-Fusionsproteinen in HEK293T-Zellen mittels Immunblottings	64
Abbildung 17: Subzelluläre Lokalisation der EGFP-FBXW11-Proteinvarianten in CHO-K1-Zellen	67
Abbildung 18: Subzelluläre Lokalisation der HA-FBXW11-Proteinvarianten in CHO-K1-Zellen	69
Abbildung 19: Subzelluläre Lokalisation von myc-TWIST1-Fusionsproteinen in CHO-K1-Zellen	70

Abbildung 20: Kolokalisation von EGFP-FBXW11-Proteinvarianten mit myc-TWIST1-Fusionsproteinen in CHO-K1-Zellen.....	73
Abbildung 21: Kolokalisation von HA-FBXW11-Proteinvarianten mit myc-TWIST1-Fusionsproteinen in CHO-K1-Zellen.....	76

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Verwendete Materialien für molekularbiologische Methoden und Angabe des Herstellers.....	12
Tabelle 2: Verwendete Materialien für proteinbiochemische Arbeiten und Angabe des Herstellers	13
Tabelle 3: Verwendete Materialien für zellbiologische Methoden und Angabe des Herstellers	13
Tabelle 4: Sonstige in dieser Arbeit verwendete Chemikalien	14
Tabelle 5: Verwendete Gerätschaften und Verbrauchsmaterialien und Angabe des Herstellers	14
Tabelle 6: Auflistung der verwendeten Bakterienstämme und Zelllinien.....	16
Tabelle 7: Verwendete Ausgangsvektoren zur Herstellung neuer Konstrukte für die Expression in eukaryotischen Zellen	17
Tabelle 8: Übersicht über die verwendeten Konstrukte für die Expression in eukaryotischen Zellen.....	17
Tabelle 9: Übersicht über die mittels der Gateway-Technologie hergestellten Konstrukte für die Expression in eukaryotischen Zellen	18
Tabelle 10: Übersicht über verwendete Konstrukte, welche nicht in dieser Arbeit hergestellt wurden	19
Tabelle 11: Übersicht über die in dieser Arbeit verwendeten Primär- und Sekundärantikörper	19
Tabelle 12: Verwendete Oligonukleotide für Klonierungen	21
Tabelle 13: Verwendete Oligonukleotide für Sequenzierungen	22
Tabelle 14: Computerprogramme und bioinformatische Datenbanken.....	28
Tabelle 15: Anregungs- und Emissionswellenlängen der verwendeten Farbstoffe...	47

Literaturverzeichnis

Alberts, Bruce; Johnson, Alexander; Lewis, Julian; Morgan, David; Raff, Martin; Roberts, Keith; Walter, Peter (2017): Molekularbiologie der Zelle. 6. Auflage. Hg. v. Ulrich Schäfer. Weinheim: Wiley-VCH.

Baloghova, Nikol; Lidak, Tomas; Cermak, Lukas (2019): Ubiquitin Ligases Involved in the Regulation of Wnt, TGF- β , and Notch Signaling Pathways and Their Roles in Mouse Development and Homeostasis. In: *Genes* 10 (10). DOI: 10.3390/genes10100815.

Barnes, Ralston M.; Firulli, Anthony B. (2009): A twist of insight - the role of Twist-family bHLH factors in development. In: *The International journal of developmental biology* 53 (7), S. 909–924. DOI: 10.1387/ijdb.082747rb.

Bhatia, Neehar; Thiyagarajan, Saravanan; Elcheva, Irina; Saleem, Mohammed; Dlugosz, Andrzej; Mukhtar, Hasan; Spiegelman, Vladimir S. (2006): Gli2 is targeted for ubiquitination and degradation by beta-TrCP ubiquitin ligase. In: *The Journal of biological chemistry* 281 (28), S. 19320–19326. DOI: 10.1074/jbc.M513203200.

Birnboim, H. C.; Doly, J. (1979): A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. In: *Nucleic Acids Research* 7 (6), S. 1513–1523. DOI: 10.1093/nar/7.6.1513.

Cavodeassi, Florencia; Creuzet, Sophie; Etchevers, Heather C. (2019): The hedgehog pathway and ocular developmental anomalies. In: *Human genetics* 138 (8-9), S. 917–936. DOI: 10.1007/s00439-018-1918-8.

Chen, Zhijian J.; Sun, Lijun J. (2009): Nonproteolytic functions of ubiquitin in cell signaling. In: *Molecular cell* 33 (3), S. 275–286. DOI: 10.1016/j.molcel.2009.01.014.

Ciurea, Alexandru Vlad; Toader, Corneliu (2009): Genetics of craniosynostosis: review of the literature. In: *Journal of Medicine and Life* 2 (1), S. 5–17.

Collins, Galen A.; Tansey, William P. (2006): The proteasome: a utility tool for transcription? In: *Current opinion in genetics & development* 16 (2), S. 197–202. DOI: 10.1016/j.gde.2006.02.009.

el Ghouzzi, V.; Le Merrer, M.; Perrin-Schmitt, F.; Lajeunie, E.; Benit, P.; Renier, D. et al. (1997): Mutations of the TWIST gene in the Saethre-Chotzen syndrome. In: *Nature genetics* 15 (1), S. 42–46. DOI: 10.1038/ng0197-42.

Fang, S.; Weissman, A. M. (2004): A field guide to ubiquitylation. In: *Cellular and molecular life sciences : CMLS* 61 (13), S. 1546–1561. DOI: 10.1007/s00018-004-4129-5.

Frescas, David; Pagano, Michele (2008): Deregulated proteolysis by the F-box proteins SKP2 and beta-TrCP: tipping the scales of cancer. In: *Nature reviews. Cancer* 8 (6), S. 438–449. DOI: 10.1038/nrc2396.

Fujimura, Naoko (2016): WNT/ β -Catenin Signaling in Vertebrate Eye Development. In: *Frontiers in Cell and Developmental Biology* 4, S. 138. DOI: 10.3389/fcell.2016.00138.

Guo, Weiwei; You, Xue; Xu, Daqian; Zhang, Yuxue; Wang, Zheng; Man, Kaiyang et al. (2016): PAQR3 enhances Twist1 degradation to suppress epithelial-mesenchymal transition and metastasis of gastric cancer cells. In: *Carcinogenesis* 37 (4), S. 397–407. DOI: 10.1093/carcin/bgw013.

Hershko, A.; Ciechanover, A. (1998): The ubiquitin system. In: *Annual review of biochemistry* 67, S. 425–479. DOI: 10.1146/annurev.biochem.67.1.425.

Hirsch-Kauffmann, Monica; Schweiger, Manfred; Schweiger, Michal-Ruth (2009): *Biologie und molekulare Medizin. Für Mediziner und Naturwissenschaftler. 7. Aufl.*: Thieme.

Ho, Margaret S.; Tsai, Pei-I; Chien, Cheng-Ting (2006): F-box proteins: the key to protein degradation. In: *Journal of biomedical science* 13 (2), S. 181–191. DOI: 10.1007/s11373-005-9058-2.

Holt, Richard J.; Young, Rodrigo M.; Crespo, Berta; Ceroni, Fabiola; Curry, Cynthia J.; Bellacchio, Emanuele et al. (2019): De Novo Missense Variants in FBXW11 Cause Diverse Developmental Phenotypes Including Brain, Eye, and Digit Anomalies. In: *American journal of human genetics* 105 (3), S. 640–657. DOI: 10.1016/j.ajhg.2019.07.005.

Hotz, Birgit; Arndt, Marco; Dullat, Sonja; Bhargava, Sarah; Buhr, Heinz-J; Hotz, Hubert G. (2007): Epithelial to mesenchymal transition: expression of the regulators snail, slug, and twist in pancreatic cancer. In: *Clin Cancer Res* 13 (16), S. 4769–4776. DOI: 10.1158/1078-0432.CCR-06-2926.

Howard, T. D.; Paznekas, W. A.; Green, E. D.; Chiang, L. C.; Ma, N.; Ortiz de Luna, R. I. et al. (1997): Mutations in TWIST, a basic helix-loop-helix transcription factor, in

Saethre-Chotzen syndrome. In: *Nature genetics* 15 (1), S. 36–41. DOI: 10.1038/ng0197-36.

Jiateng Zhong; Kohei Ogura; Zhiwei Wang; Hiroyuki Inuzuka (2013): Degradation of the Transcription Factor Twist, an Oncoprotein that Promotes Cancer Metastasis. In: *Discovery medicine* 15 (80), 7-15UR

Katoh, Yuriko; Katoh, Masaru (2008): Hedgehog signaling, epithelial-to-mesenchymal transition and miRNA (review). In: *International journal of molecular medicine* 22 (3), S. 271–275.

Kim, Sung-Eun; Yoon, Ju-Yong; Jeong, Woo-Jeong; Jeon, Soung-Hoo; Park, Yoon; Yoon, Jong-Bok et al. (2009): H-Ras is degraded by Wnt/beta-catenin signaling via beta-TrCP-mediated polyubiquitylation. In: *J Cell Sci* 122 (Pt 6), S. 842–848. DOI: 10.1242/jcs.040493.

Kim, Tai Young; Siesser, Priscila F.; Rossman, Kent L.; Goldfarb, Dennis; Mackinnon, Kathryn; Yan, Feng et al. (2015): Substrate trapping proteomics reveals targets of the β TrCP2/FBXW11 ubiquitin ligase. In: *Molecular and cellular biology* 35 (1), S. 167–181. DOI: 10.1128/MCB.00857-14.

Kipreos, E. T.; Pagano, M. (2000): The F-box protein family. In: *Genome Biology* 1 (5), REVIEWS3002. DOI: 10.1186/gb-2000-1-5-reviews3002.

Koolen, David A.; Herbergs, Jos; Veltman, Joris A.; Pfundt, Rolf; van Bokhoven, Hans; Stroink, Hans et al. (2006): Holoprosencephaly and preaxial polydactyly associated with a 1.24 Mb duplication encompassing FBXW11 at 5q35.1. In: *Journal of human genetics* 51 (8), S. 721–726. DOI: 10.1007/s10038-006-0010-8.

Laemmli, U. K. (1970): Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. In: *Nature* 227 (5259), S. 680–685. DOI: 10.1038/227680a0.

Landy, A. (1989): Dynamic, structural, and regulatory aspects of lambda site-specific recombination. In: *Annual review of biochemistry* 58, S. 913–949. DOI: 10.1146/annurev.bi.58.070189.004405.

Mikecz, Anna von (2006): The nuclear ubiquitin-proteasome system. In: *Journal of cell science* 119 (Pt 10), S. 1977–1984. DOI: 10.1242/jcs.03008.

Mülhardt, Cornel (2013): Der Experimentator Molekularbiologie / Genomics. Hg. v. Springer Spektrum. Heidelberg.

- Muratani, Masafumi; Tansey, William P. (2003): How the ubiquitin-proteasome system controls transcription. In: *Nature reviews. Molecular cell biology* 4 (3), S. 192–201. DOI: 10.1038/nrm1049.
- Noelanders, Rivka; Vleminckx, Kris (2017): How Wnt Signaling Builds the Brain: Bridging Development and Disease. In: *The Neuroscientist : a review journal bringing neurobiology, neurology and psychiatry* 23 (3), S. 314–329. DOI: 10.1177/1073858416667270.
- Nusse, Roel; Clevers, Hans (2017): Wnt/ β -Catenin Signaling, Disease, and Emerging Therapeutic Modalities. In: *Cell* 169 (6), S. 985–999. DOI: 10.1016/j.cell.2017.05.016.
- Pickart, Cecile M.; Eddins, Michael J. (2004): Ubiquitin: structures, functions, mechanisms. In: *Biochimica et biophysica acta* 1695 (1-3), S. 55–72. DOI: 10.1016/j.bbamcr.2004.09.019.
- Putters, Joyce; Slotman, Johan A.; Gerlach, Jan P.; Strous, Ger J. (2011): Specificity, location and function of β TrCP isoforms and their splice variants. In: *Cellular signalling* 23 (4), S. 641–647. DOI: 10.1016/j.cellsig.2010.11.015.
- Qin, Qian; Xu, Young; He, Tao; Qin, Chunlin; Xu, Jianming (2012): Normal and disease-related biological functions of Twist1 and underlying molecular mechanisms. In: *Cell Res* 22 (1), S. 90–106. DOI: 10.1038/cr.2011.144.
- Raspopovic, J.; Marcon, L.; Russo, L.; Sharpe, J. (2014): Modeling digits. Digit patterning is controlled by a Bmp-Sox9-Wnt Turing network modulated by morphogen gradients. In: *Science (New York, N.Y.)* 345 (6196), S. 566–570. DOI: 10.1126/science.1252960.
- Sanger, F.; Nicklen, S.; Coulson, A. R. (1977): DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. In: *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 74 (12), S. 5463–5467. DOI: 10.1073/pnas.74.12.5463.
- Schaaf, Christian P.; Zschocke, Johannes (2018): Basiswissen Humangenetik. 3., überarbeitete und erweiterte Auflage. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg (Springer-Lehrbuch).
- Schmitz, Sabine (2011): Der Experimentator: Zellkultur. 3. Aufl. Heidelberg: Spektrum Akademischer Verlag (Experimentator).

- Singh, Shalini; Gramolini, Anthony O. (2009): Characterization of sequences in human TWIST required for nuclear localization. In: *BMC Cell Biology* 10 (1), S. 47. DOI: 10.1186/1471-2121-10-47.
- Swatek, Kirby N.; Komander, David (2016): Ubiquitin modifications. In: *Cell Res* 26 (4), S. 399–422. DOI: 10.1038/cr.2016.39.
- Varshavsky, Alexander (1991): Naming a targeting signal. In: *Cell* 64 (1), S. 13–15. DOI: 10.1016/0092-8674(91)90202-A.
- Xu, Chao; Min, Jinrong (2011): Structure and function of WD40 domain proteins. In: *Protein & cell* 2 (3), S. 202–214. DOI: 10.1007/s13238-011-1018-1.
- Xu, Huanji; Zhou, Sheng; Xia, Hongwei; Yu, Huangfei; Tang, Qiulin; Bi, Feng (2019): MEK nuclear localization promotes YAP stability via sequestering β -TrCP in KRAS mutant cancer cells. In: *Cell Death Differ* 26 (11), S. 2400–2415. DOI: 10.1038/s41418-019-0309-6.
- Zheng, Nana; Zhou, Quansheng; Wang, Zhiwei; Wei, Wenyi (2016): Recent advances in SCF ubiquitin ligase complex: Clinical implications. In: *Biochimica et biophysica acta* 1866 (1), S. 12–22. DOI: 10.1016/j.bbcan.2016.05.001.
- Zhong, Jiateng; Ogura, Kohei; Wang, Zhiwei; Inuzuka, Hiroyuki (2013): Degradation of the transcription factor Twist, an oncoprotein that promotes cancer metastasis. In: *Discovery medicine* 15 (80), S. 7–15.

Eidesstattliche Erklärung

Ich versichere hiermit, dass ich die vorliegende Bachelorarbeit mit dem im Ausgabeantrag formulierten Thema ohne fremde Hilfe selbstständig verfasst und nur die angegebenen Quellen und Hilfsmittel benutzt habe. Wörtlich oder dem Sinn nach aus anderen Werken entnommene Stellen sind unter Angabe der Quellen kenntlich gemacht.

Hamburg, der 05.06.2020

Unterschrift Liisa Knipp