

Zellgängige Peptide zur Inhibition des Wnt/ β -Catenin Signalweges

Dissertation

zur Erlangung des akademischen Grades

doctor rerum naturalium

(Dr. rer. nat.)

eingereicht an der

Fakultät für Chemie und Chemische Biologie

der Technischen Universität Dortmund

von

Laura Dietrich

Bei dieser Veröffentlichung handelt es sich um eine Dissertation der Fakultät Chemie und Chemische Biologie an der Technischen Universität Dortmund.

Diese Dissertation wurde am Chemical Genomics Centre of the Max Planck Society in der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Tom N. Grossmann unter der Betreuung von Prof. Dr. Susanne Brakmann von der Fakultät für Chemie und Chemische Biologie der Technischen Universität Dortmund im Zeitraum von April 2013 bis Juli 2017 angefertigt.

Teile dieser Arbeit wurden in folgender Publikation veröffentlicht:

L. Dietrich, B. Rathmer, K. Ewan, T. Bange, S. Heinrichs, T.C. Dale, D. Schade, T.N. Grossmann (2017). Cell Permeable Stapled Peptide Inhibitor of Wnt Signaling that Targets β -Catenin Protein-Protein Interactions, *Cell Chemical Biology*, 24, 1-11.

1. Gutachter: Prof. Dr. S. Brakmann

2. Gutachter: Prof. Dr. T. N. Grossmann

Eingereicht am: 19.06.2017

Tag der mündlichen Prüfung: 25.07.2017

Danksagung

Mein besonderer Dank gilt Prof. Dr. Tom N. Grossmann für die Möglichkeit, meine Doktorarbeit auf dem spannenden Gebiet des Wnt/ β -Catenin Signalweges anzufertigen. Vielen Dank für Dein Vertrauen, das Du mir entgegengesetzt hast und, dass Du mir den Freiraum gegeben hast, meine Ideen und Vorstellungen uneingeschränkt zu entwickeln und umzusetzen. Auch möchte ich mich für Deine ständige Gesprächsbereitschaft, die konstruktiven Beiträge, aber vor allem für die Motivation auf langen Durststrecken bedanken.

Ich bedanke mich bei Prof. Dr. Susanne Brakmann für die fortwährende Begleitung meines gesamten Studiums. Während meiner Bachelorarbeit konnte ich nicht nur grundlegende praktische Fähigkeiten erlernen, sondern konnte auch bei der Umsetzung meines Auslandsaufenthaltes mit voller Unterstützung rechnen. Dies weiß ich sehr zu schätzen und ich freue mich, dass Du mich auch während meiner Promotion begleitet hast.

Insbesondere gilt mein Dank den Kollaborationspartnern am MPI Dortmund, der Technischen Universität Dortmund und Cardiff University, deren Beiträge meine Arbeit sehr bereichert haben: Prof. Dr. Dennis Schade und Dr. Stefan Heinrichs danke ich, dass sie sich die Zeit genommen haben, mir bei biologischen Fragestellungen weiterzuhelfen und wissenschaftliches Feedback zu geben. Insbesondere die tolle Zusammenarbeit im Wnt-Reporter-gen-Assay mit Bernd Rathmer und Prof. Dr. Dennis Schade sowie die Unterstützung von Dr. Stefan Heinrichs bei der Auswertung cytometrischer Daten, möchte ich erwähnen. Dr. Tanja Bange und Franziska Müller danke ich für die Unterstützung beim Pull-Down-Experiment und für die Erhebung und Auswertung der umfangreichen Daten. Für das sorgfältige wissenschaftliche Feedback zu meiner Arbeit sowie der Durchführung der Genexpressionsanalyse danke ich Prof. Trevor C. Dale und Dr. Kenneth Ewan.

„Keine Straße ist lang mit einem Freund an deiner Seite.“ - (Japanisches Sprichwort)

Der gesamten Arbeitsgruppe und den Kollegen am Chemical Genomics Centre möchte ich für das freundliche, ausgelassene Arbeitsklima danken sowie für viele lustige Momente am Kicker, schöne Grillabende und nicht zuletzt für ein paar mehr Kilos auf der Waage Durch Eure leckeren Kuchen! Ich freue mich über die tollen Freundschaften, die sich auch über die Arbeit hinaus entwickelt haben.

Bei meinen Bürokollegen Nicole Pospiech, David Bier, Nicolas Brauckhoff, Christiane Stiller, Chang-Uk Lee, Adrian Glas und Gernot Hahne möchte ich mich herzlich für die Unterstützung bedanken. Ihr habt Euch nicht nur die Mühe gemacht, Euch in die Probleme und Fragestellungen meines Projektes hineinzudenken und mich bei der Lösung zu unterstützen, sondern auch schöne Momente bereitet, an die ich mich gerne erinnere.

I am deeply grateful to Marta Pelay-Gimeno and Hélène Adihou who helped with words and deeds. Thank you for your encouragement, advice, post-doc-wisdoms and making me laugh. I am more than happy to have shared this chapter of my life with you (and I am looking forward to many more).

Mareike Sieler, Julia Kriegesmann und Judith Sommer danke ich für die gewissenhafte und sorgfältige Untersuchung von Nebenprojekten.

Großer Dank geht an Zhizhou Fang, Adrian Glas, Julia Frank sowie Nicole und Julian Strauchmeier für das Lesen und Korrigieren dieser Arbeit.

Abschließend möchte ich mich bei Sarah Plaschke, Zhizhou Fang und meiner Familie bedanken. Danke, dass Ihr mich in jedem Schritt meines Lebens begleitet, den Rücken stärkt, zum Weitermachen motiviert und viele Lebenstr aume erfüllt habt. Ich bin froh Euch an meiner Seite zu haben.

Kurzzusammenfassung

Protein-Protein-Interaktionen (PPIs) steuern auf allen Ebenen der zellulären Organisation grundlegende Prozesse und stellen deshalb attraktive Ziele für die Wirkstoffforschung dar. Die Inhibition von PPIs ist sehr anspruchsvoll, da die Interaktionsflächen oft keine definierten Bindungstaschen aufweisen, die mit niedermolekularen Verbindungen adressierbar sind. Peptide stellen eine vielversprechende alternative Verbindungsklasse dar, da sie das Potenzial aufweisen flache und ausgedehnte Interaktionsflächen zu binden. Trotz der guten Bindungseigenschaften ist ihre Anwendung aufgrund schlechter Zellgängigkeit limitiert. Die zelluläre Aufnahme von Peptiden erfolgt über eine Vielzahl an möglichen Importwegen, die bisher in weiten Teilen noch nicht verstanden sind.

Auf der Grundlage eines bestehenden PPI Inhibitors, dessen Aktivität durch geringe Zellgängigkeit limitiert ist, wurde eine Strategie zur Optimierung seiner Zellgängigkeit entwickelt. Aus der vergleichenden Analyse mit bekannten zellpenetrierenden Peptiden und *stapled peptides* ergab sich ein Konzept, das auf feiner Nuancierung von Hydrophobizität, Nettoladung und Ladungsverteilung beruht. Unter Beibehaltung der Affinität zum Zielprotein wurden sowohl Modifikationen der Kernsequenz als auch des *N*-Terminus vorgenommen.

Das untersuchte Peptid inhibiert die Wechselwirkung zwischen β -Catenin und Transkriptionsfaktoren der TCF/LEF-Familie, die im sogenannten Wnt/ β -Catenin Signalweg die Transkription bestimmter Zielgene kontrollieren. Störungen des Systems führen zu unkontrolliertem Zellwachstum und stehen im Zusammenhang mit Onkogenese, insbesondere dem kolorektalen Karzinom. Aus einer kleinen Bibliothek im Rahmen dieser Arbeit synthetisierter Peptide wurden Kandidaten mit guter Zellgängigkeit ausgewählt und deren Aktivität im Kontext des kolorektalen Karzinoms evaluiert. Unter diesen Kandidaten inhibierte das zellgängigste Peptid *NLS-StAx-h* sowohl selektiv die Interaktion zwischen β -Catenin und TCF, als auch spezifisch die Proliferation und Migration von Darmkrebszellen. In einem *ex vivo* Darmkrebsmodell wurde außerdem nachgewiesen, dass die mit Darmkrebs assoziierte abnormale Genexpression auf das Basallevel reduziert wurde. *NLS-StAx-h* ist damit die erste Verbindung, die eine gute zelluläre Aufnahme mit einer effizienten Hemmung der β -Catenin/TCF-Wechselwirkung kombiniert.

Abstract

Protein-protein interactions (PPIs) control fundamental processes at all levels of cellular organization and therefore represent attractive targets for drug discovery. The inhibition of intracellular PPIs is very challenging, as the surfaces of interacting proteins generally do not have defined binding pockets which can be addressed with small molecules. Peptides have the potential to bind flat and extended protein surfaces and therefore represent a promising starting point for the development of PPI inhibitors. Despite their good binding properties, their application is limited by poor cellular uptake. Importantly, development of cell permeable peptides is particularly challenging, as peptides enter cells *via* different import routes that are not fully understood yet.

Based on an existing PPI inhibitor whose activity is limited by low cell permeability, an optimization strategy to improve penetration was developed herein. The comparative analysis with known cell-penetrating peptides and stapled peptides resulted in a concept of fine-tuning hydrophobicity, net charge and charge distribution. While maintaining the affinity for the target protein, both the core sequence and the *N*-terminus were altered by gradually increasing the hydrophobicity of amino acids required for permeation. Other modifications increased the overall net charge or charge distribution of the peptide.

The investigated peptides inhibit the interaction between β -catenin and transcription factors of the TCF/LEF-family within the Wnt/ β -catenin signaling pathway. This PPI controls the transcription of genes involved in cell proliferation. Aberrant pathway activation results in uncontrolled cell growth and is associated with oncogenesis, particularly with colorectal carcinomas. Herein, suitable candidates with increased cellular uptake were identified from a panel of modified peptides, and their potential to inhibit aberrant Wnt/ β -catenin signaling was further evaluated in the context of colorectal cancer. In comparison to other cell types, *NLS-StAx-h* selectively inhibited the interaction between β -catenin and transcription factors and specifically impeded the proliferation and migration of colorectal cancer cells. In an *ex vivo* colon cancer model, *NLS-StAx-h* reduced abnormal gene expression to a basal level. *NLS-StAx-h* is the first compound that combines good cellular uptake with efficient inhibition of the β -catenin/TCF interaction.

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung.....	1
1.1	Zellgängige Peptide.....	2
1.2	Zelluläre Aufnahme von Peptiden.....	7
1.3	Wnt/ β -Catenin Signalweg.....	14
1.4	Inhibition des Wnt/ β -Catenin Signalweges.....	20
2	Zielsetzung.....	27
3	Ergebnisse und Diskussion.....	29
3.1	Evaluierung zellgängiger Peptide.....	30
3.2	β -Catenin.....	40
3.3	Weiterentwicklung von StAx-35R.....	51
3.4	Inhibition von β -Catenin im Kolonkarzinom.....	63
3.5	Diskussion.....	76
4	Zusammenfassung.....	81
5	Experimenteller Teil.....	87
5.1	Allgemeine Verbrauchsmaterialien und Chemikalien.....	88
5.2	Allgemeine Geräte.....	90
5.3	Analytische Methoden.....	92
5.4	Festphasen-Peptidsynthese.....	103
5.5	Molekularbiologische Methoden.....	108
5.6	Proteinbiochemische Methoden.....	117
5.7	Biochemische Methoden.....	123
5.8	Zellbiologische Methoden.....	127
6	Literaturverzeichnis.....	135
7	Abkürzungsverzeichnis.....	159
8	Anhang.....	169
8.1	Festphasen-Peptidsynthese.....	170
8.2	Oligonukleotide.....	185
8.3	Oligonukleotide für die Genexpressionsanalyse.....	186
8.4	gBlock-Sequenzen.....	187
8.5	Gensequenzen.....	189
8.6	Vektorkarten.....	190
8.7	Sequenzierungsergebnisse.....	194
8.8	Expressionsanalyse.....	206

8.9	DSF.....	212
8.10	nanoDSF.....	215
8.11	Reportergen-Assay.....	216
8.12	Pull-Down-Assay.....	217

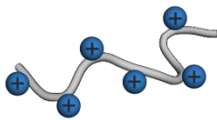
1 Einleitung

1.1 Zellgängige Peptide

Natürlich vorkommende Peptide fungieren in der Natur als Antibiotika, Hormone, Neurotransmitter oder Wachstumsfaktoren und zeichnen sich durch hohe Affinität und Selektivität aus¹. Ihre therapeutische Nutzung ist jedoch durch geringe metabolische Stabilität und niedrige Zellgängigkeit erschwert. Um die mit Peptiden assoziierte geringe Zellgängigkeit zu verbessern und sie damit zu attraktiven pharmakologischen Verbindungen zu entwickeln, müssen die Grundlagen zellulären Imports besser verstanden werden. Eine einfache Methode oder ein fundiertes Rational zur Umwandlung eines nicht-permeablen Peptids ist bisher nicht verfügbar, da die zelluläre Aufnahme über eine Vielzahl an Importwegen verläuft und darüber hinaus von Faktoren wie von Zelltyp und Membranzusammensetzung maßgeblich beeinflusst wird^{2,3}. Die Erzeugung zellgängiger Peptide ist somit eine der anspruchsvollsten Aufgaben auf dem Forschungsgebiet Peptid-basierter Wirkstoffe. Zur Untersuchung von sowohl Zellgängigkeit-induzierenden als auch -bestimmenden Faktoren werden deshalb zellpenetrierende Peptide (*cell-penetrating peptides*, CPPs, Abbildung 1) herangezogen. Sie weisen die Fähigkeit auf, Zellmembranen zu durchdringen und sind dabei in der Lage, verschiedene Moleküle, wie z.B. siRNA, Plasmide, Peptide oder auch Proteine, zu transportieren⁴⁻⁷.

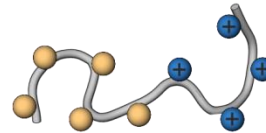
Polykationische CPPs

- Tat₄₉₋₅₇ $H_2N-RKKRRQRRR-CONH_2$
- R₈ $H_2N-RRRRRRRR-CONH_2$



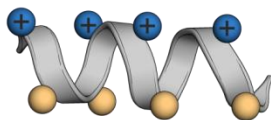
Primär amphipathische CPPs

- MPG $H_2N-GALFLGFLGAAGSTMGAWSQPKKRKRK-cya$
- Pep-1 $H_2N-KETWWETWWTEWSQPKKRKRK-cya$
- TP10 $H_2N-AGYLLGKINLKALAALAKKIL-CONH_2$



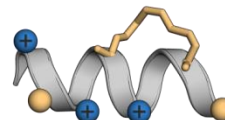
Sekundär amphipathische CPPs

- Penetratin $H_2N-RQIKIWFQNRMRMKWKK-CONH_2$



Stapled Peptides

- SAHM1 $H_2N-ERLRRRIS_3LCRS_3HHST-CONH_2$
- StAx $H_2N-RRWPRS_3ILDS_3HVRVWR-CONH_2$



- kationische Seitenkette
- hydrophobe Seitenkette

Abbildung 1: Klassen zellgängiger Peptide und Beispiele einiger Vertreter. Abbildung modifiziert nach Dietrich *et al.*⁸.

Zellgängige Peptide können als Vehikel für die Aufnahme biologisch aktiver Verbindungen in Zellen, aber auch für einen zielgerichteten Transport an einen Wirkort, genutzt

werden. Darüber hinaus eröffnet die Kombination von Zellgängigkeit und Bioaktivität in einem Peptid die Möglichkeit, anspruchsvolle intrazelluläre Prozesse wie z.B. Protein-Protein-Interaktionen (PPIs), die mit klassischen niedermolekularen Verbindungen nicht ausreichend adressierbar sind, zu modulieren⁹.

1.1.1 Polykationische CPPs

Die Entdeckung zellpenetrierender Peptide begann Ende der 80er Jahre mit der Beobachtung von Frankel und Pabo, dass das *Trans-Activator of Transcription* (Tat) Protein aus HIV-1 in Zellen eindringt und in den Zellkern transloziert¹⁰. Die Domäne, die für diese Translokation verantwortlich ist, wurde einem basischen Bereich des Tat-Proteins zugeordnet, der sich von den Resten 37 bis 72 erstreckte und die Internalisierung von konjugierten Proteinen wie z.B. β -Galaktosidase ermöglichte^{11,12}. Erst 10 Jahre später wurde systematisch untersucht, welche Aminosäuren maßgeblich für die Zellgängigkeit sind und so die Reste 49-57 als minimale Sequenz identifiziert^{13,14}. Etwa zeitgleich entdeckten Joliot *et al.*, dass das Proteinprodukt des Antennapedia Gens aus *Drosophila melanogaster* in der Lage ist in Zellen einzudringen. Die 60 Aminosäuren lange Sequenz Antennapedias Homöodomäne translozierte in neuronale Zellen und reguliert die Ausbildung von Beinen während der Entwicklung¹⁵. Derossi *et al.* identifizierten anschließend die Aminosäuresequenz Penetratin – abgeleitet aus den Aminosäuren 43-58 der Homöodomäne – als Vermittler der Zellgängigkeit¹⁶. Da sowohl Penetratin als auch Tat eine positive Nettoladung aufwiesen, untersuchten Futaki und Wender Homopolymere positiv geladener Aminosäuren. Okta- und Nonamere von Arginin zeigten die höchste Zellgängigkeit, während Dekamere und längere Polyarginine eine geringere Internalisierungseffizienz aufwiesen. Polymere aus Lysin und Histidin zeigten geringere bzw. marginale Zellgängigkeit gegenüber Polyarginin^{17,18}. So entstand die erste Definition zellgängiger Peptide als kurze Sequenzen (< 30 Aminosäuren), die vorwiegend aus den basischen Aminosäuren Arginin und Lysin bestehen und somit über eine hohe Nettoladung verfügen. Sie werden als polykationische CPPs oder auch Arginin-reiche Peptide (RRPs, Abbildung 1) bezeichnet¹⁹.

1.1.2 Amphipathische CPPs

Als weiterer Meilenstein gilt die Entdeckung zellgängiger Peptidsequenzen aus Toxinen, Transkriptionsfaktoren und Viren, die nicht nur reich an Argininen waren, sondern auch

1 Einleitung

hydrophobe Bereiche enthielten. Transportan ist ein 27 Aminosäuren langes, chimäres Peptid, das *N*-terminal aus 12 Aminosäuren des Neuropeptids Galanin und *C*-terminal aus 14 Aminosäuren des Wespengifts Mastoparan besteht. Der *N*-terminale Teil ist der kleinste bekannte Ligand für den Galaninrezeptor, während der *C*-terminale Teil die Bindung von G-Proteinen realisiert. Letzterer bildet sowohl in wässriger Lösung als auch in Gegenwart von Phospholipiden eine α -helikale Struktur aus²⁰. Ursprünglich wurde Transportan entworfen, um Na^+ - K^+ -ATPasen zu studieren²¹, jedoch rückte es aufgrund seiner zellpenetrierenden Eigenschaften für seine Anwendung als Transportvektor in den Vordergrund²². Um dieses Potenzial auszuschöpfen und um Effekte auf intrazelluläre Zielproteine zu verringern, schlossen sich Mutationsstudien zur Identifikation der zellpenetrierenden Sequenz an²³. Das erhaltene Deletionsanalogon TP10 wird heutzutage für den Nukleinsäure-Transport (Transfektionsreagenz) verwendet²⁴⁻²⁷. Das Peptid MPG ist ein weiteres amphipathisches CPP, das eine Fusion aus einer hydrophoben Domäne des HIV gp41-Proteins, einem Abstandshalter und einer basischen Kernlokalisierungssequenz (*nuclear localization sequence*, NLS) ist. Durch elektrostatische Wechselwirkungen bindet MPG Nukleinsäuren und transportiert sie in die Zelle^{6,28,29}. Als Analogon zu MPG entwickelte dieselbe Gruppe Pep-1, welches als Transportvektor für Proteine, Antikörper und Peptidnukleinsäuren (*peptide nucleic acid*, PNA) fungiert^{30,31}. Es besteht ebenfalls aus einer Kernlokalisierungssequenz, einem Abstandshalter und einer hydrophoben Domäne. Beide Peptide unterscheiden sich jedoch hinsichtlich ihrer Aminosäuresequenz des hydrophoben Bereichs, der in Pep-1 aus einem Tryptophan-reichen Motiv besteht. Des Weiteren wurde beobachtet, dass Pep-1 bei Kontakt mit Phospholipiden bzw. Membranen eine α -Helixstruktur ausbildet^{32,33}. Basierend auf dieser Beobachtung wurde untersucht, ob die Sekundärstruktur zur zellulären Aufnahme beiträgt. Durch *de novo* Design wurden das amphipathische Modellpeptid (*model amphipathic peptide*, MAP)³⁴ sowie GALA³⁵ und KALA³⁶ synthetisiert. Diese Peptide bilden α -Helices aus, in denen sich polare und unpolare Aminosäuren auf gegenüberliegenden Seiten der Helix gruppieren. Sie sind sehr zellpermeabel und eine Substitution der polaren Aminosäure Arginin durch Lysin verringerte die Zellgängigkeit nicht. So wurde die Definition von zellgängigen Arginin-reichen Peptiden um die amphipathischen CPPs erweitert: Primär amphipathische Peptide sind modular aufgebaut und enthalten größere Abschnitte hydrophiler, positiv geladener sowie größere Abschnitte hydrophober Aminosäuren. In sekundär amphipathischen Peptiden sind hydrophile und hydrophobe Aminosäuren im gesamten Peptid verteilt. Wenn sie mit Membranen interagieren, bilden sie Sekundärstrukturen aus, wie z.B. eine α -Helix.

Dadurch werden hydrophile und hydrophobe Bereiche strukturell auf den gegenüberliegenden Seiten der Helix separiert (Abbildung 1)³⁷⁻³⁹.

1.1.3 Stapled Peptides

Es gibt eine Reihe weiterer Peptidfamilien, die neben CPPs zellgängig sind. Zu den prominentesten Beispielen gehören *stapled peptides*. Dabei handelt es sich um modifizierte Peptide, die in ihrer Sequenz unnatürliche Aminosäuren enthalten, deren Seitenketten chemisch verknüpft werden und dabei die Ausbildung einer α -helikalen Struktur begünstigen. Als Bausteine werden α -Methyl-, α -Alkenyl-Aminosäuren verwendet, die durch Ruthenium-katalysierte Ringschlussmetathese einen Makrozyklus ergeben (Abbildung 2)⁴⁰. Durch eine spezifische Position der Bausteine innerhalb der Peptidsequenz an den Positionen i , $i+3$ und i , $i+4$ kann so entweder eine helikale Windung oder an der Position i , $i+7$ zwei helikale Windungen überspannt werden (Abbildung 2)⁴¹. Diese unnatürlichen Bausteine werden in Abhängigkeit von ihrer absoluten Konfiguration des α -Kohlenstoffatoms (S oder R) und der Anzahl n der Kohlenstoffatome in der Seitenkette als S_n oder R_n bezeichnet. Linkerlänge und absolute Konfiguration der eingeführten α -Methyl-, α -Alkenyl-Aminosäuren wurden optimiert, um eine maximale Helixstabilisierung zu gewährleisten: Die am weitesten verbreitete Methode beinhaltet die i , $i+4$ -Makrozyklisierung, bei der zwei S -konfigurierte Bausteine ($S_5 + S_5$) einen Makrozyklus aus acht Kohlenstoffatomen ergeben^{41,42}. Für die Synthese von i , $i+3$ und i , $i+7$ verknüpfter Makrozyklen wird ein R -konfigurierter Baustein an Position i und ein S -konfigurierter Baustein an Position $i+n$ benötigt⁴³. Bei der Makrozyklisierung der i , $i+3$ können zwei verschiedene Linkerlängen verwendet werden, die einen Makrozyklus mit sechs ($R_3 + S_5$) oder acht ($R_5 + S_5$) Kohlenstoffatomen ergeben^{43,44}. Für die i , $i+7$ Variante entsteht ein elfgliedriger Makrozyklus ($R_8 + S_5$)⁴⁵.

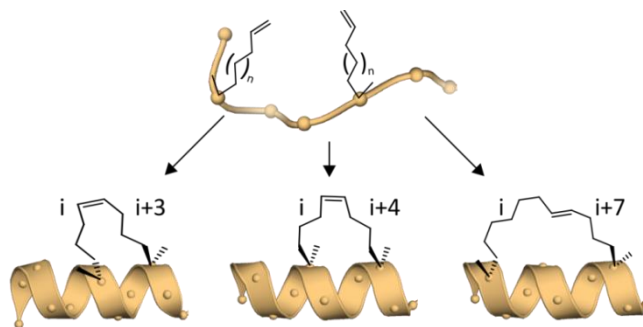


Abbildung 2: Mögliche Positionen des Makrozyklus in kohlenwasserstoffverbrückten Peptiden. Die Inkorporation von α , α -disubstituierten Aminosäuren in die Peptidsequenz, gefolgt von Ringschlussmetathese, ergibt Peptide mit verschiedenen Architekturen, z. B. i , $i+3$, i , $i+4$, i , $i+7$.

1 Einleitung

Da α -Helices ein prädominantes Strukturmotiv in Protein-Protein-Interaktionen darstellen, können konformationell eingeschränkte Peptide wie die *stapled peptides* insbesondere für die Entwicklung von PPI Inhibitoren herangezogen werden^{9,46,47}. Aufgrund ihrer physikochemischen Eigenschaften können sie Proteinoberflächen erkennen und Bindungsepitope imitieren⁴⁸. Die Gruppe um Verdine entwickelt seit 2004 bedeutende Anwendungsbeispiele⁴⁹⁻⁵¹, darunter auch SAHM1 zur Regulation des Notch Signalweges (Abbildung 1)⁵². Der Notch-Transkriptionsfaktorkomplex – bestehend aus NOTCH1, CSL und MAML1 – reguliert die Transkription für die Differenzierung notwendiger Gene während der Embryonalentwicklung und Homöostase. Die konstitutive Aktivierung des Notch Signalweges kann an mehreren Erkrankungen beteiligt sein, einschließlich der akuten lymphatischen Leukämie. Aus einer dominant-negativen Version von MAML1 wurde SAHM1 abgeleitet, welches die Bildung des Komplexes verhindert und einen anti-proliferativen Effekt *in vitro* und *in vivo* zeigte⁵².

1.2 Zelluläre Aufnahme von Peptiden

1.2.1 Allgemeine Faktoren

Biologische Membranen regulieren Aufnahme und Abgabe von Molekülen und halten innerhalb der Zelle chemische Unterschiede zwischen Kompartimenten und dem Cytosol aufrecht. Sie sind für hydrophobe und kleine, ungeladene polare Moleküle durchlässig, die durch Diffusion entlang eines Konzentrationsgefälles die Membran passieren. Große, ungeladene polare Moleküle oder polare geladene Moleküle diffundieren sehr langsam und müssen mit Hilfe von Transportern und Kanälen transportiert werden. Biologische Membranen bestehen hauptsächlich aus Phospholipiden, aber auch aus Sphingolipiden und Cholesterol, die aufgrund des hydrophoben Effektes die charakteristische Lipiddoppelschicht ausbilden^{53,54}. Auf der extrazellulären Seite der Membran sind sie oft mit Polysacchariden modifiziert. In die Membran sind Proteine eingebettet, die ebenfalls stark glykosyliert sein können und zusammen mit Glykolipiden die sogenannte Glykokalyx ergeben (Abbildung 3)⁵⁵. Die Zellmembran bildet somit ein komplexes Geflecht, das für Peptide angesichts ihrer Größe und Polarität eine natürliche Barriere ist. CPPs und verwandte Peptide stellen jedoch eine Ausnahme dar, da sie unabhängig von Rezeptoren oder Transportproteinen die Zellmembran passieren. So vielfältig wie die Sequenzen der CPPs sind auch ihre berichteten Importwege. Trotz umfangreicher Studien sind mechanistische Details sowie die Parameter, die eine Route gegenüber einer anderen favorisieren, nur in Grundzügen verstanden. Bis dato wird davon ausgegangen, dass Ladung, Ladungsverteilung, Hydrophobizität und Struktur die Anlagerung an die Zelloberfläche und Membraninsertion beeinflussen.

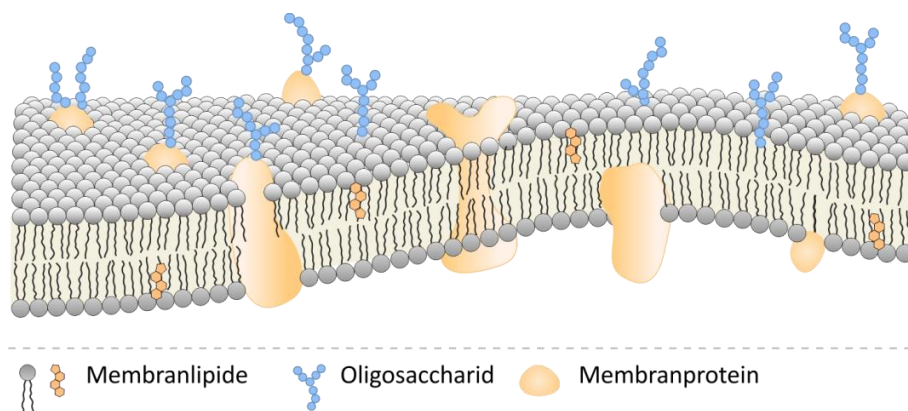


Abbildung 3: Aufbau der Plasmamembran. In die Doppelschicht sind integrale und periphere Proteine eingelagert. Proteine und Lipide sind im Extrazellulärraum glykosyliert.

Ladung

Das vorherrschende Glykosylierungsmuster der Glykokalyx ist die Modifikation mit Glykosaminoglykanen (GAG). GAGs bilden lineare Polymere aus Hyaluronsäure, Heparan-, Keratan- oder Dermatansulfat, die insgesamt eine hohe negative Nettoladung aufweisen⁵⁶. Aus diesem Grund spielt die Ladung der Peptide bei der Erkennung und Anlagerung an die Zelloberfläche eine wichtige Rolle. Durch elektrostatische Wechselwirkungen von positiv geladenen Aminosäuren mit negativ geladenen Sulfaten oder Carboxylaten wird die erste Interaktion mit der Zelloberfläche gewährleistet (Abbildung 4). Das Vorhandensein von positiven Ladungen allein ist nicht ausreichend, da Studien mit Oligomeren von Histidin, Ornithin und Lysin gezeigt haben, dass ihre zelluläre Aufnahme geringer ist als von Arginin-Oligomeren¹⁷. Die Struktur und Geometrie der Guanidiniumgruppe in Arginin erlaubt es die negativen Ladungen besser zu stabilisieren. Arginin hält seinen protonierten Zustand und die Fähigkeit zur Ausbildung von Wasserstoffbrückenbindungen über einen weiten pH-Bereich aufgrund der Delokalisierung der positiven Ladung in der Guanidiniumgruppe aufrecht^{57,58}.

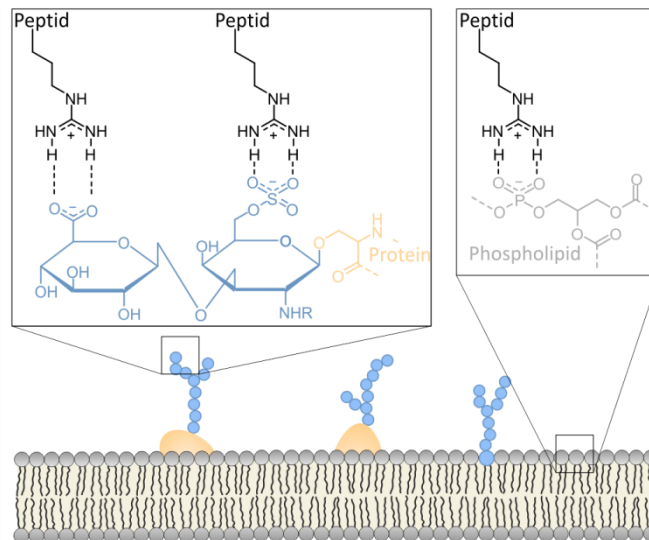


Abbildung 4: Interaktion der Argininseitenkette mit Glykosaminoglykanen und Phospholipiden der Plasmamembran.

Hydrophobizität

Die systematische Analyse von amphipathischen Peptiden ergab, dass für Penetration und Translokation nicht nur die Interaktion mit der Zelloberfläche, sondern auch mit der Membran wichtig ist. Der Kern der Lipiddoppelschicht ist durch das Vorhandensein von Kohlenwasserstoffketten unpolar und ungeladen und die Insertion unpolarer Aminosäuren ist aufgrund des Entropiegewinns durch Verdrängung umgebender Wassermoleküle

begünstigt (hydrophober Effekt)⁵⁹. Insbesondere Tyrosin und Tryptophan werden vornehmlich an der Lipid-Wasser-Grenzfläche von Membranproteinen gefunden und scheinen somit eine vorteilhafte freie Insertionsenergie aufzuweisen⁵⁹⁻⁶¹. Des Weiteren sind die aromatischen Aminosäuren Tyrosin, Tryptophan und Phenylalanin in der Lage, kationische Spezies wie basische Aminosäuren, durch Kationen- π -Interaktionen zu stabilisieren. Die Kationen- π -Interaktion verändert den pKa-Wert von Arginin und erhöht die Prävalenz der protonierten Guanidgruppe^{60,62,63}. Auch in amphipathischen CPPs ist Tryptophan eine häufig vorkommende Aminosäure und kann möglicherweise auch die Insertion von Peptiden ähnlich positiv beeinflussen.

Struktur

Peptide besitzen frei in Lösung häufig keine Sekundärstruktur, sondern liegen als ein Kollektiv verschiedener ungeordneter Strukturen vor (*random coil*). Für eine hohe Bioverfügbarkeit sollte eine chemische Verbindung gemäß der Lipinski Regeln über nicht mehr als 5 Wasserstoffbrückenbindungsdonatoren und nicht mehr als 10 -akzeptoren verfügen⁶⁴. Aufgrund des Vorhandenseins vieler Wasserstoffbrückenbindungsdonatoren und -akzeptoren im Rückgrat wird diese Zahl bei Peptiden schnell überschritten. Durch die Ausbildung einer Sekundärstruktur, in der Amidstickstoff und Carbonylgruppe intramolekulare Wasserstoffbrückenbindungen eingehen, kann die Zahl der Donatoren sowie Akzeptoren erniedrigt werden. Diese Theorie wird zum einen von Studien unterstützt, in denen die Methylierung von Amidstickstoffatomen die Zahl der Donatoren verringerte und eine erhöhte Bioverfügbarkeit zur Folge hatte^{65,66}. Zum anderen zeigten Untersuchungen zellgängiger amphipathischer CPPs, dass TP10, Penetratin, MPG, Pep-1 und MAP in Abhängigkeit der Lipidzusammensetzung der Membran eine α -helikale Struktur einnehmen⁶⁷⁻⁶⁹. Ferner liegen Beispiele vor, in denen gezielte Rigidisierung des Peptidrückgrates in verbesserter Zellgängigkeit resultierte⁷⁰⁻⁷³. Als eine spezielle Form der Makrozyklisierung stellt die Synthese von *stapled peptides* eine besonders erfolgreiche Methode zur Stabilisierung von α -Helices dar^{41,48,74}.

1.2.2 Direkte Penetration

Arginin-reiche Peptide (RRPs) können in Abhängigkeit von der Konzentration sowohl über energieabhängige Aufnahmewege (Endocytose) als auch energieunabhängige direkte Penetration (Translokation, Transduktion) in die Zellen gelangen⁷⁵⁻⁷⁷. Oberhalb einer Schwellenkonzentration findet Transduktion und unterhalb dieser Konzentration finden sowohl Endocytose als auch Translokation statt. Wie hoch diese Schwellenkonzentration ist, hängt vom Peptid und externen Faktoren wie Zelltyp und extrazellulärem Milieu ab⁷⁸⁻⁸⁰. Einen Nachweis, dass andere CPP-Klassen über energieunabhängige Mechanismen in die Zelle gelangen, wurde bisher nicht ausreichend belegt. Deshalb wird angenommen, dass Peptide mit geringer Nettoladung und großem Cargo hauptsächlich über Endocytose internalisiert werden^{77,81}.

Translokation

Bezüglich des Translokationsmechanismus existieren verschiedene Theorien, die die Bildung ringförmiger Poren⁸², invertierter Mizellen^{83,84} und teppichartiger Ansammlungen an der Membranoberfläche⁸⁵ beschreiben. Die meisten Theorien wurden bisher experimentell nicht eindeutig belegt oder gelten für antimikrobielle Peptide, welche jedoch oft eine irreversible Zerstörung der Membran induzieren. Bisher wurde für CPPs das Teppich-Modell von der Gruppe um Cardoso, die sich auf die Untersuchung der RRP-Membran-Interaktionen spezialisiert hat, widerlegt⁸⁶. Stattdessen gelang sowohl in theoretischen Berechnungen als auch in *in vitro*- und Lebendzell-Experimenten der Nachweis, dass die RRP Tat und R₉ eine transiente Pore in der Membran induzieren^{76,87-90}. In diesem Modell liegt das Hauptaugenmerk auf der elektrostatischen Anziehung der positiv geladenen Guanidgruppe zur anionischen Lipiddoppelschicht. Durch die Akkumulation positiv geladener Peptide werden lokale Deformationen in der Lipiddoppelschicht erzeugt. Peptide werden mittels elektrostatischer Anziehung von Phosphatgruppen der distalen Membranseite in die Membran gezogen und initiieren die Ausbildung einer ringförmigen Pore. Die Lipide biegen sich dabei so, dass das CPP immer nahe an der Kopfgruppe liegt. Sobald die Pore gebildet ist, bewegen sich die Peptide durch Diffusion auf der Oberfläche der Pore. Aufgrund einer minimalen Abnahme des pH-Wertes zwischen extra- und intrazellulärem Raum konkurrieren Protonen um die Interaktion mit der Membran, sodass die Peptide von der Membran dissoziieren und die Pore sich schließt.

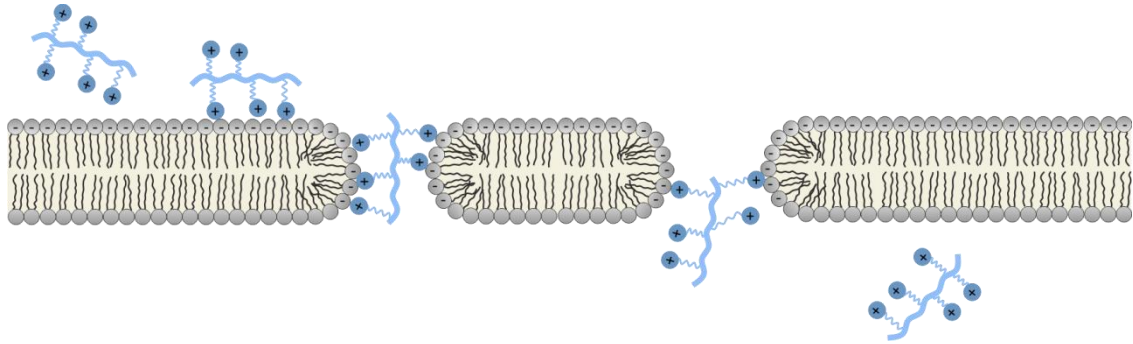


Abbildung 5: Translokation Arginin-reicher CPPs. Das Peptid wird auf der extrazellulären Seite von negativ geladenen Fettsäuren elektrostatisch angezogen und bildet einen Peptid-Fettsäure-Komplex. Dieser Komplex diffundiert durch einen Kanal, während gleichzeitig Protonen von der cytosolischen Seite um die Interaktion mit Fettsäuren konkurrieren. Das Peptid wird im Cytosol freigesetzt und der Kanal schließt sich.

Transduktion

Transduktion beschreibt die schnelle Aufnahme Arginin-reicher Peptide ausgehend von lokalen Aggregaten hoher Peptidkonzentration an räumlich definierten Bereichen (Nukleierungszonen) der Plasmamembran^{88,91}. Verdurmen *et al.* zeigten, dass Transduktion die Aktivierung des Enzyms saure Sphingomyelinase involviert⁹². Nach einer Translokation vom Lysosom in die äußere Plasmamembran, hydrolysiert dieses Enzym die Phosphodiesterbindung in Sphingomyelin zu Ceramid und Phosphorylcholin. Als eine Folge der Ceramidentstehung entwickeln sich Membranmikrodomänen, die in der Plasmamembran Krümmungen erzeugen. Die Bildung dieser Krümmungen, die mit der Transduktion von CPPs einhergeht, liefert eine erste Erklärung für den Mechanismus der Transduktion^{79,92}.

1.2.3 Endocytose

Mit der Entdeckung von CPPs und der Untersuchung ihrer Aufnahmemechanismen wurde anfänglich vermutet, dass sie über direkte Penetration in die Zellen gelangen. In 2003 zeigten Richard *et al.*, dass die in Standardmethoden verwendete Fixierung von Zellen artifizielle sowie falsch positive Ergebnisse bezüglich der Aufnahme, Verteilung innerhalb der Zelle und Importmechanismen lieferte⁹³. Somit begannen Untersuchungen zur Endocytose als weiterer möglicher Importmechanismus für Peptide. Endocytose kennzeichnet eine Vielzahl energieabhängiger Prozesse zur Aufnahme von extrazellulärem Material, bei denen die Plasmamembran das Material einschließt und als Vesikel in die Zelle abschnürt⁹⁴⁻⁹⁶. Diese Einführungswege umfassen Phagozytose, Makropinocytose⁹⁷, Clathrin-^{94,98} oder Caveolae-vermittelte Endocytose^{95,99} sowie Clathrin- und Caveolae-unabhängige Wege¹⁰⁰⁻¹⁰³ (Abbildung 6).

1 Einleitung

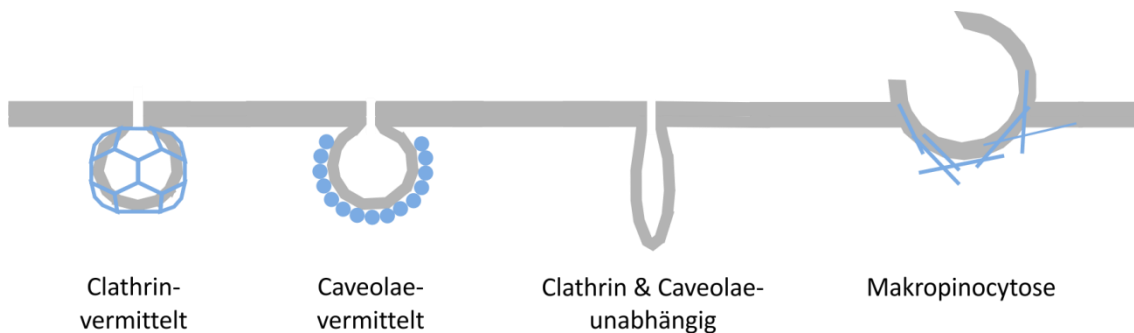


Abbildung 6: Endocytose-Mechanismen. Clathrin- und Caveolae-abhängige Endocytose zeichnen sich durch Abschnürung beschichteter Vesikel mit Hilfe von Dynamin aus. Makropinocytose beinhaltet die Ausbildung von Pseudopodien und verläuft entlang des Aktin-Cytoskeletts. Clathrin- und Caveolae-unabhängige Mechanismen umfassen beispielsweise den CLIC/GEEC-Pfad, die Arf6-abhängige Endocytose und die Flotillin-abhängige Endocytose und können sowohl Aktin-Umverteilung als auch Vesikelbeschichtungen involvieren.

Für die Aufnahme zellgängiger Peptide sind bisher die Mechanismen der Makropinocytose sowie Clathrin- oder Caveolae-vermittelte Endocytose berichtet: Bei der Makropinocytose werden durch Umverteilung von Aktin Membranausstülpungen gebildet, die zufällig Moleküle einfangen und in das Innere der Zelle als Makropinosom abschnüren. Dieser Prozess involviert keine Rezeptoren und ist unspezifisch bzgl. der aufgenommenen Substanzen. Makropinosomen sind in Größe und Form sehr heterogen ($>0,2 \mu\text{M}$)⁹⁷. Die Clathrin-vermittelte Endocytose dient dem Frachttransport, der Aufnahme von Nährstoffen, aber auch dem Umsatz von membranständigen Proteinen. Der Auslöser und exakte Ort der Ausbildung Clathrin-beschichteter Vesikel ist weitestgehend unbekannt. Ca. 50 Adapter- und Zusatzproteine koordinieren die Keimbildung an Stellen der Plasmamembran, die internalisiert werden sollen. Die Keimbildung fördert die Polymerisation des Hüllproteins Clathrin zu einem Käfig, was eine Verformung der Membran und Bildung von Vesikeln zur Folge hat. Die Bindung von Adapterproteinen an die Membran und membrangebundenen Frachtrezeptoren vermittelt die Rekrutierung der Fracht in das Vesikel (ca. 120 nm Durchmesser). Dynamin erleichtert die Abschnürung der Vesikel, da es eine Spirale um den Hals der Vesikel bildet, den Vesikelhals verjüngt und so bewirkt, dass es sich von der Membran abschnürt. Anschließend verliert es seine Clathrinbeschichtung und bewegt sich in der Zelle als nacktes Vesikel^{94,98}. Caveolae-vermittelte Endocytose ist mit Ausnahme von Neuronen und Leukozyten in fast allen Zelltypen zu finden. Caveolae sind flaschenförmige Einstülpungen der Membran (60-80 nm Durchmesser), die einen charakteristischen Überzug aus Caveolinen und speziellen Lipiden besitzen. Caveolin1 ist ein membranständiges Protein, das an Cholesterol und Sphingolipide bindet, weshalb Caveolae vorwiegend in *Lipid Rafts* gefunden werden. Durch Oli-

gomerisierung der Caveoline wird die Krümmung der Membran verändert und die Ausbildung der Vesikel erleichtert. Im Gegensatz zu Clathrin-beschichteten Vesikeln verlieren Caveolae ihren Überzug nicht^{95,99}.

In Studien zur endocytotischen Aufnahme von CPPs wurden Inhibitoren einzelner Endocytosemechanismen verwendet und beobachtet, dass das Ausschalten des einen Mechanismus zur Induktion eines anderen führen kann. Auch wurde deutlich, dass CPPs nicht ausschließlich über einen einzelnen endocytotischen Vorgang in die Zelle gelangen⁷⁷. Durch die Untersuchung spezifischer Endocytosemarker konnte erst im letzten Jahrzehnt Endocytose als weiterer möglicher Aufnahmemechanismus eindeutig belegt werden: Endocytose reguliert die Signalweiterleitung von Plasmamembran-Rezeptoren auf verschiedenen Ebenen, einschließlich der Rezeptor-Internalisierung, endocytotischer Sortierung oder der Verwendung von Endosomen als mobile Signalplattformen. Beispielweise werden die Tumornekrosefaktor-Rezeptoren 1 und 2 (TNF-R) mittels Clathrin-abhängiger Endocytose internalisiert. Dieses Prinzip machte sich die Gruppe um Brock zu Nutze und belegte 2005, dass R₉, Tat und Penetratin die TNF-R-Internalisierung induzieren und somit über Clathrin-vermittelte Endocytose in die Zellen gelangen¹⁰⁴. Des Weiteren konnte die Internalisierung von Tat durch Makropinocytose anhand des Makropinocytose-Markers Dextran nachgewiesen werden¹⁰⁵. Weiterhin wurde ein Zusammenhang zwischen GAGs und der Induktion von Rac-abhängiger Aktin-Reorganisation gefunden, der auf Makropinocytose als einen weiteren möglichen Aufnahmemechanismus für Tat und R₈ hinweist¹⁰⁶. Eine Studie von 200 nicht verwandter *stapled peptides* zeigte 2015, dass diese vornehmlich über Endocytose, jedoch unabhängig von Clathrin- und Caveolae internalisiert werden. Ihre Internalisierung deutete auf Makropinocytose hin, da negativ geladene GAGs und Aktin-Reorganisation beteiligt waren¹⁰⁷.

1.3 Wnt/ β -Catenin Signalweg

Wnt-Liganden können drei hoch konservierte Signaltransduktionswege aktivieren, um sowohl Aspekte wie die Organogenese in embryonalen, als auch die Homöostase und die Regeneration von Geweben in adulten Zellen zu regulieren^{108,109}. Der Wnt/Calcium Signalweg löst die Ausschüttung von Ca^{2+} aus dem Endoplasmatischen Retikulum (ER) in das Cytosol aus und ist relevant für die Zellmigration¹¹⁰. Der *planar cell polarity* (PCP) Signalweg reguliert hingegen die Morphologie und gleichmäßige Orientierung von Zellpopulationen¹¹¹. Der Wnt/ β -Catenin Signalweg steuert die Zellproliferation durch die Aktivierung der Transkription verschiedener Zielgene (Abbildung 7).

Das Gerüstprotein Axin bindet die Casein-Kinase 1 α (CK1 α) und Glykogen-Synthase-Kinase 3 (GSK3), β -Catenin und den Tumorsuppressor Adenomatous-Polyposis-Coli (APC). Durch Phosphorylierung von β -Catenin wird es von der E3-Ubiquitin-Ligase $\text{SCF}^{\beta\text{-TrCP}}$ erkannt, ubiquitiniert und im Proteasom degradiert. Die Bindung des Wnt-Liganden an die Transmembranrezeptoren Frizzled (FZD) und low-density lipoprotein receptor-related Protein 5/6 (LRP5/6) aktiviert den Signalweg. Der Abbaukomplex wird über Dishevelled (DVL) und Axin an die Membran rekrutiert um die Degradation von β -Catenin zu inhibieren. Daraufhin akkumuliert β -Catenin im Cytosol, transloziert in den Zellkern und aktiviert die Transkription von Wnt-Zielgenen¹¹².

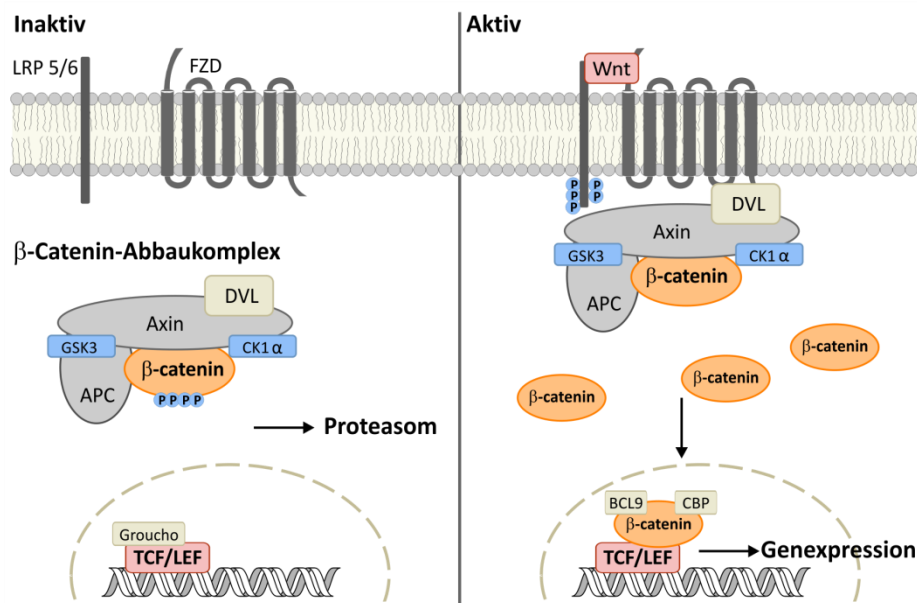


Abbildung 7: Wnt/ β -Catenin Signalweg. Im inaktiven Zustand wird β -Catenin im Cytosol vom β -Catenin-Abbaukomplex gebunden und für den Abbau im Proteasom markiert. Ist der Signalweg aktiv, wird β -Catenin nicht degradiert, sondern aktiviert im Zellkern die Transkription bestimmter Gene, die Proliferation und Differenzierung kontrollieren. Abbildung modifiziert nach Hahne *et al.*¹¹³.

1.3.1 Wnt-Signalosom

Wnt-Liganden gehören zu einer evolutionär konservierten Proteinfamilie, die 19 verschiedene Mitglieder umfasst. Sie werden im ER post-translational *N*-glykosyliert, mit Palmitin- und Palmitoleinsäure lipidiert und anschließend sekretiert¹¹⁴⁻¹¹⁶. Extrazellulär interagieren sie mit mehr als 15 Rezeptoren und Co-Rezeptoren wie FZD, LRP, Ror, Ryk, MuSK, PTK7 und R-spondin-1 und können dadurch entweder die β -Catenin-abhängigen oder -unabhängigen Signalwege aktivieren¹¹⁷⁻¹²².

Bei der Aktivierung des Wnt/ β -Catenin Signalweges sind die Transmembranrezeptoren der FZD-Familie sowie die Co-Rezeptoren LRP5/6 beteiligt. Die extrazellulären Domänen (ECD) beider Transmembranrezeptorfamilien binden den Wnt-Liganden, werden durch diesen Vorgang in räumliche Nähe gebracht und bilden einen trimeren Komplex¹²³⁻¹²⁵. FZD und LRP5/6 transduzieren das Signal, indem ihre intrazellulären Domänen (ICD) mit nachgeschalteten cytoplasmatischen Komponenten interagieren, wie z.B. Dishevelled (DVL) und Axin. Der C-Terminus des FZD-Rezeptors ragt ins Cytosol und enthält ein hoch-konserviertes KTxxxW-Motiv, welches durch DVL erkannt wird und dessen Rekrutierung an die Plasmamembran unterstützt. DVL ist ein multifunktionales Protein, das als Knotenpunkt für den β -Catenin abhängigen und die unabhängigen Signalwege dient. DVL-Proteine enthalten die drei Hauptdomänen DIX (Dishevelled, Axin), PDZ (Postsynaptic density 95, discs large, zona occludens-1) und DEP (Dishevelled, Egl-10, Pleckstrin). Die PDZ-Domäne ist für die Bindung an das intrazelluläre KTxxxW-Motiv und die DEP-Domäne für die Wechselwirkung mit der dritten intrazellulären Schleife von FZD essentiell¹²⁶. Die ICD von LRP5/6 ist reich an Prolin-, Serin- und Threoninresten, die in fünf wiederholenden PPP(S/T)Px(S/T) Sequenzmotiven konzentriert sind. Nach Aktivierung des Signalweges wird jedes Motiv je einmal von Prolin-gerichteten Kinasen, wie Glykogensynthase-Kinase (GSK3) und Casein Kinase Isoform γ (CK1 γ), phosphoryliert¹²⁷. Das phosphorylierte PPPSPxS-Motiv, jedoch nicht das unphosphorylierte, ist eine Andockstelle für Axin¹²⁸. Die Wnt-Aktivierung resultiert ebenfalls in Hyperphosphorylierung von DVL, welche vermutlich Interaktion und Polymerisation mit Axin, aber auch mit DVL selbst, triggert¹²⁹. Dieser Plasmamembran-Komplex aus Wnt, FZD, LRP5/6, DVL und Axin wird auch Signalosom genannt.

1.3.2 β -Catenin-Abbaukomplex

Axin ist ein Multidomänen-Gerüstprotein, das die Vereinigung des Abbaukomplexes zur Phosphorylierung und Degradation von β -Catenin nukleiert, indem es β -Catenin¹³⁰, GSK3¹³¹, CK1 α ¹³², APC¹³³ sowie zusätzliche Proteine¹³⁴⁻¹³⁶ bindet.

Ist der Signalweg inaktiv, liegen Axin und APC in phosphorylierter Form vor, wodurch ihre Affinität zu β -Catenin erhöht wird^{137,138}. Die Bindung von β -Catenin zum Abbaukomplex resultiert in seiner Phosphorylierung an Ser45 durch CK1 α ¹³⁹. Diese phosphorylierte β -Catenin Spezies wird von der Axin gebundenen GSK3 erkannt, die daraufhin β -Catenin an Thr41, Ser37 und Ser33 phosphoryliert¹⁴⁰. Der letzte Phosphorylierungsschritt ermöglicht die Erkennung durch die β -TrCP-Einheit des Skp1-Cullin-F-box (SCF) E3 Ubiquitin Ligase Komplexes (SCF $^{\beta$ -TrCP)¹⁴¹. Gebunden an den Abbaukomplex wird β -Catenin polyubiquitiniert und anschließend durch das Proteasom abgebaut. Dieser Schritt recycelt den Zerstörungskomplex für weitere Reaktionen¹⁴².

Mechanistische Details, wie die Wnt-Rezeptoraktivierung zu einer Hemmung der β -Catenin-Phosphorylierung und zur Akkumulation im Cytoplasma führt, sind unklar. Die verfügbaren Daten deuten auf mögliche parallele Mechanismen hin^{143,144}: Ist der Signalweg aktiviert, wird Axin durch Proteinphosphatase 1 (PPA1) dephosphoryliert und die Affinität zu β -Catenin ist verringert¹⁴⁵. Möglich wäre eine Auflösung des Zerstörungskomplexes durch Dissoziation¹³⁸, aber auch durch proteasomalen Abbau von Axin¹⁴⁶. Weitere Hinweise deuten auf Inhibition der GSK3-Aktivität durch autoinhibitorische Phosphorylierung¹⁴⁷, Sequestrierung von GSK3 in Endosomen¹⁴⁸ oder Inhibition von GSK3 durch Phospho-LRP6¹⁴⁹. Diskutiert wird auch die Inhibition der SCF $^{\beta$ -TrCP-vermittelten Ubiquitinierung¹⁴².

1.3.3 Transaktivator-komplex

Nach Wnt-Rezeptoraktivierung und Dissoziation vom Abbaukomplex, transloziert β -Catenin durch die Kernporen in den Nukleus. Der exakte Mechanismus wird kontrovers diskutiert und konnte bisher nicht eindeutig geklärt werden^{112,150}. Im Zellkern bindet β -Catenin an Transkriptionsfaktoren der T-cell factor/Lymphoid enhancer-binding factor (TCF/LEF)-Familie, die als transkriptionelle Schalter fungieren. Sie weisen keine intrinsische transkriptionelle Aktivität auf, sondern unterdrücken/aktivieren die Transkription durch Rekrutierung von Co-Repressoren/Co-Aktivatoren und β -Catenin. In Wirbeltieren gibt es vier Mitglieder der TCF/LEF-Familie (TCF1/TCF7, LEF1, TCF3/TCF7L1 und

TCF4/TCF7L2), die aus vier wichtigen funktionellen Domänen bestehen (Abbildung 8)¹⁵¹. Die *N*-terminale β -Catenin-bindende Domäne (CBD, Aminosäuren 1-53) ist hoch konserviert, da alle LEF/TCFs β -Catenin binden. Ihre Interaktion basiert auf ionischen Wechselwirkungen zwischen der superhelikalen Interaktionsfläche der zentralen Armadillo-Repeat-Domäne von β -Catenin und den ersten 53 Aminosäuren des TCFs¹⁵²⁻¹⁵⁴. Die kontextabhängige regulatorische Domäne (*context-dependent regulatory domain*, CDRD) zeigt die geringste Sequenzidentität mit anderen TCFs. Alle Mitglieder der TCF/LEF-Familie haben ein alternatives Exon in dieser Region, die als Plattform für die Bindung von Co-Repressoren der Groucho-Familie oder anderer Proteine diskutiert wird^{155,156}. Im Kern des TCF/LEF befinden sich die *high-mobility group* (HMG) und ein basischer Abschnitt, die zusammen eine konservierte DNA-bindende Domäne ergeben. Die HMG-box interagiert mit der kleinen DNA-Furche und erkennt die Konsensussequenz 5' -CCTTTGATG/C-3'¹⁵⁷⁻¹⁵⁹. Der basische Abschnitt fungiert als Kernlokalisierungssignal sowohl für den Importin- α -vermittelten nukleären Import als auch die Interaktion mit dem DNA-Rückgrat¹⁶⁰. Am *C*-Terminus befindet sich eine kleine mit Cysteinen sowie basischen und aromatischen Aminosäuren angereicherte Region. Diese Domäne wird als *C clamp* bezeichnet, da sie vier Cysteinreste enthält, die in die DNA-Bindung involviert sind. Sie ist spezifisch für GC-reiche DNA-Sequenzen, die als Helfer-Stellen bezeichnet werden und mit variablen Abständen und Orientierungen relativ zum Wnt-Response Element auftreten können¹⁶¹.

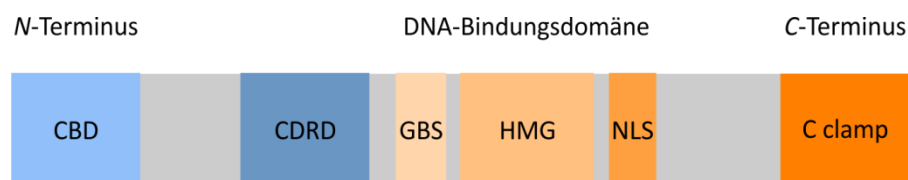


Abbildung 8: Funktionelle Domänen der TCF/LEF-Transkriptionsfaktoren. β -Catenin bindet an die ersten 50 Aminosäuren des *N*-Terminus. Die Groucho-Bindungsstelle, die HMG-Box und NLS bilden die DNA-Bindungsdomäne. Der *C clamp* fungiert als Helferstelle für die DNA Bindung. CBD = β -Catenin Bindungs-Domäne, CDRD = *context-dependent regulatory domain*, GBS = Groucho-Bindungsstelle, HMG = *High-mobility-group*, NLS = Kernlokalisierungssequenz.

Das Hauptmerkmal von β -Catenin ist seine zentrale, rigide Superhelix, die aus 12 sich wiederholenden Einheiten, den Armadillo-Repeats, besteht. Jeder Armadillo-Repeat besteht aus drei α -Helices mit ca. 40 repetitiven Aminosäuren (Abbildung 9). Diese zentrale Region bildet eine langgezogene, positiv geladene Superhelix, die der Interaktion mit TCF, APC, Axin und Cadherinen dient. *N*- und *C*-Terminus sind hingegen unstrukturiert und flankieren die Armadillo-Repeats. Die *C*-terminale Transaktivierungsdomäne von β -

1 Einleitung

Catenin umfasst drei Armadillo-Repeats und den flexiblen C-Terminus. Zur Aktivierung der Zielgen Transkription bindet β -Catenin an TCF/LEF, verdrängt negative Regulatoren und rekrutiert Co-Aktivatoren. Dazu gehören Faktoren, die die Interaktion von β -Catenin und TCF/LEF fördern, die an die N- oder C-terminale Transaktivierungsdomäne von β -Catenin binden, oder Chromatin-umstrukturierende Komplexe, die zu den Wnt-Response Elementen rekrutiert werden. Gut charakterisierte C-terminal bindende Transaktivatoren sind die Histon-Acetyltransferasen *CREB-binding protein* (CBP) und p300^{162,163}. Die Acetylierung von Lysinseitenketten in Histonen dient der Öffnung der Chromatin-Struktur, trägt zur Aktivierung der Transkription bei und ist die wichtigste Chromatin-Modifikation im Rahmen der Wnt-Zielgenregulation. Die am besten charakterisierten Aktivatoren der N-terminalen Transaktivierungsdomäne sind *B-cell Lymphoma 9* (BCL9) und Pygopus (Pygo). BCL9 bindet an den ersten Armadillo-Repeat und fungiert als Adapter für die weitere Bindung von Pygo. Pygo bindet außerdem an modifizierte Histon H3 Untereinheiten und ist so notwendig um die Transkription zu initiieren^{164,165}. Sowohl β -Catenin als auch Pygo interagieren wiederum mit Untereinheiten des sogenannten Mediator-Komplexes^{166,167}. Mediator ist eine evolutionär konservierte Multiprotein-Schnittstelle zwischen den genspezifischen Transkriptionsfaktoren und der allgemeinen Transkriptionsmaschinerie der RNA-Polymerase II¹⁶⁸.

Ist der Signalweg inaktiv, können Co-Repressoren über verschiedene Modi die Transkription von Wnt-Zielgenen unterdrücken (Abbildung 9). Co-Repressoren der Groucho/Transducin-like enhancer (Gro/TLE) Familie konkurrieren mit β -Catenin um die Interaktion mit TCF^{155,169}. Co-Repressoren wie Chibby und Inhibitor of β -Catenin and TCF (ICAT) hingegen binden β -Catenin und lösen dessen Interaktion mit TCF/LEF^{170,171}. Andere Repressoren wie C-terminal-binding protein (CtBP) interagieren nicht mit TCF oder β -Catenin, sondern mit den Wnt-Response Elementen in der Promotorregion und verhindern so die Transkription¹⁷².

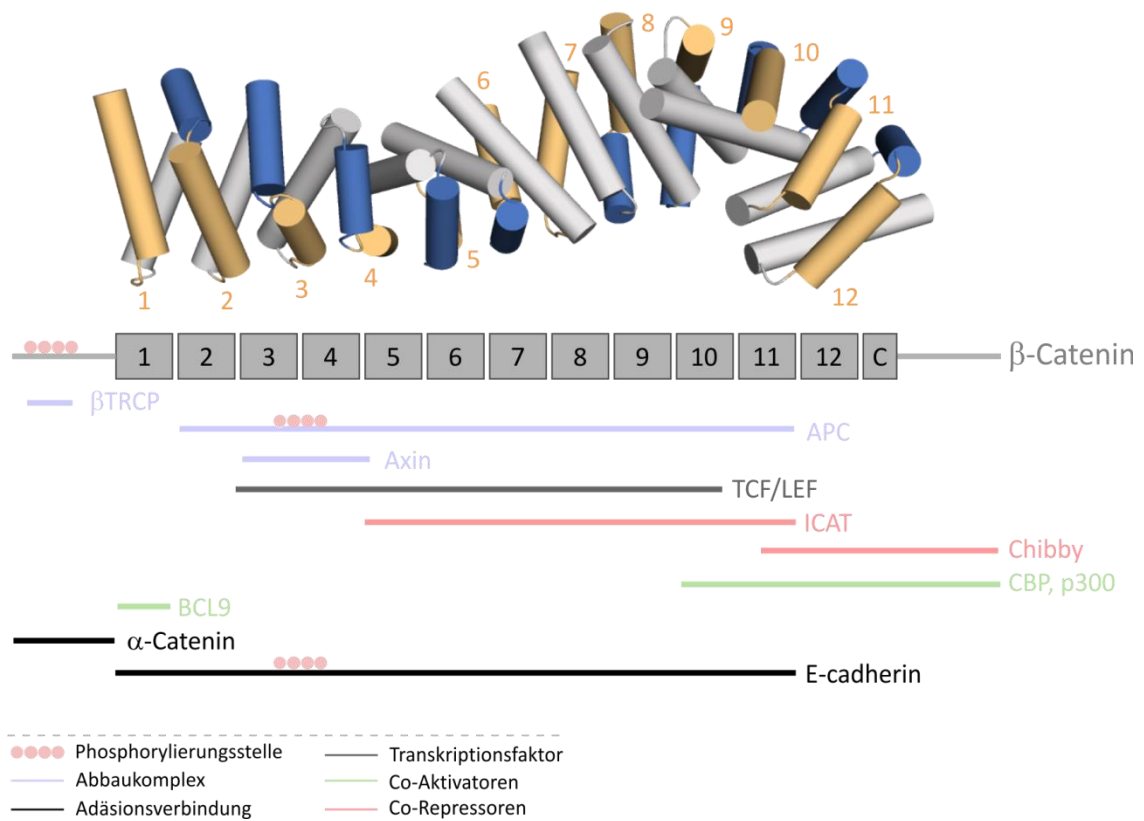


Abbildung 9: Struktur von β -Catenin, welches 12 Armadillo-Repeats und eine C-terminale Helix sowie flexible N- und C-terminale Enden aufweist (PBD:4DJS). Die Balken repräsentieren die Regionen von β -Catenin an denen verschiedene Bindungspartner binden.

1.4 Inhibition des Wnt/ β -Catenin Signalweges

Die Beteiligung des Wnt/ β -Catenin Signalweges in der Embryonalentwicklung, der Homöostase, aber auch bei der Entstehung von Krankheiten, macht ihn zu einem wichtigen Ziel für die pharmakologische Forschung und Entwicklung. Fehlregulationen können chronische Erkrankungen wie z.B. neurodegenerative Störungen (Demenz)¹⁷³ und Osteoporose¹⁷⁴, aber auch die Entstehung von Dickdarm-, Leber- und Hautkrebs¹⁷⁵⁻¹⁷⁷ zur Folge haben. Verschiedene Ansätze zur Modulation des Signalweges führten zur Entdeckung von sowohl niedermolekularen aber auch proteinbasierten Inhibitoren. Aufgrund der Komplexität und Überschneidungen mit anderen Signalwegen haben nur wenige der Moleküle klinische Phasen erreicht, wobei bisher keines als Medikament zugelassen wurden¹⁷⁸⁻¹⁸⁰. Im Folgenden werden nur einige ausgewählte Beispiele publizierter Signalweg-Modulatoren beschrieben.

1.4.1 Inhibition der Wnt-Biosynthese oder extrazellulärer Domänen

Versuche, die Stimulation des Signalweges bereits auf Rezeptorebene zu verhindern, resultierten in der Entwicklung von Antikörpern gegen Wnt, FZD oder LRP. OncoTherapy Science entwickelte OTSA101-DTPA-90Y, einen Yttrium 90-radiomarkierten monoklonalen Antikörper (mAb), der FZD10 erkennt. FZD10 zeigt ein beschränktes Expressionsmuster im menschlichen Gewebe, ist aber im synovialen Sarkom hochreguliert (ClinicalTrials.gov NCT01469975)^{181,182}. OncoMed Pharmaceuticals konzipierte in Zusammenarbeit mit der Bayer Pharma AG den mAb Vantictumab/OMP-18R5, der FZD1, 2, 5, 7 und 8 erkennt. Zurzeit wird er in der klinischen Phase 1a für solide Tumore (ClinicalTrials.gov NCT01345201) und in Phase 1b in Kombination mit Paclitaxel für Bauchspeicheldrüsen- und metastasierten Brustkrebs geprüft (ClinicalTrials.gov NCT02005315, NCT01973309)¹⁸³. Aus dieser Kollaboration ging auch Ipafricept/OMP-54F28, eine Fusion der FZD8-CRD mit der Immunglobulin-Fc-Domäne, hervor. Er fungiert als *Scavenger*, der mit dem Fzd8-Rezeptor um Wnt1 konkurriert. Die klinischen Studien der Phase 1b laufen für Bauchspeicheldrüsenkrebs (Gemcitabin/nab-Paclitaxel + Ipafricept, ClinicalTrials.gov NCT02050178), Leberkrebs (Sorafenib + Ipafricept, ClinicalTrials.gov NCT02069145) und Eierstockkrebs (Carboplatin/Paclitaxel + Ipafricept, ClinicalTrials.gov NCT02092363)¹⁸⁴.

1.4 Inhibition des Wnt/ β -Catenin Signalweges

Die Lipidierung der Wnt-Liganden ist eine für die Sekretion notwendige post-translationale Modifikation und wird von Porcupine (Porc) – einer membran-gebundenen *O*-Acyltransferase – durchgeführt^{116,124,185}. Die Verhinderung der Reifung des Wnt-Liganden stellt eine Möglichkeit dar, den Wnt/ β -Catenin Signalweg noch vor der Interaktion mit weiteren Signalwegkomponenten auszuschalten (Abbildung 10). 2009 wurden von der Gruppe um Lum die ersten Inhibitoren für Porc entwickelt und in nachfolgenden Studien optimiert: Die Mitglieder der *Inhibitors of Wnt Production* (IWP)-Serie inhibieren selektiv die Palmitoleinsäure-Modifizierung von Wnt3A, ohne die Aktivitäten anderer Enzyme der *O*-Acyltransferase-Familie zu beeinträchtigen¹⁸⁶⁻¹⁸⁸. In 2010 patentierte Novartis den Porc-Inhibitor Wnt-C59^{189,190}. Dessen optimierte Version LGK-974 wird seit 2011 in klinischen Studien Phase 1 getestet (ClinicalTrials.gov NCT01351103)^{191,192}. Ein weiterer Porc-Inhibitor, ETC-159, wird seit 2015 in klinischen Studien Phase 1 zur Behandlung fortgeschrittener solider Tumore untersucht (ClinicalTrials.gov NCT02521844)¹⁹³.

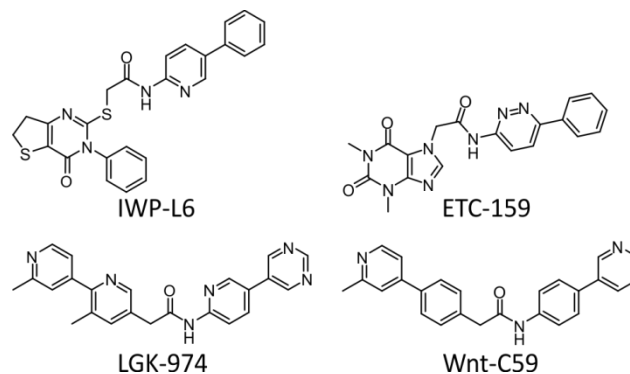


Abbildung 10: Porcupine-Inhibitoren.

Die Anwendung von Inhibitoren des Signalweges auf dem extrazellulären Level gestaltet sich in Bezug auf die Selektivität als sehr schwierig. Die extrazellulären Wnt-Liganden und die Membrankomponenten FZD und DVL sind zum einen nicht nur im Wnt/ β -Catenin Signalweg vorhanden, sondern auch in β -Catenin-unabhängigen Signalwegen. Zum anderen sind Liganden und Rezeptoren komplex miteinander verschaltet, da es ca. 19 Mitglieder der Wnt-Familie gibt, die mit mehr als 15 Rezeptoren interagieren und dadurch unterschiedlichste Signalwege in der Zelle induzieren¹¹⁵. Dabei ist bisher weitestgehend ungeklärt, welcher Wnt Ligand mit welchem Rezeptor interagiert, sodass eine gezielte Adressierung ohne Nebenwirkungen auf andere essentielle Zellprozesse sehr schwierig ist.

1.4.2 Direkte und indirekte Inhibition des Abbaukomplexes

Das Gerüstprotein Axin bindet β -Catenin, APC, GSK3, CK1 α , um β -Catenins Phosphorylierung und Ubiquitin-abhängige Degradation zu beschleunigen. Axin ist in der Zelle nur gering verfügbar und der limitierende Faktor des β -Catenin-Abbaukomplexes. Um das Vorkommen von Axin zu erhöhen und damit auch die Degradation von β -Catenin zu beeinflussen, wurden Inhibitoren für Tankyrase entwickelt. Die Tankyrasen 1 und 2 reduzieren den Axin-Gehalt, indem sie Axin durch Poly-ADP-ribosylierung (PARsylieren) für die Ubiquitinierung und den Abbau durch das Proteasom markieren^{194,195}. Verbindungen, die die Aktivität von TNKS/TNKS2, aber nicht der verwandten Poly(ADP-Ribose)-Polymerasen inhibieren, wurden von Chen *et al.* (IWR-1¹⁸⁶), Waaler *et al.* (JW55¹⁹⁶), James *et al.* (WIKI4¹⁹⁷) und Huang *et al.* (XAV939¹⁹⁸) identifiziert. Diese Verbindungen sind in der Lage, das Wachstum von Brust- und Dickdarmkrebszellen zu reduzieren, jedoch ist bisher keine in klinischen Phasen evaluiert worden.

Therapeutische Regulation von Kinasen, insbesondere von GSK3, wurde in Diabetes, neurodegenerativen sowie Herz-Kreislauf-Erkrankungen untersucht. Die Inhibition von GSK3 aktiviert β -Catenin/TCF-abhängige Transkription, aber verändert auch eine Vielzahl anderer zellulärer Prozesse, da GSK3 mehr als 100 bekannte Interaktionspartner aufweist. Demzufolge birgt die Inhibition von GSK3 ein hohes Risiko für Nebenwirkungen^{199,200}. In einer biochemischen Testreihe für Regulatoren der β -Catenin-Stabilität wurde die niedermolekulare Verbindung Pyrvinium als Binder für CK1 α identifiziert. Pyrvinium fungiert als allosterischer Aktivator von CK1 α und erhöht so die Phosphorylierung von β -Catenin und folglich auch seine Degradation²⁰¹. Wie GSK3 ist CK1 α nicht nur im Signalweg involviert, sondern in vielen weiteren grundlegenden Prozessen, wie Regulation des Zellzyklus oder Apoptose, beteiligt²⁰².

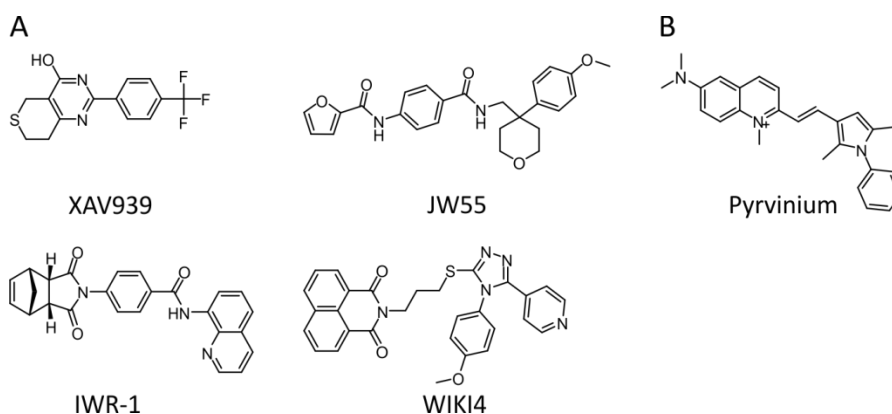


Abbildung 11: Inhibitoren der (A) Tankyrase und (B) Kinase CK1.

In ca. 80% der kolorektalen Karzinome sind die häufigsten Veränderungen Mutationen in APC. Daraus resultieren verkürzte Proteine, die durch den Zerstörungskomplex nur mit einer Restkapazität erkannt werden, um die β -Catenin-abhängige Transkription zu reduzieren. Je nach Ausmaß der APC-Verkürzung ändert sich die Kapazität mit der Länge des erhaltenen Proteins^{203,204}. Weitere 10% der kolorektalen Krebsarten tragen Mutationen, die die Phosphorylierungsstellen von β -Catenin betreffen. Die sukzessive Phosphorylierung von Ser45, Thr41, Ser37 und Ser33 erzeugt die für den proteasomalen Abbau von β -Catenin erforderliche β -TrCP-Bindungsstelle. Infolgedessen wird β -Catenin nicht degradiert, sondern aktiviert unkontrolliert die Transkription von Wnt-Zielgenen^{204,205}. In diesem Kontext hat eine Inhibition des Abbaukomplexes sowie der Transmembranrezeptoren nur einen geringen Effekt auf unkontrolliertes Zellwachstum. Inhibition auf einer tieferen Ebene des Signalweges ist in diesem Kontext daher von gesteigertem Interesse.

1.4.3 Inhibition des Transaktivator-Komplexes

Sobald β -Catenin einen Komplex mit den DNA-gebundenen Transkriptionsfaktoren eingegangen ist, aktiviert es mit Hilfe weiterer Co-Aktivatoren die Transkription. In 2004 haben Emami *et al.* die niedermolekulare Verbindung ICG-001 entwickelt, die spezifisch an den Co-Aktivator CBP, jedoch nicht an die verwandte Histon-Acetyltransferase p300, bindet²⁰⁶. PRI-724, ein zu ICG-001 strukturell verwandter CBP-Inhibitor, wurde von PrismPharma in Kooperation mit Eisai Pharmaceuticals entwickelt²⁰⁷. PRI-724 wurde 2012 in Sicherheits- und Wirksamkeitsstudien der Phase 1 für solide Tumore untersucht (ClinicalTrials.gov NCT01302405) und wird seitdem in Folgeuntersuchungen zur Verwendung in einer Kombination mit Bevacizumab bei metastasiertem Dickdarmkrebs (ClinicalTrials.gov NCT02413853) und mit Gemcitabin bei fortgeschrittenem metastasiertem Bauchspeicheldrüsenkrebs (ClinicalTrials.gov NCT01764477) getestet.

Die N-terminale Transaktivierungsdomäne von β -Catenin interagiert mit BCL9, einem Co-Aktivator, der als Adapter für Pygo dient und darüber den Kontakt zum Mediator-Komplex vermittelt. Takada *et al.* wählten einen struktur-basierten Ansatz, um einen Inhibitor der BCL9/ β -Catenin Interaktion zu designen²⁰⁸. Die α -helikale Homologiedomäne 2 (HD2) von BCL9 interagiert mit zwei α -Helices des Armadillo-Repeat 1 aus β -Catenin²⁰⁹. Anhand dieses Bindemotivs wurde das *stapled peptide* SAH-BCL9_B als PPI-Inhibitor entworfen. SAH-BCL9_B unterdrückt sowohl die Interaktion zwischen

1 Einleitung

β -Catenin und BCL9 *in vitro*, aber auch Tumorwachstum, Angiogenese, Invasion und Metastasierung in einem Maus-Xenograft-Modell²⁰⁸.

Zur direkten Inhibition der β -Catenin/TCF Interaktion im Zellkern haben Lepourcelet *et al.* eine Naturstoff-Bibliothek in einem Hochdurchsatz-Assay gescreent und die drei Verbindungen PKF115-584, PKF118-310 und CGP049090 identifiziert, die die Interaktion zwischen β -Catenin und TCF/LEF inhibieren²¹⁰. In *in vivo* Experimenten wurde gezeigt, dass sie in chronisch lymphatischer Leukämie Apoptose induzieren; jedoch wurde keine der Verbindungen bisher in klinischen Studien getestet²¹¹. Gonsalves *et al.* identifizierten in einem zell-basierten Screening eine Reihe von Oxazol-Liganden, *inhibitors of β -Catenin responsive transcription* (iCRT3, iCRT5, iCRT14), die an β -Catenin binden und die Interaktion mit TCF4 inhibieren²¹². Diese Verbindungen zeigten spezifische Toxizität in Dickdarmkrebs-Zelllinien, Tumorbiopsien und in multiplen Myelom-Zellen^{212,213}. Der exakte Bindungs- und Wirkmechanismus konnte bisher weder von PKF115-584, PKF118-310 und CGP049090 noch von iCRT Verbindungen gezeigt werden.

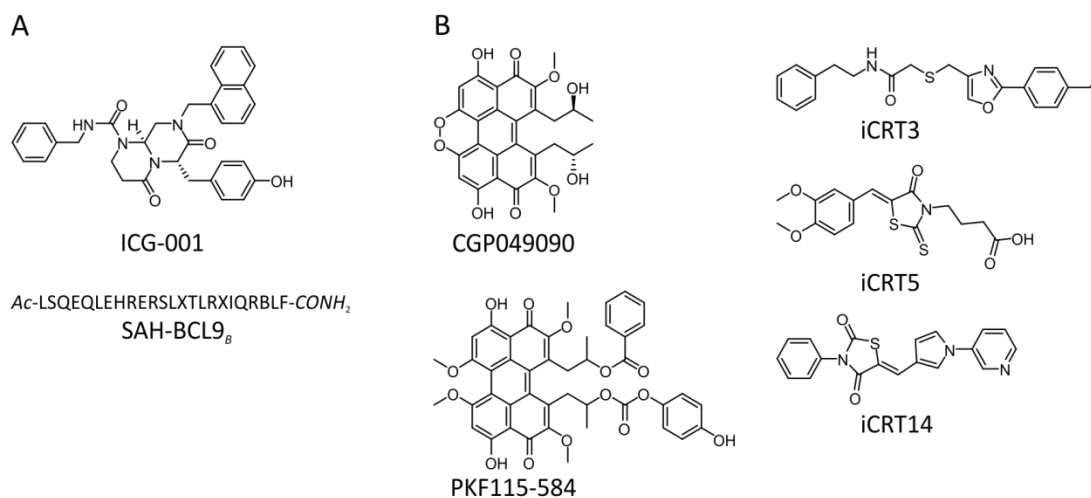


Abbildung 12: Inhibitoren des Transaktivator-Komplexes. (A) Inhibitoren von CBP und BCL9. SAH-BCL9_B ist ein *stapled peptide* und die Aminosäuresequenz im Einbuchstabencode angegeben. X = (S)-2-(4'-Pentenyl)alanin, B = Norleucin. (B) Inhibitoren der β -Catenin/TCF-Interaktion.

Auch die selektive Adressierung von Co-Aktivatoren oder des Mediator-Komplexes im Zusammenhang mit Fehlregulationen des Signalweges gestaltet sich sehr schwierig, da sie neben Wnt-Zielgenen eine Vielzahl Wnt-unabhängiger Genen regulieren. Auch eine direkte Inhibition von β -Catenin ist nicht risikofrei, da β -Catenin auch eine wichtige Rolle bei der Ausbildung von Adhäsionsverbindungen für die Zell-Zell-Kommunikation spielt²¹⁴. Diese Beispiele veranschaulichen, dass ein Wirkstoffkandidat schwerwiegende

Nebenwirkungen haben kann, da Aktivierung und Abschaltung des Signalweges hoch kontextabhängig und für jeden physiologischen Zustand fein abgestimmt sind. Im Kontext des kolorektalen Karzinoms erscheint (auf der Basis der am häufigsten auftretenden Mutationen in APC und β -Catenin) die Inhibition des Transaktivator-Komplexes dennoch am geeignetsten. Trotz vieler Nachteile kommt der bisherigen Entwicklung von Modulatoren eine große Bedeutung zu, da sie zu einem besseren Verständnis des gesamten Signalnetzwerkes sowie krankheitsrelevanter Prozesse unabhängig vom kolorektalen Karzinom beitragen.

1.4.4 Inhibition der β -Catenin/TCF7L2 Interaktion mit StAx-35R

Die β -Catenin/TCF-Interaktion ist der zentrale Knotenpunkt für unkontrollierte Aktivierung der Wnt-Zielgenexpression und damit ein attraktives Ziel für die Entwicklung eines Inhibitors. Das Hauptmerkmal von β -Catenin ist seine zentrale, positiv geladene Superhelix, die als Interaktionsplattform für TCF, APC, Axin und Cadherine dient²¹⁵. Bisherige kristallographische und biochemische Studien verdeutlichten, dass die N-terminale β -Catenin bindende Domäne (CBD) des TCF (Aminosäuren 1-53) antiparallel zu β -Catenin entlang der Superhelix verläuft (Abbildung 13A). Sie bindet mit einer helikalen Region (Aminosäuren 40-50) und einer "erweiterten Region" (Aminosäuren 13-25) an zwei Stellen der Armadillo-Repeats von β -Catenin²¹⁶. Letztere kann mindestens zwei unterschiedliche Konformationen annehmen. In einer Kristallstruktur bildet sie eine kurze α -Helix¹⁵³, während sie in einer anderen eine ausgedehnte Struktur annimmt^{152,209,216}. Affinitätsmessungen zeigten, dass ein TCF4-Peptid, das nur die α -Helixregion der TCF7L2-CBD umfasst, keine nachweisbare Wechselwirkung mit β -Catenin eingeht. Ein TCF7L2-Peptid, das sowohl die α -helikale als auch die erweiterte Region enthielt, wies dagegen eine hohe Affinität zu β -Catenin auf. Die TCF-CBD eignet sich somit aufgrund seiner Größe und ausgestreckten Sekundärstruktur nicht als Startpunkt für die Entwicklung peptidbasierter Inhibitoren²¹⁷.

Axins β -Catenin-Bindungsdomäne weist eine α -Helixstruktur auf, die mit einer Grube des Armadillo-Repeat 3 in β -Catenin mit hoher Affinität bindet^{130,217}. Diese Bindungsstelle überlappt im Wesentlichen mit der TCF7L2-CBD (Abbildung 13A) und erfüllt somit die grundlegenden Kriterien für das Design eines PPI Inhibitors. Durch die Methode des *Peptide Stapling* können isolierte Peptidsequenzen in ihrer bioaktiven Struktur stabilisiert werden und dadurch effektiv Bindungs epitope imitieren (Kapitel 1.1.3)^{9,48}. Ausgehend

1 Einleitung

vom Axin1-Bindemotiv wurde ein *stapled peptide* als PPI-Inhibitor entwickelt. Für die Einführung des Makrozyklus wurden Positionen ohne signifikanten Beitrag zur β -Catenin-Bindung aus der Axin1-CBD ausgewählt. Anschließend wurde unter Zuhilfenahme eines Phagen-Display-basierten Assays eine optimierte Aminosäuresequenz mit verbesserter Affinität zu β -Catenin identifiziert. Für eines der resultierenden Peptide, StAx-35, liegt eine Kristallstruktur im Komplex mit β -Catenin vor, die einen analogen Bindungsmodus zu Axin1 zeigt (Abbildung 13B). StAx-35 interagiert mit Aminosäuren des Armadillo-Repeats 3 und 4. Die Aminosäure Trp aus StAx-35 bildet eine Edge-to-Face-Interaktion mit Trp338 und eine Wasserstoffbrückenbindung des Carbonyl-Sauerstoffs mit Lys335 von β -Catenin. Diese Interaktion existiert in Axin nicht, da an dieser Position ein Methionin vorhanden ist. Weitere Interaktionen bestehen zwischen C-terminal lokalisiertem Arg und His mit Asn261 bzw. His260 sowie von Asp mit Lys292. Der Makrozyklus zeigt aus der Interaktionsfläche weg und ist somit nicht an der Bindung zu β -Catenin beteiligt. Das aus StAx-35 abgeleitete StAx-35R (= StAx-35 Q5R Substitution) zeigte in zell-basierten Assays eine geringe Aktivität, die in dieser Arbeit verbessert werden soll.

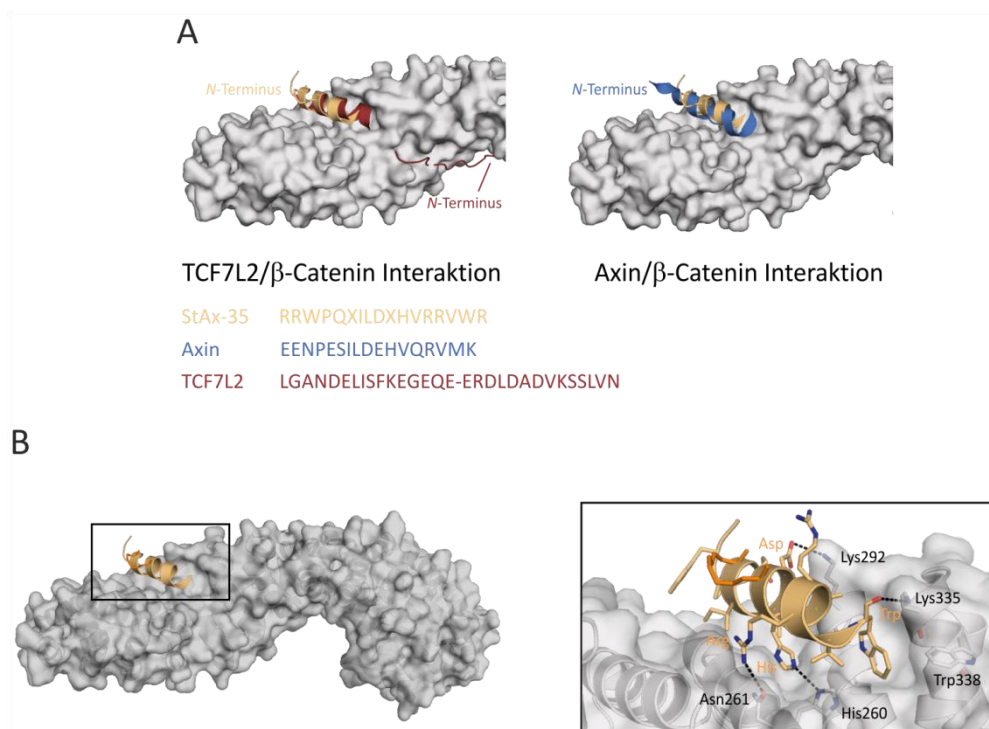


Abbildung 13: Entwicklung von StAx-35 zur Inhibition von β -Catenin. (A) Überlagerung der Kristallstrukturen von StAx-35 (orange, PDB: 4DJS) und TCF7L2 (rot, PDB: 2GL7) sowie mit Axin (blau, PDB: 1QZ7). (B) Kristallstruktur von StAx-35 (orange, PDB: 4DJS) und Wechselwirkung mit Armadillo-Repeat 3 und 4 von β -Catenin.

2 Zielsetzung

2 Zielsetzung

Der Wnt/ β -Catenin Signalweg kontrolliert fundamentale Prozesse der Embryonalentwicklung sowie die Homöostase im adulten Gewebe. Fehlregulation durch konstitutive Aktivierung resultiert in übermäßiger Proliferation und fördert die Entstehung von Krebs. Insbesondere im kolorektalen Karzinom sind aktivierende Mutationen im β -Catenin-Abbaukomplex charakteristisch. Die Mehrzahl bisheriger Inhibitionsstrategien zielt jedoch auf Membranrezeptoren oder Komponenten oberhalb des Abbaukomplexes ab. Eine Inhibition des Transaktivator-Komplexes wäre demnach vielversprechend, aber anspruchsvoll, da dieser durch PPIs reguliert wird. Peptide weisen gute Bindungseigenschaften für flache und ausgedehnte Interaktionsflächen auf und bilden die Grundlage neuartiger Strategien zur Adressierung von PPIs. Jedoch ist ihre Anwendung aufgrund schlechter Membranpenetration limitiert. Das Design zellgängiger Peptide wird durch die Tatsache erschwert, dass Peptide über eine Vielzahl an Importwegen in die Zelle gelangen, die bisher nur zum Teil mechanistisch untersucht wurden. Daher gibt es derzeit keine stringente Designregeln für eine effiziente Aufnahme.

Das Ziel dieser Arbeit bestand darin, die Zellgängigkeit des *stapled peptides* StAx-35R für eine effiziente Inhibition des Wnt/ β -Catenin Signalweges zu erhöhen. Da die Literatur keine Analyse zellpenetrierender Peptide unter vergleichbaren Bedingungen liefert, sollten bekannte CPPs und *stapled peptides* hinsichtlich ihrer Zellgängigkeit mit StAx-35R verglichen werden. Anhand der Ergebnisse sollte eine Optimierungsstrategie zur Erhöhung der Zellgängigkeit und Effektivität von StAx-35R entwickelt werden. Diese sah Modifikationen der Kernsequenz sowie des *N*-Terminus vor, die sowohl die Hydrophobizität als auch die Nettoladung beeinflussen. Dabei muss überprüft werden, ob diese Modifikationen die Affinität zum Zielprotein beeinflussen. In einem Reporter-Gen-Assay sollten die Peptide initial hinsichtlich ihres Potentials zur Modulation des Wnt Signalweges untersucht werden. Für die aktivsten Derivate sollte außerdem überprüft werden, ob eine Selektivität für die Inhibition des Wnt Signalweges besteht und ob diese Peptide in der Lage sind, spezifisch die Proliferation und Migration von Wnt-abhängigen Krebszelllinien zu inhibieren.

3 Ergebnisse und Diskussion

3.1 Evaluierung zellgängiger Peptide

3.1.1 Zellgängige Peptide

Bisher ist eine Vielzahl an Arbeiten zur Zellgängigkeit von CPPs publiziert worden, die jedoch unter unterschiedlichen Bedingungen durchgeführt wurden (Zelllinien, Methodik, experimentelle Parameter) und deren Ergebnisse somit nur eingeschränkt miteinander vergleichbar sind. Des Weiteren stammen viele Ergebnisse aus Studien, in denen die Fixierung von Zellen als Standardmethode angewendet wurde. Seit 2003 ist jedoch bekannt, dass eine Fixierung die Aufnahme und Lokalisation der Peptide beeinflusst und daher als nicht adäquat gilt. Die Fixierung führt zu experimentellen Artefakten, da sie eine Neuverteilung von in Vesikeln eingeschlossenen oder membrangebundenen Peptiden in andere Kompartimente zur Folge hat⁹³. Um Erkenntnisse über mögliche Permeabilität-fördernde Parameter zu gewinnen und die Zellgängigkeit des *stapled peptides* StAx-35R (ab hier: StAx) zu verbessern, wurden sieben Vertreter der verschiedenen CPP-Klassen unter vergleichbaren Bedingungen re-evaluiert (Tabelle 1). Aus der Gruppe der polykationischen CPPs wurden Oktaarginin (ab hier: R₈)¹⁸ sowie Tat₄₉₋₅₇ (ab hier: Tat)¹⁰ und als Vertreter der primär amphipathischen CPPs wurden Pep-1³¹, MPG²⁸ und TP10²³ ausgewählt. Das sekundär amphipathische Penetratin¹⁶ und SAHM1⁵², ein Vertreter der *stapled peptides*, wurden ebenfalls in den Vergleich hinzugenommen. Zusätzlich wurde eine Negativkontrolle eingeführt: Da anti-mikrobielle Peptide ähnliche strukturelle Eigenschaften wie amphipathische CPPs aufweisen (positive Nettoladung und Hydrophobizität), wurde das nicht lytische und nicht zellgängige N-terminale Fragment Bac₁₅₋₂₄ (ab hier: Bac) des anti-mikrobiellen Peptides Bactenecin7 ausgewählt²¹⁸.

Tabelle 1: Zellgängige Peptide. Die synthetisierten Peptide tragen C-terminal eine Amidfunktion. Pep-1 und MPG weisen C-terminal ein Cysteamin (cya) auf. N-terminal wurden die Peptide je nach Verwendungszweck modifiziert (z.B. Fluorophormarkierung). X = (S)-2-(4'-Pentenyl)alanin.

Peptid	Sequenz
Bac ₁₅₋₂₄	PRPLPFPRPG
Tat ₄₉₋₅₇	RKKRRQRRR
R ₈	RRRRRRRR
Penetratin	RQIKIWFQNRRMKWKK
TP10	AGYLLGKINLKALAALAKKIL
Pep-1	KETWWETWWTEWSQPKKKRKV-cya
MPG	GALFLGFLGAAGSTMGAWSQPKKKRKV-cya
SAHM1	ERLRRRIXLCRXHHST
StAx-35R	RRWPRXILDXHVRVWR

Die Peptide wurden mittels Fmoc-basierter Festphasen-Peptidsynthese synthetisiert (Abbildung 14, Kapitel 5.4). Die kohlenwasserstoffverbrückten Peptide StAx und SAHM1 weisen in $i, i+4$ Position α -Methyl, α -Alkenyl-Aminosäurebausteine auf, die während der Peptidsynthese nach Standardprotokoll eingefügt wurden. Zur Bildung der α -helikalen Struktur wurde nach der kompletten Peptidsequenz eine Ruthenium-katalysierte Ringschlussmetathese (*ring-closing metathesis*, RCM) durchgeführt. N-terminale Modifikationen wurden ebenfalls an der festen Phase gekuppelt. Für die Untersuchung der Zellgängigkeit wurden die Peptide mit einem Polyethylenglykol (PEG₂)-Distanzhalter und anschließend mit Fluoresceinisothiocyanat (FITC, *f*-) markiert. Anschließend wurden die Peptide vom polymeren Träger abgespalten, über semi-präparativer Hochleistungsflüssigkeitschromatographie (HPLC) aufgereinigt und mittels analytischer HPLC, gekoppelt an ein Massenspektrometer mit Elektrospray-Ionisation (HPLC/ESI-MS), auf Identität und Reinheit überprüft (Kapitel 8.1).

3 Ergebnisse und Diskussion

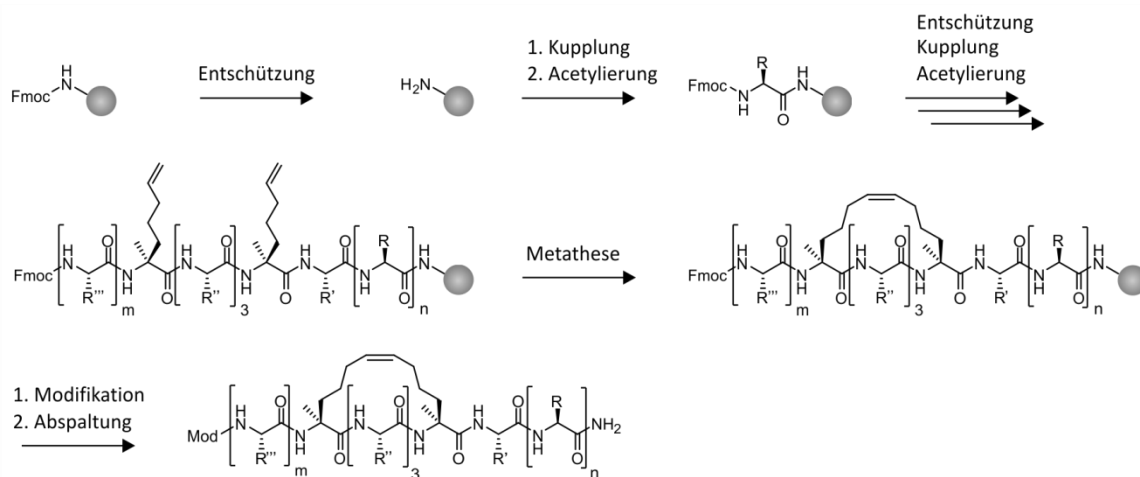


Abbildung 14: Schema der Peptidsynthese und Ringschlussmetathese. Entschützung: 25% Piperidin in DMF, 2x5 min. Kupplung: 4 Äq Aminosäure, 3.9 Äq Kupplungsreagenz, 8 Äq DIPEA in DMF, 30-60 min. Acetylierung: NMP/Ac₂O/DIPEA (10:1:1), 10 min. Metathese: Grubbs Katalysator (1. Generation) unter Stickstoffatmosphäre in DCE, 6x1 h. Modifikation: Kupplung *N*-terminaler Modifikationen wie in Kapitel 5.4.4 beschrieben. Abspaltung: TFA/H₂O/TIPS (95:2,5:2,5), 4 h.

3.1.2 Cytotoxizität

Bevor die Peptide in zellbasierten Studien genutzt werden konnten, musste sichergestellt werden, dass sie keine Toxizität aufweisen. Cytotoxizität beschreibt allgemein die zelltörende Eigenschaft chemischer Verbindungen und ist nicht als ein spezifischer Mechanismus des Zelltodes wie Apoptose oder Nekrose zu verstehen^{219,220}. Die metabolische Aktivität wurde als Indikator für die Cytotoxizität mit dem WST-1-Assay gemessen. In diesem Assay können nur metabolisch aktive Zellen das Tetrazoliumsalz WST-1 zu einem wasserlöslichen Formazanfarbstoff reduzieren, der photometrisch detektiert wird. Ein Anstieg der Anzahl lebensfähiger Zellen führt zu einer Erhöhung der Gesamtaktivität von mitochondrialen Dehydrogenasen in der Probe^{221,222}. Diese Zunahme der Enzymaktivität resultiert wiederum in vermehrter Bildung des Formazanfarbstoffes, der direkt mit der Anzahl der metabolisch aktiven Zellen korreliert. Jede zelluläre Schädigung, die durch die untersuchten CPPs verursacht wird, führt zu einem Verlust der Fähigkeit, Energie für die metabolische Zellfunktion bereitzustellen, und zu einer geringeren Bildung des Formazanfarbstoffes.

HeLa-Zellen wurden 6 h mit unterschiedlichen Peptidkonzentrationen (10, 5 und 2,5 µM, finale DMSO-Konzentration 0,5%) inkubiert. Für die Untersuchung der Toxizität der einzelnen Peptide wurden Fluoresceinisothiocyanat-markierte Peptide (FITC, *f*-) verwendet, da diese Peptidmodifikation auch für die weitere Evaluation der Zellgängigkeit eingesetzt wurde. Um den dynamischen Bereich des Assays zu bewerten, wurden eine

DMSO-Lösungsmittel-Kontrolle (0,5%) und Triton™ X-100-Kontrolle (1%) angefertigt. Triton™ X-100 solubilisiert die Zellmembran und wurde daher als Kontrolle für tote Zellen verwendet. Da alle Peptide in DMSO gelöst wurden, diente die DMSO-Kontrolle dazu, peptidspezifische Effekte von allgemeinen DMSO-bezogenen Effekten zu unterscheiden. Die Zellviabilitäten Peptid-behandelter Zellen wurden auf die DMSO-Kontrolle normiert (Abbildung 15). Nach 6 h Inkubation schwankten die Zellviabilitäten Peptid-behandelter Zellen zwischen 80 und 90%, während die niedrigste Zellviabilität für Triton™ X-100 mit 5-10% zu erkennen war. Für *f*-TP10 behandelte Zellen war bei der höchsten Konzentration (10 μ M) eine Reduktion der Zellviabilität auf ca. 40% vorhanden. Bei *f*-Bac, *f*-Tat, *f*-Pep-1, *f*-MPG, *f*-SAHM1 und *f*-StAx lag die Zellviabilität bei 90%, für *f*-R₈ und *f*-Penetratin bei 80%. Insgesamt war innerhalb der Konzentrationsreihe jedes einzelnen Peptids kein konzentrationsabhängiger Effekt auf die Zellviabilität der Zellen zu beobachten. Gegenüber dem Lösungsmittel DMSO waren im Rahmen des Fehlers keine signifikanten Einbußen der Zellviabilität zu beobachten. Ein negativer Einfluss auf die Zellviabilität war lediglich bei der höchsten Konzentration (10 μ M) von *f*-TP10 zu erkennen.

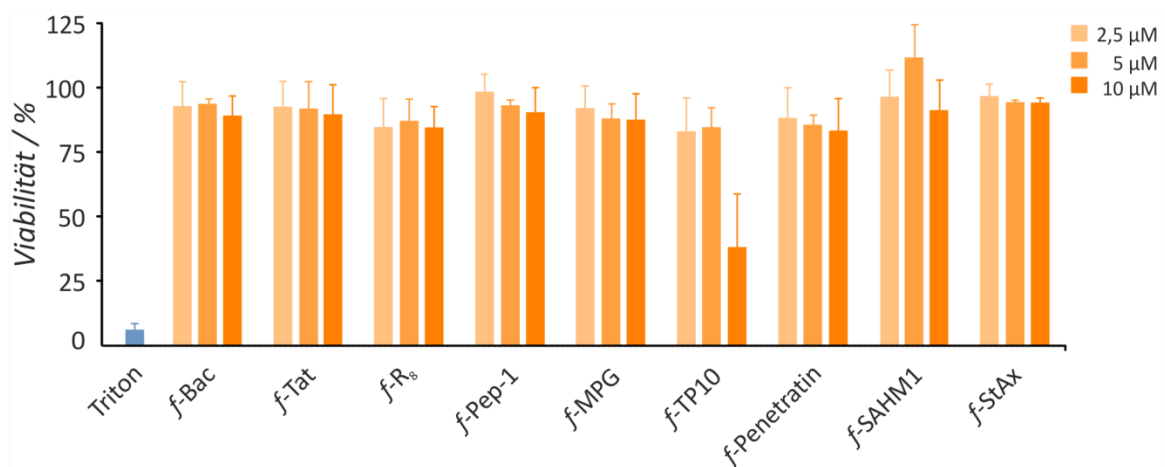


Abbildung 15: Zellviabilität von HeLa-Zellen nach 6 h Inkubation mit *f*-markierten Peptiden (2,5-10 μ M). Die Zellviabilität wurde auf die DMSO-Lösungsmittelkontrolle (0,5%) normiert. 1% Triton™ X-100 fungiert als Negativkontrolle. Experimente wurden als biologisches Replikat ($n = 4$) mit jeweils technischen Triplikaten angefertigt. Fehlerbalken repräsentieren 1σ .

Im Vergleich zu Kontrollproben können die Effekte auf die Zellviabilität der Zellen durch CPPs als nicht signifikant eingestuft werden. Die Cytotoxizität wird als sehr gering eingeschätzt, was schlussfolgern lässt, dass die meisten der untersuchten Peptide weder den Zellstoffwechsel beeinträchtigen noch eine tödliche cytotoxische Wirkung bei Konzentrationen bis zu 10 μ M verursachen. Lediglich für TP10 konnte nach 6 h Inkubationszeit

eine Erniedrigung der Zellviabilität detektiert werden, die auf mögliche Toxizität hinweist. TP10 ist ein chimäres Peptid, das sich aus dem Neuropeptid Galanin und dem Wespengift Mastoparan zusammensetzt²². In der Vergangenheit wurde vermehrt beobachtet, dass TP10 die Integrität der Membran störte indem es transiente Poren induzierte²²³⁻²²⁵. Die Zellviabilitätsdaten dieser Arbeit bestätigen dies.

3.1.3 Durchfluscytometrie

Zur Beurteilung des Peptidimports wurde eine Kombination aus Durchfluscytometrie und Konfokalmikroskopie mit lebenden Zellen gewählt, um die Wahrscheinlichkeit von falsch positiven Ergebnissen zu verringern. Die Konfokalmikroskopie ermöglicht die subzelluläre Lokalisation von Peptiden, aber ist nicht quantitativ, während die Durchfluscytometrie quantitativ ist, aber keine räumlichen Informationen liefert.

Zunächst wurde die Zellgängigkeit der Peptide mittels Durchfluscytometrie untersucht. Diese Methode beruht auf dem Prinzip, dass von einem Hüllstrom fokussierte Zellen einzeln durch einen engen Kanal strömen und dabei an einem Laserstrahl vorbeifließen. Das dabei entstehende Streulicht und die emittierte Fluoreszenz werden detektiert und liefern quantitative Aussagen über jede einzelne Zelle. Abhängig von ihrer Morphologie, Größe und Struktur streuen die Zellen Licht im rechten Winkel (*side scatter*, SSC) und in einer Vorwärtsrichtung (*forward scatter*, FSC) relativ zum Laserstrahl. Das Seitenstreulicht ist ein Maß für im rechten Winkel gebrochenes Licht und gibt Informationen über die Granularität (Textur) der Zellen. Beispielsweise weisen Zellen mit Vesikeln oder großem Zellkern eine hohe Seitenstreuung auf. Das Vorwärtsstreulicht ist ein Maß für in einem flachen Winkel gebrochenes Licht und hängt von Größe und Volumen der Zellen ab. In einem Cytogramm wird Seitenstreulicht gegen Vorwärtsstreulicht aufgetragen und jeder Messpunkt einzeln dargestellt. So können Zelltrümmer, aggregierte Zellen und vereinzelte Zellen als voneinander abgegrenzte Populationen unterschieden werden.

HeLa-Zellen wurden mit 5 μM *f*-markiertem Peptid für 90 min inkubiert. Um auszuschließen, dass der Fluorophor selbst die treibende Kraft der Zellgängigkeit ist, wurden in einer Kontrollreaktion HeLa-Zellen mit 5 μM Carboxyfluorescein (FAM) inkubiert. Da alle Peptide in DMSO gelöst wurden, diente die DMSO-Kontrolle (0,5% DMSO) dazu, peptidspezifische Effekte von allgemeinen DMSO-bezogenen Effekten zu unterscheiden. Im Bereich für vereinzelte, intakte Zellen (*cell gate*) wurden 10.000 Messpunkte erhoben. Für die Zellpopulation DMSO- und Peptid-behandelter Zellen ist der prozentuale Anteil

an Zellen im *cell gate* in Abhängigkeit der Gesamtheit aller Messpunkte ähnlich. Für keines der Peptide ist ein erhöhter Anteil an Messpunkten im Ursprungsbereich des Cytogramms aufzufinden, der auf verstärktes Vorhandensein von Zelltrümmern hindeutet. Dies legt nahe, dass keine auf Ebene der Zellmorphologie detektierbare Toxizität durch beispielsweise Zerstörung der Zellmembranen vorliegt. Diese Ergebnisse sind in Übereinstimmung mit der Zellviabilitätsbestimmung Peptid-behandelter HeLa-Zellen, in der keines der Peptide einen signifikanten Effekt auf die Zellviabilität bei einer Konzentration von 5 μM aufwies (Kapitel 3.1.2). Auffällig ist jedoch das Cytogramm MPG-behandelter Zellen, da gegenüber der DMSO-Kontrolle die Seitenlichtstreuung stärker ist und auf erhöhte Granularität der Zellen hinweist (Abbildung 16). Ob die Granularität durch z.B. Akkumulation in vesikulären Strukturen oder Aggregation hervorgerufen wurde, wurde mittels Konfokalmikroskopie geklärt.

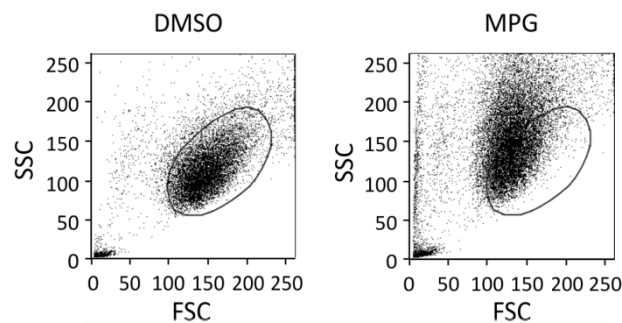


Abbildung 16: Cytogramme DMSO (0,5%) und MPG (5 μM , 0,5% DMSO) behandelte HeLa-Zellen. Das Oval indiziert das *cell gate* einzelner HeLa-Zellen.

Parallel zur Lichtstreuung misst das Durchflusscytometer Fluoreszenzsignale, die von jeder einzelnen Zelle emittiert werden. Da die Peptide mit Fluorescein modifiziert sind, wird nach ihrer Internalisierung eine erhöhte Emission bei 530 nm erwartet. Um falsch positive Ergebnisse durch Oberflächen-adhärenzte Peptide zu minimieren, wurden die Zellen zuvor mit Trypsin behandelt – einer Protease, die nach basischen Aminosäuren schneidet. Der geometrische Mittelwert der Fluoreszenzintensität wurde verwendet, um die Internalisierung der Peptide zu vergleichen (Abbildung 17). Die DMSO-Kontrolle zeigt die geringste Fluoreszenzintensität und spiegelt den Beitrag der zellulären Autofluoreszenz wieder. Die Fluorophor- und Peptid-Kontrollen FAM und *f*-Bac zeigen nur eine gering erhöhte Fluoreszenz gegenüber der DMSO-Kontrolle. Sie sind demnach nicht internalisiert. Die polykationischen Peptide *f*-Tat und *f*-R₈ zeigen eine 26- bzw. 47-fach erhöhte Fluoreszenzintensität. Das primär amphipathische Peptid *f*-TP10 liegt mit 30-fach erhöhter Fluoreszenzintensität im Bereich zwischen *f*-Tat und *f*-R₈. Das sekundär amphip-

3 Ergebnisse und Diskussion

pathische *f*-Penetratin schließt sich mit 56-facher Erhöhung der Fluoreszenzintensität der Reihenfolge an und wird im Vergleich zu den polykationischen Peptiden vermehrt von den Zellen aufgenommen. Die primär amphipathischen Peptide *f*-Pep-1 und *f*-MPG sowie *stapled peptide f*-SAHM1 zeigen die höchste Fluoreszenzintensität mit einer 160-fachen Erhöhung gegenüber DMSO. Interessanterweise zeigt das *stapled peptide f*-StAx die geringste Internalisierung und liegt knapp unterhalb des polykationischen Peptides *f*-Tat. Wie bereits von Grossmann *et al.* vermutet, könnte die niedrige zelluläre Aktivität des Peptides ein Resultat der geringen Zellgängigkeit sein²¹⁷. Die vergleichende Analyse der CPPs in dieser Arbeit bestätigt eine relativ niedrige Internalisierung.

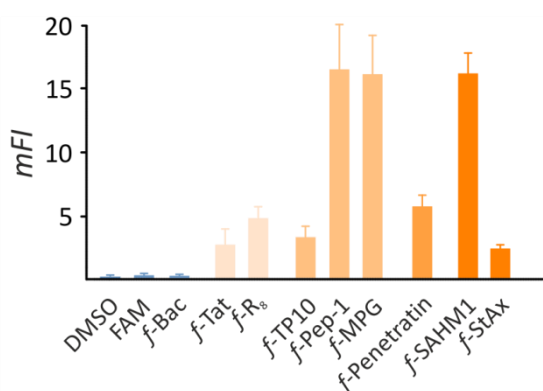


Abbildung 17: Zelluläre Aufnahme von CPPs. Plot des geometrischen Mittels der Fluoreszenzintensitäten (mFI), die durch Durchflusscytometrie erhalten wurden. HeLa-Zellen wurden mit FITC (*f*)-markierten Peptiden (5 μ M, 90 min) behandelt und 10.000 Ereignisse lebender Zellen aus mindestens drei biologischen Replikaten gemessen. Fehlerbalken repräsentieren 1σ .

3.1.4 Konfokalmikroskopie

Zur Untersuchung der zellulären Lokalisation der Peptide wurde die Konfokalmikroskopie ausgewählt. Die Konfokalmikroskopie ist eine spezielle Form der Lichtmikroskopie, bei der das von der Probe reflektierte Licht durch eine Lochblende fokussiert wird und nur aus einer Ebene durchlässt. Licht anderer Ebenen wird blockiert. So erlaubt es die Konfokalmikroskopie verschiedene Ebenen der Zelle zu visualisieren und stellt so sicher, dass die beobachtete Fluoreszenz von internalisierten Peptiden stammt und nicht von Peptiden, die an der Zelloberfläche adhäreren. TP10 wurde aufgrund der in der Zellviabilitätsmessung festgestellten Toxizität bei erhöhten Konzentrationen aus der weiteren Untersuchung ausgeschlossen, da die erhaltenen Ergebnisse und Rückschlüsse nicht zielführend für eine Zellgängigkeitsoptimierung von StAx wären.

Simultan zur Durchflusscytometrie wurden HeLa-Zellen mit den übrigen Fluoresceinmarkierten Peptiden inkubiert (90 min, 5 μ M). Um auszuschließen, dass der Fluorophor

selbst Zellgängigkeit induziert, wurden in einer Kontrollreaktion HeLa-Zellen mit 5 μ M FAM inkubiert. Da alle Peptide in DMSO gelöst wurden, diente die DMSO-Kontrolle (0,5%) dazu, Peptid spezifische Effekte von allgemeinen DMSO-bezogenen Effekten zu unterscheiden. Transmissions- sowie Fluoreszenzbilder der *f*-Peptide wurden aufgenommen (Abbildung 18). Für die DMSO- und FAM-Kontrollen sowie für *f*-Bac war keine Färbung der Zellen zu sehen. Die Beobachtungen stimmen mit denen der Durchflusscytometrie überein. Weder der Fluorophor selbst noch das Kontrollpeptid wurden internalisiert. *f*-Tat, *f*-R₈, *f*-Penetratin, *f*-Pep-1 und *f*-SAHM1 behandelten Zellen zeigten diffuse Färbung innerhalb des Cytosols, des Kerns und auch intensiv fluoreszierender Punkte um den Zellkern. Vergleicht man StAx-35R mit den anderen Peptiden wird deutlich, dass Internalisierung des Peptides mikroskopisch kaum erkennbar ist, da lediglich punktförmige fluoreszierende Strukturen anstatt einer diffusen Verteilung zu sehen sind. Die Ergebnisse sind konsistent mit der Durchflusscytometrie; alle Peptide werden aufgenommen, aber eine quantitative Aussage ist mit der Konfokalmikroskopie nicht möglich.

Auch das Peptid MPG zeigt intrazelluläre Färbung sowie verzweigte Strukturen mit hoher Fluoreszenzintensität an den Rändern der Zellen. Diese Strukturen befinden sich entlang der Plasmamembran, jedoch nicht innerhalb der Zelle. Diese These wird bestätigt, da die Strukturen auch im Transmissionsbild erkennbar sind (Abbildung 18). Auffällig ist, dass sich diese Strukturen nicht nur an den Zellen, sondern auch in der Lösung um die Zellen herum befinden. Vermutlich handelt es sich hierbei um Aggregate des Peptides, die auf die geringe Löslichkeit des Peptides zurückzuführen sind. Diese Aggregate erklären die Veränderung der Zellmorphologie, die in der Durchflusscytometrie beobachtet wurde (Kapitel 3.1.4). Die Aggregate können das Licht stärker brechen, es werden höhere Werte des Seitenstreulichts detektiert und die Zellpopulation ist im Cytogramm verschoben. Geschlussfolgert werden kann auch, dass die mit Durchflusscytometrie beobachtete starke Internalisierung von MPG ein Artefakt ist, das durch die stark fluoreszierenden Aggregationen zustande gekommen ist. Diese Ergebnisse verdeutlichen die Wichtigkeit orthogonaler Methoden zur Charakterisierung der Zellgängigkeit.

3 Ergebnisse und Diskussion

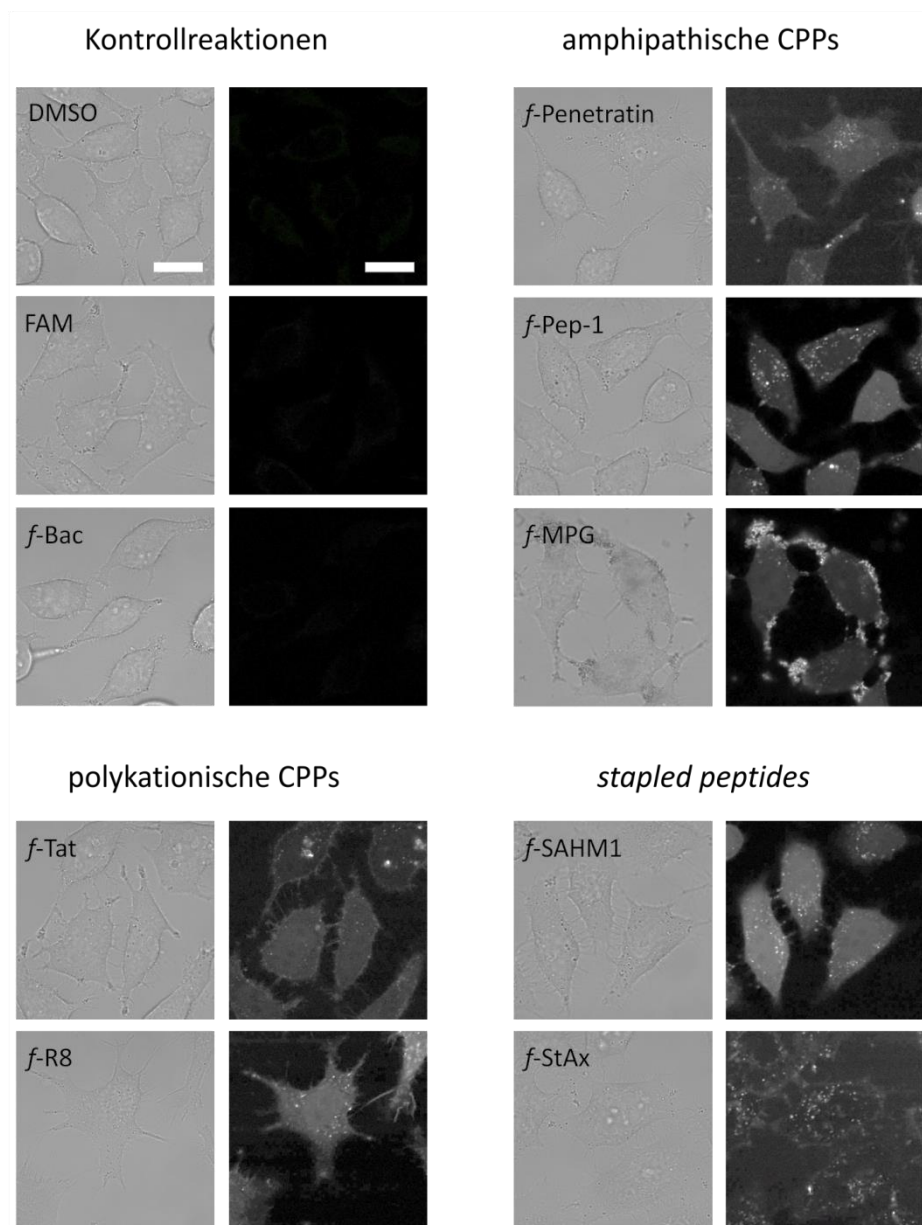


Abbildung 18: Zelluläre Aufnahme FITC (*f*)-markierter Peptide. Lebendzell-Konfokalmikroskopie von HeLa-Zellen, die für 90 min mit 5 μ M *f*-markierter Peptide inkubiert wurden. Links: Durchlicht, rechts: FITC-Fluoreszenz, Maßstabsbalken 20 μ m.

Zusammenfassend zeigt sich, dass die Verwendung orthogonaler Analysemethoden für die Untersuchung der Zellgängigkeit entscheidend ist. Am Beispiel von *f*-MPG wurde deutlich, dass trotz stringenter Waschprotokolle und Proteaseverdau Peptidaggregate auf der Zelloberfläche zurück blieben und falsch positive Ergebnisse erzeugten. *f*-Tat, *f*-R₈ und *f*-StAx-35R zeigten in cytomertischen Untersuchungen vergleichbar schwache Internalisierung. Anhand der Konfokalmikroskopie wurde jedoch deutlich, dass die intrazelluläre Verteilung nicht vergleichbar ist. *f*-Tat und *f*-R₈ wiesen diffuse cytosolische Färbung auf, während *f*-StAx-35R nur gering cytosolisch verfügbar war und die detektierte

Fluoreszenz vorrangig von vesikulären Strukturen stammte. Sollten die Peptide nicht in der Lage sein, diese vesikulären Strukturen zu verlassen sondern in ihnen verweilen, würden diese vermutlich in Endosomen bzw. Lysosomen verdaut werden und nicht ihrem Zweck – der Inhibition des Wnt/ β -Catenin Signalweges im Nukleus – zur Verfügung stehen.

Entsprechend dem Stand der aktuellen Forschung erfolgt die Internalisierung polykationischer Peptide konzentrationsabhängig durch die passiven Mechanismen Transduktion und Translokation sowie aktiv über Endocytose. Die Schwellenwerte jedes einzelnen Mechanismus können überlappen und sind von der Zelllinie abhängig^{80,226}. Hier wurden für die polykationischen Peptide *f*-R₈ und *f*-Tat sowohl cytosolische als auch vesikuläre Akkumulation beobachtet, die auf diese parallelen Internalisierungsmechanismen hindeuten. Aber auch die hydrophoberen Peptide *f*-Penetratin, *f*-Pep-1 und *f*-SAHM1 zeigen diffuse Verteilung in der gesamten Zelle sowie vereinzelte vesikuläre Ansammlungen. Es kann geschlussfolgert werden, dass sich die CPPs in Bezug auf die Internalisierung anscheinend ähnlich verhalten und vermutlich mehrere Internalisierungsmechanismen gleichzeitig bedienen. Jedoch scheinen einzelne Peptide wie *f*-Pep-1 und *f*-SAHM1 effektiver die Membran zu durchdringen als andere.

3.2 β -Catenin

3.2.1 Expressionsanalyse

Für die Zellgängigkeitsoptimierung wurde eine Veränderung der Aminosäuresequenz von StAx nötig. Um zu untersuchen, ob diese die Bindungsaffinität zum Zielprotein beeinflusst, sollte ein Bindungsassay durchgeführt werden. Dafür wurde β -Catenin zunächst kloniert, exprimiert und aufgereinigt. Humanes Vollängen- β -Catenin (Aminosäuren 1-781, Genbank Zugriffsschlüssel NM_001904.3.) wurde in pET-28a, pETM-40 und einen modifizierten pGEX-4T-I-Vektor kloniert, um drei Fusionsproteine mit verschiedenen Affinitätsmarkern (*Tags*) zu erzeugen. Unter Verwendung von pET-28a wurde ein Konstrukt mit einem C-terminalen Hexahistidin (His_6)-*Tag* erstellt. Zusätzlich wurden N-terminale Fusionsproteine exprimiert, die die Löslichkeit der Zielproteine und ihre native Faltung erhöhen können²²⁷. Der Vektor pETM-40 kodiert das Maltose-bindende Protein (MBP) und pGEX-4T-I die Glutathion-S-Transferase (GST, Abbildung 19). Für die heterologe Expression wurde *Escherichia coli* (*E. coli*) BL21-Gold (DE3) verwendet.

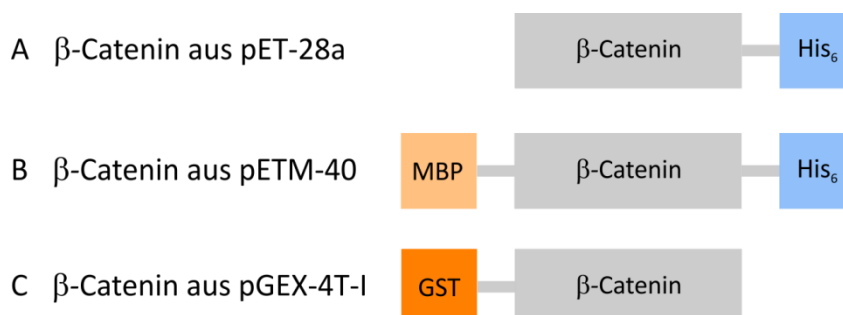


Abbildung 19: Übersicht der verwendeten β -Catenin-Fusionsproteine. (A) β -Catenin mit C-terminalem His_6 -*Tag*. (B) N-terminaler MBP-*Tag* gefolgt von β -Catenin und einem C-terminalen His_6 -*Tag*. (C) β -Catenin mit N-terminalem GST-*Tag*.

Zur Identifikation geeigneter Kultivierungs- und Expressionsbedingungen zur Gewinnung von β -Catenin wurde eine Expressionsanalyse durchgeführt. Hierbei wurden Parameter wie Temperatur und Zeit variiert, aber auch verschiedene Nährmedien wie LB und TB verwendet (Tabelle 2). Es wurden Proben vor und nach Induktion der Expression genommen sowie von einer Testaufreinigung, um zu prüfen, ob lösliches Protein vorhanden ist. Expression, Aufreinigung und Analyse wurde für alle Reaktionen analog durchgeführt. Die Analyse erfolgte über denaturierende Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE, Abbildungen in Kapitel 8.8).

Tabelle 2: Inkubationsparameter der Expressionsanalyse. Alle Bedingungen wurden sowohl in LB- als auch TB-Medium getestet. n.b. = nicht bestimmt, x = getestete Bedingung.

	20°C	25°C	37°C
4 h	n.b.	x	x
über Nacht	x	x	n.b.

Unter allen getesteten Bedingungen wird eine erfolgreiche Überexpression erzielt sowie unlösliches und lösliches Protein erhalten. Zwischen den einzelnen Parametern sind geringe Unterschiede zu erkennen: Durch die erhöhte Nährstoffdichte und Zusammensetzung des TB-Mediums waren die Biomasse und somit auch die Menge erhaltenen Gesamtproteins erhöht. Obwohl das Protein mit verschiedenen Löslichkeitsmarkern exprimiert wurde, war in allen Proben unlösliches Protein vorhanden. Unlösliches Protein liegt vermutlich in Einschlusskörperchen vor, welche oft bei der exzessiven Überexpression rekombinanter Proteinen entstehen. Die Proteine wurden unvollständig oder fehlerhaft gefaltet, sodass unlösliche Aggregate entstehen^{228,229}. Im Allgemeinen kann die Bildung von Einschlusskörpern verringert werden, indem die Rate der Proteinbiosynthese durch Absenken der Temperatur nach Induktion verringert wird. Des Weiteren wird die Aggregation von Proteinen bei höheren Temperaturen aufgrund der starken Temperaturabhängigkeit von hydrophoben Wechselwirkungen begünstigt²³⁰. Aus diesem Grund wurden weitere Expressionen unter Verwendung von TB-Nährmedium und bei 20°C über Nacht durchgeführt.

3.2.2 Proteinstabilität

Differential Scanning Fluorimetry

Die Praxis zeigte, dass β -Catenin relativ instabil ist, da es nur über einen kurzen Zeitraum lagerungsfähig ist und dazu neigt, bei Konzentrationen $>100 \mu\text{M}$ auszufallen. Eine Änderung der Pufferzusammensetzung oder spezielle Additive wie z.B. Co-Faktoren können die Stabilität von Proteinen fördern. Die Auswirkungen veränderter Pufferzusammensetzungen auf die Proteininstabilität erfolgte mittels *Differential Scanning Fluorimetry* (DSF), die auf der Messung der Thermostabilität beruht. Proteine werden dabei einem stetig steigenden Temperaturgradienten ausgesetzt, der zur thermischen Entfaltung und anschließender Denaturierung des Proteins führt. Bei der Denaturierung werden hydrophobe Bereiche dem Lösungsmittel exponiert an die sich der umgebungssensitive Fluorophor

3 Ergebnisse und Diskussion

SYPRO[®] Orange anlagert. Der thermische Entfaltungsprozess kann so durch eine Zunahme der Fluoreszenz verfolgt werden. Ist die Struktur des Proteins durch einen bestimmten Pufferzusatz stabilisiert, entfaltet sich das Protein erst bei einer höheren Temperatur. Trägt man die Fluoreszenzintensität gegen die Temperatur auf wird im Idealfall eine sigmoidale Kurve beobachtet, deren Wendepunkt der Schmelztemperatur T_m entspricht. Aus dem Maximum der ersten Ableitung kann daher die Schmelztemperatur bestimmt werden^{231,232}. Es wurden 96 verschiedene Pufferzusammensetzungen und Additive (Kapitel 8.9) für jedes der drei exprimierten β -Catenin Proteine getestet. Die Fluoreszenz bei 570 nm wurde im Temperaturprofil von 5-95°C gemessen. Aufgrund der hohen Datenmenge werden im Weiteren nur einige Beispiele exemplarisch gezeigt.

Die Thermostabilitätsdaten des Fusionsprotein MBP- β -Catenin-His₆ aus pETM-40 zeigen bei niedriger Temperatur ($T = 5-25^\circ\text{C}$) eine hohe Fluoreszenz, die bis $T = 45^\circ\text{C}$ abnimmt (Abbildung 20). Bei weiterer Erhöhung der Temperatur ist ein sigmoidaler Kurvenverlauf, jedoch ohne starken Anstieg des Fluoreszenzsignals zu verzeichnen. Da der verwendete Fluorophor SYPRO[®] Orange an hydrophobe Bereiche bindet, liegt das Protein vermutlich bereits größtenteils entfaltet vor. Der anschließende annähernd sigmoidale Kurvenverlauf ist durch eine thermische Entfaltung des restlichen Proteins zu erklären. Die Verwendung des Maltose-bindenden Proteins als Löslichkeitsvermittler für β -Catenin erscheint somit nicht zielführend. Aus diesem Grund wurde das Protein nicht für weitere Experimente eingesetzt.

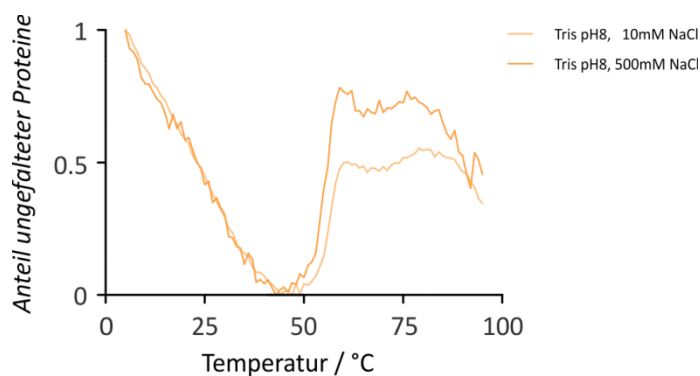


Abbildung 20: Thermische Entfaltung von β -Catenin aus pETM-40 in 10 mM Tris pH8 mit 10 bzw. 500 mM NaCl. Die Fluoreszenz von SYPRO[®] Orange wurde bei 570 nm gemessen und zwischen (0,1) normiert. Die Schmelztemperatur entspricht der Temperatur bei der die Hälfte der Proteine entfaltet ist. Bei den dargestellten Messungen handelt es sich um Unikate.

Für die Bestimmung der Thermostabilität von β -Catenin aus pGEX wurde der GST-Tag durch Verdau mit der *tobacco etch virus* (TEV)-Protease abgetrennt. Die Fusionsproteine β -Catenin-His₆ aus pET-28a und β -Catenin aus pGEX lieferten vergleichbare

Thermostabilitäten. Aus diesem Grund werden im Folgenden nur Ergebnisse von β Catenin aus pGEX gezeigt. Die Stabilität von β -Catenin wurde in einem pH-Bereich von 4-9 untersucht. In Abhängigkeit des pH-Wertes verändert sich der Ionisierungszustand der Aminosäuren und somit ihre Fähigkeit Wasserstoffbrückenbindungen auszubilden. Liegt der pH-Wert der Lösung nahe dem isoelektrischen Punkt (pI) des Proteins, verringert sich die Fähigkeit Wasserstoffbrückenbindungen mit den umgebenden Wassermolekülen auszubilden. Des Weiteren findet keine Abstoßung zwischen den Proteinen statt und sie aggregieren²³³. Bei erniedrigtem pH-Wert (pH4-6, blaue Kurven, Abbildung 21A) waren keine idealen sigmoidalen Thermostabilitätskurven aus denen zuverlässige Schmelztemperaturen abgelesen werden können vorhanden. Insgesamt ist jedoch die Tendenz zu erkennen, dass die Kurvenverläufe zu geringeren Temperaturen verschoben sind. Dies ist vermutlich auf Aggregation des Proteins zurückzuführen, da sich die getesteten pH-Werte in der Nähe des isoelektrischen Punktes von β -Catenin (pI = 5,6) befinden. Bei neutralem bis basischem pH-Wert (pH7-9, orangene Kurven, Abbildung 21A) waren sigmoidale Kurvenverläufe vorhanden. Die erste Ableitung liefert eine Schmelztemperatur von $T_m = 55.5^\circ\text{C}$ für pH9 und $T_m = 57^\circ\text{C}$ für HEPES pH7 und Tris pH8. β -Catenin weist somit die höchste Thermostabilität in einem pH-Bereich von 7-8 auf.

Im Allgemeinen können Salze die Thermostabilität von Proteinen verändern. Chaotrope Salze erhöhen die Entropie des Systems, indem sie die Protein umgebende Hydrathülle aufbrechen und den hydrophoben Effekt verringern. Da die Tertiärstruktur jedoch unter anderem abhängig vom hydrophoben Effekt ist, können die Proteine denaturieren^{234,235}. Kosmotrope Salze verstärken hydrophobe Effekte und stabilisieren intramolekulare Wechselwirkungen in Proteinen. Bei hohen Salzkonzentrationen kommt es jedoch zu Konkurrenz um die Lösungsmittelmoleküle und die Salze können die Hydrathüllen des Proteins entfernen, sodass es präzipitiert^{235,236}. Die Thermostabilität von β -Catenin wurde in Abhängigkeit der Ionenstärke von NaCl gemessen ($c = 10\text{-}500\text{ mM}$, Abbildung 21B). NaCl ist laut der Hofmeister-Serie weder ein stark chaotropes noch kosmotropes Salz. Die Schmelztemperatur beträgt bei 10 und 50 mM NaCl ca. 57°C , bei den höheren Salzkonzentrationen 56°C . Aufgrund der erhaltenen Daten wurde geschlussfolgert, dass eine Variation der Ionenstärke von NaCl einen geringen Effekt auf die Thermostabilität von β Catenin ausübt.

3 Ergebnisse und Diskussion

Polyole wie PEG oder Glycerol sind wasserlösliche Verbindungen, die Proteine stabilisieren und ihre Aggregation verringern. Sie interagieren vorzugsweise mit hydrophoben Bereichen bei denen Glycerol als eine amphiphile Grenzfläche zwischen der Proteinoberfläche und dem Lösungsmittel wirkt^{237,238}. Je nach Konzentration oder Kettenlänge können PEGs jedoch auch Präzipitation induzieren²³⁹. Die Thermostabilität von β -Catenin wurde mit einem Glycerolzusatz von 2,5 und 10% sowie unter Verwendung von 2 und 5% PEG3350 untersucht. Glycerol erhöhte die Thermostabilität bereits bei einer Konzentration von 2,5% ($T_m \approx 58,5^\circ\text{C}$) und liefert bei 10% die höchste in diesem Experiment beobachtete Schmelztemperatur ($T_m \approx 60,5^\circ\text{C}$, orangene Kurven, Abbildung 21C). PEG3350-haltige Lösungen hatten geringen Einfluss auf die Schmelztemperatur, sie bewegte sich im Bereich von $56,5$ - $57,5^\circ\text{C}$ (blaue Kurven, Abbildung 21C). Als Beispiel für ein destabilisierendes Salz ist die Thermostabilität von β -Catenin in Natriumphosphatpuffer pH7,5 gezeigt (Abbildung 21D). Durch Erhöhung der Phosphatkonzentration sank die Schmelztemperatur auf bis zu 51°C .

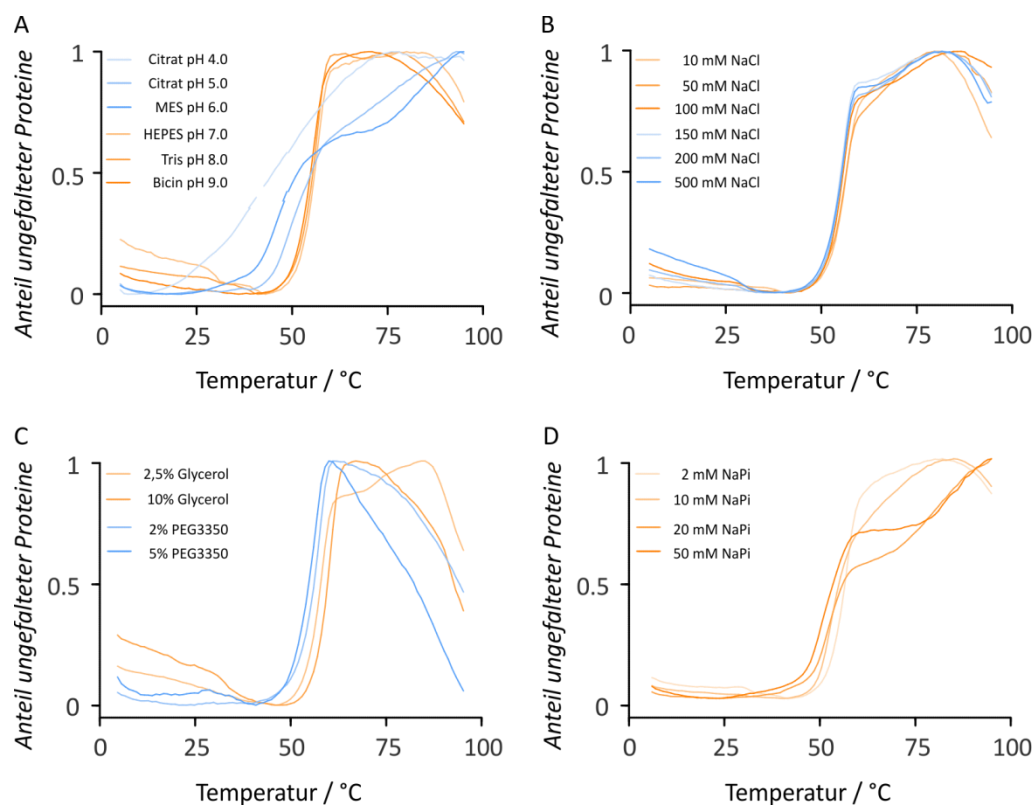


Abbildung 21: Thermische Entfaltung von β -Catenin aus pGEX. Die Fluoreszenz von SYPRO[®] Orange wurde bei 570 nm gemessen und zwischen [0,1] normiert. Die Schmelztemperatur entspricht der Temperatur bei der die Hälfte der Proteine entfaltet ist. (A) pH-Werte 4-9, 20 mM Puffersubstanz. (B) 10 mM HEPES pH7,5, NaCl-Konzentration von 10-500 mM. (C) 20 mM HEPES pH7,5, Zusatz verschiedener Polyole. (D) 2-50 mM Natriumphosphat (NaPi) pH7,5. Bei den dargestellten Messungen handelt es sich um Unikate.

Nano Differential Scanning Fluorimetry

Da die Testreihe nur zur Identifikation möglicher stabilisierender Faktoren diente, sollten wenige ausgewählte Parameter mit einer sensibleren Methode validiert werden. Dazu wurde die Farbstoff-freie nano *Differential Scanning Fluorimetry* (nanoDSF)-Technologie ausgewählt, bei der die Thermostabilität anhand der Änderung der intrinsischen Fluoreszenz von Tryptophan-Seitenketten des Proteins gemessen wird. Die Tryptophan-Fluoreszenz ist stark abhängig von der Umgebung: Häufig ist diese Aminosäure im hydrophoben Kern eines Proteins zu finden und wird bei thermischer Entfaltung dem Lösungsmittel exponiert. Die Änderung der Proteinstruktur beeinflusst sowohl die Intensität als auch die Emissionswellenlänge, welche je nach Protein bei 330 und/oder 350 nm ausgelesen werden kann. Im vorherigen Experiment war β -Catenin über einen engen pH-Bereich von 7-8 stabil, tolerierte Salzkonzentrationen über einen weiten Konzentrationsbereich und wies eine erhöhte Thermostabilität nach Zugabe von Glycerol auf. Hier wurden im Gegensatz zum Thermofluor-Assay nicht einzelne Substanzen allein in wässriger Lösung getestet, sondern in einer Mischung aus Salz, pH-Wert und Additiv systematisch analysiert, indem immer ein Bestandteil des Puffers variiert wurde und die anderen konstant gehalten wurden (Tabelle 47, Kapitel 8.10). Die Grundlage des Puffers bildeten 50 mM HEPES bzw. Tris in einem pH-Bereich von 7-8, 50-500 mM Natriumchlorid sowie bis zu 10% Glycerol. Die Thermostabilität von β -Catenin aus pGEX wurde in einem Temperaturprofil von 20-95°C gemessen und die Schmelztemperatur der ersten Ableitung der gemessenen Tryptophan-Fluoreszenzintensität bei 350 nm berechnet (Abbildung 22).

Die Erhöhung des pH-Wertes von 7 auf 7,5 ergab eine Steigerung der Schmelztemperatur von 56,8°C auf 57,2°C (Abbildung 22A). Bei weiterer Erhöhung des pH-Wertes auf 8 veränderte sich die Thermostabilität nicht. Für die Grundlage weiterer Puffer wurde deshalb der physiologische pH-Wert verwendet. Zwischen den getesteten NaCl-Konzentrationen schwankte die Schmelztemperatur zwischen 56,8°C für 50 mM und zwischen 57,2°C und 57,8°C für 150-500 mM (Abbildung 22B). Auf Grundlage dieser Ergebnisse wurden Salzkonzentrationen zwischen 250 und 500 mM für die Puffer zur Aufreinigung von β -Catenin und für die Puffer zur Lagerung die physiologische Konzentration von 150 mM ausgewählt. Die stärkste Thermostabilisierung wurde durch Zusatz von Glycerol erlangt (Abbildung 22C). Mit steigender Glycerolkonzentration stieg die Schmelztemperatur von 57,2°C auf 61°C. Da die Zugabe von Glycerol im Allgemeinen die

3 Ergebnisse und Diskussion

Viskosität des Puffers und den Druck während der Aufreinigung erhöht, wurden für Lyse- und Waschpuffer 2,5-5% Glycerol und für die Lagerung des Proteins 10% Glycerol ausgewählt.

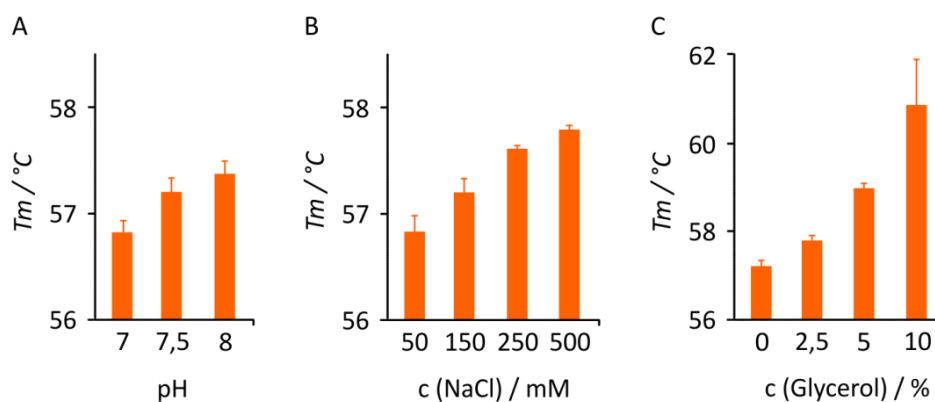


Abbildung 22: Schmelztemperaturen von β -Catenin aus pGEX. Die Emission von Trp wurde bei 350 nm gemessen und die Schmelztemperatur aus der ersten Ableitung berechnet. Die Schmelztemperatur entspricht der Temperatur bei der die Hälfte der Proteine entfaltet ist. (A) pH7-7,5 (50 mM HEPES) und pH8 (50 mM Tris), 150 mM NaCl. (B) 50 mM HEPES pH7,5, NaCl-Konzentration von 50-500 mM. (C) 50 mM HEPES pH7,5, 150 mM NaCl, Glycerol 0-10%. Bei den dargestellten Messungen handelt es sich um technische Triplikate.

Des Weiteren wurde die Thermostabilität des Proteins in einer Verdünnungsreihe von 2,5-40 μ M untersucht (Abbildung 23). Mit steigender Konzentration nahm die Thermostabilität ab. Der Unterschied zwischen der höchsten und niedrigsten getesteten Konzentration betrug 1,5°C, mit der höchsten Thermostabilität bei 2,5 μ M (58,3°C). Diese Daten bestätigen die experimentelle Beobachtung, dass das Protein bei hoher Konzentration präzipitiert und deshalb instabil scheint. Aus diesem Grund wurde das Protein in möglichst geringer Konzentration gelagert und eingesetzt.

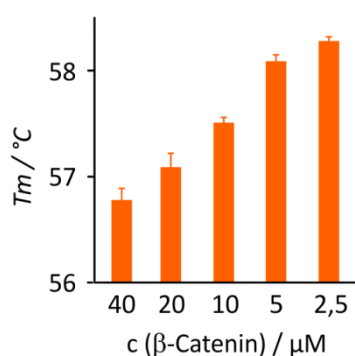


Abbildung 23: Schmelztemperaturen verschiedener Konzentrationen von β -Catenin aus pGEX. Die Emission von Trp wurde bei 350 nm gemessen und die Schmelztemperatur aus der ersten Ableitung berechnet. Die Schmelztemperatur entspricht der Temperatur bei der die Hälfte der Proteine entfaltet ist. Puffer: 50 mM HEPES pH7,5, 150 mM NaCl. Bei den dargestellten Messungen handelt es sich um technische Triplikate.

3.2.3 Expression

Nach Evaluierung geeigneter Parameter für die Expression und Aufreinigung wurde β -Catenin in einem größeren Ansatz exprimiert. Dazu wurde die Expression in TB Medium bei 20°C über Nacht durchgeführt. Das GST- β -Catenin-Fusionsprotein aus pGEX wurde mittels Glutathion-Affinitätschromatographie gereinigt, gefolgt von einer Abspaltung des GST-Tags mittels *Tobacco Etch Virus* (TEV)-Protease auf der Säule. Weitere Verunreinigungen wurden mit Größenausschlusschromatographie entfernt und der Verlauf der Aufreinigung wurde mittels SDS-PAGE verfolgt (Abbildung 24A). Das GST-Fusionsprotein besitzt ein Molekulargewicht von 113,6 kDa und das Protein ohne Löslichkeits-Tag von ca. 86,5 kDa auf. Sowohl im löslichen Überstand als auch im Pellet der Zellyse war Protein mit einem Molekulargewicht zwischen der 100 und 130 kDa Markerbande vorhanden. Nach Proteolyse des GST-Tags verschiebte sich die Bande unterhalb der 100 kDa Markerbande, welches etwa dem gesuchten Molekulargewicht von 86,5 kDa entspricht. Die letzte Probe repräsentiert das Protein nach Größenausschlusschromatographie. Zu erkennen ist, dass unterhalb dieser dominanten Proteinbande weitere Proteinspezies vorhanden waren, die weder durch Affinitäts- noch Größenausschlusschromatographie abgetrennt wurden. Pro Liter Expressionskultur konnten durchschnittlich etwa 6 mg Protein gewonnen werden.

Zur Aufreinigung von β -Catenin aus pET-28a wurde die Nickel (Ni)-Affinitätschromatographie verwendet und der C-terminale His₆-Tag nicht entfernt. Der Verlauf der Aufreinigung wurde mittels SDS-PAGE verfolgt (Abbildung 24B). Sowohl im löslichen Überstand als auch im Pellet der Zellyse war Protein mit einem dem Molekulargewicht auf Höhe der 100 kDa Markerbande vorhanden, welche etwa dem berechneten Molekulargewicht von ca. 87,5 kDa entspricht. Die letzte Probe repräsentiert das Protein nach Größenausschlusschromatographie. Wie auch bei β -Catenin aus pGEX waren unterhalb der dominanten Proteinbande weitere Proteinspezies vorhanden sind, die weder durch Affinitäts- noch Größenausschlusschromatographie abgetrennt wurden. Pro Liter Expressionskultur konnten durchschnittlich etwa 9 mg Protein gewonnen werden.

3 Ergebnisse und Diskussion

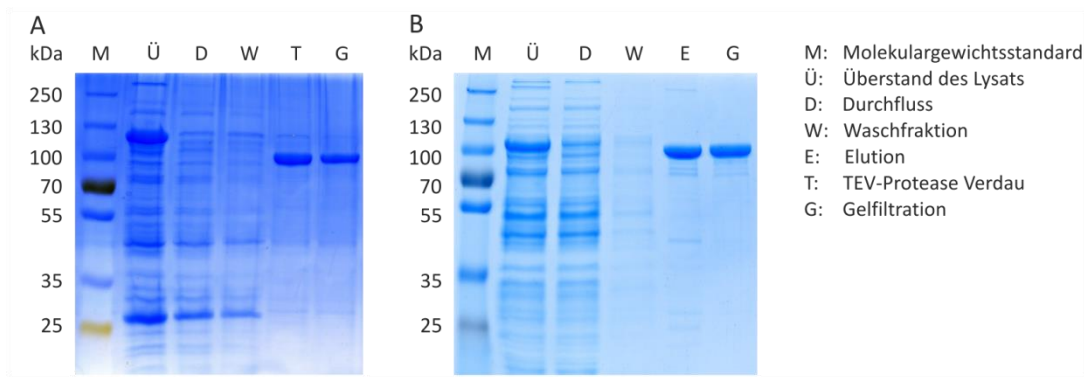


Abbildung 24: Expression und Aufreinigung von β -Catenin. 12%iges SDS-Polyacrylamidgel. (A) Aufreinigung β -Catenin aus pGEX-4T-I $M(\text{GST-}\beta\text{-Catenin}) = 113,6 \text{ kDa}$, $M(\beta\text{-Catenin}) = 86,5 \text{ kDa}$. (B) Aufreinigung β -Catenin- His_6 aus pET-28a. $M(\beta\text{-Catenin-}\text{His}_6) = 87,5 \text{ kDa}$.

3.2.4 Proteincharakterisierung

Western Blot und Massenspektrometrie

Proteinidentität und Reinheit wurden mit SDS-PAGE, Western Blot und ESI-MS analysiert (Abbildung 25). Das berechnete Molekulargewicht von β -Catenin aus pGEX beträgt $86,5 \text{ kDa}$ und von β -Catenin- His_6 aus pET-28a $87,5 \text{ kDa}$. Sowohl mittels SDS-PAGE als auch Western Blot wird eine deutliche Bande auf Höhe der 100 kDa -Bande des Referenzmarkers identifiziert, die etwa mit dem gewünschten Produkt korreliert. Zusätzliche Banden zwischen 70 und 100 kDa entsprechen verkürzten β -Catenin-Spezies, da sie auch mittels Western Blot detektiert werden. Unabhängig vom gewählten Expressionsvektor und Lokalisierung des Affinitätstags (*C*-terminaler His_6 -Tag, *N*-terminaler GST-Tag) sind verkürzte Proteinprodukte erkennbar.

Für β -Catenin aus pGEX wurde zusätzlich das exakte Molekulargewicht massenspektrometrisch bestimmt (Abbildung 25B). Es wurden Masse-zu-Ladungs-Verhältnisse (m/z) des 66-120-fach positiv geladenen Proteins gefunden. Die Dekonvolution des Spektrums mit dem Programm ProMassXcali identifizierte ein Gesamtmolekulargewicht von $86.528,7 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$, das dem erwarteten Molekulargewicht von $86.528,8 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$ entspricht.

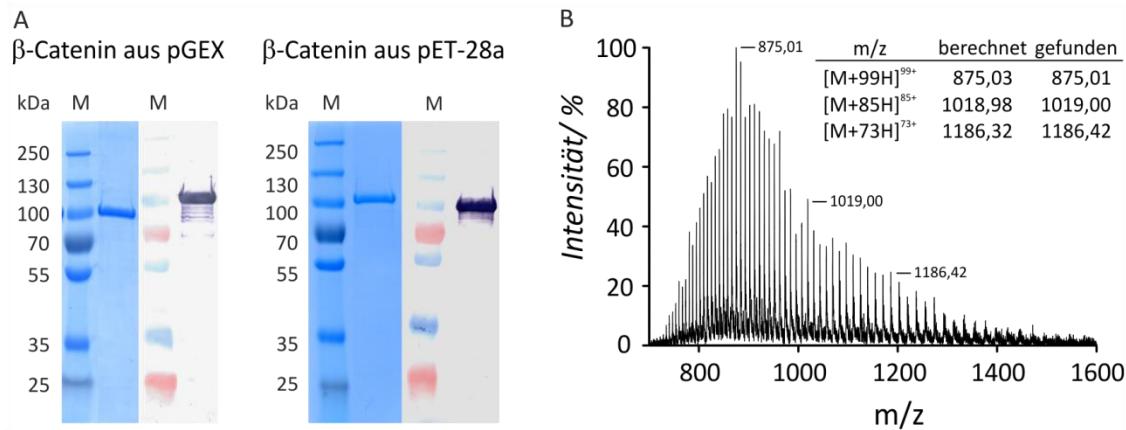


Abbildung 25: Analytik von β -Catenin. (A) Coomassie gefärbtes 12% SDS-Polyacrylamidgel (links) und Western Blot (rechts) von β -Catenin aus pGEX und β -Catenin- His_6 aus pET28a. Für das Western Blot wurde ein primärer Antikörper, der die Aminosäuren 134-665 von β -Catenin erkennt, und ein sekundärer Antikörper, der mit alkalischer Phosphatase (AP) konjugiert ist, eingesetzt. M = Molekulargewichtsstandard. (B) ESI-MS-Spektrum von β -Catenin aus pGEX. Berechnetes Molekulargewicht = $86.528,8 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$, dekonvolutiertes Molekulargewicht = $86.528,7 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$. Einige Masse-zu-Ladungs-Verhältnisse (m/z) sowie dazugehörige Molekulargewichte (in $\text{g}\cdot\text{mol}^{-1}$) der geladenen Fragmente sind angegeben.

Analytische Größenausschlusschromatographie

β -Catenin aus pGEX und β -Catenin- His_6 aus pET-28a β -Catenin wurden mittels analytischer Größenausschlusschromatographie auf Reinheit und Grad der Oligomerisierung untersucht. Die Auftragung der Absorption bei 280 nm gegen das Elutionsvolumen der Proteine ergibt Chromatogramme (Abbildung 26B), die ein starkes Signal bei einem Elutionsvolumen von 12,9 mL sowie einen Anstieg der Absorption im Bereich von 9-12 mL zeigen. Da große Proteine die Chromatographiesäule schneller passieren, handelt es sich hierbei um Spezies, die ein höheres Molekulargewicht als β -Catenin aufweisen. Die mittels Gelelektrophorese und Western Blot nachgewiesenen verkürzten β -Catenin-Spezies (Abbildung 25) werden anscheinend mit der Größenausschlusschromatographie nicht separiert. Des Weiteren wurde mit Hilfe kommerziell erhältlicher Referenzproteine (Abbildung 26A) und deren Verteilungskoeffizienten das theoretische Molekulargewicht der β -Catenin Spezies berechnet (Details in Kapitel 5.3.3, Formel 2). Das Molekulargewicht der exprimierten β -Catenin Proteine beträgt etwa 86,5 kDa (β -Catenin aus pGEX) bzw. 87,5 kDa (β -Catenin- His_6 aus pET-28a), welche einem theoretischen Elutionsvolumen von 14,4 mL entsprechen würden. Tatsächlich zeigten beide Chromatogramme ein Elutionsvolumen von 12,9 mL (Abbildung 26B). Dies entspricht einem berechneten Molekulargewicht von ca. 210 kDa, also dem ca. 2,5-fachen des zu erwartenden Molekulargewichts. β -Catenin liegt in Lösung somit nicht als Monomer, sondern als Di- bzw. Trimer, vor.

3 Ergebnisse und Diskussion

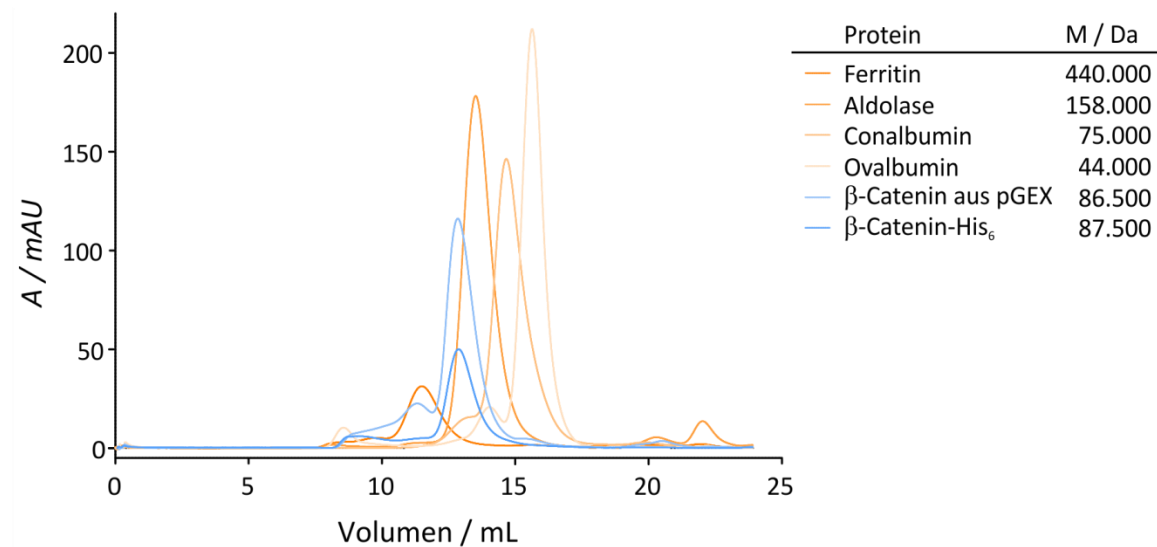


Abbildung 26: Analytische Größenausschlusschromatographie von β -Catenin. Chromatogramme kommerziell erhältlicher Referenzproteine sowie von β -Catenin aus pGEX und β -Catenin-His₆ aus pET-28a wurden durch Messung der Absorption bei 280 nm erhalten.

3.3 Weiterentwicklung von StAx-35R

3.3.1 Optimierung der Aminosäuresequenz

Die Untersuchung zellgängiger Peptide ergab, dass unter den gewählten Bedingungen (HeLa-Zellen, 10% Serum, $c(\text{Peptid}) = 5 \mu\text{M}$, 90 min Inkubation) polykationische Peptide wie $f\text{-R}_8$ und $f\text{-Tat}$ am schlechtesten aufgenommen werden. Amphipathische Peptide ($f\text{-Penetratin}$, $f\text{-Pep-1}$, $f\text{-SAHM1}$) zeigten eine tendenziell höhere Zellgängigkeit mit Ausnahme von $f\text{-StAx}$. Alle Peptide waren diffus im Cytosol sowie im Zellkern verteilt, aber auch in vesikulären Strukturen konzentriert. Die Ausnahme dazu bildet $f\text{-StAx}$, welches hauptsächlich vesikulär vorliegt (Kapitel 3.1). Setzt man diese Ergebnisse in Relation zu Nettoladung, Hydrophilie und dem Verhältnis hydrophiler Aminosäuren zur Gesamtheit aller Aminosäuren, wird folgender Trend deutlich (Tabelle 3): die Negativkontrolle $f\text{-Bac}$ mit geringer Nettoladung und einem niedrigen Anteil hydrophiler Aminosäuren wurde nicht internalisiert. Peptide mit hoher Nettoladung sowie hoher Hydrophilie waren geringfügig zellgängig. $f\text{-TP10}$ mit mittlerer Nettoladung, aber geringer Hydrophilie war jedoch wie die polykationischen Peptide wenig zellgängig. Mittelmäßige bis sehr gute Zellgängigkeit wurde unabhängig von der Nettoladung, jedoch mit einem etwa 50%igen Anteil hydrophiler Aminosäuren für $f\text{-Pep-1}$, $f\text{-Penetratin}$ und $f\text{-SAHM1}$ beobachtet. Die hoch permeablen Peptide $f\text{-Pep-1}$ und $f\text{-SAHM1}$ wiesen zudem eine primäre Amphipathizität auf, da sich ein Großteil der Ladung auf einer Seite der Sequenz konzentriert. Des Weiteren weisen beide Peptide α -helikale Strukturen auf, die entweder künstlich stabilisiert ($f\text{-SAHM1}$) oder durch Membraninteraktionen induziert wird ($f\text{-Pep-1}$). Basierend auf der untersuchten Testreihe erfordert eine effiziente Internalisierung von Peptiden demnach positiv geladene Aminosäuren wie Lysin oder Arginin, aber auch einen gewissen Anteil an Hydrophobizität. $f\text{-Pep-1}$ und $f\text{-Penetratin}$ weisen zudem auch die aromatische Aminosäure Tryptophan auf, welche die Membraninsertion positiv beeinflussen soll^{59,61,63}. Interessanterweise verfügt $f\text{-StAx}$ – genau wie die sehr permeablen Peptide – eine mittlere positive Nettoladung, über eine α -helikale Struktur sowie ausgewogene Hydrophilie. Jedoch sind die positiven Ladungen über das Peptid verteilt, die Zellgängigkeit ist sehr gering und die Lokalisierung in der Zelle unterscheidet sich drastisch. Die Zellgängigkeit ist somit zwar abhängig von allgemeinen Faktoren wie Ladung, Ladungsverteilung, Hydrophobizität und Struktur, jedoch scheint das Vorhandensein dieser Merkmale kein Garant zu sein, wie $f\text{-StAx}$ zeigt. In der Konsequenz be-

3 Ergebnisse und Diskussion

deutet das, dass aus dem vorhandenen Datensatz kein allgemein anwendbares Prinzip ableitbar ist, sondern die Zellgängigkeit präzise und individuell feingesteuert werden muss.

Tabelle 3: Eigenschaften zellgängiger Peptide. Die Nettoladungen und pI wurden mit dem *peptide property calculator* der Firma InnovagenAB berechnet. Die Parameter beziehen sich auf unmodifizierte Peptide mit freiem Carboxyl- und Aminoterminus. Pep-1 und MPG weisen C-terminal ein Cysteamin (cya) auf. Die Hydrophilie wurde aus dem Anteil polarer Aminosäuren zur Gesamtheit aller Aminosäuren berechnet. X = (S)-2-(4'-Pentenyl)alanin, / = nicht quantifizierbar.

Peptid	Sequenz	Ladung	pI	Hydrophilie	Aufnahme
Bac ₁₅₋₂₄	PRPLPFPRPG	2	12,1	0,2	-
Tat ₄₉₋₅₇	RKKRRQRRR	8	12,8	1	+
R ₈	RRRRRRRR	8	12,9	1	+
Penetratin	RQIKIWFQNRRMKWKK	7	12,5	0,63	++
TP10	AGYLLGKINLKALAALAKKIL	4	10,8	0,24	+
Pep-1	KETWWETWWTEWSQ PKKKRKKV-cya	2,9	10,1	0,52	+++
MPG	GALFLGFLGAAGSTMGAWSQ PKKKRKKV-cya	4,9	11,1	0,30	/
SAHM1	ERLRRRIXLCRXHHST	4.1	11,9	0,44	+++
StAx-35R	RRWPRXILDXHVRVWR	5.1	12,4	0,47	+

StAx-35R wurde bereits von Grossmann *et al.* hinsichtlich der Einführung einer hohen Anzahl von Argininen (R) optimiert²¹⁷. Infolgedessen gibt es wenig Spielraum für zusätzliche Variationen an der Kernpeptidsequenz. Aus der Kristallstruktur von StAx-35 und β -Catenin (PDB: 4DJS) geht hervor, dass die sechs Argininreste unwesentlich zur Bindung an β -Catenin beitragen und somit als Positionen zur Einführung von Modifikationen prinzipiell in Frage kommen (Abbildung 9 in Kapitel 1.4.4 sowie Abbildung 27A). Da jedoch die positiv geladene Guanidgruppe entscheidend für die Zellpenetration ist, liegt der Fokus für eine Optimierung auf der Modulation ihrer Alkylkette mit dem Ziel, deren hydrophoben Charakter zu erhöhen. Diese Strategie hatte sich bereits für die Verbesserung von polykationischen CPPs bewährt¹⁴. Aus diesem Grund werden anstelle des natürlichen Arginins Derivate mit veränderten Linker-Strukturen, nämlich Homo-Arginin (hR, längerer Alkyl-Linker) und 4-Guanidino-Phenylalanin (pR, aromatischer Linker), eingebaut (Abbildung 27B). In den beiden neuen resultierenden Peptiden sind alle Arginine entweder durch hR (StAx-h) oder durch pR (StAx-p) ersetzt.

Des Weiteren wird jede Kernsequenz mit sieben verschiedenen *N*-terminalen Modifikationen versehen (Abbildung 27C), um weiteren Strategien zur Erhöhung der Bioverfügbarkeit nachzugehen: Zum einen erkennen Aminopeptidasen keine geschützten *N*-Termini, was zu einer Erhöhung der allgemeinen Proteasestabilität der Peptide führt²⁴⁰⁻²⁴². Des Weiteren erhöht die Anlagerung von verschiedenen hydrophoben Einheiten einschließlich Acetylierung (*Ac*-), Capronylierung (*C₆*) und Palmitoylierung (*C₁₆*-) schrittweise die Hydrophobizität und vermutlich die Affinität zu Membranen und somit die Zellgängigkeit^{243,244}. Darüber hinaus werden hydrophile Modalitäten untersucht, nämlich den freien *N*-Terminus (*H₂N*-), Spermin (*sp*-) sowie die Kernlokalisierungssequenz (*NLS*-) des SV40-large T-Antigens des SV40-Virus. Diese Kernlokalisierungssequenz enthält vier Lysine und ein Arginin und wurde bisher verwendet, um sowohl die zelluläre Aufnahme als auch die Kernlokalisierung zu verbessern²⁴⁵⁻²⁴⁷. Letzteres ist ein Aspekt, der auch die biologische Aktivität von StAx-Peptiden unterstützen kann, da der Zielproteinkomplex im Zellkern angereichert ist²⁴⁸. Des Weiteren wird durch das Anhängen dieser ausschließlich kationischen Sequenz ein primär amphipathischer Charakter erzeugt, wie er auch in SAHM1 und Pep-1 vorhanden ist. Als weitere Varianten einer hydrophilen Modalität kommen Polyamine (Polyethylenimin, Polyamidoamin, Spermin, etc.) in Betracht. Sie erhöhen nicht nur die Hydrophilie, sondern können ein Entweichen der Peptide aus endolysosomalen Strukturen begünstigen. Es wird angenommen, dass Polyamine Protonen aus der sauren Umgebung der Endosomen absorbieren. Als Ergebnis wird eine erhöhte Menge an Protonen zusammen mit Wasser und Chlorid-Ionen in die Endosomen gepumpt (Protonenschwamm-Hypothese) und das daraus resultierende osmotische Anschwellen führt zum Aufbrechen endolysosomaler Kompartimente^{249,250}. Da Spermin natürlicherweise in eukaryotischen Zellen vorkommt und deshalb eine hohe biologische Toleranz aufweist, aber auch bereits vereinzelt gezeigt werden konnte, dass es die Zellgängigkeit verbessert, wird es ebenfalls für die Modifikation von StAx ausgewählt^{251,252}.

3 Ergebnisse und Diskussion

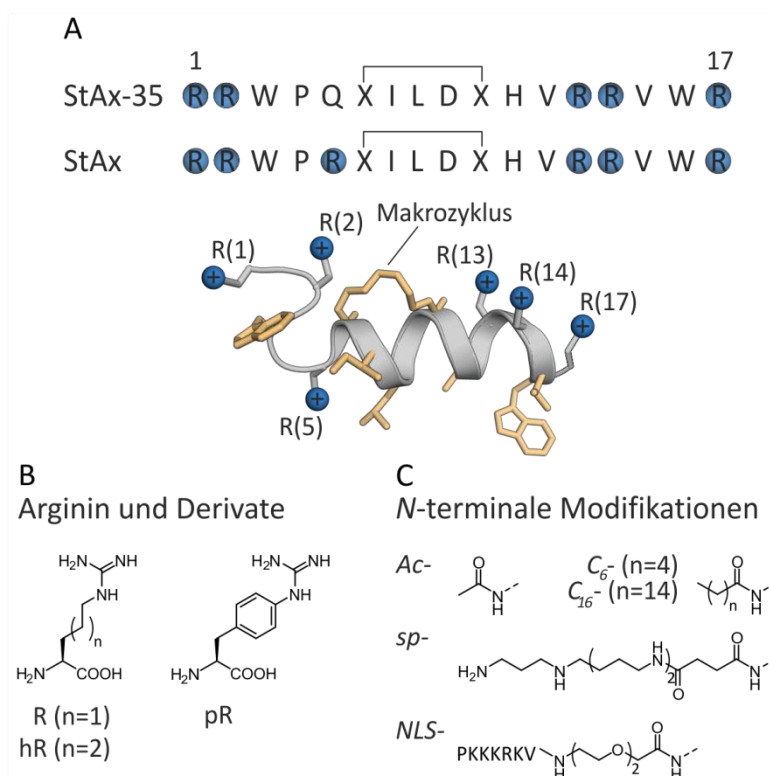


Abbildung 27: (A) Sequenz von StAx-35 und StAx-35R (kurz: StAx). StAx-35 ist in der Kristallstruktur mit β -Catenin aufgelöst (PBD: 4DJS). StAx unterscheidet sich von StAx-35 durch eine Substitution von Gln durch Arg und wurde von Grossmann *et al.* für zellbasierte Studien verwendet²¹⁷. (B) Arginin-Derivate Homo-Arginin (hR) und 4-Guanidino-Phenylalanin (pR). (C) N-terminale Modifikationen der drei Kernsequenzen. Ac = Acetyl, sp = Spermin, NLS = Kernlokalisierungssequenz.

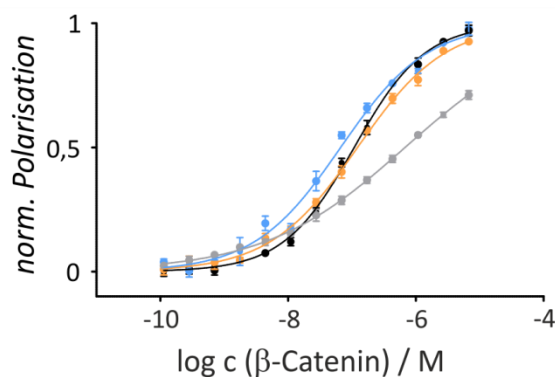
Alle Peptide wurden manuell nach Standardprotokollen der Fmoc-basierten Festphasen-Peptidsynthese synthetisiert. Die α -Methyl, α -Alkenyl-Aminosäurebausteine wurden ebenfalls nach Standardprotokoll eingefügt und zur Stabilisierung der α -helikalen Struktur eine Ruthenium-katalysierte Ringschlussmetathese durchgeführt (Abbildung 14 in Kapitel 3.1.1). Alle N-terminalen Modifikationen wurden im Anschluss an die Metathesereaktion auf festem Träger durchgeführt. Zwischen der NLS und dem Peptid wurde ein Polyethylenglykol PEG₂-Distanzhalter eingefügt; alle anderen Modifikationen folgen direkt der StAx-Sequenz. Anschließend wurden die Peptide vom polymeren Träger abgespalten, über semi-präparativer Hochleistungsflüssigkeitschromatographie (HPLC) aufgereinigt und mittels analytischer HPLC, gekoppelt an ein Massenspektrometer mit Elektrospray-Ionisation (HPLC/ESI-MS), auf Identität und Reinheit überprüft (Kapitel 8.1).

3.3.2 Evaluierung der Bindungsaffinität

Nach erfolgter Charakterisierung und Expression des Proteins β -Catenin wird die Affinität der hR- und pR-modifizierten StAx-Peptide evaluiert. Dies erfolgt durch den Fluoreszenzpolarisations-Assay (FP-Assay), einer Methode zur Bestimmung von Bindungskonstanten zwischen zwei Interaktionspartnern. Sie beruht auf dem Prinzip, dass Fluorophore, die mit linear polarisiertem Licht angeregt werden, wieder linear polarisiertes Licht in Abhängigkeit ihrer Fluoreszenzlebensdauer und Rotationsgeschwindigkeit emittieren. Bei konstanter Temperatur und Viskosität ist die Fluoreszenzpolarisierung abhängig vom Volumen des Fluorophor-modifizierten Moleküls. Liegt ein Fluorophor-markierter Ligand frei in Lösung vor, ist sein Volumen gering und seine Beweglichkeit hoch, wodurch das emittierte Licht stark depolarisiert wird. Bindet dieser Ligand an das Zielprotein, nimmt sein Volumen zu und seine Beweglichkeit aufgrund eingeschränkter Rotation ab, wodurch innerhalb der Fluoreszenzlebensdauer das emittierte Licht stärker polarisiert bleibt^{253,254}.

In einer Mikrotiterplatte wurde eine Verdünnungsreihe des Proteins β -Catenin-His₆ vorgelegt, mit 10 nM *f*-markierten Peptiden (*f*-StAx, *f*-StAx-h, *f*-StAx-p) versetzt und für 60 min inkubiert. Die gemessene Fluoreszenzpolarisierung wurde gegen die logarithmische Konzentration von β -Catenin-His₆ aufgetragen und ergab mittels einer 4-Parameter Hill-Gleichung eine Bindungskurve aus dessen Wendepunkt die Dissoziationskonstante K_D berechnet wurde (Abbildung 28). Die erhaltenen Bindungskurven lieferten für alle drei Peptide Dissoziationskonstanten im nanomolaren Bereich. Es ging hervor, dass die Substitution der Arginine in der Kernsequenz durch hR und pR keinen Verlust der Bindungsaffinität zur Folge hat ($K_D = 123 \pm 17$ nM bzw. 66 ± 13 nM). Alle Affinitäten sind in derselben Größenordnung wie *f*-StAx ($K_D = 108 \pm 10$ nM). Dieser Wert stimmt mit dem Literaturwert überein²¹⁷. Da der *N*-Terminus des Transkriptionsfaktors TCF7L2 mit β -Catenin interagiert (Kapitel 1.3.3), wurde die Bindungsaffinität eines *N*-terminalen Fragments (*f*-TCF7L2) als Kontrollreaktion bestimmt. Aus der Bindungskurve geht hervor, dass die Bindungsaffinität des *f*-TCF7L2 ebenfalls in der Größenordnung des Literaturwertes²¹⁷ liegt, jedoch geringer als die der StAx-Peptide ist (Abbildung 28, $K_D > 700$ nM).

3 Ergebnisse und Diskussion



Peptid	Sequenz	K_D
● <i>f</i> -StAx	FITC-PEG ₂ -R R W P R X I L D X H V R R V W R	108 ± 10 nM
■ <i>f</i> -StAx-p	FITC-PEG ₂ -p p W P P X I L D X H V p p V W p	66 ± 13 nM
▲ <i>f</i> -StAx-h	FITC-PEG ₂ -h h W P h X I L D X H V h h V W h	123 ± 17 nM
◻ <i>f</i> -TCF7L2	FITC-PEG ₂ -D E L I S F K D E G E Q E βA βA E R D L A D V K S S L V N	~ 700 nM

Abbildung 28: Fluoreszenzpolarisations-Assay zur Bestimmung der Dissoziationskonstanten (K_D) zwischen β -Catenin und *f*-markierten Peptiden. Die Bindungskurven wurden durch nicht-lineare Regression mit der Software Prism (Version 5.03, GraphPad) erhalten. Proteinkonzentration 7 μ M-0,1 nM. FITC = Fluorescein Isothiocyanat, PEG₂ = 8-Amino-3,6-Dioxyoctanoyl, h = Homo-Arginin, p = 4-Guanidino-Phenylalanin, X = (S)-2-(4'-Pentenyl)alanin, β A = β -Alanin. Experimente wurden als Triplikat angefertigt. Fehlerbalken repräsentieren 1 σ .

3.3.3 Proteolytische Stabilität

Zur effizienten Nutzung von Peptiden in zellulären Studien muss die Integrität des Peptides über den Zeitraum des Experimentes und unter den gegebenen experimentellen Bedingungen gewährleistet sein. Zur Analyse der proteolytischen Stabilität wurden *f*-markierte Peptide (*f*-StAx, *f*-StAx-h, *f*-StAx-p und *f*-Penetratin) analog zu zellulären Experimenten in Kulturmedium angereichert mit 10% fötalem Rinderserum bei 37°C inkubiert, nach 24 sowie 48 h Inkubation Proben entnommen und mittels HPLC-ESI/MS analysiert (Abbildung 29). Das in dieser Arbeit verwendete Serum ist nicht hitzeinaktiviert, sodass vorhandene Proteasen nicht deaktiviert sind und die Peptide theoretisch degradiert werden können.

Zu Beginn des Experimentes ist für jedes der untersuchten Peptide ein Signal vorhanden, welches dem jeweiligen Peptid zugeordnet werden kann (Abbildung 29A). Nach einer Inkubationszeit von 24 h wird bei *f*-StAx und *f*-StAx-h weiterhin nur ein Signal detektiert, während bei *f*-Penetratin mindestens vier weitere Signale aufgezeichnet werden. Das Signal des intakten Peptides bei einer Retentionszeit von 11,8 min hat sich gegenüber dem Startpunkt verringert. Auch nach 48 h ist bei *f*-StAx und *f*-StAx-h nur ein einziges Signal vorhanden. Wie bereits nach 24 h werden in der Probe von *f*-Penetratin weiterhin vier

weitere Signale detektiert. Das Hauptsignal des intakten *f*-Penetratin bei einer Retentionszeit von 11,8 min hat jedoch innerhalb der Inkubationszeit weiter an Intensität abgenommen. Mittels ESI/MS-Analyse können diese Signale ionischen Spezies von Abbauprodukten zugeordnet werden. Bei einer Retentionszeit von 12,3 min entspricht das detektierte Molekulargewicht von $1192.6 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$ dem Fragment FITC-PEG₂-RQIKI-COOH. Bei *f*-StAx-p treten nach 24 h und 48 h zwei weitere Signale auf, die jedoch keinem Abbauprodukt zugeordnet werden können.

Des Weiteren wurden die Integrale der detektierten Signale berechnet, um die vorhandene Peptidmenge in der Probe zu analysieren (Abbildung 29B). Auch hier wird deutlich, dass die Menge an *f*-StAx und *f*-StAx-h im Rahmen des Fehlers konstant bleibt. Der Anteil des Volllängen-Peptides *f*-Penetratin nimmt innerhalb von 48 h um 65% ab. Insgesamt kann geschlussfolgert werden, dass die stabilisierten StAx-Peptide mindestens über einen Zeitraum von 48 h stabil sind, während unstabilisierte Peptide wie Penetratin innerhalb 48 h zu einem großen Teil abgebaut werden.

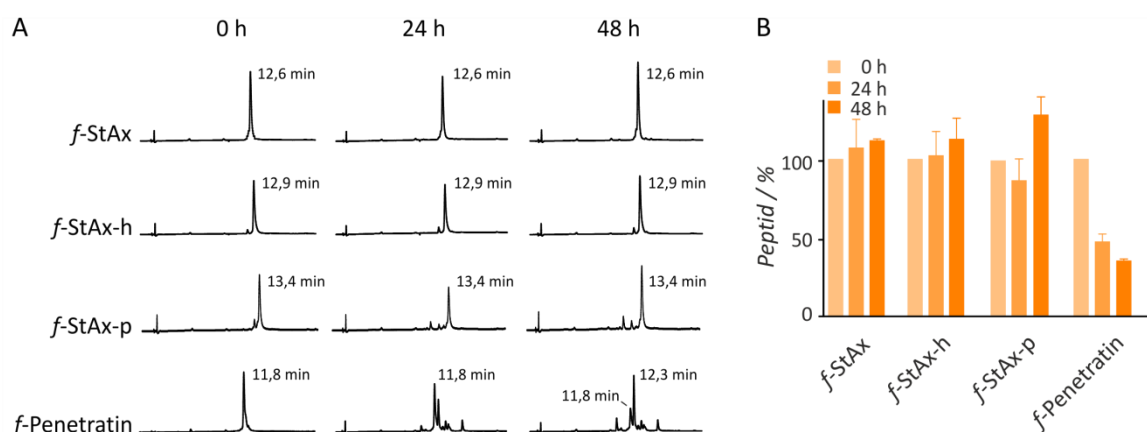


Abbildung 29: (A) Repräsentative HPLC-Chromatogramme *f*-markierter Peptide nach Inkubation in Medium angereichert mit 10% fötalem Rinderserum. Gradient 10-60% Acetonitril mit 0,1% TFA in 20 min, $\lambda = 440 \text{ nm}$. (B) Anteil des Volllängen Peptides in der Probe nach 24 und 48 h. Das Experiment wurde als Duplikat angefertigt. Fehlerbalken repräsentieren 1σ .

3.3.4 Reporter-Gen-Assay

Der Reporter-Gen-Assay wurde in Kollaboration mit der Arbeitsgruppe von Dr. Dennis Schade, Fakultät für Chemie und Chemische Biologie, Technische Universität Dortmund, von Bernd Rathmer durchgeführt.

Nachdem gezeigt wurde, dass die modifizierten StAx-Sequenzen β -Catenin mit unveränderter Affinität binden, wurden die 21 Peptidvarianten hinsichtlich ihres Potenzials untersucht, den Signalweg zu hemmen. Dazu wurde ein Reporter-Gen-Assay durchgeführt, mit

3 Ergebnisse und Diskussion

dem die Expression einer Leuchtkäfer-Luciferase unter der Kontrolle der TCF/LEF Response-Elemente quantifiziert wurde. Aktiviert β -Catenin zusammen mit Co-Aktivatoren und TCF die Transkription der Luciferase, ist dies durch eine erhöhte Biolumineszenz als Resultat der Luciferaseaktivität auslesbar. Kompetitiert StAx mit dem Transkriptionsfaktor um die Bindung an β -Catenin, wird die Transkription der Leuchtkäfer-Luciferase nicht aktiviert und es kann keine Biolumineszenz detektiert werden.

Zu diesem Zweck wurden 293T-Zellen mit drei Vektoren transfiziert²⁵⁵: Einer enthielt sieben Mikrosatelliten (*tandem repeats*) des TCF/LEF-Response-Elements (einschließlich eines minimalen Promotors) gefolgt vom Leuchtkäfer-Luciferasegen. Zur Normalisierung wurde ein weiterer Vektor, der die Renilla-Luciferase kodiert, verwendet. Die para- und autokrine Stimulation des Signalweges wurde durch die Co-Transfektion eines Wnt3A-Liganden kodierenden Vektors erreicht. Die Zellen wurden entweder mit variierenden Peptidkonzentrationen (0,1-10 μM) oder mit der niedermolekularen Verbindung XAV939 inkubiert, die als Kontrollverbindung zur Inhibition des Signalweges fungierte. Die Luciferaseaktivität wurde nach 22 h gemessen und gegen die logarithmische Inhibitorkonzentration aufgetragen. Aus dem Wendepunkt der erhaltenen sigmoidalen Dosis-Wirkungs-Kurve wurde mittels nicht-linearer Regression die mittlere inhibitorische Konzentration (IC_{50}) berechnet. Details zu den ermittelten IC_{50} -Werten sind in Kapitel 8.11 enthalten. Um allgemeine Tendenzen aus den Kern- und N-terminalen Modifikation in Bezug auf ihr inhibitorisches Potenzial abzuleiten, sind die ermittelten IC_{50} als *Heatmap* dargestellt (Abbildung 30). XAV939 zeigt eine Hemmung des Signalweges im erwarteten Bereich ($IC_{50} = 0,071 \mu\text{M}$)¹⁹⁸. Die Ausgangsverbindungen *f*-StAx und *Ac*-StAx liefern die geringste Inhibition des Signalweges mit IC_{50} -Werten im Bereich von 4,3-5,4 μM . In der StAx- und StAx-p-Serie sind allgemein mittlere und geringe Inhibition des Signalweges zu beobachten ($IC_{50} = 2-6,3 \mu\text{M}$). Unter den drei Kernsequenzen zeigt StAx-h, welches die hR Modifikation repräsentiert, die höchste Hemmung des Signalweges. Die Aktivsten Verbindungen sind H_2N - und *NLS*-StAx-h ($IC_{50} = 1,4 \mu\text{M}$). Modifikationen wie *f*-, C_6 - oder C_{16} - zeigen in dieser Serie eine geringe bis mittlere Aktivität ($IC_{50} = 1,7-3,0 \mu\text{M}$). Insgesamt liegen die erhaltenen Werte der Wnt/ β -Catenin Signalweginhibition eng beieinander, jedoch liegt eine Tendenz zu verbesserten IC_{50} -Werten durch hydrophile Modifikationen vor. Eine deutliche Erhöhung der Hydrophobizität – repräsentiert durch StAx-p und N-terminale Lipidierung – erniedrigt das Potential der Peptide die TCF/LEF-abhängige Luciferase-Expression herunter zu

regulieren. Die Derivatisierung der Kernsequenz und Einführung *N*-terminaler Modifikationen liefert einen vielversprechenden Ansatz, um die Einflüsse hydrophiler und hydrophober Modulation auf das Verhalten der Peptide zu analysieren. Vor dem Hintergrund, dass alle drei Kernmodifikationen (StAx, StAx-h, StAx-p) eine ähnliche Affinität zu β -Catenin aufweisen (Kapitel 3.3.2), könnten Unterschiede in der Inhibition des Signalweges auf Unterschiede in der Zellgängigkeit oder der zellulären Lokalisation zurückzuführen sein.

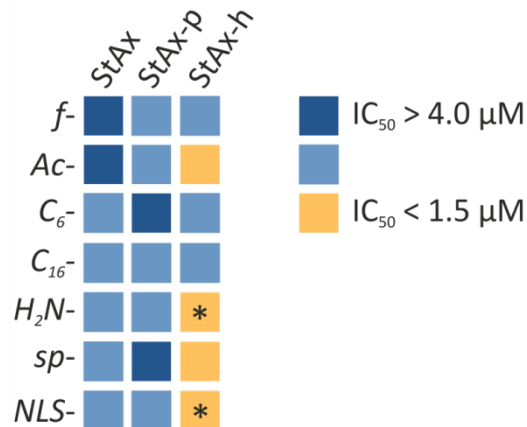


Abbildung 30: *Heatmap* der Inhibition des Wnt/ β -Catenin Signalweges in einem Reporter-gen-Assay. 293T Zellen wurden mit: i) Wnt3a-exprimierendem Vektor, ii) Super (8x)TOPFlash-Vektor kodierend für Luciferase unter der Kontrolle von TCF/LEF-Response-Elementen und iii) Renilla-Luciferase kodierender Vektor zur Normalisierung. Nach der Peptidbehandlung (22 h) wurde die Luciferaseaktivität über Biolumineszenz nachgewiesen und IC_{50} -Werte bestimmt. Details zur Berechnung können Kapitel 5.8.9 entnommen werden. * höchste Aktivität innerhalb des Panels). Experimente wurden als biologisches Replikat ($n = 2$) mit jeweils technischem Triplikat angefertigt.

3.3.5 Evaluierung der Zellgängigkeit

Um zu überprüfen, ob die Unterschiede in der Inhibition des Wnt/ β -Catenin Signalweges auf Änderungen in der Zellgängigkeit zurückzuführen sind, wurde die zelluläre Aufnahme mittels Durchflusszytometrie und Konfokalmikroskopie untersucht. Dazu wurden die drei Kernsequenzen StAx, StAx-h und StAx-p sowie *NLS*-StAx-h ausgewählt. *NLS*-StAx-h wurde im Reporter-gen-Assay als eine der aktivsten Modifikationen identifiziert. Dieses weist weitere interessante Eigenschaften auf, welche die Zellgängigkeit und Aktivität im Signalweg potentiell verbessern können: Durch die polykationische *NLS*-Sequenz wird zum einen ein primär amphipathischer Charakter erzeugt, wie er auch in den gut zellgängigen Peptiden SAHM1 und Pep-1 vorhanden ist. Des Weiteren weisen Kernlokalisierungssequenzen intrinsische Zellgängigkeit auf²⁴⁵, die sich positiv auf die Permeabilität von StAx auswirken könnte. Da die zu inhibierende Interaktion zwischen β -Catenin und dem Transkriptionsfaktor im Zellkern stattfindet,

3 Ergebnisse und Diskussion

könnte die NLS-Modifikation die Aufenthaltswahrscheinlichkeit zu Gunsten nukleärer Lokalisation erhöhen und somit den Signalweg effizienter regulieren.

Alle drei Kernsequenzen sowie *NLS-StAx-h* wurden mit dem Fluorophor FITC markiert (*f-StAx*, *f-StAx-h*, *f-StAx-p*, *f-NLS-StAx-h*) und ihre Zellgängigkeit analog zu den CPPs untersucht (Kapitel 3.1.3). HeLa Zellen wurden unter Verwendung einer Verdünnungsreihe von Peptiden inkubiert (0,1-5 μM , 90 min), stringent gewaschen sowie einer Trypsinbehandlung zur Entfernung Oberflächen-gebundener Peptide unterzogen. Anschließend wurde die Internalisierung der Peptide mittels Durchflusszytometrie quantifiziert (Abbildung 31A). Insgesamt nimmt die Aufnahme aller Peptide mit der Konzentration zu (wenn auch in unterschiedlichem Ausmaß), wobei alle Peptide eine erhöhte Internalisierung im Vergleich zum ursprünglichen *StAx*-Peptid aufweisen. *f-StAx* (schwarz) und *f-StAx-h* (hellorange) zeigten ab einer Konzentration von 1 μM eine Sättigung der Peptidaufnahme. Bei Erhöhung der Konzentration auf 5 μM stieg die Aufnahme nur noch geringfügig. *f-StAx-p* (blau) und *f-NLS-StAx-h* (orange) werden in Abhängigkeit von der Konzentration internalisiert. Bei der höchsten Konzentration zeigt *f-NLS-StAx-h* die größte Zunahme im Vergleich zu *f-StAx* (7-fach bei 5 μM) und liegt damit im Bereich der zellgängigsten CPPs Pep-1 und SAHM1 (Fluoreszenzintensität bei 5 μM : 17.000 für *f-NLS-StAx-h*, 16.400 für Pep-1, 16.100 für SAHM1, Kapitel 3.1.3).

Um artifizielle Ergebnisse durch unspezifische Aggregation der Peptide auszuschließen, wurde zusätzlich die zelluläre Lokalisation im Konfokalmikroskop untersucht. Analog zu vorherigen Zellgängigkeitsuntersuchungen (Kapitel 3.1.4) wurden HeLa-Zellen für 90 min mit 5 μM der vier *StAx*-Peptide inkubiert (Abbildung 31B). Wie bereits in Kapitel 3.1.4 beschrieben, sind in HeLa-Zellen nach Inkubation mit dem Ausgangspeptid *f-StAx* hauptsächlich punktförmige fluoreszierende Strukturen erkennbar und keine cytosolische Lokalisation. Zusammen mit den Ergebnissen der Durchflusszytometrie ist deutlich, dass die Internalisierung gering ist. *f-StAx-p* ist überwiegend membranassoziiert. Cytosolische Verteilung ist kaum erkennbar. Im Gegensatz zu *f-StAx-p* und *f-StAx* zeigen beide *f-StAx-h*-Derivate cytosolische Verteilung, die für *f-NLS-StAx-h* besonders ausgeprägt ist. Neben fluoreszierenden vesikulären Strukturen tritt für *f-StAx-h* im Gegensatz zu *f-StAx* die diffuse Verteilung im Cytosol leicht hervor. Für *f-NLS-StAx-h* ist zusätzlich zu einer sehr starken cytosolischen Färbung eine deutliche perinukleäre Lokalisation zu erkennen. Im Gegensatz zur Hypothese, dass die Anheftung einer NLS eine nukleäre Lokalisation herbeiführen könnte, ist das Peptid in der gesamten Zelle verteilt. Ein- und

Austritt aus dem Zellkern wird durch Kernporen kontrolliert. Sie ermöglichen einen passiven Transport von kleinen Proteinen bis zu einem Molekulargewicht von 40 kDa, beschränken jedoch den Durchgang größerer Moleküle auf diejenigen, die ein Kernlokalisierungssignal enthalten. Größere Moleküle benötigen Importmoleküle, die sogenannten Importine, die direkt die NLS binden (α -Importin) und die Interaktion mit den Kernporen vermitteln (β -Importin)²⁴⁶. Demnach können StAx-Peptide durch die Kernporen in beide Richtungen frei diffundieren und sind somit nicht ausschließlich im Zellkern zu erwarten. Dennoch besteht die Möglichkeit, dass das Gleichgewicht des Aufenthaltes zwischen Cytosol und Zellkern mit Hilfe der NLS in Richtung nukleärer Lokalisation verschoben werden kann.

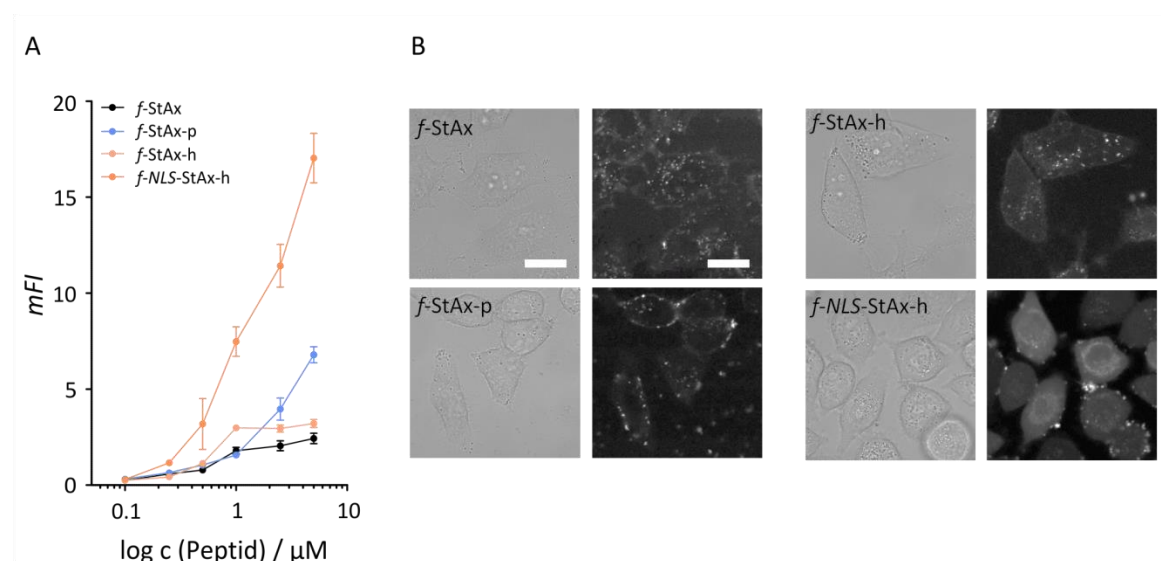


Abbildung 31: Zelluläre Aufnahme ausgewählter StAx-Peptide. (A) Plot der geometrischen mittleren Fluoreszenzintensitäten (mFI), die durch Durchflusszytometrie erhalten wurden. HeLa-Zellen wurden mit *f*-markierten Peptiden (0,1-5 μ M, 90 min) behandelt und 10.000 Ereignisse lebender Zellen aus mindestens drei biologischen Replikaten gemessen. Fehlerbalken repräsentieren 1σ . (B) Lebendzell-Konfokalmikroskopie von HeLa-Zellen, die mit *f*-markierten StAx-Peptiden inkubiert wurden (5 μ M, 90 min). Links: Durchlicht, rechts: FITC-Fluoreszenz, Maßstabsbalken 20 μ m.

Um zu prüfen, ob die erhöhte Internalisierung von *f*-NLS-StAx-h auf die Eigenschaften der Kernlokalisierungssequenz selbst zurückgeht oder durch die zusätzliche 5-fache Ladung verursacht wird, wurde ein Ladungsanalogon, das fünf *N*-terminale Lysinreste anstelle der NLS (*f*-KKKKK-StAx-h) aufweist, entworfen. Die Aufnahme dieses Peptides wurde mittels Durchflusszytometrie untersucht (Abbildung 32) und ergab, dass *f*-KKKKK-StAx-h ähnlich stark aufgenommen wird wie *f*-NLS-StAx-h (mFI bei 5 μ M: 13,9 vs. 17,0). Dies weist darauf hin, dass die zelluläre Aktivität der NLS-modifizierten Version hauptsächlich durch eine erhöhte zelluläre Aufnahme ausgelöst wird, die durch positive Ladungen innerhalb des *N*-Terminus verursacht wird.

3 Ergebnisse und Diskussion

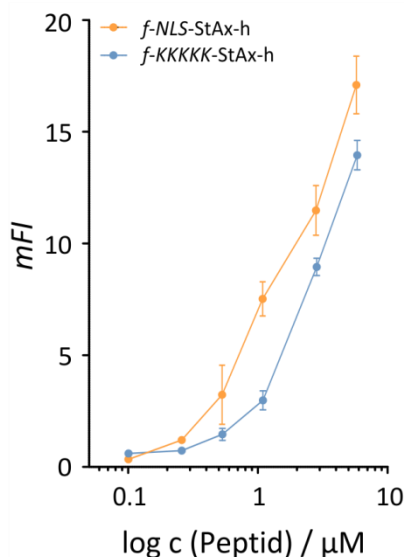


Abbildung 32: Zelluläre Aufnahme von *f-KKKKK-StAx-h*. Plot der geometrischen mittleren Fluoreszenzintensitäten (mFI), die durch Durchflusszytometrie erhalten wurden. HeLa-Zellen wurden mit *f*-markierten Peptiden (0,1-5 μM , 90 min) behandelt und 10.000 Ereignisse lebender Zellen aus mindestens drei biologischen Replikaten gemessen. Fehlerbalken repräsentieren 1σ .

Insgesamt kann geschlussfolgert werden, dass unter den verglichenen Peptiden *f-StAx-p* die geringste Internalisierung aufweist. Die mittels Durchflusszytometrie beobachtete konzentrationsabhängige Zunahme der zellulären Fluoreszenz ist keine Konsequenz erhöhter Internalisierung, sondern auf eine Akkumulation des Peptides in der Plasmamembran zurückzuführen. Im Reporter-gen-Assay zeigt die *StAx-p*-Reihe im Vergleich zu *StAx* und *StAx-h* eine tendenziell geringe Inhibition, die nun durch die vornehmliche Membranassoziation erklärbar ist. Durch die erhöhte Hydrophobizität ist die Affinität zu hydrophoben Kompartimenten wie der Membran zwar gestiegen, jedoch kann übermäßige Hydrophobizität auch bewirken, dass die Peptide in der Membran verbleiben. Die Inkorporation von hR erhöht die Hydrophobizität weniger als pR und resultierte in einem höheren Anteil cytosolischer Fluoreszenz, jedoch einer Sättigung der Peptidaufnahme bei 1 μM . Die Addition der hydrophilen, positiv geladenen NLS bzw. 5 facher positiver Ladung verändert die zelluläre Aufnahme und Verteilung drastisch und zeigte eine deutliche Inhibition des Wnt/ β -Catenin Signalweges

3.4 Inhibition von β -Catenin im Kolonkarzinom

3.4.1 Anreicherung von β -Catenin aus Zelllysat

Massenspektrometrie und Analyse des Pull-Down-Experimentes wurden von Dr. Tanja Bange, Abteilung für mechanistische Zellbiologie, Max-Planck-Institut für molekulare Physiologie, Dortmund, durchgeführt.

Der Reportergen-Assay (Kapitel 3.3.3) und die Untersuchung der Zellgängigkeit (Kapitel 3.3.5) zeigten, dass der Austausch von Arginin durch hR das Potenzial für eine effiziente Inhibition des Signalweges hat. Zur Annäherung an ein biologisch komplexeres Evaluierungssystem wurde die Bindung an β -Catenin *in cellulo* untersucht. Zu diesem Zweck wurde ein Pull-Down-Experiment unter Verwendung einer biotinylierten Version von StAx-h (*b*-StAx-h) durchgeführt. Das Peptid wurde auf Streptavidin-*Beads* immobilisiert und mit dem Lysat von DLD-1-Zellen – einer Darmkrebszelllinie mit erhöhtem β Catenin-Level – inkubiert. Nach stringentem Waschen wurden die gebundenen Proteine einem tryptischen Verdau unterzogen und die Fragmente mittels hochauflösender Massenspektrometrie analysiert.

Dieses Experiment dient nicht nur der Validierung, dass StAx-h und β -Catenin auch in einer komplexen biologischen Umgebung interagieren, sondern erlaubt auch die Identifikation eventueller unspezifischer Binder sowie von Proteinen, die im Komplex mit den direkten Interaktionspartnern vorliegen. Identifizierte Proteine wurden entsprechend ihrer Anreicherung und statistischen Relevanz im Vergleich zu einer Kontrollreaktion ohne Peptid ausgewertet. Das resultierende Streudiagramm (Abbildung 33) zeigt 37 signifikant angereicherte Proteine. Unter diesen Treffern war das Zielprotein β -Catenin am stärksten angereichert (orange, Abbildung 33). Mit Hilfe der BioGRID Datenbank wurden die verbleibenden 36 Proteine hinsichtlich möglicher Interaktion mit β -Catenin analysiert²⁵⁶. Davon können 17 Komponenten als potentielle β -Catenin-Komplexparker (blau, Abbildung 33, vollständige Liste in Kapitel 8.12) zugeordnet werden, die im Folgenden näher erläutert werden.

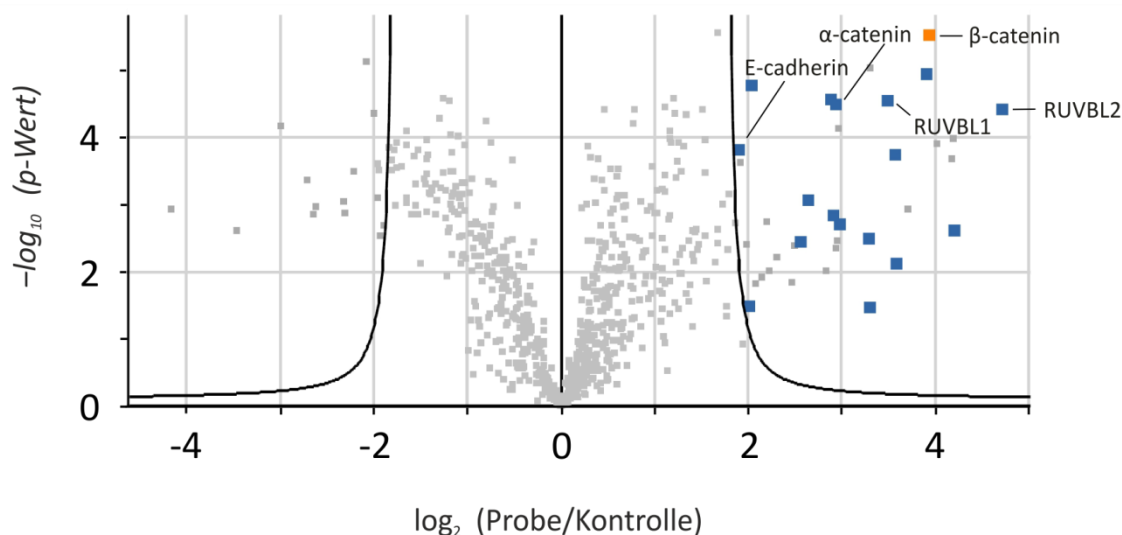


Abbildung 33: Streudiagramm des Pull-Down-Experimentes. *b*-StAx-h, immobilisiert auf Streptavidin-beschichteten *Beads*, wurde mit DLD-1-Zelllysat inkubiert. β -Catenin (orange) und signifikant angereicherte Partner in β -Catenin-haltigen Komplexen (blau) sind hervorgehoben (vollständige Liste der Pull-Down-Ergebnisse in Kapitel 8.12).

β -Catenin in der Transkriptionsregulation

Der größte Anteil identifizierte Bindungspartner stammt aus dem Bereich der Transkriptionsregulation (Tabelle 4). DDX3X ist eine ATP-abhängige RNA-Helicase, die in Transkriptionsregulation, mRNA-Prozessierung, -Export und -Translation involviert ist. Unabhängig davon nimmt DDX3X im Signalweg mehrere Funktionen ein: Als Aktivator von CK1 ϵ fördert DDX3 die Phosphorylierung von DVL, welches die Assemblierung des Signalosoms unterstützt²⁵⁷. Darüber hinaus ist in Lungenkrebszelllinien eine direkte Interaktion zwischen DDX3 und β -Catenin bei der Regulierung der TCF-4-vermittelten Transkriptionsaktivität berichtet worden²⁵⁸.

Das DNA damage-binding protein 1 (DDB1) ist ein Proteinkomplex bestehend aus zwei Untereinheiten, die in der Reparatur UV-geschädigter DNA beteiligt sind, aber auch als Adaptermolekül für die Cullin4 E3 Ubiquitin Ligase fungieren. Die DDB1-Untereinheit interagiert mit CBP/p300-Co-Aktivatoren, die unter anderem mit β -Catenin interagieren²⁵⁹. Des Weiteren ist β -Catenin als Interaktionspartner der Ubiquitin Ligase-Untereinheit identifiziert worden²⁶⁰. Aus diesem Grund könnte DDB1 als indirekter Interaktionspartner angereichert worden sein.

RUVBL1 und RUVBL2 sind DNA-abhängige ATPasen, die wesentliche Komponenten von Chromatin-Remodeling- und Transkriptionsfaktor-Komplexen ausmachen. Durch eine direkte Bindung an β -Catenin sind sie an der Regulation der Transkription beteiligt²⁶¹⁻²⁶³.

3.4 Inhibition von β -Catenin im Kolonkarzinom

Der Tumorsuppressor p53 ist in DLD-1 Zellen stark überexprimiert und interagiert mit vielen Komponenten des Signalweges. Unter anderem reduziert p53 die Menge an cytosolischem β -Catenin, indem es GSK3 β und somit das Ubiquitin-Proteasom-System aktiviert²⁶⁴. Andere mögliche indirekte Interaktionen über β -Catenin-Interaktionspartner basieren auf der Interaktion mit CBP²⁶⁵ oder der Ubiquitin-Ligase²⁶⁶.

Zusammen mit weiteren Faktoren ist Protein Flightless-1 Homolog an der Regulation der β -Catenin-abhängigen Transkription beteiligt. FLII fungiert als negativer Regulator, indem es die Interaktion von Co-Aktivatoren stört, und gehört somit zu den indirekten Interaktionspartnern²⁶⁷.

Die Proteine des CCR4-NOT Komplexes, heterogene nukleäre Ribonucleoproteine (hnRNPs), Proteine des Mediator Komplexes und die RNA-Polymerase II sind komplex miteinander verschaltet und regulieren die Genexpression von der Transkription, über die RNA-Prozessierung bis zum nukleären Export²⁶⁸. β -Catenin und Co-Aktivatoren interagieren mit Untereinheiten des Mediatorkomplexes, die die Transkription initiieren²⁶⁹. RNA-Polymerase II benötigt viele weitere Proteinfaktoren, um Zugang zur DNA zu erhalten, darunter auch Proteine des CCR4-NOT Komplexes²⁷⁰. Untereinheiten des CCR4-NOT-Komplexes interagieren wiederum mit hnRNPs, die prä-mRNA-Splicing und nukleären Export regulieren²⁷⁰⁻²⁷³.

Tabelle 4: Direkte und indirekte Interaktionspartner von β -Catenin auf der Ebene der Transkriptionsregulation.

Protein	Gen	Quelle
ATP-dependent RNA helicase DDX3X	DDX3X;DDX3Y	257,258,274
DNA damage-binding protein 1	DDB1	260
RuvB-like 1 (Pontin)	RUVBL1	261,263
RuvB-like 2 (Reptin)	RUVBL2	261,262
Cellular tumor antigen p53	TP53	264-266
Protein flightless-1 homolog	FLII	267
DNA-directed RNA polymerase II subunit RPB1	POLR2A	268-270
CCR4-NOT transcription complex subunit 1	CNOT1	270
Heterogeneous nuclear ribonucleoproteins C1/C2	HNRNPC	271-273

β -Catenin im Kernporenkomplex

Des Weiteren werden *Ran binding protein 2* (RanBP2) und *Ran GTPase activating protein* (RanGAP) angereichert (Tabelle 5). RanBP2 ist ein Mitglied der Nucleoporin-Familie und bildet mit weiteren Komponenten den Kernporenkomplex, der den Import von mRNA und Proteinen in den Zellkern reguliert. Da der Kerntransport energieabhängig ist, liegt es in einem Komplex mit RanGAP vor²⁷⁵. Details des Kerntransports von β Catenin sind bis heute nicht geklärt. Es konnte jedoch gezeigt werden, dass β -Catenin direkt an der Kernpore mit RanBP2 interagiert^{276,277}.

Tabelle 5: Direkte und indirekte Interaktionspartner von β -Catenin im Kernporenkomplex.

Protein	Gen	Quelle
Ran GTPase-activating protein 1	RANGAP1	²⁷⁵
E3 SUMO-protein ligase RanBP2	RANBP2	^{276,277}

β -Catenin in der Zell-Zell-Adhäsion

Die in Adhäsionsverbindungen vorkommenden Cadherine E-Cadherin und Protocadherin FAT1 sowie γ -Catenin, α -Catenin, Plectin und Desmoplakin werden im Pull-Down aus DLD-1-Zellen angereichert. Da β -Catenin nicht nur die Gentranskription reguliert, sondern auch an der Koordination von Zell-Zell-Kontakten beteiligt ist²¹⁵, lassen sich E-Cadherin, FAT1, α -Catenin als direkte und Desmoplakin sowie Plectin als indirekte Interaktionspartner von β -Catenin kategorisieren (Tabelle 6).

Adhäsionsverbindungen verbinden benachbarte Zellen durch membranständige Proteine der Cadherin Superfamilie miteinander. Intrazellulär sind Cadherine über Ankerproteine mit dem Cytoskelett verbunden^{278,279}. An ihre cytoplasmatische Domäne binden δ - und β - bzw. γ -Catenin, und sind mit dem Ankerprotein α -Catenin mit dem Aktinfilament verbunden²¹⁴. Aus kristallographischen Analysen geht hervor, dass der intrazelluläre Teil E-Cadherins sich um die zentrale Armadillo Region von β -Catenin windet²⁸⁰. Das bedeutet auch, dass E-Cadherin unter anderem mit der StAx-Bindungsstelle interagiert. Eine Konkurrenz zwischen StAx und E-Cadherin um β -Catenin könnte zu Einschränkungen der Ausbildung von Zell-Zell-Kontakten führen. Da in diesem Experiment E-Cadherin jedoch stark angereichert wird, scheint diese Interaktion nicht gestört zu sein. Auch vorausgegangene Experimente bestätigen, dass StAx die E-Cadherin- β -Catenin Interaktion nicht beeinträchtigt²¹⁷, da es sich um eine sehr starke Interaktion mit einer Affinität im

3.4 Inhibition von β -Catenin im Kolonkarzinom

pikomolaren Bereich handelt²⁸¹. Die Bindung von α -Catenin ist auf den flexiblen N-terminalen Bereich von β -Catenin beschränkt wodurch sie nicht mit der StAx-Bindungsstelle überlappt und diese Interaktion nicht stört²⁸².

Anders als in Adhäsionsverbindungen sind α - und β -Catenin nicht in der Ausbildung von Desmosomen beteiligt. Stattdessen werden desmosomale Cadherine über Plakophilin, γ -Catenin und die Ankerproteine Desmoplakin mit Intermediärfilamenten verbunden^{283,284}. Da die Armadillo-Regionen von γ - und β -Catenin eine 80%ige Sequenzidentität teilen²⁸⁰, kann γ -Catenin mit den gleichen Proteinen wie β -Catenin wechselwirken, aber zusätzlich noch die desmosomalen Cadherine binden. Dies bedeutet auch, dass γ -Catenin mit Komponenten des Signalweges, insbesondere mit APC²⁸⁵, Axin²⁸⁶, β -TrCP²⁸⁷ und LEF1²⁸⁸ interagiert. Ob γ -Catenin tatsächlich dieselbe Funktion im Signalweg einnimmt, nämlich die Transaktivierung von Zielgenen im Komplex mit TCF, wird kontrovers diskutiert und bleibt zu klären^{289,290}. Es ist deshalb nicht auszuschließen, dass StAx aufgrund der Sequenzidentität direkt mit γ -Catenin interagiert und deshalb im Experiment angereichert wurde. Da spezifische Unterschiede in der zellulären Funktion zwischen den beiden Cateninen bisher nicht vollständig geklärt sind, ist dieses Ergebnis nicht als kritisch zu bewerten.

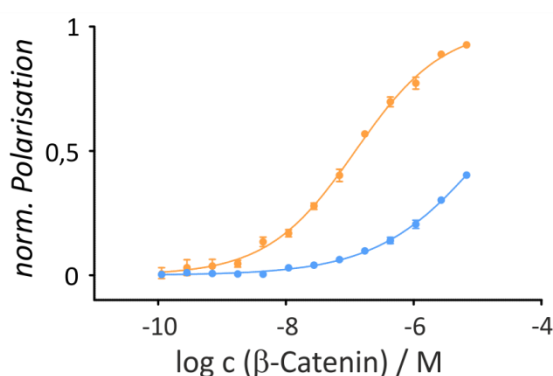
Tabelle 6: Direkte und indirekte Interaktionspartner von β -Catenin in Zell-Zell-Adhäsionen.

Protein	Gen	Quelle
Cadherin-1	CDH1	280
Protocadherin Fat 1	FAT1	291
Catenin alpha-1	CTNNA1	282
Plectin	PLEC	292
Junction Plakoglobin (Catenin gamma)	JUP	293,294
Desmoplakin	DSP	284

Zusammenfassend kann gesagt werden, dass etwa die Hälfte der im Pull-Down angereicherten Proteine bekannte Interaktionspartner von β -Catenin sind. Ein Großteil der angereicherten Proteine lassen sich den β -Catenin assoziierten Komplexen zuordnen, die entweder in der Transkriptionsregulation oder bei der Ausbildung von Zelladhäsionen beteiligt sind. Unter den verbliebenen 19 Proteinen befinden sich keine bisher dokumentierten direkten oder indirekten Interaktionspartner von β -Catenin (Kapitel 8.12).

3.4.2 Zellproliferation

Da die vorhergegangenen Experimente zeigen, dass StAx-h und insbesondere NLS-StAx-h tendenziell effektiver den Wnt/ β -Catenin Signalweg inhibieren und eine erhöhte zelluläre Aufnahme sowie cytosolische Lokalisation aufweisen, wurden H_2N -StAx-h sowie NLS-StAx-h in zellbasierten Assays evaluiert. Um Wnt-unabhängige Effekte durch beispielsweise generelle Toxizität auszuschließen, wurde ein Kontrollpeptid StCo-h angefertigt. Dazu wurden drei Aminosäuren in der StAx-Sequenz ausgetauscht, die an der Interaktion zu β -Catenin beteiligt sind (D9H, H11D, W16A). Dadurch sinkt die Affinität zu β -Catenin und somit auch das Potenzial den Signalweg zu inhibieren. Mittels Fluoreszenzpolarisations-Assay wurde gezeigt, dass die Affinität zu β -Catenin deutlich verringert ist ($K_D \approx 10 \mu\text{M}$, Abbildung 34). Sowohl für H_2N -StAx-h als auch NLS-StAx-h wurden anschließend die Kontrollpeptide H_2N -StCo-h und NLS-StCo-h synthetisiert und in allen Experimenten im Kontext des kolorektalen Karzinoms eingesetzt.



Peptid	Sequenz	K_D
—●— f -StCo-h	FITC-PEG ₂ -h h W P h X I L H X D V h h V A h	$\sim 10 \mu\text{M}$
—●— f -StAx-h	FITC-PEG ₂ -h h W P h X I L D X H V h h V W h	$123 \pm 17 \text{ nM}$

Abbildung 34: Fluoreszenzpolarisations-Assay zur Bestimmung der Dissoziationskonstanten (K_D) zwischen β -Catenin und f -StCo-h. Die Bindungskurven wurden durch nicht-lineare Regression mit der Software Prism (Version 5.03, GraphPad) erhalten. Proteinkonzentration $7 \mu\text{M}$ - $0,1 \text{ nM}$. FITC = Fluorescein Isothiocyanat, PEG₂ = 8-Amino-3,6-Dioxyoctanoyl h = Homo-Arginin, X = 2-(4'-Pentenyl)alanin. Experimente wurden als Triplikate durchgeführt. Fehlerbalken repräsentieren 1σ .

Um die Aktivität und Spezifität von StAx-h-Peptiden auf das Zellwachstum zu untersuchen, wurde der zelluläre ATP-Gehalt als Maß für die Proliferation verwendet. Durch den enzymatischen Umsatz von ATP durch die Leuchtkäfer Luciferase aus *Photuris pennsylvanica* wird unter anderem Biolumineszenz generiert, die auf den ATP-Gehalt und somit die Zellviabilität der Zellen rückschließen lässt. Die Inhibition des Wnt/ β -Catenin Signalweges verringert das Wachstum von Wnt-abhängigen Krebszell-

linien, hat aber keine Wirkung auf Zellen, die unabhängig vom Signalweg wachsen. Deshalb wurden Krebszelllinien, die aus verschiedenen menschlichen Geweben stammen, auf ihre Empfindlichkeit gegenüber der Inhibitorbehandlung untersucht. Hierbei handelt es sich um Wnt-abhängige Darmkrebszelllinien DLD-1 und SW-480, bei denen der Signalweg aufgrund von unzureichender Aktivität des Abbaukomplexes durch Mutationen in APC aktiviert ist. Darüber hinaus wurden drei Zelllinien gewählt von denen bisher nicht berichtet wurde Wnt-abhängig zu sein: U87-Glioblastomzellen, MCF-7-Brustkrebszellen und U2OS-Osteosarkomzellen²⁹⁵.

Im Vergleich zu Literatur-bekanntem Studien wurden alle fünf Zelllinien mit Peptiden, Kontrollpeptiden und dem *small molecule* Inhibitor XAV939 ($c = 10 \mu\text{M}$) unter stringenter Bedingungen – nämlich unter Verwendung der normalen Serumkonzentration (anstelle von Aushungern)¹⁹⁸ und einer relativ kurzen Inkubationszeit von 72 h (anstelle von 120-144 h)^{186,217,296} – kultiviert. Da alle Peptide in DMSO gelöst wurden, diente die DMSO-Kontrolle dazu, peptidspezifische Effekte von allgemeinen DMSO-bezogenen Effekten zu unterscheiden. Die Zellviabilitäten Peptid-behandelter Zellen wurden auf die DMSO-Kontrolle normiert (Abbildung 35). H_2N -StAx-h zeigte eine moderate Wirkung auf SW-480-Zellen (38% Hemmung), jedoch nicht auf DLD-1 und die Wnt-unabhängigen Zelllinien. Das zellgängigste Peptid NLS -StAx-h verringerte die Proliferation von SW-480 und DLD-1 um mehr als 80%; die Proliferation der Wnt-unabhängigen Zelllinien bleibt unverändert. Die Kontrollpeptide NLS -StCo-h und H_2N -StCo-h, die eine geringere Affinität zu β -Catenin aufweisen, hatten keinen Einfluss auf die Proliferation der getesteten Zelllinien. Unter den hier verwendeten Kulturbedingungen zeigten das Ausgangs-peptid Ac -StAx und der bekannte Axin-Stabilisator XAV939 keine signifikanten Effekte auf die Proliferation von Wnt-abhängigen DLD-1 und SW-480 Zellen. Jedoch inhibierte XAV939 die Proliferation von MFC-7 Zellen (48% Hemmung), was auf eine Aktivität hinweist, die unabhängig von der Inhibition des Signalweges ist. Ac -StAx zeigte (im Gegensatz zu von Grossmann *et al.* berichtet²¹⁷) nur eine geringe Reduzierung der Zellviabilität Wnt-abhängiger Zelllinien (20% Hemmung). Dieser Unterschied ist durch die hier verkürzte Dauer des Experimentes zu erklären. Die Verkürzung der Inkubationszeit erlaubte eine stringenter Selektion potenter Peptide.

3 Ergebnisse und Diskussion

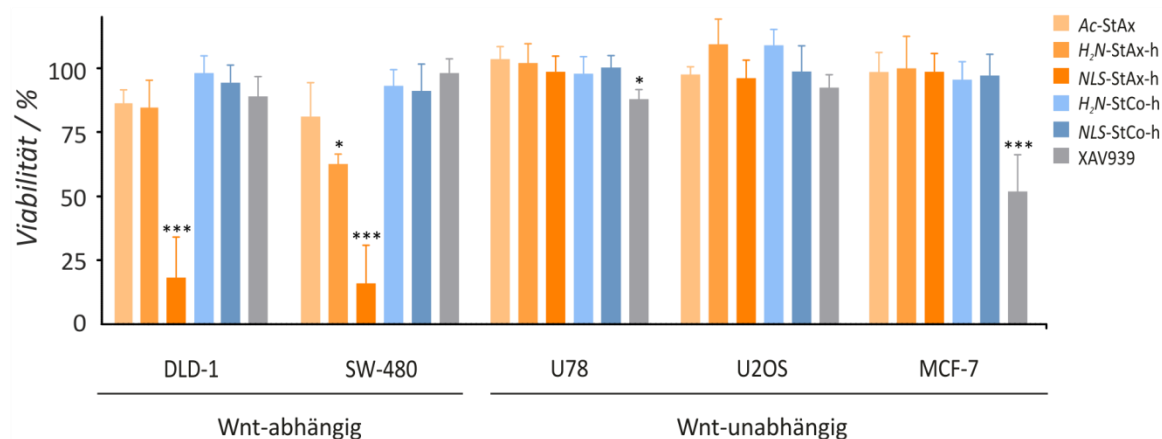


Abbildung 35: Proliferation von Wnt-abhängigen (DLD-1, SW-480) und Wnt-unabhängigen Zelllinien (U78, U2OS, MCF-7) nach Behandlung mit StAx-Peptiden und dem Tankyrase-Inhibitor XAV939 (10 μ M, 72 h). Die Proliferation ist relativ zu DMSO-behandelten Zellen aufgetragen. Experimente wurden als unabhängige biologische Replikate ($3 < n < 6$) durchgeführt. Fehlerbalken repräsentieren 1σ , * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$, ns = nicht signifikant.

Nachdem die Zellgängigkeit der *f*-markierten Peptide detailliert untersucht wurde, sollte ihr Effekt auf die Zellviabilität untersucht werden (Abbildung 36A). In Übereinstimmung mit dem Reporter-Gen-Assay und der geringen Zellgängigkeit verfügte *f*-StAx-h über eine geringe Aktivität auf Wnt-abhängige SW-480 Zellen. *f*-NLS-StAx-h zeigte eine Aktivität die ähnlich zu der von NLS-StAx-h ist. Interessanterweise reduzierten *f*-StAx-h und *f*-NLS-StAx-h die Zellviabilität Wnt-unabhängiger MCF-7 Zellen um etwa 20%. Dies deutet auf eine unspezifische Toxizität des Fluorescein-Labels hin.

Das Ladungsanalogon *f*-KKKKK-StAx-h zeigte in HeLa Zellen eine ähnlich hohe Zellgängigkeit wie *f*-NLS-StAx-h (Kapitel 3.3.5). Um zu untersuchen, ob eine gute Zellgängigkeit zu einer hohen Aktivität führt, wurde der Effekt von KKKKK-StAx-h auf die Zellviabilität untersucht (Abbildung 36B). KKKKK-StAx-h reduzierte die Zellviabilität von SW-480 Zellen um denselben Faktor wie NLS-StAx-h (ca. 80% Hemmung). Auf die Wnt-unabhängigen MCF-7 hatte KKKKK-StAx-h keinen Effekt. Eine unspezifische Toxizität der Lysine ist somit auszuschließen. Dies bedeutet aber auch, dass die verbesserte zelluläre Aktivität NLS-StAx-h durch eine Erhöhung der Ladung und nicht auf eine erhöhte Kernlokalisation durch das Anfügen der Kernlokalisierungssequenz zurückzuführen ist.

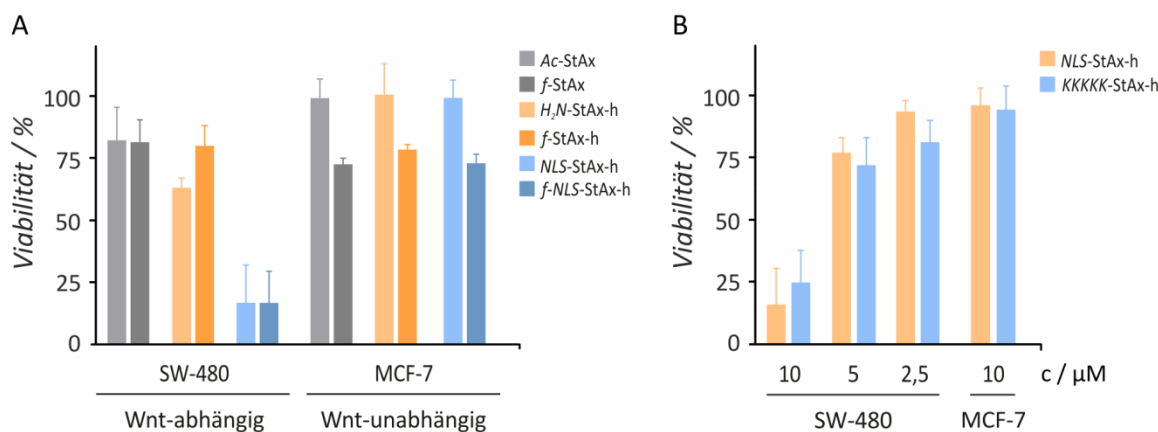


Abbildung 36: Proliferation von Wnt-abhängigen SW-480 und Wnt-unabhängigen MCF-7 nach Behandlung mit (A) *f*-markierten StAx-Peptiden (10 μ M, 72 h) oder (B) mit dem Ladungsanalogon KKKKK-StAx-h (2,5-10 μ M, 72 h). Die Proliferation ist relativ zu DMSO-behandelten Zellen aufgetragen. Experimente wurden als unabhängige biologische Replikate ($3 < n < 6$) durchgeführt. Fehlerbalken repräsentieren 1σ .

3.4.3 Zellmigration

Der Signalweg kontrolliert nicht nur die Proliferation, sondern auch die Zellmigration, die bei einer Fehlregulation des Signalweges zur Krebsmetastasierung beiträgt²⁹⁷⁻²⁹⁹. Mit Hilfe einer artifiziell zugefügten Wunde in einer konfluenten Einzellschicht, der sogenannten Kratzwunde (*scratch wound*), kann die Zellmigration beobachtet werden. Die Zellen am Rand der Wunde migrieren in Richtung der kreierten Lücke bis die Wunde geschlossen ist. Die Wunden wurden mit einem speziellen Gerät, das homogene Kratzer innerhalb eines Experimentes erzeugt, in die Einzellschicht eingeführt. Mit Hilfe eines automatischen Mikroskops und der IncuCyte[®] Zoom Software wurden Spaltbreite und Konfluenz stündlich vermessen.

Da bei der Analyse der Zellproliferation NLS-StAx-h als das aktivste Peptid identifiziert wurde, wurde es zusammen mit dem Kontrollpeptid NLS-StCo-h auf die Aktivität im Wundverschluss-Assay untersucht. Nach Einführung einer sterilen Wunde in der konfluenten Einzellschicht der kolorektalen Karzinomzelllinie DLD-1 (blau, Abbildung 37A+B) wurden die Zellen entweder mit 0,5% DMSO, dem Migrationsinhibitor Actinomycin ($c = 1 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$) oder mit einem der Peptide (10, 5 und 2,5 μ M, finale DMSO-Konzentration 0,5%) bis zur Wundschließung behandelt. In Abwesenheit von Peptid (DMSO-Kontrolle) ist die ursprüngliche Wunde bereits nach 24 h um 69% verschlossen, während die NLS-StAx-h-Behandlung zu einer dosisabhängigen Hemmung dieses Prozesses führt (Wundverschluss: 52% bei 5 μ M und 24% bei 10 μ M). Die Wunde der DLD-1-Zellen, die mit dem Kontrollpeptid NLS-StCo-h inkubiert wurden, ist nach 24 h um 64% verschlossen und verhält sich wie die DMSO-Kontrolle (69% Wundver-

3 Ergebnisse und Diskussion

schluss). Somit wurde keine Inhibition der Zellmigration durch das Kontrollpeptid festgestellt. Diese robuste Inhibition der Zellmigration durch *NLS-StAx-h* wurde auch durch zeitabhängige Messungen bestätigt (Abbildung 37C), die gegenüber *NLS-StCo-h* eine signifikante Hemmung der Wundschließung bereits 5 h nach Beginn des Assays aufwies.

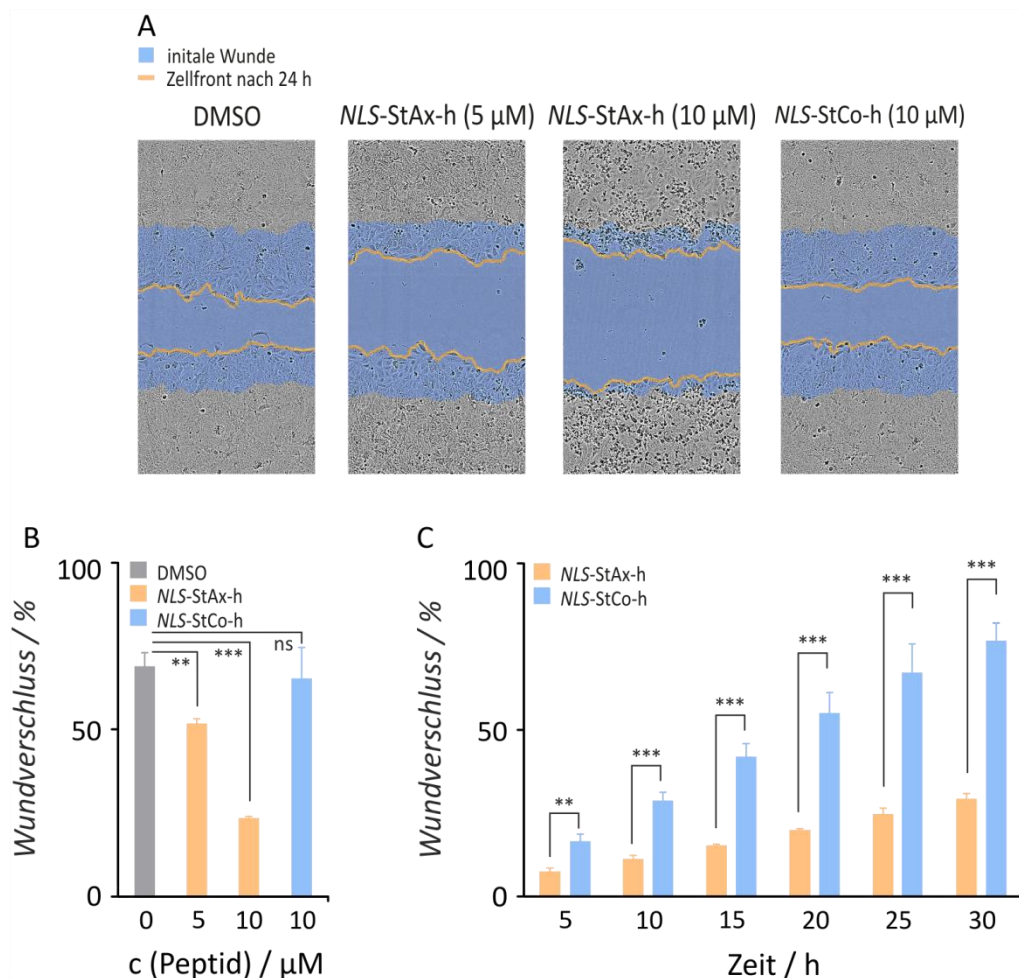


Abbildung 37: Wundverschluss-Assay von DLD-1-Zellen. (A) Für 24 h wurden die Zellen entweder mit 0,5% DMSO oder Peptid bei gegebener Konzentration behandelt grau: Anfangszellbereich, blau: initiale Wunde, orangene Linie: Zellfront nach 24 h. (B) Quantifizierung des Wundverschlusses aus (A) nach 24 h. (C) Zeitabhängigkeit des Wundverschlusses. Vergleichende Analyse der Behandlung mit *NLS-StAx-h* (orange) und Kontrollpeptid *NLS-StCo-h* (blau). Experimente wurden als unabhängige biologische Triplikate durchgeführt. Fehlerbalken repräsentieren 1σ . * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$, ns = nicht signifikant.

Als zusätzliche Kontrolle wurde dieses Experiment mit der Wnt-unabhängigen Brustkrebszelllinie MCF-7 durchgeführt (Abbildung 38). In Abwesenheit von Peptid (0,5% DMSO) war die ursprüngliche Wunde bereits nach 24 h um 55% verschlossen (Abbildung 38A). Für *NLS-StAx-h*-behandelte Zellen war die Wunde bereits um 66% und für *NLS-StCo-h* um 55% geschlossen ($c = 10 \mu\text{M}$). Keines der Peptide inhibierte somit die Zellmigration in MCF-7-Zellen. Auch in der zeitabhängigen Messung der

Wundschließung waren die Unterschiede zwischen den Peptiden nicht signifikant (Abbildung 38B)

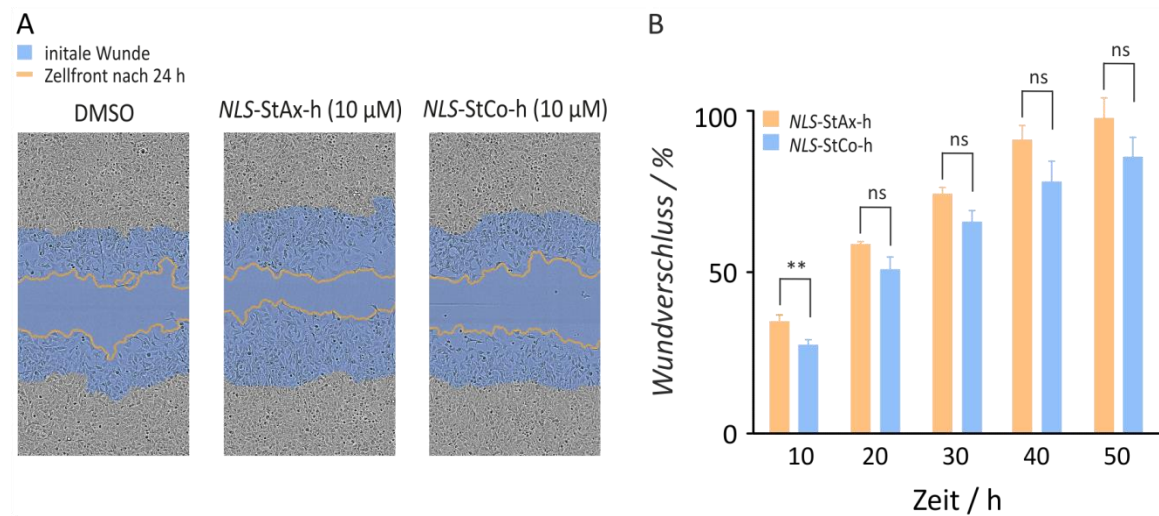


Abbildung 38: Wundverschluss-Assay von MCF-7-Zellen. (A) Für 24 h wurden die Zellen entweder mit 0,5% DMSO oder 10 μ M Peptid behandelt. grau: Anfangszellbereich, blau: initiale Wunde, orangene Linie: Zellfront nach 24 h. (B) Zeitabhängiger Wundverschluss-Assay, der die Behandlung mit *NLS-StAx-h* (orange) und Kontrollpeptid *NLS-StCo* (blau) vergleicht. Experimente wurden als unabhängige biologische Triplikate durchgeführt. Fehlerbalken repräsentieren 1 σ , * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$, ns = nicht signifikant.

Das *NLS-StAx-h*-Peptid zeigte in DLD-1 Zellen, die durch Mutation in APC den Signalweg dauerhaft aktiviert haben, eine Verringerung des Wundverschlusses und somit der Migration. Das Kontrollpeptid *NLS-StCo-h*, welches aufgrund einer leicht abgeänderten Aminosäuresequenz eine geringere Affinität zu β -Catenin aufweist, beeinflusste die Wundschließung und somit die Migration nicht. Da weder *NLS-StAx-h* noch *NLS-StCo-h* die Wundheilung in MCF-7, einer Krebszelllinie, die keine Mutation von Signalwegkomponenten aufweist, beeinflusste, wurde geschlussfolgert, dass die beobachteten Effekte auf die Migration von DLD-1-Zellen auf eine spezifische Hemmung des Wnt/ β -Catenin Signalweges zurückzuführen sind.

3.4.4 Genexpression in Dünndarmkrypten

Die Experimente wurden in Kollaboration mit der Arbeitsgruppe von Prof. Trevor C. Dale, School of Biosciences, Cardiff University, Großbritannien, von Kenneth Ewan durchgeführt.

Die Transkription Wnt-abhängiger Zielgene wird durch die Lokalisation von β -Catenin reguliert. Ist der Signalweg aktiv, initiiert β -Catenin durch die Interaktion mit Co-Aktivatoren und Transkriptionsfaktoren der TCF/LEF-Familie die Transkription dieser Ziel-

3 Ergebnisse und Diskussion

gene. Insbesondere im Darm kontrolliert der Wnt/ β -Catenin Signalweg die Erneuerung des Darmepithels und ist essentiell zur Aufrechterhaltung der Stammzellnische in den Krypten^{300,301}. Die Fehlregulation des Signalweges und die damit verbundene Veränderung der Transkriptionslevel trägt zur Entstehung und Progression von Darmkrebs bei³⁰². Um das Potenzial zur Repression der Zielgentranskription durch StAx in einem biologisch relevanten System zu evaluieren, wurde ein Darmkrebsmodell aus der Maus generiert. Durch Expression einer N-terminal verkürzten β -Catenin Variante (Δ N1-89- β -Catenin), der Phosphorylierungs- und Erkennungsstelle zur proteasomalen Degradation fehlen, wurde der Signalweg aktiviert und führte zur Entstehung von Hyperplasien, wie sie auch im kolorektalen Karzinom vorzufinden sind. Die Krypten wurden aus dem Dünndarm gewonnen und daraus Organoide – miniaturisierte und vereinfachte drei-dimensionale Nachbildungen eines Organs – zur *ex vivo* Kultivierung generiert³⁰³.

In einer Kalibrierprobe, die zur Normalisierung der mRNA-Level benötigt wird, wurde die Expression von Δ N1-89- β -Catenin und somit auch der Zielgene durch Zugabe von Doxycyclin (Dox) für 72 h induziert. In einer Kontrollprobe wurde Dox nach 48 h aus dem Medium entfernt und die Organoide für die verbliebenen 24 h des Experimentes ohne Dox kultiviert. Die Entfernung von Dox hat ein Abschalten der Expression von β Catenin – und somit auch der Zielgentranskription – zur Folge. Um einen dynamischen Bereich der Signalweg-Inhibition zu erfassen, wurden pro eingesetztem Peptid vier Zeitpunkte getestet: die Organoide wurden für die letzten 2, 4, 10 und 24 h des Experimentes mit Peptiden ($c = 10\mu\text{M}$, finale DMSO Konzentration 0,5%) versetzt. Da sich insbesondere *NLS-StAx-h* als geeigneter Kandidat zur Inhibition der β -Catenin/TCF-Interaktion herauskristallierte, wurde sein Effekt zusammen mit *NLS-StCo-h* auf die Zielgenexpression untersucht. Anschließend wurde die mRNA-Menge von vier Zielgenen (*Ascl2*³⁰⁴, *Tiam1*³⁰⁵, *Myc*³⁰⁶ und *Axin2*³⁰⁷) zusammen mit dem intestinalen Differenzierungsmarker *Car4*³⁰⁸ mittels quantitativer real-time PCR (qPCR) quantifiziert (Abbildung 39). Die erhaltenen Ergebnisse wurden auf das Referenzgen *Gapdh* und die Kalibrierprobe (72 h Dox) normalisiert. In Bezug zur Kalibrierprobe wird eine Abnahme der Zielgentranskription für die Kontrollreaktion beobachtet. Für die Zugabe von *NLS-StAx-h* wird ein ähnlicher Effekt wie in der Kontrollreaktion – nämlich die Reduktion der Zielgen-mRNA-Level – erwartet. Nach bereits 2 h nahm die Menge transkribierter mRNA ab und war nach 6 h Inkubation auf das Basallevel reduziert. Da *NLS-StCo-h* theoretisch die Zielgentranskription nicht beeinflusst, werden konstante Transkriptlevel wie in der Kalibrierprobe

3.4 Inhibition von β -Catenin im Kolonkarzinom

erwartet. Die Ergebnisse zeigten, dass die Transkriptlevel der Zielgene auch über einen Inkubationszeitraum von 24 h konstant blieben. Dadurch wird belegt, dass *NLS-StAx-h* spezifisch die Transkription von Wnt-Zielgenen reguliert. Durch die Verwendung von *NLS-StCo-h* wird ausgeschlossen, dass die erhaltenen Messwerte nicht durch unspezifische Toxizität durch die Kernmodifikation hR oder die Kernlokalisierungssequenz hervorgerufen wird.

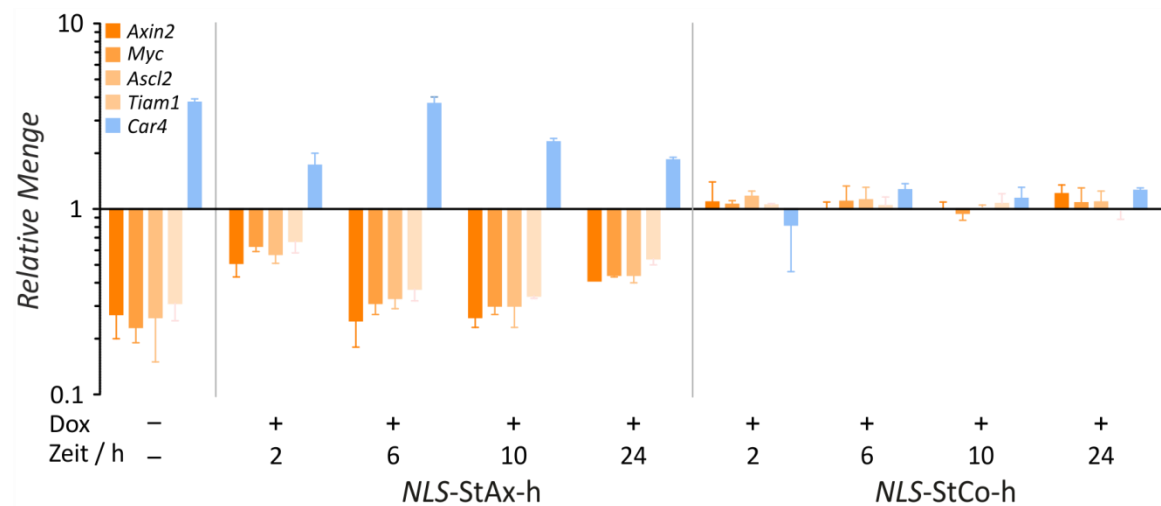


Abbildung 39: Zielgenexpression in Dünndarm-Krypt-Organoiden, die ein Doxycyclin (Dox)-induzierbares mutiertes β -Catenin (Tet-O- Δ 1-89- β -Catenin) exprimieren. Die relativen mRNA-Mengen sind in Bezug auf Dox-induzierte Krypten (+Dox), die nicht mit Peptid inkubiert wurden, aufgetragen. Mit $4 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ Dox induzierte Organoiden wurden mit $10 \mu\text{M}$ *NLS-StAx-h* oder *NLS-StCo-h* behandelt. mRNA-Spiegel der Wnt-Zielgene (*Myc*, *Ascl2*, *Tiam1* und *Axin2*) und des Differenzierungsmarkers *Car4* wurden quantifiziert. Genexpressionsänderungen als Ergebnis der Entfernung von Dox für die letzten 24 h (-Dox) sind auf der linken Seite gezeigt. Experimente wurden als drei unabhängige biologische Replikate mit jeweils drei technischen Replikaten durchgeführt. Fehlerbalken repräsentieren 1σ .

3.5 Diskussion

Das Ziel dieser Arbeit bestand darin, ein Konzept zur Verbesserung der Zellgängigkeit von Peptiden anhand des *stapled peptides* StAx-35R zu entwickeln. Obwohl eine große Anzahl CPPs in der Literatur bekannt sind, gibt es keine einheitlichen Standards, unter denen sie evaluiert wurden. Aufgrund der Vielfalt zellgängiger Peptide und der Vielzahl an berichteten – teilweise widersprüchlichen – Importmechanismen^{93,226,309}, herrscht in der Literatur kein Konsens über mechanistische Details sowie über Parameter, die eine Importroute gegenüber einer anderen favorisieren. Zunächst wurde die Zellgängigkeit von StAx-35R im Vergleich zu bekannten zellgängigen Peptiden untersucht. Durchflusszytometrie und Konfokalmikroskopie erlaubten Quantifizierung und Beschreibung der zellulären Lokalisation (Kapitel 3.1). Es wurden die polykationischen Peptide R₈ und Tat, die primär amphipathischen Peptide Pep-1, MPG und TP10, das sekundär amphipathische Penetratin und das *stapled peptide* SAHM1 ausgewählt. Polykationische Peptide, gefolgt vom sekundär amphipathischen Penetratin, zeigten die niedrigste Aufnahme. Das primär amphipathische Pep-1 und das *stapled peptide* SAHM1 wurden am effizientesten internalisiert. Alle Peptide waren diffus im Cytosol und im Zellkern verteilt, waren aber auch in vesikulären Strukturen konzentriert. Obwohl die Nettoladung, α -helikale Struktur und Hydrophilie der sehr permeablen Peptide Pep-1 und SAHM1 ähnlich zu StAx-35R ist, unterschied sich seine zelluläre Aufnahme und Lokalisation deutlich. StAx-35R zeigte eine sehr geringe Internalisierung und eine vesikuläre Lokalisation. Zwar sind Nettoladung, Amphipathizität und Struktur wiederkehrende Elemente zellgängiger Peptide, jedoch scheinen Nuancen den Unterschied zwischen grundlegender und starker Zellgängigkeit auszumachen. Es wurde postuliert, dass die Modulation des amphipathischen Profils die Balance zwischen hydrophoben und elektrostatischen Wechselwirkungen mit der Membran – und somit auch den Aufnahmemechanismus des Peptides – verändern kann. Aus diesem Grund sollte die Sequenz des Peptides optimiert werden.

Da StAx-35R für eine hohe Zielaffinität optimiert ist, gab es wenig Potenzial für zusätzliche Variationen an der Kernsequenz. Lediglich Arginin ist an der Bindung zu β -Catenin unbeteiligt, jedoch notwendig für die Membraninteraktion. Somit wurde der Fokus auf die Modulation der Alkylkette von Arginin gelegt, mit dem Ziel ihren hydrophoben Charakter schrittweise zu erhöhen. Alle Arginine in StAx-35R wurden durch Arginin-Derivate mit veränderten Linker-Strukturen, namens Homo-Arginin (hR) und 4-Guanidino-Phenylalanin (fR), ersetzt. Um Hydrophobizität und Ladung des Peptides weiter zu mo-

dulieren, wurden die *N*-Termini aller drei Kernsequenzen modifiziert (Kapitel 3.3.1). Die Einführung von Fettsäuren sollte schrittweise die Hydrophobizität und damit die Affinität zu Membranen erhöhen. Hydrophile Modifikationen sollten die Ladungsverteilung des Peptides verändern. Insbesondere die Einführung einer Kernlokalisierungssequenz sollte einen primär amphipathischen Charakter wie in Pep-1 und SAHM1 erzeugen und die Wahrscheinlichkeit erhöhen, dass sich das Peptid im Zellkern aufhält. Ein Luciferase-Reportergen-Assay ergab, dass die Peptide der hR-Serie tendenziell ein höheres Potenzial zur Inhibition des Wnt/ β -Catenin Signalweges verfügen (Kapitel 3.3.3). Anschließend wurde die zelluläre Aufnahme sowie subzelluläre Lokalisation von *f*-StAx, *f*-StAx-p, *f*-StAx-h und *f*-NLS-StAx-h untersucht (Kapitel 3.3.5). Im Vergleich zu *f*-StAx verbesserten sich Zellgängigkeit und cytosolische Lokalisation der hR-substituierten Peptide. Zellen, die mit *f*-StAx-h inkubiert wurden, wiesen zwar immer noch in Vesikeln eingeschlossene Peptide auf, doch der Anteil an cytosolischer Fluoreszenz war gestiegen. *f*-NLS-StAx-h induzierte eine drastische Erhöhung der Internalisierung und Veränderung der zellulären Lokalisation. Das Peptid war nun im Cytosol, im Zellkern, aber auch perinukleär lokalisiert. Die Peptide der StAx-p Serie waren hauptsächlich in der Plasmamembran angereichert. Vermutlich erhöhte der pR-Baustein die Hydrophobizität und damit auch die Affinität zu Membranen so sehr, dass das Peptid nur zu einem geringen Anteil ins Cytosol gelangte.

2015 veröffentlichten Chu *et al.* eine Studie einer Bibliothek verschiedenster *stapled peptides* und kamen zu der Schlussfolgerung, dass der Makrozyklus selbst und eine positive Nettoladung die Schlüsseleigenschaften für die Zellpenetration seien¹⁰⁷. Daraufhin veröffentlichten Bird *et al.* die erste Studie, in der systematisch biophysikalische Parameter eines bekannten *stapled peptides* variiert wurden, um zu untersuchen, welche die Aufnahme von *stapled peptides* bestimmen⁷³. Sie fanden heraus, dass die Positionierung des Makrozyklus am Übergang vom hydrophoben zum hydrophilen Bereich, eine erhöhte Hydrophobizität, Helizität (61–86%) und ein pI im Bereich von 8,8-9,4 die Zellgängigkeit steuerten. Die Autoren schlussfolgerten zudem, dass im Gegensatz zu anderen Klassen von zellpenetrierenden Peptiden, wie polykationischen Peptiden, positive Ladung nicht zwingend erforderlich für die Aufnahme von *stapled peptides* sei. Trotz hohen systematischen Designs dieser Hochdurchsatzstudie weist sie den großen Nachteil auf, dass die Zellen Serum-frei inkubiert und anschließend fixiert wurden. Es ist jedoch bekannt, dass Fixierung zu

3 Ergebnisse und Diskussion

experimentellen Artefakten führt, da sie eine Neuverteilung von in Vesikeln eingeschlossenen oder membrangebundenen Peptiden in andere Kompartimente zur Folge hat⁹³. Im Gegensatz dazu wurde in dieser Arbeit die Aufnahme einer kleinen Bibliothek von StAx-Peptiden in lebenden Zellen untersucht und mit orthogonalen Methoden validiert. Hier zeigte sich, dass eine Erhöhung der Nettoladung am *N*-Terminus (KKKKK oder NLS) mit gleichzeitiger Erhöhung der Hydrophobizität in der Kernsequenz die Zellgängigkeit von StAx deutlich verbesserte. Dies widerspricht hingegen den von Bird *et al.* identifizierten Parametern. Eine Erhöhung der Ladung, somit auch des pI sowie der Hydrophilie, verbesserte die Zellgängigkeit signifikant. Im Gesamtkontext wird deutlich, dass die Frage, welche spezifischen Eigenschaften die Zellgängigkeit vermitteln, weiterhin ungeklärt bleibt. Die Verbesserung der Zellgängigkeit bedarf somit einer individuellen Abstimmung.

Da angenommen wurde, dass eine Verbesserung der Zellgängigkeit und Lokalisation die Effektivität des Peptides steigert, bildete die Validierung der Inhibition des Wnt/ β -Catenin Signalweges eine weitere Grundlage dieser Arbeit. Insbesondere im Darm kontrolliert der Wnt/ β -Catenin Signalweg die Erneuerung des Darmepithels und ist essentiell zur Aufrechterhaltung der Stammzellnische in den Lieberkühn-Krypten. Die durch Mutationen ausgelöste Fehlregulation von Proliferation und Migration führt zur Entwicklung dysplastischer Krypten und Adenomen. Durch Mutation weiterer Tumorsuppressorgene entwickeln sich daraus invasive Karzinome³¹⁰. Über 80% der kolorektalen Karzinome weisen APC-Mutationen auf und weitere 10% zeigen Mutationen in anderen Signalwegkomponenten (z.B. β -Catenin oder Axin)^{204,311,312}. Aus diesem Grund wurde der Kontext des Kolonkarzinoms als Grundlage für die Untersuchung der Effektivität ausgewählt. Zunächst wurde die Bindung von StAx-h an β -Catenin *in vitro* bestätigt und anschließend in einem komplexen Zellysate einer Darmkrebszelllinie nachgewiesen (Kapitel 3.3.2 und 3.4.1). In einem Proliferations-Assay wurden das Startpeptid *Ac*-StAx, *H₂N*-StAx-h, *NLS*-StAx-h und ihre jeweiligen Kontrollpeptide sowohl in zwei Wnt-abhängigen Kolonkarzinomzelllinien (DLD-1, SW-48 β Kolorektalkarzinom), als auch in drei Wnt-unabhängigen Zelllinien (U2OS Osteosarkom, U87 Glioblastom, MCF-7 Mammakarzinom) untersucht (Kapitel 3.4). *Ac*-StAx, *H₂N*-StAx-h sowie das Kontrollpeptid *H₂N*-StCo-h zeigten im untersuchten Zeitraum keine Reduktion der Proliferation. *NLS*-StAx-h, jedoch nicht *NLS*-StCo-h, inhibierte die Proliferation beider Darmkrebszelllinien. Für die Untersuchung der

Wundheilung wurde die DLD-1 Zelllinie als Wnt-abhängige und die MCF-7 Zelllinie als Wnt-unabhängige Zelllinie eingesetzt und nur das potenteste Peptid *NLS-StAx-h* zusammen mit seinem Kontrollpeptid *NLS-StCo-h* validiert (Kapitel 3.4.3). *NLS-StAx-h*, allerdings nicht *NLS-StCo-h*, verhinderte die Schließung der artifiziellen Wunde ähnlich dem Inhibitor Actinomycin. In MCF-7 Zellen war die Wundheilung durch *NLS-StAx-h* nicht beeinträchtigt. Anschließend wurde mittels qPCR die Transkription Wnt-abhängiger Zielgene unter Verwendung des potentesten Peptides *NLS-StAx-h* quantifiziert. Aus Lieberkühn-Krypten gewonnene Organoide fungierten hierbei als ein *ex vivo* Darmkrebsmodell. Durch Expression einer *N*-terminal verkürzten β -Catenin-Variante wurde der Signalweg aktiviert, was zur Entstehung von Hyperplasien führte, wie sie auch im kolorektalen Karzinom vorzufinden sind. Durch die Inhibition der β -Catenin/TCF Interaktion wurde eine Abnahme der mRNA-Produktion erwartet. Es konnte nachgewiesen werden, dass nach Inkubation mit *NLS-StAx-h* die Menge transkribierter mRNA bereits nach 2 h Inkubationszeit zurückging. Nach 6 h Inkubation war die mit Darmkrebs assoziierte abnormale Genexpression auf das Basallevel reduziert. In Organoiden, die mit *NLS-StCo-h* inkubiert wurden, blieben die Transkriptlevel der Zielgene auch über einen Inkubationszeitraum von 24 h unverändert.

Die Aussagekraft dieser Aktivitäts-bezogenen Experimente wird durch die Wahl geeigneter Kontrollen verstärkt: Die Verwendung von *StCo-h*-Peptiden reduzierte das Auftreten falsch positiver Ergebnisse, indem es unspezifische Toxizität, die beispielsweise durch die Kernmodifikation hR oder dem modifizierten *N*-Terminus hervorgerufen werden könnte, ausschließt. Artefakte durch mögliche Off-target-Effekte konnten durch die Wahl von Wnt-unabhängigen Zelllinien minimiert werden. Parallel zu den *StAx*-Peptiden wurde der Inhibitor XAV939 als Kontrolle im Proliferations-Assay eingesetzt. XAV939 stabilisiert den Axinlevel in der Zelle, um die Bindung von β -Catenin an den Zerstörungskomplex zu erhöhen. Es wurde berichtet, dass diese niedermolekulare Verbindung die Koloniebildung von DLD-1 Zellen bei einer Konzentration von 3,3 μM reduziert¹⁹⁸. In diesem experimentellen Aufbau war eine Reduktion der Proliferation mit XAV939 auch bei einer Konzentration von 10 μM nicht zu reproduzieren. Die Untersuchung von XAV939 sowie weiterer potentieller Inhibitoren des Signalweges basieren auf Experimenten, in denen Zellen in reduziertem Medium kultiviert wurden. Der Entzug von Serum erzeugt zellulären Stress und kann zur Folge haben, dass hungernde Zellen versuchen, vermehrt Nährstoffe aus ihrer Umgebung – und damit auch die im Medium

3 Ergebnisse und Diskussion

vorhandenen Verbindungen – aufzunehmen. Des Weiteren besteht die Möglichkeit, dass hydrophobe Verbindungen unspezifisch an Albumine aus dem Serum binden und die tatsächlich vorhandene Konzentration des Inhibitors abweicht. In dieser Arbeit wurden die Zellen jedoch möglichst nah an physiologischen Bedingungen – d.h. in Serum-haltigem Medium – kultiviert, da eine erhöhte zelluläre Aufnahme durch Aushungern der Zellen vermieden werden sollte. Diese Unterschiede im experimentellen Aufbau erklären somit das abweichende Verhalten des Inhibitors XAV939 und verdeutlichen gleichzeitig, dass StAx trotz stringenter Assay-Bedingungen die Effektivität eines etablierten Inhibitors übertrifft.

In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass Peptidliganden, die bereits eine hohe Zielaffinität aufweisen, mit kleinen Modifikationen zu permeablen Peptiden transformiert werden können. Im Wnt/ β -Catenin Signalweg ist *NLS-StAx-h* die erste peptidische Verbindung, die eine gute Verfügbarkeit mit einer effizienten Inhibition der β -Catenin/TCF-Wechselwirkung vereint. Bereits veröffentlichte niedermolekulare Verbindungen, die ähnlich wie StAx *Downstream*-Komponenten inhibieren, müssen in erhöhter Konzentration angewendet werden, um die Zellproliferation zu reduzieren (iCRT3: $75 \mu\text{M}^{212}$, iCRT5: $200 \mu\text{M}^{212}$, iCRT14: $50 \mu\text{M}^{212}$, ICG-001: $25 \mu\text{M}^{206}$ vs. *NLS-StAx-h*: $10 \mu\text{M}$). Damit übersteigt *NLS-StAx-h* die Potenz der bisher verfügbaren Inhibitoren und bekommt eine große Bedeutung für die zukünftige Untersuchung von Ansätzen, die auf den Wnt-Transaktivierungskomplex abzielen.

4 Zusammenfassung

4 Zusammenfassung

Protein-Protein-Interaktionen (PPIs) steuern auf allen Ebenen der zellulären Organisation grundlegende Prozesse und basieren häufig auf der Interaktion ausgedehnter Proteinoberflächen. Im Gegensatz zu niedermolekularen Verbindungen weisen Peptide gute Bindungseigenschaften für derartige Oberflächen auf. Aufgrund der Undurchlässigkeit biologischer Membranen für die meisten Peptide, gibt es bisher nur Peptid-basierte Therapeutika für extrazelluläre Zielproteine. Die Ableitung eines Konzeptes zur Verbesserung der Zellgängigkeit ist aufgrund der Komplexität der zellulären Importmechanismen eine sehr anspruchsvolle Aufgabe.

Das Ziel dieser Arbeit bestand darin, ein Konzept zur Verbesserung der Zellgängigkeit und damit auch der inhibitorischen Effizienz am Beispiel des PPI-Inhibitors StAx-35R zu entwickeln. In einem ersten Schritt wurde deshalb die Zellgängigkeit von StAx-35R im Vergleich zu bekannten CPPs untersucht. Durchflusszytometrie und Konfokalmikroskopie erlaubten Quantifizierung und Beschreibung der zellulären Lokalisation (Kapitel 3.1). Die hier untersuchten polykationischen und sekundär amphipathischen Peptide zeigten die niedrigste Aufnahme. Das primär amphipathische Pep-1 und das *stapled peptide* SAHM1 wurden am effizientesten internalisiert. Alle Peptide waren diffus im Cytosol und im Zellkern verteilt, aber zeigten auch vesikuläre Lokalisation. Obwohl StAx-35R strukturelle Gemeinsamkeit sowie ähnliche Nettoladung und Hydrophobizität zu den permeablen Peptiden Pep-1 und SAHM1 teilt, wies es den geringsten Import und kaum detektierbare cytosolische Lokalisation auf. Aus diesen Beobachtungen lassen sich keine allgemeinen Designprinzipien ableiten. Da StAx-35R bereits hinsichtlich der Einführung einer großen Anzahl an Argininresten optimiert ist, wurden die an der Bindung unbeteiligten Arginine zur schrittweisen Erhöhung der Hydrophobizität durch Homo-Arginin (hR, längerer Alkyl-Linker) und 4-Guanidino-Phenylalanin (pR, aromatischer Linker) ersetzt. Zusätzlich wurden die *N*-Termini aller drei Kernsequenzen mit Gruppen unterschiedlicher Hydrophobizität und Ladung modifiziert (Abbildung 40).

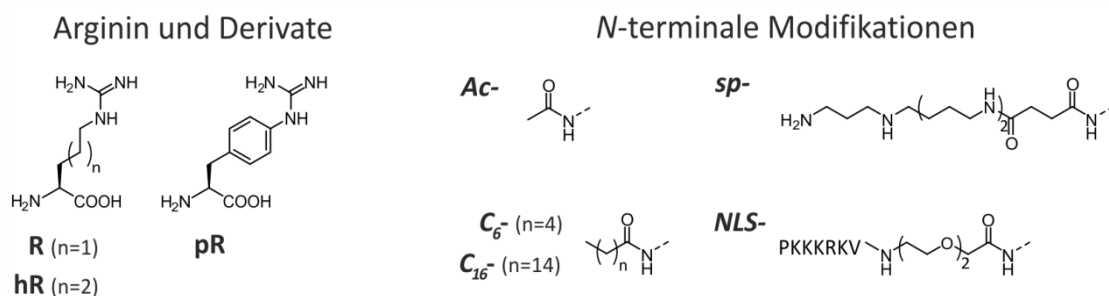


Abbildung 40: Struktur der Arginin-Derivate Homo-Arginin (hR) und 4-Guanidino-Phenylalanin (pR) sowie der *N*-terminalen Modifikationen. Ac = Acetyl, sp = Spermin, NLS = Kernlokalisierungssequenz.

Die Affinität der Kernsequenz-modifizierten Peptide zu β -Catenin wurde mit einem Fluoreszenzpolarisations-Assay bestimmt (Kapitel 3.3.2), der zeigt, dass sich die Variation der Argininreste geringfügig auf die Affinitäten zu β -Catenin auswirkt (K_D (*f*-StAx) = 106 ± 10 nM, K_D (*f*-StAx-h) = 123 ± 17 nM, K_D (*f*-StAx-p) = 66 ± 13 nM). Um die Einflüsse der Kern- und *N*-terminalen Modifikation auf das Potenzial zur Inhibition des Wnt/ β -Catenin Signalweges zu evaluieren, wurde die TCF/LEF-abhängige Expression einer Luciferase mit einem Reporter-gen-Assay untersucht (Kapitel 3.3.3). In der gesamten hR-Serie ergaben sich tendenziell verringerte IC_{50} -Werte, insbesondere für H_2N -StAx-h und *NLS*-StAx-h. Mittels Durchflusscytometrie und Konfokalmikroskopie wurden die zelluläre Aufnahme sowie subzelluläre Lokalisation von *f*-StAx, *f*-StAx-p, *f*-StAx-h und *f*-*NLS*-StAx-h untersucht (Kapitel 3.3.5). Im Vergleich zu *f*-StAx verbesserten sich Zellgängigkeit und cytosolische Lokalisation der hR-substituierten Peptide (wenn auch für *f*-StAx-h nur in einem geringen Maß). *f*-*NLS*-StAx-h wies eine um den Faktor sieben erhöhte Internalisierung und eine drastisch veränderte zelluläre Lokalisation gegenüber *f*-StAx auf. Das Peptid war nun im Cytosol, im Zellkern, aber auch perinukleär lokalisiert. Peptide der StAx-p Serie waren aufgrund der Hydrophobizität des pR-Bausteins hauptsächlich in der Plasmamembran angereichert.

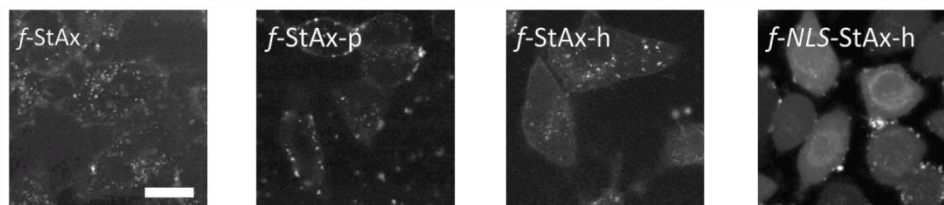


Abbildung 41: Zelluläre Lokalisation von StAx-Peptiden. HeLa-Zellen wurden 90 min mit $5 \mu\text{M}$ *f*-Peptid inkubiert. Maßstabsbalken = $20 \mu\text{m}$. Details können Kapitel 3.3 entnommen werden.

Um das Potenzial zur Bindung von β -Catenin in einem komplexen Zellsystem zu analysieren, wurde in einem Pull-Down-Experiment nachgewiesen, dass β -Catenin durch StAx-h am deutlichsten angereichert wird (Kapitel 3.4.1). Anschließend wurden H_2N -StAx-h, *NLS*-StAx-h und deren Kontrollpeptide ($K_D \approx 10 \mu\text{M}$) im Kontext des kolorektalen Karzinoms evaluiert. Die β -Catenin/TCF Interaktion aktiviert die Transkription Wnt-abhängiger Zielgene, die in Proliferation und Migration involviert sind. In einem Proliferations-Assay wurden sowohl zwei Wnt-abhängige Kolonkarzinomzelllinien (DLD-1, SW-480), als auch drei Wnt-unabhängige Zelllinien (U2OS Osteosarkom, U87 Glioblastom, MCF-7 Mammakarzinom) untersucht (Kapitel 3.4.2). *NLS*-StAx-h, jedoch nicht *NLS*-StCo-h, inhibierte die Proliferation beider

4 Zusammenfassung

Darmkrebszelllinien nach 72 h. Das Ausgangspeptid *Ac-StAx*, *H₂N-StAx-h* sowie das Kontrollpeptid *H₂N-StCo-h* reduzierten die Proliferation im untersuchten Zeitraum nur geringfügig. Für die Untersuchung der Zellmigration wurden DLD-1 und MCF-7 Zellen ausgewählt und mit *NLS-StAx-h* und *NLS-StCo-h* inkubiert (Kapitel 3.4.3). *NLS-StAx-h*, jedoch nicht *NLS-StCo-h*, verhinderte die Schließung der artifiziellen Wunde ähnlich dem Migrationsinhibitor Actinomycin. In MCF-7 Zellen war die Wundheilung durch *NLS-StAx-h* nicht beeinträchtigt. Anschließend wurde mittels qPCR die Veränderung der Transkription Wnt-abhängiger Zielgene quantifiziert. In aus Lieberkühn-Krypten gewonnenen Organoiden wurden durch die Expression einer verkürzten β -Catenin-Variante Darmkrebs-ähnliche Hyperplasien erzeugt. Es wurde nachgewiesen, dass sich bereits nach 2 h Inkubation mit *NLS-StAx-h* die Menge transkribierter mRNA verringerte. Nach 6 h Inkubation war die mit Darmkrebs assoziierte abnormale Genexpression auf das Basallevel reduziert. Im Gegensatz dazu blieb die Menge an mRNA durch das Kontrollpeptid *NLS-StCo-h* unverändert.

Um zu überprüfen, ob die Zellgängigkeit und damit verknüpfte hohe Aktivität von *NLS-StAx-h* in zellulären Assays durch die Ladung oder die Kernlokalisierungssequenz selbst zustande kommt, wurde das Peptid *KKKKK-StAx-h* als Ladungsanalogon zu *NLS-StAx-h* synthetisiert. *KKKKK-StAx-h* zeigte vergleichbar zu *NLS-StAx-h* eine hohe Zellgängigkeit und inhibitorische Aktivität. Somit wurde deutlich, dass eine Erhöhung der Nettoladung bei gleichzeitiger Erniedrigung der Hydrophilie der Kernsequenz die Zellgängigkeit von *StAx* positiv beeinflusste.

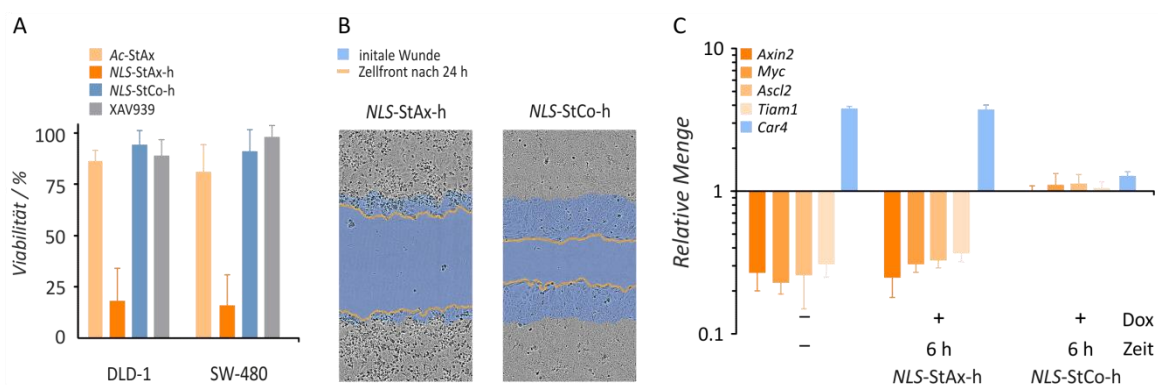


Abbildung 42: Effekt von 10 μ M *NLS-StAx-h* auf (A) die Proliferation von DLD-1 und SW-480 Zellen, (B) die Migration von DLD-1 und (C) die Genexpression von Wnt-Zielgenen in Krypt-Organoiden. Details zu den Experimenten sind in Kapitel 3.4 zu finden.

In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass Peptidliganden mit potenter Inhibition einer Protein-Protein-Interaktion, aber geringer Zellgängigkeit, zu permeablen Peptiden mit

hoher Effizienz in zellbasierten Systemen transformiert werden können. Für die Aufnahme müssen wichtige Kriterien wie Struktur, Ladung, Ladungsverteilung, und Amphipathizität individuell angepasst werden. Obwohl die Optimierung der Zellgängigkeit ein aufwendiger Prozess ist, kann dieser Mehraufwand – wie hier gezeigt – insbesondere für die Inhibition anspruchsvoller Zielproteine, bei denen eine Adressierung mit niedermolekularen Substanzen versagt, lohnenswert sein. *NLS-StAx-h* ist die erste Verbindung, die eine gute zelluläre Aufnahme mit einer effizienten Hemmung der β -Catenin/TCF-Wechselwirkung kombiniert und damit die Potenz der bisher verfügbaren Inhibitoren übersteigt. Angesichts der inhärenten Schwierigkeiten und ungeklärten Mechanismen, die mit der Zellgängigkeit von Peptiden verbunden sind, unterstreichen diese Ergebnisse die Bedeutung der gewählten Optimierungsstrategie sowie die Bedeutung von *NLS-StAx-h* für die zukünftige Untersuchung von Inhibitionsansätzen, die auf den Transaktivierungskomplex abzielen.

5 Experimenteller Teil

5.1 Allgemeine Verbrauchsmaterialien und Chemikalien

In dieser Arbeit wurden die in Tabelle 7 aufgelisteten Verbrauchsmaterialien verwendet. Spezielle Materialien sind im jeweiligen Experiment dokumentiert.

Tabelle 7: Liste der verwendeten Verbrauchsmaterialien.

Bezeichnung	Hersteller
Filter-Pipettenspitzen (10, 200, 1250 μ L)	Sarstedt
Flaschenaufsatz-Filtersystem Nalgene [®]	VWR
Kanülen Sterican [®]	Braun
Kulturröhrchen (steril, 13 mL, 100 x 16 mm)	Sarstedt
Low-Binding Reaktionsgefäße	Biozym
PCR-Tubes (8er Kette)	Sarstedt
Pipettenspitzen (10, 200, 1250 μ L)	Sarstedt
Reaktionsgefäße	Sarstedt, Eppendorf
Röhrchen (15, 50 mL)	Sarstedt
Serologische Pipetten (5, 10, 25 mL)	Sarstedt
Spritzenfilter Filtropur S (0,2, 0,45 μ m)	Sarstedt

Alle Standardchemikalien und Lösungsmittel wurden von AnalaR NORMAPUR VWR, Acros Organics, AppliChem, Carl Roth, Fischer Chemicals, Iris Biotech, MerckMillipore oder Sigma Aldrich bezogen und ohne weitere Aufreinigung eingesetzt (Tabelle 8). Spezielle Chemikalien und Reagenzien sind im jeweiligen Experiment aufgeführt.

Tabelle 8: Liste der verwendeten Chemikalien.

Bezeichnung	Hersteller
Acetonitril (ACN)	Iris Biotech, VWR
Acrylamid 4K Lösung (30%) 37,5:1	AppliChem
Ammoniumpersulfat (APS)	Santa Cruz Biotechnology
β -Mercaptoethanol	Serva Electrophoresis
Dichlorethan (DCE)	Sigma Aldrich
Dichlormethan (DCM)	Iris Biotech, Fischer Chemicals
Diethylether	GPR Rectapur VWR
Diisopropylethylamin (DIPEA)	Roth

5.1 Allgemeine Verbrauchsmaterialien und Chemikalien

Bezeichnung	Hersteller
Dimethylformamid (DMF)	Iris Biotech
Dimethylsulfoxid (DMSO)	PAN Biotech
Dithiothreitol (DTT)	Serva Electrophoresis
Essigsäureanhydrid (Ac ₂ O)	Sigma Aldrich
Ethanol (absolut)	Sigma Aldrich
Fluorescein Isothiocyanat Isomer I	Sigma Aldrich
Glutathion (reduziert)	MerckMillipore
Glycerol	GERBU
Glycin	Roth
Grubbs 1 st Generation Catalyst	Sigma Aldrich
2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl)-ethansulfonsäure (HEPES)	Carl Roth
Imidazol	Carl Roth
Isopropanol	Fischer Chemicals
N-Methyl-2-pyrrolidon	Iris Biotech, Carl Roth
Natriumdodecylsulfat (SDS)	GERBU
Piperidin	Carl Roth
Phenylmethylsulfonylfluorid (PMSF)	Serva Electrophoresis
Tetramethylethylenediamine (TEMED)	Carl Roth
N-(Tri(hydroxymethyl)methyl)glycin (Tricin)	Sigma Aldrich
Trifluoressigsäure (TFA)	Carl Roth
Triisopropylsilan	Sigma
Tris(hydroxymethyl)-aminomethan (Tris)	Carl Roth
Tris(2-carboxyethyl)phosphin (TCEP)	Serva Electrophoresis
Tween® 20	Serva Electrophoresis

5.2 Allgemeine Geräte

In der vorliegenden Arbeit wurden die in Tabelle 9 aufgelisteten allgemeinen Laborgeräte benutzt. Spezielle Laborgeräte sind im jeweiligen Experiment aufgeführt.

Tabelle 9: Liste der verwendeten Laborgeräte.

Geräte und Zubehör	Hersteller
Absaugsystem VACUSAFE comfort	INTEGRA Bioscience
Autoklav VE-150	Systec
Brutschrank	BINDER
CO ₂ -Incubator 370 Series Steri-Cycle	ThermoFisher Scientific
Heizblock Analog	VWR
Magnetrührer RCT classic	IKA
Mikrowelle	Severin
Mixer Vortex-Genie 2	Scientific Industries
pH-Meter inoLab®	WTW
pH Elektrode SenTix® 81 Plus	WTW
Pipetten Reference	Eppendorf
0,5-10 µL	
10-100 µL	
100-1000 µL	
Pipetten Research plus	Eppendorf
0,1-2,5 µL	
0,5-10 µL	
2-20 µL	
20-200 µL	
100-1000 µL	
Pipettierhilfe EXPRESS™ Pipet-Aid®	BD Biosciences
Schüttelinkubatoren	
Innova 42	New Brunswick Scientific
Innova 4430	New Brunswick Scientific
Sicherheitswerkbank Herasafe HS12	Hereaus Instruments
Thermomixer Comfort	Eppendorf

Geräte und Zubehör	Hersteller
Tischzentrifugen	
5415R	Eppendorf
5804R	Eppendorf
MiniSpin®	Eppendorf
Multifuge3 S-R	Hereaus
Universal 320R	Hettich
Waage LA230P	Sartorius
Wasserbad SW23	Julabo
Wassersystem Milli-Q® Q-POD™	MerckMillipore
Zentrifuge Avanti J-25	Beckman Coulter
JA-25.50 Rotor	
JLA 8.1000	

5.3 Analytische Methoden

5.3.1 Peptidanalytik

Analytische HPLC

Um Reinheit und Identität der hergestellten Peptide zu überprüfen, wurden diese mittels analytischer Hochleistungsflüssigkeitschromatographie (HPLC) und gekoppelter Elektrospray Ionisation (ESI)-Massenspektrometrie analysiert (HPLC/ESI-MS, 1260 Infinity, 6120 Quadropole, Agilent Technologies). Die Proben wurden auf einer Umkehrphasensäule (Zorbax Eclipse XDB-C18, 4,6 x 150 mm, Partikelgröße 5 µm; Agilent Technologies) und einer Flussrate von 1 mL·min⁻¹ getrennt. Die mobile Phase setzte sich aus Laufmittel A (ddH₂O mit 0,1% TFA) und Laufmittel B (ACN mit 0,1% TFA) zusammen. Signale wurden bei Wellenlängen von $\lambda = 280$ nm und $\lambda = 210$ nm detektiert.

Zur Analyse wurden folgende Gradienten verwendet:

Gradient 1: 10-50% B in 20 min

Gradient 2: 15-45% B in 20 min

Gradient 3: 20-60% B in 20 min

Gradient 4: 22-32% B in 20 min

Gradient 5: 40-60% B in 20 min

Gradient 6: 25-35% B in 20 min

Gradient 7: 25-45% B in 20 min

Gradient 8: 27-30% B in 20 min

Gradient 9: 30-35% B in 20 min

Gradient 10: 30-37% B in 20 min

Gradient 11: 30-40% B in 20 min

Gradient 12: 30-45% B in 20 min

Gradient 13: 5-95% B in 10 min

Gradient 14: 45-57% B in 20 min

Eine Zusammenfassung der Analytik kann Tabelle 43 und eine ausführliche Auflistung kann Kapitel 8.1 entnommen werden.

Hochaufgelöste Massenspektrometrie

Einige Peptide wurden mittels hochaufgelöster Massenspektrometrie (HRMS) näher charakterisiert. Die Messungen wurden an von Christiane Heitbrink, Fakultät für Chemie und Chemische Biologie, Technische Universität Dortmund, auf einem Accela HPLC System, LTQ Orbitrap, ThermoFisher Scientific) durchgeführt. Die Proben wurden in 100 µL eines Gemisches aus ACN/ddH₂O (5-30% ACN) mit einer Konzentration von 1 mg·mL⁻¹ gelöst. Die Analyse der Proben erfolgte isokratisch (50% B) mit einer Flussrate von 250 µL·min⁻¹. Eine Zusammenfassung der Analytik kann Tabelle 43 sowie eine ausführliche Auflistung kann dem Anhang entnommen werden (Kapitel 8.1).

Konzentrationsbestimmung von Peptiden

Die Ausbeuten der Synthese wurden anhand der Absorption der aromatischen Aminosäuren bei 280 nm photometrisch quantifiziert. Die molaren Extinktionskoeffizienten ϵ wurden mit dem ProtParam tool berechnet³¹³. FITC weist ein charakteristisches Absorptionsmaximum bei 495 nm auf und diente zur Quantifizierung Fluorophor-markierter Peptide. Sie wurden in einem 0,1 M Natriumphosphat-Puffer pH8,5 gelöst und in einer Quartzküvette (Schichtdicke $d = 1$ cm) in einem UV/VIS-Spektrophotometer (V-550, Jasco) analysiert. Die Konzentration wurde unter Beachtung des Verdünnungsfaktors mithilfe des Lambert Beer'schen Gesetzes berechnet (Formel 1).

$$A = \frac{I}{I_0} = \epsilon \cdot c \cdot d$$

Formel 1: Lambert Beer'sches Gesetz. A = Absorption, I = Lichtintensität nach Probendurchgang, I_0 = Lichtintensität vor Probendurchgang, ϵ = molarer Extinktionskoeffizient, c = Konzentration, d = Schichtdicke der Küvette, $\epsilon(\text{FITC}) = 77.000 \text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$, $\epsilon(\text{StAx}, \text{StAx-h}) = 11.000 \text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$, $\epsilon(\text{StCo}, \text{StCo-h}) = 5.500 \text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$.

Proteolytische Stabilität von Peptiden

Aus einer 10 mM DMSO-Stammlösung FITC-markierter Peptide wurden in 210 µL DMEM (4,5 g·L⁻¹ Glukose, Natriumpyruvat, 0,5 g·L⁻¹ NaHCO₃, 2 mM stabiles Glutamin, 25 mM HEPES) supplementiert mit 10% fötalem Kälberserum eine 50 µM Lösung hergestellt (finale DMSO-Konzentration 0,5%). Des Weiteren wurde eine DMSO-Kontrollreaktion (finale DMSO-Konzentration 0,5%) angesetzt. Direkt nach Ansetzen der Reaktion wurden 50 µL der Lösung entnommen, auf Eis gestellt und mit 100 µL eines 50%

5 Experimenteller Teil

ACN/H₂O-Gemisches und 3% TFA versetzt. Die Proben wurden zentrifugiert (15 min, 16.000 g, 4°C) und der Überstand vorsichtig entnommen. Davon wurden jeweils dreimal 45 µL auf die HPLC-ESI/MS injiziert und bei einem Gradienten 10-60% ACN mit 0,1% TFA und einer Wellenlänge von $\lambda = 440$ nm analysiert. Die restlichen Reaktionslösungen wurden bei 37°C inkubiert und nach 24 und 48 h Proben wie oben beschrieben entnommen und analysiert.

5.3.2 Nukleinsäureanalytik

Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren

Die Nukleinsäurekonzentration wurde anhand des charakteristischen Absorptionsmaximums der aromatischen Nukleobasen bei 260 nm photometrisch bestimmt. Eine Lösung mit einer Absorption von 1 weist eine Konzentration von 50 µg·mL⁻¹ DNA bzw. 40 µg·mL⁻¹ RNA auf. Die Reinheit einer Nukleinsäure-Lösung wurde über die Quotienten A_{260}/A_{280} und A_{260}/A_{230} mithilfe der UV-Spektroskopie bestimmt. Eine Probe, deren $A_{260}/A_{280} = 1,8$ (DNA) bzw. 2,0 (RNA) und $A_{260}/A_{230} = 2,0-2,2$ liegt, wurde als rein betrachtet. Abweichende Werte weisen auf Kontaminationen durch Proteine (Absorptionsmaximum bei 280 nm), aber auch durch Salze, Ethanol, Guanidinthiocyanat oder Phenol (Absorption bei 230 nm) hin, welche in diesem Bereich stark absorbieren. Die Konzentrationsbestimmung erfolgte mit einem UV/VIS-Spektrophotometer (NanoDrop 2000c, peqlab). Das eingesetzte Probenvolumen betrug 1,5 µL.

Agarose-Gelelektrophorese

Die Agarose-Gelelektrophorese ist eine elektrophoretische Methode, mit der sich Nukleinsäuren nach ihrer Größe auftrennen und analysieren lassen. Für Nukleinsäuren mit einer Größe zwischen 500-10.000 bp wurden 1%ige Agarose-Gele hergestellt, während für kleinere Fragmente (20-2000 bp) 2%ige Agarose-Gele verwendet wurden. 1 g bzw. 2 g UltraPure™ Agarose (ThermoFisher Scientific) wurden in 100 mL 1X TAE Puffer aufgekocht bis die Lösung klar wurde. Für Agarose-Gele zur Analyse von RNA wurde dem Gel zusätzlich 1% Natriumhypochlorid (v/v) hinzugegeben. Der DNA-Interkalator GelRed™ Nucleic Acid Gel Stain (Biotium) wurde in 10.000-facher Verdünnung hinzugegeben. Das Gel wurde in einem horizontalen Elektrophorese-Apparat (Bio-Rad) gegossen und nach vollständiger Aushärtung mit 1X TAE Puffer überschichtet.

Tabelle 10: TAE-Puffer für die Agarose-Gelelektrophorese.

50X TAE Puffer	
TRIS	242 g
Borsäure	-
Essigsäure	57,1 mL
0,5 M Na ₂ EDTA pH8	100 mL
ddH ₂ O	ad 1 L

Zur Analyse von PCR-Produkten wurden 1/10 des Reaktionsansatzes verwendet. Für Plasmide oder Restriktionsverdau wurden 500 ng Probe untersucht. Für die präparative Aufbereitung von DNA-Fragmenten wurden 2-5 µg DNA aufgetragen. Die Proben wurden im Verhältnis 1:6 mit 6X DNA Loading Dye (ThermoFisher Scientific) versetzt. Als Referenzmarker dienten 5 µL GeneRuler™ 1 kb DNA Ladder Plus (ThermoFisher Scientific). Zur Analyse der RNA-Integrität wurden 400 ng RNA im Verhältnis 1:1 mit 2X RNA Loading Dye (ThermoFisher Scientific) versetzt. Als Referenz wurden 5 µL des Markers RiboRuler High Range RNA Ladder (ThermoFisher Scientific) verwendet. Die Auftrennung erfolgte für 50 min bei 80 V. Analyse und Dokumentation der Gele erfolgte mittels Dokumentationssystem AlphaImager® FluorChem™ (Alpha Innotech).

5.3.3 Proteinanalytik

Konzentrationsbestimmung von Proteinen

Die Bestimmung der Proteinkonzentration ist aufgrund charakteristischer Absorptionsmaxima der Aminosäuren Tyr, Trp und Cys bei 280 nm photometrisch möglich. Die Konzentration von Proteinen wurde mit Hilfe des Lambert Beer'schen Gesetzes (Formel 1) berechnet. Der molare Extinktionskoeffizient wurde mit dem ProtParam tool berechnet³¹³. Die Konzentrationsbestimmung von Proteinen erfolgte mit dem NanoDrop 2000c Spectrometer (peqlab). Das eingesetzte Probenvolumen betrug 1,5 µL.

5 Experimenteller Teil

Tabelle 11: Extinktionskoeffizienten und Molekulargewichte exprimierter Proteine.

Konstrukt	Extinktionskoeffizient / $M^{-1}\cdot cm^{-1}$	Molekulargewicht / kDa
β -Catenin-His ₆ aus pET-28a	63.830	87,5
β -Catenin-His ₆ aus pETM-40	63.830	86,7
β -Catenin aus pGEX	63.830	86,5
β -Catenin134-665 aus pGEX	29.910	58,3

Konzentrationsbestimmung von Proteinen nach Bradford

Der Bradford-Assay ist eine kolorimetrische Methode zur Bestimmung der Proteinkonzentration und basiert auf einer Farbveränderung des Farbstoffes Coomassie Brilliant Blau G-250. Dieser Farbstoff bildet mit basischen Aminosäureseitenketten Komplexe, wodurch der Farbstoff in seiner blauen Sulfonatform stabilisiert wird und sich sein Absorptionsmaximum zu 595 nm verschiebt. Die Zunahme der Absorption ist proportional zur Menge des gebundenen Farbstoffes und zur Konzentration des vorliegenden Proteins.

Zur Erstellung einer Kalibrierkurve wurde eine BSA-Lösung (Pierce™ Bovine Serum Albumin Standard, ThermoFisher Scientific) verwendet. Aus der BSA-Lösung wurde eine Verdünnungsreihe im Verhältnis 1:1 in ddH₂O hergestellt (0,063-1 mg·ml⁻¹). Das 5X Bradford Reagenz (Serva Electrophoresis) wurde in ddH₂O 5-fach verdünnt. 1000 μ L des Bradford-Reagenz wurden mit 20 μ L ddH₂O, des Referenzproteins oder der zu bestimmenden Probe versetzt, gemischt, 5 min bei Raumtemperatur inkubiert und bei einer Wellenlänge von 595 nm im NanoDrop 2000c Spectrometer (peqlab) gemessen. Die erhaltenen Absorptionswerte der Verdünnungsreihe des Standardproteins wurden gegen die Konzentration aufgetragen, und aus der durch linearen Regression erhaltenen Geradengleichung die Konzentration der unbekannt Probe bestimmt.

Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamid-Gelelektrophorese – Tris/Glycin

Die Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (*sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis*, SDS-PAGE) ist eine elektrophoretische Methode, mit der sich Proteine nach ihrer Größe bzw. relativen Molekülmasse auftrennen und analysieren lassen. Zur Auftrennung von Proteinen mit einem Molekulargewicht >50 kDa wurden diskontinuierliche Tris-Glycin SDS-PAGE durchgeführt. Verwendete Puffer- und Gelzusammensetzung sind Tabelle 12, Tabelle 13 und Tabelle 14 zu entnehmen.

Tabelle 12: Zusammensetzung des Proben- und des Laufpuffers für SDS-PAGE.

5X SDS-Probenpuffer		10X SDS-Laufpuffer	
TRIS pH6.8	0,25 M	TRIS	250 mM
SDS-	10% (w/v)	Glycin	2 M
β -Mercaptoethanol	25% (v/v)	SDS	1% (w/v)
Glycerin	50% (v/v)		
Bromphenolblau	1% (v/v)		

Tabelle 13: Pipettierschema zur Herstellung von Tris-Glycin SDS-Gelen.

	Sammelgel 5%	Trenngel 10%	Trenngel 12%	Trenngel 15%
H ₂ O	0,68 mL	1,9 mL	1,6 mL	1,1 mL
30% Acryl-bisacrylamid	0,17 mL	1,7 mL	2,0 mL	2,5 mL
1.5 M TRIS pH8.8	0,13 mL	1,3 mL	1,3 mL	1,3 mL
10% SDS-	0.01 mL	0.05 mL	0.05 mL	0.05 mL
10% APS	0.01 mL	0.05 mL	0.05 mL	0.05 mL
TEMED	0.001 mL	0.002 mL	0.002 mL	0.002 mL

Tabelle 14: Zusammensetzung der Coomassie-Färbe- und Entfärbelösung.

	Färbelösung	Entfärbelösung
Coomassie Brilliant Blue G 250	2.5 g	-
Ethanol	0.45 L	0.45 L
Essigsäure	0.1 L	0.1 L
ddH ₂ O	ad 1 L	ad 1 L

Die zu analysierenden Proben wurden mit 5X SDS-Probenpuffer im Verhältnis 1:5 verdünnt, für 10 min bei 95°C im Heizblock denaturiert und anschließend auf das Gel aufgetragen. Pro Geltasche wurde ein maximales Volumen von 20 μ L verwendet. Als Referenz wurden 5 μ L des Markers PageRuler™ Plus Prestained Protein Ladder (ThermoFisher Scientific) verwendet. Die elektrophoretische Auftrennung erfolgte in 1X SDS-Laufpuffer bei einer Spannung von 180 V. Um die Proteine sichtbar zu machen, wurde das Gel mit Coomassie-Färbelösung aufgekocht und für 30 min angefärbt. Die

5 Experimenteller Teil

Entfärbung des Gels erfolgte durch Aufkochen in Entfärbelösung. Die Dokumentation erfolgte mit einem Flachbettscanner (Perfection 2400 Photo, Epson).

Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamid-Gelelektrophorese – Tris/Tricin

Zur Auftrennung von Proteinen mit einem Molekulargewicht <50 kDa wurde die diskontinuierliche Tris-Tricin SDS-PAGE durchgeführt. Verwendete Puffer- und Gelzusammensetzung sind Tabelle 15 und Tabelle 16 zu entnehmen.

Tabelle 15: Zusammensetzung der Gel- und Laufpuffer für Tris-Tricin SDS-PAGE.

	10X Anodenpuffer	10X Kathodenpuffer	Gelpuffer
TRIS	2 M pH8,8	1 M	3 M pH8,5
Tricin	-	1 M	-
SDS	-	1% (w/v)	0.3% (w/v)

Tabelle 16: Pipettierschema zur Herstellung von Tris-Tricin SDS-Gelen.

	Sammelgel 5%	Trenngel 10%	Trenngel 12%	Trenngel 15%
H ₂ O	0,70 mL	3,90 mL	3,20 mL	2,20 mL
30% Acryl-bisacrylamid	0,17 mL	3,20 mL	3,90 mL	4,90 mL
Gelpuffer	0,13 mL	2,50 mL	2,50 mL	2,50 mL
10% APS	0,01 mL	0,10 mL	0,10 mL	0,10 mL
TEMED	0.001 mL	0,01 mL	0,01 mL	0,01 mL

Die zu analysierenden Proben wurden mit 5X SDS-Probenpuffer im Verhältnis 1:5 verdünnt, für 10 min bei 95°C im Heizblock denaturiert und anschließend auf ein Polyacrylamid-Gel aufgetragen. Pro Geltasche wurde ein maximales Volumen von 20 verwendet. Als Referenz wurden 5 µL des Markers PageRuler™ Plus Prestained Protein Ladder (ThermoFisher Scientific) verwendet. Die elektrophoretische Auftrennung erfolgte in 1X Anoden- und Kathodenpuffer bei einer Spannung von 180 V. Um die Proteine sichtbar zu machen, wurde das Gel mit Coomassie-Färbelösung aufgekocht und für 30 min angefärbt. Die Entfärbung des Gels erfolgte durch Aufkochen in Entfärbelösung. Die Dokumentation erfolgte mit einem Flachbettscanner (Perfection 2400 Photo, Epson).

Western Blot

Western Blot ist eine analytische Methode zum Nachweis eines Proteins in einer Probe unter Verwendung von Antikörpern, die spezifisch das gesuchte Protein erkennen. Im ersten Schritt wurden die zu untersuchenden Proben elektrophoretisch mittels SDS-PAGE getrennt (Kapitel 5.3.3). Zum Nachweis heterolog in *E.coli* exprimierter Proteine, wurden ca. 1-3 µg des Proteins verwendet. Für den Nachweis eines Proteins aus Zelllysaten, wurden 20-40 µg Gesamtprotein verwendet. Alle hier verwendeten Puffer sind Tabelle 17 zu entnehmen.

Tabelle 17: Zusammensetzung der Stammlösungen für Western Blot.

	Transferpuffer	TBS-Puffer	TBST-Puffer	Blockierungspuffer
Tris	25 mM, pH8,3	50 mM, pH7,8	50 mM, pH7,8	50 mM, pH7,8
Glycin	192 mM	-	-	-
Methanol	20% (v/v)	-	-	-
NaCl	-	150 mM	150 mM	150 mM
MgCl ₂	-	1 mM	1 mM	1 mM
Tween [®] 20	-	-	0,2% (v/v)	-
Milchpulver	-	-	-	5% (w/v)

Zur Übertragung der Proteine wurde das sogenannte *Semidry*-Verfahren verwendet. Dazu wurde eine Nitrocellulose-Membran (BA85, Porengröße 0,45 µM, Protran) und 4 Whatman[®]-Filter sowie das Gel in Transferpuffer äquilibriert. Für den Transfer wurden 2 Whatman[®]-Filter, die Membran und 2 Whatman[®]-Filter luftblasenfrei in eine *Semidry*-Blot-Kammer gelegt (Trans-Blot[®] SD semi-dry transfer cell, BIO-RAD) und für 30 min eine Stromstärke von 180 mA angelegt. Die Membran wurde für 1 h bei Raumtemperatur in Blockierungspuffer auf einem Plattformschüttler (Unimax 1010, Heidolph Instruments) inkubiert, gefolgt von einem Waschschrift (5 min, leichtes schütteln, Raumtemperatur). Die zum Nachweis und Detektion verwendeten primären und sekundären Antikörper sowie die verwendeten Verdünnungen, sind in Tabelle 18 aufgeführt. Alle Antikörper wurden in Blockierungspuffer verdünnt.

5 Experimenteller Teil

Tabelle 18: Mono- und polyklonale Antikörper.

Antikörper	Wirtsart	Verdünnung	Hersteller
Anti-His ₆ -Tag	Maus monoklonal [3H2201]	1:500	Abcam
Anti-APC	Kaninchen polyklonal	1:1000	CST
Anti-Axin1	Kaninchen monoklonal [C95H11]	1:1000	CST
Anti-Axin2	Kaninchen monoklonal [76G6]	1:1000	CST
Anti-β-Catenin	Maus monoklonal [9G10]	0.5 µg·mL ⁻¹	Nanotool
Anti-Dvl	Kaninchen monoklonal [30D2]	1:1000	CST
Anti-E-Cadherin	Kaninchen monoklonal [24E10]	1:1000	CST
Anti-GSK-3β	Kaninchen monoklonal [D5C5Z]	1:1000	CST
Anti-LEF1	Kaninchen monoklonal [C18A7]	1:1000	CST
Anti-LRP6	Kaninchen monoklonal [339TS]	1:1000	CST
Anti-RPL13A	Kaninchen polyklonal	1:1000	CST
Anti-TCF7L2	Maus monoklonal [3A4]	1:500	Novusbio
Anti-TCF7L2	Kaninchen polyklonal	0.5 µg·mL ⁻¹	Novusbio
Anti-mouse IgG, AP-linked		1:1000-1:3000	CST
Anti-mouse IgG, AP-linked		1:1000-1:3000	CST

Die Auftragung der primären Antikörper erfolgte entweder für 1 h bei Raumtemperatur oder über Nacht bei 4°C. Die Membran wurde dreimal in TBST-Puffer gewaschen. Die sekundären Antikörper wurden für 1 h bei Raumtemperatur und leichtem schütteln inkubiert. Die abschließenden Waschschrte beinhalteten dreimaliges Waschen in TBST- und einmal in TBS-Puffer. Die Detektion erfolgte über eine Farbreaktion, die durch die Alkalische Phosphatase katalysiert wird, welche an den sekundären Antikörper gekuppelt ist. Durch Zugabe von 1-3 mL BCIP[®]/NBT-Lösung (Calbiochem) auf die Membran und Inkubation unter Lichtausschluss wurden die Proteinbanden sichtbar gemacht. Die Dokumentation erfolgte mit dem Flachbettscanner (Perfection 2400 Photo, Epson).

Analytische Größenausschlusschromatographie

In der vorliegenden Arbeit wurde die analytische Größenausschlusschromatographie sowohl zur Bestimmung der Reinheit, als auch zur Untersuchung der Oligomerisierung von β-Catenin verwendet. Zur Kalibrierung wurden Referenzproteine des Gel Filtration HMW Calibration Kit (GE Healthcare) benutzt (Tabelle 19).

Tabelle 19: Referenzproteine zur Kalibrierung.

Protein	M / g·mol⁻¹	log M	Elutionsvolumen / mL	K
Ovalbumin	44,000	4,64	15,6	0,46
Conalbumin	75,000	4,88	14,6	0,39
Aldolase	158,000	5,20	13,5	0,32
Ferritin	440,000	5,64	11,5	0,19
Blue Dextran	2,000,000	6,30	8,6	0

Mit Hilfe der Referenzproteine wurde eine Gerade erstellt, welche die Berechnung des Molekulargewichts zu untersuchender Proteine ermöglicht. Durch das Elutionsvolumen der Referenzproteine kann der so genannte Verteilungskoeffizient K berechnet werden (Formel 2).

$$K = \frac{V_e - V_o}{V_c - V_o}$$

Formel 2: Berechnung des Verteilungskoeffizienten K. V_e = Elutionsvolumen, V_o = Ausschlussvolumen, V_c = Säulenvolumen.

Das Ausschlussvolumen V_o wurde durch das Elutionsvolumen von Blue Dextran ermittelt. Durch Auftragung des Verteilungskoeffizienten K gegen die logarithmische Konzentration der Molekulargewichte der Referenzproteine wird eine lineare Funktion erhalten. Durch Berechnung der Verteilungskoeffizienten der zu untersuchenden Proteine und Einsetzen in diese lineare Funktion, können deren Molekulargewichte ermittelt werden.

Die Größenausschlusschromatographie erfolgte auf einer Superdex 200 10/300 GL Säule (GE Healthcare) mit einem Säulenvolumen von 24 mL bestehend aus einer Dextran-Matrix mit verknüpfter Agarose. Zur Kontrolle der Aufreinigung wurde die Säule an ein automatisiertes Chromatographiesystem (ÄKTAexplorer, GE Healthcare) angeschlossen, welches die Absorption bei 280 nm detektierte. Die Chromatographiesäule wurde zunächst mit 1 SV Gelfiltrationspuffer (Tabelle 37) äquilibriert ($0,5 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$). Anschließend erfolgten Beladung der Säule und Auftrennung der Proteinspezies (1 SV , $0,5 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$).

Massenspektrometrie von Proteinen

Zur Bestimmung des Molekulargewichts des Proteins β -Catenin wurde eine massenspektrometrische Analyse durchgeführt. Zunächst wurden für die Analyse störende Puffersubstanzen wie z.B. Glycerol durch Dialyse des aufgereinigten Proteins entfernt. Die Dialyse erfolgte über Nacht bei 4°C in einem Puffer aus 10 mM HEPES pH7,4, 100 mM NaCl, und 350 μ M DTT. Die Konzentration des Proteins wurde auf 1 mg·mL⁻¹ eingestellt und 1 μ L dieser Lösung zur Analyse verwendet. Die Analyse erfolgte mit dem Programm ProMassXcali (Novatia, LCC) und wurde von Dr. Petra Janning, Abteilung für Chemische Biologie, Max-Planck-Institut für molekulare Physiologie, Dortmund.

5.4 Festphasen-Peptidsynthese

Zur Festphasen-Peptidsynthese wurden verschiedene Harze mit unterschiedlicher polymerer Grundstruktur als feste Phase verwendet (Tabelle 20).

Tabelle 20: Harze, Aminosäuren und Kupplungsreagenzien zur Festphasen-Peptidsynthese.

Bezeichnung	polymerer Träger	Hersteller
ChemMatrix®	Polyethylenglycol	Sigma Aldrich
cysteamine-SASRIN™	Polystyrol	Bachem
NovaSyn-TGR®	Polystyrol	MerckMillipore
SpheriTide™	Sebacinsäure verlinktes Poly-ε-Lysin	MerckMillipore
TentaGel® S RAM	Polyethylenglycol	Sigma Aldrich

Geschützte Derivate der verwendeten Aminosäuren wurden von Iris Biotech, Merck Millipore und Sigma Aldrich erworben. (*S*)-*N*-Fmoc-2-(4'-Pentenyl)alanin) zur Seitenkettenverbrückung wurde von Okeanos Tech bezogen.

Tabelle 21: Aminosäuren (AS) und Kupplungsreagenzien.

Bezeichnung	Hersteller
Fmoc-AS-OH	Iris Biotech, Merck Millipore, Sigma Aldrich
Fmoc-O ₂ c-OH	Iris Biotech
Fmoc-NH-PEG(5)-COOH	Iris Biotech
<i>D</i> -Biotin	Sigma Aldrich
Hexansäure, Hexadecansäure	Sigma Aldrich
Spermine(FBBSuc-OH)	Iris Biotech
(<i>S</i>)- <i>N</i> -Fmoc-2-(4'-Pentenyl)alanin	Okeanos Tech
1-Cyano-2-ethoxy-2-oxoethylidenaminoxy)dimethylaminomorpholino-carbenium-hexafluorophosphat (COMU)	MerckMillipore
Ethyl-2-cyano-2-(hydroxyimino)acetat (Oxyma)	Merck Millipore
Benzotriazol-1-yl-oxytripyrrolidino-phosphonium-hexafluorophosphat (PyBOP)	MerckMillipore
<i>O</i> -(7-Azabenzotriazol-1-yl)- <i>N,N,N',N'</i> -tetramethyluronium-hexafluorophosphat (HATU)	MerckMillipore
2-(6-Chlor-1 <i>H</i> -benzotriazol-1-yl)-1,1,3,3-tetramethylaminium-hexafluorophosphat (HCTU)	Sigma Aldrich

5.4.1 Manuelle Synthese

Alle Peptide wurden nach dem Protokoll der Fmoc-basierten Festphasen-Peptidsynthese hergestellt. Gemäß diesem Ansatz ist der *N*-Terminus mit der basenlabilen Fluorenylmethoxycarbonyl (Fmoc)-Schutzgruppe und die Seitenketten mit säurelabilen Schutzgruppen versehen. Unter sauren Bedingungen erfolgte auch die Abspaltung des Peptides vom polymeren Träger. Die manuelle Peptidsynthese wurde in Spritzenreaktoren (Polypropylen, MultisynTech) oder Chromatographiesäulen (Polypropylen, Bio-Rad) mit Polyethylenfritten durchgeführt. Die Durchmischung des Syntheseansatzes erfolgte auf einem Schüttelinkubator oder im Stickstoffgegenstrom auf einem Vac-Man© Laboratory Vacuum Manifold (Promega).

Quellen und Waschen

Zu Beginn der Synthese wurde das Harz für 30 min in DMF gequollen. Pro eingesetzten 10 mg Harz wurden ca. 100 μ L Lösungsmittel verwendet.

Wenn nicht anders angegeben, wurde das Harz nach jedem Reaktionsschritt dreimal in DMF, dreimal in DCM und erneut dreimal in DMF gewaschen.

Fmoc-Entschützung

Zur Entschützung des *N*-Terminus wurde der Reaktionsansatz zweimal 5 min mit 25% Piperidin in DMF inkubiert. Anschließend wurde das Harz dreimal in NMP, dreimal in DCM und dreimal in DMF gewaschen.

Zur Kontrolle der Kupplungseffizienz wurde das bei der Entschützung entstandene Dibenzofulven-Piperidin-Addukt photometrisch bei 295 nm quantifiziert. Die Messung erfolgte an einem J-815 Spectrometer (Jasco) und wurde unter Zuhilfenahme des Lambert Beer'schen Gesetzes mit einem Extinktionskoeffizienten $\epsilon = 7.800 \text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$ berechnet (Kapitel 5.3.1).

Aminosäurekupplung

Ausgehend vom Beladungsgrad des Harzes, wurden 4 Äquivalente (Äq) der geschützten Aminosäure, 3,9 Äq Kupplungsreagenz und 8 Äq der Base DIPEA in DMF gelöst (0,15 M), für 30 s durchmischt und dann zum Reaktionsansatz gegeben.

Es wurden zwei verschiedene Kupplungsschritte durchgeführt: Bei der ersten Kupplung wurde das Kupplungsreagenz PyBOP verwendet und die Reaktion für 1 h oder über

Nacht inkubiert. Die zweite Kupplung wurde unter Zuhilfenahme von COMU und Oxyma durchgeführt und für maximal 30 min inkubiert.

***N*-Acetylierung**

Nach jeder Aminosäure Kupplung wurden nicht abreagierte Aminogruppen mit einem Gemisch aus NMP/Ac₂O/DIPEA (10:1:1) für 10 min acetyliert.

5.4.2 Automatisierte Synthese

Einige Peptide wurden automatisiert in Polypropylen-Spritzenreaktoren mit Polytetrafluorethylenfritte (MultiSynTech) mit einem Syntheseroboter (Syro II, MultiSynTech) hergestellt. Das Protokoll wurde eng an die manuelle Festphasensynthese angelehnt: Alle Syntheseschritte wurden in DMF durchgeführt, lediglich DIPEA und Essigsäureanhydrid (Ac₂O)-Stammlösungen wurden in NMP angesetzt. Die Fmoc-Entschützung erfolgte zweimal für 5 min mit 20% Piperidin in DMF. Die Aminosäuren wurden in einer 0,5 M Oxyma Lösung gelöst und mittels Doppelkupplung für jeweils 40 min gekuppelt. Dazu wurden 4 Äq der Aminosäure mit 3,9 Äq PyBOP oder HCTU und 8 Äq DIPEA verwendet. Die Reaktionszeit der *N*-Acetylierung wurde auf 2 min reduziert. Zwischen jedem Schritt wurde das Harz sechsmal für 1 min mit DMF gewaschen.

5.4.3 Ringschlussmetathese

Zur Zyklisierung der olefinischen Aminosäuren (*S*)-*N*-Fmoc-2-(4'-Pentenyl)alanin wurde das Harz zunächst für 30 min in wasserfreiem DCE gewaschen und gequollen. Im Stickstoffgegenstrom wurde die Reaktion mit 4 mg·mL⁻¹ (4,9 mM) Benzylidenbis(tricyclohexylphosphin)dichlororuthenium (Grubbs Katalysator, 1. Generation) in DCE sechsmal für 1 h durchgeführt. Im Anschluss wird das Harz zweimal für 10 min in DMSO/DCM (1:1) gewaschen.

5.4.4 *N*-terminale Modifikation

Bevor *N*-terminale Modifikationen eingeführt wurden, wurde die Fmoc-Schutzgruppe entfernt. Mit dem gewaschenen Harz wurde dann wie in den folgenden Punkten beschrieben weiter gearbeitet.

5 Experimenteller Teil

N-Acetylierung

Zur Acetylierung wurde das Harz zweimal für 10 min mit NMP/Ac₂O/DIPEA (10:1:1) behandelt.

Einführung von Fettsäuren

Zur Synthese *N*-terminal lipidierter Peptide wurden 4 Äq Capronsäure (Hexansäure) oder Palmitinsäure (Hexadecansäure) mit 3,9 Äq PyBOP und 8 Äq DIPEA verwendet. Jede Kupplung wurde zweimal für 1 h durchgeführt.

Einführung von Spermin

Eine Spermin-Modifikation wurde durch das zweimalige Kuppeln von 4 Äq Spermin (FBBSuc-OH) mit 3,9 Äq PyBOP bzw. HATU und 8 Äq DIPEA verwendet. Jede Kupplung wurde für 1 h durchgeführt. Nach Beendigung der Synthese wurde das Peptid zweimal 5 min mit 25% Piperidin in NMP entschützt.

Einführung einer Kernlokalisierungssequenz

Als Distanzhalter wurde zunächst eine Polyethylenglycol-Einheit (PEG₂) eingeführt gefolgt von einer Kernlokalisierungssequenz (PKKKRKV). Die Kupplungen erfolgten gemäß dem Standardprotokoll (Kapitel 5.4.1). Um einen freien *N*-Terminus zu erhalten, wurde das der Reaktionsansatz zweimal 5 min mit 25% Piperidin in NMP inkubiert.

Einführung von Fluorescein Isothiocyanat

Bevor das Peptid mit einem Fluorophor modifiziert wurde, wurde eine Polyethylenglycol-Einheit (PEG₂) als Distanzhalter eingeführt. Anschließend wurden zweimal 4 Äq Fluorescein Isothiocyanat Isomer I (FITC) mit 8 Äq DIPEA versetzt und für 1 h reagiert.

Biotinylierung

Zunächst wurde eine fünfgliedrige Polyethylenglycol-Einheit (PEG₅) und anschließend *D*-Biotin gemäß dem Standardprotokoll eingeführt. Beide Kupplungen wurden zweimal mit PyBOP durchgeführt.

5.4.5 Abspaltung vom polymeren Träger

Vor der finalen Abspaltung vom polymeren Träger wurden die Peptide fünfmal in DCM gewaschen und im Vakuum getrocknet. Thiolhaltige Peptide wurden mit einer Lösung

aus TFA/H₂O/EDT/TIPS (94:2,5:2,5:1) und alle anderen Peptide mit einer Lösung aus TFA/H₂O/TIPS (95:2,5:2,5) für mindestens 4 h abgespalten. Für 100 mg Harz wurden ca. 2 mL Abspalllösung verwendet. Im Anschluss wurde das Harz mit TFA gewaschen und die Abspalllösung aufgefangen. Diese wurde unter Stickstoff auf etwa 20% des Volumens eingedampft und durch Zugabe von kaltem Diethylether (-20°C) gefällt. Zentrifugation für 15 min bei 3600 rpm erlaubte Separierung des Peptides. Der Überstand wurde verworfen und der Niederschlag mit kaltem Diethylether gewaschen und erneut zentrifugiert. Die im Niederschlag befindlichen Peptide wurden unter Verwendung von Stickstoff getrocknet und bis zur Aufreinigung bei -20°C gelagert.

5.4.6 Peptidaufreinigung

In Abhängigkeit der Löslichkeit wurden die Peptide in einem ACN/ddH₂O-Gemisch variierender Zusammensetzung aufgenommen und mittels semi-präparativer HPLC auf einem Shimadzu HPLC-System aufgereinigt. Präparative Ansätze $\leq 5 \mu\text{mol}$ wurden auf einer Vorsäule (VP50/10 Nucleodor, C18 Gravity, Partikelgröße 5 μm ; Macherey-Nagel) und einer Hauptsäule (VP125/10 Nucleodor, C18 Gravity, Partikelgröße 5 μm ; Macherey-Nagel) mit einer Flussrate von 6 mL·min⁻¹ aufgetrennt. Präparative Ansätze $> 5 \mu\text{mol}$ wurden auf einer Vorsäule (VP50/21 Nucleodor, C18 Gravity, Partikelgröße 5 μm ; Macherey-Nagel) und einer Hauptsäule (VP125/21 Nucleodor, C18 Gravity, Partikelgröße 5 μm ; Macherey-Nagel) mit einer Flussrate von 17,5 mL·min⁻¹ aufgetrennt. Die mobile Phase setzte sich aus Laufmittel A (ddH₂O mit 0,1% TFA) und Laufmittel B (ACN mit 0,1% TFA) zusammen. Die Produktfraktionen wurden vereinigt und in einem Vakuumkonzentrator eingeeengt (RVC 2-25, Christ). Die Peptide wurden in flüssigem Stickstoff eingefroren und anschließend gefriergetrocknet (Heto PowerDry® LL1500 Freeze Dryer, ThermoFisher Scientific). Die getrockneten Peptide wurden bei -20°C gelagert.

5.5 Molekularbiologische Methoden

5.5.1 Bakterienstämme

Zu Klonierungs- und Expressionszwecken wurden verschiedene Bakterienstämme von *Escherichia coli* (*E. coli*) verwendet (Tabelle 22).

Tabelle 22: Genotypen verwendeter *E. coli*-Stämme.

Taxonomie	Stamm	Genotyp	Hersteller
<i>E. coli</i>	BL21-Gold (DE3)	F ⁻ <i>ompT hsdS</i> (r _B ⁻ m _B ⁻) <i>dcm</i> ⁺ TetR <i>gal λ</i> (DE3) <i>endA Hte</i>	Agilent Technologies
<i>E. coli</i>	OmniMAX™ 2 T1 ^R	F ⁺ (<i>proAB+lacIq lacZΔM15</i> <i>Tn10</i> (TetR) Δ (<i>ccdAB</i>)) <i>mcrA</i> Δ (<i>mrr-hsdRMS-mcrBC</i>) ϕ 80(<i>lacZ</i>) Δ M15 (<i>lacZYA-argF</i>) U169 <i>endA1 recA1 supE44 thi-1</i> <i>gyrA96 relA1tonA pand</i>	Invitrogen
<i>E. coli</i>	DH5 α ™	F ⁺ Φ 80 <i>lacZΔM15 Δ</i> (<i>lacZYA-argF</i>) U169 <i>recA1 endA1</i> <i>hsdR17</i> (r _k ⁻ , m _k ⁺) <i>phoA supE44</i> <i>thi-1 gyrA96 relA1 λ</i> ⁻	Thermo Scientific

5.5.2 Plasmide

Zur Klonierung wurden verschiedene Ausgangsvektoren verwendet, deren wichtigsten Charakteristika in Tabelle 23 zusammengefasst sind. Detaillierte Vektorkarten der Ausgangsvektoren sowie der durch Klonierung generierten Vektoren sind im Anhang dargestellt (Kapitel 8.6).

Tabelle 23: Verwendete Ausgangsvektoren. *lacI* = Lac-Repressorgen, AmpR = Ampicillinresistenzgen, KanR = Kanamycinresistenzgen, NeoR = Neomycinresistenzgen, prom = Promotor, GST = Glutathion-S-Transferase-Tag, His₆ = Hexahistidin-Tag, MBP = *Maltose-binding protein*-Tag, TEV = Erkennungssequenz für TEV-Protease, THB = Erkennungssequenz für Thrombin-Protease, MCS = Polylinker (*multiple cloning site*).

Vektor	Eigenschaften	Herkunft
pGEX-4T-1	<i>lacI</i> , AmpR, tac prom, GST, THB, MSC	GE Healthcare
pET-28a(+)	<i>lacI</i> , KanR, T7 prom, His ₆ , THB, MCS, His ₆	Novagen
pETM-40	<i>lacI</i> , KanR, T7 prom, MBP, TEV, MCS, His ₆	EMBL

5.5.3 Nährmedien zur Kultivierung von *E. coli*

Die in dieser Arbeit verwendeten Nährmedien zur Kultivierung von *E. coli* sind den nachfolgenden Tabellen zu entnehmen. Alle Medien wurden vor Verwendung autoklaviert.

Tabelle 24: SOC Medium zur Transformation chemisch kompetenter Zellen.

SOC-Medium	
Trypton	20 g
Hefeextrakt	5 g
NaCl	0,58 g
KCl	0,19 g
MgCl ₂ ·6H ₂ O	2,03 g
MgSO ₂ ·7H ₂ O	2,46 g
ad 0,96 L	
Zugabe 0,04 L einer sterilen 50% Glukose-Lösung	

Tabelle 25: Zusammensetzung von TB- und LB-Medium zur Kultivierung von *E.coli*.

TB-Medium	Komponente 1	LB-Medium
Trypton	12 g	Trypton 10 g
Hefeextrakt	24 g	Hefeextrakt 5 g
Glycerol	4 mL	NaCl 10 g
ddH ₂ O	ad 0,9 L	ad 1 L, pH 7,4
Komponente 2		
KH ₂ PO ₄ (0.17 M)	2,3 g	
K ₂ HPO ₄ (0.72 M)	12,5 g	
ddH ₂ O	ad 0,1 L	
nach autoklavieren Komponente 1 und 2 mischen		

Tabelle 26: Verwendete Medienadditive zur Selektion oder Expressionsinduktion.

Additiv	verwendete Konzentration	Hersteller
Ampicillin	100 µg·mL ⁻¹	GERBU
Kanamycin	100 µg·mL ⁻¹	GERBU
IPTG	0,4 mM	Sigma Aldrich

5.5.4 Herstellung chemisch kompetenter Zellen

Zunächst wurde eine Übernachtskultur von 5 mL LB-Medium mit 100 μ L *E.coli* Zellsuspension angeimpft und bei 37°C inkubiert. Am nächsten Tag wurde mit 1 mL dieser Übernachtskultur eine Hauptkultur von 100 mL LB-Medium angesetzt und bei 37°C inkubiert bis eine optische Dichte bei einer Wellenlänge von 600 nm (OD_{600}) von 0,4 erreicht wurde. Die Zellen wurden durch Zentrifugation (3200 g, 10 min, 4°C) geerntet und in 40 mL eiskalter 0,1 M $CaCl_2$ Lösung resuspendiert und für 30 min auf Eis gelagert. Die Suspension wurde anschließend erneut zentrifugiert (3200 g, 10 min, 4°C) und das Zellpellet in 4 mL eiskalter 0,1 M $CaCl_2$ Lösung resuspendiert. Dieser Suspension wurden 500 μ L Glycerol hinzugegeben und in Aliquote zu 100 μ L aufgeteilt, in flüssigem Stickstoff eingefroren und bis zur Verwendung bei -80°C gelagert.

5.5.5 Hitzeschock Transformation

Dazu wurden chemisch kompetente *E. coli* Zellen auf Eis aufgetaut und mit Plasmid-DNA versetzt. Nach 20 min Inkubation auf Eis wurden die Zellen für 1 min bei 42°C inkubiert, gefolgt von 2 min auf Eis. Die Zellen wurden dann mit 500 μ L vorgewärmten SOC-Medium versetzt und für 1 h bei 37°C unter schütteln inkubiert. Anschließend wurden die Zellen zentrifugiert (180 g, 3 min) und das Zellpellet in 200 μ L SOC-Medium resuspendiert und auf LB-Agarplatten mit geeignetem Antibiotikum ausplattiert. Die Platten wurden über Nacht bei 37°C inkubiert. Die Reaktionsansätze unterschieden sich in der Menge der zugesetzten DNA: Zur Vervielfältigung von Plasmid-DNA wurden DH5 α TM Zellen verwendet und mit 50-100 ng DNA versetzt. Für die Proteinexpression wurde BL21-Gold(DE3) ebenfalls mit 50 ng DNA transformiert. Bei der *in vivo*-Klonierung wurde der gesamte Klonierungsansatz (100 ng Plasmid-DNA und 1200 ng Insert) in OmniMAXTM 2 T1R transformiert.

5.5.6 Glycerol-Lagerkulturen

Zur Herstellung von Glycerol-Lagerkulturen wurde eine Einzelkolonie der transformierten Zellen (5.5.5) verwendet um 5 mL LB-Medium anzuimpfen. Zur Herstellung einer Lagerkultur des Expressionsstammes BL21-Gold(DE3) wurde ein Querschnitt durch mehrere Kolonien verwendet. Die Kulturen wurden über Nacht (37°C, 170 rpm) inkubiert und von der Zellsuspension 1350 μ L entnommen und mit 450 μ L einer sterilen, 50%igen

Glycerollösung versetzt. Die Suspension wurde in ein Kryogefäß überführt und bei -80°C gelagert.

5.5.7 Isolierung von Plasmid-DNA

Zur Gewinnung von Plasmid-DNA wurden 50-100 ng des Plasmids in *E. coli* DH5 α^{TM} transformiert und 5 mL LB Medium mit einer Einzelkolonie angeimpft. Die Kulturen wurden über Nacht inkubiert (37°C , 170 rpm) und die Plasmid-DNA am nächsten Tag mittels QIAprep Spin Miniprep Kit (Qiagen) nach Herstellerangaben isoliert. Die Konzentration der Probe wurde mittels UV/VIS-Spektroskopie ermittelt (0).

5.5.8 Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

In dieser Arbeit wurde eine kommerziell erhältliche vorgemischte Lösung, 2x Phusion Flash High-Fidelity PCR Master-Mix (ThermoFisher Scientific), verwendet, die bereits Polymerase, dNTPs, MgCl_2 und Reaktionspuffer enthält. Die Zusammensetzung des Reaktionsansatzes ist Tabelle 27 zu entnehmen.

Tabelle 27: Pipettierschema zum Ansetzen einer PCR.

Komponente	finale Konzentration
Primer A	0,5 μM
Primer B	0,5 μM
2x Phusion Flash High-Fidelity PCR Master-Mix	25 μL (1x)
Templat	25 ng
ddH ₂ O	ad 50 μL

Die PCR wurde in einem PCR-Thermocycler (Mastercycler EP Gradient, Eppendorf) durchgeführt. Der Reaktionszyklus und verwendete Parameter sind Tabelle 28 zu entnehmen. Die Annealingtemperatur wurde auf die verwendeten Primer individuell abgestimmt. Die Elongationszeit wurde der Größe des Templates angepasst.

5 Experimenteller Teil

Tabelle 28: Zyklus der PCR.

Schritte	2-Schritt Protokoll		3-Schritt Protokoll		Zyklen
	Temperatur / °C	Zeit / s	Temperatur / °C	Zeit / s	
Initiale Denaturierung	98	10	98	10	1
Denaturierung	98	1	98	1	
Annealing	-		X		30
Elongation	72	15 s/kbp	72	15 s/kbp	
finale Elongation	72	60	72	60	1
	4		4		

Die Konzentration des Produktes wurde mit UV/VIS-Spektroskopie bestimmt und mittels Agarose-Gelelektrophorese analysiert (Kapitel 5.3.3). Bis zur weiteren Verwendung wurden die PCR-Produkte bei -20°C gelagert.

5.5.9 Restriktionsverdau

In dieser Arbeit wurde der Restriktionsverdau als Vorbereitung von Plasmid-DNA oder PCR-Produkten auf die Klonierung durchgeführt. Die verwendeten Restriktionsenzyme und die dazugehörigen Reagenzien sind Tabelle 29 zu entnehmen.

Tabelle 29: Restriktionsendonukleasen zum Schneiden von DNA.

Bezeichnung	zugehörige Reagenzien	Hersteller
FastDigest <i>EcoRI</i>	10X FastDigest Buffer	ThermoFisher Scientific
FastDigest <i>HindIII</i>	10X FastDigest Buffer	ThermoFisher Scientific
FastDigest <i>NcoI</i>	10X FastDigest Buffer	ThermoFisher Scientific
FastDigest <i>NdeI</i>	10X FastDigest Buffer	ThermoFisher Scientific
FastDigest <i>NheI</i>	10X FastDigest Buffer	ThermoFisher Scientific
FastDigest <i>XhoI</i>	10X FastDigest Buffer	ThermoFisher Scientific

Die Restriktionsansätze (Tabelle 30) wurden für 30 min bei 37°C inkubiert. Anschließend wurden die Restriktionsendonukleasen für 10 min bei 80°C inaktiviert. Eine Aufreinigung

der geschnittenen PCR-Produkte erfolgte nicht. Plasmid-Vektoren wurden mittels Gelextraktion präparativ aufbereitet (Kapitel 5.5.10).

Tabelle 30: Pipettierschema zum Ansetzen eines Restriktionsverdaus.

Komponente	Plasmid-DNA	PCR-Produkt
Templat	2-5 µg	0,02-0,2 µg
10X FastDigest Buffer	2 µL	2 µL
Restriktionsenzym A	2 µL	1 µL
Restriktionsenzym B	2 µL	1 µL
ddH ₂ O	ad 20 µL	ad 20 µL

5.5.10 Gelextraktion

Geschnittene Vektoren wurden für die Klonierung durch die Methode der Gelextraktion aufgereinigt. Die Probe wurde als präparativer Ansatz elektrophoretisch aufgetrennt (Kapitel 5.3.2) und die gewünschte DNA-Bande mit einem Skalpell ausgeschnitten. Die Extraktion erfolgte mit dem E.Z.N.A.[®] Gel Extraction Kit (OMEGA bio-tek). Die Konzentration des Eluates wurde UV/VIS-spektroskopisch bestimmt und die Probe bis zur weiteren Verwendung bei -20°C gelagert.

5.5.11 Klonierung

Die Klonierung ist eine molekularbiologische Methode zur Generierung rekombinanter DNA.

Die in dieser Arbeit verwendeten Gensequenzen, Oligonukleotide sowie Karten der generierten Plasmide sind dem Anhang zu entnehmen (Kapitel 8.4, 8.5, 8.6).

Restriktions-Ligations-Klonierung

Gemäß der Restriktions-Ligations-Methode wurden sowohl Vektor als auch Zielgen (Insert) mittels Restriktionsendonukleasen geschnitten (Kapitel 5.5.9). Die geschnittenen Enden des Vektors wurden dephosphoryliert um eine Selbstligation zu verhindern. Anschließend wurden Vektor und Insert durch die Zugabe einer Ligase verknüpft. Sowohl Dephosphorylierung mittels Alkaliner Phosphatase als auch Ligation mittels T4 DNA Ligase (ThermoFisher Scientific) erfolgten entsprechend der Herstellerangaben. Die

5 Experimenteller Teil

Dephosphorylierungsreaktion (Tabelle 31) wurde für 30 min bei 37°C durchgeführt und die Phosphatase anschließend bei 75°C für 5 min inaktiviert.

Tabelle 31: Pipettierschema zur Dephosphorylierung des Zielvektors.

Komponente	
linearisierter Vektor	0,5-1 µg
10X FastAP Buffer	2 µL
FastAP Thermosensitive Alkaline Phosphatase	1 µL (1 u)
ddH ₂ O	ad 20 µL

Für die Ligation des Inserts in den geschnittenen, dephosphorylierten Zielvektor wurden beide Komponenten in verschiedenen Verhältnissen eingesetzt (3:1, 5:1, 10:1). Die Reaktion wurde für 6 h bei Raumtemperatur inkubiert, gefolgt von Hitzeinaktivierung der T4 DNA Ligase bei 70°C für 5 min (Tabelle 32). Anschließend wurde der gesamte Reaktionsansatz in chemisch kompetente *E. coli* DH5α™ Zellen transformiert (Kapitel 5.5.5), auf LB-Agarplatten mit geeignetem Antibiotikum ausplattiert und über Nacht bei 37°C inkubiert. Zur Identifikation der Ligationsprodukte wurden Kolonie-PCR (Kapitel 5.5.12) und Sequenzierung (Kapitel 5.5.13) durchgeführt.

Tabelle 32: Pipettierschema zur Ligationsreaktion.

Komponente	
linearisierter, dephosphorylierter Vektor	50 ng
Insert	3:1-10:1 (Verhältnis zu Vektor)
10X T4 DNA Ligase Buffer	2 µL
T4 DNA Ligase	1 µL (1 u)
ddH ₂ O	ad 20 µL

***In vivo*-Klonierung**

Der Zielvektor wird, wie in Kapitel 5.5.9 beschrieben, an der Stelle mit Restriktionsendonukleasen linearisiert, an der das gewünschte Insert eingebaut werden soll. Das Insert muss entsprechend zu diesen Schnittstellen etwa 25 bp lange homologe Sequenzen aufweisen. Durch die Wahl entsprechender Primer wurden homologe Sequenzen im Zuge einer PCR Reaktion hinzugefügt (Kapitel 5.5.8) oder das gesamte Genfragment

kommerziell erworben (gBlocks Gene Fragments, IDT DNA Technologies). Für die Klonierungsreaktionen wurden 100 ng linearisierter Vektor und 1200 ng Insert für 10 min bei Raumtemperatur und anschließend für 10 min bei 4°C inkubiert. Der gesamte Reaktionsansatz wurde in chemisch kompetente OmniMAX™ 2 T1R Zellen transformiert (Kapitel 5.5.5), auf LB-Agarplatten mit geeignetem Antibiotikum ausplattiert und über Nacht bei 37°C inkubiert. Zur Identifikation der Ligationsprodukte wurden Kolonie-PCR (Kapitel 5.5.12) und Sequenzierung (Kapitel 5.5.13) durchgeführt.

5.5.12 Kolonie-PCR

Einzelne Bakterienkolonien wurden mit einer sterilen Pipettenspitze angetippt und in 10 µL ddH₂O resuspendiert. Die Suspension wurde für 10 min bei 95°C inkubiert und anschließend für 2 min bei 16.000 g zentrifugiert. Der Überstand wurde für die PCR eingesetzt. Die Reaktionskomponenten sind Tabelle 33 zu entnehmen.

Tabelle 33: Pipettierschema zum Ansetzen einer Kolonie-PCR.

Komponente	
10x Reaktionspuffer	1x
MgCl ₂	2,0 mM
dNTP-Mix	0,2 mM
Primer A	0,5 µM
Primer B	0,5 µM
aTaq DNA Polymerase	1,25 U (0,25 µL)
Bakteriensuspension	1 µL
ddH ₂ O	ad 50 µL

Die PCR wurde in einem PCR-Thermocycler (Mastercycler EP Gradient, Eppendorf) durchgeführt. Der Reaktionszyklus und verwendete Parameter sind Tabelle 34 zu entnehmen. Die Annealingtemperatur wurde auf die verwendeten Primer individuell abgestimmt. Die Elongationszeit wurde der Größe des Templates angepasst. Die Produkte wurden mittels Agarose-Gelelektrophorese analysiert.

5 Experimenteller Teil

Tabelle 34: Zyklus der Kolonie-PCR.

Schritte	Temperatur / °C	Zeit / s	Zyklen
Initiale Denaturierung	95	120	1
Denaturierung	95	30	
Annealing	X	30	30
Elongation	72	60 s/kbp	
finale Elongation	72	300	1
	4		

5.5.13 Sequenzierung

Zur Bestimmung der Abfolge der Nukleobasensequenz wurde eine Sequenzierung durchgeführt. Die Sequenzierung wurde bei StarSEQ GmbH in Auftrag gegeben und die Herstellung des Reaktionsansatzes erfolgte nach Herstellerempfehlung (Tabelle 35). Die Auswertung erfolgte unter Zuhilfenahme der Analysesoftware SnapGene[®] (GSL Biotech LLC) durch einen Sequenzabgleich des Sequenzierungsergebnis mit der theoretischen Zielsequenz.

Tabelle 35: Zusammensetzung einer Sequenzierungsreaktion.

Komponente	
Templat	400-700 ng
Primer	1.43 μ M
ddH ₂ O	ad 7 μ L

5.6 Proteinbiochemische Methoden

5.6.1 Expressionsanalyse

Aus vorhandenen Glycerol-Lagerkulturen wurden 150 mL LB- bzw. TB-Medium angeimpft und bei 37°C inkubiert. Bei Erreichen einer $OD_{600} = 0,6$ wurde die Proteinexpression mit Zugabe von 0,4 mM Isopropyl- β -thiogalactosid (IPTG) induziert. Anschließend wurden verschiedene Expressionszeiten und -temperaturen getestet (Tabelle 36).

Tabelle 36: Inkubationsparameter der Expressionsanalyse. Alle Bedingungen wurden sowohl in LB- als auch TB-Medium getestet. n.b. = nicht bestimmt, x = getestete Bedingung.

	20°C	25°C	37°C
4 h	n.b.	x	x
über Nacht	x	x	n.b.

Vor der Induktion, nach 2 h bzw. 4 h und nach der über-Nacht-Expression sowie vor der Zellernte wurden 1 mL Bakteriensuspension entnommen, 5 min bei 4000 g zentrifugiert und das erhaltene Zellpellet in 200 μ L 1X SDS-Probenpuffer resuspendiert. Nach Ablauf der Inkubationszeit wurden 50 mL der Kultur zentrifugiert (20 min, 4000 g, 4°C) und das Pellet zur Durchführung eines Löslichkeitstestes verwendet. Die Zellpellets wurden in 2 mL Lysepuffer resuspendiert (50 mM HEPES pH7,4, 500 mM NaCl, 2 mM DTT, 2,5 % Glycerol, cOmplete™, EDTA-free Protease Inhibitor Cocktail) und mittels Ultraschall-Homogenisation aufgeschlossen (Kapitel 5.6.3). Zelltrümmer wurden durch Zentrifugation abgetrennt (60 min, 16,000 g, 4°C). Parallel wurden 100 μ L Glutathion- bzw. Ni-Beads in Lysepuffer gewaschen und anschließend mit dem Überstand der Zentrifugation versetzt. Nach 1 h Inkubation am Rotationsrad bei 4°C wurden die Beads dreimal in Lysepuffer gewaschen (Zentrifugation 2 min, 300 g) und mit 50 μ L 2,5X SDS-Probenpuffer aufgeköcht. Weitere Proben für die SDS-PAGE wurden nach jedem Schritt entnommen (20 μ L + 80 μ L 2,5X SDS-Probenpuffer). Der Verlauf der Expressions- und Löslichkeitsanalyse wurde mittels SDS-PAGE analysiert (Kapitel 5.3.3).

5.6.2 Proteinexpression

Nach erfolgreicher Testexpression wurde eine Expressionskultur zur Aufreinigung des Zielproteins in größerem Maßstab angefertigt. Hierzu erfolgte zunächst die Transformation des Vektors in chemisch kompetente *E. coli* BL21-Gold (DE3) Zellen Kapitel 5.5.5)

5 Experimenteller Teil

und anschließende Kultivierung auf LB-Agarplatten mit geeignetem Antibiotikum über Nacht bei 37°C. Es wurde eine Vorkultur angelegt, indem 10 Kolonien der LB-Agarplatten genutzt wurden, um 100 mL TB-Medium mit Antibiotikum anzupflanzen. Die Vorkultur wurde über Nacht bei 37°C, 150 rpm in einem Schüttelinkubator (Innova™ 4430 Incubator Shaker, New Brunswick Scientific) inkubiert. Für die Inokulation der Expressionskultur wurden 25 mL der Vorkultur pro 2,5 L TB-Medium mit geeignetem Antibiotikum verwendet und bis zu einer $OD_{600} = 0,6-1$ bei 37°C und 150 rpm inkubiert. Die Induktion der Expression erfolgte durch die Zugabe von 0,4 mM IPTG. Nach einer Inkubation über Nacht (20°C, 150 rpm) im Schüttelinkubator wurden die Zellen durch Zentrifugation (4°C, 4500 g, 20 min) geerntet und das Zellpellet bei -80°C gelagert.

5.6.3 Zellaufschluss

Ultraschall-Homogenisation

Der Zellaufschluss mittels Ultraschall-Homogenisator wurde für kleine Probenvolumina verwendet (<50 mL Lysat). Ein Zellpellet aus 50 mL Expression wurde in 2 mL Lysepuffer resuspendiert. Der Lösung wurde eine Spatelspitze DNaseI (AppliChem) und cComplete™, EDTA-free Protease Inhibitor Cocktail (Roche) hinzugefügt. Zur Zellyse wurden mit dem Homogenisator Digital Sonifier® (Branson) drei Zyklen à 1 min (1 s Ultraschall, 1 s Pause) mit 15% Amplitude durchgeführt. Das Zellysate wurde für 60 min bei 4°C und 16.000 g zentrifugiert.

Hochdruck-Homogenisation

Der Zellaufschluss mittels Hochdruck-Homogenisator wurde für große Probenvolumina verwendet (>50 mL Lysat). Pro 2,5 L Expressionsvolumen wurden 50 mL Lysepuffer zur Resuspendierung des Zellpellets verwendet. Dem Lysat wurden vor dem Aufschluss eine Spatelspitze DNaseI (AppliChem) und eine Tablette cComplete™, EDTA-free Protease Inhibitor Cocktail (Roche) hinzugegeben. Der Aufschluss erfolgte dann in drei Wiederholungszyklen mittels Microfluidizer® (Microfluidics Corporation). Die homogenisierte Suspension wurde für 40 min bei 4°C und 50.000 g zentrifugiert (Avanti J-26XP) und der dabei entstandene Überstand wurde für die weitere Aufreinigung verwendet.

5.6.4 Proteinaufreinigung

Puffer

Da in dieser Arbeit mit verschiedenen Konstrukten des Proteins β -Catenin gearbeitet wurde, erfolgte die Aufreinigung je nach verwendetem Affinitäts-*Tag* nach verschiedenen Protokollen. Die verwendeten Puffer sind Tabelle 37 zu entnehmen.

Tabelle 37: Puffer zur Aufreinigung von β -Catenin aus verschiedenen Expressionsvektoren. BME = β -Mercaptoethanol, DTT = Dithiothreitol, His₆ = Hexahistidin-Tag, MBP = Maltose bindendes Proteins, GST = Glutathion-S-Transferase.

β-Catenin1-781 aus pET-28a	
Lysepuffer	80 mM TRIS pH8,0, 300 mM NaCl, 10 mM Imidazol, 5% Glycerol, 2 mM BME
Waschpuffer	50 mM TRIS pH8,0, 500 mM NaCl, 25 mM Imidazol, 5% Glycerol, 1 mM BME
Elutionspuffer	50 mM TRIS pH8,0, 200 mM NaCl, 250 mM Imidazol, 5% Glycerol, 1 mM BME
Gelfiltrationspuffer	20 mM TRIS pH8,0, 150 mM NaCl, 10% Glycerol, 5 mM BME
β-Catenin1-781 aus pETM-40	
Lysepuffer	50 mM HEPES pH7,4, 500 mM NaCl, 10 mM Imidazol, 2,5% Glycerol, 2 mM DTT
Waschpuffer	50 mM HEPES pH7,4, 150 mM NaCl, 25 mM Imidazol, 2,5% Glycerol, 2 mM DTT
Elutionspuffer	50 mM HEPES pH7,4, 150 mM NaCl, 250 mM Imidazol, 2,5% Glycerol, 2 mM DTT
Gelfiltrationspuffer	50 mM HEPES pH7,4, 150 mM NaCl, 2,5% Glycerol, 2 mM DTT
β-Catenin1-781 aus pGEX	
Lysepuffer	50 mM HEPES pH7,4, 500 mM NaCl, 2,5% Glycerol, 2 mM DTT
Waschpuffer	50 mM HEPES pH7,4, 150 mM NaCl, 2,5% Glycerol, 2 mM DTT
Gelfiltrationspuffer	50 mM HEPES pH7,4, 150 mM NaCl, 2,5% Glycerol, 2 mM DTT

β -Catenin134-665 aus pGEX

Lysepuffer	50 mM TRIS pH8,0, 500 mM NaCl, 5% Glycerol, 2 mM DTT
Waschpuffer (Puffer A)	50 mM TRIS pH9,5, 100 mM NaCl, 5% Glycerol, 2 mM DTT
Elutionspuffer	50 mM TRIS pH9,5, 100 mM NaCl, 5% Glycerol, 2 mM DTT, 10 mM GSH
Puffer B	50 mM TRIS pH9,5, 1000 mM NaCl, 5% Glycerol, 2 mM DTT
Gelfiltrationspuffer	20 mM TRIS pH8,5, 150 mM NaCl, 2 mM DTT

Nickel-Affinitätschromatographie

Für die Aufreinigung von Proteinen, die einen His₆-Tag enthielten, wurde die Nickel(Ni)-Affinitätschromatographie verwendet. Hier besteht die stationäre Phase aus Ni²⁺-Ionen, die die Chelatisierung von Histidin-Resten des Protein-Tags erlaubt. Alle verwendeten Puffer sind Tabelle 37 zu entnehmen. Für die Ni-Affinitätschromatographie wurde eine HisTrap™ FF crude 5 mL-Säule (GE Healthcare) zunächst mit jeweils 4 Säulenvolumina (SV) ddH₂O, 6 M Guanidinhydrochlorid und ddH₂O regeneriert (3 mL·min⁻¹) und anschließend mit 5 SV Lysepuffer äquilibriert (2 mL·min⁻¹). Die Säule wurde mit dem geklärten Lysat beladen (0,5-1 mL·min⁻¹) und ungebundene Proteine wurden durch Waschen mit 10 SV Waschpuffer entfernt (2 mL·min⁻¹). Das Protein wurde durch Verwendung von 5 SV des Elutionspuffers eluiert (1 mL·min⁻¹). Anschließend wurde die Säule wieder regeneriert und bis zur weiteren Verwendung in 20% Ethanol gelagert. Proteine mit einem C-terminalen MBP-Tag und N-terminalen His₆-Tag aus pETM-40 wurde anschließend zur Entfernung des MBP-Tags mit Tobacco Etch Virus-Protease (TEV-Protease, Dortmund Protein Facility) im Verhältnis 1:0,04 (β -Catenin:Protease) über Nacht bei 4°C inkubiert.

Glutathion-Affinitätschromatographie

Für die Aufreinigung von Proteinen, die einen GST-Tag enthielten, wurde Glutathion (GSH)-Affinitätschromatographie verwendet. Alle verwendeten Puffer sind Tabelle 37 zu entnehmen. Für die GSH-Affinitätschromatographie wurde eine GSTrap™ HP 5 mL-Säule (GE Healthcare) zunächst mit jeweils 4 SV ddH₂O, 6 M Guanidinhydrochlorid und

ddH₂O regeneriert (3 mL·min⁻¹) und anschließend mit 5 SV des Lysepuffers äquilibriert (2 mL·min⁻¹). Die Säule wurde mit dem geklärten Lysat beladen (0,5-1 mL·min⁻¹), und ungebundene Proteine wurden durch Waschen mit 10 SV Waschpuffer entfernt (2 mL·min⁻¹). Zur proteolytischen Abtrennung des GST-Tags wurden 2 mL einer Lösung bestehend aus Waschpuffer und TEV-Protease (Verhältnis 1:0,04) über die Säule geleitet (0,5 mL·min⁻¹). Am nächsten Tag wurde das geschnittene Zielprotein durch Zugabe von 2 SV Waschpuffer von der Säule gespült (1 mL·min⁻¹). Die Eluate der Affinitätschromatographie wurden soweit konzentriert, dass die Konzentration 50 µM nicht überstieg. Die Proteinproben wurden für 10 min bei 4°C und 16.000 g zentrifugiert, um Schwebstoffe und denaturiertes Protein zu separieren.

Ionenaustauschchromatographie

Die Ionenaustauschchromatographie wurde für β-Catenin134-665 durchgeführt, da es für Kristallisationszwecke, die hohe Reinheit erfordern, eingesetzt wurde. Alle verwendeten Puffer sind Tabelle 37 zu entnehmen. Für die Ionenaustauschchromatographie wurde eine MonoQ™ 5/50 GL 1 mL-Säule (GE Healthcare) zunächst mit jeweils 4 SV ddH₂O, 6 M Guanidinhydrochlorid und ddH₂O regeneriert (1 mL·min⁻¹) und anschließend mit 5 SV Puffer A (Waschpuffer) äquilibriert (1 mL·min⁻¹). Die Säule wurde mit dem Eluat der Glutathion-Affinitätschromatographie beladen (1 mL·min⁻¹) und ungebundene Proteine wurden durch Waschen mit 10 SV Waschpuffer entfernt (1 mL·min⁻¹). Die Elution erfolgte mit einem Gradienten auf 500 mM NaCl unter Verwendung von Puffer B (1 mL·min⁻¹). Die Eluate wurden soweit konzentriert, dass die Konzentration des Proteins 50 µM nicht überstieg. Die Proteinproben wurden für 10 min bei 4°C und 16.000 g zentrifugiert, um Schwebstoffe und denaturiertes Protein zu separieren.

Größenausschlusschromatographie

Die Größenausschlusschromatographie erfolgte auf einer HiLoad™ 16/600 Superdex 200 Säule mit einem Säulenvolumen von 120 mL bestehend aus einer Dextran-Matrix mit verknüpfter Agarose. Zur Kontrolle der Aufreinigung wurde die Säule an ein automatisiertes Chromatographiesystem (ÄKTAexplorer, GE Healthcare) angeschlossen, welches unter anderem die Absorption bei 280 nm detektierte. Die Chromatographiesäule wurde zunächst mit 1 SV Gelfiltrationspuffer (Tabelle 37) äquilibriert (1 mL·min⁻¹). Anschließend erfolgten Beladung der Säule und Trennung der Proteinspezies (1 SV, 1 mL·min⁻¹). Fraktionen mit hoher Absorption wurden aufgefangen und anschließend mittels SDS-

5 Experimenteller Teil

PAGE analysiert (Kapitel 5.3.3). Fraktionen, die das Zielprotein enthielten wurden mittels Ultrafiltration aufkonzentriert. Das Protein β -Catenin wurde nicht länger als sieben Tage bei 4°C gelagert und für jedes Experiment erneut aufgereinigt und direkt verwendet.

Ultrafiltration von Proteinen

Um die Konzentration von Proteinen zu erhöhen, wurde ihr Volumen durch die Zuhilfenahme von Ultrafiltrationsgefäßen eingeengt. Diese enthalten Filter mit unterschiedlicher Porengröße (engl. *molecular weight cut-off*, MWCO), die Moleküle oberhalb dieses Ausschlusses zurückhalten. Zur Aufreinigung von β -Catenin wurden Amicon[®] Ultra centrifugal filter (MerckMillipore) mit einem MWCO von 30.000 g·mol⁻¹ verwendet. Die Filtergefäße wurden zunächst mit dem Puffer, in dem sich das Protein befand, äquilibriert (Zentrifugation 3000 g, 4°C). Die Proteinproben wurden soweit konzentriert, dass die Konzentration 50 μ M nicht überstieg und anschließend für 10 min bei 4°C und 16.000 g zentrifugiert um Schwebstoffe und denaturiertes Protein zu separieren.

5.7 Biochemische Methoden

5.7.1 Fluoreszenzpolarisations-Assay

Zur Untersuchung der Affinität zwischen β -Catenin und Peptiden wurde die Methode der Fluoreszenzpolarisation ausgewählt. In eine 384-well Mikrotiterplatte (schwarz, small volume, non-binding; Greiner) wurden 15 μ L Puffer vorgelegt. Es wurde der Puffer, in dem das zu untersuchende Protein gelagert ist, verwendet und mit 0,05% TWEEN[®] 20 versetzt. Eine Verdünnungsreihe wurde ausgehend von einer 50-60 μ M β -Catenin-Lösung hergestellt. Dazu wurden 10 μ L Proteinlösung durch dreimaliges auf- und ab pipettieren mit dem vorgelegten Puffer gemischt, 10 μ L dieses Gemisches entnommen und in der nächsten Kavität weiter verdünnt (2,5-fache Verdünnung). Ausgehend von einer 20 μ M DMSO-Stammlösung der zu untersuchenden FITC-markierten Peptide wurde eine 40 nM Verdünnung in FP-Puffer hergestellt. Von dieser Lösung wurden 5 μ L in jede Kavität gegeben und durch dreimaliges auf- und ab pipettieren gemischt. Die Endkonzentration des FITC-markierten Peptides betrug 10 nM. Die Platte wurde 1 h bei 4°C inkubiert, zentrifugiert (1 min, 1000 g, 4°C) und im Plattenlesegerät (Safire2, Tecan) ausgelesen. Zur Anregung von des verwendeten Fluorophors FITC wurde eine Extinktionswellenlänge $\lambda_{\text{ex}} = 470$ nm und eine Emissionswellenlänge $\lambda_{\text{em}} = 525$ nm verwendet. Jede Messung erfolgte als technisches Triplikat und wurde mit verschiedenen Proteinchargen durchgeführt. Die gemessene Fluoreszenzpolarisation wurde gegen die logarithmische Konzentration aufgetragen und die Werte der Dissoziationskonstante (K_D) wurden durch nicht-lineare Regression mit einer 4-Parameter-Hill-Gleichung (log(inhibitor) vs. response – variable slope (4 parameter)) und aus dem Wendepunkt der Kurve mit der Software Prism (Version 5.03, GraphPad Software) erhalten.

5.7.2 Pull-Down-Assay

Massenspektrometrie und Analyse des Pull-Down-Experimentes wurden von Dr. Tanja Bange, Abteilung für mechanistische Zellbiologie, Max-Planck-Institut für molekulare Physiologie, Dortmund, durchgeführt.

1,0 \cdot 10⁶ DLD-1 Zellen wurden in eine 10 cm Kulturschale gegeben und bis zu einer Konfluenz von ca. 80% kultiviert. Das Nährmedium wurde aspiriert und die Zellen in 5 mL kaltem D-PBS gewaschen. Anschließend wurden die Zellen mit 200 μ L kaltem Lysepuffer (Tabelle 38) versetzt und mit Hilfe eines Zellschabers (Sarstedt) von der Oberfläche

5 Experimenteller Teil

der Zellkulturschale gelöst. Durch vierfaches Wiederholen von Einfrieren in flüssigem Stickstoff für 3 min, gefolgt von Auftauen bei Raumtemperatur wurden die Zellen lysiert. Abschließend erfolgte ein zusätzlicher Ultraschall-Homogenisations-Schritt (1 min, 10 s Ultraschall, 10 s Pause, Amplitude 10%, Kapitel 5.6.3) und Zentrifugation (20 min, 16.000 g, 4°C) zum Abtrennen der Zelltrümmer. Die Konzentration des Überstandes wurde kolorimetrisch nach Bradford (Kapitel 5.3.3) bestimmt und auf 1 mg·mL⁻¹ mit Bindungspuffer (Tabelle 38) verdünnt. Streptavidin-beschichtete magnetische *Beads* (Dynabeads® M-280 Streptavidin, 10 mg·mL⁻¹, ThermoFisher Scientific), mit einer Beladungskapazität von 200 pmol·mg⁻¹, wurden mit biotinyliertem Peptid gesättigt. Pro Reaktionsansatz wurden 100 µL *Beads* verwendet und mit einem zweifachen Überschuss an Peptid (1200 pmol) in 1 mL Bindungspuffer für 1 h bei Raumtemperatur am Rotationsrad inkubiert. Anschließend wurden die *Beads* dreimal in Bindungspuffer gewaschen. Als Kontrollreaktion dienten *Beads*, die nicht mit Peptid immobilisiert wurden. Anschließend wurde 1 mL des Zelllysates (1 mg Gesamtprotein) zu den *Beads* gegeben und für 3 h bei 4°C am Rotationsrad inkubiert. Die *Beads* wurden dreimal in Bindungspuffer gewaschen und für den tryptischen Verdau und anschließender massenspektrometrischer Untersuchung an Dr. Tanja Bange übergeben.

Drei Replikate von Peptid- und Kontroll-Pull-Downs wurden gemessen, um zuverlässige quantitative Daten zu erhalten. Vor der Injektion wurden die Proben reduziert, alkyliert und direkt auf den *Beads* mit LysC/Trypsin verdaut³¹⁴. Erhaltene Peptide wurden mit einer PepMap100 RSLC C18-Nano-HPLC-Säule (2, 100, 75 IDx25 cm, NanoViper, Dionex, Deutschland) auf einem UltiMate™ 3000 RSLCnano-System (ThermoFisher Scientific) unter Verwendung eines 125-minütigen Gradienten von 5-60% Acetonitril mit 0,1% Ameisensäure getrennt und dann direkt über eine Nano-Elektrospray-Quelle (Nanospray Flex Ion Source, Thermo Scientific) in das Q Exactive™ Plus Hybrid Quadrupol-Orbitrap Massenspektrometer (ThermoFisher Scientific) injiziert. Das Massenspektrometer wurde in einem datenabhängigen Modus betrieben in dem zunächst ein Übersichts-Scan und anschließend zehn MS/MS-Scans durchgeführt wurden. Die resultierenden Rohdateien wurden mit der MaxQuant-Software (Version 1.5.2.18) auf der Basis der Uniprot-Datenbank (Stand Januar 2016) unter Verwendung von Deamidierung (NQ), Oxidation (M) und Acetylierung (N-Terminus) als variable Modifikationen und Carbamidomethylierung (C) als feste Modifikation ausgewertet³¹⁵. Eine falsche Entdeckungsrate von 1% wurde auf Peptid- und Proteinebene angewendet. Der integrierte

Algorithmus wurde für die relative Quantifizierung der identifizierten Proteine verwendet³¹⁶. Quantifizierte Proteine wurden mit der Perseus Software (Version 1.5.5.5.) analysiert³¹⁷. Potenzielle Kandidaten, die mit *b*-StAx-h interagieren, mussten in allen drei Wiederholungen quantifiziert werden (fehlende Kontrollwerte wurden am unteren Ende der Verteilung aller gemessenen und quantifizierten Proteine hinzugerechnet) und wurden dann mit einem Zweistichproben-t-Test identifiziert. Das Ergebnis wurde in einem Streudiagramm (Cut-off-Werte: p-Wert 0,01; S0 8) visualisiert.

Tabelle 38: Zusammensetzung der für den Pull-Down-Assay verwendeten Puffer. EDTA = Ethylendiamintetraacetat, EGTA = Ethylenbis(oxyethylennitrilo)-tetraessigsäure.

Lysepuffer		Bindungspuffer	
HEPES pH7,5	20 mM	Tris pH8,0	50 mM
KCl	10 mM	NaCl	300 mM
MgCl ₂	1 mM		
Na ₂ EDTA	1 mM		
EGTA	1 mM		
Halt™ Protease Inhibitor Cocktail (Thermo Scientific)	1X		

5.7.3 DSF

Die *Differential Scanning Fluorimetry* (DSF) ist eine biochemische Methode, um die Thermostabilität eines Proteins zu bestimmen. Zunächst wurde der Farbstoff SYPRO® Orange (ThermoFisher Scientific) in einem Verhältnis von 1:80 in ddH₂O verdünnt. Eine Titerplatte mit 96 verschiedenen 5X-Puffern wurde zur Untersuchung der Thermostabilität der drei β -Catenin-Proteine verwendet. In eine 96-well Quali-PCR-Platte (Kisker Biotech) wurden SYPRO® Orange, 5X Puffer und β -Catenin gegeben (Tabelle 39), die PCR-Platte mit Ultra-Clear-Folie (Kisker Biotech) verschlossen und in einer Plattenzentrifuge zentrifugiert (30 s, 700 rpm). Die Durchführung der Reaktion erfolgte anschließend im 7500 fast Real Time PCR System (Applied Biosystems). Die Fluoreszenz bei 570 nm wurde im Temperaturprofil von 5-95°C gemessen, wobei die Temperatur mit einer Rate von 1°C·min⁻¹ angehoben wurde. Die Auswertung der Daten erfolgte mit der Software Prism (Version 5.03, GraphPad Software).

5 Experimenteller Teil

Tabelle 39: Zusammensetzung der Reaktion zur Bestimmung der Thermostabilität von β -Catenin.

Komponente	
5X Puffer	5 μ L (1X)
SYPRO® Orange (62,5X)	2 μ L (5X)
Protein	3 μ M
ddH ₂ O	ad 25 μ L

5.7.4 nanoDSF

Bei nanoDSF, einer Variante der DSF, wurde die Thermostabilität des Proteins anhand der Änderung der intrinsischen Tryptophanfluoreszenz gemessen. Zur Untersuchung der Thermostabilität von β -Catenin wurden 18 verschiedene Pufferzusammensetzungen sowie Harnstoff und Guanidinhydrochlorid als Denaturierungskontrollen, getestet (Kapitel 8.10). In Reaktionsgefäßen wurden die Komponenten gemäß des Pipettierschemas (Tabelle 40) zusammen gegeben und in Kapillaren aufgesogen (nanoDSF Grade High Sensitivity Capillaries, NanoTemper). Jede Pufferzusammensetzung wurde als Triplikat getestet. Die Durchführung der Reaktion erfolgte anschließend im Prometheus NT.48 (NanoTemper). Die Fluoreszenz bei 330 und 350 nm wurde mit einer Anregungsstärke von 10% im Temperaturprofil von 20-95°C gemessen, wobei die Temperatur mit einer Rate von 1°C·min⁻¹ angehoben wurde. Die Auswertung der Daten erfolgte mit der Software Prism (Version 5.03, GraphPad Software).

Tabelle 40: Zusammensetzung des nanoDSF Assays.

Komponente	
ddH ₂ O	16 μ L
5X Puffer	2,4 μ L (1X)
Protein	20 μ M
ddH ₂ O	ad 12 μ L

5.8 Zellbiologische Methoden

5.8.1 Kultivierung von Säugetierzellen

Alle in dieser Arbeit verwendeten Säugetierzelllinien, ihre Herkunft und Nährmedien zur Kultivierung sind Tabelle 41 zu entnehmen. Alle Nährmedien, Medienzusätze und verwendete Puffer und Enzyme wurden von PAN Biotech bezogen. Verbrauchsmaterialien wurden, wenn nicht anders angegeben, von Sarstedt, BD Falcon und Corning verwendet.

Die Zelllinien wurden entweder in Dulbecco's modified Eagle medium (DMEM, 4,5 g·L⁻¹ Glukose, Natriumpyruvat, Phenolrot, 3,7 g·L⁻¹ NaHCO₃, 2 mM stabiles Glutamin) supplementiert mit 10% fötalem Kälberserum (*fetal calf serum*, FCS) und 1X nicht essentieller Aminosäuren ohne L-Glutamin, (*Minimum Essential Medium non-essential amino acids*, MEM NEAA) oder in RPMI-1640 (2 g·L⁻¹ Glukose, Phenolrot, 2 g·L⁻¹ NaHCO₃, 2 mM L-Glutamin) supplementiert mit 10% FCS. Die Kulturen wurden bei 37°C, 5% CO₂ und unter hoher Luftfeuchtigkeit kultiviert (CO₂-Inkubator Steri-Cycle, ThermoFisher Scientific). Zur Subkultivierung der Zellen wurden sie in Dulbecco's phosphate buffered saline (D-PBS) gewaschen und danach für 3-5 min mit Trypsin-EDTA in PBS (0,05%/0,02% oder 0,25%/0,02%) behandelt. Die Dissoziationsreaktion wurde durch die Zugabe von Nährmedium gestoppt, die Zellsuspension in ein Zentrifugationsgefäß überführt und zentrifugiert (180 g, 3 min). Der Überstand wurde verworfen, die verbliebenen Zellen in frischem Medium resuspendiert und in eine neue Schale gegeben. Alle 3-4 Tage wurden die Zellen subkultiviert.

Tabelle 41: Charakteristika verwendeter Säugetierzelllinien. Die verwendeten Zelllinien stammen aus *Homo sapiens* oder *Mus Musculus*. Die Zellen wurden entweder von der Deutschen Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen (DSMZ), der American Type Culture Collection (ATCC) oder vom Max-Planck-Institut für molekulare Physiologie erhalten.

Taxonomie	Zelllinie	Gewebe	Zelltyp	Krankheit	Quelle	Medium
<i>H. sapiens</i>	293T	Niere	Epithel	Normal	DSMZ	DMEM
<i>H. sapiens</i>	DLD-1	Darm	Epithel	kolorektales Adenokarzinom	ATCC	RPMI-1640
<i>H. sapiens</i>	HCT116	Darm	Epithel	kolorektales Karzinom	MPI	DMEM
<i>H. sapiens</i>	HeLa	Gebärmutterhals	Epithel	Adenokarzinom	MPI	DMEM
<i>H. sapiens</i>	MCF-7	Brustdrüse	Epithel	Adenokarzinom	MPI	DMEM

Taxonomie	Zelllinie	Gewebe	Zelltyp	Krankheit	Quelle	Medium
<i>M. musculus</i>	MEF	Embryo	Fibroblast	Normal	MPI	DMEM
<i>H. sapiens</i>	SW-480	Darm	Epithel	kolorektales Adenokarzinom	DSMZ	RPMI-1640
<i>H. sapiens</i>	U2OS	Knochen	Epithel	Osteosarkom	MPI	DMEM
<i>H. sapiens</i>	U87	Gehirn	Epithel	Glioblastom	MPI	DMEM

5.8.2 Bestimmung der Zellzahl nach der Neubauer Methode

Um eine definierte Zellzahl für Experimente auszusähen, wurden die Zellen mit Hilfe der Neubauer-Zählkammer (Hecht-Assistent) gezählt. Die Zellsuspension wurde in 0,4% Trypanblau-Lösung verdünnt und in die Zählkammer überführt. Abgestorbene und perforierte Zellen nahmen den Farbstoff auf und färbten sich blau. Lebende Zellen blieben farblos und wurden in den Eckquadraten der Zählkammer ausgezählt. Gemäß Formel 3 ergibt sich die Gesamtlebendzellzahl:

$$\text{Zellzahl} = \frac{\text{Anzahl gezählter Zellen}}{\text{Anzahl gezählter Eckquadrate}} \cdot \text{Verdünnung} \cdot 10^4$$

Formel 3: Formel zur Berechnung der Zellzahl nach Neubauer. Bei dem Faktor 10^4 handelt es sich um eine kammer-spezifische Konstante.

5.8.3 Kryokonservierung und Auftauen von Zellen

Die Zellen wurden wie bei der Subkultivierung geerntet und die Zellzahl bestimmt. Zur Kryokonservierung wurde das Zellkulturmedium mit 10% DMSO versetzt und das Zell-pellet in diesem mit einer Konzentration von $5 \cdot 10^6 - 1 \cdot 10^7$ Zellen $\cdot \text{mL}^{-1}$ resuspendiert, in Kryoröhrchen aliquotiert und zum Einfrieren bei -80°C in einen Einfrierbehälter (CoolCell, Biozym) platziert. Nach Erreichen der Temperatur wurden die Kryoröhrchen in der Gasphase einer Kryobank gelagert.

Kryokonservierte Zellen wurden in einem 37°C warmen Wasserband aufgetaut. Die Zellsuspension wurde sofort in vorgewärmtes Zellkulturmedium gegeben und zentrifugiert um DMSO abzutrennen. Der Überstand wurde abgesaugt, und die Zellen in frischem, vorgewärmten Medium aufgenommen und in Kulturgefäße überführt. Nach 24 h Inkubation wurde das Nährmedium erneuert, um tote Zellen zu entfernen.

5.8.4 WST-1 Assay

Zur Messung der metabolischen Aktivität wurden entweder 10.000 HeLa Zellen pro Kavität einer 96-well Mikrotiterplatte (BD Falcon) ausgesät und über Nacht bei 37°C und 5% CO₂ inkubiert. Die zu untersuchenden Peptide wurden separat in frischem, vorgewärmten Zellkulturmedium gelöst (finale Peptidkonzentration: 10, 5, 2,5 µM, finale DMSO-Konzentration: 0,5%) und durchmischt. Das Medium wurde von den Zellen aspiriert und mit dem vorgemischtem Medium versetzt. Anschließend wurden die Zellen 6 h inkubiert. Als Kontrollreaktionen dienten Zellen, die entweder nur in Gegenwart von 0,5% DMSO oder in Gegenwart von 1% Triton[®] X-100 kultiviert wurden.

Um eventuelle Artefakte bei der Bestimmung der Zellviabilität durch die Eigenschaften der verwendeten Peptide auszuschließen, wurden nach Ablauf Reaktionszeit die Absorption der Reaktionen bei 450 nm gegen eine Hintergrundkontrolle (650 nm), um die Absorption der Peptide im Nährmedium zu korrigieren, in einem Plattenlesegerät (Safire2, Tecan) ausgelesen. Pro 100 µL verwendetem Zellkulturmedium wurden 10 µL Zellproliferationsreagenz WST-1 (Roche) hinzugegeben, für 3 h inkubiert und die Platte erneut ausgelesen. Jedes Experiment wurde als technisches Triplikat und mindestens als biologisches Triplikat angefertigt.

5.8.5 CellTiter-Glo[®] Assay

Der sogenannte CellTiter-Glo[®] Luminescent Cell Viability Assay (Promega) basiert auf der Quantifizierung des ATP Gehaltes metabolisch aktiver Zellen. Es wurden die Effekte der StAx-Peptide auf 5 verschiedene Zelllinien (DLD-1, SW-480, MCF-7 U2OS, U87) ausgelesen. Dazu wurden jeweils 5000 Zellen in 96-well Mikrotiterplatten (Corning) ausgeplattiert und über Nacht bei 37°C und 5% CO₂ inkubiert. Die zu untersuchenden Peptide wurden separat in frischem, vorgewärmten Zellkulturmedium gelöst (finale Peptidkonzentration: 10, 5, 2,5, 1, 0,5 µM, finale DMSO-Konzentration: 0,5%) und durchmischt. Das Medium wurde von den Zellen aspiriert und mit dem vorgemischtem Medium versetzt. Anschließend wurden die Zellen 72 h mit den Peptiden inkubiert. Als Kontrollreaktionen dienten Zellen, die entweder in Gegenwart von 0,5% DMSO oder des Tankyrase Inhibitors XAV939 (finale Konzentration: 10, 5, 2,5, 1, 0,5 µM, finale DMSO-Konzentration: 0,5%) kultiviert wurden. Gemäß Herstellerangaben wurden Reagenzien und Zellen auf Raumtemperatur äquilibriert, bevor in jede Kavität ein Volumen CellTiter-Glo[®] Reagenz hinzugegeben wurde. Zur Zellyse wurden die Platten für 2 min auf einem Platt-

5 Experimenteller Teil

formschüttler (Unimax 1010, Heidolph Instruments) aufgeschlossen und zur Signalstabilisierung für weitere 10 min bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend konnte die Lumineszenz im Plattenlesegerät (Safire2, Tecan) ausgelesen werden. Hintergrund-Lumineszenz des Mediums wurde von den erhaltenen Messwerten subtrahiert. Jedes Experiment wurde als technisches Triplikat gemessen. Insgesamt wurden mindestens ein biologisches Duplikat und maximal eine sechsfach Messung angefertigt.

5.8.6 Scratch Wound Assay

DLD-1 und MCF-7 Zellen wurden bis zur Konfluenz in 96-well ImageLock™ Platten (Essen Biosciences) kultiviert. Mit dem WoundMaker™ (Essen Biosciences) wurden homogene Wunden von 700-800 µm in der konfluenten Einzellschicht erzeugt. Um abgelöste Zellen zu entfernen, wurde das Medium aspiriert und die Zellen dreimal in D-PBS gewaschen. Die zu untersuchenden Peptide wurden bereits separat in frischem, vorgewärmten Zellkulturmedium gelöst (finale Peptidkonzentration: 10, 5, 2,5 µM, finale DMSO-Konzentration: 0,5%) und zu den Zellen gegeben. Die Zellen wurden bis zur Schließung der artifiziellen Wunde im IncuCyte® Zoom Live-Cell Analysis System (Essen Biosciences) inkubiert und stündlich Bilder zur Beobachtung des Fortschrittes aufgenommen. Mittels der IncuCyte® Zoom Software (Essen Biosciences) wurde die Spaltgröße der Wunde zu jedem Zeitpunkt ermittelt und auf den Startpunkt der Messung normalisiert. Anhand der Steigung der erhaltenen Wachstumskurven konnten die Effekte der applizierten Peptide auf die Wundschließung gemessen werden. Jedes Experiment wurde als technisches und biologisches Triplikat angefertigt.

5.8.7 Durchfluscytometrie

50.000 HeLa Zellen wurden in 24-well Mikrotiterplatten ausplattiert und über Nacht bei 37°C und 5% CO₂ inkubiert. Die zu untersuchenden Peptide wurden separat in frischem, vorgewärmten Zellkulturmedium gelöst (finale Peptidkonzentrationen: 5, 2,5, 1, 0,5 µM, finale DMSO-Konzentration: 0,5%) und durchmischt. Für die Untersuchung von CPPs wurden 5 µM Peptid verwendet, während die komplette Konzentrationsreihe zur Untersuchung von StAx gemessen wurde. Als Kontrollen wurden sowohl Zellen nur mit 0,5% DMSO, aber auch mit 5 µM (5)6-Carboxyfluorescein (FAM, Sigma-Aldrich) und 5 µM des nicht zellgängigen Kontrollpeptides Bac₁₅₋₂₄ kultiviert. Das alte Medium wurde von den Zellen aspiriert, und das frische Medium mit den Peptiden für 90 min hinzugegeben.

Nach Ablauf der Inkubation wurden die Zellen dreimal in D-PBS gewaschen und 3 min mit 0,05% Trypsin behandelt. Die Dissoziationsreaktion wurde mit DMEM gestoppt, und die Zellen durch Zentrifugation geerntet (180 g, 3 min). Nach wiederholtem Waschen in D-PBS wurden die Zellen in 500 μL D-PBS resuspendiert und durch Zellsiebe in Cyto-metriegefäße (BD Falcon) filtriert. Die Internalisierung der FITC-markierten Peptide wurde im Durchflusscytometer (LSRII, BD Biosciences) durch Detektion der Fluoreszenz bei 530 nm bestimmt (Filter 530/30, mirror: 502 LP). Mittels Vorwärtslicht- und Seitenstreuung wurde ein Bereich intakter Zellen definiert (*cell gate*) und in diesem 10.000 Ereignisse detektiert, die mittels FlowJo™ Software Paket (V.10.1, FlowJo, LLC) ausgewertet wurden. Dieses Experiment wurde mindestens als biologisches Triplikat angefertigt.

5.8.8 Konfokalmikroskopie

150.000 HeLa Zellen wurden in einem 35 mm Kulturschälchen mit 0,13-0,16 μm dickem Glasboden (MatTek) ausgesät und über Nacht bei 37°C und 5% CO₂ inkubiert. Die zu untersuchenden Peptide wurden bereits separat in frischem, vorgewärmten Zellkulturmedium gelöst (finale Peptidkonzentration: 5 und 2,5 μM , finale DMSO-Konzentration: 0,5%) und für 90 min zu den Zellen gegeben. Gleichzeitig wurde 1 μL des rot fluoreszierenden Farbstoffes LysoTracker Red DND-99 (Invitrogen) zur Markierung und Verfolgung saurer Zellorganellen hinzugegeben. Nach Ablauf der Inkubationszeit wurden die Zellen dreimal in D-PBS gewaschen. Zur Mikroskopie wurden die Zellen mit speziellem DMEM (4,5 $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ Glukose, Natriumpyruvat, 0,5 $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ NaHCO₃, 2 mM stabiles Glutamin, 25 mM HEPES) versetzt, das keinen pH Indikator aufwies und mit HEPES gepuffert wurde, um die Zellen ohne CO₂-Zufuhr zu analysieren. Anschließend wurden die Zellen bei 37°C auf einem LSM510 Konfokalmikroskop mit 63x Öl-Immersions-Objektiv analysiert (Zeiss). Die verwendeten Parameter sind Tabelle 42 zu entnehmen. Die aufgenommenen Bilder wurden mit der Bildbearbeitungssoftware Fiji eingelese, eingefärbt und als JPG Dateiformat exportiert³¹⁸.

Tabelle 42: Zur Konfokalmikroskopie verwendete Fluorophore, Anregungsquellen, Wellenlängen und Emissionsfilter.

Fluorophor	Laser	Wellenlänge / nm	Bandweite
FITC	Argon	488	505-540
LysoTracker Red DND-99	DPSS	561	575-615

5.8.9 Reporter-gen-Assay

Der Reporter-gen-Assay wurde in Kollaboration mit der Arbeitsgruppe von Dr. Dennis Schade, Fakultät für Chemie und Chemische Biologie, Technische Universität Dortmund, von Bernd Rathmer durchgeführt.

Reporter-gen-Assays finden Anwendung bei der Untersuchung von Signalwegen, Genregulationsprozessen und Genregulatorelementen. Der in dieser Arbeit verwendete Assay bestand aus dem Genregulator-Element (7x TCF/LEF Response Element), gefolgt vom Reporter-gen (Leuchtkäfer Luciferase aus *Photinus pyralis*), dessen Aktivität über Biolumineszenz ausgelesen wurde. Die Aktivierung des Wnt/ β -Catenin Signalweges erfolgte durch das Signalprotein Wnt3A, welches in diesem Experiment co-transfiziert wurde. Als Transfektionskontrolle diente die Renilla Luciferase (*Renilla reniformis*), die ebenfalls als Co-Reporter transfiziert wurde.

Für die transiente Transfektion von $3 \cdot 10^6$ 293T Zellen wurden je 3 μg der Plasmide pWnt3a und pSTF sowie 0.3 μg des Plasmids pRLuc zu 100 μL Opti-MEM[®] (ThermoFisher Scientific) gegeben und für 5 min bei Raumtemperatur inkubiert. 18.9 μL Lipofectamine2000 (ThermoFisher Scientific) wurden ebenfalls zu 100 μL Opti-MEM[®] gegeben und für dieselbe Zeit inkubiert. Anschließend wurden beide Komponenten zusammengegeben und für 20 min bei Raumtemperatur inkubiert. Der Reaktionsmix wurde dann zu 293T Zellen gegeben und diese für 8 h transfiziert. Nach Ablauf dieser Zeit wurden die Zellen geerntet und gezählt. In jede Kavität einer 96-well Platte wurden 25.000 Zellen in einem Volumen von 110 μL ausgesät und für 1 h inkubiert, damit die Zellen an die Plattenoberfläche adhären. Die zu untersuchenden Substanzen wurden nachfolgend hinzugegeben, in einer Konzentrationsreihe von 10-0,1 μM mit einer maximalen Konzentration des Lösungsmittels DMSO von 0,5% und für 22 h inkubiert. Für das Auslesen der Luciferaseaktivität wurden alle Komponenten des Dual Luciferase[®] Reporter Assay Systems (Promega) auf Raumtemperatur äquilibriert. Der 5X Passive Lysis Buffer wurde 1:5 in D-PBS verdünnt. Das Medium wurde von den Zellen aspiriert und 50 μL Lysepuffer pro Kavität hinzugegeben und für 25 min auf einem Plattformschüttler inkubiert. Das lyophilisierte Luciferase Assay Substrat wurde in Luciferase Assay Buffer II gelöst und 10 μL pro Kavität einer weißen Mikrotiterplatte vorgelegt (96-well Half Area Microplate, Corning) und mit 10 μL der lysierten Zellen versetzt. Die Lumineszenz der Leuchtkäfer Luciferase wurde unmittelbar in einem Plattenlesegerät (Infinite 200, Tecan) ausgelesen. Anschließend wurde das 50x Stop & Glo[®] Substrat 50-fach in Stop & Glo[®] Buffer ver-

dünnt. 10 μL des Stop & Glo[®] Reagenz wurden in jede Kavität der Mikrotiterplatte gegeben und die Lumineszenz der Renilla Luciferase am Plattenlesegerät ausgemessen. Jedes Experiment wurde als technisches Triplikat und als biologisches Duplikat angefertigt. Die Auswertung der Daten beinhaltete Normierung auf die Lumineszenz der Renilla Luciferase sowie auf Kontrollreaktionen, die das Lösungsmittel DMSO enthielten. Die Inhibition wurde gegen die logarithmische Konzentration aufgetragen und die Werte der halbmaximalen inhibitorischen Fähigkeit (IC_{50}) wurden durch nicht-lineare Regression (log(inhibitor) vs normalized response – variable slope) mit der Software Prism (Version 5.03, GraphPad Software) erhalten.

5.8.10 Genexpressionsanalyse in Dünndarmkrypten

Die Experimente wurden in Kollaboration mit der Arbeitsgruppe von Prof. Trevor C. Dale, School of Biosciences, Cardiff University, Großbritannien, von Kenneth Ewan durchgeführt.

Ein Tetracyclin-induzierbares Mausmodell, welches $\Delta 1\text{-}89\text{-}\beta\text{-Catenin}$ exprimiert und starke intestinale Hyperplasien aufwies, wurde zur Quantifizierung Wnt-abhängiger Zielgenexpression verwendet. Die Tet-O- $\Delta 1\text{-}89\text{-}\beta\text{-Catenin}$ Mäuse trugen sowohl das Tet-O- $\beta\text{-Catenin}$ -Allel als auch das ROSA26-M2-rtTA-Allel und waren ein gemischter SV129 x C57Bl/6-Stamm³⁰³. Die Dünndarmorganoide, welche für die Assays verwendet wurden, wurden von einem 4 Monate alten Männchen erhalten. Die Kolonie wurde in Übereinstimmung mit dem britischen „*Animal (Scientific Procedures) Act*“ (Projektlizenz 30/3279) in Filterkäfigen in einer pathogenfreien Anlage unter 12 h Licht / 12 h Dunkelheit-Zyklen gezüchtet und gepflegt. Wasser und Nahrung wurden *ad libitum* zur Verfügung gestellt.

Der Dünndarm wurde seziiert, mit kaltem PBS gewaschen und längs aufgeschnitten. Die Zotten wurden abgekratzt, bevor der Darm in kleine Stücke zerschnitten und in PBS gewaschen wurde. Fragmente des Epithels wurden vom darunterliegenden Mesenchym und glatten Muskelzellen befreit, indem es mehreren Waschschritten in 2 mM EDTA/PBS-Lösung und PBS bei 4°C unter Schütteln unterzogen wurde. Die Epithelfragmente wurden zentrifugiert (5 min, 500 g), durch ein Sieb (70 μm Porengröße, Greiner) gefiltert und wieder zentrifugiert (5 min, 250 g). Die Krypten wurden in Matrigel (Corning) ausgesät (100-200/50 μL) und in Advanced DMEM (Invitrogen) kultiviert. Das Nährmedium wurde mit 1X B27, 1X N-2, Penicillin/Streptomycin, 0,2% Fungizone, 1X Glutamax,

5 Experimenteller Teil

10 mM HEPES (alle Invitrogen), 50 ng·mL⁻¹ EGF (Sigma), 100 ng·mL⁻¹ Noggin und 400 ng·mL⁻¹ R-spondin-1 (beide Peprotech) supplementiert. Nach 48 h begann die Knospung der Strukturen. Alle 7-10 Tage erfolgte eine Subkultivierung durch mechanisches Lösen in einer 1 mL Pipettenspitze. Nach Zentrifugation (5 min, 250 g) wurden sie in frisches Matrigel ausgesät. Für den Assay wurden die Organoide 48 h in R-spondin-1 freiem Medium kultiviert, das mit 4 µg·mL⁻¹ Doxycyclin (Dox) versetzt wurde, um die Expression von $\Delta 1$ -89- β -Catenin zu induzieren. Anschließend wurde das Medium mit frischem Nährmedium, welches entweder 4 µg·mL⁻¹ Dox, 4 µg·mL⁻¹ Dox und 10 µM Peptid enthielt oder frei von Dox war, ersetzt. Die beiden Kontrollreaktionen wurden für 24 h inkubiert, während die Reaktionen mit Peptid für 2, 6, 10 und 24 h inkubiert wurden. Pro 50 µL Matrigel-Tropfen der Organoide wurden 800 µL Trizol (Invitrogen) zur Zelllyse verwendet. Zur RNA Isolierung wurden pro 50 µL Matrigel-Tropfen 0,2 mg des Co-Präzipitanz Glycogen (Ambion) hinzugegeben und mit einer Chloroform/Isoamyl-Alkohol-Mischung (Sigma Aldrich) auf 20% des Trizol-Volumens verdünnt. Die wässrige Phase wurde entnommen und mit 1 Volumen Isopropanol versetzt, zentrifugiert (20 min, 12.000 g) und das Pellet wurde zweimal in 75%igem Ethanol gewaschen. Genomische DNA (gDNA) wurde mit Hilfe des TURBO DNA-free™ Kit (Ambion) nach Herstellerangaben verdaut. Zur reversen Transkription wurden 700 ng RNA mit dem ImProm-II™ Reverse Transcription System (Promega) umgeschrieben. Die qPCR Analyse erfolgte mit dem SensiFAST SYBR® HI-ROX Kit (Bioline) gemäß Herstellerangaben. Die Sequenzen der verwendeten Primer sowie Amplikonlänge sind Tabelle 45 im Anhang (Kapitel 8.3) zu entnehmen. Die Auswertung der Daten erfolgte nach der $\Delta\Delta C_T$ -Methode zur relativen Quantifizierung der Genexpression. Die Signifikanz wurde mit Hilfe der Varianzanalyse nach Bonferroni ermittelt.

6 Literaturverzeichnis

6 Literaturverzeichnis

- 1 Fosgerau, K. & Hoffmann, T. (2015). Peptide therapeutics: current status and future directions. *Drug Discov Today*, 20, 122-128.
- 2 Yang, N. J. & Hinner, M. J. (2015). Getting across the cell membrane: an overview for small molecules, peptides, and proteins. *Methods Mol Biol*, 1266, 29-53.
- 3 Keller, A. A., Mussbach, F., Breitling, R. et al. (2013). Relationships between Cargo, Cell Penetrating Peptides and Cell Type for Uptake of Non-Covalent Complexes into Live Cells. *Pharmaceuticals (Basel)*, 6, 184-203.
- 4 Schwarze, S. R., Ho, A., Vocero-Akbani, A. & Dowdy, S. F. (1999). In vivo protein transduction: delivery of a biologically active protein into the mouse. *Science*, 285, 1569-1572.
- 5 Eguchi, A. & Dowdy, S. F. (2009). siRNA delivery using peptide transduction domains. *Trends Pharmacol Sci*, 30, 341-345.
- 6 Morris, M. C., Chaloin, L., Mery, J., Heitz, F. & Divita, G. (1999). A novel potent strategy for gene delivery using a single peptide vector as a carrier. *Nucleic Acids Res*, 27, 3510-3517.
- 7 Matsumoto, R., Okochi, M., Shimizu, K. et al. (2015). Effects of the properties of short peptides conjugated with cell-penetrating peptides on their internalization into cells. *Sci Rep*, 5, 12884.
- 8 Dietrich, L., Rathmer, B., Ewan, K. et al. (2017). Cell Permeable Stapled Peptide Inhibitor of Wnt Signaling that Targets β -Catenin Protein-Protein Interactions. *Cell Chemical Biology*, 24, 1-11.
- 9 Pelay-Gimeno, M., Glas, A., Koch, O. & Grossmann, T. N. (2015). Structure-Based Design of Inhibitors of Protein-Protein Interactions: Mimicking Peptide Binding Epitopes. *Angew Chem Int Ed Engl*, 54, 8896-8927.
- 10 Frankel, A. D. & Pabo, C. O. (1988). Cellular uptake of the tat protein from human immunodeficiency virus. *Cell*, 55, 1189-1193.
- 11 Fawell, S., Seery, J., Daikh, Y. et al. (1994). Tat-mediated delivery of heterologous proteins into cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 91, 664-668.
- 12 Ruben, S., Perkins, A., Purcell, R. et al. (1989). Structural and functional characterization of human immunodeficiency virus tat protein. *J Virol*, 63, 1-8.
- 13 Vives, E., Brodin, P. & Lebleu, B. (1997). A truncated HIV-1 Tat protein basic domain rapidly translocates through the plasma membrane and accumulates in the cell nucleus. *J Biol Chem*, 272, 16010-16017.
- 14 Wender, P. A., Mitchell, D. J., Pattabiraman, K. et al. (2000). The design, synthesis, and evaluation of molecules that enable or enhance cellular uptake: peptoid molecular transporters. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 97, 13003-13008.

- 15 Joliot, A., Pernelle, C., Deagostini-Bazin, H. & Prochiantz, A. (1991). Antennapedia homeobox peptide regulates neural morphogenesis. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 88, 1864-1868.
- 16 Derossi, D., Joliot, A. H., Chassaing, G. & Prochiantz, A. (1994). The third helix of the Antennapedia homeodomain translocates through biological membranes. *J Biol Chem*, 269, 10444-10450.
- 17 Mitchell, D. J., Kim, D. T., Steinman, L., Fathman, C. G. & Rothbard, J. B. (2000). Polyarginine enters cells more efficiently than other polycationic homopolymers. *J Pept Res*, 56, 318-325.
- 18 Futaki, S., Suzuki, T., Ohashi, W. et al. (2001). Arginine-rich peptides. An abundant source of membrane-permeable peptides having potential as carriers for intracellular protein delivery. *J Biol Chem*, 276, 5836-5840.
- 19 Schmidt, N., Mishra, A., Lai, G. H. & Wong, G. C. (2010). Arginine-rich cell-penetrating peptides. *FEBS Lett*, 584, 1806-1813.
- 20 Fanghanel, S., Wadhvani, P., Strandberg, E. et al. (2014). Structure analysis and conformational transitions of the cell penetrating peptide transportan 10 in the membrane-bound state. *PLoS One*, 9, e99653.
- 21 Langel, U., Pooga, M., Kairane, C., Zilmer, M. & Bartfai, T. (1992). A galanin-mastoparan chimeric peptide activates the Na⁺,K⁺-ATPase and reverses its inhibition by ouabain. *Regul Pept*, 62, 47-52.
- 22 Pooga, M., Hallbrink, M., Zorko, M. & Langel, U. (1998). Cell penetration by transportan. *FASEB J*, 12, 67-77.
- 23 Soomets, U., Lindgren, M., Gallet, X. et al. (2000). Deletion analogues of transportan. *Biochim Biophys Acta*, 1467, 165-176.
- 24 Mae, M., El Andaloussi, S., Lundin, P. et al. (2009). A stearylated CPP for delivery of splice correcting oligonucleotides using a non-covalent co-incubation strategy. *J Control Release*, 134, 221-227.
- 25 Ezzat, K., Andaloussi, S. E., Zaghloul, E. M. et al. (2011). PepFect 14, a novel cell-penetrating peptide for oligonucleotide delivery in solution and as solid formulation. *Nucleic Acids Res*, 39, 5284-5298.
- 26 Andaloussi, S. E., Lehto, T., Mager, I. et al. (2011). Design of a peptide-based vector, PepFect6, for efficient delivery of siRNA in cell culture and systemically in vivo. *Nucleic Acids Res*, 39, 3972-3987.
- 27 Anko, M., Majhenc, J., Kogej, K. et al. (2012). Influence of stearyl and trifluoromethylquinoline modifications of the cell penetrating peptide TP10 on its interaction with a lipid membrane. *Biochim Biophys Acta*, 1818, 915-924.
- 28 Morris, M. C., Vidal, P., Chaloin, L., Heitz, F. & Divita, G. (1997). A new peptide vector for efficient delivery of oligonucleotides into mammalian cells. *Nucleic Acids Res*, 25, 2730-2736.

- 29 Simeoni, F. (2003). Insight into the mechanism of the peptide-based gene delivery system MPG: implications for delivery of siRNA into mammalian cells. *Nucleic Acids Research*, 31, 2717-2724.
- 30 Gros, E., Deshayes, S., Morris, M. C. et al. (2006). A non-covalent peptide-based strategy for protein and peptide nucleic acid transduction. *Biochim Biophys Acta*, 1758, 384-393.
- 31 Morris, M. C., Depollier, J., Mery, J., Heitz, F. & Divita, G. (2001). A peptide carrier for the delivery of biologically active proteins into mammalian cells. *Nat Biotechnol*, 19, 1173-1176.
- 32 Deshayes, S., Heitz, A., Morris, M. C. et al. (2004). Insight into the Mechanism of Internalization of the Cell-Penetrating Carrier Peptide Pep-1 through Conformational Analysis. *Biochemistry*, 43, 1449-1457.
- 33 Ding, B. & Chen, Z. (2012). Molecular interactions between cell penetrating peptide Pep-1 and model cell membranes. *J Phys Chem B*, 116, 2545-2552.
- 34 Oehlke, J., Scheller, A., Wiesner, B. et al. (1998). Cellular uptake of an alpha-helical amphipathic model peptide with the potential to deliver polar compounds into the cell interior non-endocytically. *Biochim Biophys Acta*, 1414, 127-139.
- 35 Subbarao, N. K., Parente, R. A., Szoka, F. C., Jr., Nadasdi, L. & Pongracz, K. (1987). pH-dependent bilayer destabilization by an amphipathic peptide. *Biochemistry*, 26, 2964-2972.
- 36 Wyman, T. B., Nicol, F., Zelphati, O. et al. (1997). Design, synthesis, and characterization of a cationic peptide that binds to nucleic acids and permeabilizes bilayers. *Biochemistry*, 36, 3008-3017.
- 37 Ziegler, A. (2008). Thermodynamic studies and binding mechanisms of cell-penetrating peptides with lipids and glycosaminoglycans. *Adv Drug Deliv Rev*, 60, 580-597.
- 38 Di Pisa, M., Chassaing, G. & Swiecicki, J. M. (2015). Translocation mechanism(s) of cell-penetrating peptides: biophysical studies using artificial membrane bilayers. *Biochemistry*, 54, 194-207.
- 39 Milletti, F. (2012). Cell-penetrating peptides: classes, origin, and current landscape. *Drug Discov Today*, 17, 850-860.
- 40 Kim, Y. W., Grossmann, T. N. & Verdine, G. L. (2011). Synthesis of all-hydrocarbon stapled alpha-helical peptides by ring-closing olefin metathesis. *Nat Protoc*, 6, 761-771.
- 41 Schafmeister, C., Po, J. & Verdine, G. L. (2000). An All-Hydrocarbon Cross-Linking System for Enhancing the Helicity and Metabolic Stability of Peptides. *J Am Chem Soc*, 122, 5891-5892.
- 42 Kim, Y. W. & Verdine, G. L. (2009). Stereochemical effects of all-hydrocarbon tethers in *i,i*+4 stapled peptides. *Bioorg Med Chem Lett*, 19, 2533-2536.

- 43 Kim, Y. W., Kutchukian, P. S. & Verdine, G. L. (2010). Introduction of all-hydrocarbon $i,i+3$ staples into alpha-helices via ring-closing olefin metathesis. *Org Lett*, 12, 3046-3049.
- 44 Shim, S. Y., Kim, Y. W. & Verdine, G. L. (2013). A new $i, i + 3$ peptide stapling system for alpha-helix stabilization. *Chem Biol Drug Des*, 82, 635-642.
- 45 Kutchukian, P. S., Yang, J. S., Verdine, G. L. & Shakhnovich, E. I. (2009). All-atom model for stabilization of alpha-helical structure in peptides by hydrocarbon staples. *J Am Chem Soc*, 131, 4622-4627.
- 46 Bullock, B. N., Jochim, A. L. & Arora, P. S. (2011). Assessing helical protein interfaces for inhibitor design. *J Am Chem Soc*, 133, 14220-14223.
- 47 Azzarito, V., Long, K., Murphy, N. S. & Wilson, A. J. (2013). Inhibition of alpha-helix-mediated protein-protein interactions using designed molecules. *Nat Chem*, 5, 161-173.
- 48 Cromm, P. M., Spiegel, J. & Grossmann, T. N. (2015). Hydrocarbon stapled peptides as modulators of biological function. *ACS Chem Biol*, 10, 1362-1375.
- 49 Bernal, F., Tyler, A. F., Korsmeyer, S. J., Walensky, L. D. & Verdine, G. L. (2007). Reactivation of the p53 tumor suppressor pathway by a stapled p53 peptide. *J Am Chem Soc*, 129, 2456-2457.
- 50 Walensky, L. D., Kung, A. L., Escher, I. et al. (2004). Activation of apoptosis in vivo by a hydrocarbon-stapled BH3 helix. *Science*, 305, 1466-1470.
- 51 Walensky, L. D., Pitter, K., Morash, J. et al. (2006). A stapled BID BH3 helix directly binds and activates BAX. *Mol Cell*, 24, 199-210.
- 52 Moellering, R. E., Cornejo, M., Davis, T. N. et al. (2009). Direct inhibition of the NOTCH transcription factor complex. *Nature*, 462, 182-188.
- 53 van Meer, G., Voelker, D. R. & Feigenson, G. W. (2008). Membrane lipids: where they are and how they behave. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 9, 112-124.
- 54 Nicolson, G. L. (2014). The Fluid-Mosaic Model of Membrane Structure: still relevant to understanding the structure, function and dynamics of biological membranes after more than 40 years. *Biochim Biophys Acta*, 1838, 1451-1466.
- 55 Weinbaum, S., Tarbell, J. M. & Damiano, E. R. (2007). The structure and function of the endothelial glycocalyx layer. *Annu Rev Biomed Eng*, 9, 121-167.
- 56 Masola, V., Zaza, G., Onisto, M., Lupo, A. & Gambaro, G. (2014). Glycosaminoglycans, proteoglycans and sulodexide and the endothelium: biological roles and pharmacological effects. *Int Angiol*, 33, 243-254.
- 57 Wexselblatt, E., Esko, J. D. & Tor, Y. (2014). On guanidinium and cellular uptake. *J Org Chem*, 79, 6766-6774.

- 58 Gasparini, G., Bang, E. K., Montenegro, J. & Matile, S. (2015). Cellular uptake: lessons from supramolecular organic chemistry. *Chem Commun (Camb)*, 51, 10389-10402.
- 59 White, S. H. & Wimley, W. C. (1999). Membrane protein folding and stability: physical principles. *Annu Rev Biophys Biomol Struct*, 28, 319-365.
- 60 Chan, D. I., Prenner, E. J. & Vogel, H. J. (2006). Tryptophan- and arginine-rich antimicrobial peptides: structures and mechanisms of action. *Biochim Biophys Acta*, 1758, 1184-1202.
- 61 Killian, J. A. & von Heijne, G. (2000). How proteins adapt to a membrane-water interface. *Trends Biochem Sci*, 25, 429-434.
- 62 Bechara, C., Pallerla, M., Zaltsman, Y. et al. (2013). Tryptophan within basic peptide sequences triggers glycosaminoglycan-dependent endocytosis. *FASEB J*, 27, 738-749.
- 63 Persson, S., Killian, J. A. & Lindblom, G. (1998). Molecular ordering of interfacially localized tryptophan analogs in ester- and ether-lipid bilayers studied by 2H-NMR. *Biophys J*, 75, 1365-1371.
- 64 Lipinski, C. A., Lombardo, F., Dominy, B. W. & Feeney, P. J. (2001). Experimental and computational approaches to estimate solubility and permeability in drug discovery and development settings. *Adv Drug Deliv Rev*, 46, 3-26.
- 65 Biron, E., Chatterjee, J., Ovadia, O. et al. (2008). Improving oral bioavailability of peptides by multiple N-methylation: somatostatin analogues. *Angew Chem Int Ed Engl*, 47, 2595-2599.
- 66 Chatterjee, J., Rechenmacher, F. & Kessler, H. (2013). N-methylation of peptides and proteins: an important element for modulating biological functions. *Angew Chem Int Ed Engl*, 52, 254-269.
- 67 Eiriksdottir, E., Konate, K., Langel, U., Divita, G. & Deshayes, S. (2010). Secondary structure of cell-penetrating peptides controls membrane interaction and insertion. *Biochim Biophys Acta*, 1798, 1119-1128.
- 68 Dunkin, C. M., Pokorny, A., Almeida, P. F. & Lee, H. S. (2011). Molecular dynamics studies of transportan 10 (tp10) interacting with a POPC lipid bilayer. *J Phys Chem B*, 115, 1188-1198.
- 69 Magzoub, M., Eriksson, L. E. & Graslund, A. (2002). Conformational states of the cell-penetrating peptide penetratin when interacting with phospholipid vesicles: effects of surface charge and peptide concentration. *Biochim Biophys Acta*, 1563, 53-63.
- 70 Yamashita, H., Kato, T., Oba, M. et al. (2016). Development of a Cell-penetrating Peptide that Exhibits Responsive Changes in its Secondary Structure in the Cellular Environment. *Sci Rep*, 6, 33003.

- 71 Lattig-Tunnemann, G., Prinz, M., Hoffmann, D. et al. (2011). Backbone rigidity and static presentation of guanidinium groups increases cellular uptake of arginine-rich cell-penetrating peptides. *Nat Commun*, 2, 453.
- 72 Lins, L., Decaffmeyer, M., Thomas, A. & Brasseur, R. (2008). Relationships between the orientation and the structural properties of peptides and their membrane interactions. *Biochim Biophys Acta*, 1778, 1537-1544.
- 73 Bird, G. H., Mazzola, E., Opoku-Nsiah, K. et al. (2016). Biophysical determinants for cellular uptake of hydrocarbon-stapled peptide helices. *Nat Chem Biol*, 12, 845-852.
- 74 Verdine, G. L. & Hilinski, G. J. (2012). Stapled peptides for intracellular drug targets. *Methods Enzymol*, 503, 3-33.
- 75 Rothbard, J. B., Jessop, T. C. & Wender, P. A. (2005). Adaptive translocation: the role of hydrogen bonding and membrane potential in the uptake of guanidinium-rich transporters into cells. *Adv Drug Deliv Rev*, 57, 495-504.
- 76 Ter-Avetisyan, G., Tunnemann, G., Nowak, D. et al. (2009). Cell entry of arginine-rich peptides is independent of endocytosis. *J Biol Chem*, 284, 3370-3378.
- 77 Duchardt, F., Fotin-Mleczek, M., Schwarz, H., Fischer, R. & Brock, R. (2007). A comprehensive model for the cellular uptake of cationic cell-penetrating peptides. *Traffic*, 8, 848-866.
- 78 Fretz, M. M., Penning, N. A., Al-Taei, S. et al. (2007). Temperature-, concentration- and cholesterol-dependent translocation of L- and D-octa-arginine across the plasma and nuclear membrane of CD34+ leukaemia cells. *Biochem J*, 403, 335-342.
- 79 Hirose, H., Takeuchi, T., Osakada, H. et al. (2012). Transient focal membrane deformation induced by arginine-rich peptides leads to their direct penetration into cells. *Mol Ther*, 20, 984-993.
- 80 Kosuge, M., Takeuchi, T., Nakase, I., Jones, A. T. & Futaki, S. (2008). Cellular internalization and distribution of arginine-rich peptides as a function of extracellular peptide concentration, serum, and plasma membrane associated proteoglycans. *Bioconjug Chem*, 19, 656-664.
- 81 Henriques, S. T., Quintas, A., Bagatolli, L. A., Hombel, F. & Castanho, M. A. (2007). Energy-independent translocation of cell-penetrating peptides occurs without formation of pores. A biophysical study with pep-1. *Mol Membr Biol*, 24, 282-293.
- 82 Matsuzaki, K., Yoneyama, S., Murase, O. & Miyajima, K. (1996). Transbilayer transport of ions and lipids coupled with mastoparan X translocation. *Biochemistry*, 35, 8450-8456.

- 83 Derossi, D., Calvet, S., Trembleau, A. et al. (1996). Cell internalization of the third helix of the Antennapedia homeodomain is receptor-independent. *J Biol Chem*, 271, 18188-18193.
- 84 Kawamoto, S., Takasu, M., Miyakawa, T. et al. (2011). Inverted micelle formation of cell-penetrating peptide studied by coarse-grained simulation: importance of attractive force between cell-penetrating peptides and lipid head group. *J Chem Phys*, 134, 095103.
- 85 Pouny, Y., Rapaport, D., Mor, A., Nicolas, P. & Shai, Y. (1992). Interaction of antimicrobial dermaseptin and its fluorescently labeled analogues with phospholipid membranes. *Biochemistry*, 31, 12416-12423.
- 86 Ciobanasu, C., Harms, E., Tunnemann, G., Cardoso, M. C. & Kubitscheck, U. (2009). Cell-penetrating HIV1 TAT peptides float on model lipid bilayers. *Biochemistry*, 48, 4728-4737.
- 87 Herce, H. D. & Garcia, A. E. (2007). Molecular dynamics simulations suggest a mechanism for translocation of the HIV-1 TAT peptide across lipid membranes. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 104, 20805-20810.
- 88 Tunnemann, G., Ter-Avetisyan, G., Martin, R. M. et al. (2008). Live-cell analysis of cell penetration ability and toxicity of oligo-arginines. *J Pept Sci*, 14, 469-476.
- 89 Herce, H. D., Garcia, A. E. & Cardoso, M. C. (2014). Fundamental molecular mechanism for the cellular uptake of guanidinium-rich molecules. *J Am Chem Soc*, 136, 17459-17467.
- 90 Herce, H. D., Garcia, A. E., Litt, J. et al. (2009). Arginine-rich peptides destabilize the plasma membrane, consistent with a pore formation translocation mechanism of cell-penetrating peptides. *Biophys J*, 97, 1917-1925.
- 91 Ziegler, A., Nervi, P., Durrenberger, M. & Seelig, J. (2005). The cationic cell-penetrating peptide CPP(TAT) derived from the HIV-1 protein TAT is rapidly transported into living fibroblasts: optical, biophysical, and metabolic evidence. *Biochemistry*, 44, 138-148.
- 92 Verdurmen, W. P., Thanos, M., Ruttekolk, I. R., Gulbins, E. & Brock, R. (2010). Cationic cell-penetrating peptides induce ceramide formation via acid sphingomyelinase: implications for uptake. *J Control Release*, 147, 171-179.
- 93 Richard, J. P., Melikov, K., Vives, E. et al. (2003). Cell-penetrating peptides. A reevaluation of the mechanism of cellular uptake. *J Biol Chem*, 278, 585-590.
- 94 Doherty, G. J. & McMahon, H. T. (2009). Mechanisms of endocytosis. *Annu Rev Biochem*, 78, 857-902.
- 95 Mooren, O. L., Galletta, B. J. & Cooper, J. A. (2012). Roles for actin assembly in endocytosis. *Annu Rev Biochem*, 81, 661-686.
- 96 Conner, S. D. & Schmid, S. L. (2003). Regulated portals of entry into the cell. *Nature*, 422, 37-44.

- 97 Lim, J. P. & Gleeson, P. A. (2011). Macropinocytosis: an endocytic pathway for internalising large gulps. *Immunol Cell Biol*, 89, 836-843.
- 98 McMahon, H. T. & Boucrot, E. (2011). Molecular mechanism and physiological functions of clathrin-mediated endocytosis. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 12, 517-533.
- 99 Pelkmans, L. (2005). Secrets of caveolae- and lipid raft-mediated endocytosis revealed by mammalian viruses. *Biochim Biophys Acta*, 1746, 295-304.
- 100 Lundmark, R., Doherty, G. J., Howes, M. T. et al. (2008). The GTPase-activating protein GRAF1 regulates the CLIC/GEEC endocytic pathway. *Curr Biol*, 18, 1802-1808.
- 101 Schweitzer, J. K., Sedgwick, A. E. & D'Souza-Schorey, C. (2011). ARF6-mediated endocytic recycling impacts cell movement, cell division and lipid homeostasis. *Semin Cell Dev Biol*, 22, 39-47.
- 102 Glebov, O. O., Bright, N. A. & Nichols, B. J. (2006). Flotillin-1 defines a clathrin-independent endocytic pathway in mammalian cells. *Nat Cell Biol*, 8, 46-54.
- 103 Otto, G. P. & Nichols, B. J. (2011). The roles of flotillin microdomains--endocytosis and beyond. *J Cell Sci*, 124, 3933-3940.
- 104 Fotin-Mleczek, M., Welte, S., Mader, O. et al. (2005). Cationic cell-penetrating peptides interfere with TNF signalling by induction of TNF receptor internalization. *J Cell Sci*, 118, 3339-3351.
- 105 Kaplan, I. M., Wadia, J. S. & Dowdy, S. F. (2005). Cationic TAT peptide transduction domain enters cells by macropinocytosis. *J Control Release*, 102, 247-253.
- 106 Nakase, I., Tadokoro, A., Kawabata, N. et al. (2007). Interaction of arginine-rich peptides with membrane-associated proteoglycans is crucial for induction of actin organization and macropinocytosis. *Biochemistry*, 46, 492-501.
- 107 Chu, Q., Moellering, R. E., Hilinski, G. J. et al. (2015). Towards understanding cell penetration by stapled peptides. *Med. Chem. Commun.*, 6, 111-119.
- 108 Staal, F. J., Luis, T. C. & Tiemessen, M. M. (2008). WNT signalling in the immune system: WNT is spreading its wings. *Nat Rev Immunol*, 8, 581-593.
- 109 Rao, T. P. & Kuhl, M. (2010). An updated overview on Wnt signaling pathways: a prelude for more. *Circ Res*, 106, 1798-1806.
- 110 Kohn, A. D. & Moon, R. T. (2005). Wnt and calcium signaling: beta-catenin-independent pathways. *Cell Calcium*, 38, 439-446.
- 111 Montcouquiol, M., Crenshaw, E. B., 3rd & Kelley, M. W. (2006). Noncanonical Wnt signaling and neural polarity. *Annu Rev Neurosci*, 29, 363-386.
- 112 Kim, W., Kim, M. & Jho, E. H. (2013). Wnt/beta-catenin signalling: from plasma membrane to nucleus. *Biochem J*, 450, 9-21.

- 113 Hahne, G. & Grossmann, T. N. (2013). Direct targeting of beta-catenin: Inhibition of protein-protein interactions for the inactivation of Wnt signaling. *Bioorg Med Chem*, 21, 4020-4026.
- 114 Tang, X., Wu, Y., Belenkaya, T. Y. et al. (2012). Roles of N-glycosylation and lipidation in Wg secretion and signaling. *Dev Biol*, 364, 32-41.
- 115 Mikels, A. J. & Nusse, R. (2006). Wnts as ligands: processing, secretion and reception. *Oncogene*, 25, 7461-7468.
- 116 Doubravska, L., Krausova, M., Gradl, D. et al. (2011). Fatty acid modification of Wnt1 and Wnt3a at serine is prerequisite for lipidation at cysteine and is essential for Wnt signalling. *Cell Signal*, 23, 837-848.
- 117 Ren, D. N., Chen, J., Li, Z. et al. (2015). LRP5/6 directly bind to Frizzled and prevent Frizzled-regulated tumour metastasis. *Nat Commun*, 6, 6906.
- 118 MacDonald, B. T. & He, X. (2012). Frizzled and LRP5/6 receptors for Wnt/beta-catenin signaling. *Cold Spring Harb Perspect Biol*, 4.
- 119 Puppo, F., Thome, V., Lhoumeau, A. C. et al. (2011). Protein tyrosine kinase 7 has a conserved role in Wnt/beta-catenin canonical signalling. *EMBO Rep*, 12, 43-49.
- 120 Peradziryi, H., Tolwinski, N. S. & Borchers, A. (2012). The many roles of PTK7: a versatile regulator of cell-cell communication. *Arch Biochem Biophys*, 524, 71-76.
- 121 Ohkawara, B., Glinka, A. & Niehrs, C. (2011). Rspo3 binds syndecan 4 and induces Wnt/PCP signaling via clathrin-mediated endocytosis to promote morphogenesis. *Dev Cell*, 20, 303-314.
- 122 Ho, H. Y. H., Susman, M. W., Bikoff, J. B. et al. (2012). Wnt5a-Ror-Dishevelled signaling constitutes a core developmental pathway that controls tissue morphogenesis. *P Natl Acad Sci USA*, 109, 4044-4051.
- 123 Chen, S., Bubeck, D., MacDonald, B. T. et al. (2011). Structural and functional studies of LRP6 ectodomain reveal a platform for Wnt signaling. *Dev Cell*, 21, 848-861.
- 124 Janda, C. Y. & Garcia, K. C. (2015). Wnt acylation and its functional implication in Wnt signalling regulation. *Biochem Soc Trans*, 43, 211-216.
- 125 Bourhis, E., Wang, W., Tam, C. et al. (2011). Wnt antagonists bind through a short peptide to the first beta-propeller domain of LRP5/6. *Structure*, 19, 1433-1442.
- 126 Tauriello, D. V. F., Jordens, I., Kirchner, K. et al. (2012). Wnt/beta-catenin signaling requires interaction of the Dishevelled DEP domain and C terminus with a discontinuous motif in Frizzled. *P Natl Acad Sci USA*, 109, E812-E820.

- 127 MacDonald, B. T., Yokota, C., Tamai, K., Zeng, X. & He, X. (2008). Wnt signal amplification via activity, cooperativity, and regulation of multiple intracellular PPPSP motifs in the Wnt co-receptor LRP6. *J Biol Chem*, 283, 16115-16123.
- 128 Tamai, K., Zeng, X., Liu, C. et al. (2004). A mechanism for Wnt coreceptor activation. *Mol Cell*, 13, 149-156.
- 129 Schwarz-Romond, T., Metcalfe, C. & Bienz, M. (2007). Dynamic recruitment of axin by Dishevelled protein assemblies. *J Cell Sci*, 120, 2402-2412.
- 130 Xing, Y., Clements, W. K., Kimelman, D. & Xu, W. (2003). Crystal structure of a beta-catenin/axin complex suggests a mechanism for the beta-catenin destruction complex. *Genes Dev*, 17, 2753-2764.
- 131 Dajani, R., Fraser, E., Roe, S. M. et al. (2003). Structural basis for recruitment of glycogen synthase kinase 3beta to the axin-APC scaffold complex. *EMBO J*, 22, 494-501.
- 132 Sobrado, P., Jedlicki, A., Bustos, V. H., Allende, C. C. & Allende, J. E. (2005). Basic region of residues 228-231 of protein kinase CK1alpha is involved in its interaction with axin: binding to axin does not affect the kinase activity. *J Cell Biochem*, 94, 217-224.
- 133 Spink, K. E., Polakis, P. & Weis, W. I. (2000). Structural basis of the Axin-adenomatous polyposis coli interaction. *Embo Journal*, 19, 2270-2279.
- 134 Morrone, S., Cheng, Z., Moon, R. T., Cong, F. & Xu, W. (2012). Crystal structure of a Tankyrase-Axin complex and its implications for Axin turnover and Tankyrase substrate recruitment. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 109, 1500-1505.
- 135 Hsu, W., Zeng, L. & Costantini, F. (1999). Identification of a Domain of Axin That Binds to the Serine/Threonine Protein Phosphatase 2A and a Self-binding Domain. *J Biol Chem*, 274, 3439-3445.
- 136 Major, M. B., Camp, N. D., Berndt, J. D. et al. (2007). Wilms tumor suppressor WTX negatively regulates WNT/beta-catenin signaling. *Science*, 316, 1043-1046.
- 137 Ha, N. C., Tonozuka, T., Stamos, J. L., Choi, H. J. & Weis, W. I. (2004). Mechanism of phosphorylation-dependent binding of APC to beta-catenin and its role in beta-catenin degradation. *Mol Cell*, 15, 511-521.
- 138 Willert, K., Shibamoto, S. & Nusse, R. (1999). Wnt-induced dephosphorylation of axin releases beta-catenin from the axin complex. *Genes Dev*, 13, 1768-1773.
- 139 Amit, S., Hatzubai, A., Birman, Y. et al. (2002). Axin-mediated CKI phosphorylation of beta-catenin at Ser 45: a molecular switch for the Wnt pathway. *Genes Dev*, 16, 1066-1076.
- 140 Liu, C. M., Li, Y. M., Semenov, M. et al. (2002). Control of beta-catenin phosphorylation/degradation by a dual-kinase mechanism. *Cell*, 108, 837-847.

6 Literaturverzeichnis

- 141 Hart, M., Concordet, J. P., Lassot, I. et al. (1999). The F-box protein beta-TrCP associates with phosphorylated beta-catenin and regulates its activity in the cell. *Curr Biol*, 9, 207-210.
- 142 Li, V. S., Ng, S. S., Boersema, P. J. et al. (2012). Wnt signaling through inhibition of beta-catenin degradation in an intact Axin1 complex. *Cell*, 149, 1245-1256.
- 143 Tacchelly-Benites, O., Wang, Z., Yang, E., Lee, E. & Ahmed, Y. (2013). Toggling a conformational switch in Wnt/beta-catenin signaling: regulation of Axin phosphorylation. The phosphorylation state of Axin controls its scaffold function in two Wnt pathway protein complexes. *Bioessays*, 35, 1063-1070.
- 144 Stamos, J. L. & Weis, W. I. (2013). The beta-catenin destruction complex. *Cold Spring Harb Perspect Biol*, 5, a007898.
- 145 Yamamoto, H., Kishida, S., Kishida, M. et al. (1999). Phosphorylation of axin, a Wnt signal negative regulator, by glycogen synthase kinase-3beta regulates its stability. *J Biol Chem*, 274, 10681-10684.
- 146 Tolwinski, N. S., Wehrli, M., Rives, A. et al. (2003). Wg/Wnt signal can be transmitted through arrow/LRP5,6 and Axin independently of Zw3/Gsk3beta activity. *Dev Cell*, 4, 407-418.
- 147 Yokoyama, N. & Malbon, C. C. (2007). Phosphoprotein phosphatase-2A docks to Dishevelled and counterregulates Wnt3a/beta-catenin signaling. *J Mol Signal*, 2, 12.
- 148 Taelman, V. F., Dobrowolski, R., Plouhinec, J. L. et al. (2010). Wnt signaling requires sequestration of glycogen synthase kinase 3 inside multivesicular endosomes. *Cell*, 143, 1136-1148.
- 149 Piao, S., Lee, S. H., Kim, H. et al. (2008). Direct inhibition of GSK3beta by the phosphorylated cytoplasmic domain of LRP6 in Wnt/beta-catenin signaling. *PLoS One*, 3, e4046.
- 150 MacDonald, B. T., Tamai, K. & He, X. (2009). Wnt/beta-catenin signaling: components, mechanisms, and diseases. *Dev Cell*, 17, 9-26.
- 151 Arce, L., Yokoyama, N. N. & Waterman, M. L. (2006). Diversity of LEF/TCF action in development and disease. *Oncogene*, 25, 7492-7504.
- 152 Graham, T. A., Weaver, C., Mao, F., Kimelman, D. & Xu, W. (2000). Crystal structure of a beta-catenin/Tcf complex. *Cell*, 103, 885-896.
- 153 Graham, T. A., Ferkey, D. M., Mao, F., Kimelman, D. & Xu, W. (2001). Tcf4 can specifically recognize beta-catenin using alternative conformations. *Nat Struct Biol*, 8, 1048-1052.
- 154 Fasolini, M., Wu, X., Flocco, M. et al. (2003). Hot spots in Tcf4 for the interaction with beta-catenin. *J Biol Chem*, 278, 21092-21098.

- 155 Daniels, D. L. & Weis, W. I. (2005). Beta-catenin directly displaces Groucho/TLE repressors from Tcf/Lef in Wnt-mediated transcription activation. *Nat Struct Mol Biol*, 12, 364-371.
- 156 Bruhn, L., Munnerlyn, A. & Grosschedl, R. (1997). ALY, a context-dependent coactivator of LEF-1 and AML-1, is required for TCR α enhancer function. *Genes Dev*, 11, 640-653.
- 157 van de Wetering, M. & Clevers, H. (1992). Sequence-specific interaction of the HMG box proteins TCF-1 and SRY occurs within the minor groove of a Watson-Crick double helix. *EMBO J*, 11, 3039-3044.
- 158 Love, J. J., Li, X., Case, D. A. et al. (1995). Structural basis for DNA bending by the architectural transcription factor LEF-1. *Nature*, 376, 791-795.
- 159 Hallikas, O., Palin, K., Sinjushina, N. et al. (2006). Genome-wide prediction of mammalian enhancers based on analysis of transcription-factor binding affinity. *Cell*, 124, 47-59.
- 160 Prieve, M. G., Guttridge, K. L., Munguia, J. & Waterman, M. L. (1998). Differential importin-alpha recognition and nuclear transport by nuclear localization signals within the high-mobility-group DNA binding domains of lymphoid enhancer factor 1 and T-cell factor 1. *Mol Cell Biol*, 18, 4819-4832.
- 161 Atcha, F. A., Syed, A., Wu, B. et al. (2007). A unique DNA binding domain converts T-cell factors into strong Wnt effectors. *Mol Cell Biol*, 27, 8352-8363.
- 162 Takemaru, K. I. & Moon, R. T. (2000). The transcriptional coactivator CBP interacts with beta-catenin to activate gene expression. *J Cell Biol*, 149, 249-254.
- 163 Sun, Y., Kolligs, F. T., Hottiger, M. O. et al. (2000). Regulation of beta -catenin transformation by the p300 transcriptional coactivator. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 97, 12613-12618.
- 164 Kramps, T., Peter, O., Brunner, E. et al. (2002). Wnt/wingless signaling requires BCL9/legless-mediated recruitment of pygopus to the nuclear beta-catenin-TCF complex. *Cell*, 109, 47-60.
- 165 Bienz, M. (2006). The PHD finger, a nuclear protein-interaction domain. *Trends Biochem Sci*, 31, 35-40.
- 166 Carrera, I., Janody, F., Leeds, N., Duveau, F. & Treisman, J. E. (2008). Pygopus activates Wingless target gene transcription through the mediator complex subunits Med12 and Med13. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 105, 6644-6649.
- 167 Kim, S., Xu, X., Hecht, A. & Boyer, T. G. (2006). Mediator is a transducer of Wnt/beta-catenin signaling. *J Biol Chem*, 281, 14066-14075.
- 168 Allen, B. L. & Taatjes, D. J. (2015). The Mediator complex: a central integrator of transcription. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 16, 155-166.

6 Literaturverzeichnis

- 169 Jennings, B. H. & Ish-Horowicz, D. (2008). The Groucho/TLE/Grg family of transcriptional co-repressors. *Genome Biol*, 9, 205.
- 170 Takemaru, K., Yamaguchi, S., Lee, Y. S. et al. (2003). Chibby, a nuclear beta-catenin-associated antagonist of the Wnt/Wingless pathway. *Nature*, 422, 905-909.
- 171 Daniels, D. L. & Weis, W. I. (2002). ICAT inhibits beta-catenin binding to Tcf/Lef-family transcription factors and the general coactivator p300 using independent structural modules. *Mol Cell*, 10, 573-584.
- 172 Fang, M., Li, J., Blauwkamp, T. et al. (2006). C-terminal-binding protein directly activates and represses Wnt transcriptional targets in Drosophila. *EMBO J*, 25, 2735-2745.
- 173 Inestrosa, N. C. & Varela-Nallar, L. (2014). Wnt signaling in the nervous system and in Alzheimer's disease. *J Mol Cell Biol*, 6, 64-74.
- 174 Manolagas, S. C. (2014). Wnt signaling and osteoporosis. *Maturitas*, 78, 233-237.
- 175 Polakis, P. (2012). Wnt signaling in cancer. *Cold Spring Harb Perspect Biol*, 4.
- 176 Cavard, C., Colnot, S., Audard, V. et al. (2008). Wnt/beta-catenin pathway in hepatocellular carcinoma pathogenesis and liver physiology. *Future Oncol*, 4, 647-660.
- 177 Kaur, A., Webster, M. R. & Weeraratna, A. T. (2016). In the Wnt-er of life: Wnt signalling in melanoma and ageing. *Br J Cancer*, 115, 1273-1279.
- 178 Lu, B., Green, B. A., Farr, J. M., Lopes, F. C. & Van Raay, T. J. (2016). Wnt Drug Discovery: Weaving Through the Screens, Patents and Clinical Trials. *Cancers (Basel)*, 8.
- 179 Kahn, M. (2014). Can we safely target the WNT pathway? *Nat Rev Drug Discov*, 13, 513-532.
- 180 Blagodatski, A., Poteryaev, D. & Katanaev, V. (2014). Targeting the Wnt pathways for therapies. *Moll Cell Ther*, 2, 1-15.
- 181 Nagayama, S., Fukukawa, C., Katagiri, T. et al. (2005). Therapeutic potential of antibodies against FZD10, a cell-surface protein, for synovial sarcomas. *Oncogene*, 24, 6201-6212.
- 182 Fukukawa, C., Hanaoka, H., Nagayama, S. et al. (2008). Radioimmunotherapy of human synovial sarcoma using a monoclonal antibody against FZD10. *Cancer Sci*, 2, 432-440.
- 183 Gurney, A., Axelrod, F., Bond, C. J. et al. (2012). Wnt pathway inhibition via the targeting of Frizzled receptors results in decreased growth and tumorigenicity of human tumors. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 109, 11717-11722.

- 184 Le, P. N., McDermott, J. D. & Jimeno, A. (2015). Targeting the Wnt pathway in human cancers: therapeutic targeting with a focus on OMP-54F28. *Pharmacol Ther*, 146, 1-11.
- 185 Lum, L. & Clevers, H. (2012). Cell biology. The unusual case of Porcupine. *Science*, 337, 922-923.
- 186 Chen, B., Dodge, M. E., Tang, W. et al. (2009). Small molecule-mediated disruption of Wnt-dependent signaling in tissue regeneration and cancer. *Nat Chem Biol*, 5, 100-107.
- 187 Wang, X., Moon, J., Dodge, M. E. et al. (2013). The development of highly potent inhibitors for porcupine. *J Med Chem*, 56, 2700-2704.
- 188 Dodge, M. E., Moon, J., Tuladhar, R. et al. (2012). Diverse chemical scaffolds support direct inhibition of the membrane-bound O-acyltransferase porcupine. *J Biol Chem*, 287, 23246-23254.
- 189 Proffitt, K. D., Madan, B., Ke, Z. et al. (2013). Pharmacological inhibition of the Wnt acyltransferase PORCN prevents growth of WNT-driven mammary cancer. *Cancer Res*, 73, 502-507.
- 190 Cheng, D., Zhang, G., Han, D., Gao, W. & Pan, S. N- (hetero)aryl, 2- (hetero)aryl-substituted acetamides for use as wnt signaling modulators. (2010).
- 191 Liu, J., Pan, S., Hsieh, M. H. et al. (2013). Targeting Wnt-driven cancer through the inhibition of Porcupine by LGK974. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 110, 20224-20229.
- 192 Jiang, X., Hao, H. X., Growney, J. D. et al. (2013). Inactivating mutations of RNF43 confer Wnt dependency in pancreatic ductal adenocarcinoma. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 110, 12649-12654.
- 193 Madan, B., Ke, Z., Harmston, N. et al. (2016). Wnt addiction of genetically defined cancers reversed by PORCN inhibition. *Oncogene*, 35, 2197-2207.
- 194 Callow, M. G., Tran, H., Phu, L. et al. (2011). Ubiquitin ligase RNF146 regulates tankyrase and Axin to promote Wnt signaling. *PLoS One*, 6, e22595.
- 195 Martino-Echarri, E., Brocardo, M. G., Mills, K. M. & Henderson, B. R. (2016). Tankyrase Inhibitors Stimulate the Ability of Tankyrases to Bind Axin and Drive Assembly of beta-Catenin Degradation-Competent Axin Puncta. *PLoS One*, 11, e0150484.
- 196 Waaler, J., Machon, O., Tumova, L. et al. (2012). A novel tankyrase inhibitor decreases canonical Wnt signaling in colon carcinoma cells and reduces tumor growth in conditional APC mutant mice. *Cancer Res*, 72, 2822-2832.
- 197 James, R. G., Davidson, K. C., Bosch, K. A. et al. (2012). WIKI4, a novel inhibitor of tankyrase and Wnt/ss-catenin signaling. *PLoS One*, 7, e50457.

- 198 Huang, S. M., Mishina, Y. M., Liu, S. et al. (2009). Tankyrase inhibition stabilizes axin and antagonizes Wnt signalling. *Nature*, 461, 614-620.
- 199 Beurel, E., Grieco, S. F. & Jope, R. S. (2015). Glycogen synthase kinase-3 (GSK3): regulation, actions, and diseases. *Pharmacol Ther*, 148, 114-131.
- 200 Kramer, T., Schmidt, B. & Lo Monte, F. (2012). Small-Molecule Inhibitors of GSK-3: Structural Insights and Their Application to Alzheimer's Disease Models. *Int J Alzheimers Dis*, 2012, 381029.
- 201 Thorne, C. A., Hanson, A. J., Schneider, J. et al. (2010). Small-molecule inhibition of Wnt signaling through activation of casein kinase 1alpha. *Nat Chem Biol*, 6, 829-836.
- 202 Schitteck, B. & Sinnberg, T. (2014). Biological functions of casein kinase 1 isoforms and putative roles in tumorigenesis. *Mol Cancer*, 13, 231.
- 203 Minde, D. P., Anvarian, Z., Rudiger, S. G. & Maurice, M. M. (2011). Messing up disorder: how do missense mutations in the tumor suppressor protein APC lead to cancer? *Mol Cancer*, 10, 101.
- 204 Muller, M. F., Ibrahim, A. E. & Arends, M. J. (2016). Molecular pathological classification of colorectal cancer. *Virchows Arch*, 469, 125-134.
- 205 Morin, P. J., Sparks, A. B., Korinek, V. et al. (1997). Activation of beta-catenin-Tcf signaling in colon cancer by mutations in beta-catenin or APC. *Science*, 275, 1787-1790.
- 206 Emami, K. H., Nguyen, C., Ma, H. et al. (2004). A small molecule inhibitor of beta-catenin/CREB-binding protein transcription [corrected]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 101, 12682-12687.
- 207 Lenz, H. J. & Kahn, M. (2014). Safely targeting cancer stem cells via selective catenin coactivator antagonism. *Cancer Sci*, 105, 1087-1092.
- 208 Takada, K., Zhu, D., Bird, G. H. et al. (2012). Targeted disruption of the BCL9/beta-catenin complex inhibits oncogenic Wnt signaling. *Sci Transl Med*, 4, 148ra117.
- 209 Sampietro, J., Dahlberg, C. L., Cho, U. S. et al. (2006). Crystal structure of a beta-catenin/BCL9/Tcf4 complex. *Mol Cell*, 24, 293-300.
- 210 Lepourcelet, M., Chen, Y. N., France, D. S. et al. (2004). Small-molecule antagonists of the oncogenic Tcf/beta-catenin protein complex. *Cancer Cell*, 5, 91-102.
- 211 Gandhirajan, R. K., Staib, P. A., Minke, K. et al. (2010). Small Molecule Inhibitors of Wnt/ β -Catenin/Lef-1 Signaling Induces Apoptosis in Chronic Lymphocytic Leukemia Cells In Vitro and In Vivo. *Neoplasia*, 12, 326-IN326.

- 212 Gonsalves, F. C., Klein, K., Carson, B. B. et al. (2011). An RNAi-based chemical genetic screen identifies three small-molecule inhibitors of the Wnt/wingless signaling pathway. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 108, 5954-5963.
- 213 BHAGAVATHI, A., NARAYANAN, N. A., DOUDICAN, J. P. et al. (2012). Antagonistic Effect of Small-molecule Inhibitors of Wnt/ β -catenin in Multiple Myeloma. *Anticancer Res*, 32, 4697-4708.
- 214 Nelson, W. J. (2008). Regulation of cell-cell adhesion by the cadherin-catenin complex. *Biochem Soc Trans*, 36, 149-155.
- 215 Valenta, T., Hausmann, G. & Basler, K. (2012). The many faces and functions of beta-catenin. *EMBO J*, 31, 2714-2736.
- 216 Poy, F., Lepourcelet, M., Shivdasani, R. A. & Eck, M. J. (2001). Structure of a human Tcf4-beta-catenin complex. *Nat Struct Biol*, 8, 1053-1057.
- 217 Grossmann, T. N., Yeh, J. T., Bowman, B. R. et al. (2012). Inhibition of oncogenic Wnt signaling through direct targeting of beta-catenin. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 109, 17942-17947.
- 218 Sadler, K., Eom, K. D., Yang, J. L., Dimitrova, Y. & Tam, J. P. (2002). Translocating proline-rich peptides from the antimicrobial peptide bactenecin 7. *Biochemistry*, 41, 14150-14157.
- 219 Fuchs, Y. & Steller, H. (2015). Live to die another way: modes of programmed cell death and the signals emanating from dying cells. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 16, 329-344.
- 220 Vanden Berghe, T., Linkermann, A., Jouan-Lanhouet, S., Walczak, H. & Vandenabeele, P. (2014). Regulated necrosis: the expanding network of non-apoptotic cell death pathways. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 15, 135-147.
- 221 Ishiyama, M., Shiga, M., Sasamoto, K., Mizoguchi, M. & He, P. G. (1993). A New Sulfonated Tetrazolium Salt That Produces a Highly Water-Soluble Formazan Dye. *Chem Pharm Bull*, 41, 1118-1122.
- 222 Ishiyama, M., Sasamoto, K., Shiga, M., Ohkura, Y. & Ueno, K. (1995). Novel Disulfonated Tetrazolium Salt That can be Reduced to a Water-soluble Formazan and its Application to the Assay of Lactate Dehydrogenase. *Analyst*, 120, 113-116.
- 223 Vasconcelos, L., Madani, F., Arukuusk, P. et al. (2014). Effects of cargo molecules on membrane perturbation caused by transportan10 based cell-penetrating peptides. *Biochim Biophys Acta*, 1838, 3118-3129.
- 224 Song, J., Kai, M., Zhang, W. et al. (2011). Cellular uptake of transportan 10 and its analogs in live cells: Selectivity and structure-activity relationship studies. *Peptides*, 32, 1934-1941.

- 225 Yandek, L. E., Pokorny, A., Floren, A. et al. (2007). Mechanism of the cell-penetrating peptide transportan 10 permeation of lipid bilayers. *Biophys J*, 92, 2434-2444.
- 226 Brock, R. (2014). The uptake of arginine-rich cell-penetrating peptides: putting the puzzle together. *Bioconjug Chem*, 25, 863-868.
- 227 Baneyx, F. (1999). Recombinant protein expression in *Escherichia coli*. *Curr Opin Biotechnol*, 10, 411-421.
- 228 Baneyx, F. & Mujacic, M. (2004). Recombinant protein folding and misfolding in *Escherichia coli*. *Nat Biotechnol*, 22, 1399-1408.
- 229 Fink, A. L. (1998). Protein aggregation: folding aggregates, inclusion bodies and amyloid. *Folding and Design*, 3, R9-R23.
- 230 Papanephytou, C. P. & Kontopidis, G. (2014). Statistical approaches to maximize recombinant protein expression in *Escherichia coli*: a general review. *Protein Expr Purif*, 94, 22-32.
- 231 Reinhard, L., Mayerhofer, H., Geerlof, A., Mueller-Dieckmann, J. & Weiss, M. S. (2013). Optimization of protein buffer cocktails using Thermofluor. *Acta Cryst.*, 69, 209-214.
- 232 Niesen, F. H., Berglund, H. & Vedadi, M. (2007). The use of differential scanning fluorimetry to detect ligand interactions that promote protein stability. *Nat Protoc*, 2, 2212-2221.
- 233 Baldwin, R. L. (1996). How Hofmeister ion interactions affect protein stability. *Biophys J*, 71, 2056-2063.
- 234 Salvi, G., De Los Rios, P. & Vendruscolo, M. (2005). Effective interactions between chaotropic agents and proteins. *Proteins*, 61, 492-499.
- 235 Hamada, H., Arakawa, T. & Shiraki, K. (2009). Effect of additives on protein aggregation. *Curr Pharm Biotechnol*, 10, 400-407.
- 236 Salis, A. & Ninham, B. W. (2014). Models and mechanisms of Hofmeister effects in electrolyte solutions, and colloid and protein systems revisited. *Chem Soc Rev*, 43, 7358-7377.
- 237 Kumar, V., Sharma, V. K. & Kalonia, D. S. (2009). Effect of polyols on polyethylene glycol (PEG)-induced precipitation of proteins: Impact on solubility, stability and conformation. *Int J Pharm*, 366, 38-43.
- 238 Vagenende, V., Yap, M. G. & Trout, B. L. (2009). Mechanisms of protein stabilization and prevention of protein aggregation by glycerol. *Biochemistry*, 48, 11084-11096.
- 239 Knowles, D. B., Shkel, I. A., Phan, N. M. et al. (2015). Chemical Interactions of Polyethylene Glycols (PEGs) and Glycerol with Protein Functional Groups:

- Applications to Effects of PEG and Glycerol on Protein Processes. *Biochemistry*, 54, 3528-3542.
- 240 Jayawardene, D. S. & Dass, C. (1999). The effect of N-terminal acetylation and the inhibition activity of acetylated enkephalins on the aminopeptidase M-catalyzed hydrolysis of enkephalins. *Peptides*, 20, 963-970.
- 241 Arnesen, T. (2011). Towards a functional understanding of protein N-terminal acetylation. *PLoS Biol*, 9, e1001074.
- 242 Wallace, R. J. (1992). Acetylation of peptides inhibits their degradation by rumen micro-organisms. *Br J Nutr*, 68, 365-372.
- 243 Zhang, L. & Bulaj, G. (2012). Converting Peptides into Drug Leads by Lipidation. *Curr Med Chem*, 19, 1602-1618.
- 244 Avadisian, M. & Gunning, P. T. (2013). Extolling the benefits of molecular therapeutic lipidation. *Mol Biosyst*, 9, 2179-2188.
- 245 Ragin, A. D., Morgan, R. A. & Chmielewski, J. (2002). Cellular import mediated by nuclear localization signal Peptide sequences. *Chem Biol*, 9, 943-948.
- 246 Lange, A., Mills, R. E., Lange, C. J. et al. (2007). Classical nuclear localization signals: definition, function, and interaction with importin alpha. *J Biol Chem*, 282, 5101-5105.
- 247 Kosugi, S., Hasebe, M., Matsumura, N. et al. (2009). Six classes of nuclear localization signals specific to different binding grooves of importin alpha. *J Biol Chem*, 284, 478-485.
- 248 Cadigan, K. M. & Waterman, M. L. (2012). TCF/LEFs and Wnt signaling in the nucleus. *Cold Spring Harb Perspect Biol*, 4.
- 249 Freeman, E. C., Weiland, L. M. & Meng, W. S. (2013). Modeling the proton sponge hypothesis: examining proton sponge effectiveness for enhancing intracellular gene delivery through multiscale modeling. *J Biomater Sci Polym Ed*, 24, 398-416.
- 250 Sonawane, N. D., Szoka, F. C., Jr. & Verkman, A. S. (2003). Chloride accumulation and swelling in endosomes enhances DNA transfer by polyamine-DNA polyplexes. *J Biol Chem*, 278, 44826-44831.
- 251 Muppidi, A., Li, X., Chen, J. & Lin, Q. (2011). Conjugation of spermine enhances cellular uptake of the stapled peptide-based inhibitors of p53-Mdm2 interaction. *Bioorg Med Chem Lett*, 21, 7412-7415.
- 252 Hahn, F., Schmitz, K., Balaban, T. S., Brase, S. & Schepers, U. (2008). Conjugation of spermine facilitates cellular uptake and enhances antitumor and antibiotic properties of highly lipophilic porphyrins. *ChemMedChem*, 3, 1185-1188.

- 253 Roehrl, M. H., Wang, J. Y. & Wagner, G. (2004). A general framework for development and data analysis of competitive high-throughput screens for small-molecule inhibitors of protein-protein interactions by fluorescence polarization. *Biochemistry*, 43, 16056-16066.
- 254 Lea, W. A. & Simeonov, A. (2011). Fluorescence polarization assays in small molecule screening. *Expert Opin Drug Discov*, 6, 17-32.
- 255 Lanier, M., Schade, D., Willems, E. et al. (2012). Wnt inhibition correlates with human embryonic stem cell cardiomyogenesis: a structure-activity relationship study based on inhibitors for the Wnt response. *J Med Chem*, 55, 697-708.
- 256 Stark, C., Breitkreutz, B. J., Reguly, T. et al. (2006). BioGRID: a general repository for interaction datasets. *Nucleic Acids Res*, 34, D535-539.
- 257 Cruciat, C. M., Dolde, C., de Groot, R. E. et al. (2013). RNA helicase DDX3 is a regulatory subunit of casein kinase 1 in Wnt-beta-catenin signaling. *Science*, 339, 1436-1441.
- 258 Bol, G. M., Vesuna, F., Xie, M. et al. (2015). Targeting DDX3 with a small molecule inhibitor for lung cancer therapy. *EMBO Mol Med*, 7, 648-669.
- 259 Datta, A., Bagchi, S., Nag, A. et al. (2001). The p48 subunit of the damaged-DNA binding protein DDB associates with the CBP/p300 family of histone acetyltransferase. *Mutat Res*, 486, 89-97.
- 260 Kawajiri, K., Kobayashi, Y., Ohtake, F. et al. (2009). Aryl hydrocarbon receptor suppresses intestinal carcinogenesis in ApcMin/+ mice with natural ligands. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 106, 13481-13486.
- 261 Bauer, A., Chauvet, S., Huber, O. et al. (2000). Pontin52 and reptin52 function as antagonistic regulators of beta-catenin signalling activity. *EMBO J*, 19, 6121-6130.
- 262 Kim, J. H., Choi, H. J., Kim, B. et al. (2006). Roles of sumoylation of a reptin chromatin-remodelling complex in cancer metastasis. *Nat Cell Biol*, 8, 631-639.
- 263 Kim, J. H., Lee, J. M., Nam, H. J. et al. (2007). SUMOylation of pontin chromatin-remodeling complex reveals a signal integration code in prostate cancer cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 104, 20793-20798.
- 264 Sadot, E., Geiger, B., Oren, M. & Ben-Ze'ev, A. (2001). Down-regulation of beta-catenin by activated p53. *Mol Cell Biol*, 21, 6768-6781.
- 265 Krois, A. S., Ferreon, J. C., Martinez-Yamout, M. A., Dyson, H. J. & Wright, P. E. (2016). Recognition of the disordered p53 transactivation domain by the transcriptional adapter zinc finger domains of CREB-binding protein. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 113, E1853-1862.
- 266 Low, T. Y., Peng, M., Magliozzi, R. et al. (2014). A systems-wide screen identifies substrates of the SCFbetaTrCP ubiquitin ligase. *Sci Signal*, 7, rs8.

- 267 Lee, Y. H. & Stallcup, M. R. (2006). Interplay of Fli-1 and FLAP1 for regulation of beta-catenin dependent transcription. *Nucleic Acids Res*, 34, 5052-5059.
- 268 Mosimann, C., Hausmann, G. & Basler, K. (2009). Beta-catenin hits chromatin: regulation of Wnt target gene activation. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 10, 276-286.
- 269 Conaway, R. C. & Conaway, J. W. (2011). Function and regulation of the Mediator complex. *Curr Opin Genet Dev*, 21, 225-230.
- 270 Miller, J. E. & Reese, J. C. (2012). Ccr4-Not complex: the control freak of eukaryotic cells. *Crit Rev Biochem Mol Biol*, 47, 315-333.
- 271 Kerr, S. C., Azzouz, N., Fuchs, S. M. et al. (2011). The Ccr4-Not complex interacts with the mRNA export machinery. *PLoS One*, 6, e18302.
- 272 Sato, S., Idogawa, M., Honda, K. et al. (2005). Beta-catenin interacts with the FUS proto-oncogene product and regulates pre-mRNA splicing. *Gastroenterology*, 129, 1225-1236.
- 273 Tian, Q., Feetham, M. C., Tao, W. A. et al. (2004). Proteomic analysis identifies that 14-3-3zeta interacts with beta-catenin and facilitates its activation by Akt. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 101, 15370-15375.
- 274 Chen, H. H., Yu, H. I., Cho, W. C. & Tarn, W. Y. (2015). DDX3 modulates cell adhesion and motility and cancer cell metastasis via Rac1-mediated signaling pathway. *Oncogene*, 34, 2790-2800.
- 275 Gareau, J. R., Reverter, D. & Lima, C. D. (2012). Determinants of small ubiquitin-like modifier 1 (SUMO1) protein specificity, E3 ligase, and SUMO-RanGAP1 binding activities of nucleoporin RanBP2. *J Biol Chem*, 287, 4740-4751.
- 276 Jamieson, C., Sharma, M. & Henderson, B. R. (2014). Targeting the beta-catenin nuclear transport pathway in cancer. *Semin Cancer Biol*, 27, 20-29.
- 277 Shitashige, M., Satow, R., Honda, K. et al. (2008). Regulation of Wnt signaling by the nuclear pore complex. *Gastroenterology*, 134, 1961-1971, 1971 e1961-1964.
- 278 Niessen, C. M. & Gottardi, C. J. (2008). Molecular components of the adherens junction. *Bba-Biomembranes*, 1778, 562-571.
- 279 Kowalczyk, A. P. & Green, K. J. (2013). Structure, Function, and Regulation of Desmosomes. *Prog Mol Biol Transl*, 116, 95-118.
- 280 Huber, A. H., Stewart, D. B., Laurents, D. V., Nelson, W. J. & Weis, W. I. (2001). The cadherin cytoplasmic domain is unstructured in the absence of beta-catenin. A possible mechanism for regulating cadherin turnover. *J Biol Chem*, 276, 12301-12309.
- 281 Choi, H. J., Huber, A. H. & Weis, W. I. (2006). Thermodynamics of beta-catenin-ligand interactions: the roles of the N- and C-terminal tails in modulating binding affinity. *J Biol Chem*, 281, 1027-1038.

- 282 Pokutta, S. & Weis, W. I. (2000). Structure of the dimerization and beta-catenin-binding region of alpha-catenin. *Mol Cell*, 5, 533-543.
- 283 Desai, B. V., Harmon, R. M. & Green, K. J. (2009). Desmosomes at a glance. *J Cell Sci*, 122, 4401-4407.
- 284 Kowalczyk, A. P., Bornslaeger, E. A., Borgwardt, J. E. et al. (1997). The amino-terminal domain of desmoplakin binds to plakoglobin and clusters desmosomal cadherin-plakoglobin complexes. *J Cell Biol*, 139, 773-784.
- 285 Shibata, T., Gotoh, M., Ochiai, A. & Hirohashi, S. (1994). Association of plakoglobin with APC, a tumor suppressor gene product, and its regulation by tyrosine phosphorylation. *Biochem Biophys Res Commun*, 203, 519-522.
- 286 Kodama, S., Ikeda, S., Asahara, T., Kishida, M. & Kikuchi, A. (1999). Axin directly interacts with plakoglobin and regulates its stability. *J Biol Chem*, 274, 27682-27688.
- 287 Sadot, E., Simcha, I., Iwai, K. et al. (2000). Differential interaction of plakoglobin and beta-catenin with the ubiquitin-proteasome system. *Oncogene*, 19, 1992-2001.
- 288 Huber, O., Korn, R., McLaughlin, J. et al. (1996). Nuclear localization of beta-catenin by interaction with transcription factor LEF-1. *Mech Dev*, 59, 3-10.
- 289 Maeda, O., Usami, N., Kondo, M. et al. (2004). Plakoglobin (gamma-catenin) has TCF/LEF family-dependent transcriptional activity in beta-catenin-deficient cell line. *Oncogene*, 23, 964-972.
- 290 Zhurinsky, J., Shtutman, M. & Ben-Ze'ev, A. (2000). Plakoglobin and beta-catenin: protein interactions, regulation and biological roles. *J Cell Sci*, 113 (Pt 18), 3127-3139.
- 291 Hou, R., Liu, L., Anees, S., Hiroyasu, S. & Sibinga, N. E. (2006). The Fat1 cadherin integrates vascular smooth muscle cell growth and migration signals. *J Cell Biol*, 173, 417-429.
- 292 Guo, Z., Neilson, L. J., Zhong, H. et al. (2014). E-cadherin interactome complexity and robustness resolved by quantitative proteomics. *Sci Signal*, 7, rs7.
- 293 Chen, T. C., Lin, K. T., Chen, C. H. et al. (2014). Using an in situ proximity ligation assay to systematically profile endogenous protein-protein interactions in a pathway network. *J Proteome Res*, 13, 5339-5346.
- 294 Choi, H. J., Gross, J. C., Pokutta, S. & Weis, W. I. (2009). Interactions of plakoglobin and beta-catenin with desmosomal cadherins: basis of selective exclusion of alpha- and beta-catenin from desmosomes. *J Biol Chem*, 284, 31776-31788.
- 295 Forbes, S. A., Beare, D., Gunasekaran, P. et al. (2015). COSMIC: exploring the world's knowledge of somatic mutations in human cancer. *Nucleic Acids Res*, 43, D805-811.

- 296 Fujii, N., You, L., Xu, Z. et al. (2007). An antagonist of dishevelled protein-protein interaction suppresses beta-catenin-dependent tumor cell growth. *Cancer Res*, 67, 573-579.
- 297 Vlad-Fiegen, A., Langerak, A., Eberth, S. & Muller, O. (2012). The Wnt pathway destabilizes adherens junctions and promotes cell migration via beta-catenin and its target gene cyclin D1. *FEBS Open Bio*, 2, 26-31.
- 298 Li, Y., Bavarva, J. H., Wang, Z. et al. (2011). HEF1, a novel target of Wnt signaling, promotes colonic cell migration and cancer progression. *Oncogene*, 30, 2633-2643.
- 299 Iskit, S., Schlicker, A., Wessels, L. & Peeper, D. S. (2015). Fra-1 is a key driver of colon cancer metastasis and a Fra-1 classifier predicts disease-free survival. *Oncotarget*, 6, 43146-43161.
- 300 Clevers, H. (2013). The intestinal crypt, a prototype stem cell compartment. *Cell*, 154, 274-284.
- 301 Sato, T., van Es, J. H., Snippert, H. J. et al. (2011). Paneth cells constitute the niche for Lgr5 stem cells in intestinal crypts. *Nature*, 469, 415-418.
- 302 Van der Flier, L. G., Sabates-Bellver, J., Oving, I. et al. (2007). The Intestinal Wnt/TCF Signature. *Gastroenterology*, 132, 628-632.
- 303 Jarde, T., Evans, R. J., McQuillan, K. L. et al. (2013). In vivo and in vitro models for the therapeutic targeting of Wnt signaling using a Tet-ODeltaN89beta-catenin system. *Oncogene*, 32, 883-893.
- 304 Schuijers, J., Junker, J. P., Mokry, M. et al. (2015). Ascl2 acts as an R-spondin/Wnt-responsive switch to control stemness in intestinal crypts. *Cell Stem Cell*, 16, 158-170.
- 305 Malliri, A., Rygiel, T. P., van der Kammen, R. A. et al. (2006). The rac activator Tiam1 is a Wnt-responsive gene that modifies intestinal tumor development. *J Biol Chem*, 281, 543-548.
- 306 He, T. C., Sparks, A. B., Rago, C. et al. (1998). Identification of c-MYC as a target of the APC pathway. *Science*, 281, 1509-1512.
- 307 Jho, E. H., Zhang, T., Domon, C. et al. (2002). Wnt/beta-catenin/Tcf signaling induces the transcription of Axin2, a negative regulator of the signaling pathway. *Mol Cell Biol*, 22, 1172-1183.
- 308 Bekku, S., Mochizuki, H., Takayama, E. et al. (1998). Carbonic anhydrase I and II as a differentiation marker of human and rat colonic enterocytes. *Res Exp Med (Berl)*, 198, 175-185.
- 309 Bechara, C. & Sagan, S. (2013). Cell-penetrating peptides: 20 years later, where do we stand? *FEBS Lett*, 587, 1693-1702.

6 Literaturverzeichnis

- 310 Krausova, M. & Korinek, V. (2014). Wnt signaling in adult intestinal stem cells and cancer. *Cell Signal*, 26, 570-579.
- 311 Albuquerque, C., Bakker, E. R., van Veelen, W. & Smits, R. (2011). Colorectal cancers choosing sides. *Biochim Biophys Acta*, 1816, 219-231.
- 312 Markowitz, S. D. & Bertagnolli, M. M. (2009). Molecular origins of cancer: Molecular basis of colorectal cancer. *N Engl J Med*, 361, 2449-2460.
- 313 Gasteiger, E., Hoogland, C., Gattiker, A. et al. (2005). in *The Proteomics Protocols Handbook* (ed Walker, J. M.) 571-607 (Humana Press).
- 314 Hubner, N. C. & Mann, M. (2011). Extracting gene function from protein-protein interactions using Quantitative BAC InteraCtomics (QUBIC). *Methods*, 53, 453-459.
- 315 Cox, J. & Mann, M. (2008). MaxQuant enables high peptide identification rates, individualized p.p.b.-range mass accuracies and proteome-wide protein quantification. *Nat Biotechnol*, 26, 1367-1372.
- 316 Cox, J., Hein, M. Y., Lubner, C. A. et al. (2014). Accurate proteome-wide label-free quantification by delayed normalization and maximal peptide ratio extraction, termed MaxLFQ. *Mol Cell Proteomics*, 13, 2513-2526.
- 317 Tyanova, S., Temu, T., Sinitcyn, P. et al. (2016). The Perseus computational platform for comprehensive analysis of (prote)omics data. *Nat Methods*, 13, 731-740.
- 318 Schindelin, J., Arganda-Carreras, I. & Frise, E. (2012). Fiji: an open-source platform for biological-image analysis. *Nat Methods*, 9, 676-682.

7 Abkürzungsverzeichnis

7 Abkürzungsverzeichnis

A

abs.	absolut
Ac	Acetyl-
Ac ₂ O	Essigsäureanhydrid
ACN	Acetonitril
AcOH	Essigsäure
AP	Alkalische Phosphatase
APC	Adenomatous-polyposis-coli
APS	Ammoniumpersulfat
Äq	Äquivalent
AS	Aminosäure
AU	willkürliche Einheiten (engl. <i>arbitrary units</i>)

B

b	D-Biotin
BCIP	5-Brom-4-chlor-3-indolyl-phosphat-p-Toluidinsalz
BCL9	<i>B-cell lymphoma 9</i>
BME	β-Mercaptoethanol
Boc	tert-butyloxycarbonyl
bp	Basenpaar (engl. <i>basepair</i>)
BSA	Rinderserumalbumin (engl. <i>bovine serum albumin</i>)

C

CBD	β-Catenin-bindende Domäne
CBP	CREB-bindendes Protein

CK1	Casein Kinase
COMU	1-Cyano-2-ethoxy-2-oxoethylidenaminoxy)dimethylamino-morpholino-carbenium-hexafluorophosphat
CPP	Zellpenetrierendes Peptid (engl. <i>Cell-Penetrating Peptide</i>)
CREB	cAMP response element-binding protein (dt. cAMP-Response-Element-bindendes Protein)
CtBP	C-terminal-binding protein
Cya	Cysteamin
D	
Da	Dalton, $\text{g}\cdot\text{mol}^{-1}$
DAPI	4',6-diamidino-2-phenylindol
DCE	1,2-Dichloroethan
DCM	Dichlormethan
ddH ₂ O	doppeltdeionisiertes Wasser
DIPEA	<i>N,N</i> -Diisopropylethylamin
DMEM	Dulbecco's modified Eagle's medium
DMF	Dimethylformamid
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNase	Desoxyribonuklease
DVL	Dishevelled
E	
ECD	Extrazelluläre Domäne
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>

7 Abkürzungsverzeichnis

EDT	1,2-Ethandithiol
EDTA	Ethylenediaminetetraacetat
ER	Endoplasmatisches Retikulum
ESI	Electrospray-Ionisation
<i>et al.</i>	und andere (lat. <i>et alii</i>)
Et ₂ O	Diethylether
EtOH	Ethanol
F	
<i>f</i> -	FITC-
FAM	5(6)-Carboxyfluorescein
FCS	fötales Kälberserum (engl. <i>fetal calf serum</i>)
FITC	Fluorescein 5-Isothiocyanat
Fmoc	9-Fluorenylmethoxycarbonyl
FP	Fluoreszenzpolarisation
FSC	Vorwärtsstreulicht (engl. <i>forward scatter</i>)
FZD	Frizzled
G	
g	Gravitationsgeschwindigkeit, 9,83 m·s ⁻²
GAG	Glykosaminoglykan
GPCR	G-Protein-gekoppelter Rezeptor
GSH	Glutathion
GSK3	Glykogensynthase-Kinase 3
GST	Glutathion-S-Transferase

H

HATU	2-(7-Aza-1H-benzotriazole-1-yl)-1,1,3,3-tetramethyluronium hexafluorophosphat
HBTU	2-(1H-benzotriazol-1-yl)-1,1,3,3-tetramethyluronium hexafluorophosphat
HCTU	2-(6-Chlor-1H-benzotriazol-1-yl)-1,1,3,3-tetramethylaminium-hexafluorophosphat
HEPES	2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl)-ethansulfonsäure
HOBt	Hydroxybenzotriazole
HPLC	Hochleistungsflüssigkeits-chromatographie (engl. <i>high performance liquid chromatography</i>)
HRMS	Hochaufgelöste Massenspektrometrie (engl. <i>high resolution mass spectrometry</i>)

I

ICAT	Inhibitor of β -Catenin and TCF
ICD	Intrazelluläre Domäne
IPTG	Isopropyl- β -D-thiogalactopyranosid

L

LB	Luria-Bertani
LEF	<i>lymphoid enhancer-binding factor</i>
LIC	Ligations-unabhängige Klonierung (engl. <i>ligation independent cloning</i>)
LRP5/6	low-density lipoprotein-related protein 5/6

7 Abkürzungsverzeichnis

M

M	Molekulargewicht
MALDI/TOF	Matrix-unterstützte Laser-Desorption/Ionisation Flugzeit Massenspektrometrie (engl. <i>matrix-assisted laser desorption and ionisation time-of-flight</i>)
MBHA	p-Methylbenzhydrylamin
MBOAT	membran-gebundene O-Acyltransferase (engl. <i>membrane-bound O-acyl transferase</i>)
MeOH	Methanol
Mmt	4-Monomethoxytrityl
MS	Massenspektrometrie
MWS	Größenmarker (engl. <i>molecular weight standard</i>)

N

NaPi	Natriumphosphat
Ni-NTA	Nickel-Nitrilotriessigsäure (engl. <i>nickel-nitrilotriacetic acid</i>)
NLS	Kernlokalisierungssequenz (engl. <i>nuclear localization sequence</i>)
NMP	N-methyl-2-pyrrolidon

O

ODT	1,8-Octanedithiol
Oxyrna	Ethyl-2-cyano-2-(hydroxyimino)acetat

P

PAGE	Polyacrylamidgelelektrophorese
PARP	Poly(ADP-Ribose)-Polymerase
PBS	Phosphat-gepufferte Salzlösung (engl. <i>phosphate buffered saline</i>)
PCR	Polymerase-Kettenreaktion (engl. <i>polymerase chain reaction</i>)
PEG	Polyethylenglykol
pI	isoelektrischer Punkt
PMSF	Phenylmethylsulfonylfluorid
Porc	Porcupine
PPI	Protein-Protein-Interaktion
PyBOP	Benzotriazol-1-yl-oxytripyrrolidino-phosphonium-hexafluorophosphat
Pygo	Pygopus

R

RCM	Ringschlussmetathese (engl. <i>ring-closing metathesis</i>)
RRP	Arginin-reiches Peptid
RP	Umkehrphase (engl. <i>reversed phase</i>)
rpm	Umdrehungen pro Minute (engl. <i>revolutions per minute</i>)
RT	Raumtemperatur

S

SAP	Alkalische Phosphatase aus <i>Pandalus borealis</i> (engl. <i>shrimp alkaline phosphatase</i>)
SDS	Natriumdodecylsulfat (engl. <i>sodium dodecyl sulfate</i>)

7 Abkürzungsverzeichnis

SOC	<i>super optimal broth with catabolite repressor</i>
SPPS	Festphasen-Peptidsynthese (engl. <i>solid-phase peptide synthesis</i>)
SSC	Seitenstreuung (engl. <i>side scatter</i>)
SV	Säulenvolumen
T	
TAE	Tris-Acetat-EDTA
TB	terrific broth
TBS	Tris-gepufferte Salzlösung (engl. <i>tris-buffered saline</i>)
TCF	<i>T-cell factor</i>
TCEP	Tris(2-chlorethyl)phosphat
TEMED	Tetramethylethylendiamin
TEV	<i>tobacco etch virus</i>
TFA	Trifluoressigsäure
TIPS	Triisopropylsilan
T _m	Schmelztemperatur
TNKS	Tankyrase
Tricin	<i>N</i> -(Tri(hydroxymethyl)methyl)glycin
Tris	Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan
U	
U	Enzymeinheit
UV	Ultraviolett

V

v/v Volumen pro Volumen

W

w/v Gewicht pro Volume (engl. *weight per volume*)

WST-1 *water-soluble tetrazolium salt-1*

X

X (S)-2-(4'-Pentenyl)alanin

8 Anhang

8.1 Festphasen-Peptidsynthese

Tabelle 43: Liste der synthetisierten Peptide und ihrer analytischen Daten. Reinheit und Identität wurden mittels HPLC-ESI/MS und HRMS überprüft. C-terminal weisen die Peptide Amide anstatt der freien Carbonsäure auf. Pep-1 und MPG weisen ein C-terminales Cysteamin auf. Die Ausbeute wurde UV/VIS-spektroskopisch und aus dem Lambert Beer'schen Gesetz mit dem Extinktionskoeffizienten von FITC oder des Peptids bestimmt (Kapitel 5.3.1). M = Molekulargewicht, FITC = Fluorescein Isothiocyanat, PEG₂ = 8-Amino-3,6-Dioxyoctanoyl, PEG₅ = Amino-penta(Ethylenglycol)-omega-carboxyl, Ac = Acetylgruppe, sp = Spermin, NLS = Kernlokalisierungssequenz, C₆ = Capronsäure, C₁₆ = Palmitinsäure, X = (S)-2-(4'-Pentenyl)alanin, b = D-Biotin, n.b. = nicht bestimmt.

Peptid	Ausbeute / %	Sequenz	MS			HRMS		
			M / g·mol ⁻¹	berechnet m/z	gefunden m/z	M / g·mol ⁻¹	berechnet m/z	gefunden m/z
<i>f</i> -Bac ₁₅₋₂₄	36	FITC-PEG ₂ -PRPLPFPRPG	1666,9	834,5/556,7	834,1/556,5	1665,7762	833,8954	833,8936
<i>f</i> -Tat ₄₉₋₅₇	7,4	FITC-PEG ₂ -RKKRRQRRR	1873,2	625,4/469,3	625,2/469,1	1871,9914	375,4056	375,4020
<i>f</i> -R ₈	12	FITC-PEG ₂ -RRRRRRRR	1801,1	601,4/451,3	601,2/451,1	1799,9451	479,4918	479,4883
<i>f</i> -Penetratin	7,8	FITC-PEG ₂ -RQIKIWFQNRRMKWKK	2780,3	927,7/696,1	927,5/695,9	2778,4152	927,1457	927,1463
<i>f</i> -TP10	4,8	FITC-PEG ₂ - AGYLLGKINLKALAALAKKIL	2716,3	906,4/680,1	906,23/680,0	2714,5234	905,8484	905,8502
<i>f</i> -Pep-1	0,2	FITC-PEG ₂ -KETWWETWWTEW SQPKKKRKV-cya	3441,9	1148,3/861,5	1148,1/861,4	3439,5947	n.b.	n.b.
<i>f</i> -MPG	0,3	FITC-PEG ₂ -GALFLGFLGAAGSTMGAW SQPKKKRKV-cya	3401,0	851,3/681,2	851,3/681,2	3398,6767	n.b.	n.b.
<i>f</i> -SAHM1	0,9	FITC-PEG ₂ -ERLRRRILCRXHHST	2618,1	873,7/655,5	873,2/655,1	2616,3192	872,4418	872,4410
<i>f</i> -StAx	3,7	FITC-PEG ₂ -RRWPRXILDHXVRRVWR	2885,4	722,4/578,1	722,3/577,9	2883,5132	1442,7639	1442,7624
Ac-StAx	6,9	Ac-RRWPRXILDHXVRRVWR	2392,9	599,2	599,1	2391,4141	399,5763	399,5772
C ₆ -StAx	5,6	C ₆ -RRWPRXILDHXVRRVWR	2449,0	613,3	613,2	2447,4767	n.b.	n.b.
C ₁₆ -StAx	2,3	C ₁₆ -RRWPRXILDHXVRRVWR	2589,3	864,1/648,3	863,8/648,3	2587,6332	n.b.	n.b.
H ₂ N-StAx	13,9	RRWPRXILDHXVRRVWR	2350,9	588,7/471,2	588,6/471,1	2349,4035	392,5745	392,5756

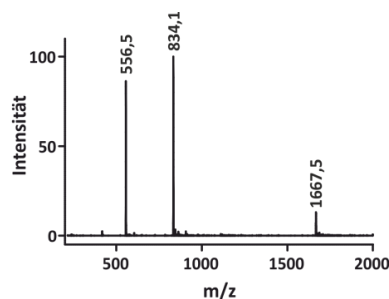
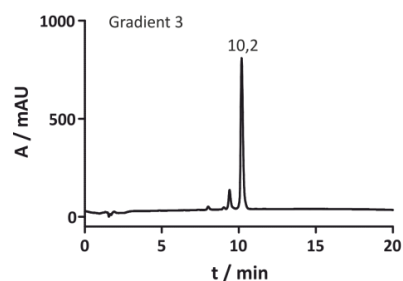
Peptid	Ausbeute / %	Sequenz	MS			HRMS		
			M / g·mol ⁻¹	berechnet m/z	gefunden m/z	M / g·mol ⁻¹	berechnet m/z	gefunden m/z
<i>sp</i> -StAx	4,2	Spermin-RRWPRXILDXHVRVWR	2635,3	659,8/528,1	659,8/528,0	2633,6248	439,9447	439,9459
<i>NLS</i> -StAx	6,0	NLS-PEG ₂ -RRWPRXILDXHVRVWR	3361,2	673,2/561,2	673,0/561,1	3359,0796	560,8539	560,8552
<i>f</i> -StAx-h	2,6	FITC-PEG ₂ -hhWPhXILDXHVVhVWh	2969,6	743,4/594,9	743,1/594,4	2967,6071	1484,8108	1484,8064
<i>f</i> -NLS-StAx-h	8,8	FITC-PEG ₂ -PKKKRKV-PEG ₂ -hhWPhXILDXHVVhVWh	3979,9	1327,6/996,0	1327,5/996,0	2835,7010	995,3281	995,3262
<i>b</i> -StAx-h	5,9	Biotin-PEG ₅ -hhWPhXILDXHVVhVWh	2952,7	985,2/739,2	985,0/739,2	2950,7432	984,5884	984,5895
<i>f</i> -StCo-h	4,8	FITC-PEG ₂ -hhWPhXILHXDVhhVAh	2854,4	952,5/714,6	952,1/714,5	2852,5649	951,8623	951,8619
<i>H₂N</i> -StCo-h	6	hhWPhXILHXDVhhVAh	2319,9	581,0/465,0	580,7/464,9	2318,4552	773,8257	773,8250
<i>NLS</i> -StCo-h	10	PKKKRKV-PEG ₂ -hhWPhXILHXDVhhVAh	3330,1	509,3/445,8	508,5/445,0	3328,1313	666,6335	666,6309
<i>b</i> -StCo-h	19	Biotin-PEG ₅ -hhWPhXILHXDVhhVAh	2837,5	710,4/568,5	710,4/568,7	2835,7010	946,2410	946,2434
<i>Ac</i> -StAx-h	4,2	Ac-hhWPhXILDXHVVhVWh	2477,1	620,3/496,4	620,1/496,1	2475,0670	826,1771	826,1759
<i>C₆</i> -StAx-h	4,2	<i>C₆</i> -hhWPhXILDXHVVhVWh	2533,2	634,3/507,6	634,1/507,6	2531,5706	n.b.	n.b.
<i>C₁₆</i> -StAx-h	2,0	<i>C₁₆</i> -hhWPhXILDXHVVhVWh	2673,0	669,4	669,2	2671,7271	n.b.	n.b.
<i>H₂N</i> -StAx-h	4,6	hhWPhXILDXHVVhVWh	2435,0	609,8/488,0	609,6/487,8	2433,4974	812,1731	812,1751
<i>sp</i> -StAx-h	1,1	Spermin-hhWPhXILDXHVVhVWh	2719,4	680,9	680,6	2717,7187	n.b.	n.b.
<i>NLS</i> -StAx-h	6,0	PKKKRKV-PEG ₂ -hhWPhXILDXHVVhVWh	TFA·(3445.3)	890,8/712,9/	890,6/712,8	3443,1735	861,8007	861,7970
<i>f</i> -StAx-p	0,2	FITC-PEG ₂ -ppWpXILDXHVPpVWp	3173,7	794,4/635,7	794,2/635,5	3171,5132	1058,1784	1058,1811
<i>Ac</i> -StAx-p	3,7	Ac-ppWpXILDXHVPpVWp	2681,2	671,3/537,2	671,0/536,9	2679,4141	n.b.	n.b.
<i>C₆</i> -StAx-p	4,3	<i>C₆</i> -ppWpXILDXHVPpVWp	2737,3	685,3/548,5	685,2/548,4	2735,4767	n.b.	n.b.
<i>C₁₆</i> -StAx-p	2,0	<i>C₁₆</i> -ppWpXILDXHVPpVWp	2877,6	720,4/576,5	720,2/576,3	2875,6332	n.b.	n.b.

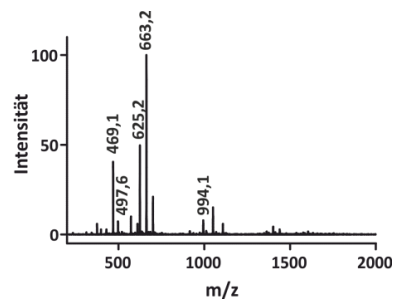
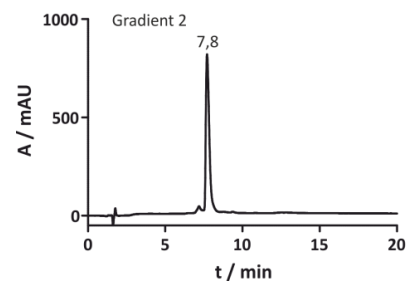
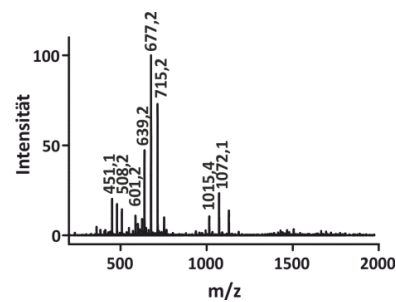
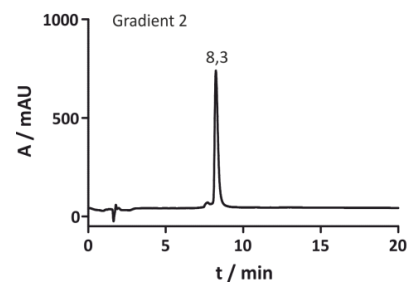
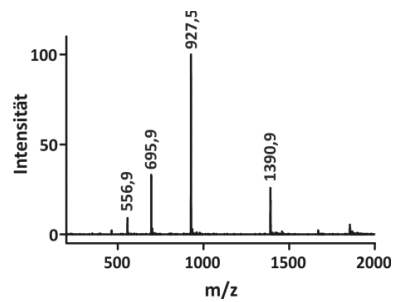
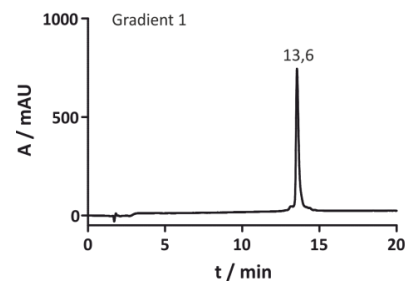
8 Anhang

Peptid	Ausbeute / %	Sequenz	MS			HRMS		
			M / g·mol ⁻¹	berechnet m/z	gefunden m/z	M / g·mol ⁻¹	berechnet m/z	gefunden m/z
H ₂ N-StAx-p	1,5	ppWPpXILDXHVppVWp	2639,1	660,8/528,8	660,7/528,7	2637,4035	n.b.	n.b.
sp-StAx-p	1,7	Spermin-ppWPpXILDXHVppVWp	2923,5	975,5/731,9	975,1/731,7	2921,6248	n.b.	n.b.
NLS-StAx-p	1,4	PKKKRKV-PEG ₂ -ppWPpXILDXHVppVWp	3649,4	730,9/609,2	730,7/609,1	3647,0796	n.b.	n.b.

Analyse und Identifikation der synthetisierten Peptide erfolgte mittels HPLC-ESI/MS (Kapitel 5.3.1). Sämtliche Chromatogramme wurden bei einer Absorption von 210 nm aufgenommen. Berechnete Molekulargewichte der Peptide sind angegeben und geladenen Fragmente, die dem Peptid zugeordnet werden können, sind im Massenspektrum indiziert. Das Molekulargewicht von TFA-Salzen ist nur angegeben, falls diese gefunden wurden. Die Sequenz der Peptide ist im Einbuchstabencode dargestellt. Nicht-proteinogene Aminosäuren und *N*-terminale Modifikationen werden wie folgt abgekürzt: FITC = Fluorescein Isothiocyanat, PEG₂ = 8-Amino-3,6-Dioxyoctanoyl, PEG₅ = Amino-penta(Ethylenglycol)-omega-carboxyl, cya = Cysteamin, ac = Acetylgruppe, sp = Spermin, NLS = Kernlokalisierungssequenz, C₆ = Capronsäure, C₁₆ = Palmitinsäure, X = (S)-2-(4'-Pentenyl)alanin, b = *D*-Biotin.

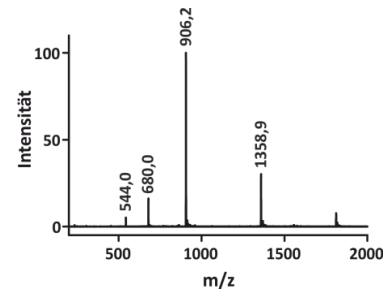
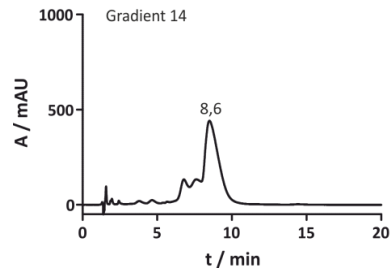
Peptid **Sequenz** **Molekulargewicht**
Bac₁₅₋₂₄ FITC-PEG₂-PRPLPFPRPG M=1666,9 g·mol⁻¹



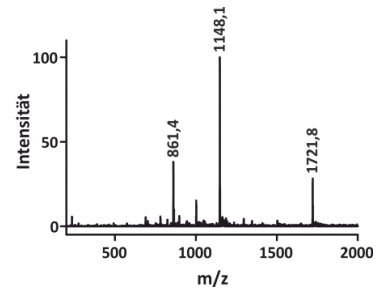
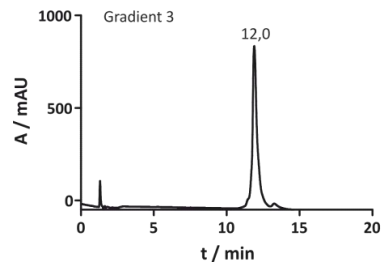
Peptid**Sequenz****Molekulargewicht****f-Tat₄₉₋₅₇**FITC-PEG₂-RKKRRQRRRM=1873,2 g·mol⁻¹ M·TFA=1987,2 g·mol⁻¹**f-R₈**FITC-PEG₂-RRRRRRRRM=1801,1 g·mol⁻¹ M·TFA=1915.1 g·mol⁻¹ M·2TFA=2029.1 g·mol⁻¹**f-Penetratin**FITC-PEG₂-RQIKIWFQNRRMKWKKM=2780,3 g·mol⁻¹

8 Anhang

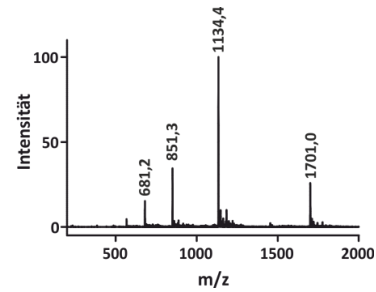
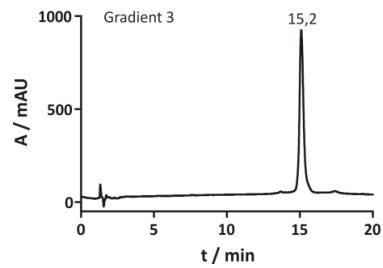
Peptid	Sequenz	Molekulargewicht
f-TP10	FITC-PEG ₂ -AGYLLGKINLKALAALAKKIL	M=2716,3 g·mol ⁻¹

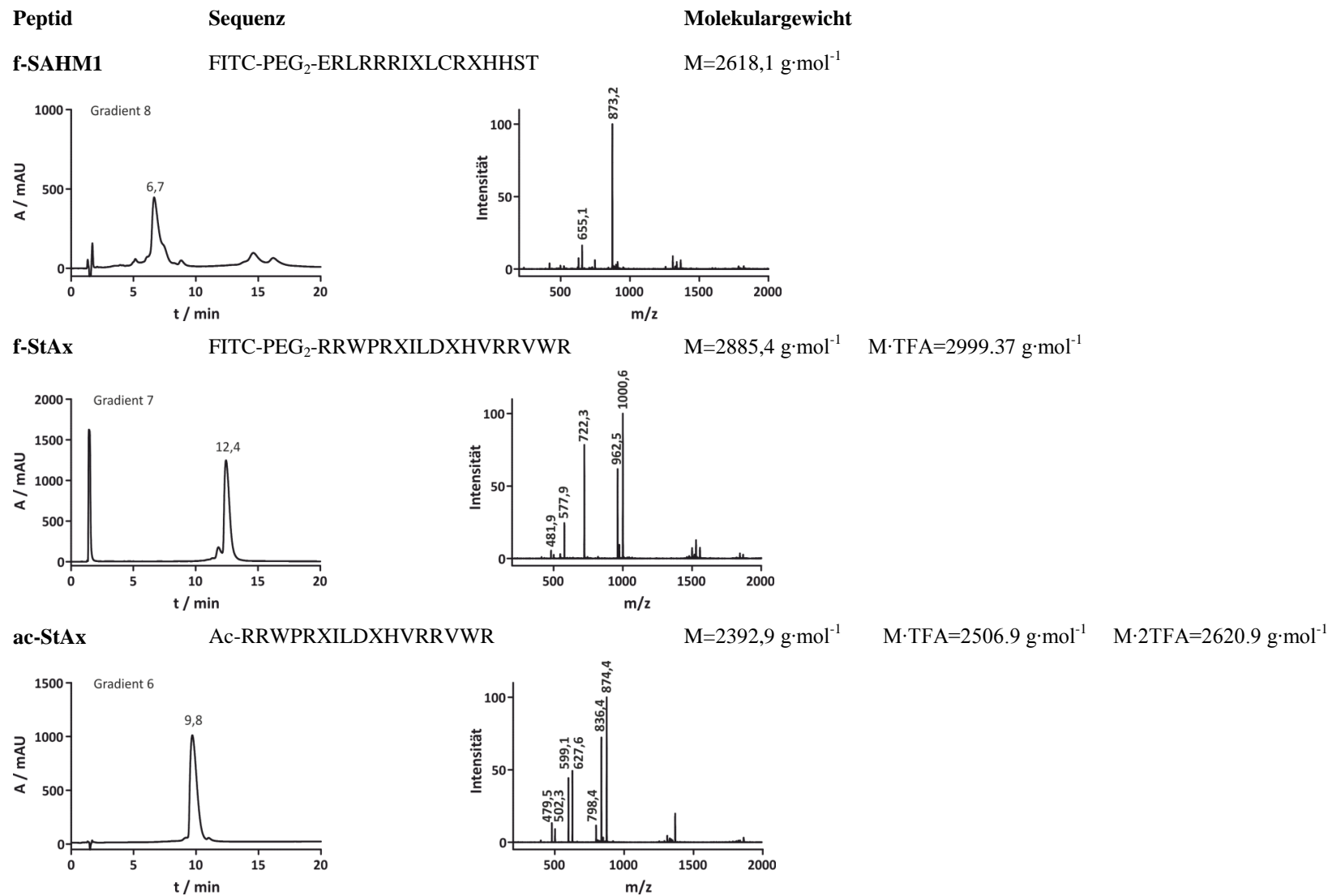


f-Pep-1	FITC-PEG ₂ -KETWWETWWTEWSQPKKRKV-cya	M=3441,9 g·mol ⁻¹
----------------	---	------------------------------

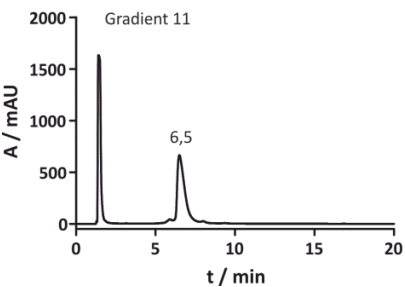
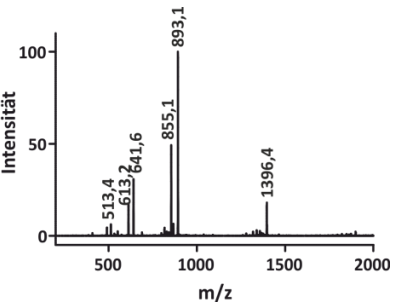
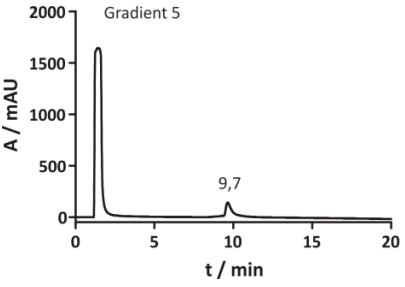
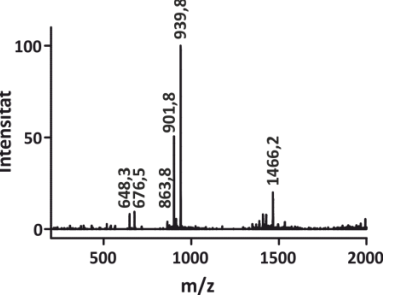
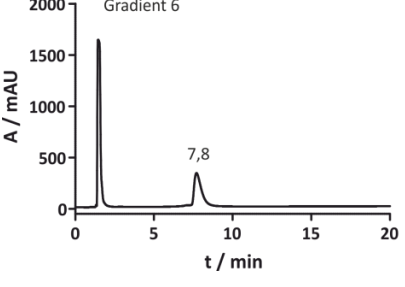
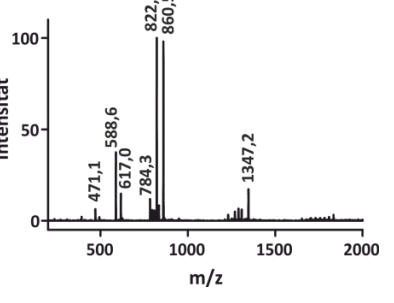


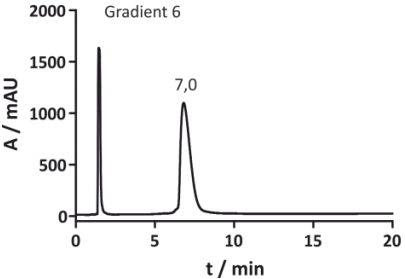
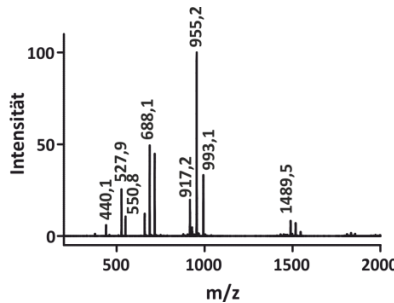
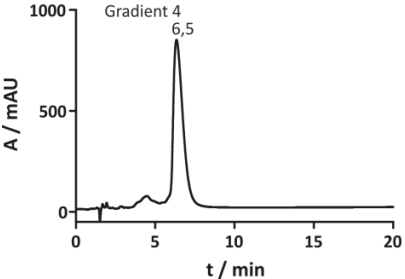
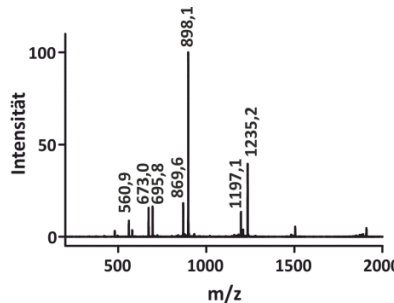
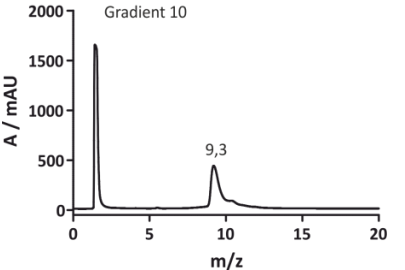
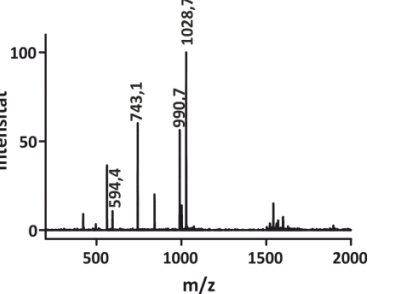
f-MPG	FITC-PEG ₂ -GALFLGFLGAAGSTMGAWSQPKKRKV-cya	M=3401,0 g·mol ⁻¹
--------------	---	------------------------------





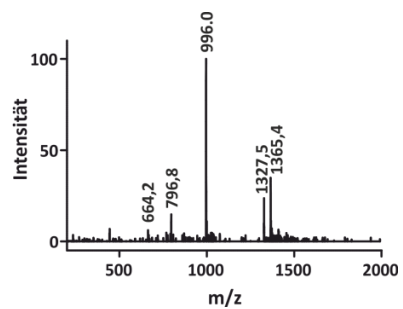
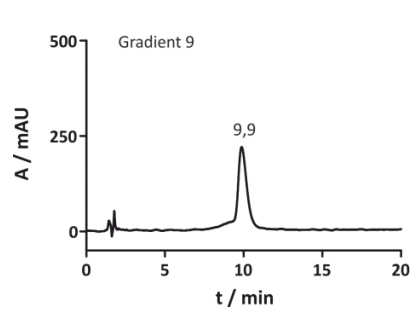
8 Anhang

Peptid	Sequenz	Molekulargewicht	M·TFA=2564,0 g·mol ⁻¹	M·2TFA=2677,1 g·mol ⁻¹	M·3TFA=2791,1 g·mol ⁻¹
C₆-StAx	C ₆ -RRWPRXILDXHVRRVWR	M=2449,0 g·mol ⁻¹			
					
C₁₆-StAx	C ₁₆ -RRWPRXILDXHVRRVWR	M=2589,3 g·mol ⁻¹	M·TFA=2703,3 g·mol ⁻¹	M·2TFA=2817,3 g·mol ⁻¹	M·3TFA=2931,1 g·mol ⁻¹
					
H₂N-StAx	RRWPRXILDXHVRRVWR	M=2350,9 g·mol ⁻¹	M·TFA=2464,9 g·mol ⁻¹	M·2TFA=2578,9 g·mol ⁻¹	M·3TFA=2692,9 g·mol ⁻¹
					

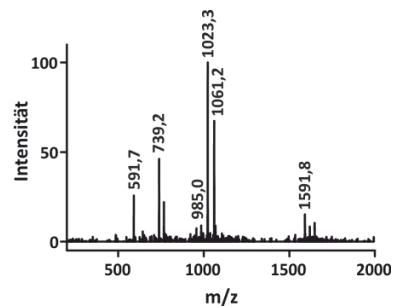
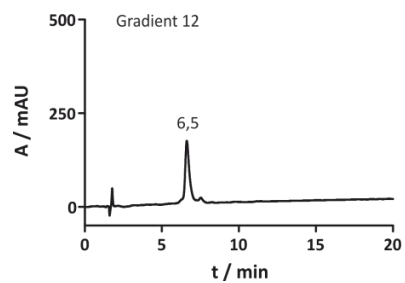
Peptid	Sequenz	Molekulargewicht			
sp-StAx	Spermin-RRWPRXILDXHVRVWR	M=2635,3 g·mol ⁻¹	M·TFA=2749,3 g·mol ⁻¹	M·2TFA=2863,3 g·mol ⁻¹	M·3TFA=2977,3 g·mol ⁻¹
					
NLS-StAx	PKKKRKV-PEG ₂ -RRWPRXILDXHVRVWR	M=3361,2 g·mol ⁻¹	M·TFA=3475,2 g·mol ⁻¹	M·2TFA=3589,2 g·mol ⁻¹	M·3TFA=3703,2 g·mol ⁻¹
					
f-StAx-h	FITC-PEG ₂ -hhWPhXILDXHVhhVWh	M=2969,6 g·mol ⁻¹	M·TFA=3083,6 g·mol ⁻¹	M·2TFA=3197,6 g·mol ⁻¹	
					

8 Anhang

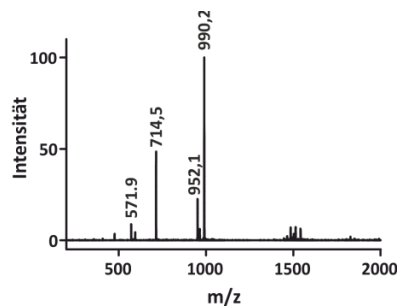
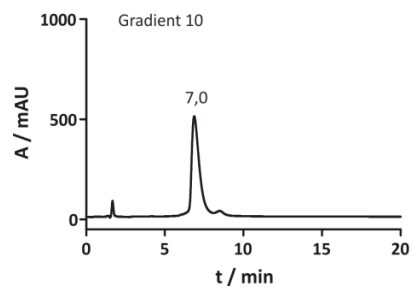
Peptid	Sequenz	Molekulargewicht
f-NLS-StAx-h	FITC-PEG ₂ -PKKKRKV-PEG ₂ -hhWPhXILDXHVhhVWh	M=3979,9 g·mol ⁻¹ M·TFA=4093,9 g·mol ⁻¹

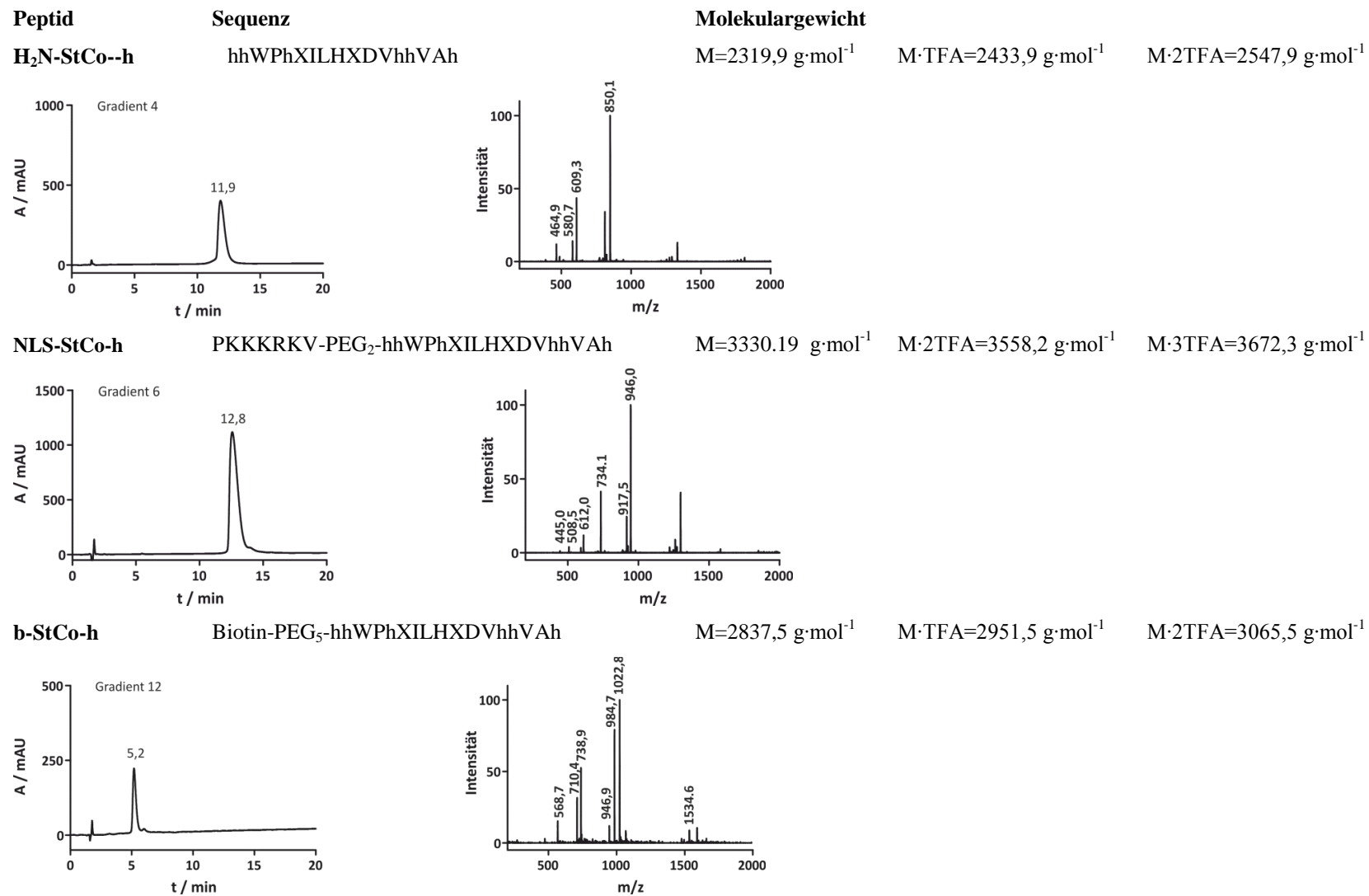


b-StAx-h	Biotin-PEG ₅ -hhWPhXILDXHVhhVWh	M=2952,7 g·mol ⁻¹ M·TFA=3066,7 g·mol ⁻¹ M·2TFA=3180,7 g·mol ⁻¹
-----------------	--	---

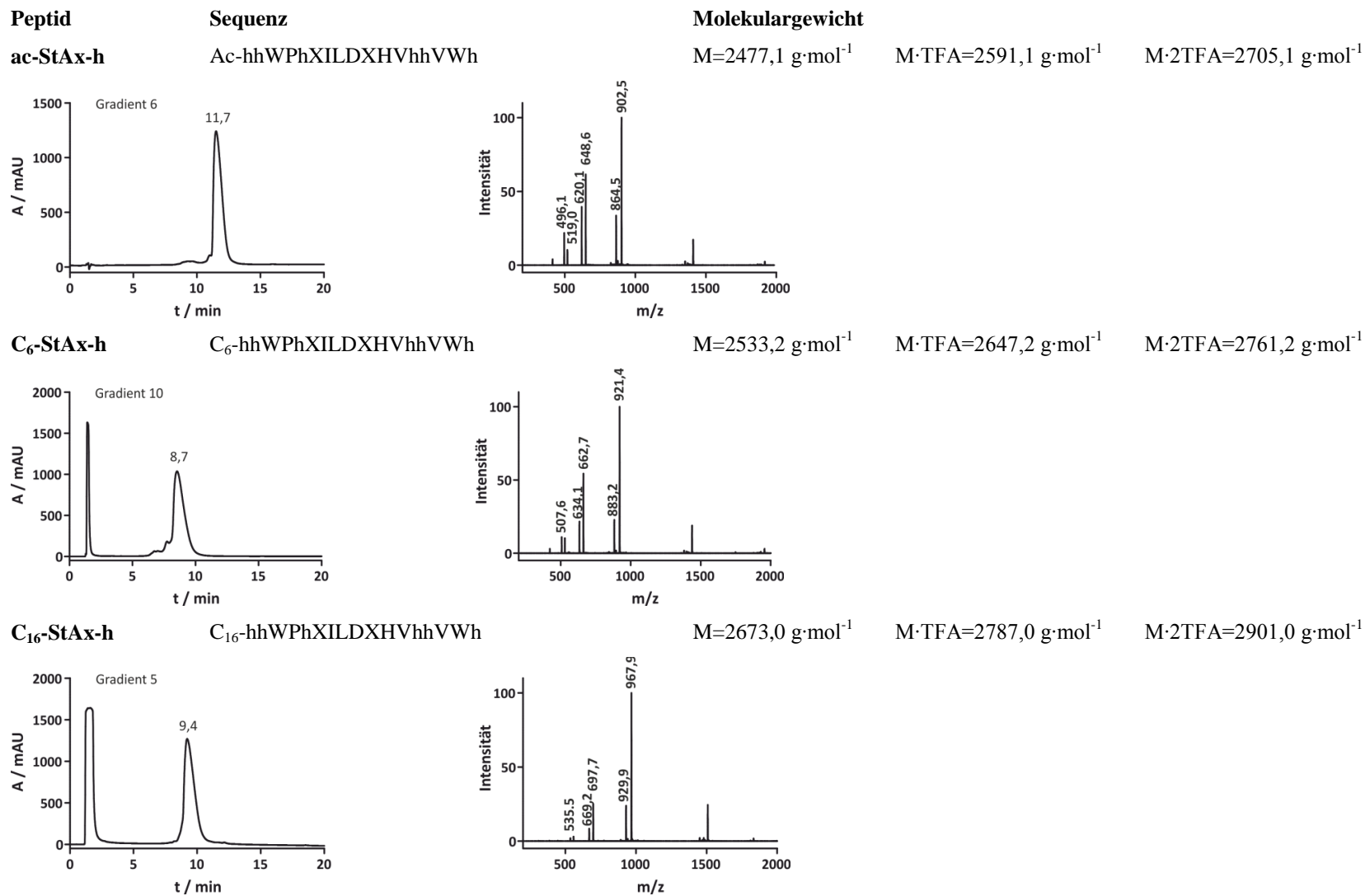


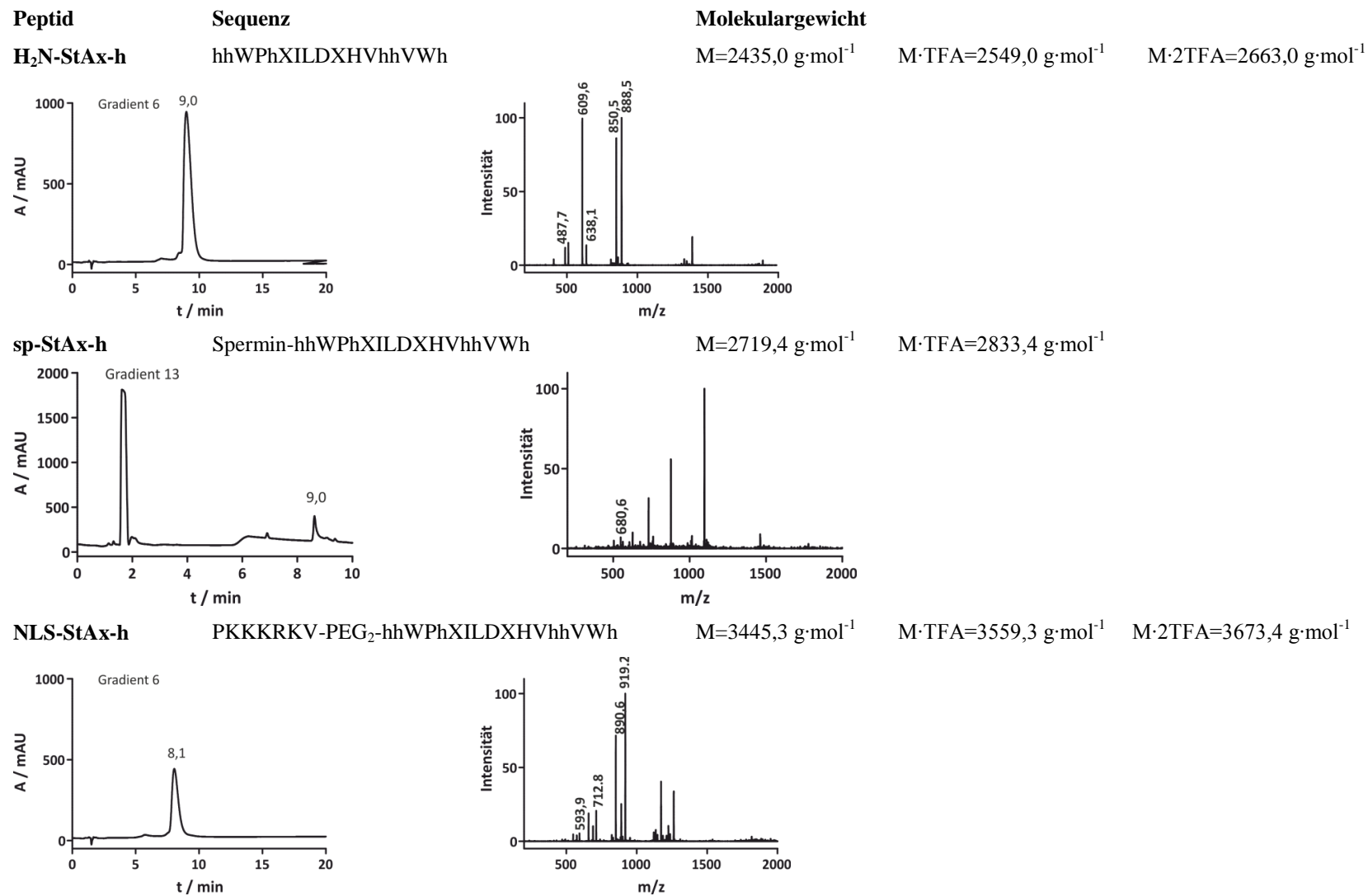
f-StCo--h	FITC-PEG ₂ -hhWPhXILHXDVhhVAh	M=2854,4 g·mol ⁻¹ M·TFA=2968,4 g·mol ⁻¹
------------------	--	---





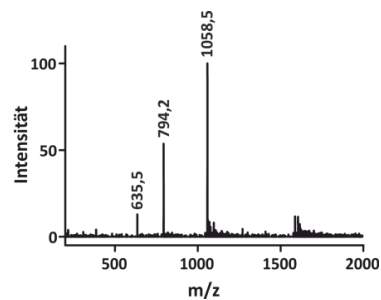
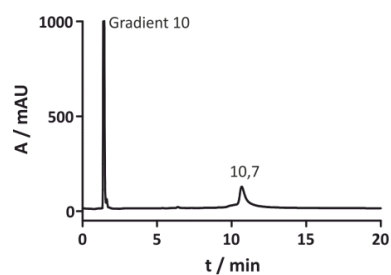
8 Anhang



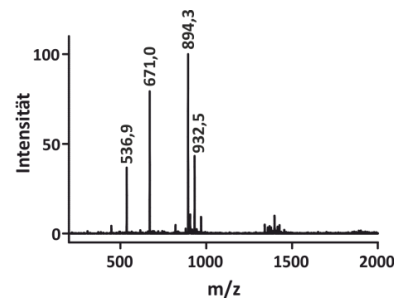
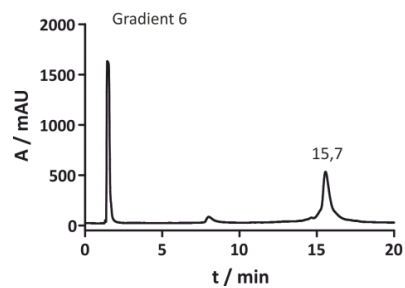


8 Anhang

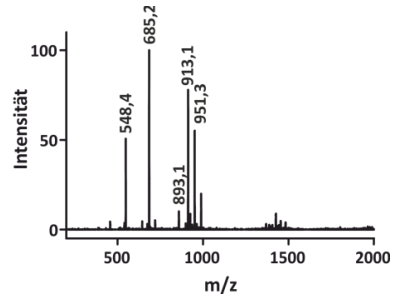
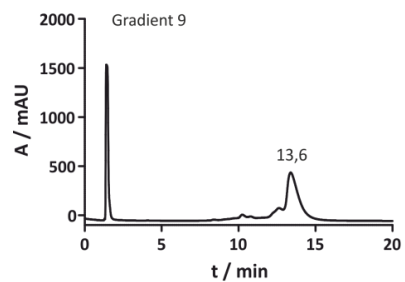
Peptid **Sequenz** **Molekulargewicht**
f-StAx-p FITC-PEG₂-ppWpXILDxHVppVWp M=3173,7 g·mol⁻¹



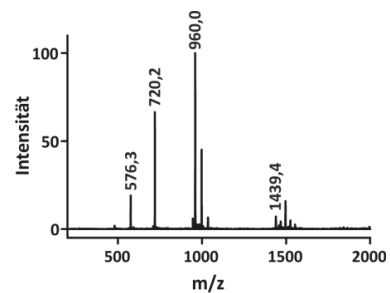
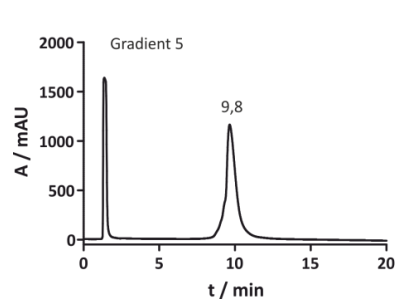
ac-StAx-p Ac-ppWpXILDxHVppVWp M=2681,2 g·mol⁻¹ M·TFA=2795,2 g·mol⁻¹



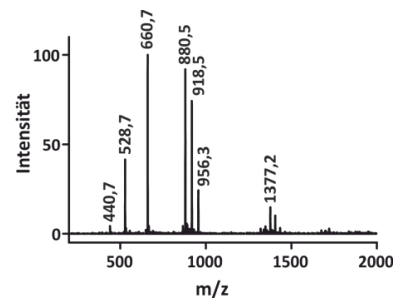
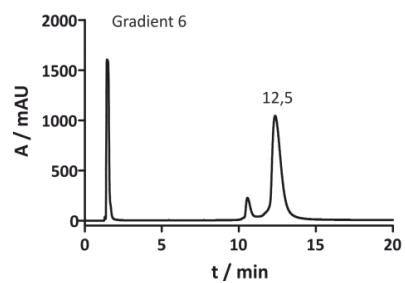
C₆-StAx-p C₆- ppWpXILDxHVppVWp M=2737,3 g·mol⁻¹ M·TFA=2851,3 g·mol⁻¹ M·2TFA=2965,3 g·mol⁻¹



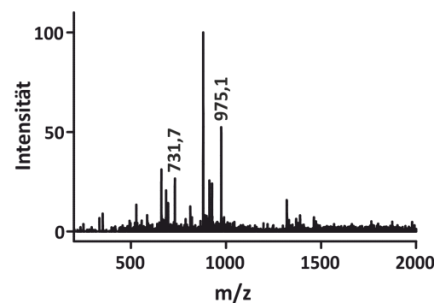
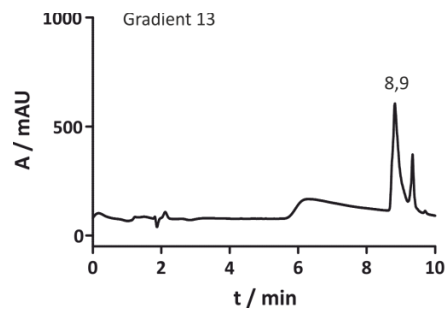
Peptid **Sequenz** **Molekulargewicht**
C₁₆-StAx-p C₁₆- ppWPpXILDXHVppVWp M=2877,6 g·mol⁻¹



H₂N-StAx-p ppWPpXILDXHVppVWp M=2639,1 g·mol⁻¹ M·TFA=2753,1 g·mol⁻¹ M·2TFA=2867,1 g·mol⁻¹

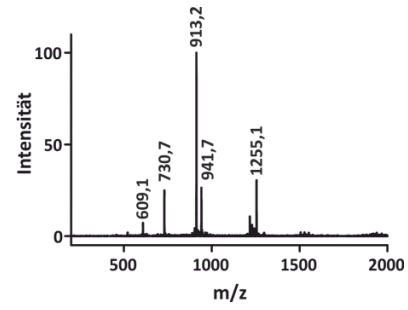
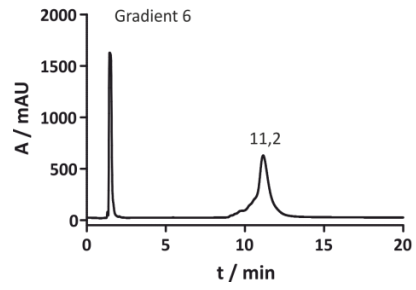


sp-StAx-p Spermin- ppWPpXILDXHVppVWp M=2923,5 g·mol⁻¹



8 Anhang

Peptid	Sequenz	Molekulargewicht
NLS-StAx-p	PKKKRKV-PEG ₂ -ppWpXILDxHVppVWp	M=3649,4 g·mol ⁻¹ M·TFA=3763,4 g·mol ⁻¹



8.3 Oligonukleotide für die Genexpressionsanalyse

Tabelle 45: Übersicht der verwendeten Primersequenzen und Amplikonlängen für die Genexpressionsanalyse aus Dünndarmorganoiden der Maus.

Gen	Primersequenz	Amplikonlänge / bp
<i>Gapdh</i>	5'-CACTGAGCATCTCCCTCACA-3'	111
	5'-GTGGGTGCAGCGAACTTTAT-3'	
MYC- Δ N β -Catenin <i>Transgene</i>	5'-GAGCAGAAGCTGATCTCC-3'	117
	5'-GCATGCCCTCATCTAATGTCTC-3'	
<i>Axin2</i>	5'-GCAGCTCAGCAAAAAGGGAAAT-3'	114
	5'-TACATGGGGAGCACTGTCTCGT-3'	
<i>Myc</i>	5'-CTAGTGCTGCATGAGGAGACAC-3'	216
	5'-GTAGTTGTGCTGGTGAGTGGAG-3'	
<i>Ascl2</i>	5'-CAGGAGCTGCTTGACTTTTCCA-3'	105
	5'-GGGCTAGAAGCAGGTAGGTCCA-3'	
<i>Tiam1</i>	5'-CTTTCTGAAGTCTGTGCATTTCG-3'	221
	5'-AATCGATGGTAAACCTGTTTCG-3'	
<i>Car4</i>	5'-CTGCTAGGACAAAGGTGAACC-3'	113
	5'-CTCCACTGTGTGTTGATTGTTCT-3'	

8.4 gBlock-Sequenzen

Bei einem gBlock handelt es sich um doppelsträngige, synthetische DNA-Fragmente. Diese wurden zur *in vivo* Klonierung von β -Catenin eingesetzt, da Restriktions-Ligations-Klonierung aufgrund vieler Restriktionsschnittstellen in der β -Catenin Nukleotidsequenz nicht durchführbar war.

gBlock 1: β -Catenin1-781

```
GAATCTTTATTTTCAGGGCGCCATGGCTACTCAAGCTGATTTGATGGAGTTGGACATGGCCATGGAACCAGA
CAGAAAAGCGGCTGTTAGTCACTGGCAGCAACAGTCTTACCTGGACTCTGGAATCCATTCTGGTGCCACTAC
CACAGCTCCTTCTCTGAGTGGTAAAGGCAATCCTGAGGAAGAGGATGTGGATACCTCCCAAGTCTGTATGA
GTGGGAACAGGGATTTTCTCAGTCCCTCACTCAAGAACAAGTAGCTGATATTGATGGACAGTATGCAATGAC
TCGAGCTCAGAGGGTACGAGCTGCTATGTTCCCTGAGACATTAGATGAGGGCATGCAGATCCCATCTACACA
GTTTGATGCTGCTCATCCCCTAATGTCCAGCGTTTGGCTGAACCATCACAGATGCTGAAACATGCAGTTGT
AAACTTGATTAACATCAAGATGATGCAGAACTTGCCACACGTGCAATCCCTGAACTGACAAAACCTGCTAAA
TGACGAGGACCAGGTGGTGGTTAATAAGGCTGCAGTTATGGTCCATCAGCTTTCTAAAAAGGAAGCTTCCAG
ACACGCTATCATGCGTTCTCCTCAGATGGTGTCTGCTATTGTACGTACCATGCAGAATACAAATGATGTAGA
AACAGCTCGTTGTACCGCTGGGACCTTGCATAACCTTTCCCATCATCGTGAGGGCTTACTGGCCATCTTTAA
GTCTGGAGGCATTCTGCCCTGGTGAAAATGCTTGGTTTACCAGTGGATTCTGTGTTGTTTTATGCCATTAC
AACTCTCCACAACCTTTTATTACATCAAGAAGGAGCTAAAAATGGCAGTGCCTTTAGCTGGTGGGCTGCAGAA
AATGGTTGCCTTGCTCAACAAAACAAATGTTAAATCTTGGCTATTACGACAGACTGCCTTCAAATTTTAGC
TTATGGCAACCAAGAAAGCAAGCTCATCATACTGGCTAGTGGTGGACCCCAAGCTTTAGTAAATATAATGAG
GACCTATACTTACGAAAACTACTGTGGACCACAAGCAGAGTGTGAAGGTGCTATCTGTCTGCTCTAGTAA
TAAGCCGGCTATTGTAGAAGCTGGTGGAAATGCAAGCTTTAGGACTTCACCTGACAGATCCAAGTCAACGTCT
TGTTTCAGAACTGTCTTTGGACTCTCAGGAATCTTTTCAGATGCTGCAACTAAACAGGAAGGGATGGAAGGTCT
CCTTGGGACTCTTGTTTCAGCTTCTGGGTTTCAGATGATATAAAATGTGGTCCACCTGTGCAGCTGGAATTCTTTC
TAACCTCACTTGAATAATTATAAGAACAAGATGATGGTCTGCCAAGTGGGTGGTATAGAGGCTCTTGTGCG
TACTGTCTTTCGGGCTGGTGACAGGGAAGACATCACTGAGCCTGCCATCTGTGCTCTTCGTCATCTGACCAG
CCGACACCAAGAAGCAGAGATGGCCAGAATGCAGTTCGCCCTTCACTATGGACTACCAGTTGTGGTTAAGCT
CTTACACCCACCATCCCCTGACCTCTGATAAAGGCTACTGTTGGATTGATTTCGAAATCTTGCCCTTTGTCC
CGCAAATCATGCACCTTTGCGTGAGCAGGGTGCCATTCCACGACTAGTTCAGTTGCTTGTTCGTGCACATCA
GGATACCCAGCGCCGTACGTCCATGGGTGGGACACAGCAGCAATTTGTGGAGGGGGTCCGCATGGAAGAAAT
AGTTGAAGGTTGTACCGGAGCCCTTCACATCCTAGCTCGGGATGTTCAACAACCGAATTGTTATCAGAGGACT
AAATACCATTCCATTGTTTGTGCAGCTGCTTTATTCTCCATTGAAAACATCCAAAGAGTAGCTGCAGGGGT
CCTCTGTGAACTTGCTCAGGACAAGGAAGCTGCAGAAGCTATTGAAGCTGAGGGAGCCACAGCTCCTCTGAC
AGAGTTACTTCACTCTAGGAATGAAGGTGTGGCGACATATGCAGCTGCTGTTTTGTTCCGAATGTCTGAGGA
CAAGCCACAAGATTACAAGAAACGGCTTTTCAGTTGAGCTGACCAGCTCTCTCTTCAGAACAGAGCCAATGGC
TTGGAATGAGACTGCTGATCTTGGACTTGATATTGGTGGCCAGGGAGAACCCCTTGGATATCGCCAGGATGA
TCCTAGCTATCGTTCTTTTCACTCTGGTGGATATGGCCAGGATGCCTTGGGTATGGACCCCATGATGGAACA
TGAGATGGGTGGCCACCACCTGGTGTGACTATCCAGTTGATGGGCTGCCAGATCTGGGGCATGCCCAGGA
```

8 Anhang

CCTCATGGATGGGCTGCCTCCAGGTGACAGCAATCAGCTGGCCTGGTTTGATACTGACCTGCTCGAGCACCA
CCACCACCACCAC

gBlock 2: β -Catenin134-665

GATCTGGTTCCGCGTGGATCTGAAAACCTTTATTTTCAGGGCGCCATGGCGCATGCAGTTGTAACTTGATT
AACTATCAAGATGATGCAGAACTTGCCACACGTGCAATCCCTGAACTGACAAAACCTGCTAAATGACGAGGAC
CAGGTGGTGGTTAATAAGGCTGCAGTTATGGTCCATCAGCTTTCTAAAAAGGAAGCTTCCAGACACGCTATC
ATGCGTTCTCCTCAGATGGTGTCTGCTATTGTACGTACCATGCAGAATACAAATGATGTAGAAAACAGCTCGT
TGTACCGCTGGGACCTTGCATAACCTTTCCCATCATCGTGAGGGCTTACTGGCCATCTTTAAGTCTGGAGGC
ATTCCCTGCCCTGGTAAAATGCTTGGTTCAACAGTGGATTCTGTGTTGTTTTATGCCATTACAACCTCCAC
AACCTTTTATTACATCAAGAAGGAGCTAAAATGGCAGTGCCTTTAGCTGGTGGGCTGCAGAAAATGGTTGCC
TTGCTCAACAAAACAAATGTTAAATTTCTGGCTATTACGACAGACTGCCTTCAAATTTTAGCTTATGGCAAC
CAAGAAAGCAAGCTCATCATACTGGCTAGTGGTGGACCCCAAGCTTTAGTAAATATAATGAGGACCTATACT
TACGAAAACACTACTGTGGACCACAAGCAGAGTGTGAAGGTGCTATCTGTCTGCTCTAGTAATAAGCCGGCT
ATTGTAGAAGCTGGTGAATGCAAGCTTTAGGACTTCACCTGACAGATCCAAGTCAACGTCTTGTTCAGAAC
TGTCTTTGGACTCTCAGGAATCTTTCAGATGCTGCAACTAAACAGGAAGGGATGGAAGGTCTCCTTGGGACT
CTTGTTCAGCTTCTGGGTTTTCAGATGATATAAAATGTGGTTCACCTGTGCAGCTGGAATTTCTTCTAACCTCACT
TGCAATAATTATAAGAACAAGATGATGGTCTGCCAAGTGGGTGGTATAGAGGCTCTTGTGCGTACTGTCCTT
CGGGCTGGTGACAGGGAAGACATCACTGAGCCTGCCATCTGTGCTCTTCGTCATCTGACCAGCCGACACCAA
GAAGCAGAGATGGCCCAGAATGCAGTTTCGCCTTCACTATGGACTACCAGTTGTGGTTAAGCTCTTACACCCA
CCATCCCCTGGCCTCTGATAAAGGCTACTGTTGGATTGATTCGAAATCTTGCCCTTTGTCCCGCAAATCAT
GCACCTTTGCGTGAGCAGGGTGCCATTCCACGACTAGTTCAGTTGCTTGTTCGTGCACATCAGGATACCCAG
CGCCGTACGTCCATGGGTGGGACACAGCAGCAATTTGTGGAGGGGGTCCGCATGGAAGAAATAGTTGAAGGT
TGTACCGGAGCCCTTACATCCTAGCTCGGGATGTTTACAACCGAATTTGTTATCAGAGGACTAAATACCATT
CCATTGTTTGTGCAGCTGCTTTATTCTCCATTGAAAACATCCAAAGAGTAGCTGCAGGGGTCTCTGTGAA
CTTGCTCAGGACAAGGAAGCTGCAGAAGCTATTGAAGCTGAGGGAGCCACAGCTCCTCTGACAGAGTTACTT
CACTCTAGGAATGAAGGTGTGGCGACATATGCAGCTGCTGTTTTGTTCCGAATGTCTGAGGACTGACTCGAG
CGGCCGCATCGTGACTGACTGACGATCTGCCTCGCGCTTTC

8.5 Gensequenzen

Das Gen, welches für β -Catenin1-781 und β -Catenin134-665 Protein kodiert, basiert auf dem Genbank-Eintrag mit dem Zugriffsschlüssel NM_001904.3.

```

ATGGCTACTCAAGCTGATTTGATGGAGTTGGACATGGCCATGGAACCAGACAGAAAAGCGGCTGTTAGTCAC
TGGCAGCAACAGTCTTACCTGGACTCTGGAATCCATTCTGGTGCCACTACCACAGCTCCTTCTCTGAGTGGT
AAAGGCAATCCTGAGGAAGAGGATGTGGATACCTCCCAAGTCTGTATGAGTGGGAACAGGGATTTTCTCAG
TCCTTCACTCAAGAACAAGTAGCTGATATTGATGGACAGTATGCAATGACTCGAGCTCAGAGGGTACGAGCT
GCTATGTTCCCTGAGACATTAGATGAGGGCATGCAGATCCCATCTACACAGTTTGATGCTGCTCATCCCCT
AATGTCCAGCGTTTGGCTGAACCATCACAGATGCTGAAACATGCAGTTGTAAACTTGATTAACATATCAAGAT
GATGCAGAACTTGCCACACGTGCAATCCCTGAACTGACAAAACCTGCTAAATGACGAGGACCAGGTGGTGGTT
AATAAGGCTGCAGTTATGGTCCATCAGCTTTCTAAAAAGGAAGCTTCCAGACACGCTATCATGCGTTCTCCT
CAGATGGTGTCTGCTATTGTACGTACCATGCAGAATACAAAATGATGTAGAAACAGCTCGTTGTACCCTGGG
ACCTTGCATAACCTTTCCCATCATCGTGAGGGCTTACTGGCCATCTTTAAGTCTGGAGGCATTCCTGCCCTG
GTGAAAATGCTTGGTTCACCAGTGGATTCTGTGTTGTTTTATGCCATTACAACCTCCACAACCTTTTATTA
CATCAAGAAGGAGCTAAAATGGCAGTGCCTTAGCTGGTGGGCTGCAGAAAATGGTTGCCTTGCTCAACAAA
ACAAATGTTAAATTCTTGGCTATTACGACAGACTGCCTTCAAATTTTAGCTTATGGCAACCAAGAAAGCAAG
CTCATCATACTGGCTAGTGGTGGACCCCAAGCTTTAGTAAATATAATGAGGACCTATACTTACGAAAACTA
CTGTGGACCACAAGCAGAGTGCTGAAGGTGCTATCTGTCTGCTCTAGTAATAAGCCGGCTATTGTAGAAGCT
GGTGAATGCAAGCTTTAGGACTTACCTGACAGATCCAAGTCAACGCTTGTTCAGAACTGTCTTTGGACT
CTCAGGAATCTTTCAGATGCTGCAACTAAACAGGAAGGGATGGAAGGTCTCCTTGGGACTCTTGTTCAGCTT
CTGGGTTTCAGATGATATAAATGTGGTCACCTGTGCAGCTGGAATCTTTCTAACCTCACTTGAATAATTAT
AAGAACAAGATGATGGTCTGCCAAGTGGGTGGTATAGAGGCTCTTGTGCGTACTGTCTTCGGGCTGGTGAC
AGGGAAGACATCACTGAGCCTGCCATCTGTGCTCTTCGTCATCTGACCAGCCGACACCAAGAAGCAGAGATG
GCCAGAATGCAGTTCGCCCTTCACTATGGACTACCAGTTGTGGTTAAGCTCTTACACCCACCATCCCCTGG
CCTCTGATAAAGGCTACTGTTGGATTGATTCGAAAATCTTGCCCTTTGTCCCGCAAATCATGCACCTTTGCGT
GAGCAGGGTGCCATTCACGACTAGTTCAGTTGCTTGTTCGTGCACATCAGGATACCCAGCGCCGTACGTCC
ATGGGTGGGACACAGCAGCAATTTGTGGAGGGGGTCCGCATGGAAGAAATAGTTGAAGGTTGTACCGGAGCC
CTTCACATCCTAGCTCGGGATGTTTACAACCGAATTGTTATCAGAGGACTAAATACCATTCCATTGTTTGTG
CAGCTGCTTTATTCTCCCATGAAAACATCCAAAGAGTAGCTGCAGGGGTCTCTGTGAACTTGCTCAGGAC
AAGGAAGCTGCAGAAGCTATTGAAGCTGAGGGAGCCACAGCTCCTCTGACAGAGTTACTTCACTCTAGGAAT
GAAGGTGTGGCGACATATGCAGCTGCTGTTTTGTTCCGAATGTCTGAGGACAAGCCACAAGATTACAAGAAA
CGGCTTTCAGTTGAGCTGACCAGCTCTCTCTCAGAACAGAGCCAATGGCTTGAATGAGACTGCTGATCTT
GGACTTGATATTGGTGGCCAGGGAGAACCCTTGGATATCGCCAGGATGATCCTAGCTATCGTCTTTTTTAC
TCTGGTGGATATGGCCAGGATGCCTTGGGTATGGACCCCATGATGGAACATGAGATGGGTGGCCACCACCCT
GGTGTGACTATCCAGTTGATGGGCTGCCAGATCTGGGGCATGCCAGGACCTCATGGATGGGCTGCCTCCA
GGTGACAGCAATCAGCTGGCCTGGTTTGATACTGACCTGTAA

```

8.6 Vektorkarten

Die zur Klonierung verwendeten Ausgangsvektoren und die daraus generierten Vektoren, sind in den folgenden Abbildungen dargestellt. Kodierende Sequenzen für Affinitätstags sind blau, Antibiotikaresistenzen gelb, β -Catenin orange dargestellt. Schnittstellen für Proteasen sind in grün, die *multiple cloning site* ist rot und andere Merkmale sind weiss markiert. lacI = Lac-Repressorgen, lac Z = Gen für β -Galactosidase, KanR = Kanamycinresistenzgen, AmpR = Ampicillinresistenzgen, MCS = *multiple cloning site*, GST = Glutathion-S-Transferase, MBP = *maltose-binding protein*, His₆ = Hexahistidin, TEV = Erkennungssequenz für TEV-Protease, THB = Erkennungssequenz für Thrombin-Protease, HRV 3C = Erkennungssequenz für die PreScission-Protease, ori = Replikationsursprung, rop = Gen des Regulatorprotein rop.

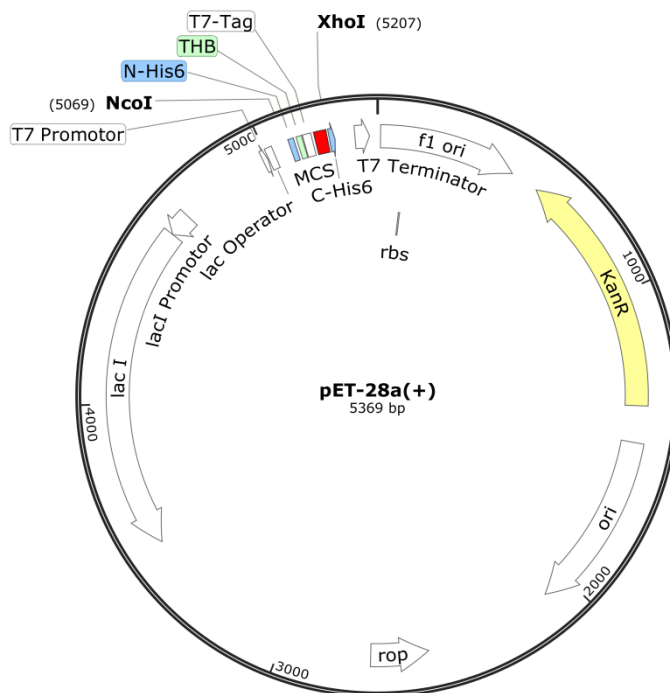


Abbildung 43: Vektorkarte des Plasmides pET-28a(+).

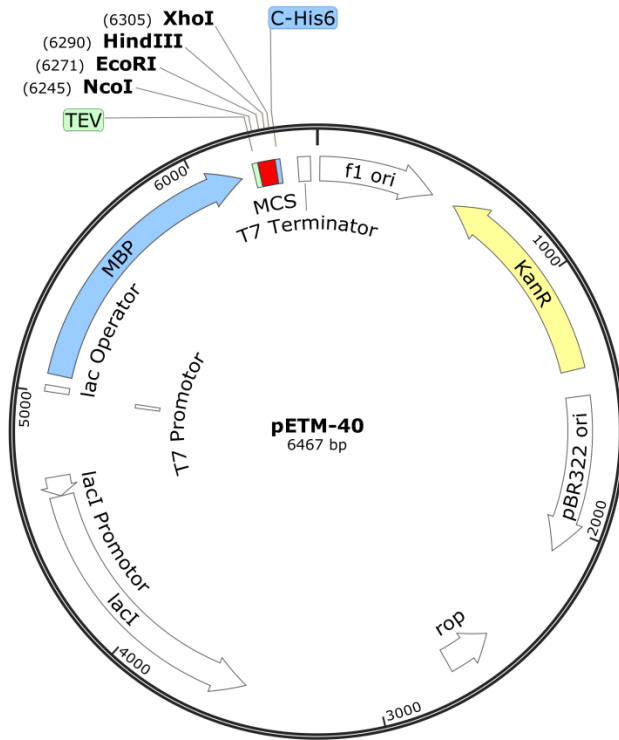


Abbildung 44: Vektorkarte des Plasmides pETM-40.

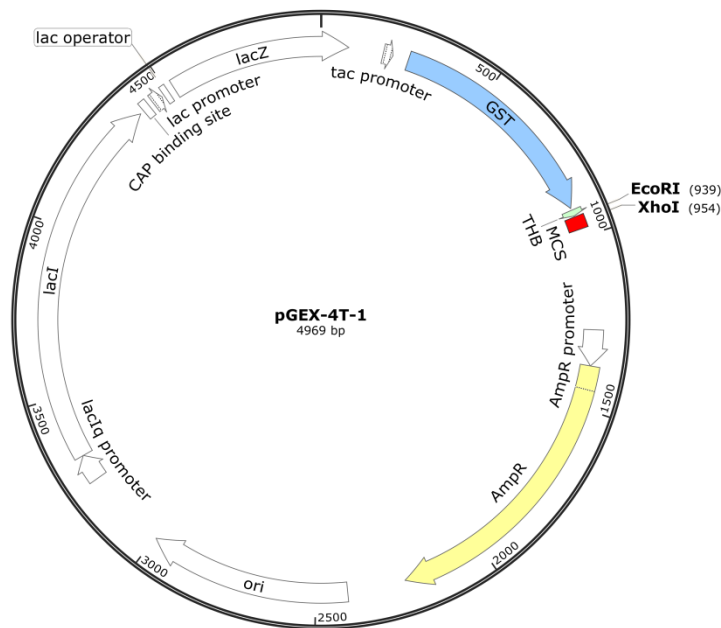


Abbildung 45: Vektorkarte des Plasmides pGEX-4T-1.

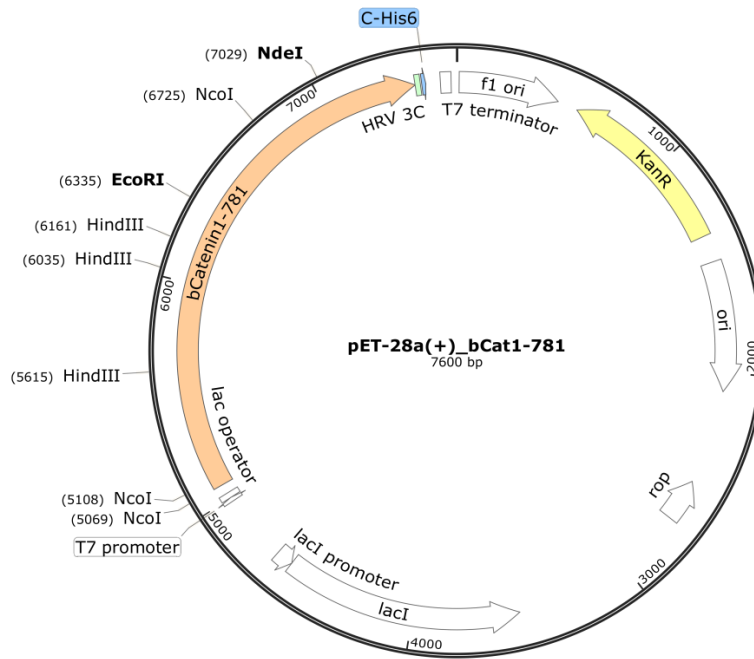


Abbildung 46: Vektorkarte des Plasmides pET-28a(+)_bCat1-781. Das Plasmid wurde von Dr. David Bier, MPI Dortmund erhalten.

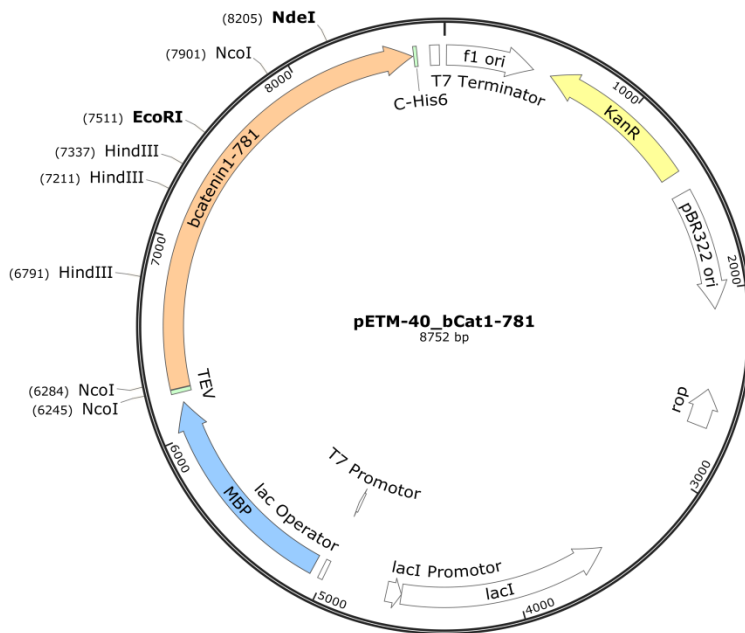


Abbildung 47: Vektorkarte des Plasmides pETM-40_bCat1-781. Dieses Plasmid wurde durch Klonierung von gBlock1 in pETM-40 erhalten.

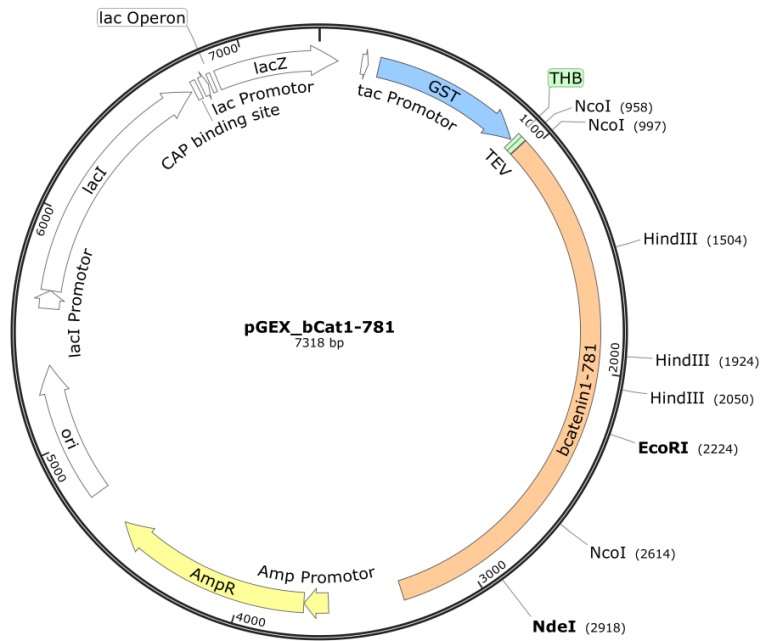


Abbildung 48: Vektorkarte des Plasmides pGEX_bCat1-781. Dieses Plasmid wurde durch Klonierung von gBlock1 in pGEX-4T-1 erhalten.

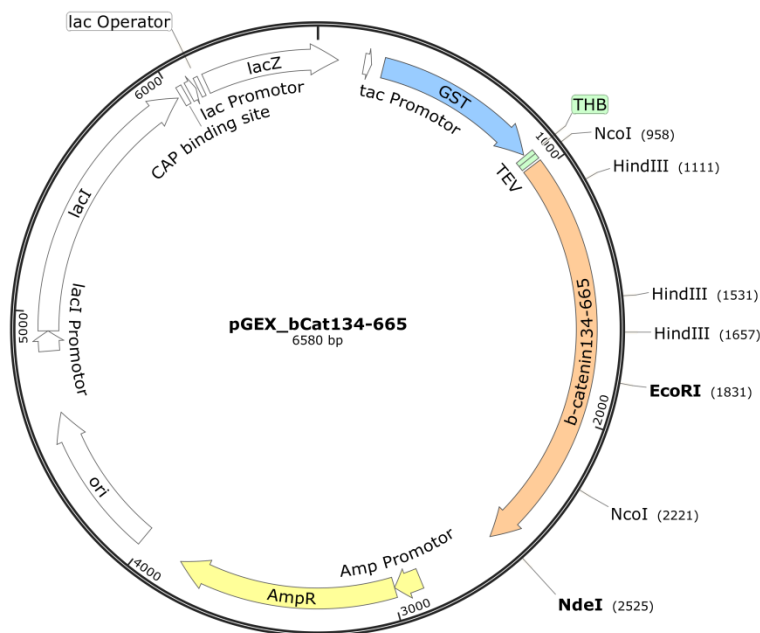


Abbildung 49: Vektorkarte des Plasmides pGEX_bCat134-665. Dieses Plasmid wurde durch Klonierung von gBlock2 in pGEX-4T-1 erhalten.

8.7 Sequenzierungsergebnisse

Sequenzierung des Vektors pETM-40_bCat1-781:

Startcodon: **ATG**

Erkennungssequenz für NcoI: **CCATGG**

Erkennungssequenz für XhoI: **CTCGAG**

Hexahistidine-Tag: **CACCACCACCACCAC**

```

PETM-40_BCAT      1 -----GAGAATCTTTATTTTCAGGGCGCCATGGGCT
128                201 CATAACAACAACCCCATGAGCGAGAATCTTTATTTTCAGGGCGCCATGGGCT

PETM-40_BCAT      1 GAGAATCTTTATTTTCAGGGCGCCATGGGCTACTCAAGCTGATTTGATGG
127                1 -----TTTATTTTCAGGGCGCCATGGGCTACTCAAGCTGATTTGATGG

PETM-40_BCAT      50 AGTTGGACATGGCCATGGAACCAGACAGAAAAGCGGCTGTTAGTCACTGG
127                42 AGTTGGACATGGCCATGGAACCAGACAGAAAAGCGGCTGTTAGTCACTGG

PETM-40_BCAT      100 CAGCAACAGTCTTACCTGGACTCTGGAATCCATTCTGGTGCCACTACCAC
127                92 CAGCAACAGTCTTACCTGGACTCTGGAATCCATTCTGGTGCCACTACCAC

PETM-40_BCAT      150 AGCTCCTTCTCTGAGTGGTAAAGGCAATCCTGAGGAAGAGGATGTGGATA
127                142 AGCTCCTTCTCTGAGTGGTAAAGGCAATCCTGAGGAAGAGGATGTGGATA

PETM-40_BCAT      200 CCTCCCAAGTCTGTATGAGTGGGAACAGGGATTTTCTCAGTCCTTCACT
127                192 CCTCCCAAGTCTGTATGAGTGGGAACAGGGATTTTCTCAGTCCTTCACT

PETM-40_BCAT      250 CAAGAACAAGTAGCTGATATTGATGGACAGTATGCAATGACTCGAGCTCA
127                252 CAAGAACAAGTAGCTGATATTGATGGACAGTATGCAATGACTCGAGCTCA

PETM-40_BCAT      300 GAGGGTACGAGCTGCTATGTTCCCTGAGACATTAGATGAGGGCATGCAGA
127                292 GAGGGTACGAGCTGCTATGTTCCCTGAGACATTAGATGAGGGCATGCAGA

PETM-40_BCAT      350 TCCCATCTACACAGTTTGATGCTGCTCATCCCCTAATGTCCAGCGTTTG
127                352 TCCCATCTACACAGTTTGATGCTGCTCATCCCCTAATGTCCAGCGTTTG

PETM-40_BCAT      400 GCTGAACCATCACAGATGCTGAAACATGCAGTTGTAACTTGATTAACTA
127                392 GCTGAACCATCACAGATGCTGAAACATGCAGTTGTAACTTGATTAACTA

```

PETM-40_BCAT 127	450 TCAAGATGATGCAGAACTTGCCACACGTGCAATCCCTGAACTGACAAAAC 452 TCAAGATGATGCAGAACTTGCCACACGTGCAATCCCTGAACTGACAAAAC
PETM-40_BCAT 127	500 TGCTAAATGACGAGGACCAGGTGGTGGTTAATAAGGCTGCAGTTATGGTC 492 TGCTAAATGACGAGGACCAGGTGGTGGTTAATAAGGCTGCAGTTATGGTC
PETM-40_BCAT 127	550 CATCAGCTTTCTAAAAAGGAAGCTTCCAGACACGCTATCATGCGTTCTCC 542 CATCAGCTTTCTAAAAAGGAAGCTTCCAGACACGCTATCATGCGTTCTCC
PETM-40_BCAT 127	600 TCAGATGGTGTCTGCTATTGTACGTACCATGCAGAATACAAATGATGTAG 592 TCAGATGGTGTCTGCTATTGTACGTACCATGCAGAATACAAATGATGTAG
PETM-40_BCAT 127	650 AAACAGCTCGTTGTACCGCTGGGACCTTGCATAACCTTTCCCATCATCGT 642 AAACAGCTCGTTGTACCGCTGGGACCTTGCATAACCTTTCCCATCATCGT
PETM-40_BCAT 127	700 GAGGGCTTACTGGCCATCTTTAAGTCTGGAGGCATTCCTGCCCTGGTGAA 692 GAGGGCTTACTGGCCATCTTTAAGTCTGGAGGCATTCCTGCCCTGGTGAA
PETM-40_BCAT 127	750 AATGCTTGGTTCACCAGTGGATTCTGTGTTGTTTTATGCCATTACAACCTC 742 AATGCTTGGTTCACCAGTGGATTCTGTGTTGTTTTATGCCATTACAACCTC
PETM-40_BCAT 127	800 TCCACAACCTTTTATTACATCAAGAAGGAGCTAAAATGGCAGTGCGTTTTA 792 TCCACAACCTTTTATTACATCAAGAAGGAGCTAAAATGGCAGTGCGTTTTA
PETM-40_BCAT 127	850 GCTGGTGGGCTGCAGAAAATGGTTGCCTTGCTCAACAAAACAAATGTTAA 842 GCTGGTGGGCTGCAGAAAATGGTTGCCTTGCTCAACAAAACAAATGTTAA
PETM-40_BCAT 127	900 ATTCTTGGCTATTACGACAGACTGCCTTCAAATTTTAGCTTATGGCAACC 892 ATTCTTGGCTATTACGACAGACTGCCTTCAAATTTTAGCTTATGGCAACC
PETM-40_BCAT 127	950 AAGAAAGCAAGCTCATCATACTGGCTA-GTGGTGGACCCCAAGCTTTAG 942 AAGAAAGCAAGCTCATCATACTGGCTAGGTGGTGGACCCCAAGCTTTAG
PETM-40_BCAT 127	998 TAAA 992 TAAA
PETM-40_BCAT 131	950 AAGAAAGCAAGCTCATCATACTGGCTAGTGGTGG 151 AAGAAAGCAAGCTCATCATACTGGGTAGTGGTGG

8 Anhang

PETM-40_BCAT 1002 TATAATGAGGACCTATACTTACGAAAACTACTGTGGACCACAAGCAGA
130 9 TATTATGAGGACCTATACTTACGAAAACTACTGTGGACCACAAGCAGA

PETM-40_BCAT 1051 GTGCTGAAGGTGCTATCTGTCTGCTCTAGTAATAAGCCGGCTATTGTAGA
130 58 GTGCTGAAGGTGCTATCTGTCTGCTCTAGTAATAAGCCGGCTATTGTAGA

PETM-40_BCAT 1101 AGCTGGTGAATGCAAGCTTTAGGACTTCACCTGACAGATCCAAGTCAAC
130 108 AGCTGGTGAATGCAAGCTTTAGGACTTCACCTGACAGATCCAAGTCAAC

PETM-40_BCAT 1151 GTCTTGTTCAGAAGTGTCTTTGGACTCTCAGGAATCTTTCAGATGCTGCA
130 158 GTCTTGTTCAGAAGTGTCTTTGGACTCTCAGGAATCTTTCAGATGCTGCA

PETM-40_BCAT 1201 ACTAAACAGGAAGGGATGGAAGGTCTCCTTGGGACTCTTGTTTCAGCTTCT
130 208 ACTAAACAGGAAGGGATGGAAGGTCTCCTTGGGACTCTTGTTTCAGCTTCT

PETM-40_BCAT 1251 GGGTTCAGATGATATAAAATGTGGTCACCTGTGCAGCTGGAATTCCTTCTA
130 258 GGGTTCAGATGATATAAAATGTGGTCACCTGTGCAGCTGGAATTCCTTCTA

PETM-40_BCAT 1301 ACCTCACTTGCAATAATTATAAGAACAAGATGATGGTCTGCCAAGTGGGT
130 308 ACCTCACTTGCAATAATTATAAGAACAAGATGATGGTCTGCCAAGTGGGT

PETM-40_BCAT 1351 GGTATAGAGGCTCTTGTGCGTACTGTCCCTCGGGCTGGTGACAGGGAAGA
130 358 GGTATAGAGGCTCTTGTGCGTACTGTCCCTCGGGCTGGTGACAGGGAAGA

PETM-40_BCAT 1401 CATCACTGAGCCTGCCATCTGTGCTCTTCGTCATCTGACCAGCCGACACC
130 408 CATCACTGAGCCTGCCATCTGTGCTCTTCGTCATCTGACCAGCCGACACC

PETM-40_BCAT 1451 AAGAAGCAGAGATGGCCCAGAATGCAGTTCGCCTTCACTATGGACTACCA
130 458 AAGAAGCAGAGATGGCCCAGAATGCAGTTCGCCTTCACTATGGACTACCA

PETM-40_BCAT 1501 GTTGTGGTTAAGCTCTTACACCCACCATCCCCTGAGCCT
130 508 GTTGTGGTTAAGCTCTTACACCCACCATCCCCTGAGCCT

PETM-40_BCAT 1540 CTGATAAAGGCTACTGTTGGATTGATTTCGAAATCTTGCCCTTTGTCCCGC
129 372 CTGATAAAGGCTACTGTTGGATTGATTTCGAAATCTTGCCCTTTGTCCCGC

PETM-40_BCAT 1590 AAATCATGCACCTTTGCGTGAGCAGGGTGCCATTCCACGACTAGTTCAGT
129 422 AAATCATGCACCTTTGCGTGAGCAGGGTGCCATTCCACGACTAGTTCAGT

PETM-40_BCAT 1640 TGCTTGTTTCGTGCACATCAGGATACCCAGCGCCGTACGTCCATGGGTGGG

129 472 TGCTTGTTTCGTGCACATCAGGATACCCAGCGCCGTACGTCCATGGGTGGG

PETM-40_BCAT 1690 ACACAGCAGCAATTTGTGGAGGGGGTCCGCATGGAAGAAATAGTTGAAGG
129 522 ACACAGCAGCAATTTGTGGAGGGGGTCCGCATGGAAGAAATAGTTGAAGG

PETM-40_BCAT 1740 TTGTACCGGAGCCCTTCACATCCTAGCTCGGGATGTTTACAACCGAATTG
129 572 TTGTACCGGAGCCCTTCACATCCTAGCTCGGGATGTTTACAACCGAATTG

PETM-40_BCAT 1790 TTATCAGAGGACTAAATACCATTCCATTGTTTGTGCAGCTGCTTTATTCT
129 622 TTATCAGAGGACTAAATACCATTCCATTGTTTGTGCAGCTGCTTTATTCT

PETM-40_BCAT 1840 CCCATTGAAAACATCCAAAGAGTAGCTGCAGGGGTCCCTCTGTGAACTTGC
129 672 CCCATTGAAAACATCCAAAGAGTAGCTGCAGGGGTCCCTCTGTGAACTTGC

PETM-40_BCAT 1890 TCAGGACAAGGAAGCTGCAGAAGCTATTGAAGCTGAGGGAGCCACAGCTC
129 722 TCAGGACAAGGAAGCTGCAGAAGCTATTGAAGCTGAGGGAGCCACAGCTC

PETM-40_BCAT 1940 CTCTGACAGAGTTACTTCACTCTAGGAATGAAGGTGTGGCGACATATGCA
129 772 CTCTGACAGAGTTACTTCACTCTAGGAATGAAGGTGTGGCGACATATGCA

PETM-40_BCAT 1990 GCTGCTGTTTTGTTCGGAATGTCTGAGGACAAGCCACAAGATTACAAGAA
129 822 GCTGCTGTTTTGTTCGGAATGTCTGAGGACAAGCCACAAGATTACAAGAA

PETM-40_BCAT 2040 ACGGCTTTCAGTTGAGCTGACCAGCTCTCTCTTCAGAACAGAGCCAATGG
129 872 ACGGCTTTCAGTTGAGCTGACCAGCTCTCTCTTCAGAACAGAGCCAATGG

PETM-40_BCAT 2090 CTTGGAATGAGACTGCTGATCTTGGACTTGATATTGGTGCCAGGGAGAA
129 922 CTTGGAATGAGACTGCTGATCTTGGACTTGATATTGGTGCCAGGGAGAA

PETM-40_BCAT 2140 CCCCTTGATATCGCCAGGATGATCCTAGCTATCGTTCTTTTCACTCTGG
129 972 CCCCTTGATATCGCCAGGATGATCCTAGCTATCGTTCTTTTCACTCTGG

PETM-40_BCAT 2190 TGGATATGGCCAGGATGCCTTGGGTATGGACCCCATGATGGAACATGAGA
129 1022 TGGATATGGCCAGGATGCCTTGGGTATGGACCCCATGATGGAACATGAGA

PETM-40_BCAT 2240 TGGGTGGCCACCACCCTGGTGCTGACTATCCAGTTGATGGGCTGCCAGAT
129 1072 TGGGTGGCCACCACCCTGGTGCTGACTATCCAGTTGATGGGCTGCCAGAT

PETM-40_BCAT 2290 CTGGGGCATGCCCAGGACCTCATGGATGGGCTGCCTCCAGGTGACAGCAA
129 1122 CTGGGGCATGCCCAGGACCTCATGGATGGGCTGCCTCCAGGTGACAGCAA

8 Anhang

```
PETM-40_BCAT      2340 TCAGCTGGCCTGGTTTGATACTGACCTGCTCGAGCACCACCACCACCACC
129                1172 TCAGCTGGCCTGGTTTGATACTGACCTGCTCGAGCACCACCACCACCACC

PETM-40_BCAT      2390 AC-----
129                1222 ACTGAGATCCGCGCAGATCAACC
```

Sequenzierung des Vektors pGEX_bCat1-781:

Startcodon: ATG

Erkennungssequenz für NcoI: **CCATGG**

Erkennungssequenz für XhoI: **CTCGAG**

```
PGEX_BCAT          1 -----GAAAAC
128                301 TGGCGACCATCCTCCCAAAATCGGATCTGGTTCCGCGTGGATCTGAAAAC
PGEX_BCAT          7 CTTTATTTTCAGGGCGCCATGGCTACTCAAGCTGATTTGATGGAGTTGGA
128                351 CTTTATTTTCAGGGCGCCATGGCTACTCAAGCTGATTTGATGGAGTTGGA

PGEX_BCAT          57 CATGG-CCATGGAACCAGACAGAAAAGCGGCTGTTAGTCACTGGCAGCAA
128                401 CATGGCCCATGGAACCAGACAGAAAAGCGGCTGTTAGTCACTGGCAGCAA

PGEX_BCAT          106 CAGTCTTACCTGGACTCTGGAATCCATTCTGGTGCCACTACCACAGCTCC
128                451 CAGTCTTACCTGGACTCTGGAATCCATTCTGGTGCCACTACCACAGCTCC

PGEX_BCAT          156 TTCTCTGAGTGGTAAAGGCAATCCTGAGGAAGAGGATGTGGATACCTCCC
128                501 TTCTCTGAGTGGTAAAGGCAATCCTGAGGAAGAGGATGTGGATACCTCCC

PGEX_BCAT          206 AAGTCCTGTATGAGTGGGAACAGGGATTTTCTCAGTCCTTCACTCAAGAA
128                551 AAGTCCTGTATGAGTGGGAACAGGGATTTTCTCAGTCCTTCACTCAAGAA

PGEX_BCAT          256 CAAGTAGCTGATATTGATGGACAGTATGCAATGACTCGAGCTCAGAGGGT
128                601 CAAGTAGCTGATATTGATGGACAGTATGCAATGACTCGAGCTCAGAGGGT

PGEX_BCAT          306 ACGAGCTGCTATGTTCCCTGAGACATTAGATGAGGGCATGCAGATCCCAT
128                651 ACGAGCTGCTATGTTCCCTGAGACATTAGATGAGGGCATGCAGATCCCAT

PGEX_BCAT          356 CTACACAGTTTGGATGCTGCTCATCCCCTAATGTCCAGCGTTTGGCTGAA
128                701 CTACACAGTTTGGATGCTGCTCATCCCCTAATGTCCAGCGTTTGGCTGAA
```

PGEX_BCAT 128	406 CCATCACAGATGCTGAAACATGCAGTTGTAACTTGATTAACATCAAGA 751 CCATCACAGATGCTGAAACATGCAGTTGTAACTTGATTAACATCAAGA
PGEX_BCAT 128	456 TGATGCAGAACTTGCCACACGTGCAATCCCTGAACTGACAAAACCTGCTAA 801 TGATGCAGAACTTGCCACACGTGCAATCCCTGAACTGACAAAACCTGCTAA
PGEX_BCAT 128	506 ATGACGAGGACCAGGTGGTGGTTAATAAGGCTGCAGTTATGGTCCATCAG 851 ATGACGAGGACCAGGTGGTGGTTAATAAGGCTGCAGTTATGGTCCATCAG
PGEX_BCAT 128	556 CTTTCTAAAAAGGAAGCTTCCAGACACGCTATCATGCGTTCTCCTCAGAT 901 CTTTCTAAAAAGGAAGCTTCCAGACACGCTATCATGCGTTCTCCTCAGAT
PGEX_BCAT 128	606 GGTGTCTGCTATTGTACGTACCATGCAGAATACAAATGATGTAGAAACAG 951 GGTGTCTGCTATTGTACGTACCATGCAGAATACAAATGATGTAGAAACAG
PGEX_BCAT 128	656 CTCGTTGTACCGCTGGGACCTTGCATAACCTTTCCCATCATCGTGAGGGC 1001 CTCGTTGTACCGCTGGGACCTTGCATAACCTTTCCCATCATCGTGAGGGC
PGEX_BCAT 128	706 TTACTGGCCATCTTTAAGTCTGGAGGCATTCTTGCCCTGGTGAAAATGCT 1051 TTACTGGCCATCTTTAAGTCTGGAGGCATTCTTGCCCTGGTGAAAATGCT
PGEX_BCAT 128	756 TGGTTCACCAGTGGATTCTGTGTTGTTTTATGCCATTACAACCTCTCCACA 1101 TGGTTCACCAGTGGATTCTGTGTTGTTTTATGCCATTACAACCTCTCCACA
PGEX_BCAT 128	806 ACCTTTTATTACATCAAGAAGGAGCTAAAATGGCAGTGCCTTTAGCTGGT 1151 ACCTTTTATTACATCAAGAAGGAGCTAAAATGGCAGTGCCTTTAGCTGGT
PGEX_BCAT 128	856 GGGCTGCAGAAAATGGTTGCCTTGCTCAACAAAACAAATGTTAAATTCTT 1201 GGGCTGCAGAAAATGGTTGCCTTGCTCAACAAAACAAATGTTAAATTCTT
PGEX_BCAT 128	906 GGCTATTACGACAGACTGCCTTCAAATTTTAGCTTATGGCAACCAAGAAA 1251 GGCTATTACGACAGACTGCCTTCAAATTTTAGCTTATGGCAACCAAGAAA
PGEX_BCAT 128	956 GC 1301 GC
PGEX_BCAT 131	942 TGGCAACCAAGAAAAGCAAGCTCATCATACTGGCTAGTGGTGGACCCCAAG 429 TGGCAACCAAGAAAAGCAAGCTCATCATACTGGCTAGTGGTGGACCCCAAG

8 Anhang

PGEX_BCAT 992 CTTTAGTAAATATAATGAGGACCTATACTTACGAAAACTACTGTGGACC
131 479 CTTTAGTAAATATAATGAGGACCTATACTTACGAAAACTACTGTGGACC

PGEX_BCAT 1042 ACAAGCAGAGTGCTGAAGGTGCTATCTGTCTGCTCTAGTAATAAGCCGGC
131 529 ACAAGCAGAGTGCTGAAGGTGCTATCTGTCTGCTCTAGTAATAAGCCGGC

PGEX_BCAT 1092 TATTGTAGAAGCTGGTGGAATGCAAGCTTTAGGACTTCACCTGACAGATC
131 579 TATTGTAGAAGCTGGTGGAATGCAAGCTTTAGGACTTCACCTGACAGATC

PGEX_BCAT 1050 AGTGCTGAAGGTGCTATCTGTCTGCTCTAGTAATAAGCCGGCTATTGTAG
130 59 AGTGCTGAAGGTGCTATCTGTCTGCTCTAGTAATAAGCCGGCTATTGTAG

PGEX_BCAT 1100 AAGCTGGTGGAATGCAAGCTTTAGGACTTCACCTGACAGATCCAAGTCAA
130 109 AAGCTGGTGGAATGCAAGCTTTAGGACTTCACCTGACAGATCCAAGTCAA

PGEX_BCAT 1150 CGTCTTGTTTCAGAACTGTCTTTGGACTCTCAGGAATCTTTCAGATGCTGC
130 159 CGTCTTGTTTCAGAACTGTCTTTGGACTCTCAGGAATCTTTCAGATGCTGC

PGEX_BCAT 1200 AACTAAACAGGAAGGGATGGAAGGTCTCCTTGGGACTCTTGTTTCAGCTTC
130 209 AACTAAACAGGAAGGGATGGAAGGTCTCCTTGGGACTCTTGTTTCAGCTTC

PGEX_BCAT 1250 TGGGTTTCAGATGATATAAAATGTGGTCACCTGTGCAGCTGGAATTCTTTCT
130 259 TGGGTTTCAGATGATATAAAATGTGGTCACCTGTGCAGCTGGAATTCTTTCT

PGEX_BCAT 1300 AACCTCACTTGCAATAATTATAAGAACAAGATGATGGTCTGCCAAGTGGG
130 309 AACCTCACTTGCAATAATTATAAGAACAAGATGATGGTCTGCCAAGTGGG

PGEX_BCAT 1350 TGGTATAGAGGCTCTTGTGCGTACTGTCC TTCGGGCTGGTGACAGGGAAG
130 359 TGGTATAGAGGCTCTTGTGCGTACTGTCC TTCGGGCTGGTGACAGGGAAG

PGEX_BCAT 1400 ACATCACTGAGCCTGCCATCTGTGCTCTTCGTCATCTGACCAGCCGACAC
130 409 ACATCACTGAGCCTGCCATCTGTGCTCTTCGTCATCTGACCAGCCGACAC

PGEX_BCAT 1450 CAAGAAGCAGAGATGGCCCAGAATGCAGTTCGCCTTCACTATGGACTACC
130 459 CAAGAAGCAGAGATGGCCCAGAATGCAGTTCGCCTTCACTATGGACTACC

PGEX_BCAT 1500 AGTTGTGGTTAAGCTCTTACACCCACCATCCCCTGGCCTCTGATAAAGG
130 509 AGTTGTGGTTAAGCTCTTACACCCACCATCCCCTGGCCTCTGATAAAGG

PGEX_BCAT 1550 CTA CTGTTGGATTGATTCGAAATCTTGCCCTTTGTCCCGCAAATCATGCA

130 559 CTACTGTTGGATTGATTTCGAAATCTTGCCCTTTGTCCCGCAAATCATGCA

PGEX_BCAT 1600 CCTTTGCGTGAGCAGGGTGCCATTCCACGACTAGTTCAGTTGCTTGTTTCG
130 609 CCTTTGCGTGAGCAGGGTGCCATTCCACGACTAGTTCAGTTGCTTGTTTCG

PGEX_BCAT 1650 TGCACATCAGGATAACCCAGCGCCGTACGTCCATGGGTGGGACACAGCAGC
130 659 TGCACATCAGGATAACCCAGCGCCGTACGTCCATGGGTGGGACACAGCAGC

PGEX_BCAT 1700 AATTTGTGGAGGGGGTCCGCATGGAAGAAATAGTTGAAGGTTGTACCGGA
130 709 AATTTGTGGAGGGGGTCCGCATGGAAGAAATAGTTGAAGGTTGTACCGGA

PGEX_BCAT 1750 GCCCTTCACATCCTAGCTCGGGATGTTTACAACCGAATTGTTATCAGAGG
130 759 GCCCTTCACATCCTAGCTCGGGATGTTTACAACCGAATTGTTATCAGAGG

PGEX_BCAT 1800 ACTAAATACCATTCCATTGTTTGTGCAGCTGCTTTATTCTCCCATTGAAA
130 809 ACTAAATACCATTCCATTGTTTGTGCAGCTGCTTTATTCTCCCATTGAAA

PGEX_BCAT 1795 AGAGGACTAAATACCATTCCATTGTTTGTGCAGCTGCTTTATTCTCCCAT
148 687 AGAGGACTAAATACCATTCCATTGTTTGTGCAGCTGCTTTATTCTCCCAT

PGEX_BCAT 1845 TGAAAACATCCAAAGAGTAGCTGCAGGGGTCCCTCTGTGAACTTGCTCAGG
148 737 TGAAAACATCCAAAGAGTAGCTGCAGGGGTCCCTCTGTGAACTTGCTCAGG

PGEX_BCAT 1895 ACAAGGAAGCTGCAGAAGCTATTGAAGCTGAGGGAGCCACAGCTCCTCTG
148 787 ACAAGGAAGCTGCAGAAGCTATTGAAGCTGAGGGAGCCACAGCTCCTCTG

PGEX_BCAT 1945 ACAGAGTTACTTCACTCTAGGAATGAAGGTGTGGCGACATATGCAGCTGC
148 837 ACAGAGTTACTTCACTCTAGGAATGAAGGTGTGGCGACATATGCAGCTGC

PGEX_BCAT 1995 TGTTTTGTTCCGAATGTCTGAGGACAAGCCACAAGATTACAAGAAACGGC
148 887 TGTTTTGTTCCGAATGTCTGAGGACAAGCCACAAGATTACAAGAAACGGC

PGEX_BCAT 2045 TTTCAGTTGAGCTGACCAGCTCTCTCTTCAGAACAGAGCCAATGGCTTGG
148 937 TTTCAGTTGAGCTGACCAGCTCTCTCTTCAGAACAGAGCCAATGGCTTGG

PGEX_BCAT 2095 AATGAGACTGCTGATCTTGACTTGATATTGGTGCCCAGGGAGAACCCCT
148 987 AATGAGACTGCTGATCTTGACTTGATATTGGTGCCCAGGGAGAACCCCT

PGEX_BCAT 2145 TGGATATCGCCAGGATGATCCTAGCTATCGTTCTTTTCACTCTGGTGGAT
148 1037 TGGATATCGCCAGGATGATCCTAGCTATCGTTCTTTTCACTCTGGTGGAT

8 Anhang

```
PGEX_BCAT      2195 ATGGCCAGGATGCCTTGGGTATGGACCCCATGATGGAACATGAGATGGGT
148            1087 ATGGCCAGGATGCCTTGGGTATGGACCCCATGATGGAACATGAGATGGGT

PGEX_BCAT      2245 GGCCACCACCCTGGTGCTGACTATCCAGTTGATGGGCTGCCAGATCTGGG
148            1137 GGCCACCACCCTGGTGCTGACTATCCAGTTGATGGGCTGCCAGATCTGGG

PGEX_BCAT      2295 GCATGCCCAGGACCTCATGGATGGGCTGCCTCCAGGTGACAGCAATCAGC
148            1187 GCATGCCCAGGACCTCATGGATGGGCTGCCTCCAGGTGACAGCAATCAGC

PGEX_BCAT      2345 TGGCCTGGTTTGATACTGACCTGCTCGAGCGGCCGCATCGTGA CTGACTG
148            1237 TGGCCTGGTTTGATACTGACCTGCTCGAGCGGCCGCATCGTGA CTGACTG

PGEX_BCAT      2395 -----
148            1287 ACGATCTGCTCCGCCCCAGC
```

Sequenzierung des Vektors pGEX_bCat134-665:

Startcodon: **ATG**

Erkennungssequenz für NcoI: **CCATGG**

Erkennungssequenz für XhoI: **CTCGAG**

```
PGEX_BCAT      1 -----GAAAACCTTTATTTTCAGGGCGCCATGGCGCATGCA
145            51 TTCCGCGTGGATCTGAAAACCTTTATTTTCAGGGCGCCATGGCGCATGCA

PGEX_BCAT      37 GTTGTAAACTTGATTA ACTATCAAGATGATGCAGAACTTGCCACACGTGC
145            101 GTTGTAAACTTGATTA ACTATCAAGATGATGCAGAACTTGCCACACGTGC

PGEX_BCAT      87 AATCCCTGAACTGACAAA ACTGCTAAATGACGAGGACCAGGTGGTGGTTA
145            151 AATCCCTGAACTGACAAA ACTGCTAAATGACGAGGACCAGGTGGTGGTTA

PGEX_BCAT      137 ATAAGGCTGCAGTTATGGTCCATCAGCTTTCTAAAAAGGAAGCTTCCAGA
145            201 ATAAGGCTGCAGTTATGGTCCATCAGCTTTCTAAAAAGGAAGCTTCCAGA

PGEX_BCAT      187 CACGCTATCATGCGTTCTCCTCAGATGGTGTCTGCTATTGTACGTACCAT
145            251 CACGCTATCATGCGTTCTCCTCAGATGGTGTCTGCTATTGTACGTACCAT

PGEX_BCAT      237 GCAGAATACAAATGATGTAGAAA CAGCTCGTTGTACCGCTGGGACCTTGC
145            301 GCAGAATACAAATGATGTAGAAA CAGCTCGTTGTACCGCTGGGACCTTGC
```

PGEX_BCAT 287 ATAACCTTTCCCATCATCGTGAGGGCTTACTGGCCATCTTTAAGTCTGGA
 145 351 ATAACCTTTCCCATCATCGTGAGGGCTTACTGGCCATCTTTAAGTCTGGA

PGEX_BCAT 337 GGCATTTCCTGCCCTGGTGAAAAATGCTTGGTTCACCAGTGGATTCTGTGTT
 145 401 GGCATTTCCTGCCCTGGTGAAAAATGCTTGGTTCACCAGTGGATTCTGTGTT

PGEX_BCAT 387 GTTTTATGCCATTACAACCTCCACAACCTTTTATTACATCAAGAAGGAG
 145 451 GTTTTATGCCATTACAACCTCCACAACCTTTTATTACATCAAGAAGGAG

PGEX_BCAT 437 CTAAAATGGCAGTGCGTTTAGCTGGTGGGCTGCAGAAAATGGTTGCCTTG
 145 501 CTAAAATGGCAGTGCGTTTAGCTGGTGGGCTGCAGAAAATGGTTGCCTTG

PGEX_BCAT 487 CTCAACAAAACAAAATGTTAAATTCCTGGCTATTACGACAGACTGCCTTCA
 145 551 CTCAACAAAACAAAATGTTAAATTCCTGGCTATTACGACAGACTGCCTTCA

PGEX_BCAT 537 AATTTTAGCTTATGGCAACCAAGAAAGCAAGCTCATCATACTGGCTAGTG
 145 601 AATTTTAGCTTATGGCAACCAAGAAAGCAAGCTCATCATACTGGCTAGTG

PGEX_BCAT 587 GTGGACCCCAAGCTTTAGTAAATATAATGAGGACCTATACTTACGAAAAA
 145 651 GTGGACCCCAAGCTTTAGTAAATATAATGAGGACCTATACTTACGAAAAA

PGEX_BCAT 637 CTACTGTGGACCACAAGCAGAGTGCTGAAGGTGCTATCTGTCTGCTCTAG
 145 701 CTACTGTGGACCACAAGCAGAGTGCTGAAGGTGCTATCTGTCTGCTCTAG

PGEX_BCAT 687 TAATAAGCCGGCTATTGTAGAAGCTGGTGGAAATGCAAGCTTTAGGACTTC
 145 751 TAATAAGCCGGCTATTGTAGAAGCTGGTGGAAATGCAAGCTTTAGGACTTC

PGEX_BCAT 737 ACCTGACAGATCCAAGTCAACGCTTGTTCAGAACTGTCTTTGGACTCTC
 145 801 ACCTGACAGATCCAAGTCAACGCTTGTTCAGAACTGTCTTTGGACTCTC

PGEX_BCAT 787 AGGAATCTTTTCAGATGCTGCAACTAAACAGGAAGGGATGGAAGGTCTCCT
 145 851 AGGAATCTTTTCAGATGCTGCAACTAAACAGGAAGGGATGGAAGGTCTCCT

PGEX_BCAT 837 TGGGACTCTTGTTCAGCTTCTGGGTTTCAGATGATATAAAATGTGGTCACCT
 145 901 TGGGACTCTTGTTCAGCTTCTGGGTTTCAGATGATATAAAATGTGGTCACCT

PGEX_BCAT 887 GTGCAGCTGGAATTCTTTCTAACCTCACTTGCAATAATTATAAGAACAAG
 145 951 GTGCAGCTGGAATTCTTTCTAACCTCACTTGCAATAATTATAAGAACAAG

PGEX_BCAT 937 ATGATGGTCTGCCAAGTGGGTGGTATAGAGGCTCTTGTGCGTACTGTCCT

8 Anhang

145	1001	ATGATGGTCTGCCAAGTGGGTGGTATAGAGGCTCTTGTGCGTACTGTCCT
PGEX_BCAT	944	TCTGCCAAGTGGGTGGTATAGAGGCTCTTGTGCGTACTGTCCTTCGGGCT
148	485	TCTGCCAAGTGGGTGGTATAGAGGCTCTTGTGCGTACTGTCCTTCGGGCT
PGEX_BCAT	994	GGTGACAGGGAAGACATCACTGAGCCTGCCATCTGTGCTCTTCGTCATCT
148	535	GGTGACAGGGAAGACATCACTGAGCCTGCCATCTGTGCTCTTCGTCATCT
PGEX_BCAT	1044	GACCAGCCGACACCAAGAAGCAGAGATGGCCCAGAATGCAGTTCGCCTTC
148	585	GACCAGCCGACACCAAGAAGCAGAGATGGCCCAGAATGCAGTTCGCCTTC
PGEX_BCAT	1094	ACTATGGACTACCAGTTGTGGTTAAGCTCTTACACCCACCATCCCCTGG
148	635	ACTATGGACTACCAGTTGTGGTTAAGCTCTTACACCCACCATCCCCTGG
PGEX_BCAT	1144	CCTCTGATAAAGGCTACTGTTGGATTGATTCGAAAATCTTGCCCTTTGTCC
148	685	CCTCTGATAAAGGCTACTGTTGGATTGATTCGAAAATCTTGCCCTTTGTCC
PGEX_BCAT	1194	CGCAAATCATGCACCTTTGCGTGAGCAGGGTGCCATTCCACGACTAGTTC
148	735	CGCAAATCATGCACCTTTGCGTGAGCAGGGTGCCATTCCACGACTAGTTC
PGEX_BCAT	1244	AGTTGCTTGTTCGTGCACATCAGGATACCCAGCGCCGTACGTCCATGGGT
148	785	AGTTGCTTGTTCGTGCACATCAGGATACCCAGCGCCGTACGTCCATGGGT
PGEX_BCAT	1294	GGGACACAGCAGCAATTTGTGGAGGGGGTCCGCATGGAAGAAAATAGTTGA
148	835	GGGACACAGCAGCAATTTGTGGAGGGGGTCCGCATGGAAGAAAATAGTTGA
PGEX_BCAT	1344	AGGTTGTACCGGAGCCCTTCACATCCTAGCTCGGGATGTTACAACCGAA
148	885	AGGTTGTACCGGAGCCCTTCACATCCTAGCTCGGGATGTTACAACCGAA
PGEX_BCAT	1394	TTGTTATCAGAGGACTAAAATACCATTCCATTGTTTGTGTCAGCTGCTTTAT
148	935	TTGTTATCAGAGGACTAAAATACCATTCCATTGTTTGTGTCAGCTGCTTTAT
PGEX_BCAT	1444	TCTCCCATTTGAAAACATCCAAAGAGTAGCTGCAGGGGTCCTCTGTGAACT
148	985	TCTCCCATTTGAAAACATCCAAAGAGTAGCTGCAGGGGTCCTCTGTGAACT
PGEX_BCAT	1494	TGCTCAGGACAAGGAAGCTGCAGAAGCTATTGAAGCTGAGGGAGCCACAG
148	1035	TGCTCAGGACAAGGAAGCTGCAGAAGCTATTGAAGCTGAGGGAGCCACAG
PGEX_BCAT	1544	CTCCTCTGACAGAGTTACTTCACTCTAGGAATGAAGGTGTGGCGACATAT

```
148          1085 CTCCTCTGACAGAGTTACTTCACTCTAGGAATGAAGGTGTGGCGACATAT

PGEX_BCAT    1594 GCAGCTGCTGTTTTGTTCCGAATGTCTGAGGACTGACTCGAGCGGCCGCA
148          1135 GCAGCTGCTGTTTTGTTCCGAATGTCTGAGGACTGACTCGAGCGGCCGCA

PGEX_BCAT    1644 TCGTGACTGACTG-----
148          1185 TCGTGACTGACTGACGATCTGCCTCGGCGGGAACGGG
```

8.8 Expressionsanalyse

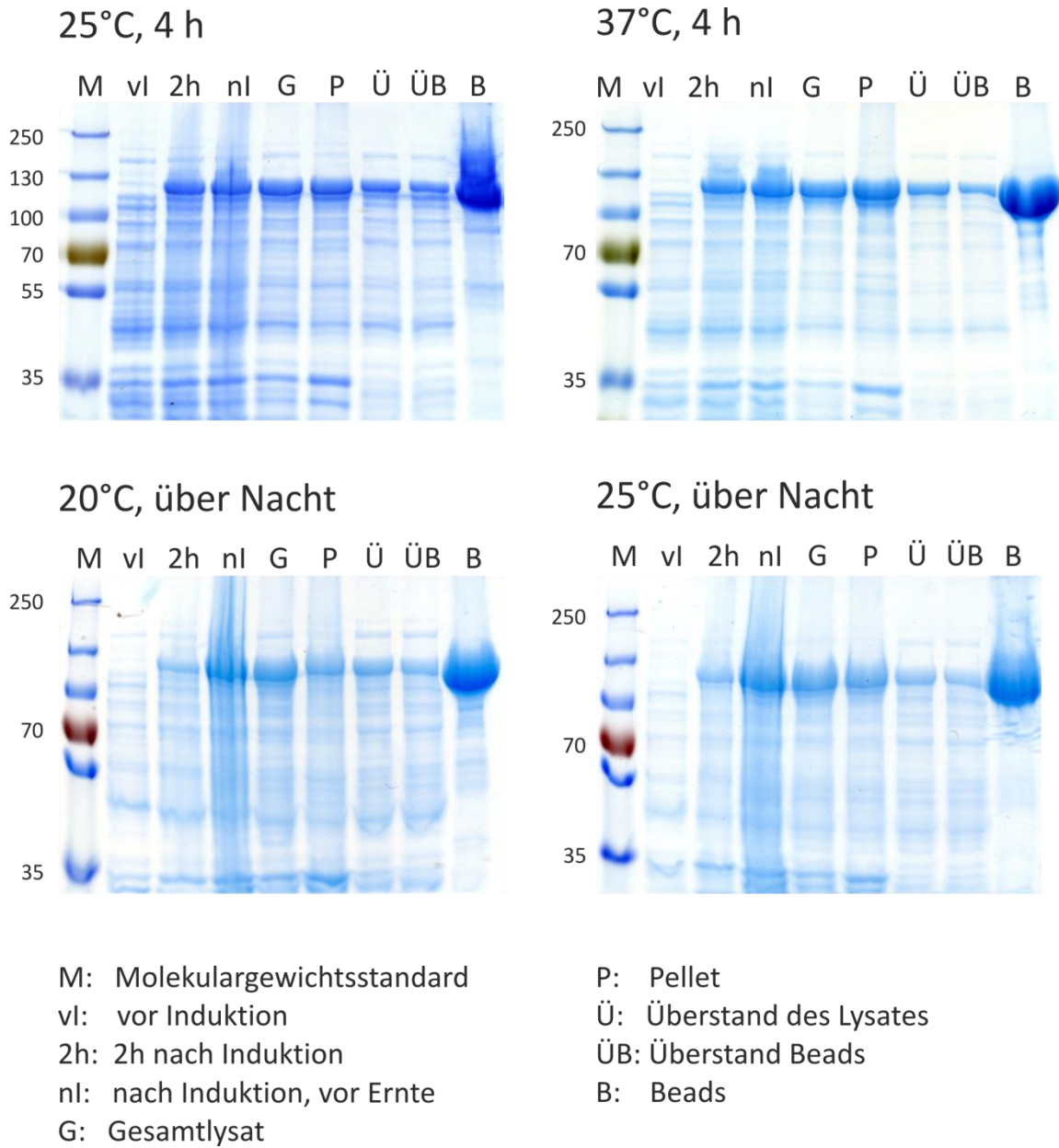


Abbildung 50: Expressionsanalyse von pGEX-bCat1-781 in *E.coli* BL21-Gold (DE3) in TB-Medium. 10%iges SDS-Polyacrylamidgel, Molekulargewichtsstandard = PageRuler Prestained Plus Protein Ladder.

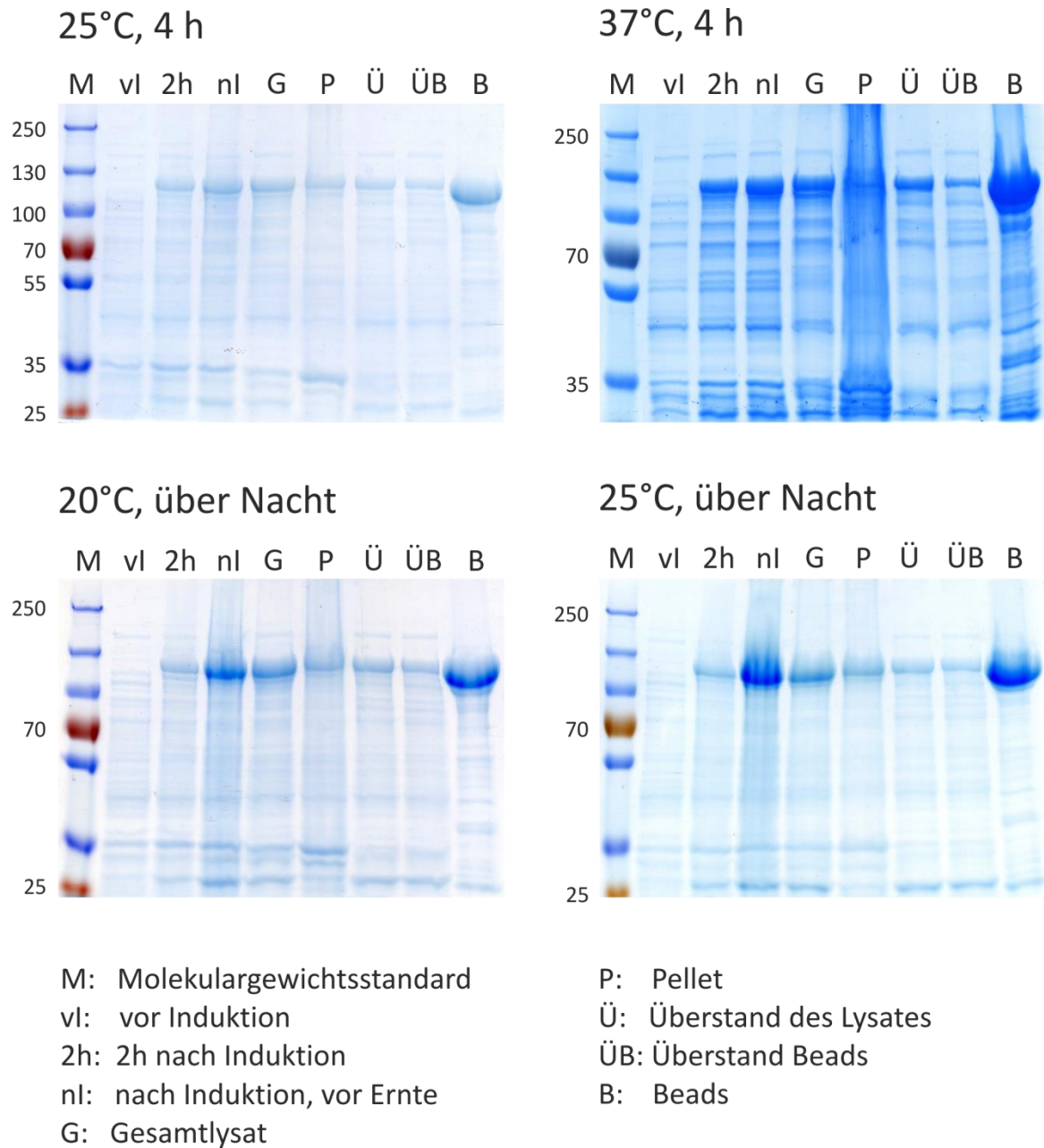


Abbildung 51: Expressionsanalyse von pGEX-bCat1-781 in *E.coli* BL21-Gold (DE3) in LB-Medium. 10%iges SDS-Polyacrylamidgel, Molekulargewichtsstandard = PageRuler Prestained Plus Protein Ladder.

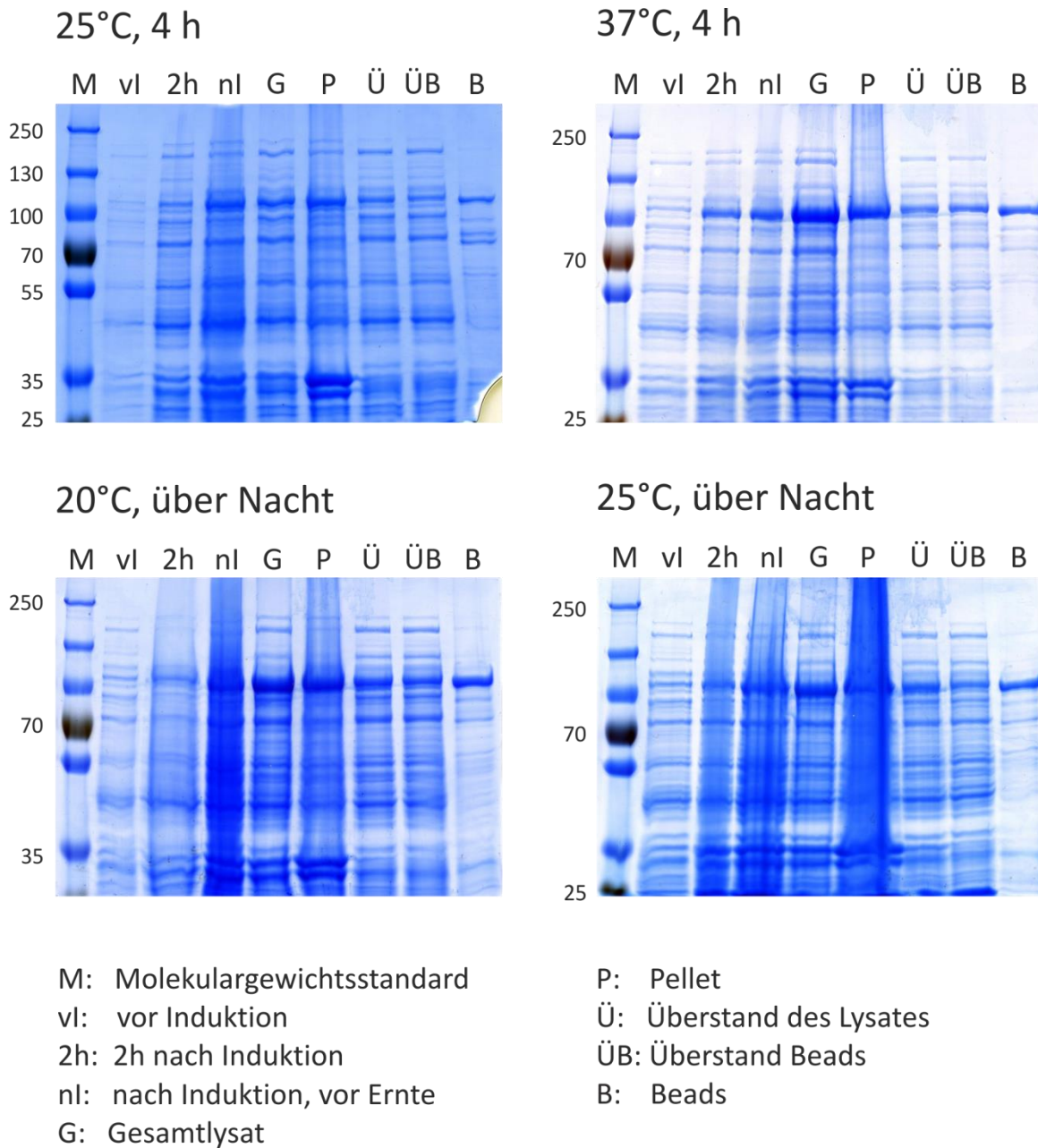


Abbildung 52: Expressionsanalyse von pET28a(+)-bCat1-781 in *E.coli* BL21-Gold (DE3) in TB-Medium. 10%iges SDS-Polyacrylamidgel, Molekulargewichtsstandard = PageRuler Prestained Plus Protein Ladder.

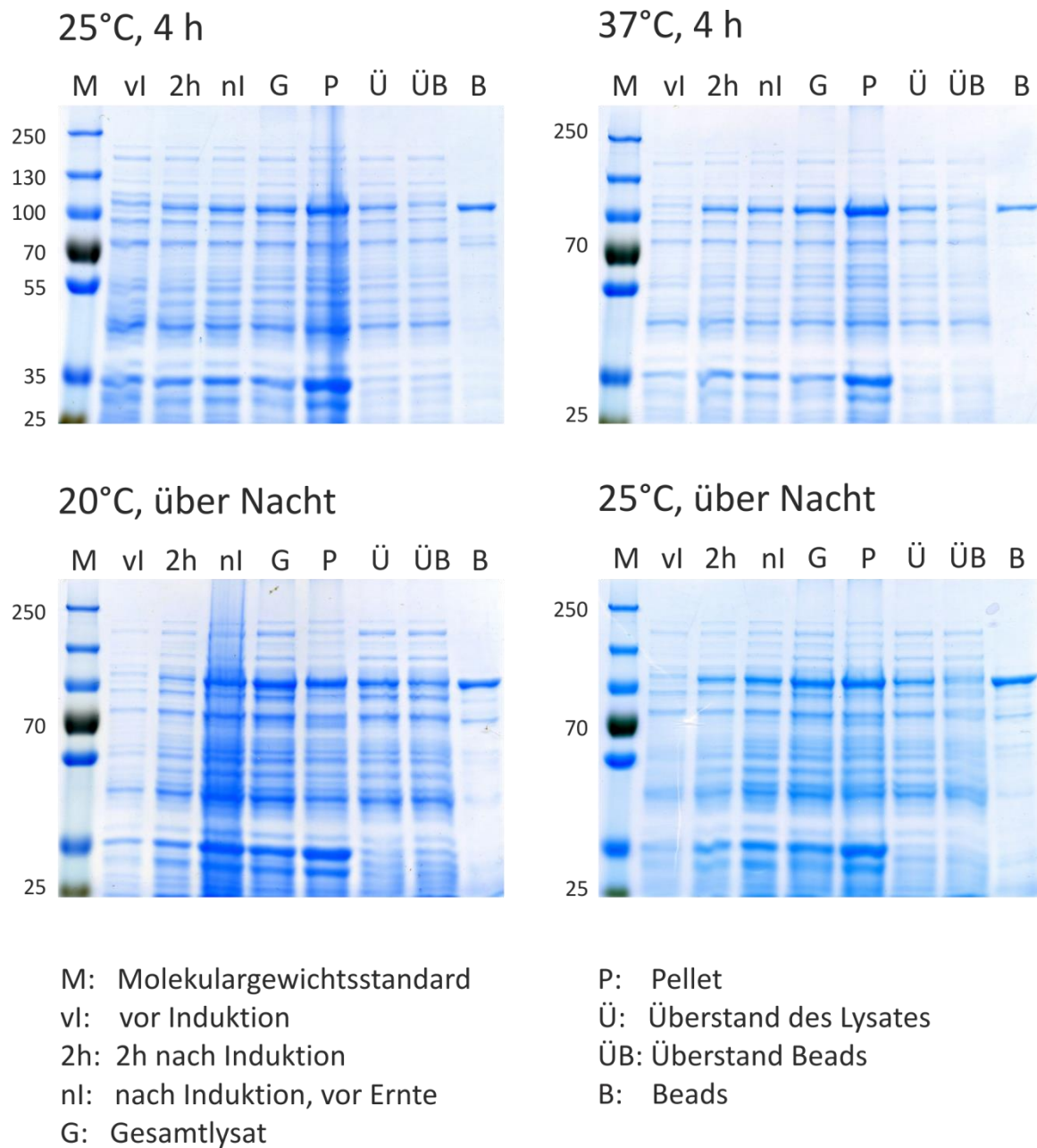


Abbildung 53: Expressionsanalyse von pET28a(+)-bCat1-781 in *E.coli* BL21-Gold (DE3) in LB-Medium. 10%iges SDS-Polyacrylamidgel, Molekulargewichtsstandard = PageRuler Prestained Plus Protein Ladder.

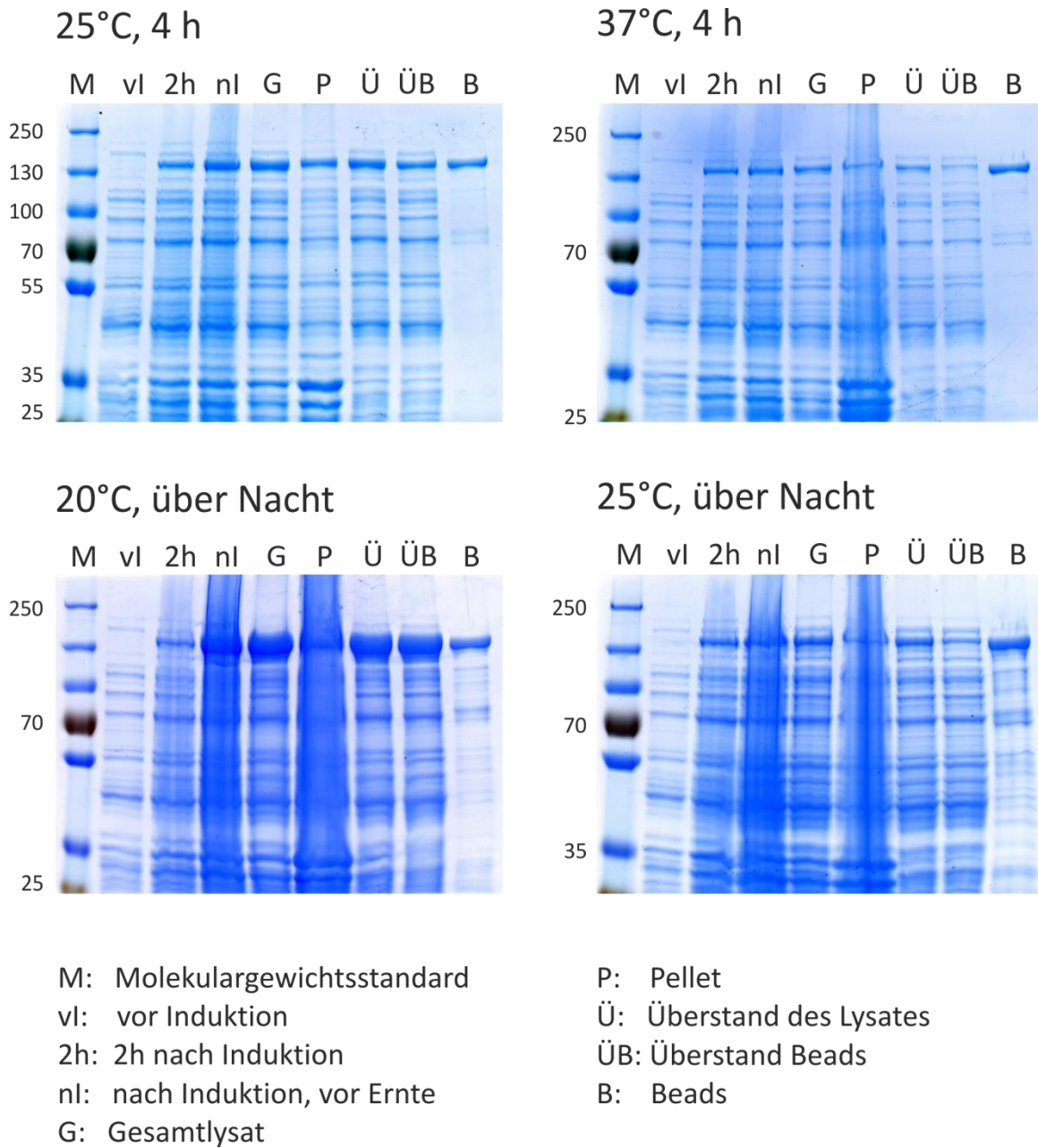


Abbildung 54: Expressionsanalyse von pETM-40-bCat1-781 in *E.coli* BL21-Gold (DE3) in TB-Medium. 10%iges SDS-Polyacrylamidgel, Molekulargewichtsstandard = PageRuler Prestained Plus Protein Ladder.

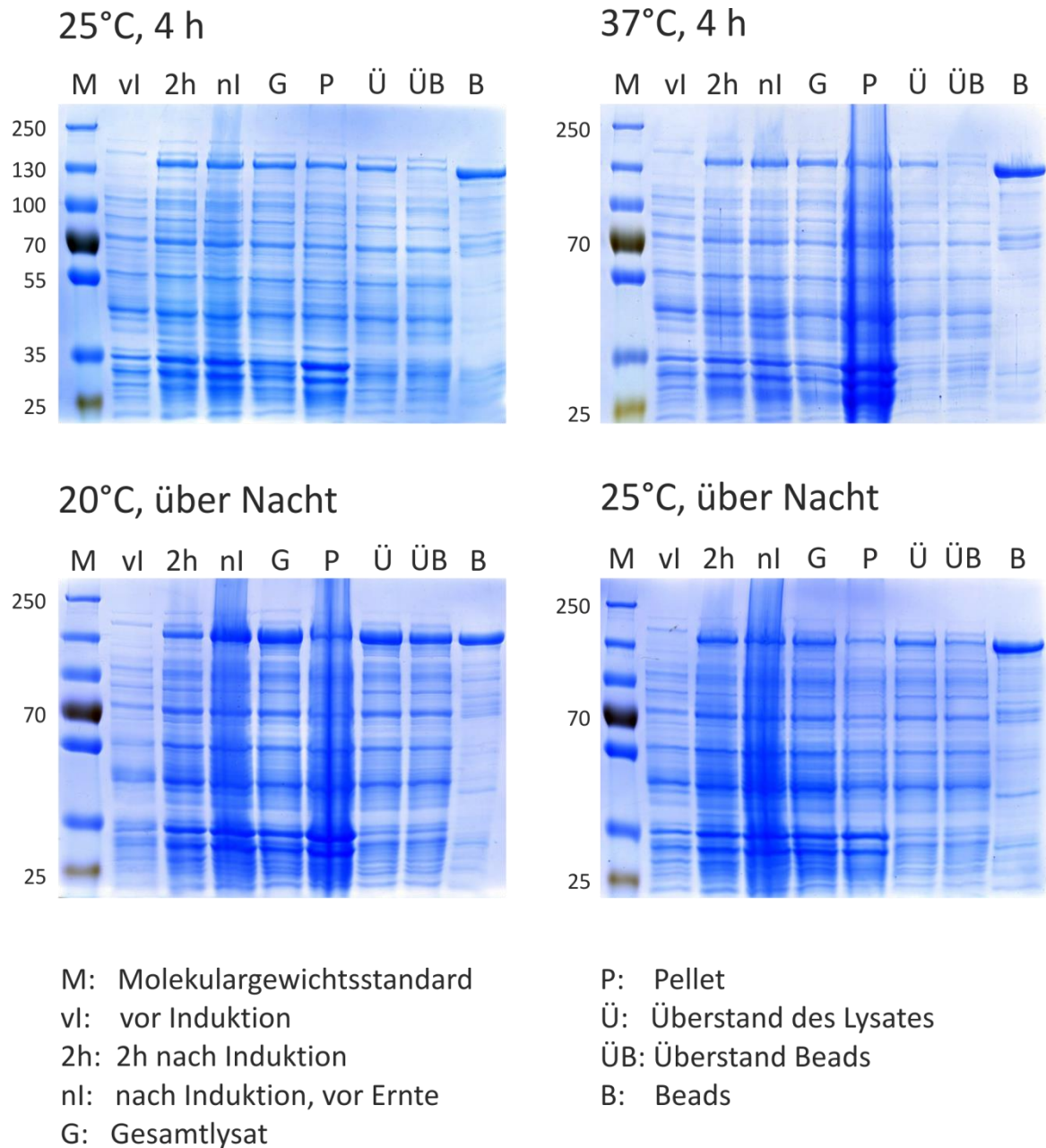


Abbildung 55: Expressionsanalyse von pETM-40-bCat1-781 in *E.coli* BL21-Gold (DE3) in LB-Medium. 10%iges SDS-Polyacrylamidgel, Molekulargewichtsstandard = PageRuler Prestained Plus Protein Ladder

8.9 DSF

Tabelle 46: Pufferzusammensetzungen zur Bestimmung der Thermostabilität von β -Catenin. Alle Angaben beziehen sich auf die 5X Stammlösungen.

Puffer	Puffersubstanz	pH	Additiv
A01	ddH ₂ O	-	-
A02	Zitronensäure 100 mM	4.0	-
A03	Natriumacetat 100 mM	4.5	-
A04	Zitronensäure 100 mM	5.0	-
A05	MES 100 mM	6.0	-
A06	KH ₂ PO ₄ +K ₂ HPO ₄ 100 mM	6.0	-
A07	Zitronensäure 100 mM	6.0	-
A08	Bis-Tris100 mM	6.5	-
A09	Natriumkakodylat 100 mM	6.5	-
A10	NaH ₂ PO ₄ +Na ₂ HPO ₄ 100 mM	7.0	-
A11	KH ₂ PO ₄ +K ₂ HPO ₄ 100 mM	7.0	-
A12	HEPES 100 mM	7.0	-
B01	MOPS 100 mM	7.0	-
B02	Ammoniumacetat 100 mM	7.3	-
B03	Tris 100 mM	7.5	-
B04	NaH ₂ PO ₄ +Na ₂ HPO ₄ 100 mM	7.5	-
B05	Imidazol 100 mM	8.0	-
B06	HEPES 100 mM	8.0	-
B07	Tris 100 mM	8.0	-
B08	Tricin 100 mM	8.0	-
B09	Bicin 100 mM	8.0	-
B10	Bicin 100 mM	8.5	-
B11	Tris 100 mM	8.5	-
B12	Bicin100 mM	9.0	-
C01	ddH ₂ O	-	NaCl 250 mM
C02	Zitronensäure 100 mM	4.0	NaCl 250 mM
C03	Natriumacetat 100 mM	4.5	NaCl 250 mM
C04	Zitronensäure 100 mM	5.0	NaCl 250 mM
C05	MES 100 mM	6.0	NaCl 250 mM
C06	KH ₂ PO ₄ +K ₂ HPO ₄ 100 mM	6.0	NaCl 250 mM
C07	Zitronensäure 100 mM	6.0	NaCl 250 mM
C08	Bis-Tris 100 mM	6.5	NaCl 250 mM
C09	Natriumkakodylat 100 mM	6.5	NaCl 250 mM
C10	NaH ₂ PO ₄ +Na ₂ HPO ₄ 100 mM	7.0	NaCl 250 mM
C11	KH ₂ PO ₄ +K ₂ HPO ₄ 100 mM	7.0	NaCl 250 mM
C12	HEPES 100 mM	7.0	NaCl 250 mM
D01	MOPS 100 mM	7.0	NaCl 250 mM
D02	Ammoniumacetat 100 mM	7.3	NaCl 250 mM
D03	Tris 100 mM	7.5	NaCl 250 mM
D04	NaH ₂ PO ₄ +Na ₂ HPO ₄ 100 mM	7.5	NaCl 250 mM
D05	Imidazol 100 mM	8.0	NaCl 250 mM

Puffer	Puffersubstanz	pH	Additiv
D06	HEPES 100 mM	8.0	NaCl 250 mM
D07	Tris 100 mM	8.0	NaCl 250 mM
D08	Tricin 100 mM	8.0	NaCl 250 mM
D09	Bicin 100 mM	8.0	NaCl 250 mM
D10	Bicin 100 mM	8.5	NaCl 250 mM
D11	Tris100 mM	8.5	NaCl 250 mM
D12	Bicin	9.0	NaCl 250 mM
E01	HEPES100 mM	7.0	Glycerol 12.5%
E02	HEPES 100 mM	7.0	Glycerol 50%
E03	HEPES 100 mM	7.0	PEG3350 10%
E04	HEPES 100 mM	7.0	PEG3350 25%
E05	HEPES 100 mM	7.5	Glycerol 12.5%
E06	HEPES 100 mM	7.5	Glycerol 50%
E07	HEPES 100 mM	7.5	PEG3350 10%
E08	HEPES 100 mM	7.5	PEG3350 25%
E09	Tris 100 mM	8.0	Glycerol 12.5%
E10	Tris 100 mM	8.0	Glycerol 50%
E11	Tris 100 mM	8.0	PEG3350 10%
E12	Tris 100 mM	8.0	PEG3350 25%
F01	HEPES 100 mM	7.0	MgCl ₂ 5 mM
F02	HEPES 100 mM	7.0	MgCl ₂ 10 mM
F03	HEPES 100 mM	7.0	MgCl ₂ 25 mM
F04	HEPES 100 mM	7.5	MgCl ₂ 5 mM
F05	HEPES 100 mM	7.5	MgCl ₂ 10 mM
F06	HEPES 100 mM	7.5	MgCl ₂ 25 mM
F07	Tris 100 mM	8.0	MgCl ₂ 5 mM
F08	Tris100 mM	8.0	MgCl ₂ 10 mM
F09	Tris100 mM	8.0	MgCl ₂ 25 mM
F10	Tris 50 mM	8.5	MgCl ₂ 5 mM
F11	Tris 50 mM	8.5	MgCl ₂ 10 mM
F12	Tris 50 mM	8.5	MgCl ₂ 25 mM
G01	HEPES 10 mM	7.5	-
G02	HEPES 50 mM	7.5	-
G03	HEPES 100 mM	7.5	-
G04	HEPES 250 mM	7.5	-
G05	NaH ₂ PO ₄ +Na ₂ HPO ₄ 10 mM	7.5	-
G06	NaH ₂ PO ₄ +Na ₂ HPO ₄ 50 mM	7.5	-
G07	NaH ₂ PO ₄ +Na ₂ HPO ₄ 100 mM	7.5	-
G08	NaH ₂ PO ₄ +Na ₂ HPO ₄ 250 mM	7.5	-
G09	Tris 10 mM	8.0	-
G10	Tris 50 mM	8.0	-
G11	Tris 100 mM	8.0	-
G12	Tris 250 mM	8.0	-
H01	HEPES 50 mM	7.5	NaCl 50 mM
H02	HEPES 50 mM	7.5	NaCl 250 mM
H03	HEPES 50 mM	7.5	NaCl 500 mM

Puffer	Puffersubstanz	pH	Additiv
H04	HEPES 50 mM	7.5	NaCl 750 mM
H05	HEPES 50 mM	7.5	NaCl 1000 mM
H06	HEPES 50 mM	7.5	NaCl 2500 mM
H07	Tris 50 mM	8.0	NaCl 50 mM
H08	Tris 50 mM	8.0	NaCl 250 mM
H09	Tris 50 mM	8.0	NaCl 500 mM
H10	Tris 50 mM	8.0	NaCl 750 mM
H11	Tris 50 mM	8.0	NaCl 1000 mM
H12	Tris 50 mM	8.0	NaCl 2500 mM

8.10 nanoDSF

Tabelle 47: Pufferzusammensetzungen für nanoDSF. Alle Angaben beziehen sich auf die 5X Stammlösungen.

Puffer	Puffersubstanz	pH	NaCl	Glycerol
1	100 mM NaH ₂ PO ₄ +Na ₂ HPO ₄	7	750 mM	-
2	100 mM NaH ₂ PO ₄ +Na ₂ HPO ₄	7.5	750 mM	-
3	100 M NaH ₂ PO ₄ +Na ₂ HPO ₄	8	750 mM	-
4	100 mM Natriumcitrat	5	750 mM	-
5	100 mM Natriumcitrat	6	750 mM	-
6	250 mM HEPES	7	750 mM	-
7	250 mM HEPES	7.5	750 mM	-
8	250 mM HEPES	8	750 mM	-
9	250 mM HEPES	7.5	750 mM	12.5%
10	250 mM HEPES	7.5	750 mM	25%
11	250 mM HEPES	7.5	750 mM	50%
12	250 mM HEPES	7.5	250 mM	-
13	250 mM HEPES	7.5	1250 mM	-
14	250 mM HEPES	7.5	2500 mM	-
15	50 mM HEPES	7.5	750 mM	-
16	250 mM Tris	7.5	750 mM	-
17	250 mM Tris	8	750 mM	-
18	50 mM Tris	7.5	750 mM	-
19	6 M Guanidinhydrochlorid	-	-	-
20	7.5 M Harnstoff	-	-	-

8.11 Reporter-Gen-Assay

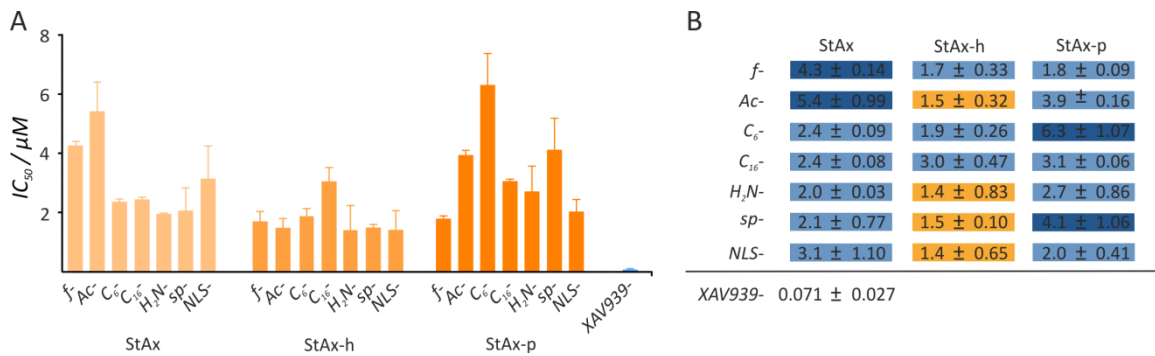


Abbildung 57: Inhibition des Wnt/ β -Catenin Signalweges durch StAx-Peptide in einem Reporter-Gen-Assay. 293T-Zellen wurden mit: i) Wnt3a-exprimierendem Vektor, ii) Super (8x)TOPFlash-Vektor codierend für Luciferase unter der Kontrolle von TCF/LEF-Response-Elementen und iii) Renilla-Luciferase codierender Vektor zur Normalisierung. Nach der Peptidbehandlung (22 h) wurde die Luciferaseaktivität über Biolumineszenz nachgewiesen. Experimente wurden als biologisches Duplikat mit jeweils technischem Triplikat angefertigt. (A) Darstellung der Luciferaseaktivität als Balkendiagramm. Fehlerbalken repräsentieren 1σ . (B) Absolute Zahlenwerte aus (A).

8.12 Pull-Down-Assay

Tabelle 48: Ergebnisliste des Pull-Down-Experimentes. orange: β -Catenin; Blau: bekannte Interaktionspartner von β -Catenin.

Zugriffsschlüssel	Protein	Gen
P35222; B4DGU4	Catenin beta-1	CTNNB1
O00571; A0A0D9SFB3; A0A0D9SG12; A0A0D9SF53; O00571-2; O15523; O15523-2	ATP-dependent RNA helicase DDX3X	DDX3X;DDX3Y
Q16531; F5GY55	DNA damage-binding protein 1	DDB1
Q9Y265; Q9Y265-2; E7ETRO	RuvB-like 1	RUVBL1
Q9Y230; Q9Y230-2; M0R0Y3; X6R2L4	RuvB-like 2	RUVBL2
P04637-9; B7Z676	Cellular tumor antigen p53	TP53
Q13045-2; Q13045; Q13045-3	Protein flightless-1 homolog	FLII
P24928; A0A0C4DGZ0; A0A087WWE2	DNA-directed RNA polymerase II subunit RPB1	POLR2A
A5YKK6; A5YKK6-2; A5YKK6-3; A5YKK6-4	CCR4-NOT transcription complex subunit 1	CNOT1
P07910-2; G3V4W0; B4DY08; B2R5W2; P07910; P07910-4; G3V4C1; G3V576; G3V2Q1; G3V555; G3V575; G3V251; G3V5X6; G3V3K6; B4DSU6; P07910-3; G3V4M8	Heterogeneous nuclear ribonucleoproteins C1/C2	HNRNPC
P46060	Ran GTPase-activating protein 1	RANGAP1
P49792	E3 SUMO-protein ligase RanBP2	RANBP2

Zugriffsschlüssel	Protein	Gen
P12830; A0A087WXI5; P12830-2; H3BNC6; A0A087WX17; A0A087WU43	Cadherin-1	CDH1
Q14517; A0A087WVP1	Protocadherin Fat 1	FAT1
P35221; P35221-2; B7Z3N5; P35221-3	Catenin alpha-1	CTNNA1
Q15149-4	Plectin	PLEC
P14923	Junction plakoglobin	JUP
P15924; P15924-3; P15924-2	Desmoplakin	DSP
P27708;F8VPD4	CAD protein;Glutamine-dependent carbamoyl- phosphate synthase	CAD
P31689; P31689-2	DnaJ homolog subfamily A member 1	DNAJA1
O60884	DnaJ homolog subfamily A member 2	DNAJA2
P25685-2	DnaJ homolog subfamily B member 1	DNAJB1
Q13409; Q13409-3; Q13409-6; Q13409- 7; Q13409-2; Q13409-5; E7EQL5; E7EV09	Cytoplasmic dynein 1 intermediate chain 2	DYNC1I2
Q92616	Translational activator GCN1	GCN1L1
Q9H9A6	Leucine-rich repeat-containing protein 40	LRRC40
Q86TB9; Q86TB9- 4; Q86TB9-2	Protein PAT1 homolog 1	PATL1
O15212	Prefoldin subunit 6	PFDN6
Q86W92; Q86W92- 4; Q86W92-3	Liprin-beta-1	PPFIBP1
P78527;P78527-2	DNA-dependent protein kinase catalytic subunit	PRKDC
P40937; P40937-2	Replication factor C subunit 5	RFC5
Q8TF72	Protein Shroom3	SHROOM3
Q68CZ2; Q68CZ2- 2; E9PCX8	Tensin-3	TNS3
Q14258	E3 ubiquitin/ISG15 ligase TRIM25	TRIM25
P21796; C9JI87	Voltage-dependent anion-selective channel protein 1	VDAC1

Zugriffsschlüssel	Protein	Gen
Q6UXN9	WD repeat-containing protein 82	WDR82
O95672-2	Endothelin-converting enzyme-like 1	ECEL1
Q6ZV70-2	LanC-like protein 3	LANCL3

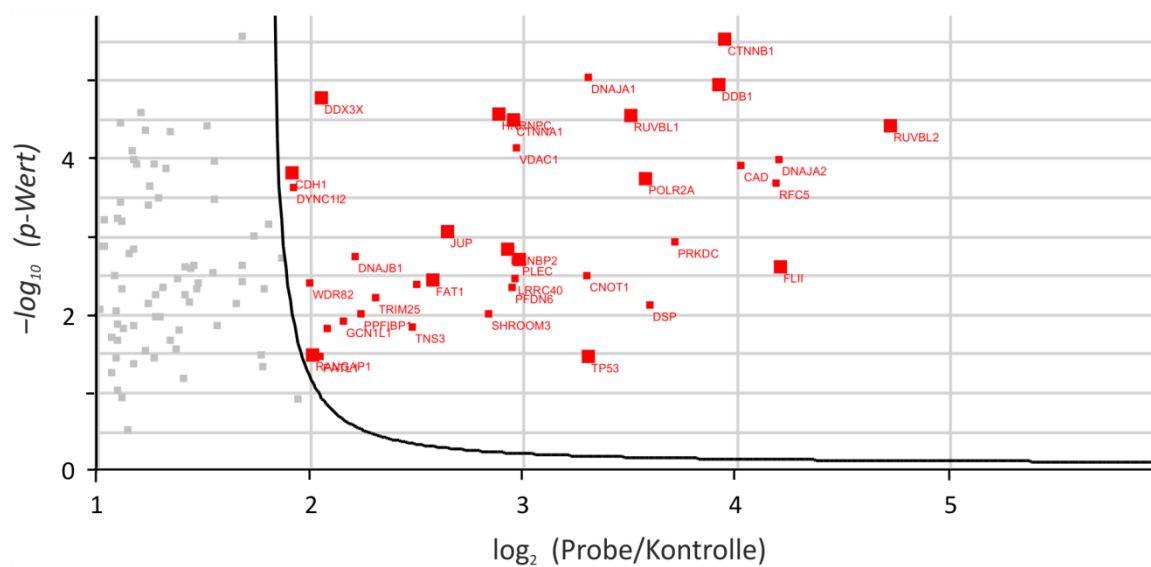


Abbildung 58: Streudiagramm der mittels Massenspektrometrie detektierten Ergebnisse des Pull-Down-Experimentes. *b-StAx-h* wurde auf Streptavidin-beschichteten *Beads* immobilisiert und mit DLD-1-Zellysat inkubiert. Zur Quantifizierung der Ergebnisse wurde das Experiment als Triplikat durchgeführt.