



universität
wien

DIPLOMARBEIT / DIPLOMA THESIS

Titel der Diplomarbeit / Title of the Diploma Thesis

„Studien zu Interaktionspartnern vom Transkriptionsfaktor
Nrf2“

verfasst von / submitted by

Daniel Pölöske

angestrebter akademischer Grad / in partial fulfilment of the requirements for the degree of

Magister der Pharmazie (Mag.pharm.)

Wien, 2019 / Vienna, 2019

Studienkennzahl lt. Studienblatt /
degree programme code as it appears on
the student record sheet:

A 449

Studienrichtung lt. Studienblatt /
degree programme as it appears on
the student record sheet:

Diplomstudium Pharmazie

Betreut von / Supervisor:

Assoc. Prof. PD Dr. Elke H. Heiß

“Everything that human beings or living animals do is done by protein molecules. And therefore the kind of proteins that one has and therefore the ability one has is determined by the genes that one has.”

– HAR GOBIND KHORANA

Danksagung

Ich möchte mich zuallererst bei Frau Prof. Dr. Elke Heiß für die Möglichkeit bedanken, eine besonders spannende Diplomarbeit in Ihrer Forschungsgruppe schreiben zu dürfen. Ebenso danke ich Ihr für Ihre freundliche Betreuung und Unterstützung während der praktischen Arbeit.

Ein besonderer Dank gebührt Manuel Matzinger, M.Sc. für die zur Verfügungstellung seiner Ergebnisse aus früheren Experimenten für meine Diplomarbeit. Zusätzlich bin ich für seine Geduld und wertvolle Hilfe während der Diplomarbeit dankbar.

Ich möchte mich bei allen Mitgliedern der Molecular Target Group für die fachliche und technische Mitwirkung danken.

Schließlich möchte ich mich bei meinen Eltern Beáta und László Pölöske für die finanzielle und seelische Unterstützung während des gesamten Studiums bedanken.

Zusammenfassung

Nrf2 (Nuclear factor erythroid 2-related factor 2) ist ein Transkriptionsfaktor aus der Familie der basischen Leucin-Zipper und hat eine bedeutsame Funktion bei der Aufrechterhaltung der zellulären Homöostase, z.B. durch die Beeinflussung des intrazellulären Energiehaushaltes und bei der Bekämpfung von oxidativem Stress. Die Erforschung der intrazellulären Protein-Protein-Interaktionen von diesem wichtigen Transkriptionsfaktor könnte das Verständnis seiner zellulären Funktion vertiefen und einer möglichen Wirkstoffentwicklung zur Therapie von z.B. entzündlichen Krankheiten förderlich sein. Diese Diplomarbeit widmet sich der Erforschung von neuartigen potenziellen Interaktionspartnern von Nrf2 (basierend auf Vorarbeiten der Gruppe).

Frühere *in vitro* Studien zeigten, dass die AMP-aktivierte Kinase (AMPK) Nrf2 in der Nähe der Bindungsdomäne vom Negativregulator Beta-Transducin Repeat Containing E3 Ubiquitin Protein Ligase (β -TrCP) phosphoryliert. Die Untersuchung vom Einfluss von diesen AMPK-abhängigen Phosphorylierungsstellen bei der Nrf2- β -TrCP-Interaktion sollte weiterführendes Wissen über den Einfluss von AMPK auf die Stabilität von Nrf2 liefern. Zudem zeigten Proteomics Daten unserer Forschungsgruppe, dass die AMPK, Phosphoglycerat Mutase 1 (PGAM1), Keratin 16 (KRT16) und Keratin (KRT17) potenzielle Interaktionspartner von Nrf2 sind. Ziel dieser Arbeit war es daher die postulierte Interaktion in einem geeigneten Zellsystem mittels Co-Immunopräzipitation (Co-IP) zu untersuchen und gegebenenfalls zu bestätigen.

Die Ergebnisse von adäquaten Co-IP-Experimenten zeigen, dass AMPK, PGAM1, KRT16 und KRT17 Interaktionspartner von Nrf2 sein könnten. Ebenfalls zeigten Studien zur AMPK-abhängigen Interaktion von Nrf2 mit β -TrCP, dass die Nrf2- β -TrCP Interaktion zwar von der AMPK-Aktivität abhängig ist, jedoch nicht signifikant von den AMPK abhängigen Phosphorylierungsstellen nahe der β -TrCP-Bindungsdomäne von Nrf2 beeinflusst wird.

Abstract

Nrf2 (Nuclear factor erythroid 2-related factor 2) is a transcription factor belonging to the family of basic leucine zippers and has a significant function in maintaining the cellular homeostasis, e.g. by influencing the intracellular energy balance and controlling oxidative stress. The research of intracellular protein-protein interactions of this important transcription factor could deepen the understanding of its cellular function and may possibly be beneficial for the development of drugs for the therapy of e.g. inflammatory diseases. This diploma thesis investigates in novel potential interaction partners of Nrf2 (based on preliminary work of the group).

Previous *in vitro* studies demonstrated that the AMP-activated kinase (AMPK) phosphorylates Nrf2 near the binding domain of the negative regulator beta-transducin repeat-containing E3 ubiquitin protein ligase (β -TrCP). The study of the influence of these AMPK-dependent phosphorylation sites in the Nrf2- β TrCP interaction would therefore provide further knowledge about the influence of AMPK on the stability of Nrf2. Additionally, proteomics data from our research group showed that AMPK, Phosphoglycerate Mutase 1 (PGAM1), Keratin 16 (KRT16) and Keratin (KRT17) are potential interaction partners of Nrf2. Therefore, the aim of this work was to investigate the postulated interaction in a suitable cell system by co-immunoprecipitation (Co-IP) and confirm if possible.

The results of adequate Co-IP-experiments show that AMPK, PGAM1, KRT16 and KRT17 could be interaction partners of Nrf2. Furthermore, studies on the AMPK-dependent interaction of Nrf2 with β -TrCP showed that the Nrf2- β -TrCP interaction depends on the AMPK activity but isn't significantly affected by the AMPK-dependent phosphorylation sites near the β -TrCP binding domain of Nrf2.

Inhaltsverzeichnis

1. Einleitung.....	2
1.1 Nuclear factor erythroid 2-related factor 2 (Nrf2)	2
1.1.1 Struktur und Funktion von Nrf2	2
1.1.2 Regulation der Nrf2-Aktivität	3
1.2 AMP-aktivierte Kinase (AMPK)	3
1.3 Phosphoglycerat Mutase 1 (PGAM1)	4
1.4 Keratin 16 (KRT16).....	4
1.5 Keratin 17 (KRT17).....	5
1.8 Ziel der Arbeit	6
2. Methoden und Materialien	7
2.1 Sterile Zellkultur	8
2.1.1 HEK Nährmedium	8
2.1.2 Humane embryonale Nierenzellen (HEK293).....	8
2.1.3 Passagieren von HEK293 Zellen.....	8
2.2 Klonierung	9
2.2.1 Transformation von E. coli	9
2.2.2 Plasmidisolierung	10
2.2.3 Qualitätskontrolle gewonnener Plasmide.....	12
2.3 Calciumphosphat-Transfektion von HEK293 Zellen	15
2.4 Zellyse und Proteinextraktion	17
2.5 Bradford-Assay	18
2.6 Co-Immunopräzipitation (Co-IP)	20
2.7 Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE).....	21
2.8 Western Blot.....	25
2.8.1 Proteintransfer (Blotting)	25
2.8.2 Proteindetektion mittels Antikörper	26
2.9 Statistik.....	28
3. Ergebnisse	29
3.1 Qualitätskontrolle klonierter Plasmide	30
3.2 AMPK ist ein Interaktionspartner von Nrf2.....	31
3.3 Die AMPK-abhängigen drei Phosphorylierungsstellen (S374, S408, S433) nahe der Neh6-Domäne von Nrf2 beeinflussen die Nrf2-β-TrCP-Interaktion kaum.....	34
3.4 PGAM1, KRT16 und KRT17 sind Interaktionspartner von Nrf2.....	36
4. Diskussion.....	39

4.1 Vor- und Nachteile der durchgeführten Co-IPs.....	40
4.2 Verbesserungsmöglichkeiten künftiger Experimente	40
4.3 Fazit	41
5. Anhang.....	43
5.1 Literaturverzeichnis.....	44
5.2 Abkürzungsverzeichnis	48

1. Einleitung

1.1 Nuclear factor erythroid 2-related factor 2 (Nrf2)

1.1.1 Struktur und Funktion von Nrf2

Nrf2 ist ein basischer Leucin-Zipper-Transkriptionsfaktor und ein Mitglied der Cap'n'Collar Familie, welcher in Bilateria, wie z.B. Nematoden, Fischen und Säugetieren homolog konserviert ist. Dieser Transkriptionsfaktor kommt ubiquitär vor und ist ein wichtiger Akteur bei der Bekämpfung von oxidativem Stress. Durch seine Bindung an das antioxidant response element (ARE) im Promoter- oder Enhancerbereich kommt es vor allem zur Hochregulierung von zytotoxischen-, antioxidativen- und Xenobiotika-metabolisierenden Enzymen. Nrf2 ist aus 605 Aminosäuren aufgebaut, welche in 7 funktionelle Domänen, Nrf2-ECH homology (Neh) 1-7, eingeteilt werden können (siehe Abb. 1). Neh1 enthält die basische Leucine-Zipper (bZip) DNA-Bindungs- und Dimerisierungsdomäne, wodurch Nrf2 mit seinem Transkriptionspartner dem small musculoaponeurotic fibrosarcoma Protein (sMAF) interagiert und als Heterodimer an die DNA bindet. Neh2 ist die Bindungsdomäne für das Kelch-like ECH-associated Protein 1 (Keap1), welches ein Negativregulator von Nrf2 ist. Die Neh3 Domäne bindet den transkriptionellen Coaktivator Chromodomain-Helicase-DNA-Binding Protein 6 (CHD6), wodurch die Transkription von ARE abhängigen Genen gefördert wird. Neh4 und die Neh5 Domäne arbeiten synergistisch und binden den transkriptionellen Coaktivator, CREB-Binding Protein (CBP). Die Neh6 Domäne bindet einen weiteren Negativregulator, β -TrCP. Neh7 ist die Retinoid-X-Rezeptor (RXR) Bindungsdomäne^{1,2}.

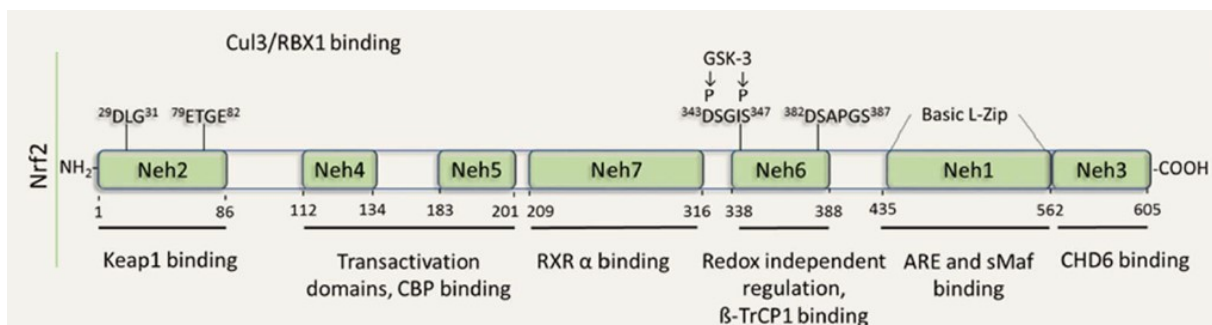


Abb. 1. Schematischer Aufbau von Nrf2³

Die Menge an intrazellulärem Nrf2 ist in nicht gestressten Zellen, aufgrund der geringen Halbwertszeit durch die kontinuierliche Aktivität der Negativregulatoren, niedrig. In Stresssituationen werden diese Abbauege umgangen, Nrf2 reichert sich in der Zelle an und bindet gemeinsam mit dem sMaf Protein als Heterodimer an das ARE in der Promoterregion von Zielgenen. Die Zielgene von Nrf2 umfassen, wie bereits erwähnt, u.a. antioxidative- und Xenobiotika metabolisierende Gene, wie die Häm-Oxygenase 1 (HMOX-1), Gluthation-S-Transferase (GST) und UDP-Glucuronosyl Transferase (UGT)⁴⁻¹⁰. Weitere Gene, die den Zellzyklus, Wachstum und die Apoptose beeinflussen sind ebenfalls von Nrf2 reguliert¹¹.

1.1.2 Regulation der Nrf2-Aktivität

Die intrazelluläre Konzentration und Aktivität von Nrf2 werden engmaschig kontrolliert und sind grundsätzlich von folgenden Mechanismen abhängig; Beeinflussung der Transkription, Translation, posttranslationale Modifikationen, sowie redoxabhängiger und -unabhängiger Abbau von Nrf2.

Die Transkriptionseffizienz von Nrf2 kann durch die Aryl-Hydrocarbon-Rezeptor (AhR) vermittelte, Myc und Jun abhängige Modulation der Nrf2-Expression¹², sowie epigenetisch durch DNA-Methylierung, Histon-Modifikationen¹³ und durch miRNAs¹⁴ beeinflusst werden. Posttranslationale Modifikationen, wie die Phosphorylierung von Nrf2 durch die Protein Kinase C (PKC)¹⁵, AMPK¹⁶ oder die Cyclin abhängige Kinase (CDK) 5¹⁷ führen zur Akkumulation von Nrf2. Die Mitogen aktivierten Kinasen (MAPK), wie die extracellular-signal regulated Kinase (ERK), Jun-N-terminale Kinase (JNK) und p38, sowie die Phosphoinositid-3-Kinase (PI3K), Akt, die Caseinkinase und die Proteinkinase A (PKA) führen zur Nrf2 Aktivierung¹⁸⁻²⁰. Die Phosphorylierung durch Glykogensynthase-Kinase 3 β (GSK3 β) führt zum nukleären Export²¹ und dadurch zur Inhibierung der Nrf2 Aktivität. Die Transaktivierung von Nrf2 Zielgenen ist wiederum durch Histon-Modifikationen und der Stummschaltung durch Promoter-Methylierung der Zielgene kontrolliert³.

Keap1 ist ein intrazelluläres Protein und der bedeutendste redoxabhängige Negativregulator von Nrf2. Zwei Moleküle Keap1 binden an die Neh1 Domäne von Nrf2 und vermitteln die Cullin-3 (CUL3) - RING Box Protein 1 (RBX1) - Komplex abhängige Ubiquitinierung durch die Ubiquitin Ligase E3. Beim oxidativen oder elektrophilen Stress werden Sensor Cysteine in Keap1 oxidiert oder kovalent modifiziert. Diese Konformationsänderungen bewirken eine Abschwächung in der Nrf2-Keap1 Interaktion und in der Interaktion zwischen Keap1 und der Ubiquitin Ligase E3²². Der Keap1-abhängige Abbau von Nrf2 wird durch AMPK¹⁶ und weiteren Proteine^{23,24}, die mit Nrf2 um die Bindung mit Keap1 konkurrieren, ebenfalls reduziert.

Neben der redoxabhängigen Negativkontrolle von Nrf2 durch Keap1 wird die Menge an intrazellulärem Nrf2 durch β -TrCP^{25,26} bestimmt, welches zumeist redoxunabhängig agiert. Ein Protein des zellulären Metabolismus, namentlich die GSK3 β , phosphoryliert Nrf2 an der Neh6 Domäne (nach primärer Phosphorylierung durch eine bisher unbekannte Kinase) und vermittelt hierdurch die β -TrCP abhängige Ubiquitinierung und proteasomale Degradation^{25,26}.

1.2 AMP-aktivierte Kinase (AMPK)

Die AMPK ist eine Serin/Threonin Kinase bestehend aus einem heterotrimeren Komplex aus α -, β - und γ - Untereinheiten. Sie ist ein energiesensitives Protein und wird ubiquitär exprimiert. Die Verschiebung des AMP/ATP-Verhältnisses zugunsten von AMP, kann unter anderem die Folge von Nährstoffmangel, Ischämie oder Hypoxie sein¹⁶. In Säugerzellen wird AMPK beim ansteigenden Verhältnis von AMP zu

ATP aktiviert und führt zur Phosphorylierung der α -Untereinheit (katalytische Domäne) am Thr172. Die Wiederherstellung der zellulären Homöostase geschieht über die AMPK-abhängige Phosphorylierung und Deaktivierung von Enzymen des Anabolismus, wie z.B. der 3-Hydroxy-3-Methylglutaryl-Coenzym-A-(HMG-CoA)-Reduktase, oder der Aktivierung von Enzymen des Katabolismus wie z.B. der Phosphofruktokinase 1 (indirekt, über die Aktivierung von Phosphofruktokinase 2)^{27,28}. Sequestosome 1 (p62) wird ebenfalls von AMPK am Ser651 phosphoryliert. Dies führt zur Aktivierung von p62 und dadurch u.a. zur lysosomalen Degradation von Keap1 und letztendlich zum Anstieg der intrazellulären Nrf2 Konzentration²⁹. Frühere Studien konnten zeigen, dass die nukleäre Translokation und die Expression von Nrf2-Zielgenen durch aktives AMPK gefördert wird^{16,30}. Aus vorangegangene *in vitro* Kinase Assays unserer Gruppe geht zudem hervor, dass Nrf2 AMPK-abhängig an den Positionen Ser374, Ser408 und Ser433 phosphoryliert wird. Diese Phosphorylierungsstellen befinden sich in der Nähe der Neh6 Domäne, der β -TrCP Bindungsdomäne von Nrf2 (343-DSGIS-347 und 382-DSAPGS-387)³¹.

1.3 Phosphoglycerat Mutase 1 (PGAM1)

PGAM1 kann intra- und extrazellulär auftreten und ist bekannt als ein Enzym der Glykolyse, welches die Reaktion von 3-Phosphoglycerat (3-PG) in 2-Phosphoglycerat (2-PG) katalysiert. Die Umwandlungsrate von 3-PG zu 2-PG beeinflusst aber nicht nur die ATP Gewinnung in der Glykolyse (via Phosphoenolpyruvat nach Dehydratisierung), sondern auch die Serin Biosynthese (durch Aktivierung der PHGDH durch 2-PG) und den Pentosephosphatweg (durch Hemmung der Glucose-6-phosphat-Dehydrogenase durch 3-PG)^{32,33}. Untersuchungen konnten zeigen, dass die Überexpression von PGAM-1 mit verschiedenen pathologischen Veränderungen, wie die Ausbildung von Tumoren assoziiert sind³⁴.

Das, wie PGAM1, zur Familie der Phosphoglycerat Mutasen gehörende Phosphoglycerat Mutase 5 (PGAM5) besitzt eine schwache Mutaseaktivität. N-terminal weist PGAM5 eine mitochondriale Zielsequenz auf, welches für die Lokalisation auf der äußeren mitochondrialen Membran zuständig ist. PGAM5 weist ebenfalls eine Keap1 bindende Domäne auf, und ist ein Substrat der Keap1-abhängigen Ubiquitin Ligase Komplexes. Es bildet mit Nrf2 und Keap1 einen ternären Komplex an der äußeren mitochondrialen Membran und führt letztlich zum proteasomalen Abbau von Nrf2³⁵.

1.4 Keratin 16 (KRT16)

KRT16 ist ein Protein der Intermediärfilamente und Bestandteil des Zytoskeletts. Es ist für die strukturelle Integrität der Epithelzellen unerlässlich. KRT16 wird in verschiedenen epithelialen Geweben, wie Ösophagus, Zunge und Haarfollikel exprimiert. Es agiert als Regulator der angeborenen Immunabwehr bei Durchbruch der Hautbarriere und beeinflusst die Entzündungsprozesse in der Haut. Mutationen in dem Gen von KRT16 führen zur Hauterkrankung Pachyonychia congenita 1³⁶.

1.5 Keratin 17 (KRT17)

KRT17 ist ebenfalls Bestandteil des Zytoskeletts. Es ist für den Aufbau und die Aufrechterhaltung verschiedener Hautanhangsgebilde, vor allem der Haare, zuständig³⁷. Es moduliert die Funktion von TNF- α beim Haarwachstumszyklus, reguliert den epithelialen Zellwachstum durch Bindung vom Adapterprotein Stratifin (SFN) und Stimulierung vom Proteinkinase B (Akt)/mammalian target of rapamycin (mTOR) - Pathway. KRT17 begünstigt eine T_h1/T_h17 dominante Umgebung und reguliert hierdurch die Immunantwort. Mutationen in dem Gen von KRT16 führen zur Hauterkrankung Pachyonychia congenita 2³⁸.

1.8 Ziel der Arbeit

Es ist bereits aus *in vitro* Kinase Assays unserer Gruppe bekannt, dass Nrf2 an den Positionen Ser374, Ser408 und Ser433 AMPK-abhängig phosphoryliert wird. Ob eine direkte Interaktion innerhalb einer lebenden Zelle zwischen den zwei Proteinen besteht, ist noch nicht bekannt. Um die Interaktion von AMPK und Nrf2 in menschlichen Zellen zu bestätigen, sollten Co-Immunopräzipitations-(Co-IP)-Experimente durchgeführt werden.

Weiters war es Ziel der Arbeit herauszufinden, ob diese AMPK-abhängigen Phosphorylierungsstellen in der Nähe der Neh6 Domäne von Nrf2 (β -TrCP Bindungsdomäne) Einfluss auf die Wechselwirkung von Nrf2 mit β -TrCP haben. Zur Beantwortung dieser Fragestellung wurde der Unterschied der Interaktion zwischen β -TrCP und der Wildtyp-Form beziehungsweise der Dreifachmutante von Nrf2 (Nrf2^{S374A, S408A, S433A}) mittels Co-IP aus Lysaten überexprimierender Zellen untersucht.

Frühere Massenspektrometrie-(MS)-basierte Proteomics Daten deuten auf eine Interaktion von Nrf2 mit PGAM1, KRT16 und KRT17. PGAM5 welches, wie PGAM1, zur Familie der Phosphoglycerat Mutasen gehört, wurde die Interaktion mit Keap1-Nrf2 bereits experimentell nachgewiesen. Dass PGAM1 ebenfalls ein Interaktionspartner von Nrf2 ist, wäre dadurch vorstellbar und könnte weitere Möglichkeiten zur Beeinflussung der Nrf2 Aktivität liefern. KRT16 und KRT17 sind Proteine des Zytoskeletts und häufig Kontaminanten in MS-Analysen, haben aber auch einen Einfluss auf inflammatorische Prozesse und Signaltransduktionsschritte. Da Nrf2 einer der Hauptakteure des antiinflammatorischen Repertoires der Zelle ist, wäre eine Nrf2-KRT16/-KRT17 Interaktion denkbar. Co-IP-Experimente sollten im Laufe dieser Arbeit zeigen, ob sich die MS Daten bestätigen lassen.

2. Methoden und Materialien

2.1 Sterile Zellkultur

Die aseptischen Arbeitsschritte, bei der Handhabung von humanen embryonalen Nierenzellen (HEK293 Zellen), wurden in der Sterilwerkbank HERAsafe® KS18 durchgeführt. Die Arbeitsfläche der Werkbank wurde vor dem Arbeitsbeginn und nach dem Arbeitsende mit 70%-igem Ethanol gereinigt. Die Gegenstände, die in der Werkbank verwendet wurden, waren steril, oder wurden durch Besprühung mit 70%-igem Ethanol oberflächendesinfiziert. Die Arbeit innerhalb des aseptischen Arbeitsbereichs erfolgte mit Handschuhen, die mit 70%-igem Ethanol desinfiziert wurden.

2.1.1 HEK Nährmedium

Das HEK Nährmedium (Zusammensetzung siehe Tabelle 1) wurde nach der Zusammenmischung der Einzelkomponenten sterilfiltriert und bei 4°C im Kühlschrank gelagert. Das Nährmedium wurde vor der Anwendung an Zellen stets auf 37°C im Wasserbad Julabo® SW23 erwärmt.

Tabelle 1. Materialien für die Kultivierung von HEK293 Zellen

Name	Zusammensetzung	Menge	Hersteller
HEK Nährmedium	• Dulbeccos modified eagle medium (4,5 g/L Glucose)	500 mL	Lonza
	• Fetales Kälberserum	50 mL	Gibco
	• Penicillin G (100 µg/mL) + Streptomycin (100 µg/mL)	5 mL	Lonza
	• L-Glutamin (2 mM)	5 mL	Lonza
<i>Sterilfiltrieren und bei 4°C lagern</i>			

2.1.2 Humane embryonale Nierenzellen (HEK293)

Für die Transfektionen und anschließende Co-IP-Experimente wurden HEK293 Zellen verwendet, die von ATCC (USA) erworben wurden. Diese Zellen weisen immortalisierte, adhärenente und epitheliale Eigenschaften auf. Die Kultivierung erfolgte in 50 mL Kulturflaschen mit 15-20 mL HEK-Nährmedium, in Ø 10 cm Petrischalen mit 5-10 mL HEK-Nährmedium, sowie in Ø 6 cm Petrischalen mit 3-5 mL HEK-Nährmedium im Inkubator HERAcell® 150 bei 37°C und 5% CO₂.

2.1.3 Passagieren von HEK293 Zellen

Die Zellen wurden täglich auf Konfluenz (sollte 90% nicht übersteigen) und Kontaminationen im Durchlichtmikroskop Olympus CKX41 geprüft. Um eine zu hohe Konfluenz zu vermeiden wurden die Zellen 3-mal pro Woche (Montag, Mittwoch und Freitag) passagiert. Die Passagierung erfolgte durch die Entfernung vom verbrauchten Nährmedium, 1-maligem Waschen mit 10 mL 37°C warmer Phosphat gepufferter Salzlösung (PBS, Zusammensetzung siehe Tabelle 2), Inkubation mit 2 mL Trypsin-EDTA (siehe Tabelle 2) bei 37°C für 5 min und Aufnahme der Zellen in 8 mL Nährlösung. 1 mL der Zellsuspension wurde verwendet um mittels dem Zellzählgerät Vi-Cell™ XR Cell Viability Analyzer die Zahl an lebenden Zellen zu bestimmen (schwankte zwischen 94%-99%, Verwendung der Zellen bis

zur Passage 38). Die benötigte Anzahl an lebenden Zellen betrug für eine \varnothing 6 cm Petrischale: $1,6 \cdot 10^6$ Zellen in 3-5 mL HEK-Nährmedium, für eine \varnothing 10 cm Petrischale: $4 \cdot 10^6$ Zellen in 5-10 mL HEK-Nährmedium, für eine 2-tägige Kultur in einem 50 mL Gefäß: $6 \cdot 10^6$ Zellen in 15 mL Nährmedium und für eine 3-tägige Kultur in einem 50 mL Gefäß: $3 \cdot 10^6$ Zellen mit 20 mL Nährmedium. Die neu ausgesäten Zellen wurden im Durchlichtmikroskop kontrolliert und bei 37°C und 5% CO_2 kultiviert.

Tabelle 2. Materialien für die Passagierung von HEK Zellen

Name	Zusammensetzung	Menge	Hersteller
Phosphat gepufferte Salzlösung (PBS)	• NaCl	7,2 g	Carl-Roth
	• Na_2HPO_4	1,48 g	Carl-Roth
	• KH_2PO_4	0,43 g	Carl-Roth
	• bidestilliertes Wasser (ddH ₂ O)	1000 mL	–
	<i>pH auf 7,4 einstellen und autoklavieren, bei 4°C lagern</i>		
Trypsin-EDTA	• Trypsin	0,5 g	Gibco
	• Na_2 -EDTA	0,2 g	Carl-Roth
	• PBS	1000 mL	siehe PBS
	<i>Steril filtrieren, bei 4°C lagern</i>		

2.2 Klonierung

Kompetente Escherichia coli (E. coli, HB101) wurden von Promega erworben. Gekaufte Plasmide (siehe Tabelle 3) wurden in kompetenten E. coli kloniert, welche optimale Eigenschaften bei der Aufnahme von Fremdplasmiden aufweisen.

2.2.1 Transformation von E. coli

Das Arbeiten mit Bakterien erfolgte getrennt von den Säugerzellen, nicht in Reinwerkbänken, sondern in der keimarmen Nähe einer offenen Flamme. Pro Plasmid wurden 40 μL kompetente E. coli in 2 mL Eppendorf®-Gefäße auf Eis vorgelegt, zusätzlich wurde zur Negativkontrolle ebenfalls ein Gefäß angelegt. Eine 50 ng Plasmid entsprechendes Volumen an Plasmidlösung wurden vorsichtig mit den E. coli vermischt und 30 min lang auf Eis inkubiert. SOC Medium (siehe Tabelle 4) wurde aufgetaut und der Heizblock Grant™ wurde auf 42°C erwärmt. Das Gefäß mit der Mischung aus E. coli und Plasmid wurde für exakt 45 sec auf dem Heizblock erwärmt und danach für 1 min auf Eis gelegt. 450 μL SOC-Medium wurde in das Gefäß pipettiert und das Gefäß wurde für 1 h bei 37°C im Inkubator Edmund Bühler SM-30 inkubiert. Nach der Inkubation wurde die Bakteriensuspension 1 min lang bei 13.000 Umdrehungen/min (U/min) im Biofuge Fresco Heraeus zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das Pellet wurde in 50 μL LB-Medium, mit dem jeweiligen Antibiotikum (Ampicillin, Kanamycin) für die Selektierung (siehe Tabelle 3 und 4), resuspendiert. Die Suspension wurde auf einer \varnothing 10 cm Petrischale mit festem LB-Agar mit dem jeweiligen Antibiotikum (siehe Tabelle 3 und 4) mit einer Impföse fraktioniert ausgestrichen. Die Platte wurde über Nacht bei 37°C bebrütet und am nächsten Morgen mit Parafilm® verschlossen und bei 4°C gelagert.

Tabelle 3. Resistenzgen und Hersteller der zu klonierende Plasmide

Plasmid	Resistenz	Hersteller
pcDNA3-myc3-bTrCP	Ampicillin	Addgene
pCMV3-Myc-PGAM1	Kanamycin	Sino Biological
pCMV3-Myc-KRT16	Kanamycin	Sino Biological
pCMV3-Myc-KRT17	Kanamycin	Sino Biological

Tabelle 4. Materialien für die Transformation von kompetenten *E. coli*

Name	Zusammensetzung	Massenkonzentration	Hersteller
SOC-Medium			New England Biolabs
LB-Medium	• LB-Medium (Lennox)	25 g/L	Carl Roth
	• mit ddH ₂ O auffüllen		–
	<i>Autoklavieren, Antibiotikum wenn auf 70°C abgekühlt hinzugeben, bei 4°C lagern</i>		
	• Ampicillin	100 µg/mL	Sigma
	• Kanamycin	50 µg/mL	Sigma
LB-Agar für Petrischalen	• LB-Medium (Lennox)	25 g/L	Carl-Roth
	• Agar	10 g/L	Carl-Roth
	• mit ddH ₂ O auffüllen		–
	<i>Autoklavieren, Antibiotikum wenn auf 70°C abgekühlt hinzugeben, steril ausplattieren, bei 4°C lagern</i>		
	• Ampicillin	100 µg/mL	Sigma
• Kanamycin	50 µg/mL	Sigma	

2.2.2 Plasmidisolation

Die Aufreinigung erfolgte mittels PureYield™ Plasmid Midiprep System von Promega. In der Früh wurden für die Vorkulturen pro Plasmid eine Einzelkolonie aus dem jeweiligen fraktioniertem Ausstrich entnommen und in ein Reagenzglas mit 5 mL LB-Medium mit dem jeweiligen Antibiotikum (siehe Tabelle 3) überführt und für 8 h bei 37°C und 200 U/min im Inkubator Edmund Bühler SM-30 bebrütet. Je nach Trübe wurde 1 bis 2 mL Prä-Kultur in einen 500 mL Erlenmeyerkolben mit 150 mL LB-Medium und dem jeweiligen Antibiotikum überführt. Die Kultur wurde über Nacht bei 37°C im Inkubator bebrütet und bei 200 U/min geschwenkt. Die Bakteriensuspension wurde am nächsten Morgen in ein zentrifugierbares Gefäß überführt und für 10 min im Rotor SLA3000 bei 4°C und 6900 U/min zentrifugiert. Der Überstand wurde vorsichtig entfernt. Das Zellpellet wurde in 6 mL Resuspension Solution resuspendiert. 6 mL Cell Lysis Solution wurde hinzugegeben, die Öffnung wurde mit Parafilm® verschlossen, 3- bis 5-mal umgeschwenkt und für 3 min bei Raumtemperatur (RT) inkubiert. 10 mL Neutralisation Solution wurde den lysierten Zellen zugegeben, 3- bis 5-mal umgeschwenkt, und 2-3 min bei RT stehen gelassen bis sich ein weißes Präzipitat geformt hat. Das Lysat wurde 15 min lang im Rotor SS-34 bei 4°C und 11220 U/min zentrifugiert. Die blaue PureYield™ Clearing Column wurde in die weiße Binding Column gesteckt und auf den Vakuumadapter von Promega montiert (siehe Abb. 2A).

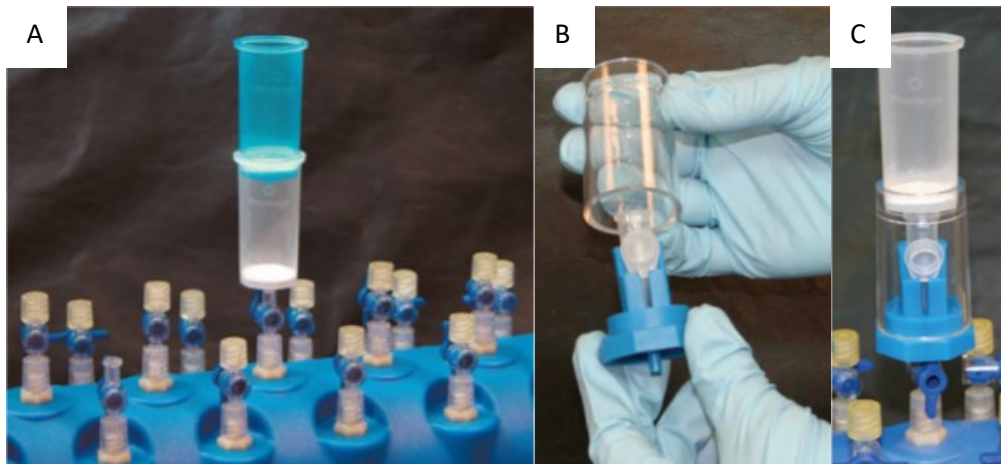


Abb. 2. (A) Zusammenbau der Clearing und der Binding Column (B und C) Aufbringen der Binding Column an den Vacuum Elution Device³⁹

Das Lysat wurde in die blaue Clearing Column gegossen und 2-3 min stehen gelassen. Das Vakuum wurde vorsichtig angelegt und die Flüssigkeit wurde in die Binding Column und in den Vakuumadapter gesogen. Nachdem die gesamte Flüssigkeit abgesaugt war, wurde das Vakuum langsam entfernt. Die blaue Clearing Column wurde abgenommen und 5 mL Endotoxin Removal Wash wurde mittels Vakuum durch die weiße Binding Column gesaugt. 20 mL Column Wash Solution wurde danach durch die Binding Column gesogen und nach Durchtritt der Flüssigkeit bei laufendem Vakuum 30 sec getrocknet. Falls die Säule nachher Feuchtigkeit aufgewiesen, oder nach Ethanol gerochen hat, wurde die Trocknung wiederholt. Die Binding Column wurde nachher vom Vakuumadapter entfernt und die Spitze vom Binding Column wurde mit einem Papiertuch abgetupft, um das restliche Ethanol zu entfernen. Ein 1,5 mL Eppendorf® Gefäß wurde auf das blaue Eluator™ Vacuum Elution Device (siehe Abb. 2B) mit offener Kappe befestigt. Die Eluator™ Device wurde wie oben gezeigt mit der Binding Column verbunden und mit einem Plastikrohr umgrenzt (Abb. 2C). Die Apparatur wurde auf dem Vakuumadapter befestigt und 1 mL Nuklease-freies Wasser wurde möglichst zentral auf die Membran innerhalb der Säule appliziert. Das Vakuum wurde angelegt, bis sich die gesamte Flüssigkeit im Eppendorf® Gefäß gesammelt hat. Das Eluat wurde in der Zentrifuge Biofuge Fresco Heraeus 10 min bei 4°C und 13.000 U/min zentrifugiert und der Überstand wurde in ein neues 2 mL Eppendorf®-Gefäß überführt. Die Konzentration an Plasmid wurde mittels NanoDrop™ 2000 bestimmt (Plasmidgehalt nach DNA-Aufreinigung siehe Tabelle 5). Der bakterielle Abfall wurde separat gesammelt und später autoklaviert. Materialien für die DNA-Reinigung siehe Tabelle 6.

Tabelle 5. Plasmidgehalt nach DNA-Aufreinigung

Plasmid	Plasmidkonzentration (ng/ μ L)	Hersteller
pcDNA3-myc3-bTrCP	64,05	addgene
pcDNA3-myc3-bTrCP	38,6	addgene
pCMV3-Myc-PGAM1	446,2	Sino Biological
pCMV3-Myc-KRT16	493,6	Sino Biological
pCMV3-Myc-KRT17	500,7	Sino Biological

Tabelle 6. Materialien für die DNA-Reinigung

Name	Hersteller
Cell Resuspension Solution	Promega
Cell Lysis Solution	Promega
Neutralisation Solution	Promega
Endotoxin Removal Wash	Promega
Column Wash Solution	Promega
Nuklease-freies Wasser	Promega

2.2.3 Qualitätskontrolle gewonnener Plasmide

Die Qualitätskontrolle gewonnener Plasmide erfolgte mittels Restriktionsverdau (Restriktionsstellen der Plasmide siehe Tabelle 7). Die Verwendung von Nuklease-freiem Wasser (nf H₂O), Restriktionsenzym (Tabelle 8), -puffer (Tabelle 9), sowie die Inkubationstemperatur und -dauer waren vom jeweiligen Plasmid und Restriktionsenzym abhängig. 0,3 bis 1 μ g Plasmid wurden wie auf Seite 14 bis 15 beschrieben mit dem nf H₂O, Restriktionsenzym und dem -puffer zusammengemischt und im Heizblock Greiner™ bei der jeweiligen Temperatur und Dauer inkubiert. Nach dem Restriktionsverdau wurden die verdauten DNA-Proben (20 μ L pro Probe) mit je 4 μ L 6x Orange Loading Dye (siehe Tabelle 10) vermischt.

Die Agarose Gel Elektrophorese wurde vorbereitet (Zusammensetzung siehe Tabelle 10). Agarose wurde dazu eingewogen und in TAE-Puffer, durch Erhitzen für 1 min in der Mikrowelle, gelöst. Als das noch flüssige Agarose-Gel auf 70°C abgekühlt war, wurde SYBR™-Safe hinzugegeben und das Gel wurde zügig in die Elektrophorese Kammer gegossen. Nach dem Aushärten vom Gel (ungefähr 1 h) wurde die Kammer mit TAE-Puffer gefüllt. Der DNA-Marker und die Proben wurden in die Taschen vom Gel aufgetragen und es wurde eine Gleichspannung von 100 V angelegt. Die Spannung wurde so lange aufrechterhalten, bis die orangene Front ungefähr 1 cm vor der Gelkante angekommen ist. Das Gel wurde mit UV-Licht im PhotoDoc-It™ Imaging Systems Fotokammer belichtet und mit der Kamera Olympus C5050Z fotografiert.

Tabelle 7. Restriktionsstellen der Plasmide

Plasmid	Ausgewählte Restriktionsstellen der Plasmide zur Qualitätskontrolle	Hersteller
pcDNA3-myc3-bTrCP	KpnI, SmaI	Addgene
pCMV3-Myc-PGAM1	KpnI, XbaI	Sino Biological
pCMV3-Myc-KRT16	NotI, HindIII	Sino Biological
pCMV3-Myc-KRT17	NotI, HindIII	Sino Biological

Tabelle 8. Restriktionsenzyme

Restriktionsenzym	Hersteller
KpnI	Fermentas
SmaI	Thermo
HindIII	Fermentas
NotI	Thermo
XbaI	Thermo
<i>Lagerung der Enzyme bei -20°C</i>	

Tabelle 9. Restriktionsenzympuffer

Restriktionsenzympuffer	Hersteller
10xKpnI-Puffer	Fermentas
10xPuffer R (HindIII-Puffer)	Fermentas
10xPuffer O (NotI-Puffer)	Thermo
10xTango-Puffer (SmaI, KpnI, HindIII und XbaI kompatibler Puffer)	Thermo
<i>Lagerung der Puffer bei -20°C</i>	

Tabelle 10. Materialien für die Agarose Gel Elektrophorese

Name	Zusammensetzung	Menge	Anbieter
Agarose Gel	Agarose	0,4 g	Sigma
	TAE-Puffer	80 mL	siehe TAE Puffer
	SYBR™-Safe	8 µL	Invitrogen
TAE Puffer	Rotiphorese® 10x TAE-Puffer	100 mL	Carl-Roth
	ddH ₂ O	900 mL	–
Agarose Gel Elektrophorese Puffer	TAE-Puffer		siehe TAE-Puffer
DNA-Marker	Quick-Load® Purple 100 bp DNA Ladder	5 µL	New England BioLabs
	<i>Lagerung bei -20°C</i>		
6x Orange Loading Dye			Thermo-Fisher
	<i>Lagerung bei -20°C</i>		

Restriktionsverdau β -TrCP-Expressionsplasmid

Negativkontrolle

nf H ₂ O	3 μ l
10x Tango buffer	2 μ l
DNA	0,5 μ g
Kein Enzym	-

SmaI Verdau (2h, 30°C)

nf H ₂ O	2 μ l
10x Tango buffer	2 μ l
DNA	0,5 μ g
SmaI	1 μ l

KpnI Verdau (2h, 37°C)

nf H ₂ O	1 μ l
10x KpnI buffer	2 μ l
DNA	0,5 μ g
KpnI	1 μ l

KpnI/SmaI Verdau (2h, 37°C)

nf H ₂ O	-
10x Tango buffer	2 μ l
DNA	0,5 μ g
SmaI	2 μ l
KpnI	1 μ l

Restriktionsverdau PGAM1-Expressionsplasmid

Negativkontrolle

nf H ₂ O	16 μ l
10x Tango buffer	2 μ l
DNA	1 μ g
Kein Enzym	-

XbaI Verdau (2h, 37°C)

nf H ₂ O	15 μ l
10x Buffer Tango	2 μ l
DNA	1 μ g
XbaI	1 μ l

KpnI Verdau (2h, 37°C)

nf H ₂ O	15 μ l
10x Buffer KpnI	2 μ l
DNA	1 μ g
KpnI	1 μ l

XbaI/KpnI Verdau (2h, 37°C)

nf H ₂ O	14 μ l
10x Tango buffer	2 μ l
DNA	1 μ g
XbaI	1 μ l
KpnI	1 μ l

Restriktionsverdau KRT16-ExpressionsplasmidNegativkontrolle

nf H ₂ O	16 µl
Tango buffer	2 µl
DNA	1 µg
Kein Enzym	-

NotI Verdau (2h, 37°C)

nf H ₂ O	15 µl
10x Buffer 0	2 µl
DNA	1 µg
NotI	1 µl

HindIII Verdau (2h, 37°C)

nf H ₂ O	15 µl
10x Buffer R	2 µl
DNA	1 µg
HindIII	1 µl

NotI/HindIII Verdau (2h, 37°C)

nf H ₂ O	14 µl
Tango buffer	2 µl
DNA	1 µg
NotI	1 µl
HindIII	1 µl

Restriktionsverdau KRT17-ExpressionsplasmidNegativkontrolle

nf H ₂ O	16 µl
10x Tango buffer	2 µl
DNA	1 µg
Kein Enzym	-

NotI Verdau (2h, 37°C)

nf H ₂ O	15 µl
10x Buffer 0	2 µl
DNA	1 µg
NotI	1 µl

HindIII Verdau (2h, 37°C)

nf H ₂ O	15 µl
10x Buffer R	2 µl
DNA	1 µg
HindIII	1 µl

NotI/HindIII Verdau (2h, 37°C)

nf H ₂ O	14 µl
10x Tango buffer	2 µl
DNA	1 µg
HindIII	1 µl
NotI	1 µl

2.3 Calciumphosphat-Transfektion von HEK293 Zellen

Plasmid-DNA bildet mit Calciumchlorid das Calciumphosphat-DNA Präzipitat. Die Kristalle adhären an der HEK-Zellmembran, werden durch Endozytose in die Zelle aufgenommen, zur Kernmembran transportiert, vermutlich durch freie Diffusion der DNA, Bindung an Importin, oder direkte Verschmelzung vom Endosom mit der Kernmembran in den Zellkern geschleust und die DNA von der Zelle exprimiert⁴⁰.

1,4·10⁶ Zellen wurden in 5 mL Nährmedium in einer Ø 6 cm Petrischale (Ø 10 cm Petrischale: 4·10⁶ Zellen in 10 mL Nährmedium) 20-24 h bei 37°C und 5% CO₂ inkubiert. Am nächsten Tag wurde im Durchlichtmikroskop auf Konfluenz kontrolliert (sollte zwischen 50 und 80% liegen). Der Transfektionsmix (Zusammensetzung siehe Tabelle 12) wurde in einem 2 mL Eppendorf®-Gefäß nach der Reihenfolge: Plasmid, ddH₂O, 2x HBS und 2M CaCl₂ hergestellt. Der Mix wurde 1 sec gevortext, 1

2. Methoden und Materialien

sec lang zentrifugiert und 20-30 min lang bei RT inkubiert. Der Transfektionsmix wurde tropfenweise in der Nährlösung über den Zellen verteilt, dies wurde später im Durchlichtmikroskop kontrolliert. Die Zellen wurden nach der Transfektion 6 h lang bei 37°C und 5% CO₂ inkubiert, danach einmal mit 37°C warmer PBS gewaschen und die Zellen erhielten 3 mL frisches Nährmedium (Ø 10 cm Petrischale: 5 mL). Die Zellen wurden für weitere 18 h bei 37°C und 5% CO₂ inkubiert, danach im Fluoreszenzmikroskop Olympus CKX41/Lumen Dynamics X-Cite® Series 120 Q auf Transfektion kontrolliert und später mit einer Lösung von MG132 (siehe Tabelle 12, Endkonzentration im Nährmedium 20 µM) versetzt. Die Zellen wurden bis zur Zellyse für weitere 2,5 h bei 37°C und 5% CO₂ inkubiert.

Wenn die Aktivierung von AMPK erwünscht war, wurde 4 h vor der Zellyse der AMPK-Aktivator A769662 (siehe Tabelle 12) in einer Endkonzentration von 50 µM im Nährmedium über den Zellen tropfenweise verteilt.

Tabelle 11. Konzentration an Plasmid in Lösung

Plasmid	Abkürzung	Plasmidkonzentration (ng/µL)	Hersteller
pcDNA3-EGFP-C4-Nrf2 #21549	wt-EGFP-Nrf2	230,2	addgene
tm-EGFP-Nrf2	tm-EGFP-Nrf2	411,4	Manuel Matzinger, M.Sc., ausgehend von wt-EGFP-Nrf2
NC16 pCDNA3.1 FLAG Nrf2 #36971	wt-Flag-Nrf2	600,5	addgene
pCIP-AMPKa1_WT #79010	AMPK	687,3	addgene
pEGFP-C1-PRKAA1 #30305	EGFP-AMPK	529,3	addgene
EGFP-N1 (B4) SH	GFP	761,5	ClonTech
pcDNA3-myc3-bTrCP #20718	myc-β-TrCP	38,6	addgene
pcDNA3-myc3-bTrCP #20718	myc-β-TrCP	64,05	addgene
pCMV3-Myc-PGAM1	myc-PGAM1	446,2	Sino Biological
pCMV3-Myc-KRT16	myc-KRT16	493,6	Sino Biological
pCMV3-Myc-KRT17	myc-KRT17	500,7	Sino Biological

Tabelle 12. Materialien für die Calciumphosphat-Transfektion von HEK Zellen

Name	Zusammensetzung	Menge	Anbieter
Plasmid Transfektions-Mix für Ø 6 cm Petrischale mit 5 mL Nährmedium	• Plasmid(e)	5 µg	siehe Tabelle 11
	• 2M CaCl ₂	22,2 µL	siehe 2M CaCl ₂
	• 2x HBS	166,7 µL	siehe 2x HBS
	• ddH ₂ O sterilfiltriert	auf 333,3 µL	–
Plasmid Transfektions-Mix für Ø 10 cm Petrischale mit 10 mL Nährmedium	• Plasmid(e)	7,5 µg	siehe Tabelle 11
	• 2M CaCl ₂	66,6 µL	siehe 2M CaCl ₂
	• 2x HBS	500 µL	siehe 2x HBS
	• ddH ₂ O sterilfiltriert	auf 1000 µL	–
2x HBS (HEPES gepufferte Salzlösung) pH 7,05	• 280 mM NaCl		Carl-Roth
	• 10 mM KCl		Carl-Roth
	• 1,5 mM NaH ₂ PO ₄		Carl-Roth
	• 12 mM Dextrose		Carl-Roth
	• 50 mM HEPES		Carl-Roth
<i>Sterilfiltrieren und bei 4°C lagern</i>			
2M CaCl ₂	• CaCl ₂ · 2 H ₂ O	7350,6 mg	Honeywell-Fluka
	• ddH ₂ O	Auf 25 mL	–
<i>Sterilfiltrieren und bei 4°C lagern</i>			
A769662	<i>Lagerung bei -20°C</i>		APEXBIO
MG132	<i>Lagerung bei -20°C</i>		APEXBIO

2.4 Zelllyse und Proteinextraktion

Der RIPA Lysis Puffer (Zusammensetzung siehe Tabelle 13) wurde frisch vor der Zelllyse hergestellt und bis zur Zelllyse auf Eis gelagert. Das Medium wurde von den Zellen entfernt und die Zellen wurden einmal mit 1 mL kaltem PBS gewaschen. PBS wurde so vollständig wie möglich entfernt. 40 µL RIPA Lysis Puffer (Ø 10 cm Platte: 100 µL) wurden gleichmäßig auf den Zellen verteilt und die Zellen wurden mit einem Zellschaber in einem Bereich der Petrischale gesammelt.

Die Zellsuspension wurde mit einer Mikroliterpipette in ein 2 mL Eppendorf®-Gefäß übergeführt und auf Eis gelagert. Die Zellsuspension wurde 5 sec lang auf höchster Stufe im Bandelin Sonoplus sonifiziert und in der Zentrifuge Biofuge Fresco Heraeus für 15 min bei 4°C und 13.000 U/min zentrifugiert. Das Zellpellet wurde verworfen und der Überstand wurde in ein neues 2 mL Eppendorf®-Gefäß überführt und auf Eis, oder bei -20°C gelagert.

Tabelle 13. Materialien für die Zellyse und Proteinextraktion

Name	Zusammensetzung	Menge	Anbieter
RIPA Lysis Puffer	• RIPA Puffer	932 µL	siehe RIPA Puffer
	• cComplete (stock)	40 µL	siehe cComplete® (stock)
	• 0,1 M PMSF	10 µL	siehe 0,1 M PMSF
	• 200 mM NaF	5 µL	siehe 200 mM NaF
	• 1 M Natriumbutyrat	5 µL	siehe 1 M Natriumbutyrat
	• 200 mM Na ₃ VO ₄	5 µL	siehe 200 mM Na ₃ VO ₄
	• 1 M MgCl ₂	2,5 µL	siehe 1 M MgCl ₂
	• DNase I (c=195 u/µL)	0,5 µL	Invitrogen
RIPA Puffer	• Tris/HCl	157,6 mg	Carl-Roth
	• NaCl	876,6 mg	Carl-Roth
	• Na ₂ -EDTA	18,6 mg	Carl-Roth
	• SDS	100 mg	Carl-Roth
	• Triton-X-100	1 g	Honeywell Fluka
	• Na-Deoxycholat	1 g	Sigma
	• HCl	nach Bedarf	Carl-Roth
	• ddH ₂ O	auf 100 mL	–
<i>Auf pH 7,5 einstellen, sterilfiltrieren, bei 4°C lagern</i>			
cComplete® (stock)	• cComplete®	1 Tablette	Roche
	• ddH ₂ O	2 mL	–
<i>Bei -20°C lagern</i>			
0,1 M PMSF	• PMSF	52,26 mg	Honeywell Fluka
	• Isopropanol	auf 3 mL	VWR
<i>Bei 4°C lagern</i>			
200 mM Na ₃ VO ₄	• Na ₃ VO ₄	919,6 mg	Sigma
	• ddH ₂ O	auf 25 mL	–
<i>Bei -20°C lagern</i>			
200 mM NaF	• NaF	209,95 mg	Honeywell Fluka
	• ddH ₂ O	auf 25 mL	–
<i>Bei -20°C lagern</i>			
1 M MgCl ₂	• MgCl ₂	2380,25 mg	Honeywell Fluka
	• ddH ₂ O	auf 25 mL	–
<i>Bei RT lagern</i>			
1M Natriumbutyrat	• Natriumbutyrat	2752,25 mg	Sigma
	• ddH ₂ O	auf 25 mL	–
<i>Bei -20°C lagern</i>			

2.5 Bradford-Assay

Der Bradford-Assay ist eine photometrische Methode zur quantitativen Bestimmung der Proteinkonzentration⁴¹. Der Triphenylmethanfarbstoff Coomassie-Brilliant-Blau G-250 existiert in anionischer, neutraler und kationischer Form. Diese Formen weisen unterschiedliche Absorptionsmaxima auf. Im sauren Milieu kommt es zu einer Abnahme von der kationischen Form und zu einer Zunahme der anionischen Form aufgrund Komplexbildung mit positiv geladenen und

aromatischen Seitenketten von Proteinen und dadurch zur Verschiebung vom Absorptionsmaximum von 470 nm zu 595 nm. Das Maß der Farbreaktion ist vom Protein und der Proteinkonzentration abhängig und bedarf einer Kalibration mit einem Standardprotein wie bovinem Serumalbumin (BSA)⁴².

Um beim Western Blot vergleichbare Ergebnisse zu erhalten, müssen die Proteinmengen untereinander gleich sein. Zur Bestimmung der Proteinkonzentration der Zelllysate wurde der Bradford-Assay verwendet. Das Bradford-Reagenz wurde wie in Tabelle 14 beschrieben vorbereitet. Die Zelllysate wurden 1:30 mit ddH₂O verdünnt (1,33 µL Lysat + 38,6 µL ddH₂O). Jeweils 10 µL Standard-Proteinlösung und Probe wurden in Triplikaten auf einer 96-well Platte aufgetragen und mit 190 µL Bradford-Reagenz mithilfe einer Multikanalpipette versetzt, wobei die Blasenbildung vermieden wurde. Die Gemische wurden 5 min bei RT inkubiert und danach im Mikrotiterplatten-Photometer Tecan Sunrise™ auf Absorption bei 595 nm gemessen (1 sec Schütteldauer und 1 sec Absetzzeit). Die Absorption der Standardproteinlösungen wurde benutzt, um beim Vergleich mit den Absorptionen der Proben die Proteinmenge zu berechnen.

Die Menge an Proteinlösungen für den Western Blot und der Co-IP wurden berechnet. Für den Western Blot wurde pro Probe 30 µg Protein verwendet, dieser Menge entsprechende Volumen an Zelllysate wurde entnommen und mit Probenpuffer (Zusammensetzung siehe Tabelle 14) vermischt, für 5 min bei 95°C erhitzt und danach bei -20°C gelagert. Das restliche Lysat wurde für die Co-IP verwendet.

Tabelle 14. Materialien für den Bradford Assay

Name	Zusammensetzung	Menge	Anbieter				
Bradford-Reagenz	• 5xRoti®Quant	3 mL	Carl-Roth				
	• ddH ₂ O	12 mL	–				
3x SDS	• 0,5 M Tris-HCl	37,5 mL	siehe 0,5 M Tris-HCl				
	• SDS	6,0 g	Carl-Roth				
	• Glycerol	30 mL	Carl-Roth				
	• Bromphenolblau	15 mg	Sigma				
	• ddH ₂ O	Auf 100 mL	–				
	Probenpuffer	• 3x SDS	255 µL	siehe 3xSDS			
	• β-Mercaptoethanol	45 µL	Sigma				
0,5 M Tris-HCl	• Tris-HCl	3,94 g	Carl-Roth				
	• ddH ₂ O	50 mL	–				
BSA-Eichlösung	• bovines Serumalbumin Fraktion V	siehe unten	Carl-Roth				
	• ddH ₂ O	siehe unten	–				
	<i>Lagerung bei -20°C</i>						
Verdünnungsstufe	1	2	3	4	5	6	7
BSA-Eichlösungskonzentration (µg/mL)	50	100	150	200	300	400	500

2.6 Co-Immunopräzipitation (Co-IP)

Die Immunopräzipitation (IP) ist eine bekannte Methode mit der ein Antigen (Protein) aus einer Lösung mithilfe von spezifischen Antikörpern konzentriert wird. Der Antikörper-Antigen-Komplex wird immobilisiert (z.B. durch magnetische Beads) und die nicht präzipitierten Proteine werden durch Waschen entfernt. Schließlich wird das Antigen durch Denaturierung vom Antikörper entfernt und mittels SDS-PAGE und Western Blot analysiert. Die Co-IP ist eine Weiterentwicklung der IP, bei denen zusätzlich die Interaktionspartner vom Antigen aus der Lösung analysiert werden⁴³. Bei der GFP-Trap® (siehe Tabelle 15) ist ein Antikörper-Fragment an magnetische Beads gekoppelt, welches GFP hochspezifisch bindet⁴⁴ (myc-Trap® analog). Das grundlegende Prinzip der Co-IP mithilfe des GFP-Traps® ist in Abb. 3A abgebildet. Der spezifische an magnetische Beads gekoppelte GFP Antikörper bindet das EGFP gekoppelte Nrf2 und Nrf2 bindet seinen Interaktionspartner. Der Komplex wird durch einen Magneten präzipitiert. Die Bindung zwischen dem GFP-Trap® und EGFP-Nrf2, sowie zwischen EGFP-Nrf2 und seinem Interaktionspartner wird durch Denaturierung mit Hitze, SDS und β -Mercaptoethanol gelöst.

Zur Equilibrierung wurden je 10 μ L GFP-Trap Suspension mit 200 μ L 4°C kalter physiologischer Pufferlösung (pPI, siehe Tabelle 15) in einem 2 mL Eppendorf®-Gefäß vermengt und 1 sec lang gevortext. Die magnetischen Beads wurden mit einem magnetic rack (Abb. 3B) von der Flüssigkeit getrennt und der Überstand wurde verworfen. Das Waschen wurde noch 2-mal wiederholt. Die Zelllysate mit bekannter Proteinkonzentration (aus dem Bradford-Assay) wurden mit pPI zu 60 μ L verdünnt, sodass alle Proben die gleiche Proteinkonzentration aufgewiesen haben. Die einzelnen verdünnten Lysate wurden zu den gewaschenen Beads gegeben und mindestens 1 Stunde bei 4°C am Rotator Intelli-Mixer RM-2 inkubiert. Die Beads wurden mit dem magnetic rack vom Lysat getrennt, dieser Überstand wurde gesammelt. Aus dem Überstand wurde das 30 μ g Protein entsprechende Volumen entnommen, mit Probenpuffer (siehe Tabelle 14) versetzt, 5 min lang bei 95°C erhitzt und bei -20°C gelagert. Dieses Gemisch wurde für die Western Blot Kontrolle verwendet, um die Effizienz der Co-IP zu überprüfen.

Die Beads wurden mit 200 μ L pPI versetzt, mit dem magnetic rack magnetisch von der Lösung abgetrennt und der Überstand wurde verworfen. Dieser Waschschrift wurde noch 2-mal wiederholt. Danach wurden die Beads zur Trennung der intermolekularen Bindungen zwischen den Proteinen in 25 μ L Probenpuffer bei 95°C im Heizblock für 10 min erhitzt. Dabei wurden die Proteine denaturiert und die Disulfidbrücken reduziert. Das Eluat wurde bis zur Verwendung am Western Blot bei -20°C gelagert.

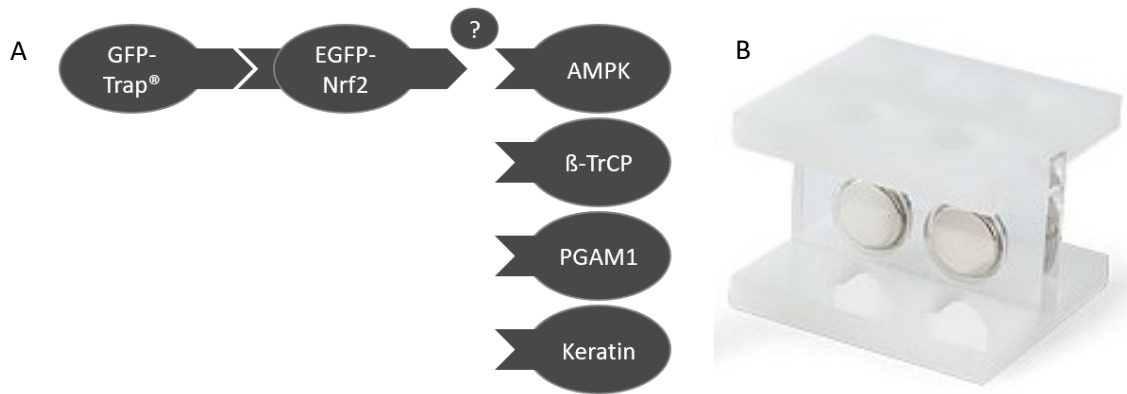


Abb. 3. (A) Grundlegendes Prinzip der Co-IP mittels des GFP-Traps® (B) magnetic rack von bio-rad™ 45

Tabelle 15. Materialien für die Co-IP

Name	Zusammensetzung	Menge	Anbieter
GFP-Trap®			Chromotek
Myc-Trap®			Chromotek
Physiologische Pufferlösung (pPI)	• 10 mM Tris-HCl		Carl-Roth
	• 150 mM NaCl		Carl-Roth
	• 0,5 mM EDTA		Carl-Roth
	• ddH ₂ O		–
<i>pH auf 7,5 einstellen, sterilfiltrieren, Lagerung bei 4°C</i>			

2.7 Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE)

Die SDS-PAGE ist eine geeignete Methode, um Proteine in einem elektrischen Feld nach ihrer Masse aufzutrennen. SDS ist ein Detergens, welches sekundäre und tertiäre, nicht durch Disulfidbrücken verknüpfte, Proteinstrukturen denaturiert und Proteine mit einer negativen Ladung umgibt. Die SDS-umhüllten Proteine weisen dasselbe Masse-zu-Ladung-Verhältnis auf, sodass die Proteine ausschließlich nach ihrer Masse im elektrischen Feld aufgetrennt werden. Das verwendete SDS-PAGE-System ist ein diskontinuierliches Gelsystem (Prinzip siehe Abb. 4) mit einem oberem Sammel- und einem unterem Trenngel, deren pH-Werte und Polyacrylamid (PAA) Konzentrationen unterschiedlich sind. Das obere weitmaschigere Sammelgel (niedrigere PAA Konzentration) weist einen neutralen pH-Wert von 6,8 auf, bei der es zu keiner Retention aufgrund unterschiedlicher Größe der Proteine kommt. Das engmaschigere Trenngel (höhere PAA Konzentration) weist dahingegen einen basischeren pH von 8,8 auf, wodurch die Proteine nach ihrer Größe aufgetrennt werden⁴⁶. Der Elektrophorese Puffer besteht aus Tris-Base, Glycin, SDS und destilliertem Wasser. In der Pufferlösung, welches einen basischen pH-Wert aufweist, sind die Glycin-Moleküle überwiegend negativ geladen. Beim Einschalten vom elektrischen Feld wandern die Glycin-Moleküle in Richtung Anode (+ Pol) ins Sammelgel. Im neutralen Sammelgel liegen die Glycin-Moleküle überwiegend in Ihrer zwitterionischen Form vor,

sodass ihre Wanderungsgeschwindigkeit Richtung Anode abnimmt. Im elektrischen Feld werden die Tris-HCl Ionenpaare vom Sammelgel nach Ihren Ionen aufgetrennt und die Tris Moleküle wandern Richtung Kathode (- Pol) und die Chlorid-Ionen Richtung Anode. Die schnell beweglichen Chlorid-Ionen ziehen die Glycin-Moleküle mit sich, sodass sich zwei Fronten bilden: eine schnelle Chlorid-Ionen Front und eine langsame Glycin-Front. Da die Proteine ebenfalls im elektrischen Feld wandern, mit einer geringeren Geschwindigkeit als die Chlorid-Ionen, aber einer höheren als die Glycin-Moleküle, bildet sich ein ‚Sandwich‘ bestehend aus Glycin-Front, Proteine und Chlorid-Ionen-Front im Sammelgel. Die Proteine werden hierdurch konzentriert. Im basischen Trenngel (pH 8,8) liegen die Glycin-Moleküle hauptsächlich negativ geladen vor, sodass ihre Wanderungsgeschwindigkeit zunimmt und sie die Proteine überholen. Dies führt dazu, dass die Proteine an der Grenze von Sammel- zu Trenngel in schmalen Banden vorliegen und sich im engmaschigerem Trenngel nach ihrer Größe auftrennen⁴⁷.

Die Komponenten vom Trenngel wurden zusammengemischt (Zusammensetzung siehe Tabelle 16), zwischen zwei Glasplatten gegossen, mit ungefähr 0,5 mL Isopropanol überschichtet und 1,5 h aushärten gelassen. Nach dem Aushärten wurde das Isopropanol entfernt und es wurde 3-mal mit ddH₂O nachgewaschen. Die Komponenten vom Sammelgel (siehe Tabelle 16) wurden zusammengemischt, zwischen die zwei Glasplatten auf das feste Trenngel gegossen, mit einem Kamm versetzt und 45 min aushärten gelassen. Das fertig ausgehärtete Gel wurde bis zur Verwendung in einem feuchtem Papiertuch bei 4°C gelagert.

Vor der Beladung mit den Proteinlösungen wurden die Glasplatten mit dem Gel im Gestell fixiert, in die Elektrophoresewanne gestellt und mit SDS-PAGE Puffer (Zusammensetzung siehe Tabelle 16) gefüllt. Der Kamm wurde entfernt, die Taschen wurden mit einer Pipette gespült und auf Unversehrtheit geprüft. 5 µL Proteinmarker (siehe Tabelle 16) und die Proteinlösungen wurden in die Geltaschen aufgetragen, sodass die Lysate und Co-IP Überstände untereinander, sowie die Eluate aus der Co-IP untereinander die gleiche Menge an Protein, für die Vergleichbarkeit, enthielten.

Die Wahl des Trenngels war von der Größe der untersuchten Proteine abhängig, bei Experimenten wo PGAM1 und GFP gleichzeitig untersucht wurden, wurden zur besseren Auflösung 12%-ige Gele gewählt, bei sonstigen Experimenten nahm man 10%-ige Gele.

Pro Gel wurde ein Gleichstrom von 25 mA angelegt und solange aufrecht erhalten bis die blaue Front vom Probenpuffer die untere Kante vom Gel erreicht hat. Ist die Elektrophorese abgeschlossen, wurde das Gel aus den zwei Glasplatten entfernt und für den Western Blot bereitgestellt.

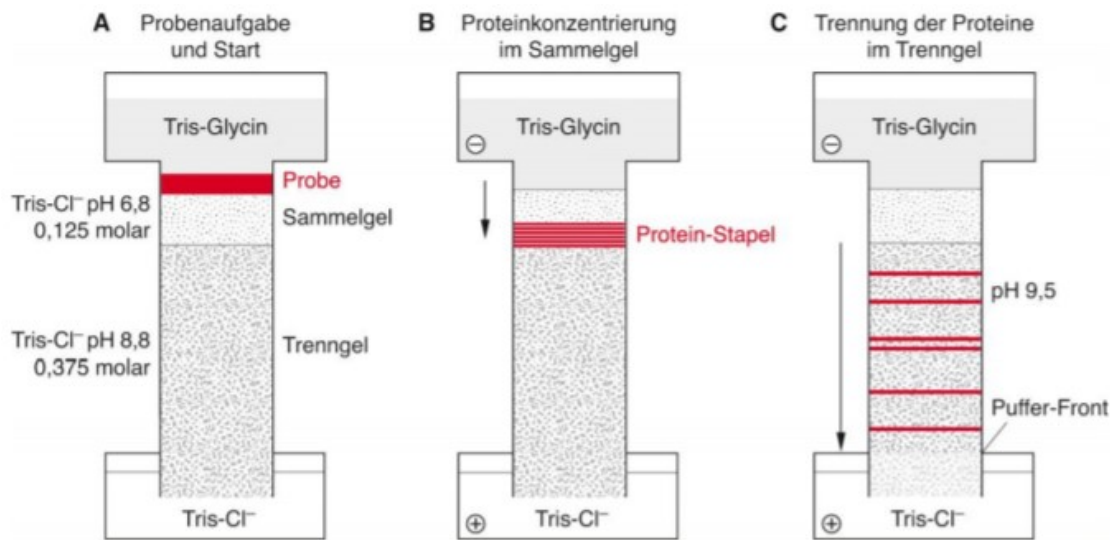


Abb. 4. Prinzip der diskontinuierlichen SDS-PAGE⁴⁸

Tabelle 16. Materialien für die SDS-PAGE

Name	Zusammensetzung	Menge	Anbieter
10%-iges Polyacrylamid Trenngel (7,5 mL)	• ddH ₂ O	3,05 mL	–
	• Rotiphorese® Gel 30	2,5 mL	Carl-Roth
	• 1,5 M Tris-HCl pH 8,8	1,875 mL	siehe 1,5 M Tris-HCl pH 8,8
	• 10% SDS	75 µL	siehe 10% SDS
	• TEMED	7,5 µL	Carl-Roth
	• APS (10%)	37,5 µL	siehe APS 10%
	<i>Lagerung der Komponenten bei 4°C</i>		
12%-iges Polyacrylamid Trenngel (7,5 mL)	• ddH ₂ O	2,55 mL	–
	• Rotiphorese® Gel 30	3 mL	Carl-Roth
	• 1,5 M Tris-HCl pH 8,8	1,875 mL	siehe 1,5 M Tris-HCl pH 8,8
	• 10% SDS	75 µL	siehe 10% SDS
	• TEMED	7,5 µL	Carl-Roth
	• APS (10%)	37,5 µL	siehe APS 10%
	<i>Lagerung der Komponenten bei 4°C</i>		
Polyacrylamid Sammelgel (3,75 mL)	• ddH ₂ O	2,62 mL	–
	• Rotiphorese® Gel 30	640 µL	Carl-Roth
	• 1,25 M Tris-HCl pH 6,8	375 µL	siehe 1,25 M Tris- HCl pH 6,8
	• 10% SDS	37,5 µL	siehe 10% SDS
	• TEMED	7,5 µL	Carl-Roth
	• APS (10%)	37,5 µL	siehe APS 10%
	<i>Lagerung der Komponenten bei 4°C</i>		
SDS-PAGE Puffer	• Tris-Base	3 g	Honeywell-Fluka
	• Glycin	14,4 g	Carl-Roth
	• SDS	1 g	Carl-Roth
	• ddH ₂ O	Auf 100 mL	–
	<i>Lagerung bei 4°C</i>		
1,5 M Tris-Base pH 8,8	• Tris-Base	18,17 g	Honeywell-Fluka
	• ddH ₂ O	Auf 100 mL	–
	• HCl	Nach Bedarf	Sigma
1,25 M Tris-Base pH 6,8	• Tris-Base	15,14 g	Honeywell-Fluka
	• ddH ₂ O	Auf 100 mL	–
	• HCl	Nach Bedarf	Sigma
10% SDS	• SDS	5 g	Carl-Roth
	• ddH ₂ O	Auf 50 mL	–
Ammoniumperoxidsulfat 10% (APS)	• Ammoniumperoxidsulfat	1 g	Sigma
	• ddH ₂ O	Auf 10 mL	Sigma
Proteinmarker	• Precision Plus Protein™ All Blue Prestained Protein Standards	5 µL	Bio-Rad
	<i>Lagerung bei -20°C</i>		

2.8 Western Blot

2.8.1 Proteintransfer (Blotting)

Das Blotting dient zur Übertragung von Proteinen von einem PAA-Gel auf eine Membran, in diesem Fall einer PVDF Membran. Das Prinzip des Blotting ist in Abb. 5 illustriert. Wird ein Gleichstrom angelegt wandern die negativen, mit SDS überdeckten Proteine aus dem PAA-Gel in die Transfermembran.

Die PVDF-Membran (Transfermembran) wurde eine Minute lang am Schüttler mit Methanol aktiviert und danach in Blotting-Puffer (siehe Tabelle 17) gelegt. Die Schwämme und Filterpapiere wurden ebenfalls mit Blotting-Puffer durchnässt. Ein ‚Sandwich‘ aus Schwamm, Filterpapier, Gel, Transfermembran, Filterpapier und Schwamm wurde hergestellt. Es wurde darauf geachtet, dass die Position vom Gel in der Blotting-Kassette richtig ist, sie musste auf der Seite der Kathode (- Pol) liegen. Die Kassette wurde in eine Blotting-Wanne gelegt, die mit einem -80°C kaltem Kühlakku, Blotting Puffer und einem Magnetrührer ausgestattet war. Der Transfer wurde bei konstantem Gleichstrom von 110 mA pro Gel für 110-120 min durchgeführt. Die Dauer vom Blotting war vom Proteingewicht abhängig, beim Blotting vom leichteren PGAM1 wurde die Zeitdauer auf 110 min beschränkt, bei den übrigen Proteinen betrug die Zeitdauer 120 min. Nach erfolgreichem Blotting wurde die Transfermembran zur Absättigung unspezifischer Antikörperbindungsstellen mit einer Blockierlösung (siehe Tabelle 17) für mindestens 1 h bei RT am Rotator inkubiert.

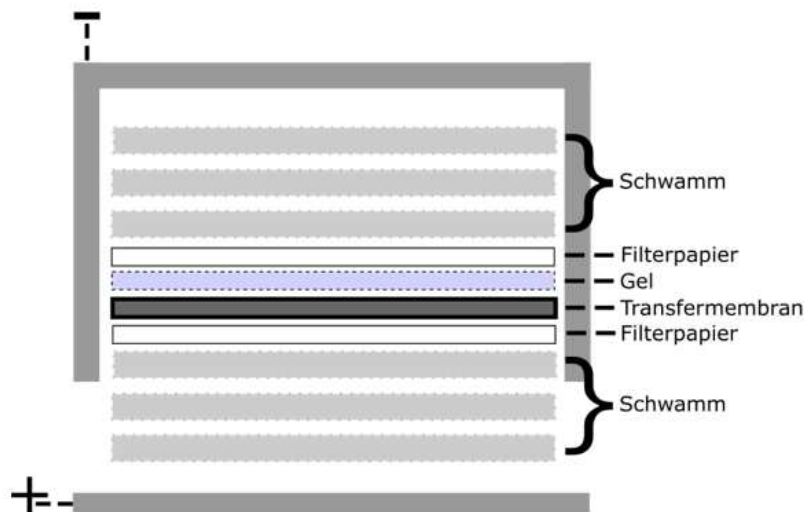


Abb. 5. Aufbau des Western Blots⁴⁹

Tabelle 17. Materialien für das Blotting

Name	Zusammensetzung	Menge	Anbieter
Blotting-Puffer	• 5x Blotting Puffer	100 mL	siehe 5x Blotting Puffer
	• Methanol	100 mL	VWR
	• ddH ₂ O	300 mL	–
5x Blotting Puffer	• Tris-Base	15,169 g	Honeywell-Fluka
	• Glycin	72,9 g	Carl-Roth
	• ddH ₂ O	auf 1000 mL	–
<i>Lagerung bei 4°C</i>			
Tris gepufferte Salzlösung mit Tween 20 (TBS-T) pH 8	• Tris-Base	3 g	Honeywell-Fluka
	• NaCl	11,1 g	Carl-Roth
	• Tween 20	1 mL	Carl-Roth
	• ddH ₂ O	Auf 1000 mL	–
	• HCl	nach Bedarf	Sigma
<i>pH auf 8 einstellen</i>			
Blockierlösung	• Bovines Serumalbumin Fraktion V	0,25 g	Carl-Roth
	• TBS-T	5 mL	siehe TBS-T
<i>Lagerung bei -20°C, 5-mal wiederverwendbar</i>			

2.8.2 Proteindetektion mittels Antikörper

Die Detektion der Proteine auf der Transfermembran erfolgte mit spezifischen Antikörpern (siehe Tabelle 18) unter Verwendung der Enhanced Chemoluminescence (ECL) Technik (siehe Abb. 6). Die Grundlage dieser Technik basiert auf spezifischen (primären) Antikörpern (Ak), die an Proteine an der Transfermembran binden. Meerrettich-Peroxidase (HRP) gekoppelte (sekundäre) Ak binden an den primären Antikörpern. Durch die Verwendung von primären und sekundären Antikörpern kann das Signal für die Detektion verstärkt werden. Da die Fc Region des primären Ak mehrere Epitope aufweist, gegen die der polyklonale sekundäre Ak gerichtet ist, kommt es zu einer Signalverstärkung. Die HRP katalysiert die Reaktion von Luminol und Wasserstoffperoxid zu 3-Aminophthalat, Wasser, Stickstoff und Licht. Die Lichtemission wird durch p-Cumarsäure verstärkt und mit einer Chemolumineszenz sensiblen Kamera detektiert⁵⁰.

Die Membran wurde aus der Blockierlösung genommen und 3-mal für mindestens 5 min mit TBS-T (siehe Tabelle 17) gewaschen und über Nacht bei 4°C mit der primären Antikörperlösung (siehe Tabelle 19) am Rotator inkubiert. Am nächsten Tag wurde die Membran aus der primären Antikörperlösung entnommen, 3-mal für mindestens 5 min in TBS-T gewaschen, und für mindestens 2 h mit der sekundären Antikörperlösung bei RT am Rotator inkubiert. Die Membran wurde aus der sekundären Antikörperlösung entnommen und 3-mal für mindestens 5 min in TBS-T gewaschen. Die ECL-Detektionslösung (siehe Tabelle 19) wurde frisch (unter Lichtschutz) zubereitet, auf die Membran getan und für 1 min bei RT inkubiert. Nachher wurde die Membran im Gerät Fujifilm LAS-3000 Image

Analyzer unter der Funktion Chemolumineszenz detektiert. Die densitometrische Auswertung der Membran erfolgte im Programm FujiFilm MultiGauge 3.0. Für die Detektion mit neuen Antikörpern wurde die Membran 3-mal für mindestens 5 min in TBS-T gewaschen und die neuen Antikörperlösungen wie oben beschrieben hinzugegeben.

Tabelle 18. Verwendete primären und sekundären Antikörper für die Proteindetektion

Primärer Antikörper	Verdünnung	Spezifität	Anbieter
AMPK #2532	1:1000	polyklonal	Cell Signaling
GFP #sc-9996	1:1000	monoklonal	Santa Cruz
Actin #69100	1:5000	monoklonal	MP Biologicals
Myc-Tag #2276	1:1000	monoklonal	Cell Signaling
pAcc #3661	1:1000	polyklonal	Cell Signaling
PGAM1 #12098	1:1000	monoklonal	Cell Signaling
KRT16 #sc-53255	1:1000	monoklonal	Santa Cruz
KRT17 #sc-101461	1:1000	monoklonal	Santa Cruz
Nrf2 #12721	1:1000	monoklonal	Cell Signaling
Sekundärer Antikörper			
Anti-Maus #7076S	1:1000	polyklonal	Cell Signaling
Anti-Kaninchen #7074S	1:1000	polyklonal	Cell Signaling
<i>Lagerung der primären und sekundären Antikörper bei -20°C (Ausnahmen: GFP-, KRT16-, KRT17- und PGAM1-Ak bei 4°C)</i>			

Tabelle 19. Materialien für die Proteindetektion mittels ECL

Name	Zusammensetzung	Menge	Anbieter
Antikörperlösung	• Antikörper	siehe Tabelle 18	
	• TBS-T	5 mL	siehe TBS-T
	<i>Lagerung bei -20°C, 5-mal wiederverwendbar</i>		
Enhanced Chemoluminescence Lösung (ECL)	• ddH ₂ O	9 mL	–
	• 1 M Tris-Base pH 8,5	1 mL	siehe 1 M Tris-Base pH 8,5
	<i>Lagerung bei 4°C</i>		
1 M Tris-Base pH 8,5	• Tris-Base	12,114 g	Honeywell-Fluka
	• ddH ₂ O	100 mL	–
	<i>Lagerung lichtgeschützt bei -20°C</i>		
Luminol (stock)	• Luminol	0,44 g	Sigma
	• DMSO	10 mL	Carl-Roth
	<i>Lagerung lichtgeschützt bei -20°C</i>		
p-Cumarsäure (stock)	• p-Cumarsäure	0,15 g	Carl-Roth
	• DMSO	10 mL	Carl-Roth
	<i>Lagerung lichtgeschützt bei -20°C</i>		
ECL-Detektionslösung	• ddH ₂ O	4,5 mL	–
	• ECL-Lösung	0,5 mL	siehe ECL-Lösung
	• Luminol (stock)	12 µL	siehe Luminol (stock)
	• p-Cumarsäure (stock)	22,5 µL	siehe p-Cumarsäure (stock)

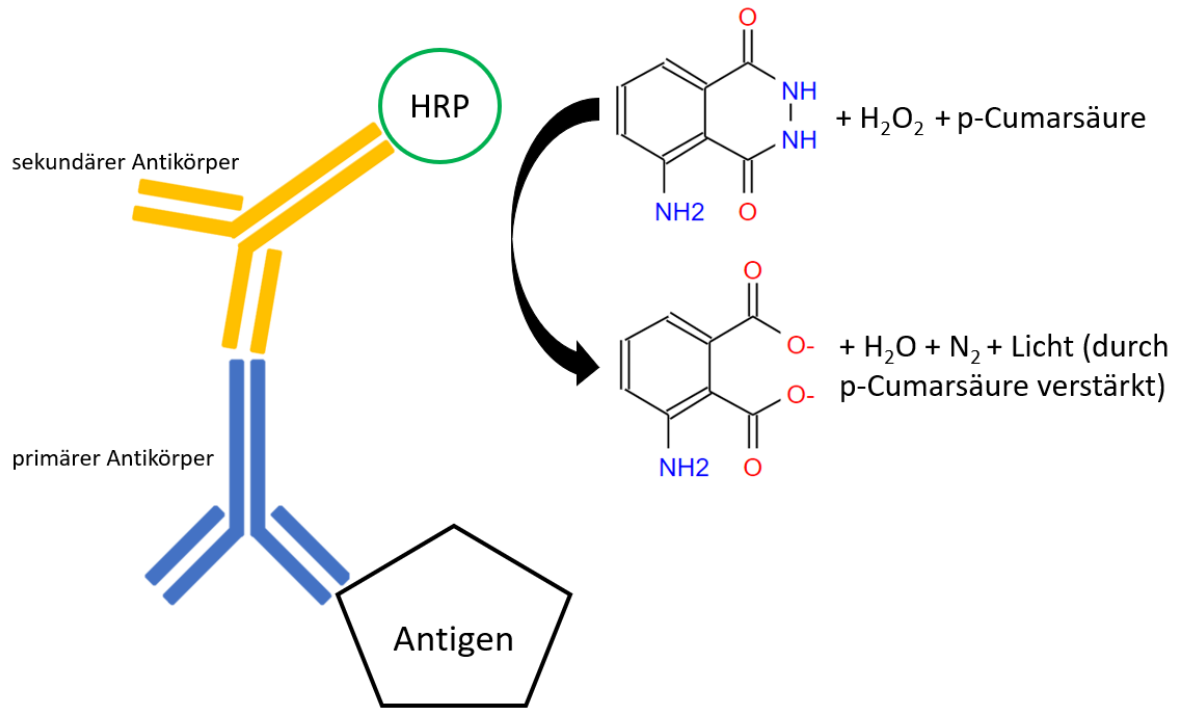


Abb. 6 Prinzip der ECL-Technik

2.9 Statistik

Für jedes Experiment wurden mindestens 3 biologische Replikate durchgeführt und die Statistik wurde mithilfe vom Programm GraphPad Prism 4 erstellt. Die Säulendiagramme zeigen den Durchschnitt mit der Standardabweichung an.

3. Ergebnisse

3.1 Qualitätskontrolle klonierter Plasmide

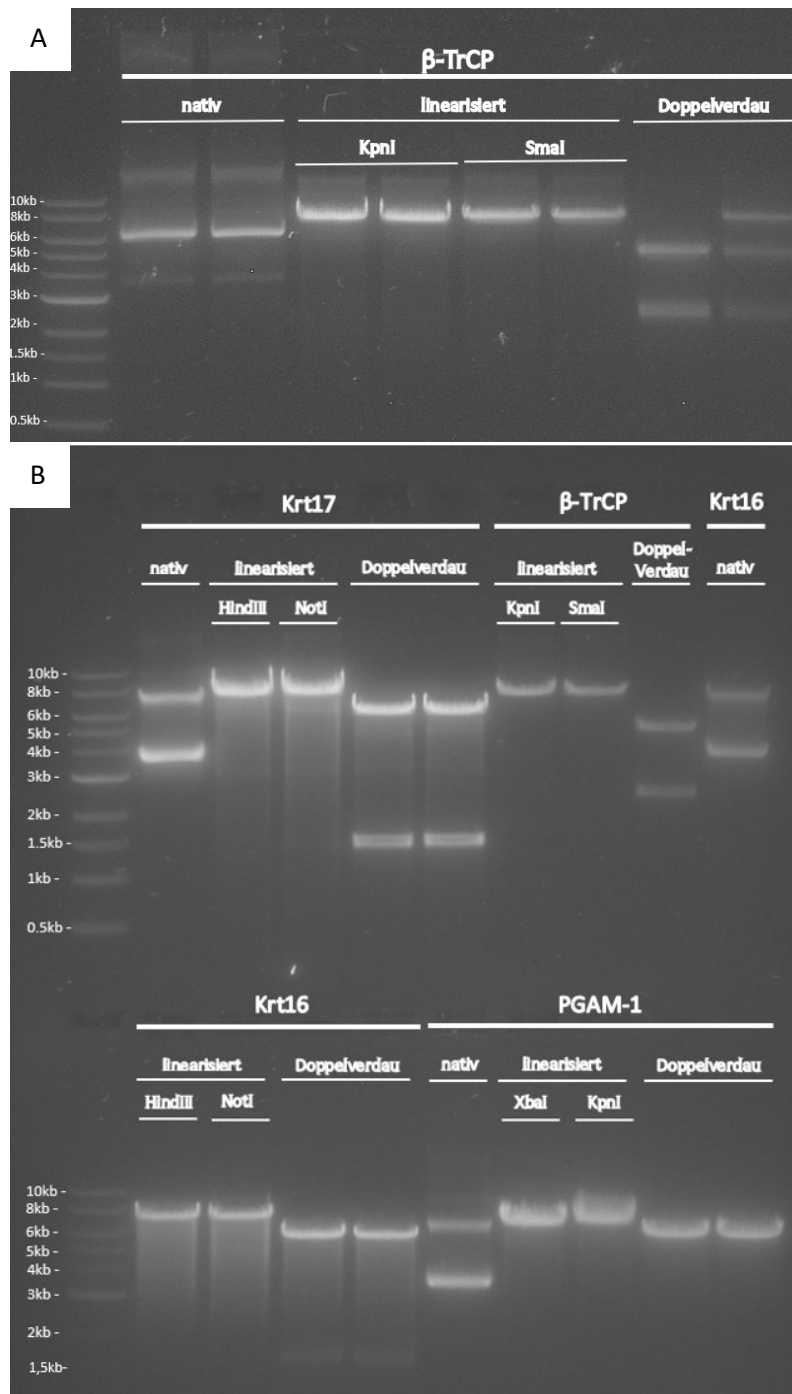


Abb. 7. (A) *pcDNA3-myc3-bTrCP-Plasmidverdau* (B) *pcDNA3-myc3-bTrCP-*, *pCMV3-Myc-KRT16-*, *pCMV3-Myc-KRT17-*, *pCMV3-Myc-PGAM1-Plasmidverdau*

Tabelle 20. Ergebnisse der Qualitätskontrolle klonierter Plasmide

Plasmid	Erwartete Größe(n) in kb			Erhaltene Größe(n) in kb		
	nativ	Einzel-	Doppelverdau	nativ	Einzel-	Doppelverdau
pcDNA3-myc3-bTrCP	7,2	7,2	2,3 + 4,9	7,5	7,5	2,5 + 5
pCMV3-Myc-PGAM1	6,81	6,81	0,81 + 6	6,2	6,5	6
pCMV3-Myc-KRT16	7,47	7,47	1,47 + 6	7,5	7,5	1,4 + 6
pCMV3-Myc-KRT17	7,34	7,34	1,34 + 6	7,5	7,5	1,4 + 6

Abweichungen: Native Plasmide traten neben den vorhergesagten Größen auch in einer niedrigeren auf. Diese Ergebnisse deuten auf unterschiedliche Konformationen (relaxed und supercoiled) vom nativen Plasmid hin. Im Doppelverdau von β -TrCP trat bei der Größe des nativen Plasmids ein Fragment auf, welches auf eine ungenügende Verdauung weist. Beim Doppelverdau von PGAM1 entstand nur ein ungefähr ein 6 kb schweres Fragment. Die mangelnde Belichtung vom unteren Ende des Gels hat sich durch die schlechte Sichtbarkeit vom 1,5 kb schwerem, zweitem Fragment vom Doppelverdau erkennbar gemacht. Da die Differenz in Höhe zwischen linearisiertem und doppelverdautem Plasmid sichtbar ist und ungefähr 1 kb beträgt, war der Doppelverdau höchstwahrscheinlich erfolgreich.

Schlussfolgerungen: Die linearisierten Plasmide und Fragmente nach dem Doppelverdau traten bei den erwarteten Höhen auf, somit sind die Identitäten der Plasmide mit einer gewissen Sicherheit bestätigt (richtige Basenfolge bereits durch Sequenzierung vom Hersteller überprüft). Ebenfalls traten keine zusätzlichen und nicht vorhergesagten Banden beim Einzel- und Doppelverdau auf, somit ist auf eine hohe Reinheit der Plasmide zu schließen.

3.2 AMPK ist ein Interaktionspartner von Nrf2

Um eine Interaktion von Nrf2 mit AMPK in einer lebenden Zelle zu untersuchen wurde die Co-Elution von überexprimierten wildtyp-(wt)-EGFP-Nrf2 mit AMPK geprüft. Die Zellen wurden wie in Abb. 8A mit Plasmiden transfiziert, lysiert und die Zelllysate wurden für die Co-Immunopräzipitation mittels GFP-Trap® verwendet. Da die Co-IP-Experimente zuerst mit unverdünnten GFP-hältigen Lysaten durchgeführt wurden, welche zu selben Ergebnissen wie die Experimente mit verdünnten GFP-Lysaten führten, aber eine massive Signalüberlagerung am Blot mit sich zogen, wurden bei allen unten angeführten Experimente die GFP-hältigen Zelllysate 1:40 für die Co-IP verdünnt.

Wie in Abbildung Abb. 8A zu sehen ist co-eluiert AMPK mit wt-EGFP-Nrf2, im Zuge einer IP via GFP-Trap® von Lysaten von HEK Zellen, welche mit AMPK- und wt-EGFP-Nrf2-Expressionsplasmiden co-transfiziert worden sind. In der Negativkontrolle ist die Co-Elution von transfiziertem AMPK mit GFP nicht zu erkennen (was auch bei unverdünntem Auftragen der Probe bestätigt werden konnte). Dies deutet auf eine spezifische Interaktion von Nrf2 mit AMPK hin. Die Co-Elution von endogenem AMPK mit wt-EGFP-Nrf2 ist ebenfalls schwach erkennbar und bestätigt die AMPK/Nrf2 Interaktion, die bereits

3. Ergebnisse

in co-transfizierten Zellen beobachtet wurde. Die densitometrische Auswertung der Western Blots ist in Abb. 8B abgebildet.

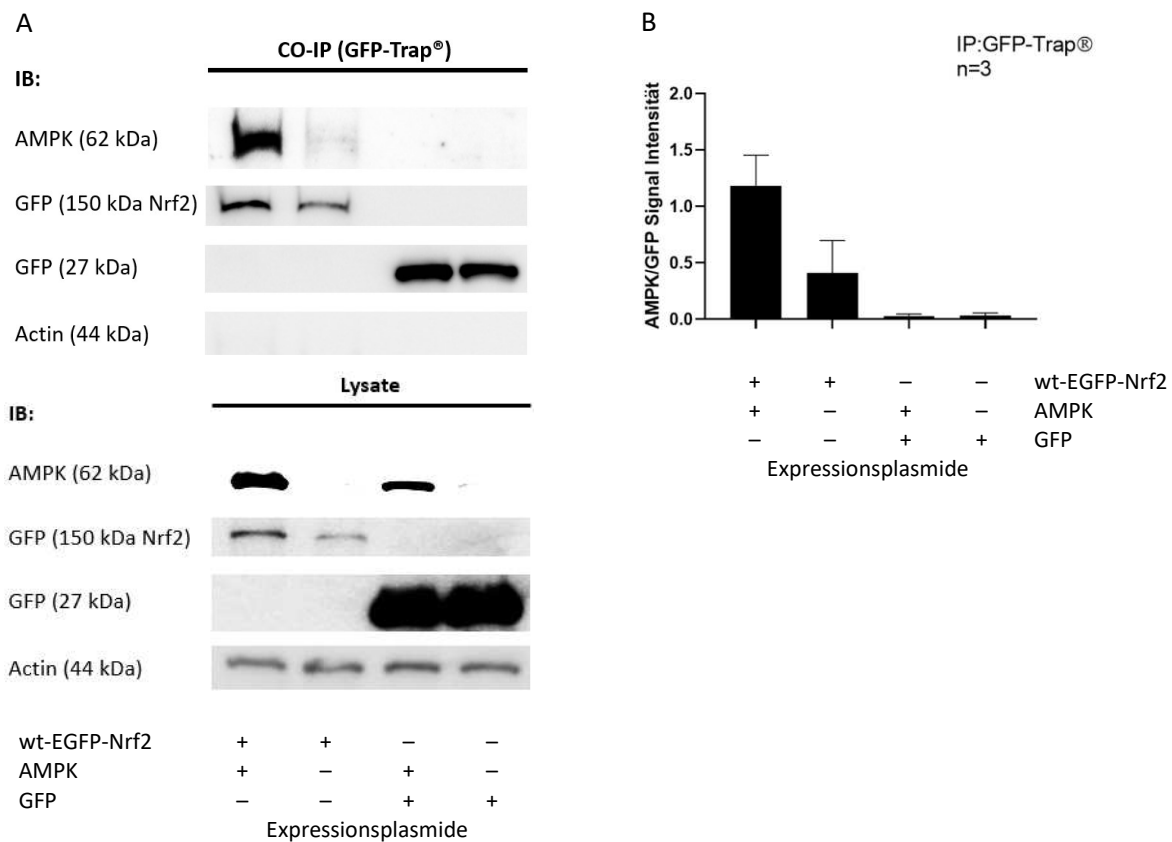


Abb. 8. (A) Repräsentativer Western Blot zur Co-IP von wt-EGFP-Nrf2 mit AMPK und Lysate zur Inputkontrolle, Immunoblot (IB): verwendete Antikörper zur Detektion (B) Densitometrische Auswertung von 3 Replikaten (n=3)

Die oben vorgestellten Ergebnisse der Co-IP mittel GFP-Trap® liefern die ersten Hinweise für die Interaktion von Nrf2 mit AMPK in Zellen. Um diese Hypothese zu unterstützen wurden komplementäre Experimente mit EGFP-AMPK und dem GFP-Trap® durchgeführt (siehe Abb. 9A und 9B). Am repräsentativen Blot ist erkennbar, dass transfiziertes wt-Flag-Nrf2 mit EGFP-AMPK co-eluiert, während transfiziertes wt-Flag-Nrf2 nicht mit GFP co-eluiert. Die densitometrische Auswertung der Western Blots ist in Abb. 9A abgebildet.

Abb. 10 zeigt repräsentative Fluoreszenzbilder von transfizierten Zellen, vor der Zugabe von MG132, die der Transfektionskontrolle dienen. Erkennbar ist, dass die Transfektionen erfolgreich waren, mit einer variierenden Expressionsstärke des transfizierten Gens.

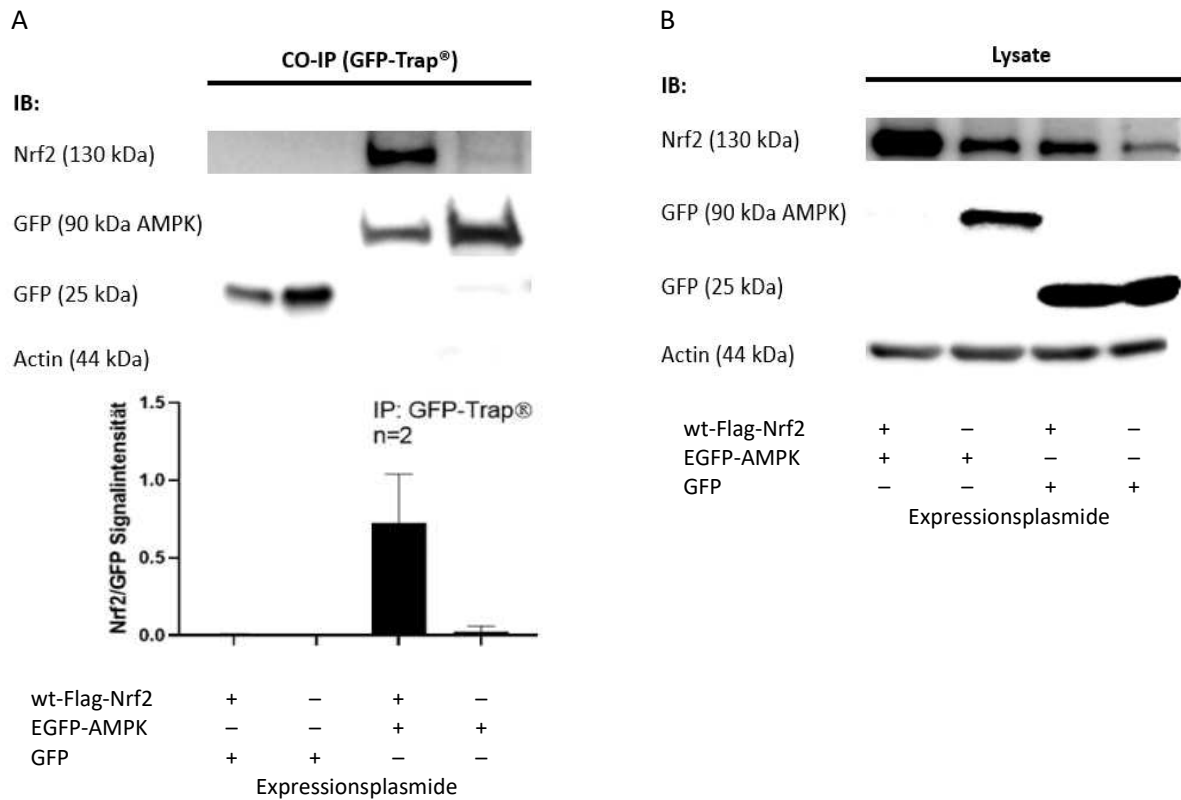


Abb. 9. (A) Repräsentativer Western Blot zur Co-IP von EGFP-AMPK mit wt-Flag-Nrf2 und densitometrische Auswertung von 2 Replikaten (n=2) (B) Western Blot der Lysate zur Inputkontrolle

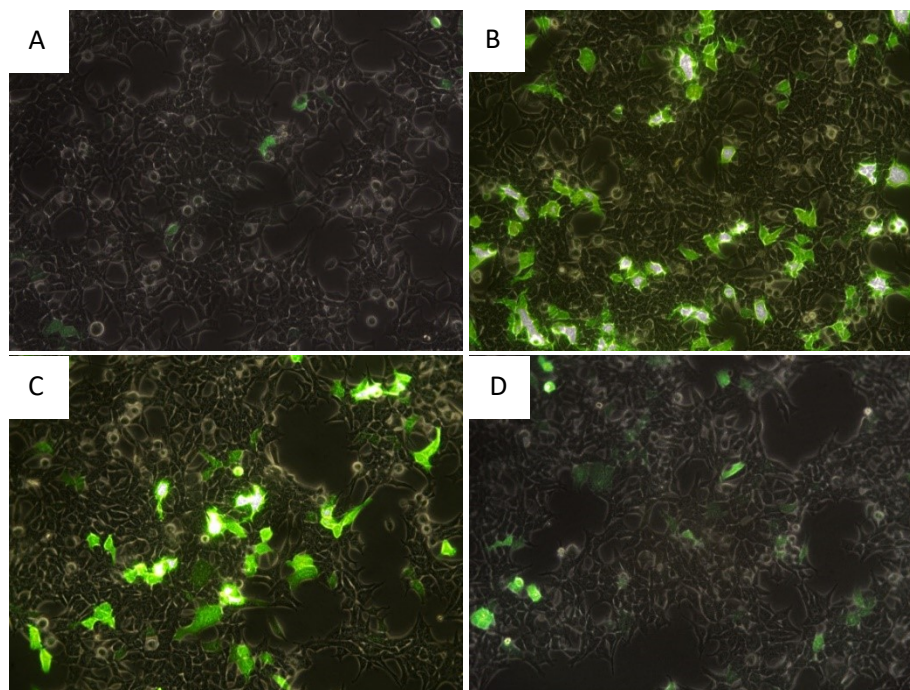


Abb. 10. Erfolgreiche Transfektion von HEK293 Zellen. (A) EGFP-AMPK (B) GFP transfizierte (C) wt-Flag-Nrf2 und GFP (D) EGFP-AMPK und wt-Flag-Nrf2 co-transfizierte HEK293 Zellen

3.3 Die AMPK-abhängigen drei Phosphorylierungsstellen (S374, S408, S433) nahe der Neh6-Domäne von Nrf2 beeinflussen die Nrf2- β -TrCP-Interaktion kaum

Die Beeinflussung der Interaktion von Nrf2 mit β -TrCP, durch AMPK-abhängige Phosphorylierungsstellen nahe der Neh6 Domäne, wurde in lebenden Zellen über die Co-Elution von überexprimierten wt- oder triplemutiertem-(tm)-EGFP-Nrf2, in dem die phosphorylierbaren Serine durch Alanin ersetzt wurden, mit myc- β -TrCP untersucht. Die Zellen wurden, wie in Abb. 11A abgebildet, mit Plasmiden transfiziert, 4 h vor der Zellyse mit dem AMPK-Aktivator A769662 (+) oder DMSO (-) behandelt, lysiert und die Zellysate wurden für die Co-IP mittels GFP-Trap® verwendet. Die Co-Transfektion von myc- β -TrCP mit GFP dient zur Kontrolle, um die Spezifität der Nrf2- β -TrCP-Interaktion zu verdeutlichen. Da die Co-Elution von myc- β -TrCP mit GFP gar nicht, aber mit EGFP-Nrf2 deutlich erkennbar ist, unterstützt dies die Hypothese der spezifischen Interaktion.

Die densitometrische Auswertung (Abb. 11B) von 3 Replikaten hat ergeben, dass die Interaktion von transfiziertem wt- und tm-EGFP-Nrf2 mit myc- β -TrCP, im Gegensatz zur Kontrolle mit DMSO, bei AMPK Aktivierung verringert ist. Abb. 11C zeigt, dass die Stärke der Interaktion von wt- und tm-EGFP-Nrf2 bei AMPK Aktivierung etwa gleich stark ist. Eine wesentliche Abweichung bei der Nrf2- β -TrCP Interaktion zeigt sich in Abb. 11C; Ohne AMPK Aktivierung ist die Interaktion zwischen tm-EGFP-Nrf2 und myc- β -TrCP geringer als bei wt-EGFP-Nrf2. Anscheinend bindet tm-EGFP-Nrf2 generell schwächer an myc- β -TrCP als wt-EGFP-Nrf2, was aber wohl eher durch die Dreifachmutation (S \rightarrow A) an sich und dadurch verursachte Konformationsänderungen begründet sein mag als durch das Fehlen phosphorylierbarer Serine.

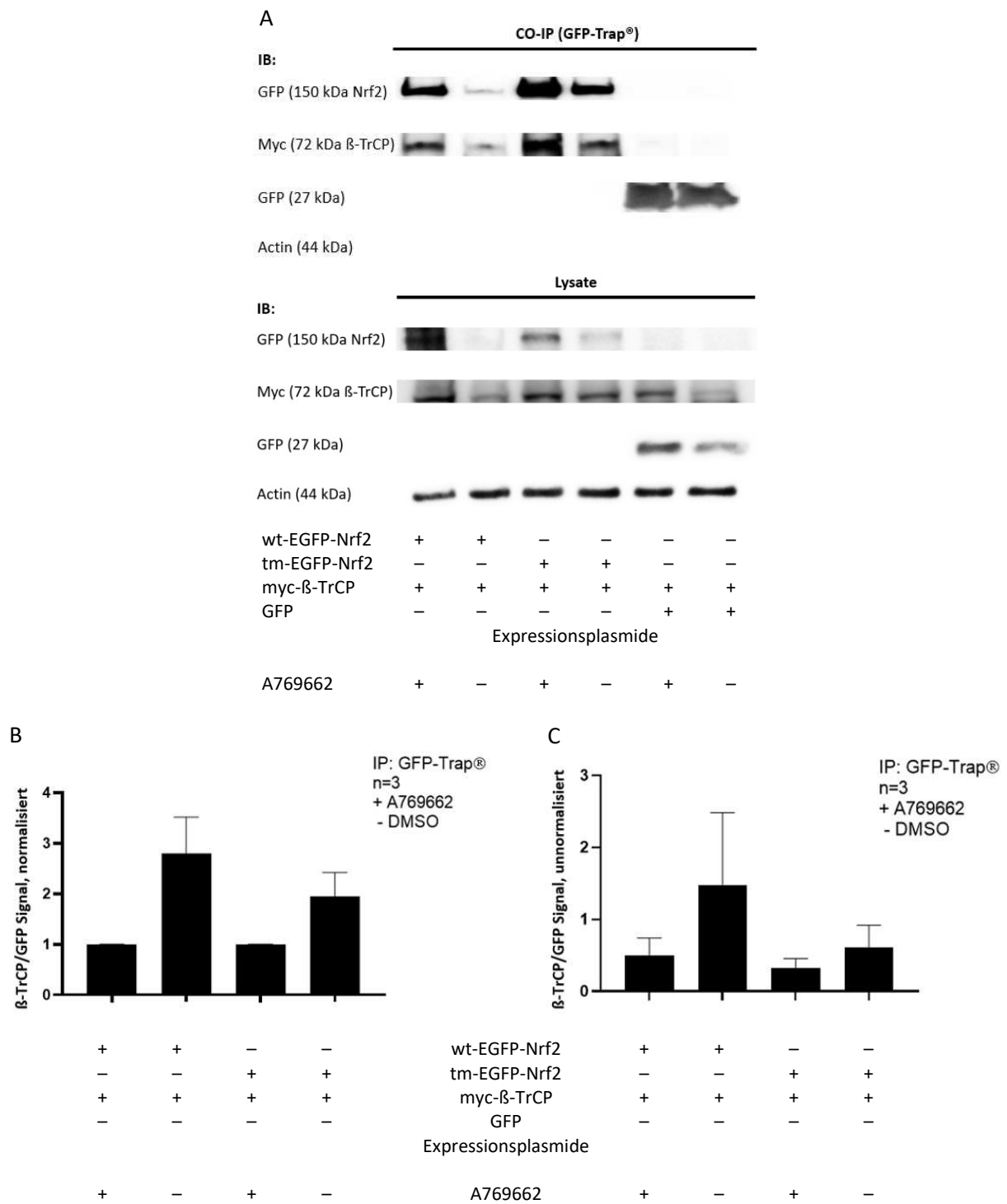


Abb. 11. (A) Repräsentativer Western Blot zur Co-IP von wt-/tm-EGFP-Nrf2 mit myc-β-TrCP und Lysate zur Inputkontrolle (B) Auf wt-EGFP-Nrf2 (+) beziehungsweise tm-EGFP-Nrf2 (+) normalisierte und (C) unnormalisierte densitometrische Auswertung von 3 Replikaten (n=3)

3.4 PGAM1, KRT16 und KRT17 sind Interaktionspartner von Nrf2

Um eine Interaktion von Nrf2 mit PGAM1, KRT16 oder KRT17 in einer lebenden Zelle zu untersuchen, wurde die Co-Elution von überexprimierten wt-EGFP-Nrf2 mit myc-PGAM1/-KRT16/-KRT17 geprüft. Die Zellen wurden, wie in Abb. 12A und 13A gezeigt, mit Plasmiden transfiziert, lysiert und die Zelllysate wurden für die Co-IP mittels GFP-Trap® verwendet. Myc-PGAM1, -KRT16 und -KRT17 wurden zuerst mit monoklonalen Antikörpern gegen die jeweiligen Proteine detektiert, wegen unzureichender Signalqualität wurden diese Proteine später ebenfalls mit Antikörpern gegen myc detektiert, welches zu besseren Signalen führten.

Wie in Abbildung Abb. 12A und 13A zu sehen ist kommt es bei der Verwendung vom GFP-Trap® zu einer Co-Elution von transfiziertem myc-PGAM1/myc-KRT16/myc-KRT17 mit wt-EGFP-Nrf2. Die Co-Elution von transfiziertem myc-PGAM1/myc-KRT16/myc-KRT17 ist mit GFP nicht zu erkennen, was auf eine spezifische Interaktion von Nrf2 mit PGAM1/KRT16/KRT17 deutet. Die densitometrische Auswertung der Western Blots ist in Abb. 14 abgebildet.

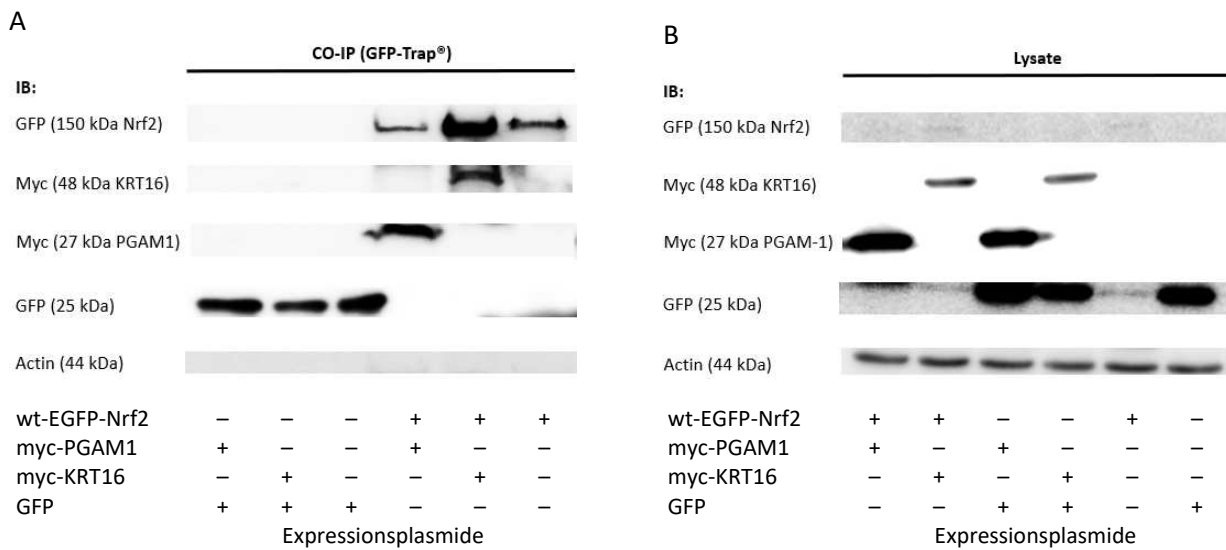


Abb. 12. (A) Repräsentativer Western Blot zur Co-IP von wt-EGFP-Nrf2 und myc-PGAM1, wt-EGFP-Nrf2 und myc-KRT16 sowie (B) Lysate zur Inputkontrolle

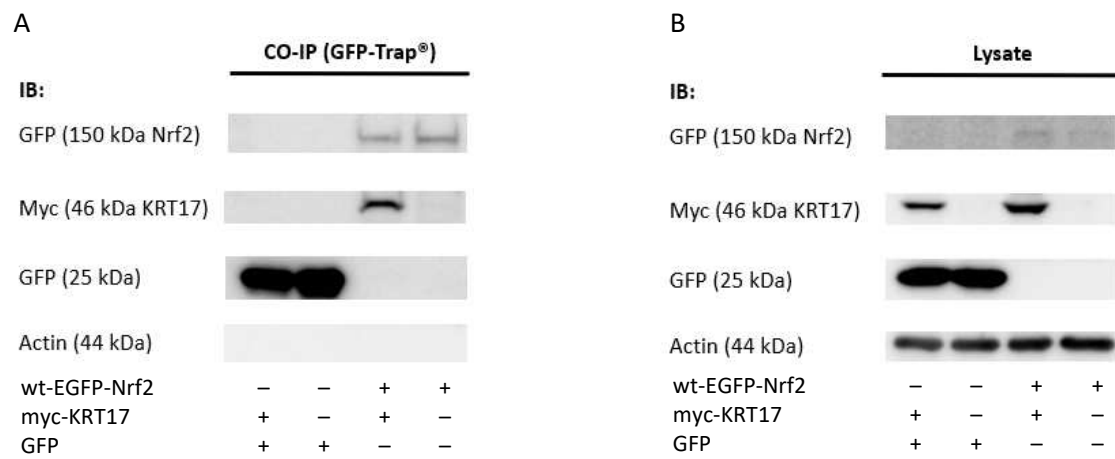


Abb. 13. (A) Repräsentativer Western Blot zur Co-IP von wt-EGFP-Nrf2 und myc-KRT17 sowie (B) Lysate zur Inputkontrolle

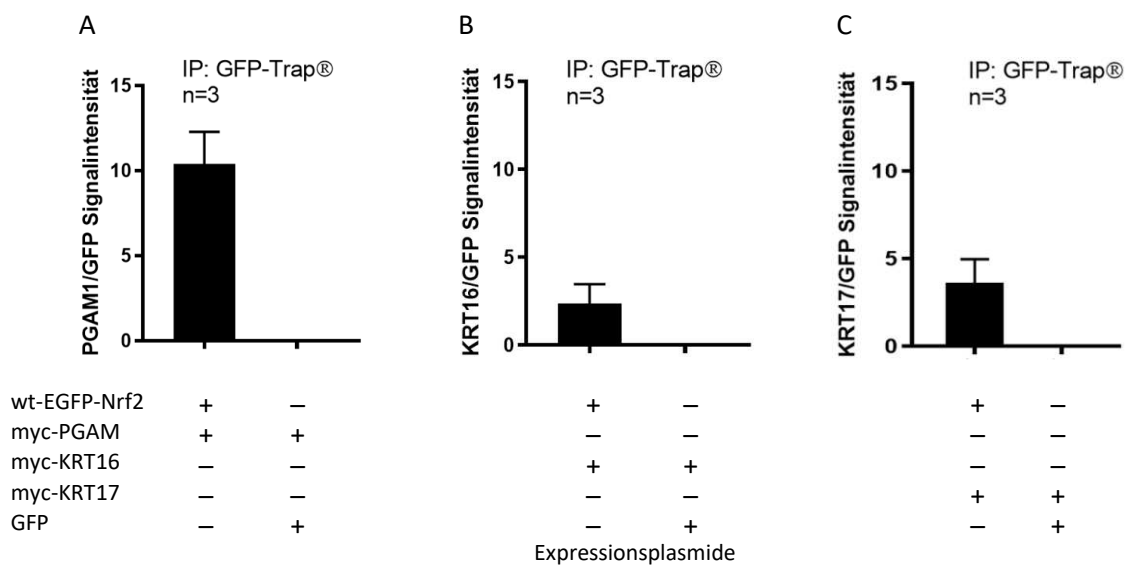


Abb. 14. Densitometrische Auswertung von 3 Replikaten ($n=3$) der Co-IP von wt-EGFP-Nrf2 mit (A) myc-PGAM1 (B) myc-KRT16 (C) myc-KRT17

4. Diskussion

4.1 Vor- und Nachteile der durchgeführten Co-IPs

Die durchgeführten Co-IPs mit Lysaten aus transfizierten Zellen haben gewisse Vorteile gegenüber Experimenten, die an endogenen Proteinen durchgeführt werden. Die Transfektion von Zellen mit Fusionsproteinen führt zu einer höheren Proteinexpression, zur verbesserten Detektion mit selektiven Tag-bindenden Antikörpern, die Möglichkeit zur hochspezifischen Co-IP mittels GFP[®]-Trap und zur einfachen Kontrolle der Transfektion durch Fluoreszenzmikroskopie. Jedoch zieht die Transfektion von Fusionsproteinen gewisse Nachteile mit sich; Unnatürlich hohe Expressionsraten von Proteinen könnten konzentrationsabhängige unerwünschte Interaktionen zur Folge haben, wodurch Ergebnisse nur mit Vorsicht auf endogene Proteine übertragen werden können. Studien wiesen ebenfalls auf eine erhöhte Halbwertszeit von GFP getagten Proteinen hin^{51,52}, weshalb die Ergebnisse von wt- und tm-EGFP-Nrf2-β-TrCP Interaktionsexperimenten und die Schlussfolgerung der β-TrCP abhängigen Stabilität von wt- und tm-EGFP-Nrf2 für endogenes Nrf2 angezweifelt werden könnten. Da sowohl wt- als auch tm-Nrf2 GFP getagt waren, hebt sich die GFP-abhängige Verlängerung der Halbwertszeit wahrscheinlich gegenseitig auf und erlaubt trotzdem einen guten relativen Interaktionsvergleich zwischen β-TrCP und wt- bzw. tm-Nrf2.

Ebenfalls zeigte die Verwendung vom myc-Trap[®] bei komplementären Co-IPs (nicht gezeigte Ergebnisse) mit myc-PGAM/-KRT16/-KRT17 und wt-Flag-Nrf2 die Notwendigkeit zur weiteren Optimierung, da wt-Flag-Nrf2 ohne Transfektion mit den oben genannten myc-getagten Proteinen ebenfalls zur Co-Elution mit dem myc-Trap[®] führte. Eine Erklärung dafür wäre die Bindung der myc-Trap[®] an endogenes Myc, welches an seinen bekannten Bindungspartner Nrf2⁵³ bindet.

4.2 Verbesserungsmöglichkeiten künftiger Experimente

Da die Interaktion von wt- bzw. tm-EGFP-Nrf2 bei AMPK-Aktivierung mit β-TrCP etwa gleich stark war, deutet dies auf den geringen Einfluss von den identifizierten AMPK-abhängigen Phosphorylierungsstellen nahe der Neh6 Domäne auf die Nrf2-β-TrCP-Interaktion hin. Die Ergebnisse der Experimente unterstützen den aktuellen Stand der Wissenschaft^{25,26}, dass β-TrCP spezifisch an ihre zwei Zielsequenzen auf der Neh6 Domäne von Nrf2 bindet und damit sterisch nicht von den naheliegenden Phosphorylierungsstellen behindert wird. Die Experimente lieferten aber zusätzlich die Erkenntnis, dass tm-EGFP-Nrf2, im Gegensatz zu wt-EGFP-Nrf2, einen verringerten Unterschied in der Interaktion mit β-TrCP bei AMPK-Aktivierung und Kontrolle zeigte. Möglicherweise bewirken die mutierten Aminosäuren von tm-EGFP-Nrf2 eine Konformationsänderung des Proteins, wodurch die Interaktion mit β-TrCP verändert wird. Zur Sicherstellung der erfolgreichen AMPK-Aktivierung wurde die Intensität der Phospho-Acetyl-CoA-Carboxylase (pAcc, Acc wird durch AMPK phosphoryliert) Bande von AMPK-Aktivator behandelten und unbehandelten Zellen verglichen. Wegen Blotting Problemen waren aber die pAcc und Nrf2 Banden in Blots von Lysaten schlecht sichtbar. Weiterführende

Experimente müssten daher angesetzt werden, um die Ergebnisse zu unterstützen, sowie um Hinweise auf den Grund der erhöhten Stabilität von tm-EGFP-Nrf2 zu geben (möglicherweise oxidativer-/xenobiotikaabhängiger Einfluss auf die Nrf2- β -TrCP-Interaktion).

Da die Zellsate der Co-Transfektion mit PGAM1/KRT16/KRT17 und Nrf2 nur wenig Nrf2 enthielten, ist der absolute fold change vom Interaktionspartner von Nrf2 bei der Co-IP fraglich. Grundsätzlich kann man festhalten, dass PGAM1, KRT16 und KRT17 vielversprechender Resultate zur Interaktion mit Nrf2 gezeigt haben und daher eine weiterführende Erforschung dieser Interaktionen sinngemäß wäre. Die Verwendung von einem größeren Ansatz mit mehr Zellen für die Co-IP wäre eine Möglichkeit der Verbesserung von künftigen Experimenten, damit eine mangelnde Nrf2 Expression vermieden werden kann. Des Weiteren könnte die Inkubationszeit der Zellen mit MG132 erhöht, die Transfektion durch Lipofectamin verbessert, oder eine stabil wt-EGFP-Nrf2 transfizierte Zelllinie etabliert werden, um eine ausreichende Nrf2-Expression sicherzustellen.

Die Transfektionskontrolle über Fluoreszenzmikroskopie bedarf ebenfalls Verbesserung, z.B. durch die Verwendung unterschiedlicher Tags bei Co-Transfektionen (EGFP und red fluorescent Protein-RFP), die Anwendung von einem fluorescence-activated cell sorting (FACS) Gerät, um nur doppelt transfizierte Zellen zu selektieren und um die Transfektionsrate besser quantitativ abschätzen zu können. Der Gebrauch von stabil transfizierten Zellen wäre ebenfalls eine Möglichkeit der Sicherstellung einer vergleichbaren Proteinexpression. Diese Zellen hätten zwar keine Transfektionskontrollen nötig, könnten aber den Nachteil der Deregulation von Signalwegen aufweisen.

Alternativ zu den in der Diplomarbeit vorgestellten GFP-getaggten Proteinen wäre die Verwendung von kleineren Tags (Flag, HA) anzudenken, um GFP-abhängige Veränderungen im Proteinverhalten (Faltung, Lokalisation, Halbwertszeit etc.) zu umgehen. Die Co-IP endogener Proteine könnte man mit Lysaten untransfizierter Zellen durchführen, die allerdings die Nachteile der niedrigen Proteinkonzentration von Nrf2 und der wenig selektiven Nrf2-Antikörpern mit sich führen. Weitere Methoden zur Unterstützung der Ergebnisse zum Nrf2 Interaktom aus Co-IP-Experimenten wären beispielsweise die super-resolution microscopy, um eine Co-Lokalisation zweier Proteine mit unterschiedlichen Farbtags sichtbar zu machen, FRET basierte Technologien, der proximity ligation assay oder das Hefe-Zwei-Hybrid-Systems.

4.3 Fazit

Zellen sind biologische Systeme, daher sind Schwankungen in ihrer Proteinexpression und letztendlich bei den Ergebnissen der Co-IP nicht unüblich, nicht zuletzt auch bedingt durch die kleinen Unterschiede bei der experimentellen Durchführung. Dies zeigten die Resultate zahlreicher Experimente mit hoher Standardabweichung. Endgültige Wahrheiten können 3 Replikate wohl zwar niemals liefern, jedoch erlaubt ein verlässlich reproduzierbares Ergebnis eine erste Antwort auf die gestellte Frage des

Experiments. Somit konnten die laut Proteomics vermuteten Interaktionen von Nrf2 mit AMPK, PGAM1, KRT16 und KRT17 in Co-IPs von überexprimierten Proteinen bestätigt werden. Zusätzliche methodische Ansätze sollten eingesetzt werden, die die jeweilige Interaktion untermauern und nachweisen, wie (z.B. direkt oder indirekt; zelluläre Lokalisation) die molekulare Interaktion von Nrf2 mit ihrem Interaktionspartner zustande kommt.

5. Anhang

5.1 Literaturverzeichnis

1. Baird, L. & Dinkova-Kostova, A. T. The cytoprotective role of the Keap1–Nrf2 pathway. *Arch. Toxicol.* **85**, 241–272 (2011).
2. Wang, X. J., Hayes, J. D., Henderson, C. J. & Wolf, C. R. Identification of retinoic acid as an inhibitor of transcription factor Nrf2 through activation of retinoic acid receptor alpha. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **104**, 19589–19594 (2007).
3. Matzinger, M., Fischhuber, K. & Heiss, E. H. Activation of Nrf2 signaling by natural products-can it alleviate diabetes? *Biotechnol. Adv.* **36**, 1738–1767 (2018).
4. Chorley, B. N. *et al.* Identification of novel NRF2-regulated genes by ChIP-Seq: influence on retinoid X receptor alpha. *Nucleic Acids Res.* **40**, 7416–7429 (2012).
5. Hu, R. *et al.* Gene expression profiles induced by cancer chemopreventive isothiocyanate sulforaphane in the liver of C57BL/6J mice and C57BL/6J/Nrf2 (–/–) mice. *Cancer Lett.* **243**, 170–192 (2006).
6. Hu, R. *et al.* Identification of Nrf2-regulated genes induced by chemopreventive isothiocyanate PEITC by oligonucleotide microarray. *Life Sci.* **79**, 1944–1955 (2006).
7. Kwak, M.-K. *et al.* Modulation of Gene Expression by Cancer Chemopreventive Dithiolethiones through the Keap1-Nrf2 Pathway: IDENTIFICATION OF NOVEL GENE CLUSTERS FOR CELL SURVIVAL. *J. Biol. Chem.* **278**, 8135–8145 (2003).
8. Malhotra, D. *et al.* Global mapping of binding sites for Nrf2 identifies novel targets in cell survival response through ChIP-Seq profiling and network analysis. *Nucleic Acids Res.* **38**, 5718–5734 (2010).
9. Thimmulappa, R. K. *et al.* Identification of Nrf2-regulated Genes Induced by the Chemopreventive Agent Sulforaphane by Oligonucleotide Microarray. *Cancer Res.* **62**, 5196 (2002).
10. Wu, K. C., Cui, J. Y. & Klaassen, C. D. Effect of Graded Nrf2 Activation on Phase-I and -II Drug Metabolizing Enzymes and Transporters in Mouse Liver. *PLOS ONE* **7**, e39006 (2012).
11. Tanaka, Y. *et al.* NF-E2-Related Factor 2 Inhibits Lipid Accumulation and Oxidative Stress in Mice Fed a High-Fat Diet. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **325**, 655 (2008).
12. DeNicola, G. M. *et al.* Oncogene-induced Nrf2 transcription promotes ROS detoxification and tumorigenesis. *Nature* **475**, 106–109 (2011).
13. Guo, Y., Yu, S., Zhang, C. & Kong, A.-N. T. Epigenetic regulation of Keap1-Nrf2 signaling. *Free Radic. Biol. Med.* **88**, 337–349 (2015).
14. Eades, G., Yang, M., Yao, Y., Zhang, Y. & Zhou, Q. miR-200a Regulates Nrf2 Activation by Targeting *Keap1* mRNA in Breast Cancer Cells. *J. Biol. Chem.* **286**, 40725–40733 (2011).

15. Bloom, D. A. & Jaiswal, A. K. Phosphorylation of Nrf2 at Ser⁴⁰ by Protein Kinase C in Response to Antioxidants Leads to the Release of Nrf2 from INrf2, but Is Not Required for Nrf2 Stabilization/Accumulation in the Nucleus and Transcriptional Activation of Antioxidant Response Element-mediated NAD(P)H:Quinone Oxidoreductase-1 Gene Expression. *J. Biol. Chem.* **278**, 44675–44682 (2003).
16. Joo, M. S. *et al.* AMPK Facilitates Nuclear Accumulation of Nrf2 by Phosphorylating at Serine 550. *Mol. Cell. Biol.* **36**, 1931–1942 (2016).
17. Jimenez-Blasco, D., Santofimia-Castaño, P., Gonzalez, A., Almeida, A. & Bolaños, J. P. Astrocyte NMDA receptors' activity sustains neuronal survival through a Cdk5–Nrf2 pathway. *Cell Death Differ.* **22**, 1877–1889 (2015).
18. Cullinan, S. B. *et al.* Nrf2 Is a Direct PERK Substrate and Effector of PERK-Dependent Cell Survival. *Mol. Cell. Biol.* **23**, 7198–7209 (2003).
19. Kulkarni, S. R. *et al.* Fasting Induces Nuclear Factor E2-Related Factor 2 and ATP-Binding Cassette Transporters *via* Protein Kinase A and Sirtuin-1 in Mouse and Human. *Antioxid. Redox Signal.* **20**, 15–30 (2014).
20. Yu, R. *et al.* Activation of Mitogen-activated Protein Kinase Pathways Induces Antioxidant Response Element-mediated Gene Expression via a Nrf2-dependent Mechanism. *J. Biol. Chem.* **275**, 39907–39913 (2000).
21. Salazar, M., Rojo, A. I., Velasco, D., de Sagarra, R. M. & Cuadrado, A. Glycogen Synthase Kinase-3 β Inhibits the Xenobiotic and Antioxidant Cell Response by Direct Phosphorylation and Nuclear Exclusion of the Transcription Factor Nrf2. *J. Biol. Chem.* **281**, 14841–14851 (2006).
22. Kobayashi, M. *et al.* The Antioxidant Defense System Keap1-Nrf2 Comprises a Multiple Sensing Mechanism for Responding to a Wide Range of Chemical Compounds. *Mol. Cell. Biol.* **29**, 493–502 (2009).
23. Chen, W. *et al.* Direct Interaction between Nrf2 and p21Cip1/WAF1 Upregulates the Nrf2-Mediated Antioxidant Response. *Mol. Cell* **34**, 663–673 (2009).
24. Kim, J.-H. *et al.* Identification and Functional Studies of a New Nrf2 Partner IQGAP1: A Critical Role in the Stability and Transactivation of Nrf2. *Antioxid. Redox Signal.* **19**, 89–101 (2013).
25. Rada, P. *et al.* Structural and Functional Characterization of Nrf2 Degradation by the Glycogen Synthase Kinase 3/ β -TrCP Axis. *Mol. Cell. Biol.* **32**, 3486–3499 (2012).
26. Cuadrado, A. Structural and functional characterization of Nrf2 degradation by glycogen synthase kinase 3/ β -TrCP. *Free Radic. Biol. Med.* **88**, 147–157 (2015).
27. Jeon, S.-M. Regulation and function of AMPK in physiology and diseases. *Exp. Mol. Med.* **48**, e245–e245 (2016).

28. Kurland, I. J. & Pilkis, S. J. Covalent control of 6-phosphofructo-2-kinase/fructose-2,6-bisphosphatase: Insights into autoregulation of a bifunctional enzyme. *Protein Sci.* **4**, 1023–1037 (1995).
29. Rhee, S. G. & Bae, S. H. The antioxidant function of sestrins is mediated by promotion of autophagic degradation of Keap1 and Nrf2 activation and by inhibition of mTORC1. *Nrf2 Regul. Redox Signal. Metab. Physiol. Med.* **88**, 205–211 (2015).
30. Zimmermann, K. *et al.* Activated AMPK boosts the Nrf2/HO-1 signaling axis—A role for the unfolded protein response. *Free Radic. Biol. Med.* **88**, 417–426 (2015).
31. Matzinger M. *et al.* Identification of AMPK-dependent phosphorylation sites in the transcription factor Nrf2 and their functional relevance in cells. *AMPK Mech. New Ther. - Niagara Lake* (2018).
32. Mullarky, E. *et al.* Identification of a small molecule inhibitor of 3-phosphoglycerate dehydrogenase to target serine biosynthesis in cancers. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **113**, 1778–1783 (2016).
33. Hitosugi, T. *et al.* Phosphoglycerate mutase 1 coordinates glycolysis and biosynthesis to promote tumor growth. *Cancer Cell* **22**, 585–600 (2012).
34. Ren, F. *et al.* Quantitative proteomics identification of phosphoglycerate mutase 1 as a novel therapeutic target in hepatocellular carcinoma. *17* (2010).
35. Lo, S.-C. & Hannink, M. PGAM5 tethers a ternary complex containing Keap1 and Nrf2 to mitochondria. *Exp. Cell Res.* **314**, 1789–1803 (2008).
36. Rosenberg, M., RayChaudhury, A., Shows, T. B., Le Beau, M. M. & Fuchs, E. A group of type I keratin genes on human chromosome 17: characterization and expression. *Mol. Cell. Biol.* **8**, 722–736 (1988).
37. McGowan, K. M. & Coulombe, P. A. Keratin 17 Expression in the Hard Epithelial Context of the Hair and Nail, and its Relevance for the Pachyonychia Congenita Phenotype. *J. Invest. Dermatol.* **114**, 1101–1107 (2000).
38. Keratin, type I cytoskeletal 17, UniProtKB - Q04695 (K1C17_HUMAN). *uniprot.org* (2019). Available at: uniprot.org/uniprot/Q04695.
39. pureyield-plasmid-midiprep-system-protocol.pdf. PureYield™ Plasmid Midiprep System. (2019).
40. Lehmann, C. Untersuchungen zum Aufnahmemechanismus und intrazellulärem Transport von fusogenen und kationischen Liposomen-DNA-Komplexen für den Gentransfer. 130
41. Bradford, M. M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* **72**, 248–254 (1976).
42. Compton, S. J. & Jones, C. G. Mechanism of dye response and interference in the Bradford protein assay. *Anal. Biochem.* **151**, 369–374 (1985).

43. Phizicky, E. M. & Fields, S. Protein-protein interactions: methods for detection and analysis. *Microbiol. Rev.* **59**, 94–123 (1995).
44. GFP-Trap. *chromotek.com* (2019). Available at: chromotek.com/products/detail/product-detail/gfp-trap/.
45. magnetic rack. *bio-rad.com* (2019). Available at: bio-rad.com/de-at/sku/1614811-surebeads-trial-kit-protein?ID=1614811.
46. Brunelle, J. L. & Green, R. One-dimensional SDS-Polyacrylamide Gel Electrophoresis (1D SDS-PAGE). in *Methods in Enzymology* **541**, 151–159 (Elsevier, 2014).
47. Nick Oswald. How SDS-PAGE Works. *bitesizebio.com* (2019).
48. Lottspeich, F. und J.W. Engels. Bioanalytik. in (Elsevier GmbH Spektrum Akademischer Verlag, 2006).
49. Schematischer Aufbau einer Western Blot. *wikipedia.com* (2019). Available at: de.wikipedia.org/wiki/Western_Blot#/media/Datei:Western_Blot_-_Aufbau.svg.
50. Enhanced Chemiluminescent (ECL) Detection Kit (Mouse IgM). *boosterbio.com* (2019). Available at: boosterbio.com/enhanced-chemiluminescent-reagent-kit-mouse-igm-for-western-blotting-ek1005-boster.html.
51. Baens, M. *et al.* The Dark Side of EGFP: Defective Polyubiquitination. *PLoS ONE* **1**, (2006).
52. Khmelinskii, A. *et al.* Incomplete proteasomal degradation of green fluorescent proteins in the context of tandem fluorescent protein timers. *Mol. Biol. Cell* **27**, 360–370 (2016).
53. Stark, C. *et al.* The BioGRID Interaction Database: 2011 update. *Nucleic Acids Res.* **39**, D698–D704 (2011).

5.2 Abkürzungsverzeichnis

A

AhR	Aryl-Hydrocarbon-Rezeptor
AK	Antikörper
Akt	Proteinkinase B
Ala	Alanin
AMP	Adenosinmonophosphat
AMPK	AMP-aktivierte Kinase
APS	Ammoniumperoxidsulfat
ARE	antioxidant response element
ATCC	American Type Culture Collection
ATP	Adenosintriphosphat

B

BSA	bovines Serum Albumin
bZip	Basic Leucine Zipper Domäne

C

c	Konzentration
CBP	CREB-Binding Protein
CDH6	Chromodomain-Helicase-DNA-Binding Protein 6
CDK	Cyclin abhängige Kinase
cmv	Cytomegalovirus
Co-IP	Co-Immunopräzipitation
CUL3	Cullin-3

D

ddH ₂ O	bidestilliertes Wasser
DM	Diabetes Mellitus

DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonucleinsäure

E

ECL	Enhanced chemoluminescence
ERK	Extracellular-signal regulated kinase

G

g	Erdbeschleunigung
GFP	grün fluoreszierendes Protein
GSK	Glycogen Synthase Kinase
GSK3 β	Glykogensynthase-Kinase 3 β
GST	Gluthation-S-Transferase

H

HBS	HEPES gepufferte Salzlösung
HEK	Humane embryonale Nierenzellen
HEPES	2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl)-ethansulfonsäure
HMOX-1	Häm-Oxygenase 1
HRP	Meerrettich-Peroxidase

I

IB	Immunoblot
----	------------

J

JNK	Jun-N-terminale Kinase
-----	------------------------

K

Keap1 Kelch-like ECH-associated protein 1
 KRT16 Keratin 16
 KRT17 Keratin 17
 kb Kilobase

L

LB Lysogeny broth

M

MAPK Mitogen aktivierte Kinase
 miRNA micro Ribonukleinsäure
 MS Multiple Sklerose
 mTOR mammalian target of rapamycin

N

Neh Nrf2-ECH homology
 nf H₂O Nuklease-freies Wasser
 Nrf2 Nuclear factor erythroid 2-related factor 2

P

p62 Sequestosom 1
 PAA Polyacrylamid
 pAcc Phospho-Acetyl-CoA-Carboxylase
 PAGE Polyacrylamidgelelektrophorese
 PBS Phosphat gepufferte Salzlösung
 PGAM1 Phosphoglycerat Mutase 1
 PGAM5 Phosphoglycerat Mutase 5
 PI3K Phosphoinositid-3-Kinase

PKA Proteinkinase A
 PKC Proteinkinase C
 PMSF Phenylmethylsulfonylfluorid
 pPI physiologische Pufferlösung
 PVDF Polyvinylidenfluorid

R

Rbx1 Ring-Box-Protein
 RIPA Radio immuno precipitation assay
 RT Raumtemperatur
 RXR Retinoid-X-Rezeptor

S

SDS Natriumdodecylsulfat
 Ser Serin
 SFN Stratifin
 sMaf small musculoaponeurotic fibrosarcoma Protein
 SOC Super optimal broth

T

β-TrCP Beta-Transducin Repeat Containing E3 Ubiquitin Protein Ligase
 TAE TRIS-Acetat-EDTA-Puffer
 TEMED Tetramethylethyldiamin
 Th-Zelle T-helfer Zeller
 Thr Threonin
 tm triplemutiert
 TNF-α Tumornekrosefaktor α
 Tris Trometamol

U

U/min Umdrehungen pro Minute

UGT UDP-Glucurnosyl-Transferase

W

wt wildtyp