

**Aus dem Lehrstuhl für Biochemie und molekulare Biologie  
der Universität Würzburg**

**Vorstand: Professor Dr. Martin Eilers**

**USP 10 als Deubiquitinase für  $\beta$ -Catenin**

**Inauguraldissertation**

**zur Erlangung der Doktorwürde der**

**Medizinischen Fakultät**

**der**

**Julius-Maximilians-Universität Würzburg**

**vorgelegt von**

**Gabriel Christmann**

**aus Tübingen**

**Würzburg, August 2021**

## **Referentenblatt**

**Referent:** Prof. Dr. Alexander Buchberger  
**Korreferent bzw. Korreferentin:** Prof. Dr. Armin Wiegering  
**Dekan:** Prof. Dr. Matthias Frosch

**Tag der mündlichen Prüfung:** 25.04.2022

**Der Promovend ist Arzt.**

# Inhalt

<b>1</b>	<b>EINLEITUNG.....</b>	<b>1</b>
1.1	KOLOREKTALE TUMOREN .....	1
1.1.1	<i>Allgemeines.....</i>	<i>1</i>
1.1.2	<i>Adenom-Karzinom-Sequenz.....</i>	<i>1</i>
1.2	DER WNT-SIGNALWEG IN DARMKRYPTEN .....	3
1.3	DER KANONISCHE WNT-SIGNALWEG UND B-CATENIN .....	4
1.4	FAMILIÄRE ADENOMATÖSE POLYPOSIS UND APC .....	7
1.5	UBIQUITIN-PROTEASOM SYSTEM .....	9
1.6	B-CATENIN ABBAU JENSEITS DES <i>DESTRUCTION COMPLEX</i> .....	12
1.7	DEUBIQUITINASEN.....	13
1.8	DEUBIQUITINASEN IM KANONISCHEN WNT-SIGNALWEG.....	13
1.8.1	<i>Weitere im WNT-Signalweg aktive Deubiquitinasen.....</i>	<i>17</i>
1.9	CRISPR/Cas9.....	17
1.10	ZIELSETZUNG .....	20
<b>2</b>	<b>MATERIAL .....</b>	<b>21</b>
2.1	VEKTOREN .....	21
2.2	ANTIKÖRPER.....	22
2.3	PRIMER.....	23
2.4	ENZYME .....	24
2.5	KITS.....	24
2.6	CHEMIKALIEN.....	24
2.7	LÖSUNGEN.....	27
2.8	NÄHRMEDIEN .....	29
2.9	ZELLINIEN .....	29
2.10	BAKTERIENSTRÄNGE .....	30
2.11	TECHNISCHE GERÄTE .....	30
2.12	SOFTWARE.....	31
<b>3</b>	<b>METHODEN .....</b>	<b>32</b>
3.1	ZELLKULTUR .....	32

3.1.1	<i>Splitten von Zellen</i> .....	32
3.1.2	<i>Einfrieren und Auftauen von Zelllinien</i> .....	32
3.2	HERSTELLEN GENVERÄNDERTER ZELLINIEN .....	33
3.2.1	<i>Klonieren der V2 Plasmide</i> .....	33
3.2.2	<i>Colony PCR</i> .....	35
3.2.3	<i>Virus Produktion</i> .....	36
3.2.4	<i>Infektion</i> .....	37
3.2.5	<i>Selektion</i> .....	37
3.3	BIOCHEMISCHE NACHWEISMETHODEN .....	38
3.3.1	<i>Western Blot</i> .....	38
3.4	INHIBITION DES UBIQUITIN-PROTEASOM SYSTEMS MITTELS MG132 .....	39
3.5	CO-IMMUNOPRÄZIPITATION .....	40
3.6	IMMUNOFLUORESZENZ .....	40
3.7	PCR AUF GENOMISCHE DNA .....	41
3.7.1	<i>Vorbereitung der Proben</i> .....	41
3.8	NACHWEISMETHODEN DES WNT-SIGNALWEGS .....	41
3.8.1	<i>Luciferase Assay</i> .....	41
3.8.2	<i>GFP Bestimmung mittels Durchflusszytometrie (FACS)</i> .....	42
3.8.3	<i>Lithiumchlorid zur experimentellen WNT-Signalwegaktivierung</i> .....	43
3.9	WACHSTUMSASSAY DER HT29 ZELLEN ( <i>USP10 KNOCKOUT</i> ).....	43
3.10	HISTOLOGISCHE FÄRBUNGEN .....	43
3.10.1	<i>Rehydradation der TMAs</i> .....	43
3.10.2	<i>Freilegen der Epitope</i> .....	43
3.10.3	<i>Blocken und Färben der TMAs</i> .....	44
<b>4</b>	<b>ERGEBNISSE</b> .....	<b>46</b>
4.1	VORARBEITEN .....	46
4.2	CRISPR/Cas9 AUF DEUBIQUITINASEN .....	47
4.3	USP10 IN KREBSERKRANKUNGEN.....	50
4.4	HISTOLOGISCHE FÄRBUNGEN .....	53
4.4.1	<i>DAB-Färbung von TMAs</i> .....	53
4.4.2	<i>Immunofluoreszenz in APC<sup>min/+</sup> Mäusen</i> .....	54
4.5	USP10 IN HEK293T ZELLEN .....	56

4.5.1	<i>Proteinstabilität</i> .....	58
4.5.2	<i>WNT-Signalwegaktivität</i> .....	60
4.6	USP10 IN HT29 ZELLEN .....	62
<b>5</b>	<b>DISKUSSION</b> .....	<b>66</b>
5.1	DER WNT-SIGNALWEG ALS ESSENZIELLER BESTANDTEIL VON TUMORWACHSTUM.....	66
5.2	DEUBIQUITYLIERUNG VON B-CATENIN ALS ZIEL.....	67
5.3	USP10 IN TUMORZELLEN .....	68
5.4	INHIBITOREN .....	72
5.5	LIMITATIONEN.....	73
5.6	AUSBLICK.....	74
<b>6</b>	<b>ZUSAMMENFASSUNG</b> .....	<b>75</b>
<b>7</b>	<b>LITERATURVERZEICHNIS</b> .....	<b>76</b>

# 1 Einleitung

## 1.1 Kolorektale Tumoren

### 1.1.1 Allgemeines

Kolorektale Krebserkrankungen sind weltweit die dritthäufigsten Krebserkrankungen mit einer Inzidenz von 10,2 %. Mit einer Mortalität von 9,2 % stellen sie die zweithäufigste Krebsart an der Patienten versterben dar [1]. Die Einteilung von kolorektalen Karzinomen (KRK) erfolgt in sporadische, familiär auftretende und erbliche Krebserkrankungen. Hierbei machen die sporadischen Fälle mit 60-80 % den größten Anteil aus, die erblichen den kleinsten. Es werden zwei verschiedene Arten von erblichen Darmkrebssyndromen unterschieden: die familiäre adenomatöse Polyposis (FAP) und die erbliche nicht-polypöse kolorektale Krebserkrankung (*hereditary non-polyposis colorectal cancer*, HNPCC). Die FAP ist das seltenere der beiden Syndrome. Hier bilden sich bereits in jungen Jahren zahlreiche Polypen im Kolon, von denen mit der Zeit einer oder mehrere in ein Karzinom transformieren [2]. Die Frequenz des Auftretens von Mutationen des *APC* (*adenomatous polyposis coli*)-Gens, welche für die Krankheit verantwortlich sind, beträgt 1-3:10.000 Geburten, wobei zwischen 10-30 % spontane Fälle ohne familiäre Vorbelastung vorkommen [3]. Es gibt unterschiedliche Ausprägungen des Syndroms, bei der klassischen Form entwickeln 100 % der Patienten ein KRK [4]. Daher wird bei molekulargenetisch bestätigter FAP eine totale Kolektomie zur Entfernung der Mukosa und Verhinderung der Entstehung eines Karzinoms empfohlen. Auch nach der Kolektomie besteht ein erhöhtes Risiko für Krebserkrankungen, sowohl des Verdauungstraktes als auch extraintestinalen Gewebe [4, 5].

### 1.1.2 Adenom-Karzinom-Sequenz

Kolorektale Adenokarzinome entstehen aus den Stammzellen der Epithelzellen in den Krypten [6]. Größtenteils entwickeln sich Kolonkarzinome via der Adenom-Karzinom-Sequenz: Durch Beobachtungen konnte festgestellt werden, dass fast alle Karzinome auf dem Boden von Adenomen entstehen. Die Sequenz beschreibt die Akkumulation mehrerer genetischer *hits*, dies sind Mutationen in entscheidenden Genen. So wird dadurch etwa die physiologische Aktivität von Tumorsuppressorgenen wie *APC* und

Tumorsuppressor Protein 53 (*TP53*) herabreguliert, oder die Aktivität des Wachstumsfaktors KRAS (*Kirsten rat sarcoma*) erhöht. Ein Beispiel für eine solche Mutation ist *KRASG12D*. Das intrazelluläre Signaltransmitterprotein KRAS wird durch (kontrollierte) Bindung von Guanosintriphosphat (GTP) aktiviert. Die physiologische Inaktivierung findet durch (wiederum kontrollierte) Spaltung des GTPs zu Guanosindiphosphat (GDP) durch die intrinsische GTPase Aktivität von KRAS statt. Durch Punktmutationen kommt es hier zum Austausch von Glycin zu Aspartat, was die intrinsische GTPase Funktion von KRAS stört und so zu einer dauerhaften Anhäufung von GTP gebundenem KRAS und der Aktivierung der intrazellulären Signalwege (vor allem des MAPK (*mitogen activated protein kinase*)-Signalwegs) führt [7, 8]. Hierdurch entsteht ein von physiologischen Kontrollmechanismen entkoppeltes, hyperproliferierendes Gewebe (Polyp). Durch Akkumulation weiterer genetischer Veränderungen wird die Invasivität des Tumorgewebes gesteigert, was in die Entwicklung eines Adenokarzinoms münden kann [2, 9, 10] (Abbildung 1).

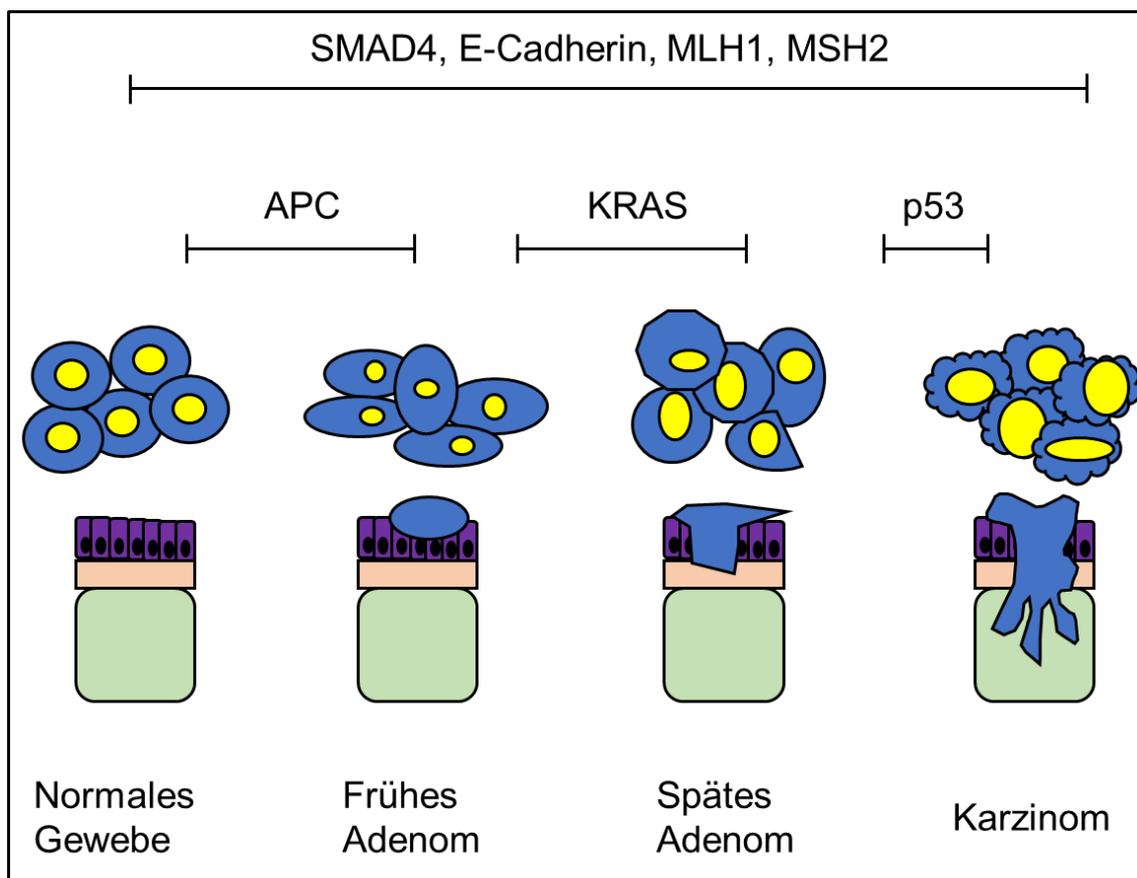


Abbildung 1: Schematische Darstellung der Adenom-Karzinom-Sequenz von KKR mit typischen Mutationsakkumulationen, modifiziert nach [7]

Aufgrund der langen Zeitspanne zwischen Entwicklung eines Karzinoms aus einem Adenom, sowie interventioneller Möglichkeiten durch wenig invasive Abtragung von Polypen und Adenomen bei Koloskopien gibt es seit 2002 Darmkrebsvorsorgeempfehlungen zu einer Koloskopie alle 10 Jahre ab dem 55. Lebensjahr in Deutschland. Bei pathologischen Befunden verkleinert sich dieses Zeitintervall [5]. Diese Vorsorgeuntersuchungen werden Studien zufolge von etwas mehr als der Hälfte der berechtigten Personen in Anspruch genommen. Von 2003 bis 2017 zeigte sich ein Rückgang der altersstandardisierten Neuerkrankungsrate von Darmkrebs um ca. 18 % bei Frauen, beziehungsweise 16 % bei Männern [11].

## 1.2 Der WNT-Signalweg in Darmkrypten

Um den Entstehungsprozess von KRK näher zu erläutern, wird in diesem Abschnitt auf die Proliferation von Zellen in den Dickdarmkrypten und die Rolle des WNT (zusammengesetzt aus *Wingless* und *Int1*) -Signalwegs in diesem Vorgang eingegangen. Die Epithelzellen des Darms gehören mit etwa 4-5 Tagen Überlebensdauer zu den kurzlebigen Zellen des menschlichen Körpers [12]. Die Zellen werden kontinuierlich durch Stammzellen in den Darmkrypten erneuert. Diese Stammzellen besitzen eine aktive Fraktion ( $LGR5^+$  (*leucine rich repeat containing G protein-coupled receptor 5*)) und eine Reservefraktion ( $BMI1^+$  (*B lymphoma Mo-MLV insertion region 1 homolog*)). Während die  $LGR5^+$  Zellen mitotisch aktiv sind und auf Veränderungen der Signalstärke des WNT-Signalwegs reagieren, sind die  $BMI1^+$  Zellen quieszent und reagieren nicht auf Veränderungen des Signalwegs. Es wurde gezeigt, dass diese quieszenten Stammzellen sehr resistent gegen Strahlenschäden sind und nach solchen die Krypten repopulieren können [13]. Aus den  $LGR5^+$  Stammzellen entstehen durch Teilung *transient amplifying* (sich vorübergehend vermehrende) Vorgängerzellen der Epithelzellen, welche sich im mittleren Bereich der Krypte 4-5 mal teilen und dann zu reifen postmitotischen Epithelzellen werden [12]. Diese funktionellen Zellen steigen in der Krypte in Richtung Darmlumen auf, wo sie dann nach einer gewissen Zeit apoptotisch werden und abgeschilfert werden. Die Proliferation und Migration der Zellen in den Krypten ist durch verschiedene extra- und intrazelluläre Signalwege kontrolliert. Beschrieben sind hier vor allem der kanonische WNT-Signalweg, der MAPK (*mitogen-activated protein kinase*) Signalweg, NOTCH und BMP(*bone morphogenetic protein*)/SMAD (*small Mothers*

*Against Decapentaplegic Homolog 4*) [6]. Die zentrale Rolle des WNT-Signalwegs zeigt sich hier vor allem bei Dysregulationen, hervorgerufen durch Mutationen in Schlüsselgenen. Während sich im physiologischen Zustand die proliferierende Fraktion der Stammzellen und *transient-amplifying* Zellen unter Einfluss der hohen Konzentration von WNT-Liganden am Kryptenboden vermehrt, ist bei reifen Epithelzellen aufgrund der niedrigeren Konzentration von WNT-Liganden der Signalweg Richtung Darmlumen weniger aktiviert und die Proliferation gestoppt (Abbildung 2a). Wird die Aktivierung des kanonischen WNT-Signalwegs, zum Beispiel durch eine Mutation im *APC*-Gen der Kontrolle der WNT-Liganden entzogen, so werden die Zellen nicht quieszent und vermehren sich auch außerhalb des Kryptenbodens. Es bilden sich Polypen, die ins Darmlumen ragen und dort kanzerogenen Einflüssen ausgesetzt sind. Durch die Adenom-Karzinom-Sequenz können Karzinome entstehen (Abbildung 2 b-e). Auf die Rolle des WNT-Signalwegs wird im folgenden Abschnitt näher eingegangen.

### **1.3 Der kanonische WNT-Signalweg und $\beta$ -Catenin**

Der WNT-Signalweg ist ein evolutionär hoch konservierter inter- und intrazellulärer Signalweg, welcher eine Rolle in der Entwicklung und Erhaltung des Organismus und bei der Entstehung vieler Tumoren spielt. Der WNT-Signalweg wird durch in den Darmkrypten sekretierten WNT-Liganden wie WNT3a aktiviert. Lokalisationsabhängige Konzentrationsunterschiede von WNT3a lassen die Kontrolle der Signalwegaktivierung innerhalb der Krypte zu. So erfahren reife Epithelzellen, die sich weiter luminal in der Krypte befinden, wenig Aktivierung des WNT-Signalwegs, da hier aufgrund des bestehenden Gradienten die Konzentration der Liganden niedriger ist. In diesem Abschnitt soll vor allem der intrazelluläre Teil dieses Signalwegs dargestellt werden (Abbildung 3). Die Aktivierung des Signalwegs wird ausgelöst durch Bindung eines der Signalproteine der WNT-Gruppe am Rezeptor FZD (*frizzled class receptor*) und Co-Rezeptor LRP (*LDL receptor related protein*). Durch die Bindung wird der Rezeptor aktiviert und nachfolgend der *destruction complex* von  $\beta$ -Catenin aufgelöst. Dadurch wird freies  $\beta$ -Catenin auf Proteinebene stabilisiert und kann sich ansammeln. Es transloziert in den Zellkern und aktiviert dort über Bindung der Transkriptionsfaktoren TCF4 (*transcription factor 4*)/LEF1 (*lymphoid enhancer binding factor 1*) die Transkription von WNT-Zielgenen [14] (Abbildung 3c). Im nicht aktivierten Zustand des Signalwegs wird

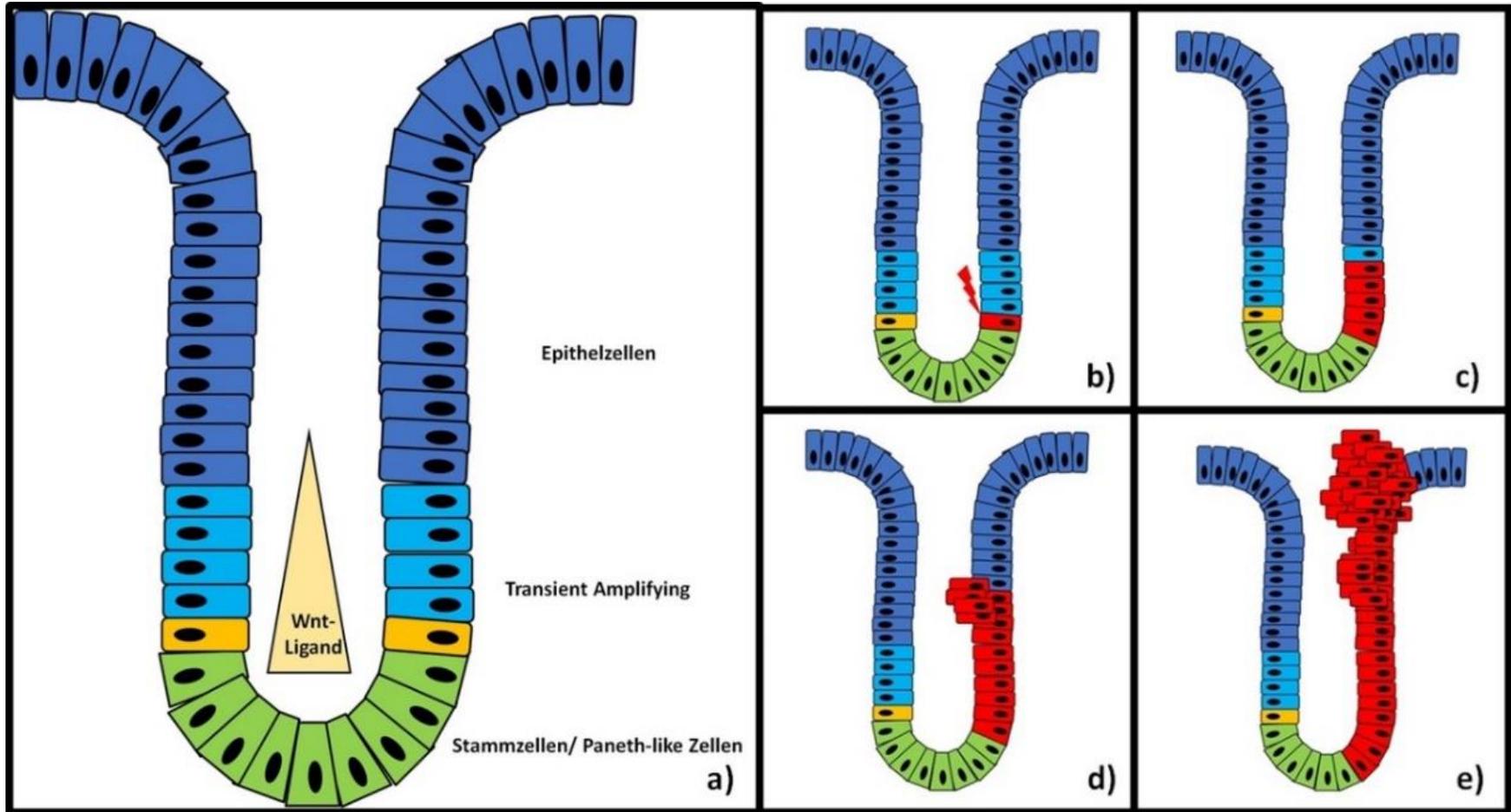


Abbildung 2: Schematische Darstellung der Rolle des WNT-Signalwegs bei der Proliferation in Dickdarmkrypten

$\beta$ -Catenin durch den *destruction complex* abgebaut: Der *destruction complex* besteht aus dem *scaffolding protein* (ein Protein, das durch Bindung verschiedener anderer Proteine räumliche Nähe zwischen diesen herstellt) AXIN (*Axis inhibition protein*), welches das Protein APC und die konstitutiv aktiven Serin-Threonin Kinasen CK1 $\alpha/\delta$  (*casein kinase I*) und GSK3 $\alpha/\beta$  (*glykogen synthase kinase 3*) in räumliche Nähe zueinander bringt. APC bindet das intrazelluläre Schlüsselprotein dieses Signalwegs:  $\beta$ -Catenin. Im nicht aktivierten Zustand des Signalwegs wird  $\beta$ -Catenin von CK1 an einem Serin- und von GSK3 an einem Threoninrest und zwei Serinresten phosphoryliert, was zu einer Bindung an die E3-Ubiquitinligase  $\beta$ -TRCP ( *$\beta$ -transducin repeat containing protein*) führt, welche eine Ubiquitinkette auf  $\beta$ -Catenin überträgt.  $\beta$ -Catenin wird daraufhin über den unten beschriebenen Ubiquitin-Proteasom-Weg abgebaut [14] (Abbildung 3 a und b).

Das Protein  $\beta$ -Catenin besteht aus 781 Aminosäuren. Diese teilen sich auf in die strukturell recht flexiblen N- und C-terminalen Domänen, sowie eine zentrale Region aus 12 Armadillo (ARM) Wiederholungen. Diese starre Region bildet die Basis der Funktion von  $\beta$ -Catenin: die Bindung seiner zahlreichen Interaktionspartner. Durch Phosphorylierungen können diese Interaktionen modifiziert werden. Die wichtigsten Bindungspartner, das im *destruction complex* vorkommende APC, die Transkriptionsfaktoren TCF4/LEF1 und das im folgenden Abschnitt erwähnte E (epitheliale)-Cadherin binden  $\beta$ -Catenin an derselben Stelle, den zentralen ARM Wiederholungen R3-R9, sodass eine gleichzeitige Bindung nicht möglich ist [15].

Neben der Funktion als zentrales Protein im kanonischen WNT-Signalweg und als Transkriptionsfaktor ist noch eine weitere Funktion für  $\beta$ -Catenin bekannt.  $\beta$ -Catenin bildet im Zusammenspiel mit E-Cadherin und weiteren Proteinen Zell-Zell-Kontakte (*adherens junctions*) [16]. In einer Studie an *Drosophila* wurde gezeigt, dass das in dieser Funktion gebundene  $\beta$ -Catenin eine höhere Halbwertszeit als freies  $\beta$ -Catenin bei inaktivierten WNT-Rezeptoren und funktionierendem *destruction complex* hat, und somit voneinander unabhängige Pools dieses Proteins vorliegen [14, 17].

Über den WNT-Rezeptor und seine Liganden wird der Abbau von  $\beta$ -Catenin und die Aktivität des WNT-Signalwegs vor allem extrazellulär gesteuert. Durch Mutationen kann die Aktivierung dieses Signalwegs aber durch Beeinträchtigung der Funktion des *destruction complex* der extrazellulären Kontrolle entgehen. Dies führt zu einem

konstitutiv aktivierten Wachstumssignal durch den WNT-Signalweg, was ein klassischer früher Schritt in der Tumorgenese des KRRs ist (Abbildung 2 und 3d). Andererseits ist nachgewiesen, dass durch Inaktivierung des Signalwegs das Wachstum der Krypten zum Erliegen kommt. Dies wurde durch Depletion des nukleären Zielgens des WNT-Signalwegs *TCF4* und durch Überexpression des WNT-Antagonisten DKK1 (*Dickkopf WNT signaling pathway inhibitor 1*) gezeigt [18-20].

#### **1.4 Familiäre adenomatöse Polyposis und APC**

Durch Studien konnte nachgewiesen werden, dass die FAP auf der Mutation eines einzelnen Gens beruht [21]. Als Produkt dieses Gens wurde das Protein APC (nach dem Syndrom *Adenomatous polyposis coli* benannt) gefunden, das, wie oben erwähnt, eine Rolle im *destruction complex* von  $\beta$ -Catenin im kanonischen WNT-Signalweg spielt [22].

APC fungiert, wie AXIN2, vor allem als *scaffolding protein* [23-25]. Bei der Interaktion von APC mit  $\beta$ -Catenin ist eine sogenannte  *$\beta$ -Catenin inhibitory domain*, die aus mehreren Einheiten besteht, entscheidend. Es wurde gezeigt, dass APC auch im Zellkern über Bindung von  $\beta$ -Catenin und Transkriptionsfaktoren eine inhibitorische Funktion auf die Transkription von Zielgenen des kanonischen WNT-Signalwegs hat [26]. In kolorektalen Tumoren sind beide Allele des *APC*-Gens mutiert. Hierbei stellten Albuquerque et al. (et alii - und weitere) fest, dass in kolorektalen Tumoren die Ausprägung der Mutation des zweiten Allels abhängig von der ersten war. So waren nur bei einem Allel alle  $\beta$ -Catenin-20-Aminosäuren-inhibitorische-Einheiten deletiert, während bei dem zweiten Allel meist weniger Einheiten betroffen waren. Darauf aufbauend schlugen sie ein Modell vor, welches auf einer graduellen Aktivierung des WNT-Signalwegs bei der Entstehung von Polypen basiert [27, 28].

In FAP-Patienten liegt ein Allel des *APC*-Gens bereits mutiert vor, mutiert nun spontan das zweite Allel, kommt es zur Entkopplung der physiologischen Aktivitätskontrolle des WNT-Signalwegs. Hierdurch entstehen im Kolon von betroffenen Personen zahlreiche Polypen und die Wahrscheinlichkeit der Entstehung eines KRRs erreicht nahezu 100 % [3].

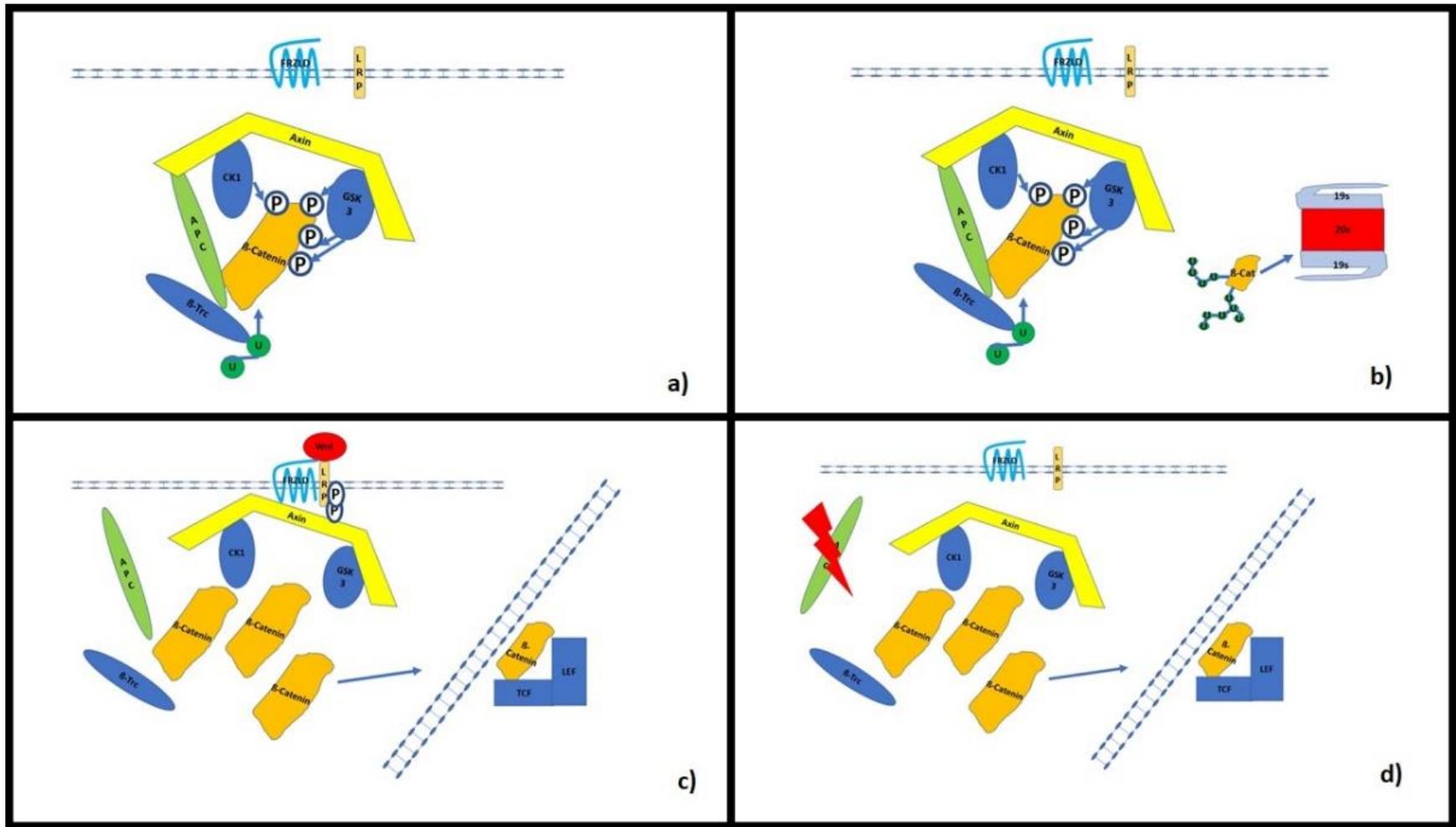


Abbildung 3: Schematische Darstellung des kanonischen WNT-Signalwegs im physiologischen Zustand (a-c) und bei Mutation von APC (d)

Der kanonische WNT-Signalweg ist nicht nur ein wegbereitender Treiber in der Entwicklung von Darmkrebs, er ist auch in späteren Stadien für die Tumorzellen ein notwendiges Wachstumssignal. Wird die Überaktivierung des WNT-Signalwegs in Darmkrebszellen rückgängig gemacht, beeinflusst dies das Wachstum der Tumorzellen negativ [29]. Dies wurde 2011 durch Scholer-Dahirel et al. am Beispiel der Reduktion von  $\beta$ -Catenin RNA (*ribonucleic acid*) Transkription in Tumorzellen gezeigt. Durch *knockdown* von  $\beta$ -Catenin mittels RNA-Interferenz in  $APC^{-/-}$  Darmkrebszelllinien konnte eine Erhöhung der Differenzierungsmarker und eine Erniedrigung des Proliferationsmarkers KI67 (*Marker Of Proliferation Ki-67*) nachgewiesen werden. Diese Vorgänge waren reversibel durch die Beendigung der shRNA (*short hairpin ribonucleic acid*) Produktion [30, 31]. Neben dieser zentralen Rolle in der Tumorentstehung ist der WNT-Signalweg außerdem entscheidend beteiligt an vielen Schritten der Immunregulation im Tumorgewebe [32]. So kommunizieren auch Tumorstammzellen von kolorektalen Tumoren noch mit den Nischenzellen, welche Teil des *Tumor microenvironments* sind [6]. Des Weiteren hat der kanonische WNT-Signalweg auch einen Einfluss auf die Entwicklung des Tumorstromas [32].

Dies macht den kanonischen WNT-Signalweg mit seinem zentralen intrazellulären Signalprotein  $\beta$ -Catenin zu einem attraktiven Ziel für Forschung und mögliche Therapien von kolorektalen Tumoren. Im nächsten Abschnitt wird das Ubiquitin-Proteasom System vorgestellt, das den Effektor beim Abbau von  $\beta$ -Catenin darstellt.

## 1.5 Ubiquitin-Proteasom System

Es wurde bereits 1997 gezeigt, dass die Regulation von  $\beta$ -Catenin Proteinspiegeln vor allem vom Abbau des Proteins im Ubiquitin-Proteasom System durch das 26s-Proteasom abhängig ist [33]. Im Folgenden werden die Grundlagen dieses Systems dargestellt.

Der Ubiquitin-Proteasom Signalweg hat großen Anteil an den unterschiedlichen Halbwertszeiten von Proteinen, die zwischen Minuten und Monaten liegen. So wurde zum Beispiel in natürlichen Killerzellen für das Matrixprotein Lamin B1 eine Halbwertszeit von über 3000 Stunden (h) gemessen [34]. So nimmt dieses System neben der kontrollierten Transkription und Translation eine große Rolle im Proteinhaushalt einer Zelle ein.

Ubiquitin ist ein kleines regulatorisches Protein (76 Aminosäuren), welches evolutionär hochkonserviert ist und zur posttranslationalen Modifikation von zellulären Proteinen genutzt wird [35]. Hierzu werden Ubiquitin oder Polyubiquitinketten kovalent an Lysinreste eines Zielproteins gebunden. An den 7 Lysinresten des Ubiquitins können weitere Ubiquitinreste gebunden werden, was zu unterschiedlichen Verzweigungen von Polyubiquitinketten führt. Für das Schicksal der Proteine kann die Ubiquitinylierung in Abhängigkeit der Verzweigung und Länge der Ubiquitinkette sowie der Position des Lysins, an welches die Ubiquitinkette gebunden wird, Verschiedenes bedeuten: Beeinflussung der Aktivität, Schwächung oder Stärkung von Protein-Protein Interaktionen oder als Signal zur Degradation des Proteins [35, 36].

Das Ubiquitin-Signal, welches am besten beschrieben ist, ist eine Ubiquitinkette über den Lysinrest K48. Dieses und einige weitere Ubiquitinkettenmuster markieren Proteine für den Abbau im 26s-Proteasom [37].

Einzelne Ubiquitinmoleküle oder Ubiquitinketten werden durch Ubiquitin aktivierende Enzyme (E1) auf Ubiquitin konjugierende Enzyme (E2) übertragen (Abbildung 4a und b). Diese übertragen den Ubiquitinrest auf die E3-Ubiquitin-Ligasen, welche spezifisch Zielproteine binden und die kovalente Bindung von Ubiquitin an Lysinreste des Zielproteins ermöglichen (Abbildung 4c und d). Weitere Ubiquitinreste werden in unterschiedlichen Mustern an die 7 Lysinreste der bereits gebundenen Ubiquitine gebunden, sodass Ubiquitinketten entstehen und verlängert werden. Im Falle von Lysin-48 verknüpften Ubiquitinketten wird das Protein zum Abbau im Proteasom bestimmt. Es gibt ein E1-Enzym mit zwei Isoformen in menschlichen Zellen, etwa 40 E2-Ligasen und über 600 E3-Ligasen [38, 39], sodass die Spezifität der Ubiquitinylierung vor allem durch die Substratspezifität der E3-Enzyme vermittelt wird [40, 41] (Abbildung 4 a-d).

Das 26s-Proteasom ist für die Degradation von Lysin-48 markierten Proteinen verantwortlich. Dieser Proteinkomplex besteht aus einer 20s Untereinheit mit Proteaseaktivität und zwei 19s Untereinheiten. Durch die 19s Einheiten werden bestimmte Muster der Ubiquitinylierung erkannt und gebunden, das Protein wird deubiquitinyliert und entfaltet. Im Anschluss wird das Protein durch das aktive Zentrum des 26s Proteasoms, die 20s Untereinheit, bewegt. Die 20s Untereinheit bildet einen

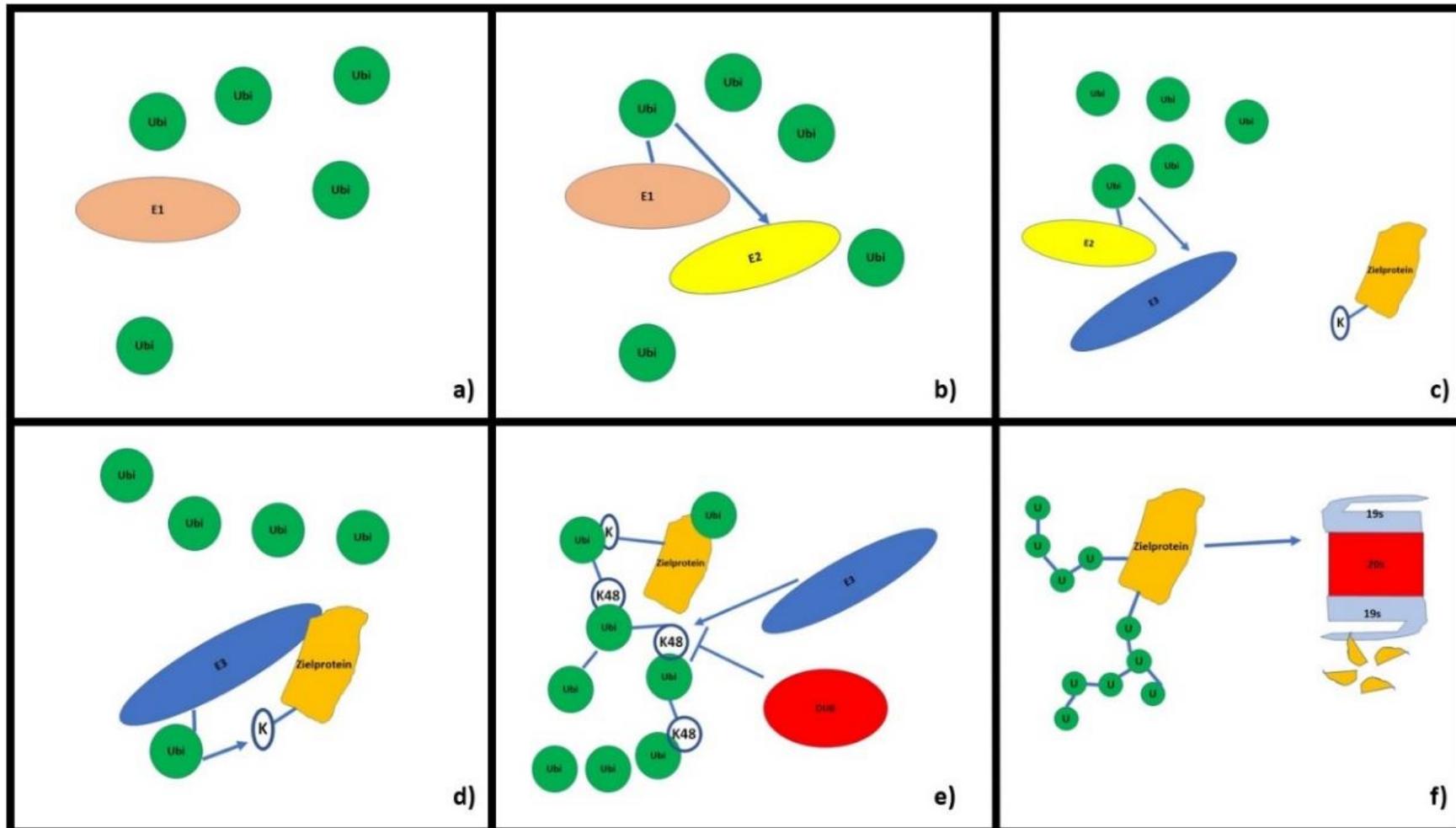


Abbildung 4: Schematische Darstellung des Ubiquitin-Proteasom Systems

Kanal, in welchem mehrere unterschiedliche Proteaseaktivitäten die Peptidbindungen spalten [42, 43]. Hierdurch entstehen kurze Oligopeptide [37].

## 1.6 $\beta$ -Catenin Abbau jenseits des *destruction complex*

Neuere Studien haben weitere Einblicke in die Funktion des kanonischen WNT-Signalwegs bei *APC* Mutationen ergeben: So verhindert nach einem neueren Modell die Bindung von WNT-Liganden an den Rezeptoren und deren Aktivierung nicht die Phosphorylierung von  $\beta$ -Catenin, sondern die Ubiquitinylierung durch die E3-Ligase  $\beta$ -TRCP. Hierdurch wird der *destruction complex* gehemmt und neu translatiertes freies  $\beta$ -Catenin kann sich ansammeln, da die Bindestellen im *destruction complex* belegt sind [14, 44, 45]. Jüngere Studien haben außerdem gezeigt, dass auch nach Mutationen von *APC* die Aktivierung des WNT-Signalwegs noch durch Inhibition oder Aktivierung des Rezeptorkomplexes beeinflussbar ist und somit der klassische Abbau von  $\beta$ -Catenin durch den *destruction complex* nicht völlig ausgeschaltet ist. Es wurde ein Modell vorgeschlagen, wonach der *destruction complex* nach WNT-Signalwegaktivierung mit phosphoryliertem  $\beta$ -Catenin aufgesättigt wird und neu translatiertes  $\beta$ -Catenin sich ansammeln kann, ohne abgebaut zu werden [28, 44].

$\beta$ -Catenin wird auch nach einer Mutation von *APC* und somit einer unzureichenden Kontrolle des *destruction complex*, noch ubiquitinyliert und durch das Proteasom abgebaut.

Als einer der Mechanismen wie die Ubiquitinylierung stattfinden kann, wurde die E3-Ligase JADE1 (*Jade family PHD finger 1*) gefunden. Es wurde gezeigt, dass dieses Enzym im Gegensatz zu  $\beta$ -TRCP in der Lage ist  $\beta$ -Catenin auch dann zu ubiquitinylieren, wenn dieses nicht vorher durch CK1 phosphoryliert wurde [46]. Auch ist gezeigt worden, dass bei *APC*-mutierten Zellen das Ausmaß der Aktivierung der  $\beta$ -Catenin Zielgentranskription immer noch durch WNT-Liganden oder Inhibitoren beeinflussbar sind. Da diese *upstream* des von *APC* abhängigen *destruction complex* eingreifen, ist vorgeschlagen worden, dass dieser auch bei mutiertem *APC* eine Funktion behält [47, 48]. Es ist auch beschrieben, dass die E3-Ligase TRIM33 (*tripartite motif containing 33*)  $\beta$ -Catenin ubiquitinyliert. Im Gegensatz zu anderen E3-Ligasen geschieht dies unabhängig von der Phosphorylierung durch GSK3 $\beta$ , ist aber abhängig von der

Phosphorylierung durch PKC $\delta$  (Protein Kinase C). TRIM33 ubiquitinyliert vor allem aktives  $\beta$ -Catenin im Nucleus [49]. Auch die E3-Ligase HUWE1 (*HECT, UBA and WWE domain containing E3 Ubiquitin protein ligase 1*) interagiert mit  $\beta$ -Catenin und destabilisiert es [50].

## 1.7 Deubiquitinasen

Die Ubiquitinylierung besiegelt das Schicksal eines Proteins nicht vollständig, sondern ist als Zwischenschritt auf dem Weg zum Abbau auch einer positiven und negativen Regulierung unterworfen. Deubiquitinasen (DUBs) sind Enzyme, welche die posttranslationale Modifikation der Ubiquitinylierung rückgängig machen und so quasi als Gegenspieler der E3-Ligasen agieren (Abbildung 4e). Hierbei können sie entweder einzelne Ubiquitinmoleküle von Ubiquitinketten entfernen, oder eine Kette *en bloc* freisetzen [41, 51]. Es sind ca. 100 DUBs im menschlichen Genom bekannt. Diese werden in 7 große Gruppen von Enzymen unterteilt, wobei die *Ubiquitin Specific Proteases* (USPs) mit etwa 50 Vertretern den größten Anteil ausmachen [35, 52, 53].

Da Ubiquitin kovalent über eine Peptidbindung am Lysinrest des Zielproteins gebunden ist, sind DUBs Proteasen. Bis auf die Untergruppe der JAMMs (*Jab1/Mov34/Mpr1 Pad1 N-terminal<sup>+</sup>*) (Zn<sup>2+</sup> Proteasen) handelt es sich hierbei um Cystein-Proteasen [53]. Für einige dieser Enzyme wurden bereits kleine spezifische Inhibitoren entwickelt, wie zum Beispiel für die USPs 1,2,5,7,8,12,14 und 28 [52]. Aufgrund vieler potenzieller Zielstrukturen für Inhibitoren aus verschiedenen Substanzgruppen und vieler möglicher Zielproteine, deren Stabilität durch Hemmung bestimmter DUBs beeinflusst werden kann, ist die Entwicklung und der Einsatz von DUB Hemmern ein aktuell sich stark entwickelndes Feld [54].

## 1.8 Deubiquitinasen im kanonischen WNT-Signalweg

Die in den oberen Abschnitten dargestellte Situation, dass  $\beta$ -Catenin auch bei mutiertem APC weiterhin abgebaut wird und die Aktivierung des WNT-Signalwegs einen essenziellen Tumortreiber in KRK darstellt, macht den Ubiquitin-Proteasom-Weg zu einem attraktiven Ziel pharmakologischer Beeinflussung. Hier bieten sich vor allem DUBs an, da durch Hemmung der Proteasefähigkeit die Proteinstabilität von freiem  $\beta$ -

Catenin negativ beeinflusst werden könnte, um so wiederum die Aktivierung des WNT-Signalweges negativ zu beeinflussen (Abbildung 5). Es wurden bereits einige DUBs beschrieben, welche die Aktivität des WNT-Signalweges über Deubiquitylierung des zentralen Proteins  $\beta$ -Catenin oder anderer Bestandteile des WNT-Signalweges beeinflussen können [16]. Diese sollen im folgenden Abschnitt dargestellt werden.

Zu Beginn der experimentellen Arbeit an diesem Forschungsprojekt war bereits USP47 als DUB von  $\beta$ -Catenin veröffentlicht. Shi et al. beschrieben 2015, dass USP47  $\beta$ -Catenin deubiquityliert. Die beiden Proteine konnten co-immunopräzipitiert werden. Nach einem *knockdown* von USP47 mittels shRNA waren auch die Proteinlevel von  $\beta$ -Catenin verringert. In Pankreas und Lungenkrebszelllinien konnte eine Wachstumsminderung bei reduzierten WNT-Zielgenen (*AXIN2* und das Protoonkogen *c-MYC*) nachgewiesen werden. Auch zeigte sich nach *knockdown* von USP47 in *Drosophila* ein mit verminderter WNT-Signalwegaktivierung in Verbindung stehender Phänotyp (*Wingless*) [55]. In den letzten Jahren wurde für weitere DUBs ein Einfluss auf WNT-Signalaktivität, mit oder ohne direkte Beeinflussung von  $\beta$ -Catenin Proteinstabilität nachgewiesen.

Die DUB USP7 (HAUSP (*Herpes virus-associated Ubiquitin-specific protease*)) ist vor allem bekannt wegen ihrer Interaktion mit dem TP53 und dessen E3-Ligase MDM2 (*mouse double minute 2 homolog*), allerdings wurde USP7 auch mit vielen weiteren Signalwegen in Verbindung gebracht [56]. So wurde die Rolle von USP7 als Regulator von  $\beta$ -Catenin Proteinstabilität in einigen Studien untersucht, was kein einheitliches Bild ergab. 2014 wurde durch Ma et al. in HEK293T (*human embryonic kidney*) Zellen über das Zusammenspiel von USP7 und der E3-Ligase RNF220 (*ring finger protein 220*) ein Mechanismus beschrieben, der zu einer Aktivierung des WNT-Signalwegs führt. RNF220 ist eine E3-Ligase, welche mit  $\beta$ -Catenin interagiert und dieses stabilisiert. Dies funktioniert, indem RNF220 die Interaktion von  $\beta$ -Catenin mit der DUB USP7 überbrückt [57].

Novallesdemunt et al. stellten 2017 mit einem CRISPR/Cas9 (*clustered regularly interspaced short palindromic repeats/ CRISPR associated protein*) Ansatz in HEK-Zellen fest, dass verschiedene APC-Mutationen dazu führen, dass  $\beta$ -Catenin zwar noch phosphoryliert wird, aber keine Ubiquitylierung mehr stattfindet [58]. Es findet keine Dephosphorylierung statt, wenn mutiertes APC  $\beta$ -Catenin nicht mehr bindet. Im

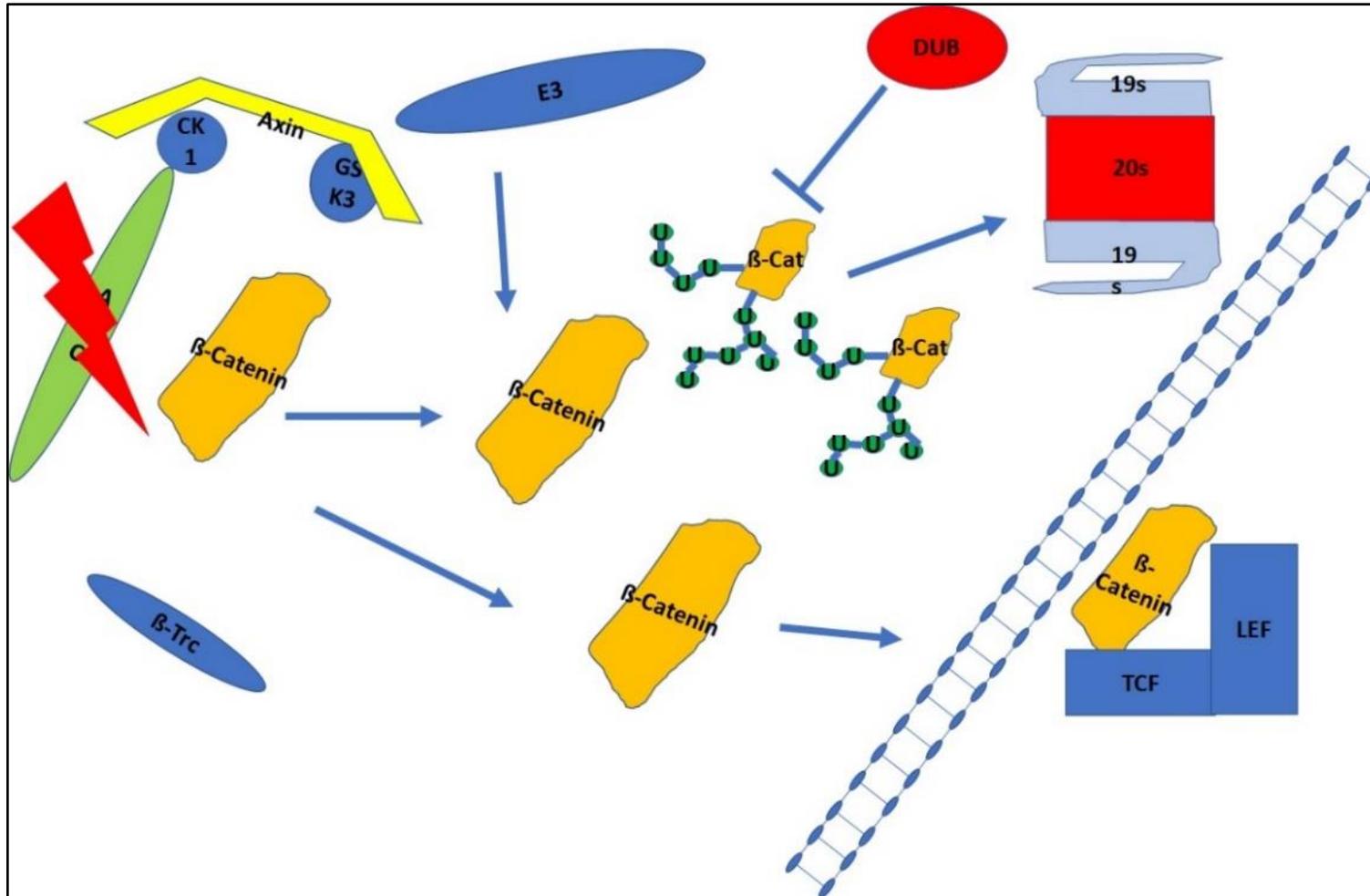


Abbildung 5: Erweitertes Schema des WNT- Signalweges bei APC-Mutation

Gegensatz zur oben genannten Studie von Ma et al. wurde in dieser Studie bei *APC* Mutation die Interaktion als unabhängig von RNF220 gezeigt (im Gegensatz dazu auch [59]). Über einen Screen mittels Massenspektrometrie wurden bei mutiertem *APC* der *destruction complex* immunopräzipitiert. Hierbei wurde abhängig von der verbleibenden Anzahl von  $\beta$ -Catenin Bindemotiven im mutierten *APC*  $\beta$ -TRCP weniger gut co-immunopräzipitiert und USP7 besser, je mehr  $\beta$ -Catenin Bindemotive im Vergleich zu Wildtyp *APC* fehlten. Somit postulierten die Autoren eine vom *APC*-Mutationsstatus abhängige Interaktion der DUB USP7 mit  $\beta$ -Catenin [58].

In einer Studie wurde gezeigt, dass der *knockdown* von USP7 oder die Inhibition dieser DUB durch den Inhibitor P5091 das Wachstum von Darmkrebszellen *in vivo* und *in vitro* beeinträchtigt. Eine verringerte WNT-Aktivierung nach Behandlung mit dem Inhibitor konnte in *TOP/FOP Assays* oder durch die quantitative Polymerase Kettenreaktion (qPCR) von WNT-Zielgenen nachgewiesen werden. Der Effekt war gleichermaßen in *TP53* mutierten als auch *TP53*-Wildtyp Zellen nachweisbar, und scheint somit nicht auf der beschriebenen Funktion von USP7 bei der Regulation des Tumorsuppressors TP53 zu beruhen [60].

Im Gegensatz zu diesen Erkenntnissen stellten Ji et al. 2019 fest, dass USP7 AXIN deubiquitinyliert und so zu einer Inhibition des WNT-Signalwegs, statt wie in den Veröffentlichungen zuvor postuliert zu einer Aktivierung des WNT-Signalweges führe. Der Ansatz wurde mittels stabilen Zelllinien mit CRISPR/Cas9 und *TOP/FOP Reporterassay* durchgeführt. Die Studie wurde nicht an *APC*-mutierten Zellen durchgeführt. Als Reaktion auf die oben genannten Studien wurden Versuche an Darmkrebszellen mit dem Inhibitor Almac4 durchgeführt: Die Behandlung von Darmkrebszellen mit Almac4 zeigte bei *TP53* mutierten HCT116 (*human colon tumor*) Zellen eine Wachstumsverzögerung, aber nicht bei *TP53* und *APC* mutierten HCT116 Zellen. In diesen Zellen war auch kein Unterschied in den Proteinspiegeln von  $\beta$ -Catenin oder AXIN1 nachweisbar [61].

Auch USP20 ließ sich mit  $\beta$ -Catenin co-immunopräzipitieren. Nach einem *knockdown* des *USP20* Gens zeigten sich sowohl in HEK293T, als auch in HCT116 Zellen niedrigere Wachstumsraten. Tumorwachstum *in vivo* bei Mäusen war bei *knockdown* von *USP20* mittels shRNA geringer. Nach einem  *$\beta$ -Catenin knockdown*, verschlechterte sich das

Tumorwachstum durch einen zusätzlichen *USP20 knockdown* nicht weiter. MDA-MB-231 Zellen (Brustkrebszelllinie, Adenokarzinom aus Pleuraerguss) mit *USP20 knockdown* schnitten in einem Migrationsassay schlechter ab, dieser Effekt war durch Überexpression von  $\beta$ -Catenin reversibel. Ein Versuch zur Chemosensitivität gegenüber Etoposid und Cisplatin zeigte, dass nach *USP20 knockdown* eine erhöhte Chemosensitivität besteht, welche durch Überexpression von  $\beta$ -Catenin reversibel ist [62].

Außerdem wurden für die DUBs USP2a, USP4, TRE2 und USP9X direkte Interaktionen mit  $\beta$ -Catenin publiziert [63-68].

### **1.8.1 Weitere im WNT-Signalweg aktive Deubiquitinasen**

Außer den direkt mit  $\beta$ -Catenin interagierenden DUBs sind weitere Vertreter der Gruppe an der Regulation der WNT-Signalwegaktivität beteiligt. Die Beeinflussung von WNT-Signalwegaktivität durch die Deubiquitylierung von AXIN durch USP34 war schon vor Beginn der Experimente bekannt [69]. So ist beschrieben, dass USP21 TCF7 deubiquityliert und ein *knockdown* das Wachstum von *in vivo* Tumoren bei Mäusen beeinflusst [70]. USP6 (FZD) und CYLD (*cylindromatosis lysine 63 deubiquitinase*) (DVL) (*dishevelled*), TRABID (*TRAF-binding protein domain*) (TCF/LEF) sind DUBs, bei denen eine Beeinflussung des WNT-Signalwegs über verschiedene Bestandteile desselben beschrieben sind [71-74].

## **1.9 CRISPR/Cas9**

In dieser Arbeit wurde das CRISPR/Cas9 System genutzt, um DUBs in Zelllinien auszuschalten und stabile Zelllinien ohne Expression dieser Proteine herzustellen. Dieses System soll im kommenden Absatz kurz vorgestellt werden.

Spätestens seit den Nachrichten über die Geburt von Kindern, welche mittels dieses Systems genetisch im *CCR5 (C-C motif chemokine receptor 5)*-Gen verändert wurden, ist CRISPR/Cas9 im gesellschaftlichen Diskurs angekommen [75]. Gezielte Genveränderung ist durch die Entdeckung von CRISPR/Cas9 relativ einfach und kostengünstig geworden. Schon vorher waren Methoden bekannt, mit denen DNA (*deoxyribonucleic acid*)-Sequenzen gezielt gebunden werden konnten und über

Effektoren das Genom oder die Transkription verändert werden konnten. Doch diese Prinzipien, Zinkfinger motive oder TALENs (*transcription activator-like effector nucleases*) gekoppelt an Effektornukleasen, beruhen auf DNA-Proteininteraktionen, welche in der Herstellung sehr ressourcenaufwendig sind. Die Spezifität im CRISPR/Cas9 System wird durch DNA bindende RNA vermittelt, wodurch die Anwendung auf verschiedene Gene weitaus breiter genutzt werden kann, da sie weniger aufwendig zu planen und herzustellen ist [76].

CRISPR/Cas9 wurde ursprünglich als eine Art bakterielles Immunsystem gegen fremde (Bakteriophagen-)DNA entdeckt [77]. Im weiterentwickelten System bindet eine sgRNA (*single guide ribonucleic acid*) über ein sogenanntes PAM (*protospacer adjacent motif*) die Nuklease Cas9. Über das 5' terminale Ende bindet die sgRNA eine zu ihrer Basensequenz passende Stelle im Genom. Die so aktivierte Nuklease erzeugt dann zielgerichtet einen Doppelstrangbruch. Da die sgRNAs an einen der DNA-Stränge binden, ist die Erfolgsquote in stark transkribierten Genen, wo der Doppelstrang öfter zu zwei Einzelsträngen geöffnet wird, höher.

Der Effekt des Doppelstrangbruchs ist abhängig von dem in der Zelle aktivierten DNA-Reparatursystem. Hier sind HDR (*homology directed repair*) und NHEJ (*non homologous end joining*) zu erwähnen [78].

Während durch HDR ein Gen mithilfe des zweiten Allels als Leseraster für Polymerasen repariert wird und so das Gen intakt bleibt, ist die Wahrscheinlichkeit, dass es zu einer Mutation im Sinne einer Insertion oder Deletion bei Reparatur der Doppelstrangbrüche durch NHEJ kommt, sehr viel größer. Durch Einführung von *missense* oder *nonsense*-Mutationen kann hiermit ein Genprodukt ausgeschaltet werden (*knockout*) (Abbildung 6). Dieser Ansatz wurde auch im Rahmen der vorliegenden Forschungsarbeit genutzt [83, 84].

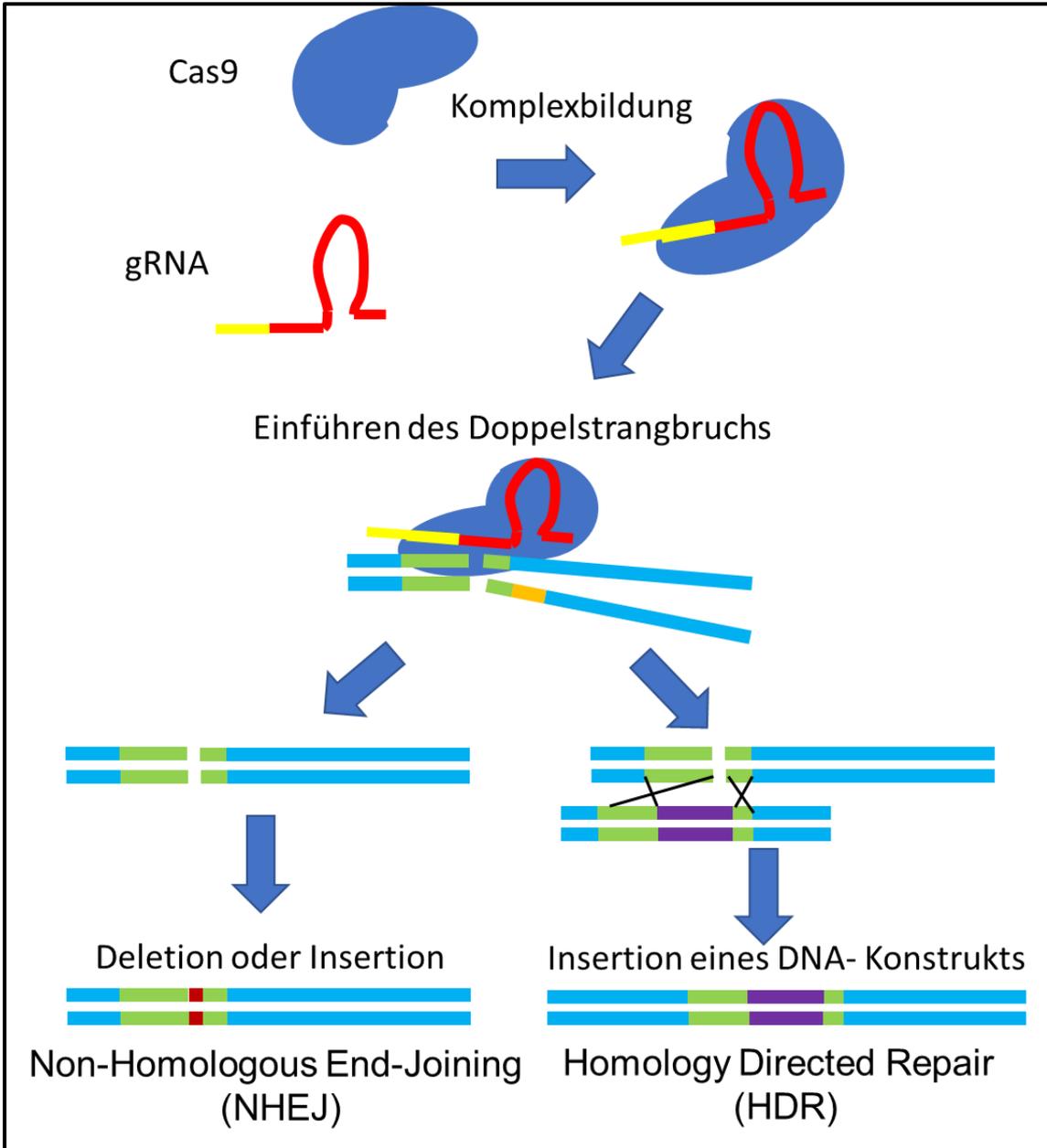


Abbildung 6: Funktionsweise des CRISPR/Cas9 Systems, modifiziert nach [76]

## 1.10 Zielsetzung

Die oben beschriebene Tatsache, dass eine Verringerung von WNT-Signalwegaktivität zum Arrest von Tumorzellwachstum führen kann, macht eine Beeinflussung des WNT-Signalwegs zu einem attraktiven Ziel neuer Therapien. Die Kontrolle des WNT-Signalwegs vor allem über den posttranslationalen Abbau des zentralen Proteins  $\beta$ -Catenin macht gerade die Hemmung von DUBs mit ihrer Inhibitoren zugänglichen Proteasefunktion zu einem interessanten Ansatz. Über die Hemmung der Deubiquitylierung von  $\beta$ -Catenin könnte in Tumorzellen eine Behinderung des Wachstumssignals durch WNT-Signalwegaktivität erreicht werden (Abbildung 5). Zu Beginn dieser Arbeit war mit USP47 eine DUB als Interaktionspartner von  $\beta$ -Catenin beschrieben worden [55]. Da, wie oben erwähnt etwa 100 DUBs im menschlichen Genom bekannt sind, ist davon auszugehen, dass die Spezifität der DUBs für einzelne Proteine nicht sehr hoch ist. So ist der erzielte Effekt einer Hemmung der jeweiligen DUB vom Umstand vieler Faktoren und dem Zustand verschiedener molekularer Einflüsse abhängig, wie durch Ji et al. am Beispiel von USP7 und dem Mutationszustand von *TP53* gezeigt [61]. Aus diesem Grund entstand die Überlegung weitere an der Beeinflussung von WNT-Signalaktivität beteiligte DUBs zu suchen, um als Endergebnis im Rahmen von personalisierter Krebstherapie eine vom konkreten molekularen Zustand der Tumorzellen abhängigen Einsatz pharmakologischer Inhibition von DUBs einzusetzen. So war die Identifikation von DUBs, die die Aktivität des WNT-Signalwegs beeinflussen, das Ziel dieser Studie. Hierzu wurden mittels eines siRNA (*small interfering ribonucleic acid*)-Screens Kandidaten bestimmt. Aus diesen Kandidaten sollten dann stabile Zelllinien aus HEK293T-Zellen und Darmkrebszellen produziert werden, in denen mit biochemischen Methoden wie Antikörper basierten Färbungen der Effekt der DUB auf die Zelllinie weiter untersucht werden kann. Zur Herstellung dieser Zelllinien entschieden wir uns für das CRISPR/Cas9 System. Um die Arbeit zu spezifizieren, entschieden wir uns nach dem CRISPR-Ansatz mithilfe von Datenbankrecherche auf eine DUB zur genaueren Untersuchung zu konzentrieren. Das Ziel dieser Arbeit war somit einen vielversprechenden Kandidaten zu finden, der die Proteinstabilität von  $\beta$ -Catenin beeinflusst.

## 2 Material

### 2.1 Vektoren

Tabelle 1: In dieser Arbeit genutzte Vektoren

Plasmid	Beschreibung	Hersteller
LentiCRISPRv2	<i>lentiCRISPR v2 was a gift from Feng Zhang</i> (Addgene plasmid # 52961; <a href="http://n2t.net/addgene:52961">http://n2t.net/addgene:52961</a> ; RRID:Addgene_52961; Abruf 06.03.2020)	Addgene #52961
psPAX2	<i>psPAX2 was a gift from Didier Trono</i> (Addgene plasmid # 12260; <a href="http://n2t.net/addgene:12260">http://n2t.net/addgene:12260</a> ; RRID:Addgene_12260; Abruf 06.03.2020)	Addgene #12260
pMD2.G	<i>pMD2.G was a gift from Didier Trono</i> (Addgene plasmid # 12259; <a href="http://n2t.net/addgene:12259">http://n2t.net/addgene:12259</a> ; RRID:Addgene_12259; Abruf 06.03.2020)	Addgene #12259
TOP-GFP.mC	<i>TOP-GFP.mC was a gift from Ramesh Shivdasani</i> (Addgene plasmid # 35491; <a href="http://n2t.net/addgene:35491">http://n2t.net/addgene:35491</a> ; RRID:Addgene_35491; Abruf 06.03.2020)	Addgene #35491
M50 Super 8x TOPFlash	<i>M50 Super 8x TOPFlash was a gift from Randall Moon</i> (Addgene plasmid # 12456; <a href="http://n2t.net/addgene:12456">http://n2t.net/addgene:12456</a> ; RRID:Addgene_12456; Abruf 06.03.2020)	Addgene #12456
M51 Super 8x FOPFlash (TOPFlash mutant)	<i>M51 Super 8x FOPFlash (TOPFlash mutant) was a gift from Randall Moon</i> (Addgene plasmid # 12457; <a href="http://n2t.net/addgene:12457">http://n2t.net/addgene:12457</a> ; RRID:Addgene_12457; Abruf 06.03.2020)	Addgene #12457
Ubi-Renilla	pRL Renilla Luciferase Promega;E2261 ( <a href="https://www.promega.de/products/luciferase-assays/genetic-reporter-vectors-and-cell-lines/prl-renilla-luciferase-control-reporter-vectors/?catNum=E2261">https://www.promega.de/products/luciferase-assays/genetic-reporter-vectors-and-cell-lines/prl-renilla-luciferase-control-reporter-vectors/?catNum=E2261</a> ; Abruf 06.03.2020)	Promega #E2261

## 2.2 Antikörper

Tabelle 2: In dieser Arbeit genutzte Antikörper

Antikörper	Isotyp	Konzentrationen	Hersteller
<b>Primäre Antikörper</b>			
$\beta$ -Catenin, <i>polyclonal</i>	<i>rabbit (rb)</i>	WB(Western Blot): 1:5000, IHC (Immunhistochemie) 1:1000, IF (Immunofluoreszenz) 1:100, IP (Immunopräzipitation) 0,5 $\mu$ g, WB für IP: 1:1000	proteintech
$\beta$ -Catenin (610153)	<i>mouse (ms)</i>	WB 1:5000, IF 1:1000	BD
USP10 <i>polyclonal</i> Antibody (19374-1-AP)	<i>rb</i>	WB: 1:1000, IF/IHC: 1:100	proteintech
USP10 (C7 - sc 365828)	<i>ms</i>	WB: 1:1000; IF: 1:100	Santa Cruz
<b>Sekundäre Antikörper</b>			
Alexa Anti-Rabbit 555 (A-31572)	<i>donkey</i>	1:10000	Thermo Fisher
Alexa Anti-Rabbit 488 (R37118)	<i>donkey</i>	1:10000	Thermo Fisher
Alexa Anti-Rabbit 800 (A32808)	<i>donkey</i>	1:10000	Thermo Fisher
Alexa Anti-Mouse 488 (A-21202)	<i>donkey</i>	1:10000	Thermo Fisher
Alexa Anti-Mouse 800 (A32789)	<i>donkey</i>	1:10000	Thermo Fisher
Dylight Anti-Mouse 800 #5257	<i>goat</i>	1:20000	Cell Signaling
Dylight Anti-Rabbit 680 #5366	<i>goat</i>	1:20000	Cell Signaling
Alexa Anti-Mouse 680 (A10038)	<i>donkey</i>	1:10000	Thermo Fisher

## 2.3 Primer

Tabelle 3: In dieser Arbeit genutzte Primer

Primername	Sequenz
g RNAs	
Usp34 for 1	caccgAGCGATACACATCAAAGTGG
Usp47 for 1	caccgAGTACTCATATCTAGTTCCT
Usp47 for 2	caccGAGGGACTCTTCAGCATCAG
CTNNB1 for1	caccGAAACAGCTCGTTGTACCGC
CTNNB1 for2	caccGGTCCATCAGCTTTCTAAAA
usp20 f1	caacgAGGAGGTATTCCTGGAGCAG
usp20 r1	aaacCTGCTCCAGGAATACCTCCTc
usp21 f1	caacGGTAGCTTGGATCCCCTCG
usp21 r1	aaacCGAGTGGGATCCAAGCTACC
usp32 f1	caacgCGAATAGGTGGTCAAACCAA
usp32 r1	aaacTTGGTTTCACCACCTATTCGc
usp45 f1	caacGGGTCCATCTGGCTGCACAC
usp45 r1	aaacGTGTGCAGCCAGATGGACCC
usp10 f1	caccGCCTGGGTACTGGCAGTCGA
usp10 r1	aaacTCGACTGCCAGTACCCAGGC
usp20 f2	caacgAGAACGTGATCAATGGGCAG
usp20 r2	aaacCTGCCCATTGATCACGTTCTc
usp21 f2	caacGGACCATTGGCAAGTATCGG
usp21 r2	aaacCCGATACTTGCCAATGGTCC
usp45 f2	caacGTGGTGGAACCTTCAAGGCC
usp45 r2	aaacGGCCTTGAAAGTTCCACCAC
<b>Primer für PCR</b>	
U6 Primer	GAGGGCCTATTTCCCATGATTCT

## 2.4 Enzyme

Tabelle 4: In dieser Arbeit genutzte Enzyme

Name	Hersteller
Bsmb1	NEB
PrimeSTAR GXL polymerase	Takara
RNase A (10µg/ml)	Sigma
T4 DNA Ligase	Thermo Fisher Scientific
Taq Polymerase	In-house

## 2.5 Kits

Tabelle 5: In dieser Arbeit genutzte Bausätze

Name	Hersteller
<i>ABC-Kit reagents</i> (PK-6100 Standard)	Vectastain
<i>Actin Cytoskeleton/Focal Adhesion Staining Kit</i> (FAK100)	Merck
<i>GeneJET Gel Extraction Kit</i>	Thermo Fisher Scientific
<i>Signal Stain DAB Substrate Kit</i> , (#8059)	Cell Signaling
<i>Human ON-TARGETplus siRNA Library - Deubiquitinating Enzymes</i>	Horizon Discovery

## 2.6 Chemikalien

Tabelle 6: In dieser Arbeit genutzte Chemikalien

Chemikalie	Hersteller
1kb plus DNA <i>Ladder</i>	Gene Ruler™
2-Propanol	ROTH
4',6-Diamidin-2-phenylindol (DAPI)	HOECHST
<i>5x Passive Lysis Buffer</i>	Promega
Essigsäure	ROTH

<b>Chemikalie</b>	<b>Hersteller</b>
Adenosintriphosphat (ATP)	Jena Bioscience
Agarose	ROTH
Ampicillin (Amp)	ROTH
Kälberserumalbumin (Bovine serum albumine, BSA)	Merck Millipore
Bromphenolblau	Sigma
Calciumchlorid (CaCl <sub>2</sub> )	Merck Millipore
Carbenicillin (Carb)	ROTH
Ciprofloxacin	Sigma
Collagen (C9791)	Sigma
Cutsmart buffer	NEB
Kristallviolett Pulver	Sigma-Aldrich/Merck
<i>Deoxynucleotide triphosphates</i> (dNTPs, 2.5mM)	ROTH
Dithiothreitol (DTT)	Life Technologies GmbH
<i>DNA loading dye</i> (6x)	NEB
<i>Dulbecco's Modified Eagle Medium</i> (DMEM)	Thermo Fisher Scientific
Ethanol (EtOH)	ROTH
Ethidiumbromid	ROTH
Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA)	ROTH
Fetales Kälberserum (Fetal calf serum, FCS)	Biochrom AG
Fibronektin (F4759)	Sigma
<i>First-Strand RT Buffer</i> (5X)	Thermo Fisher Scientific
Fluoromount (F4680)	Sigma
Glycerol	ROTH
<i>Glycogen blue</i> (Ambion)	Thermo Fisher Scientific
Hematoxylin	Sigma
HEPES-Puffer	Roth
Wasserstoffperoxid (H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> )	Sigma
<i>Immobilon Transfer Membrane</i>	Merck
Isoamylalkohol	ROTH

<b>Chemikalie</b>	<b>Hersteller</b>
Kanamycin	Life Technologies GmbH
<i>LHC Basal Medium ( Lechner and LaVeck medium) (LHC-9)</i>	Thermo Fisher Scientific
Methanol (MeOH)	ROTH
Mowiol 40-88	Sigma-Aldrich
N,N,N',N'-Tetramethylethylendiamin (TEMED)	ROTH
Natriumchlorid (NaCl)	AppliChem
<i>Neutrally buffered formalin (NBF)</i>	Thermo Fisher Scientific
<i>Nuclease-free water</i>	Merck
<i>PageRuler Prestained Protein ladder</i>	Thermo Fisher Scientific
Paraformaldehyd (PFA)	Sigma-Aldrich P6148
Penicillin (Pen)	Sigma
<i>Pierce™ Protein A/G Magnetic Beads</i>	Thermo Fisher
Polyethylenimin (PEI, 25kD, linear)	Polysciences
Polyethylenimin (PEI)	Sigma-Aldrich
<i>PrimeSTAR GXL Buffer</i>	PrimeSTAR
Propidiumiodid (PI)	Sigma
<i>REDExtract-N-Amp PCR (ReadyMix)</i>	Sigma
<i>Richard-Allan Scientific Cytoseal™ 60 (8310-4)</i>	Thermo Scientific
Roti-Phenol	Cell Signaling
Rotiphorese Gel 30	ROTH
Natriumdodecylsulfat (SDS)	ROTH
Streptomycin (Strep)	Sigma
<i>SYBR green</i>	Applied Biosystems
<i>T4 DNA ligase buffer</i>	Thermo Fisher Scientific
<i>TAE-buffer (TRIS-Acetat-EDTA-Puffer)</i>	ROTH
Trichlormethan/Chloroform	ROTH
<i>TriFast</i>	Peqlab
Tris (Tris(hydroxymethyl)aminomethan) -HCl	ROTH
<i>Triton X-100</i>	ROTH

Chemikalie	Hersteller
Trypsin	Sigma
Xylen	Sigma
$\beta$ -Mercaptoethanol	ROTH

## 2.7 Lösungen

Tabelle 7: In dieser Arbeit genutzte Lösungen

Name	Inhalt
<i>Base Solution PCR 50x</i>	1,25 M NaCl, 10 mM EDTA, (pH 12), 50 g NaOH Salz und 20 ml 0,5 M EDTA, auf 1 l mit H <sub>2</sub> O auffüllen
<i>Base Solution PCR 1x</i>	Base solution PCR 50x auf 25 mM NaOH, 0,2 mM EDTA verdünnen
<i>Blocking buffer</i>	0,1 % (w/v) Casein, 0,2x PBS, 0,1 % (v/v) Tween20
<i>Bradford Solution</i>	117 $\mu$ M Coomassie blue G-250, 1 % 85 % (w/v) Phosphorsäure
Citrat-Puffer	10 mM, pH 6,0
Kristallviolett-Lösung	0,5 % Kristallviolett-Pulver, 79,5 % (v/v) dH <sub>2</sub> O, 20 % (v/v) MeOH
Firefly-Luciferase Assay Puffer	2 mM ATP, 1 mM DTT in GlyGly Puffer
Firefly-Luciferase-Substratlösung	0,2 mM Luciferin in GlyGly Puffer
GlyGly Puffer	25 mM Glycylglycin, 15 mM MgSO <sub>4</sub> , 4 mM EGTA, pH 7,8
<i>HR Lysis Buffer</i>	50 mM Tris-HCl (pH 7,4), 5 mM MgCl <sub>2</sub> , 250 mM Sucrose, 0,1 % (v/v) NP-40, 1 mM DTT, 1:1000 Protease Inhibitor
Lauria Broth (LB)-medium	10 g/l <i>Yeast extract</i> , 5 g/l NaCl, 5 g/l <i>Tryptone</i> , pH 7,5
Lysis-Buffer (L7)	200 mM NaOH, 1 % (w/v) SDS
Neutralization-Solution PCR 1x	40 mM Tris-HCl pH 5 in H <sub>2</sub> O
PBS ( <i>phosphate-buffered saline</i> )	137 mM NaCl, 2,7 mM KCl, 10 mM Na <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> , 1,8 mM KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>
PEI Stock	PEI wurde gelöst in endotoxinfreiem, 80 °C heißem H <sub>2</sub> O, der Ansatz wurde auf

Name	Inhalt
	Raumtemperatur abgekühlt, durch eine Filtrierung sterilisiert 0,22 µm und bei -20 °C gelagert
Penicillin/Streptomycin (Pen/Strep)	50/50 mixture of Pen/Strep (1x)
Phenol/Chloroform	Mischungsverhältnis: Phenol/Chloroform/Isoamylalkohol = 25:24:1 (v/v/v)
Präzipitierungs-Puffer (N3)	3,1 M Kaliumacetat, pH 5,4
<i>Pre-coating solution for BEAS-2B cell culture</i>	0,03 % (w/v) Collagen (in 0,1 M Essigsäure), 0,01 % (w/v) Fibronectin, 0,001 % (w/v) BSA, 0,03 % (w/v) Collagen
<i>Primary antibody buffer</i>	0,1 % (w/v) Casein, 0,2x PBS, 0,1 % (v/v) Tween20
Protease Inhibitor	2,5 mM Natriumpyrophosphat, 1 mM β-Glycerophosphat, 1 mM Na <sub>3</sub> VO <sub>4</sub> , 1 µg/ml Leupeptin
Renilla Puffer	0.1 mM KPi, 0.5 mM NaCl, 1 mM EDTA, pH 7,6
Renilla Substratlösung	100 nM Coelenterazin in Renilla Puffer
Resuspension Puffer (R3)	50 mM Tris-HCl, 10 mM EDTA, 100 µg/ml RNase
<i>RIPA Buffer (1X)</i> (Radioimmunpräzipitationsassaypuffer)	20 mM Tris-HCl (pH 7,5), 150 mM NaCl, 1 mM Na <sub>2</sub> EDTA, 1 mM EGTA, 1 % (v/v) NP-40, 1 % (v/v) Natriumdeoxycholat
<i>Samplebuffer</i>	Samplebuffer (2x 125 mM Tris HCl, pH6,8, 4 % SDS, 0,01 % Bromphenolblau, 2 % 2-Mercaptoethanol
<i>SDS Loading Buffer/lämmli buffer (5X)</i>	312,5 mM Tris-HCl (pH 6,8), 500 mM DTT, 0,0001 % (v/v) Bromphenolblau, 10 % (w/v) SDS, 50 % (v/v) Glycerol
<i>SDS Running Buffer</i>	1,25 M Tris-Base, 1,25 M Glycin, 1 % (v/v) SDS
<i>Secondary antibody buffer</i>	0,1 % (w/v) Casein, 0,2x PBS, 0,1 % (v/v) Tween20, 0,01 % (w/v) SDS
<i>Taq DNA Polymerase PCR Buffer (10X)</i>	200 mM Tris-HCl (pH 8,4), 500 mM KCl verdünnt in 1 ml 50 mM MgCl <sub>2</sub>

Name	Inhalt
<i>TMRUbVME stock solution</i>	50 mM Natriumacetat (pH 4,5, 5 % (v/v) DMSO)
<i>Transfer Buffer</i>	25 mM Tris-Base, 192 mM Glycin, 20 % (v/v) MeOH
<i>Wash Buffer</i>	0,2x PBS, 0,01 % (v/v) Tween20

## 2.8 Nährmedien

Tabelle 8: In dieser Arbeit genutzte Nährmedien für die Zellkultur

Medium	Komponenten
Agar <sup>Carb+</sup> ( <i>plated</i> )	Petrischale gefüllt mit Agar plus 0,1 % Carb
DMEM <sup>+/+</sup>	89 % (v/v) DMEM, 10 % (v/v) FCS, 1 % (v/v) Pen/Strep
Gefriermedium	50 % (v/v) FCS, 40 % (v/v) DMEM <sup>+/+</sup> 10 % (v/v) DMSO
LB <sup>Amp+</sup>	LB-Medium mit 0,1 % Amp

## 2.9 Zelllinien

Tabelle 9: In der Zellkultur genutzte Zelllinien

Zelllinie	Beschreibung	Nummer
HEK293 Zellen: strain T, A and T eco	Menschliche embryonale Nierenzellen, transformiert durch das SV40-large-T-Antigen.	ATCC® CRL-1573™
HT29	Humane Darmkrebszelllinie eines kaukasischen Patienten	91072201
SW480	Humane Darmkrebszelllinie	ATCC® CCL-228™

## 2.10 Bakterienstränge

Tabelle 10: In dieser Arbeit genutzte Bakterienstränge

Bakterienstrang	Beschreibung
<i>E. coli</i> XL-1 blue	Genotype: endA1 gyrA96(nal <sup>R</sup> ) thi-1 recA1 relA1 lac glnV44 F'[::Tn10 proAB <sup>+</sup> lacI <sup>q</sup> Δ(lacZ)M15] hsdR17(rk <sup>-</sup> mk <sup>+</sup> )
<i>E. coli</i> XL-10 gold	Genotype: endA1 glnV44 recA1 thi-1 gyrA96 relA1 lac Hte Δ(mcrA)183 Δ(mcrCB-hsdSMR-mrr)173 tet <sup>R</sup> F'[proAB lacI <sup>q</sup> ΔM15 Tn10(Tet <sup>R</sup> Amy Cm <sup>R</sup> )]

## 2.11 Technische Geräte

Tabelle 11: In dieser Arbeit genutzte technische Geräte

Name/Funktion	Hersteller
Durchflusszytometrie/FACS ( <i>fluorescence-activated cell sorting</i> ) BD <i>FACS Canto II Cell Analyzer</i>	BD Biosciences
Consort EV243 <i>electrophoresis power supply</i>	Sigma Aldrich
Fluoreszenz-Mikroskop	FSX 100 Olympus
Gel iX20 <i>imager</i>	Peqlab Biotechnology GmbH
<i>Gel-blotting paper/Whatman paper</i>	A. Hartenstein
<i>Hyrax M55 Rotary Microtome</i>	Leica
Illuminator HXP 120V	Zeiss
Mirax midi	Zeiss
<i>Mr. Frosty™ freezing container</i>	Thermo Fisher Scientific
<i>NanoDrop® ND 1000 spectral photometer</i>	Thermo Fisher Scientific
<i>Odyssey CLX imaging system</i>	Li-COR
<i>Operetta screening and imaging system</i>	Perkin Elmer
Pannoramic DESK Scanner	3DHISTECH
<i>PAP pen</i> (Wasserabweisender Stift)	Sigma
<i>PCR cycler: SimpliAmp thermo cycler</i>	Life technologies

<b>Name/Funktion</b>	<b>Hersteller</b>
<i>PowerPac Basic</i>	Bio-Rad
<i>T100 Thermo cycler</i>	Bio-Rad

## 2.12 Software

Tabelle 12: Zur Erstellung der Arbeit genutzte Software und Homepages

<b>Software/Online</b>	<b>Hersteller/Quelle</b>
Agarose gel imaging and analysis: Fly Capture Camera Selection 2.7.3.18	Fly Capture
Word, Excel, PowerPoint	Microsoft
GraphPad Prism 8	GraphPad Software
Zitiersoftware Endnote	Endnote
Immunofluoreszenz-Bilder Analyse	Olympus
Image J (Bildbearbeitung)	Image J
kmplot.org	kmplot.org
Cbioportal.org	cbioportal.org
Visualizer for scanned TMAs Case Viewer	Panoramic Viewer 3DHISTECH

## **3 Methoden**

### **3.1 Zellkultur**

Es wurden die Zelllinien HEK293T, HT29 (*human tumor*) und SW480 in Zellkultur benutzt. Zur Virusproduktion wurden HEK293T Zellen genutzt. Die Zelllinien sind adhärenent und wurden in dem Kulturmedium DMEM<sup>++</sup> gehalten. Die Zellen wurden auf Greiner Platten kultiviert und für optimale Wachstumsbedingungen bei 37 °C, 95 % relativer Feuchtigkeit und 5 % CO<sub>2</sub> inkubiert. Generell wurde die Zellkultur unter S1 Bedingungen durchgeführt. Transfizierte Zellen zur Virusproduktion oder Zellen, die mit Virus infiziert waren, wurden unter S2 Bedingungen kultiviert. Bevor infizierte Zellen zurück in S1 Bedingungen genommen wurden, wurde überprüft, dass diese nicht mehr infektiös waren.

#### **3.1.1 Splitten von Zellen**

Bei einer Konfluenz von 70 % wurden die Zellen zu 1/5 (HT29 und SW480) bzw. 1/10 (HEK293T) gesplittet. Adhärenente Zellen wurden vorsichtig mit 1x PBS gewaschen und im Anschluss mit 0,05 % Trypsin (in PBS mit EDTA) bei 37 °C inkubiert bis sie von der Platte gelöst waren (5 Minuten (min) für HEK293T Zellen, 7-10 min für HT29 Zellen und 5-7 min für SW480 Zellen). Die Proteaseaktivität des Trypsins wurde durch Überführen in ein 15 ml Zentrifugenröhrchen mit Vollmedium gestoppt. Die Zentrifugenröhrchen wurden bei 300 G und Raumtemperatur für 4 min zentrifugiert. Der Überstand aus Medium und Trypsin wurde verworfen und die Zellen in neuem Vollmedium resuspendiert. Nach Berechnung der benötigten Menge wurden der benötigte Anteil dieser Resuspension in die dazugehörige Platte gegeben, welche mit dem Rest des benötigten Mediums (vorgewärmt auf 37 °C) befüllt waren: 6-*well* Platten 2 ml pro *well*, 10 cm Platten 10 ml pro Platte, 15 cm Platten 15 ml pro Platte.

#### **3.1.2 Einfrieren und Auftauen von Zelllinien**

Um Zelllinien zu konservieren, wurden sie in flüssigem Stickstoff kryokonserviert. Nachdem die zu konservierenden Zellen, wie oben beschrieben, mit Trypsin von der Platte gelöst und eingesammelt worden waren, wurden sie in 1 ml sterilem

Gefriermedium resuspendiert und in Kryoröhrchen transferiert. Die Kryoröhrchen wurden in einen *Mr. Frosty™ freezing container* platziert, welcher, bei -80 °C gelagert, die innere Temperatur um 1 °C/min reduziert. Nachdem die innere Temperatur -80 °C erreicht hatte, konnten die Zellen für längere Zeit in einem Flüssigstickstofftank gelagert werden.

Zum Auftauen kryokonservierter Zellen wurden Kryoröhrchen in einem Wasserbad bei 37 °C aufgetaut. Sobald die Zellen im Gefriermedium aufgetaut waren, wurden diese in einen Zentrifugenröhrchen, welches mit 10 ml Zellmedium vorgefüllt war, überführt. Um das DMSO des Gefriermediums zu entfernen, wurden die Zellen bei 300 G und Raumtemperatur für 3 min zentrifugiert. Nach Resuspension in 37 °C warmem Medium wurden die Zellen auf 10 cm Platten ausgesät und in den Zellinkubator überführt.

## **3.2 Herstellen genveränderter Zelllinien**

### **3.2.1 Klonieren der V2 Plasmide**

#### **3.2.1.1 Verdau des Vektors**

Der Vektor *CRISPR.V2* wurde mit der Restriktionsendonuklease BsmBI (gelagert bei -80 °C) für 1 h bei 55 °C verdaut. Es wurde 2 µl der Enzymlösung für 3,5 µg DNA benutzt, mit 5 µl *Smartbuffer (2.1)* 10x gemischt und auf ein Endvolumen von 50 µl aufgefüllt und 1 h bei 37 °C inkubiert.

#### **3.2.1.2 Agarosegel**

Die Auftrennung von DNA Proben nach Größe wurde mittels einer Elektrophorese in einem Agarosegel durchgeführt. Um ein 1 % Agarosegel vorzubereiten wurde 1 g Agarose mit 100 ml TAE Puffer (1x) vermischt. Die Mischung wurde in einer Mikrowelle aufgekocht und kühlte anschließend ab, bis sie handwarm war. 10 µl Ethidiumbromid (5 µg/µl) wurden in die Lösung zugegeben. Anschließend wurde der Ansatz auf eine Schale mit Kamm gegossen. 2 µg DNA wurden mit 6-fach Ladepuffer gemischt und Wasser zum Auffüllen bis 20 µl zugegeben. Zur Größenkontrolle wurde eine Tasche mit 8 µl *Generuler™ DNA Ladder Mix* gefüllt. Mittels eines *Bio-Rad PowerPac Basic* wurden die Proben mit 150 V für 45 min Richtung Anode gezogen. Eine Bildkontrolle

wurde mit UV-Licht und dem *Gel iX20 imager* durchgeführt. Beim Klonen wurde der gewünschte Bereich mit einem sauberen Skalpell unter UV-Licht Kontrolle aus dem Gel geschnitten.

#### **3.2.1.3 DNA Extrahierung aus Agarosegel**

DNA wurde mit dem *GeneJET Gel Extraction Kit* aus Agarosegelen extrahiert. Zu den Gelstücken wurden 500 µl *binding buffer* hinzugefügt. Dieser Ansatz wurde für 10 min bei 55 °C inkubiert. Des Weiteren wurden die Anleitungen des Kits befolgt.

#### **3.2.1.4 Doppelstrangbildung der gRNAs**

Um Doppelstränge aus den komplementären Oligonukleotiden der gRNAs zu bilden wurden je 1 µl der Oligonukleotide mit 1 µl *T4 DNA-Ligase* Puffer gemischt und auf 20 µl Gesamtvolumen mit Wasser aufgefüllt. Dieser Ansatz wurde für 5 min auf 95 °C erhitzt und kühlte dann zu Zimmertemperatur ab. Anschließend wurde der Ansatz mit 180 µl ddH<sub>2</sub>O verdünnt.

#### **3.2.1.5 Ligation**

Der Ligationsansatz wurde gemischt und bei 1 h bei 37 °C inkubiert.

Ligationsansatz:

- 1 µl Vector
- 1 µl des Doppelstrangansatzes
- 1 µl *T4 Ligation*-Puffer
- 1,5 µl *T4 DNA Ligase*
- 6,5 µl H<sub>2</sub>O

#### **3.2.1.6 Transformation**

*STBL3* Bakterien (*xlgold*) wurden mit dem Ansatz des ligierten Vektors transformiert. 100 µl Ansätze der Bakterien waren bei -80 °C vorrätig, diese wurden auf Eis aufgetaut. Dann wurden 2 µl des Ligationsansatzes dazugegeben. Durch Anschnipsen des Eppendorfgefäßes wurde der Ansatz vermischt, und 30 min auf Eis inkubiert. Dann folgte ein Hitzeschock bei 42 °C für 1 min, sodass die kompetenten Bakterien das Plasmid aufnahmen. Daraufhin wurde dem Ansatz 500 µl pures LB-Medium hinzugegeben.

Dieser Ansatz wurde bei 1000 rpm (*rounds per minute*) (Schütteln) bei 37 °C für 1 h inkubiert. Danach wurde das LB-Medium abzentrifugiert bei 2000 rpm, Raumtemperatur und 3 min, der Überstand verworfen und die Bakterien in 100 µl LB-Medium mit Pipette wiederaufgenommen und auf einer Agar<sup>Carb+</sup> Platte ausgestrichen und über 12 h bei 37 °C inkubiert.

### 3.2.2 Colony PCR

Die über Nacht gewachsenen Bakterienkolonien wurden gepickt und eine *ColonyPCR* durchgeführt. Hierzu wurde mit einer Pipettenspitze eine Kolonie gepickt, welche dann auf einer 96-*well* Platte in den untenstehenden Mix zur PCR getunkt wurde, und daraufhin in einer 96-*well* Platte mit LB-Medium plus Amp 100 µg/ml getunkt, diese wurden für 24 h bei 37 °C inkubiert. Dann wurde die PCR durchgeführt und ein Saccharosegel zum Nachweis eines PCR-Produktes der gesuchten gRNA im *V2Plasmid* gegossen. Wenn das gewünschte Produkt nachgewiesen wurde, wurde aus dem Ansatz, der im Medium gewachsen war, ein *Maxiprep* vorbereitet.

PCR-Mix für *ColonyPCR*:

- H<sub>2</sub>O (9,4 µl)
- *U6 forward primer* (1 µl)
- MgCl (50 M; 0,4 µl)
- *ReadyMix* (10 µl)
- *reverse Primer gRNA AAAC* (0,1 µl)
- Bakterienkolonie (0 µl)

PCR-Programm:

- 1 Zyklus
- 5 min 94 °C
- 35 Zyklen
- 1 min 95 °C
- 1 min 55 °C
- 2 min 72 °C
- 1 Zyklus
- 4 °C Temperatur halten

### 3.2.2.1 *Maxiprep*

Die mittels PCR bestätigten Bakterien der 96-well Platten wurden in einem Erlenmeyerkolben mit 50 ml *LB-Brothlegrowth* und 100 µg/ml Amp gegeben und für 14 h bei 200 rpm schüttel-inkubiert. Die Ansätze der Transformation wurden in Zentrifugenröhrchen mit 50 ml gefüllt und bei Raumtemperatur mit 4000 G 10 min zentrifugiert. Darauffolgend wurde der Überstand abgegossen und das *Pellet* (Sediment) in 3 ml 37 °C warmem Resuspensionspuffer mit RNase 5 min bei Raumtemperatur inkubiert. 3 ml Lysepuffer wurden hinzugefügt und der Ansatz für weitere 5 min inkubiert, daraufhin wurden 3 ml des Präzipitationspuffers hinzugefügt. Der Ansatz wurde 15 min auf Eis inkubiert und dann mit 4000 G 20 min bei Raumtemperatur zentrifugiert. Der Überstand wurde in das mit einem Filter versehenen Zentrifugationsgefäß gegeben. 6 ml Isopropanol wurden hinzugegeben und der Ansatz mit 12000 U/min bei 4 °C 20 min zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das *Pellet* in 400 µl dH<sub>2</sub>O gelöst, der Ansatz wurde 5 min bei Raumtemperatur inkubiert und wurde dann in ein 2 ml Eppendorfgefäß überführt. Auf diesen wurde unter dem Abzug 1 ml eines Phenol/Chloroform/Isoamylalkohol-(25:24:1)-Gemischs gegeben. Die Füllung des Eppendorfgefäßes wurde für 5 Sekunden mit dem *Vortex* Gerät vermischt und für 20 min bei 12000 G zentrifugiert. Die oberstehende Wasserphase wurde in ein neues Eppendorfgefäß überführt und mit 1 ml 100 % EtOH vermischt. Dieser Ansatz wurde wiederum bei 12000 G und 4 °C für 15 min zentrifugiert. Der Überstand wurde abgegossen und das *Pellet* wurde luftgetrocknet. Das trockene *Pellet* wurde in 100 – 500 µl Wasser gelöst, die Konzentration der Nukleinsäuren mittels *NanoDrop* gemessen und auf 1 µg/µl verdünnt.

### 3.2.3 **Virus Produktion**

#### 3.2.3.1 *Transfektion in HEK293T Zellen*

Transfektionen von Zellen wurden grundsätzlich mittels des Polyethylenimins (PEI) bei zu 70 % konfluenten Zellmedien durchgeführt. Es wurde ein Ansatz aus dem jeweiligen *CRISPR.V2* Plasmid, den zwei Helferplasmiden *psPAX2* und *pMD2G* im Verhältnis 1:1:1 sowie PEI (1µg/µl) in reinem Zellkulturmedium nach Tabelle 13 angesetzt. Dieser Ansatz

wurde 15 min inkubiert und dann auf die Zellen gegeben. Danach wurden die Zellen mit neuem DMEM/10 % FBS/Pen/Strep aufgefüllt. Die Zellen wurden bei 37 °C inkubiert.

**Tabelle 13: Plattengrößen Zellkultur**

<b>Plattengröße</b>	<b>Zellmenge ca.</b>	<b>Menge an DMEM ml</b>	<b>Menge an gesamt DNA µg</b>	<b>Menge an PEI µl</b>
6-well	$0.5 \times 10^6$	0,2	3	9
10 cm	$4.0 \times 10^6$	1	15	45
15 cm	$9.0 \times 10^6$	2	30	90

### 3.2.3.2 Virusernte

Nach 48 h Inkubation wurde das Virus geerntet. Hierfür wurde das überstehende Zellmedium vorsichtig abgezogen.

### 3.2.3.3 Viruskonzentration

Der Virus wurde konzentriert durch Zentrifugation von 5 ml des Ansatzes durch 400 nm Porenfilter, die im Filter hinterbliebene Masse wurde in Zellmedium resuspendiert.

### 3.2.4 Infektion

Die zu infizierenden Zellen wurden auf 10 cm Platten mit je 5 ml des Virusmediums übergossen. 5 ml frisches Medium wurde hinzugefügt. Die Zellen wurden für 48 h in diesem Ansatz inkubiert.

### 3.2.5 Selektion

48 h nach der Infektion wurden die infizierten Zellen mittels des Nukleosid-Antibiotikums Puromycin selektiert. Hierzu wurde das Zellmedium mit 2 µg/ml Puromycin versetzt. Nach jeweils 4 wurde das Medium gewechselt und durch die Puromycin-Selektion abgestorbene Zellen entfernt. Die als Klone wachsenden resistenten Zellen wurden nach 5 Tagen mittels Pipette von der Platte gekratzt und auf eine eigene Platte übertragen, um dann aus der Zellkultur weitere biochemische Untersuchungen anzustellen.

### **3.3 Biochemische Nachweismethoden**

#### **3.3.1 Western Blot**

##### ***3.3.1.1 Proteinisolation***

Zu 70 % konfluente Platten wurden zum Ernten der Zellen für Western Blots benutzt. Während des Vorganges befanden sich die Platten oder Eppendorfggefäße, wenn nicht anders erwähnt, zu jeder Zeit auf Eis. Zur Extraktion von Protein wurde bei den zu untersuchenden Platten der Zellkultur das Medium abgesaugt und 0,5ml PBS (für 6-well Platten, 1 ml für 10 cm Platten) aufgetragen. Die Zellen wurden mit einem Schaber von der Plattenfläche gelöst. Die in PBS gelösten Zellen wurden in 1,5 ml Eppendorfggefäße überführt, welche bei Raumtemperatur 4 min bei 2000 rpm zentrifugiert wurden. Mittels Pipette wurde der Überstand nach Zentrifugation entfernt. Es wurde 200 µl RIPA-Puffer mit Proteinase und 1/100 *InhibitorCocktail* hinzugegeben. Danach wurden die Eppendorfggefäße samt Inhalt in flüssigem Stickstoff schockgefroren, dann sofort in 37 °C Wasserbad aufgetaut. Insgesamt wurden 3 Gefrierzyklen durchgeführt. Das Protein wurde dann bei 140000 rpm 15 min bei 4 °C zentrifugiert. Der Überstand wurde in neues Eppendorfggefäß überführt, das *Pellet* verworfen.

##### ***3.3.1.2 Proteinmengenbestimmung mit Bradford-Lösung***

Die Menge des Proteins in der Lösung wurde mit *Bradford* Lösung bestimmt. 1,5 µl der Proteinlösung wurde mit 1 ml *Bradford* Lösung in einer Phirole gemischt. Dann wurde die Extinktion bei 660 nm gemessen. Die Konzentration des Proteins in den Proben wurde über eine interpolierte Standardkurve mit BSA berechnet.

##### ***3.3.1.3 Auftrennung der Proteinproben***

Gele wurden mit entweder 10 % oder 7,5 % Acrylamid gegossen.

Die Proteinproben wurden mit *Samplebuffer* (2x 125 mM Tris HCl, pH6,8, 4 % SDS, 0,01 % Bromphenolblau, 2 % 2-Mercaptoethanol) im Verhältnis 1:1 vermischt, für 5 min auf 95 °C erhitzt, anschließend für 5 min bei 4 °C und 12000 G zentrifugiert, und dann in die Kammtaschen der Gele gefüllt.

Die Proben liefen für den Durchlauf des *Stacking Gels* mit einer Spannung von 80 V, für die Auftrennung im *Running Gel* wurde eine Spannung von 130 V angelegt, die Dauer wurde mithilfe des aufgetragenen Markers kontrolliert.

#### **3.3.1.4 Transfer der Proteinproben**

Für den Transfer der aufgetrennten Proteinproben auf eine *Immobilon*-Membran wurde eine nasse Transfermethode benutzt. Hierzu wurde folgender Material-Aufbau verwendet: Schwamm, zwei *Whatmanpaper*, Gel, Membran, zwei *Whatmanpaper*, Schwamm. Sämtliche Materialien des Aufbaus wurden vor Aufschichtung in Transferpuffer getränkt. Die Membran wurde zuerst 2 min in MeOH aktiviert, folgend für 2 min in ddH<sub>2</sub>O getränkt und anschließend in Transferpuffer aufbewahrt, bis sie auf den Aufbau geschichtet wurde. Der Transfer wurde bei 140 mA über 12 h durchgeführt.

#### **3.3.1.5 Färbung mit Antikörpern**

Die Membranen wurden nach dem Transfer für 1 h im Blockpuffer (dH<sub>2</sub>O mit 0,1 % Casein 0,2 % PBS) geblockt. Dann wurden sie für 12 h im Ansatz für den ersten Antikörper (dH<sub>2</sub>O, 0,1 % Casein, 0,2 % PBS, 0,1 % Tween20, Antikörper nach Angabe) unter Drehung bei 4 °C inkubiert. Es folgten 3 Waschschrte für jeweils 5 min im Waschpuffer (dH<sub>2</sub>O 0,2 % PBS, 0,1 % Tween20). Die Lösung für den zweiten Antikörper (dH<sub>2</sub>O, 0,1 % Casein, 0,2 % PBS, 0,1 % Tween20, 0,01 % SDS, Antikörper nach Angabe) wurde für 1 h bei Raumtemperatur in lichtgeschützten Behältern inkubiert. Es folgten weitere 3 Waschschrte für jeweils 5 min in Waschpuffer, dann wurde die Membran gescannt.

### **3.4 Inhibition des Ubiquitin-Proteasom Systems mittels MG132**

Der Proteasominhibitor MG132 wurde genutzt, um eine Blockade des Ubiquitin-Proteasom Systems zu erreichen und so einen Abbau ubiquitinylierter Proteine zu verhindern. Die Proben wurden in der Zellkultur mit 20 µg/ml MG132 in EtOH (20 mg/ml) für 6 h behandelt. Kontrollen wurden mit 1 µl/ml EtOH behandelt. Die Zellen wurden nach 6 h geerntet und ein Western Blot wurde durchgeführt.

### 3.5 Co-Immunopräzipitation

Die Immunopräzipitation wurde durchgeführt mit 0,25 mg *Pierce™ Protein A/G Magnetic Beads*, 0,5 µg des Antikörpers gegen  $\beta$ -Catenin und 500 µg Protein-Lysat. Für die Spezifitätskontrolle wurden die *Beads* mit *rbIgG* inkubiert. Es wurde ein Western Blot auf USP10 und  $\beta$ -Catenin durchgeführt.

### 3.6 Immunofluoreszenz

Zellen für Immunofluoreszenz wurden in 6-well Platten auf Deckgläschen ausgesät. Wenn die Zellen die Deckgläschen zu 70 % bewachsen hatten, wurde das Medium abgesaugt, die Deckgläschen mit der zellbewachsenen Seite nach oben in 24-well Platten gegeben, welche mit PBS gefüllt waren. Nach 3 min Wartezeit wurde das PBS vorsichtig abgegossen und 4 % Formalin (300 µl) auf die Deckgläschen gegeben. Nach 7 min wurde dieses Formalin abgeschüttet und die *wells* 3 mal für jeweils 5 min mit PBS gespült. Anschließend wurden die *Coverslips* für 5 min mit dem Detergens *Triton X-100* (0,5 % in PBS) bedeckt, um die Zellmembranen für die Antikörper permeabel zu machen. Nachdem das *Triton X-100* verworfen wurde, wurden die Zellen mit Blockserum (HS + Azid + TBS) für 30 min inkubiert, um unspezifische Proteinbindungen der Antikörper zu verhindern. Danach wurden die Zellen mit dem ersten Antikörper inkubiert. Hierfür wurde eine Petrischale mit einem in PBS getränkten *Whatmanpaper* belegt, hierauf wurde eine Paraffinfolie gespannt, worauf wiederum ein 20 µl Tropfen mit Ansatz mit dem ersten Antikörper (BSA/PBS + Azid + Tubulin (1:1000) und weiterer Antikörper) gegeben wurde. Die *Coverslips* wurden mit der mit Zellen beschichteten Seite auf diesen Tropfen gelegt, sodass sie komplett benetzt waren. Dieser Ansatz wurde über 12 h bei Raumtemperatur inkubiert. Danach wurden die Deckgläschen in den 24-well Platten erneut in 3 Schritten je 5 min in PBS gewaschen. Anschließend wurden die Deckgläschen auf einen Tropfen des Ansatzes mit dem 2. Antikörper (BSA/PBS + Azid + DAPI (1:5000) und 2. Antikörper) analog zum 1. Antikörper gelegt. Ab jetzt wurden die Deckgläschen im Dunkeln gelagert. Im Ansatz des 2. Antikörper wurde für 1 h inkubiert, worauf 3 5-minütige Waschschrte mit PBS in der 24-well Platte folgten. Dann wurden die *Coverslips* mit *Mowiol* auf Glasstreifen befestigt und das *Mowiol* trocknen gelassen. Die Glasscheiben wurden lichtgeschützt über Nacht aufbewahrt. Überschüssiges *Mowiol*

wurde mit EtOH oder Isopropanol nach Aushärtung weggewischt. Die Bilder wurden mit einem *Zeiss* Mikroskop angefertigt.

### **3.7 PCR auf genomische DNA**

#### **3.7.1 Vorbereitung der Proben**

Das Medium wurde abgesaugt, die Zellen wurden mit dem Schaber geerntet und in ein Eppendorfgefäß überführt. Nach kurzer Zentrifugation (8000 G, 3 min) wurde der Überstand abgegossen und die Zellmasse in 75 µl „*base solution – working stock*“ 1x resuspendiert. Die Proben wurden bei 95 °C auf dem Heizblock für 30 min gehalten. Danach wurden die Eppendorfgefäße für 5 min auf Eis abgekühlt. Es wurde 75 µl „*neutralization solution*“ 1x hinzugefügt. Mit 2 µl dieses Ansatzes wurde eine 10 µl PCR Reaktion nach Punkt 3.2.2 durchgeführt.

### **3.8 Nachweismethoden des WNT-Signalwegs**

#### **3.8.1 Luciferase Assay**

Der *TOP-FLASH Reporter Assay* wurde benutzt um die Aktivität des WNT-Signalwegs an seinem Effektor dem *TCF/LEF(TOP)* Promotor zu messen. Zellen wurden mit zwei unterschiedlichen Plasmiden transient infiziert. Das *TOP-Flash* Plasmid enthält nach Hersteller 7 *TCF/LEF* Strukturen (statt wie ursprünglich veröffentlicht 8) vor dem *Firefly-Luciferase* Gen. Als Kontrolle wurde das *FOP-Flash* Plasmid verwendet, dieses enthält 6 mutierte *TCF/LEF* Bindestellen (statt wie ursprünglich veröffentlicht 8). Wird  $\beta$ -Catenin in transfizierten Zellen stabilisiert, so kann es an die *TCF/LEF* Stellen binden, aber nicht an die mutierten Stellen. Im Falle einer Bindung wird die *Firefly Luciferase* exprimiert und ihre Aktivität kann mittels Abstrahlung gemessen werden.[79]

Es wurden 250 ng *TOP/FOP* Plasmid benutzt und zum Normalisieren des Signals 75 ng des *Ubi-Renilla* Plasmids, diese wurden mit PEI vermischt in Zellen gegeben (siehe Punkt 3.2.3.1). Die Zellen wurden wieder ausgesät und nach 24 h je nach Versuch mit 15 mM LiCl stimuliert.

Nach weiteren 24 h wurden die Zellen geerntet. Hierzu wurde das Medium abgezogen, sie wurden in 1x PBS gewaschen. Danach wurde in die 6-well Platten je 200 µl *Passive Lysis Buffer* gegeben und die Zellen wurden für 10 min auf Eis inkubiert und anschließend resuspendiert im Puffer.

Der Assay-Puffer und das Substrat für den *Firefly Luciferase Assay* wurden vorbereitet und auf weißen 96-well Platten auf 20 µl Zell-Lysat gegeben. Mittels des *GLOMAX luminometers* wurde in den Ansatz 70 µl Assay-Puffer sowie 25 µl Substrat gegeben.

Für die Messung der *Renilla* Aktivität wurden 10 µl der lysierten Zellen auf eine weiße 96-well Platte aufgetragen. Das im zugehörigen Reaktionspuffer gelöste Coelenterazin-Substrat wurde angesetzt und mit einer Multipipette wurden je 100 µl auf die Zell-Lysat Proben gegeben.

Pro Versuch wurden jeweils Triplikate pipettiert. Mittels Excel wurde die Aktivität der *Firefly Luciferase* zur zugehörigen *Renilla*-Aktivität normalisiert und Mittelwerte der technischen Triplikate gebildet. Der *Luciferase Assay* wurde durchgeführt von Julia Hauptstein geb. Martini und Bastian Krenz.

### **3.8.2 GFP Bestimmung mittels Durchflusszytometrie (FACS)**

Als weitere Nachweismethode von WNT-Aktivität wurde das Plasmid *TOP-GFP.mc* benutzt. Bei diesem Plasmid steht das *GFP (green fluorescent protein)*-Gen unter der Kontrolle eines 7-fachen *TOP(TCF/LEF)* Promotors, also wird GFP in Abhängigkeit der WNT-Signalwegaktivierung exprimiert [80]. Aus dem Plasmid wurde nach Verdau mit dem Restriktionsenzym ein Lentivirus in HEK293T Zellen hergestellt (siehe Punkt 3.2.1 -3.2.3) hierfür wurden beide Plasmide, *CRISPR.V2* und *TOP-GFP* mit *BsmBI* verdaut. Der Virus wurde unter S2 Bedingungen geerntet und die zu untersuchenden Zellen damit infiziert. Nachdem die Zellen nicht mehr infektiös waren, wurden Sie in S1 Zellkultur genommen. Die Zellen wurden geerntet mittels Trypsinbehandlung und in 10 ml frischem Medium in 15 ml Gefäßen überführt. Nach 5 min Zentrifugation mit 400 G bei 4 °C wurde der Überstand verworfen und die Zellen in 10 ml PBS gewaschen. Es erfolgte eine erneute Zentrifugation bei 400 G und 4 °C. Danach wurden die Zellen in 5 ml PBS

resuspendiert und eine FACS Untersuchung mit dem Gerät *BD FACSCanto II* durchgeführt. Die Analyse erfolgte mit der Software *FlowJo*.

### **3.8.3 Lithiumchlorid zur experimentellen WNT-Signalwegaktivierung**

Das Chloridsalz des Alkalimetalls Lithium ist ein in der Psychiatrie zur Stabilisierung eingesetztes Medikament mit nicht komplett verstandener Wirkweise. Einer der bekannten, postulierten molekularen Wirkmechanismen ist eine Blockade von GSK3, daher wird Lithiumchlorid (LiCl) in experimentellen Settings zur Aktivierung des WNT-Signalwegs durch Blockade des  $\beta$ -Catenin *destruction complex* eingesetzt [81, 82] Zur Aktivierung des Signalweges wurden Zellen mit LiCl 15 mM 24 h vor Versuchsdurchführung behandelt.

## **3.9 Wachstumsassay der HT29 Zellen (*USP10 knockout*)**

Um das Wachstum der HT29 Zellen mit und ohne *USP10 knockout* zu vergleichen wurden je 200 Zellen in eine 96-well Platte gesät und mit Medium bedeckt. Diese wurden an Tag 1,2,3 und 4 mit 8 % Formalin fixiert, mit DAPI gefärbt (1:10000 in PBS), in PBS gewaschen und mittels des *Operetta* Gerätes ausgezählt. Die Auszählung und Färbung wurde von Dr. Ursula Eilers und Dr. Christina Schüle-Völk durchgeführt.

## **3.10 Histologische Färbungen**

### **3.10.1 Rehydratation der TMAs**

Die Mikrogewebsproben (TMA (*tissue microarray*)) wurden schrittweise deparaffinisiert und rehydriert für 2x 5 min. in Xylen, für 2x 3 min in EtOH (100 %), für 2x 3 min in EtOH (95 %), für 2x 3 min in EtOH (70 %), für 3 min in EtOH (50 %) und für 3 min in H<sub>2</sub>O.

### **3.10.2 Freilegen der Epitope**

Die TMAs wurden in den vorgewärmten Citrat-Puffer (10 mM Natriumcitrat pH 6,0) in 3 Zyklen mit der Mikrowelle jeweils 5 min auf 750 Watt, 600 Watt und 360 Watt erhitzt und anschließend unter fließendem Leitungswasser abgekühlt. Es folgte ein einminütiger Waschschrift in PBS. Durch die Inkubation von *Triton X-100* 0,2 % in PBS bei 5 min

Raumtemperatur wurden die Zellmembranen permeabilisiert. Es folgten zwei zweiminütige Waschschrte in PBS. Im Falle der DAB (Diaminobenzidin)-Färbung wurde an dieser Stelle ein Inkubationsschritt für 10 min in H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (3 % in PBS) durchgeführt, gefolgt von einem 3-minütigen Waschschrte mit PBS. Mittels eines hydrophoben Stiftes wurden die einzelnen Proben umkreist, um so später den aufgetragenen Antikörpermix nicht durch Ablauf zu verlieren.

### 3.10.3 Blocken und Färben der TMAs

Die TMAs wurden in 3 % BSA in PBS bei Raumtemperatur für 1 h geblockt. Wenn Mausantikörper benutzt wurden, wurde 1:100 *donkey-anti-mouse-IgG-HRP (sc-2314)* in die Blocklösung zugegeben.

600 µl des primären Antikörpers (1:50 - 1:100 in 1 % BSA in PBS), wurde auf die umkreisten Stellen aufgetragen, woraufhin die TMA in der Lösung bei 4 °C für 12 h inkubiert wurden. Danach folgten 3 Waschschrte mit PBS für 5 min. Für die DAB-Färbung wurde entweder der *polyclonal goat anti-rabbit biotinylated Dako E-0432* Antikörper 1:2000 1 h oder der *SignalStain Boost IHC* 30 min jeweils bei Raumtemperatur in 3 % BSA in PBS inkubiert.

Für Immunofluoreszenzfärbungen wurden bei diesem Inkubationsschritt die Antikörper *donkey-anti-goat Alexa488 (Invitrogen 11055)* and *goat-anti-mouse Alexa568 (Invitrogen11019)* 1:500 in 3 % BSA in PBS für 1 h inkubiert. Immunofluoreszenzfärbungen wurden lichtgeschützt durchgeführt. Es folgten 3 Waschschrte für 10 min mit PBS.

Für die DAB-Färbung wurden parallel die Reagenzien des *Vectastain ABC-Kits* 1:100 mit PBS vermischt und 30 min bei Raumtemperatur inkubiert. Diese wurden nach den Waschschrten auf die TMAs gegeben und für 30 min bei Raumtemperatur inkubiert. Es folgten 3 Waschschrte für 5 min mit PBS. Mithilfe des *signal stain DAB substrate Kits (Cell signalling #8059)* wurden die TMA dann nach Protokoll des Herstellers entwickelt (1 ml Lösung mit 39 µl *chromogen* Konzentrat) unter Beobachtung wurden die Proben bis zur gewünschten Intensität gefärbt, der Prozess dann durch Eintauchen in Wasser unterbrochen. Daraufhin wurde die Gegenfärbung durch Auftragen von 1:3 verdünntem

Hämatoxylin durchgeführt. Abwechselnd wurden die Glasscheiben erst in Hämatoxylin Lösung und sofort danach in Wasser getaucht, dieser Vorgang wurde 4-mal wiederholt. Danach wurden die Glasscheiben mit TMA unter fließendem dH<sub>2</sub>O gewaschen. Danach wurden sie 20-mal in die *blueing solution* getaucht und für 2 min unter laufendem Wasser abgewaschen. Zur Dehydrierung der TMA wurden sie für je 2x 2 min nacheinander in Becken mit 70 %, 95 % und 100 % EtOH getaucht. Danach folgten 2 Schritte während derer sie für je 5 min in 100 % Xylen getaucht wurden. Es wurden Deckplatten auf die Glasplatten mit 2 Tropfen *mounting media (Cytoseal 60, Thermo scientific 8310-4)* gelegt.

Immunofluoreszenz Proben wurden mit DAPI 1 µg/ml in H<sub>2</sub>O für 15 min gegengefärbt. Daraufhin folgten 2 Waschschrte für 5 min in PBS. Dann wurden die Glasplatten mit Sudanschwarz 0,1 % für 5 min inkubiert. Es folgten 2 weitere Waschschrte mit PBS. Daraufhin wurden eine Deckplatte mit *fluoromount* (Sigma F4680) aufgetragen.

## 4 Ergebnisse

### 4.1 Vorarbeiten

Bekannte Regulatoren	Neue Treffer	Lokalisation
USP: USP47 USP34	JAMM: MPND	Nukleus
	MYSM1	Nukleus
	STAMBPL1	Cytoplasma
	USP: USP10	Cytoplasma
	USP11	Nukleus
	USP20	Cytoplasma
	USP21	Cytoplasma
	USP32	Cytoplasma
	USP45	Nukleus

**Abbildung 7:** Schematische Darstellung des siRNA Screens  
Zur Verfügung gestellt von Dr. Markus Diefenbacher.

Um DUBs als Kandidaten für die Beeinflussung der Höhe des Proteinspiegels von  $\beta$ -Catenin zu identifizieren, wurde als Vorarbeit von Dr. Markus Diefenbacher in Zusammenarbeit mit Dr. Ursula Eilers und Dr. Christina Schüle-Völk ein siRNA-Screen mit der *Human ON-TARGETplus siRNA Library - Deubiquitinating Enzymes* durchgeführt. APC-mutierte HT29 Zellen wurden mit siRNA transfiziert und anschließend mittels Immunofluoreszenz auf  $\beta$ -Catenin gefärbt. Ausgewertet wurde die relative Intensität des Immunofluoreszenz-Signals, im Vergleich zu mit *scrambled* siRNA transfizierten Zellen, in der gesamten Zelle, sowie unterteilt im Zytosol und im Zellkern. Als Marker für den Zellkern wurde DAPI verwendet. Als Treffer, das heißt Kandidaten für weitere Untersuchungen, wurden DUBs gewertet, deren Signalintensität sich von der Kontrolle unterschieden. Die genannte Lokalisation beschreibt die Hauptlokalisierung der DUB (Abbildung 7). Zum Zeitpunkt des Experiments waren USP47 und USP34 bereits als Regulatoren von  $\beta$ -Catenin beschrieben, USP20 wurde 2018 beschrieben [55, 62, 69].

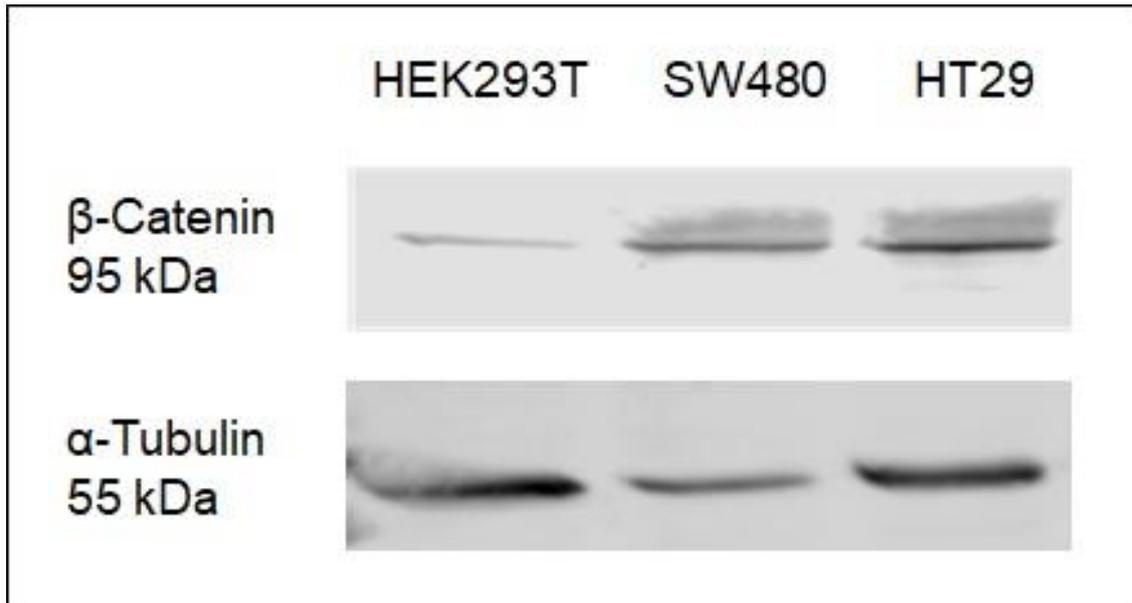
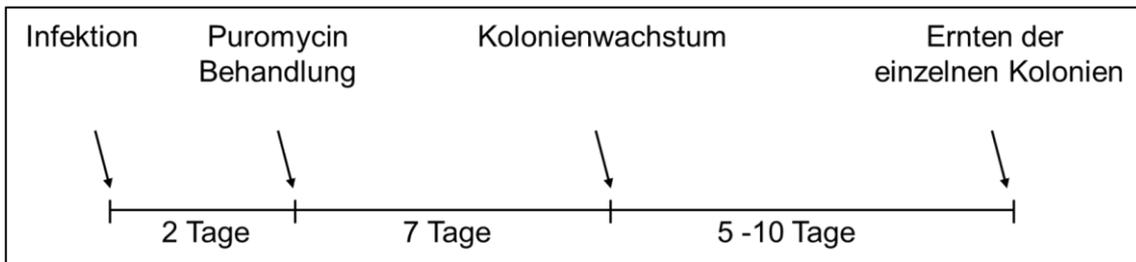


Abbildung 8: Vergleich der  $\beta$ -Catenin Proteinspiegel in den genutzten Zelllinien

## 4.2 CRISPR/Cas9 auf Deubiquitinasen

Um die im siRNA-Screen identifizierten DUBs in Zelllinien zu untersuchen, wurden in das Plasmid *lentiCRISPRv2* ein oder zwei gRNAs geklont, welche auf exonische Sequenzen der jeweiligen DUB gerichtet waren. Basierend auf diesen Plasmiden wurden Lentiviren hergestellt, um damit *APC* Wildtyp sowie *APC* mutante Zelllinien zu infizieren. Hier wurden die *APC* Wildtyp Zelllinie HEK293T und die *APC* mutanten Zelllinien SW480 und HT29 verwendet. Durch die lentivirale Integrase erfolgte die Etablierung von stabilen Zelllinien, welche sowohl SpCas9 als auch sgRNA gegen die identifizierten DUBs exprimieren. Die Zelllinien wurden gewählt, um HEK293T Zellen ohne aktivierende Mutation im WNT-Signalweg mit den Darmkrebszelllinien HT29 und SW480 mit *APC*-Mutation zu vergleichen. Die vorliegenden  $\beta$ -Catenin Proteinspiegel der Zelllinien wurden im Western Blot dargestellt. HEK293T Zellen haben keine Mutation in *APC* und zeigen weniger  $\beta$ -Catenin Expression im Western Blot als Zellen mit einer *APC* Mutation (Abbildung 8). Durch die Nuclease SpCas9 sollten nun Doppelstrangbrüche innerhalb der kodierenden Genabschnitte der betreffenden DUBs entstehen, gefolgt von einer „fehlerhaften“ Reparatur mittels NHEJ, welches einen *frameshift* und somit einen *knockout* des jeweiligen Gens zur Folge hat. Die Selektion für eine erfolgreiche Infektion mit dem Lentivirus wurde mit Puromycin durchgeführt. Aus einzelnen infizierten Zellen wurden Klone kultiviert, dahinter stand die Annahme, dass

diese Klone aus einer einzelnen Zelle mit dem jeweiligen Effekt der CRISPR/Cas9 Behandlung entstand. Nachdem die Zellklone eine gewisse Größe erreicht hatte, wurden sie biochemisch auf einen Effekt des *knockouts* in Bezug auf  $\beta$ -Catenin-Proteinspiegel untersucht (Abbildung 9).



**Abbildung 9:** Schematische Darstellung des Zeitplans der Infektion und Selektion der Zellklone

Es bildeten sich unterschiedlich viele Klone in den verschiedenen Zelllinien, hier dargestellt in einer Übersicht (Abbildung 10). Jeweils 6 Klone wurden, wenn möglich, entnommen und in Zellkultur weitergeführt.

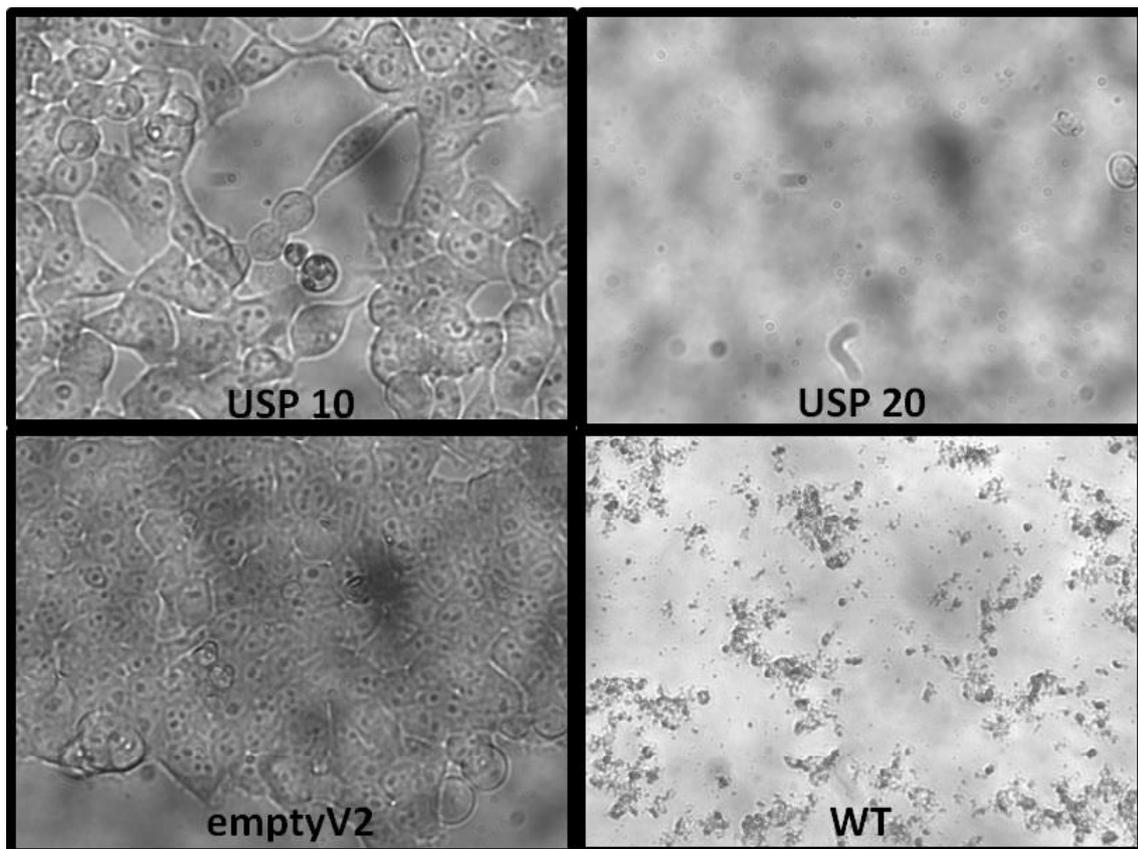
Zielgen	USP10	USP20	USP21	USP32	USP34	USP45	USP47	CTNNB1	Kontrolle
Anzahl gRNA	1	2	2	1	1	2	1	2	-
Zelllinie	HEK293T	✓	X	X	✓	✓	✓	✓	✓
	SW480	X	✓(2)	✓	✓	✓	✓	✓(1)	✓
	HT29	✓	✓(1)	X	✓	✓	✓	✓	✓

x: kein Kolonienwachstum; ✓: Kolonienwachstum, bei weniger als 6 Kolonien ist die Anzahl der Kolonien in Klammern angegeben.

**Abbildung 10:** Übersicht des Wachstums der Kolonien nach Selektion mit Puromycin

Um einen möglichst starken reduzierenden Effekt auf die Aktivität der DUBs zu erzielen, wählten wir den Ansatz des *knockouts* dieser Gene mittels CRISPR/Cas9. Hierbei zeigte sich nach dem CRISPR Ansatz, dass nicht aus jedem der Ansätze eine stabile Zelllinie entstand. Um nun eine der DUBs weiter zu untersuchen, musste eine Auswahl getroffen werden. Die Wahl fiel hier aus mehreren Gründen auf USP10: Während der Ansatz bei USP20 und USP21 den größten Effekt auf das Heranwachsen von Zellen hatte, war hier aber sowohl bei den Zellen ohne bekannte Mutation im WNT-Signalweg (HEK293T Zellen) als auch den KKK-Tumorzelllinien nur vermindertes Wachstum möglich. Dagegen zeigten Zellen mit USP10 sgRNA ein ähnliches Wachstumsmuster wie die

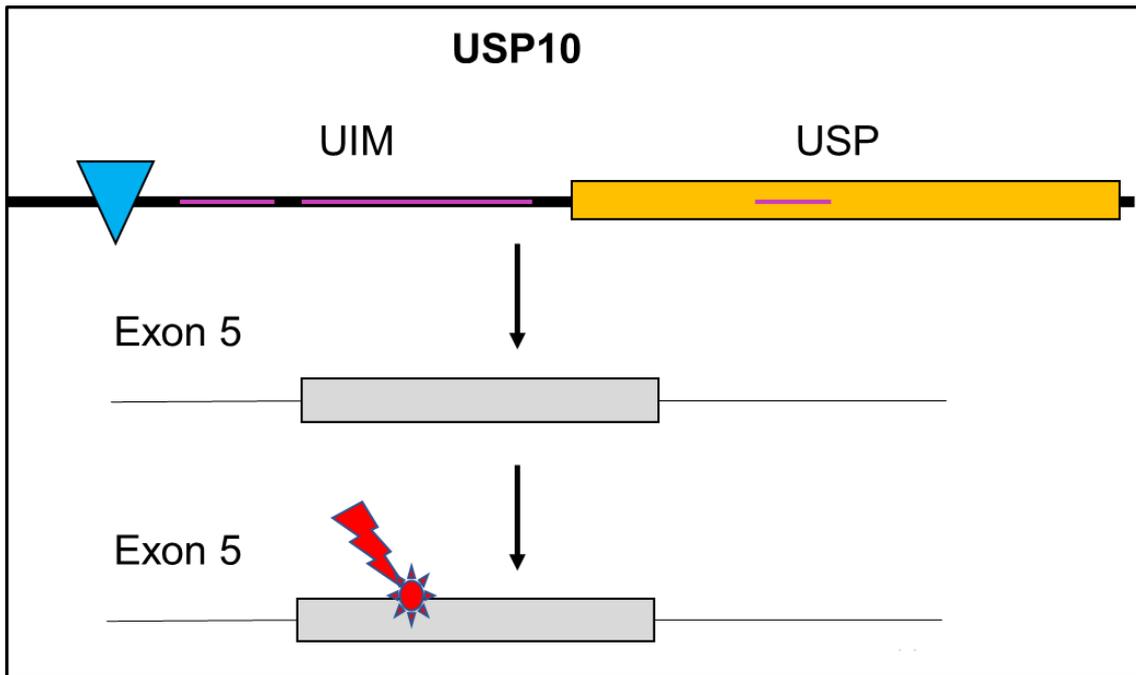
Zellen, welche mit sgRNA auf USP47, der zum Zeitpunkt des Experiments einzigen veröffentlichten DUB von  $\beta$ -Catenin, behandelt wurden [55]. SW480 Zellen zeigten kein Wachstum, aber HT29 Zellen und APC-Wildtyp HEK293T Zellen. Die mit USP10-CRISPR attackierten Zellen der Zelllinien HEK293T und HT29 zeigten subjektiv ein verlangsamtes Wachstum im Vergleich zu *non-targeting* Kontrollen (Abbildung 11). Aus diesen Gründen fiel die Entscheidung, weitere Untersuchungen an den USP10-CRISPR Zellen durchzuführen.



Links oben: HEK293T Zellen infiziert mit LentiV2 mit gRNAs gegen USP10; rechts oben: HEK293T Zellen infiziert mit LentiV2 mit gRNAs gegen USP20; links unten: HEK293T Zellen infiziert mit Leervektor ohne gRNA; rechts unten: nicht infizierte HEK293T Zellen. Vergrößerung 40x.

**Abbildung 11: Beispielhafte Bilder der Kolonien von infizierten HEK293T Zellen zum Zeitpunkt 7 Tage nach Puromycin-Selektion**

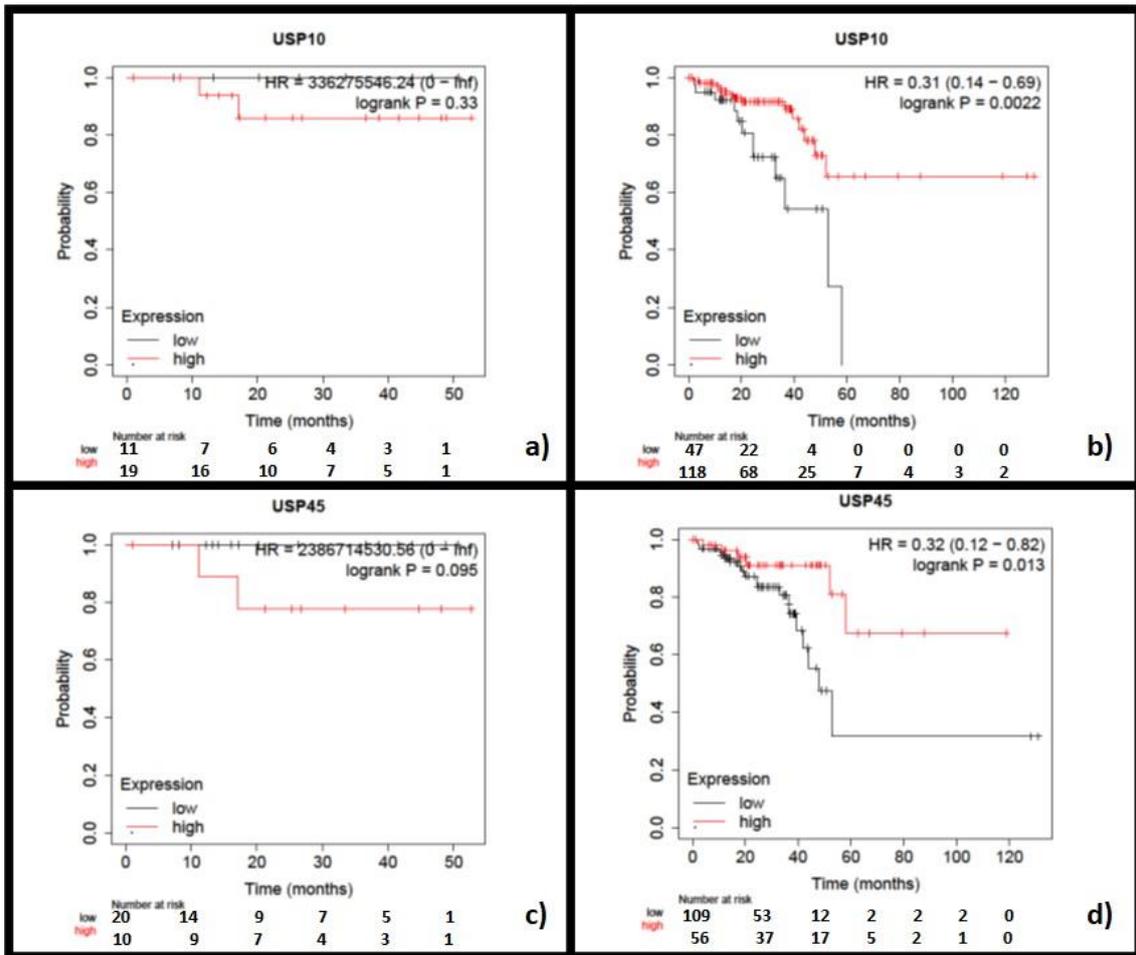
USP10 besteht aus 798 Aminosäuren. Die in dieser Studie verwendete sgRNA bindet im Exon 5 des Gens, dies befindet sich innerhalb des *Ubiquitin interacting motif* und N-Terminal des Peptidase-Zentrums. Durch SpCas9 hervorgerufene Doppelstrangbrüche werden also vor dem enzymatisch aktiven Zentrum eingeführt (Abbildung 12).



**Abbildung 12:** Schematische Darstellung des Proteins USP10, sowie der erwarteten Bindestelle der gRNA

### 4.3 USP10 in Krebserkrankungen

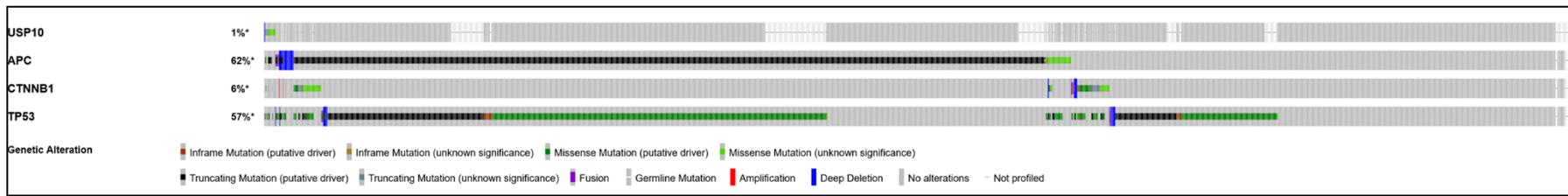
Um Hinweise auf eine Rolle von USP10 in Karzinomen des Magen-Darm-Traktes zu erhalten wurde eine Kaplan-Meier-Kurve von Rektumkarzinomen erstellt, in dem die Höhe der USP10 Expression mit dem Überleben korreliert wurde. In der Kaplan-Meier-Kurve zeigte sich allerdings, dass in den untersuchten Proben von Rektumkarzinomen in allen Stadien hohe mRNA Spiegel von USP10 mit einem besseren Überleben der Patienten einhergingen als niedrige Spiegel von USP10 mRNA. Wählte man zum Erstellen der Kurve nur Tumore des Stadiums 1, so zeigte sich ein besseres Überleben. USP45 wiederum zeigte ein ähnliches Bild beim Erstellen dieser Kaplan-Meier-Kurven (Abbildung 13).



a) USP 10 Tumorstadium 1 (Cut off 2043), b) USP10 alle Stadien (Cut off 1924), c) USP45 Stadium 1 (Cut off 391), d) USP45 alle Stadien (Cut off 332) Erstellt mit *USP10/Rectum adenocarcinoma*: kmplot.com (25.04.2021) [83]

**Abbildung 13: Kaplan-Meier-Kurven: Überleben von Rektumkarzinom-Patienten nach mRNA Expression von USP10 und USP45**

Außerdem zeigte eine Analyse mittels *cbioportal* [84, 85], dass im *USP10*-Gen in KRK, im Gegensatz zu häufig mutierten Genen wie *APC*, *CTNNB1* (das für  $\beta$ -Catenin kodierende Gen) und *TP53*, keine gehäufteten Mutationen vorkommen, was ein Hinweis auf eine wichtige Rolle der DUB in KRK-Tumorzellen ist (Abbildung 14).



*USP10* ist in weniger als 1 % der untersuchten Proben von Darmkrebszellen mutiert. Im Vergleich dazu finden sich Mutationen in für diese Krebsart typischen Genen wie *APC*, *CTNNB1* und *TP53* weitaus häufiger. cbioportal.com, colorectal adenocarcinoma TCGA Pan Cancer Atlas (07.03.2020)

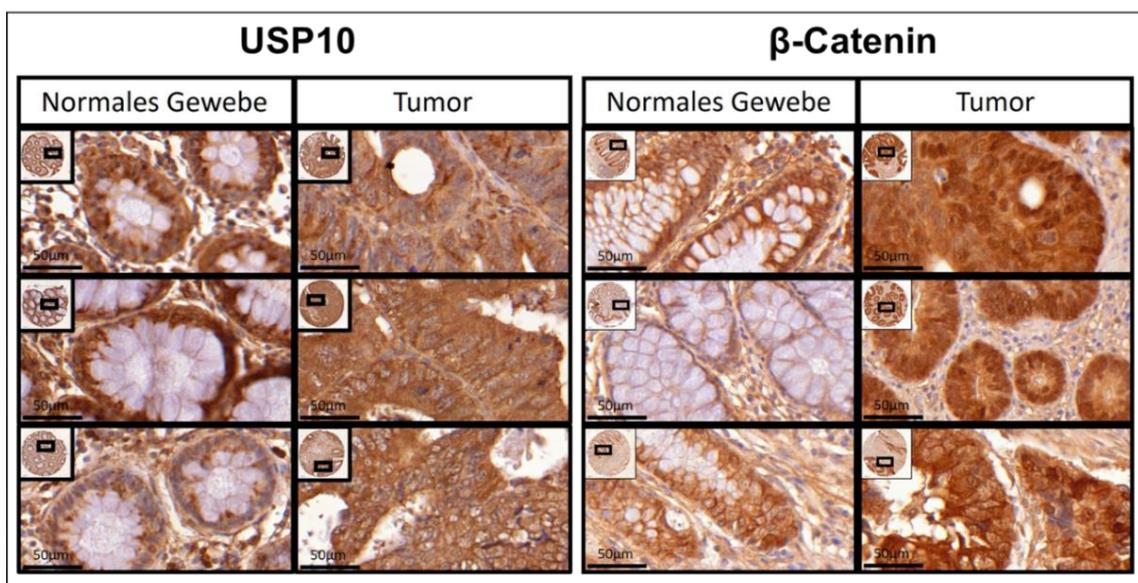
**Abbildung 14: Vergleich der Mutationsfrequenzen in KRK mittels c-Bioportal**

## 4.4 Histologische Färbungen

Zur weiteren Untersuchung von USP10 als mögliches Zielprotein für eine Beeinflussung des WNT-Signalwegs in KRK fertigten wir antikörperbasierte histologische Färbungen von TMAs an.

### 4.4.1 DAB-Färbung von TMAs

Wir nutzten KRK-TMAs, gewonnen aus Proben von Patienten der Klinik Chirurgie I des Universitätsklinikums Würzburg (zur Verfügung gestellt von Prof. Dr. Armin Wiegering), für DAB-Färbungen auf USP10. TMAs sind histologisch aufgetragene Gewebsschnittproben aus Tumor- und Nicht-Tumorgewebe verschiedener Patienten. Die Proben wurden mit Antikörpern gegen USP10 und  $\beta$ -Catenin gefärbt und qualitativ verglichen. In den mit gegen USP10 gerichteten Antikörpern gefärbten TMAs aus kolorektalen Tumoren zeigte sich kein deutlicher Unterschied zwischen Tumorgewebe und mikroskopisch gesundem Gewebe. Die Färbung, bei der der primäre Antikörper gegen  $\beta$ -Catenin gerichtet war, zeigte dagegen ein deutlich stärkeres Signal des Tumorgewebes als Zeichen des deregulierten  $\beta$ -Catenin-Abbaus (Abbildung 15).



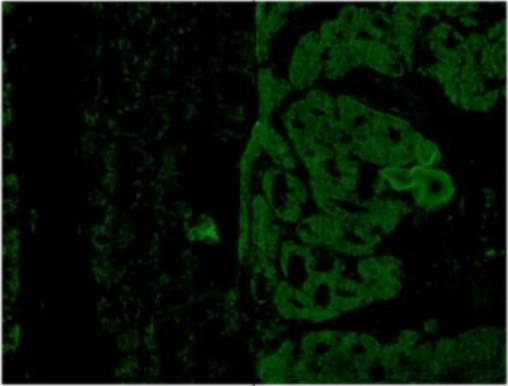
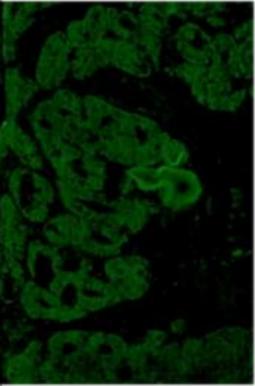
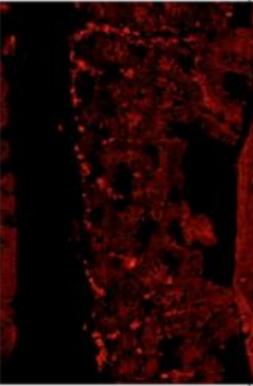
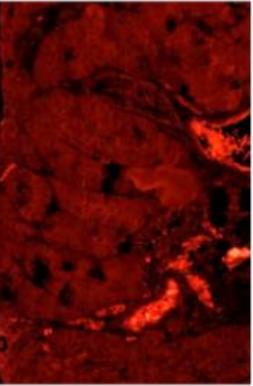
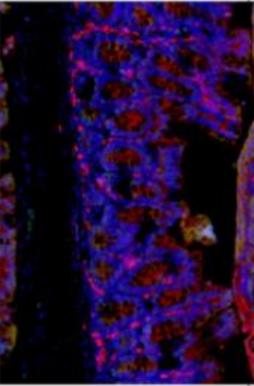
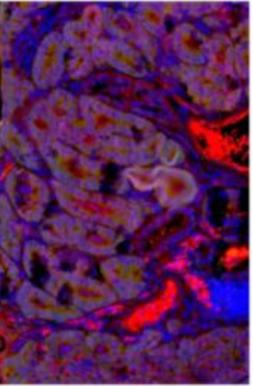
Antikörper: USP10 (rb) und  $\beta$ -Catenin (rb), repräsentative Bildausschnitte

**Abbildung 15: DAB-Färbung von menschlichen Kolon TMAs**

#### 4.4.2 Immunofluoreszenz in APC<sup>min/+</sup> Mäusen

Eine weitere histologische Färbung wurde an Tumoren von APC<sup>min/+</sup> Mäusen durchgeführt. APC<sup>min/+</sup> Mäuse besitzen, ähnlich wie Patienten mit FAP, nur ein intaktes Allel des APC Gens. Durch einen (induzierten) *second hit* kann das zweite APC Allel ausgeschaltet werden, wodurch es zu einer Deregulation des WNT-Signalwegs kommt und über die Adenom-Karzinom-Sequenz zur Tumorbildung [86]. Einer dieser Kolontumore wurde von Dr. Markus Diefenbacher im Vergleich mit Nicht-Tumorgewebe mit Immunofluoreszenz auf  $\beta$ -Catenin und USP10 gefärbt. In den Tumoren zeigte sich nun im Gegensatz zu den TMA-Proben sowohl eine Erhöhung der Expression von  $\beta$ -Catenin als auch von USP10 (Abbildung 16).

Zusammenfassend ergeben die Ergebnisse des Screens, der Datenbanken und der histologischen Färbungen ein Bild, das USP10 als möglichen Kandidaten der Beeinflussung von WNT-Signalgebung erscheinen lässt. Ein eindeutiges Bild von Veränderung der USP10 Aktivität oder Expression in kolorektalen Tumoren ergab sich dadurch jedoch nicht. Wir entschieden uns die Rolle von USP10 in den genveränderten Zelllinien weiter zu untersuchen.

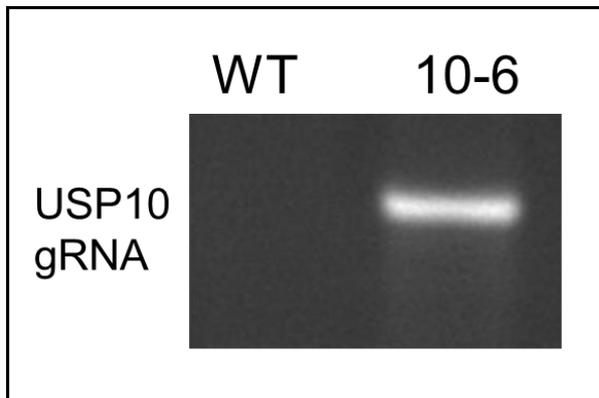
USP10		$\beta$ -Catenin		Überlagerte Bilder	
Normales Gewebe	Tumor	Normales Gewebe	Tumor	Normales Gewebe	Tumor
					

Jeweils links gesundes Gewebe und rechts Tumordarmgewebe von  $APC^{min/+}$  Mäusen. Antikörper: USP10 (rb),  $\beta$ -Catenin (ms), Kernfärbung mit DAPI. n=1 (Zur Verfügung gestellt von Dr. Markus Diefenbacher.)

**Abbildung 16: Färbung der Kolonmukosa von  $APC^{min/+}$  Mäusen**

## 4.5 USP10 in HEK293T Zellen

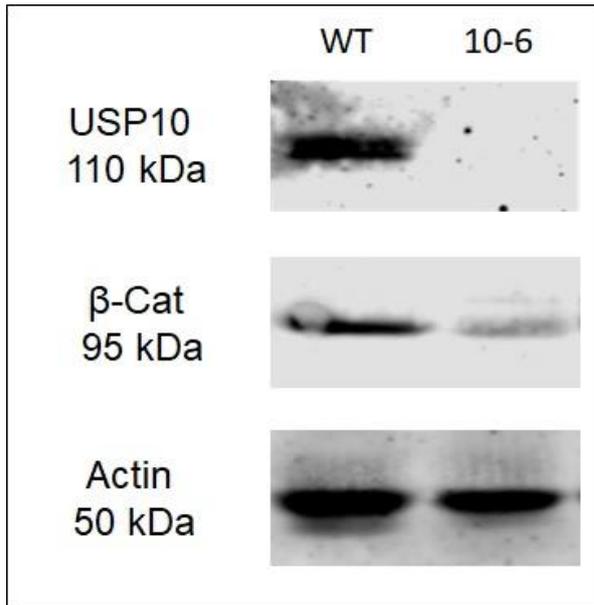
Da nach der Selektion mit Puromycin die Zellen in Klonen wuchsen und bis zu 6 dieser als genveränderte Zelllinien in Kultur genommen wurden, wählten wir einen dieser Klone der Zelllinie HEK293T zur weiteren Untersuchung aus. Hierzu wurde der Zellklon 10-6 (nach USP10 und zufälliger Nummerierung 1 bis 6) gewählt. Als Kontrollen für die Untersuchungen wurden HEK293T-Wildtyp Zellen genutzt. Wir wählten HEK293T Zellen, die keine Mutation im WNT-Signalweg haben, um die Effekte des USP10 *knockouts* auf den WNT-Signalweg in physiologischem Zustand zu beschreiben und später einen Vergleich zu *APC*-mutierten Zellen zu haben. Nachdem die 10-6 Zellen in Kultur genommen wurden, wiesen wir die gRNA gegen das Exon 5 von USP10 mittels PCR auf genomische DNA nach (Abbildung 17). Da die Zelllinien mittels lentiviraler Transduktion genetisch verändert wurden, konnte durch die Gewinnung von genomischer DNA die Komponente des Vektors, welche die sgRNA kodiert mittels PCR nachgewiesen werden.



Vergleich von Wildtyp (WT) Zellen mit CrisprV2 mit gRNA gegen USP10 infizierte Zellen (10-6), Primer: U10rev, U6fwd.

**Abbildung 17: PCR-Nachweis der gRNA für USP10 in HEK293T Zellen**

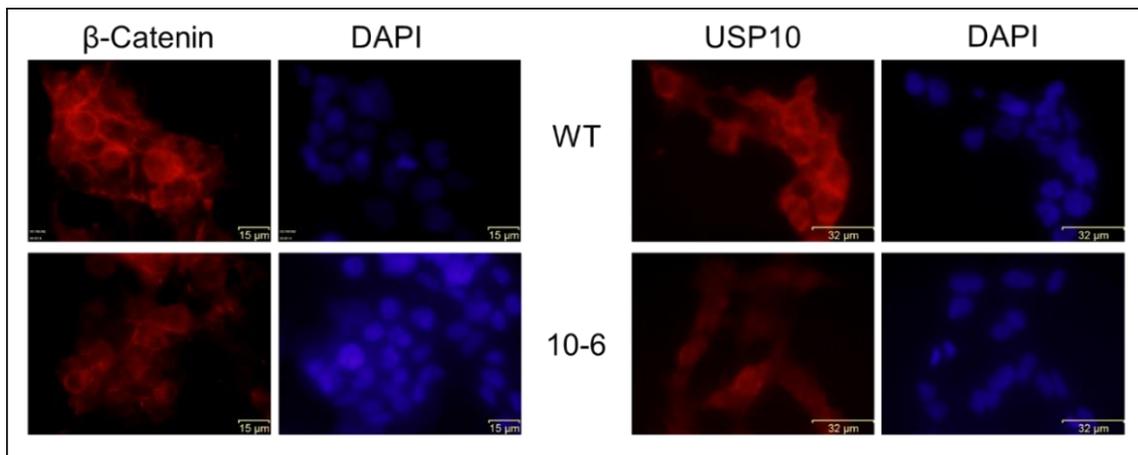
Im Western Blot konnte bei 10-6 Zellen eine Abschwächung des Signals für USP10 nachgewiesen werden, welches mit einer Abschwächung des Signals für  $\beta$ -Catenin einherging (Abbildung 18).



Antikörper: USP10 (ms), β-Catenin (rb), Actin (ms)

**Abbildung 18: Expression von USP10 und β-Catenin in 10-6 und Wildtyp (WT) HEK293T Zellen**

Die Reduktion des Signals der beiden Proteine in dieser Zelllinie konnte durch eine Immunofluoreszenz bestätigt werden. Das Signal für USP10 war zwar vermindert, jedoch immer noch nachweisbar, sodass nicht von einem vollständigen *knockout* des Proteins auszugehen ist (Abbildung 19).

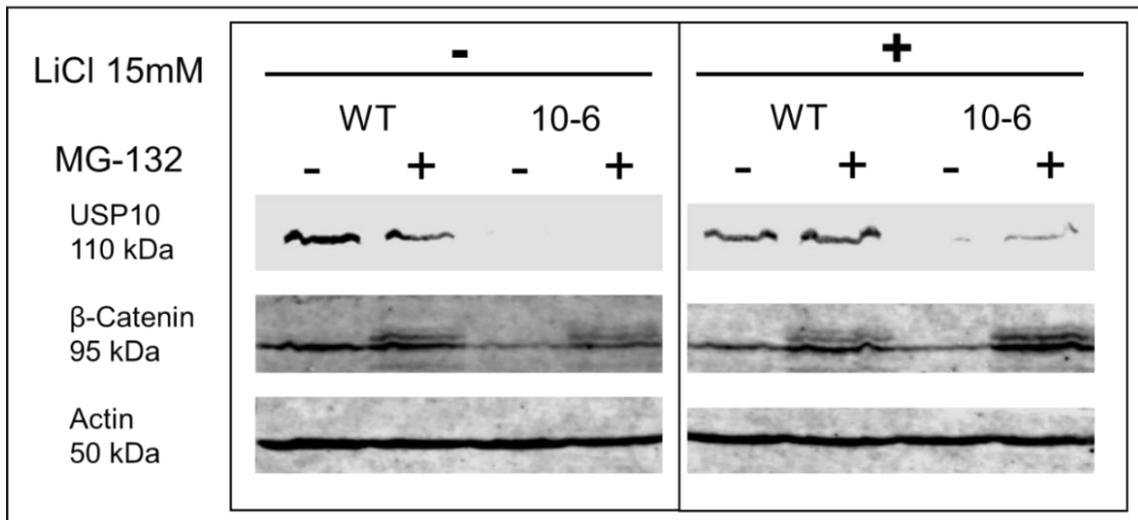


Antikörper: β-Catenin (ms) und USP10 (ms). Kernfärbung mit DAPI, repräsentative Bildausschnitte.

**Abbildung 19: Expression von USP10 und β-Catenin mit Immunofluoreszenz in 10-6 und Wildtyp (WT) HEK293T Zellen**

#### 4.5.1 Proteinstabilität

Um zu untersuchen, ob USP10 die Proteinstabilität von  $\beta$ -Catenin reguliert, behandelten wir im nächsten Schritt *USP10* wildtypische und mutante HEK293T Zellen mit dem Proteasominhibitor MG132. Dieser führt durch eine Blockade des 26s Proteasoms zu einer Akkumulation von Proteinen. Nach Behandlung mit dem Inhibitor konnten die  $\beta$ -Catenin Proteinspiegel in *USP10*-Wildtyp Zellen angereichert und in der *USP10* defizienten Zelllinie 10-6 wiederhergestellt werden. Wurde der kanonische WNT-Signalweg der Zellen vorher durch LiCl aktiviert, zeigte sich in den 10-6 Zellen ein stärkeres Signal nach Behandlung mit dem Proteasominhibitor MG132 (n=2) (Abbildung 20).

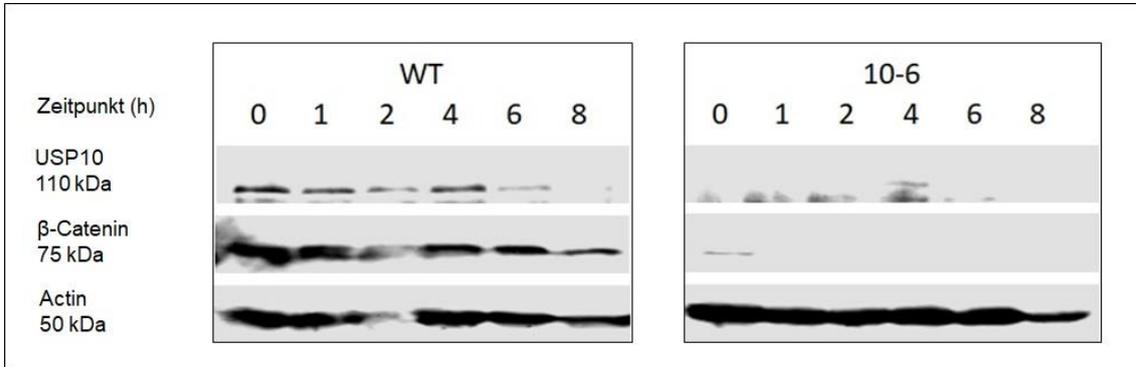


Stimulation mit (links) und ohne (rechts) LiCl über 24 h, MG132 Gabe 6 h vor Zellernte. Antikörper: USP10 (ms),  $\beta$ -Catenin (ms), Actin (n=2); WT: Wildtyp

**Abbildung 20:** Expression von USP10 und  $\beta$ -Catenin nach MG132 Behandlung in HEK293T Zellen

Nachdem wir eine USP10 abhängige Stabilisierung von  $\beta$ -Catenin in Zellen beobachten konnten, wollten wir als nächstes untersuchen, ob eine Modulation von USP10-Proteinspiegeln die Halbwertszeit von  $\beta$ -Catenin beeinflusst. Hierfür verwendeten wir Cycloheximid, hierbei handelt es sich um einen Hemmstoff des Ribosoms und somit der Neusynthese von Proteinen [87]. In einem Experiment konnte mittels der Behandlung von Cycloheximid ein Hinweis darauf gezeigt werden, dass Cycloheximid nur einen geringen Einfluss auf die Spiegel von  $\beta$ -Catenin habe. Während sich die basalen Proteinmengen in wildtypischen Zellen kaum veränderten, konnten wir in mutanten

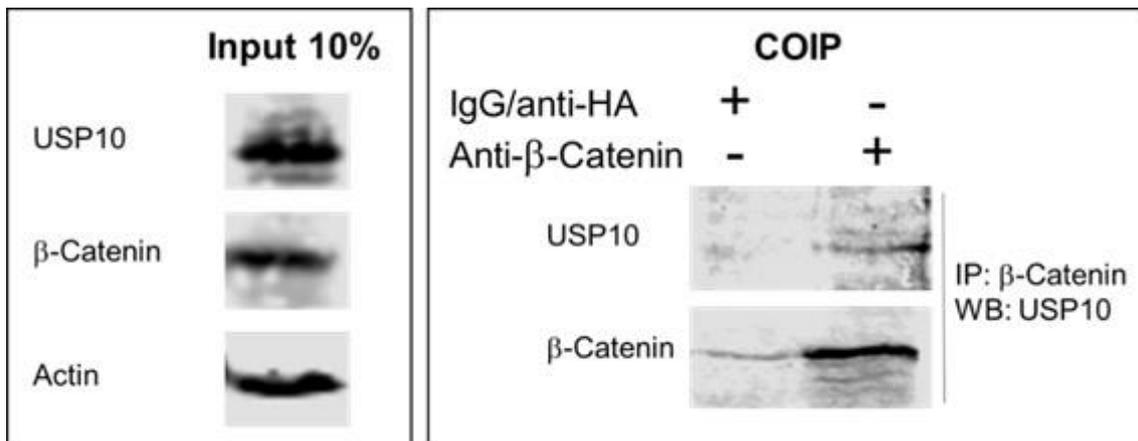
Zellen einen sehr schnellen Abbau der verbleibenden Proteinmenge innerhalb von einer h beobachten (Abbildung 21).



Die Zellen wurden mit 10 µg/ml Cycloheximid behandelt und zu den angegebenen Zeitpunkten geerntet. Antikörper: USP10 (rb), beta-Catenin (ms), Actin (n=1)

**Abbildung 21: Expression von USP10 und beta-Catenin nach Behandlung mit Cycloheximid in 10-6 und Wildtyp (WT) HEK293T Zellen**

USP10 beeinflusst die *steady state* Proteinmengen, sowie die Proteinhalfwertszeit von beta-Catenin, jedoch ist unklar, ob USP10 direkt an beta-Catenin bindet. Mittels Co-Immunopräzipitation war es möglich, nach Immunopräzipitation von beta-Catenin aus Zell-Lysat von HT29 Zellen, USP10 nachzuweisen und so einen Hinweis auf eine Interaktion der beiden Proteine zu erhalten (Abbildung 22).

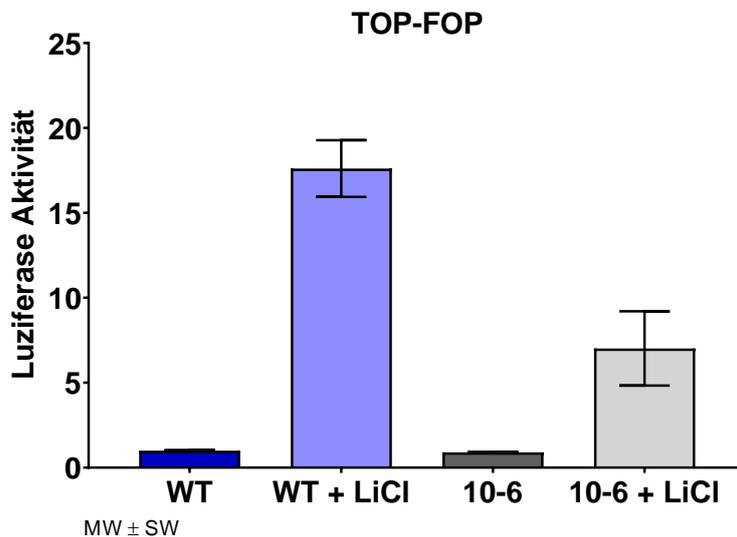


Zell-Lysat von HT29-Wildtyp Zellen, Antikörper für Immunopräzipitation: beta-Catenin (rb), IgG (rb), Antikörper für Western Blots: USP10 (ms), beta-Catenin (ms). n=1. (Co-Immunopräzipitation: COIP)

**Abbildung 22: Nachweis von USP10 nach Immunopräzipitation von beta-Catenin**

#### 4.5.2 WNT-Signalwegaktivität

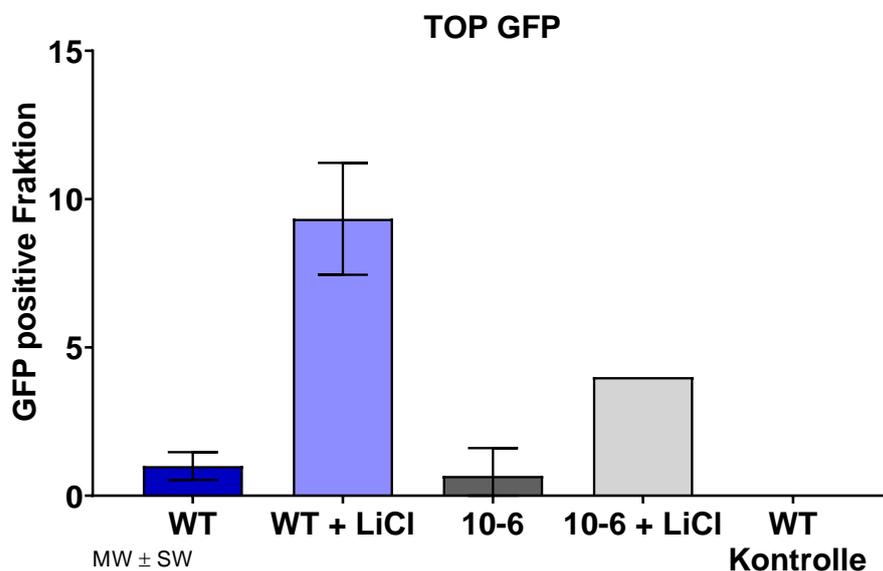
Zur weiteren Untersuchung des Effekts des USP10-CRISPR Ansatzes wurde ein *TOP/FOP Luciferase Assay* durchgeführt, ein indirekter *Reporterassay* für die Aktivität des WNT-Signalweges. Hierbei sind mehrere kanonische *LEF1/TCF4* Bindestellen in Reihe vor die kodierende Sequenz für das Luciferase-Gen „geschaltet“. Ohne Aktivierung des WNT-Signalwegs erfolgt keine Aktivierung des Reporters, wird der Signalweg aktiviert bzw. stimuliert, erfolgt eine gesteigerte Transkription des Luciferase Gens, die Zellen exprimieren mehr Protein, welches sich in einer gesteigerten enzymatischen Aktivität äußert. Dies hat einen Anstieg der Reporteraktivität zur Folge, es wird mehr Substrat umgesetzt und das abgestrahlte Signal wird stärker detektiert. Hier zeigte sich kein großer Unterschied der Reporteraktivität zwischen HEK293T-Wildtyp Zellen und den CRISPR-Zellen (10-6). Dies ist nicht überraschend, da der WNT-Signalweg in HEK293T Zellen nicht konstitutiv aktiv ist. Wurde der WNT-Signalweg allerdings durch LiCl aktiviert, so erfolgte die Aktivierung des Reporters. Hierbei zeigte sich, dass die Aktivierung des Reporters in *USP10* depletierten Zellen deutlich schwächer ausfiel als in HEK293T-Wildtyp Zellen. Die *TOP/FOP Luciferase Assay*-Experimente wurden durch Julia Hauptstein und Bastian Krenz durchgeführt (Abbildung 23).



Die Ergebnisse sind relativ zur Aktivität in Wildtyp (WT) Zellen ohne LiCl Aktivierung. Die Ergebnisse sind angegeben als Mittelwert  $\pm$  Standardabweichung. Auf eine Signifikanzprüfung wurde verzichtet. Die Experimente wurden durch Julia Hauptstein und Bastian Krenz durchgeführt. n=1, technische Triplikate

**Abbildung 23:** Nachweis der WNT-Signalweg Aktivität in 10-6 und HEK293T-Wildtyp Zellen durch den TOP-FOP Luciferase Assay

Als einen weiteren Ansatz zur Überprüfung der Relevanz von USP10 auf den WNT-Signalweg wurden 10-6 und HEK293T-Wildtyp Zellen mit einem *TOP-GFP* kodierenden Lentivirus infiziert, ein Konstrukt, welches *GFP* unter der Kontrolle des artifiziellen WNT-Signalwegs *TOP*-Promoters hat. Bei Aktivierung des Signalwegs produzieren diese Zellen GFP. Zur Auswertung wurden mit einem aus dem Plasmid hergestellten Virus infizierte Zellen durch den FACS-Sorter nach GFP-Signal ausgewählt. Das Diagramm zeigt die relative Expression von GFP unter basalen (nicht stimulierten) Bedingungen und nach Aktivierung des kanonischen WNT-Signalweges durch LiCl (Abbildung 24).

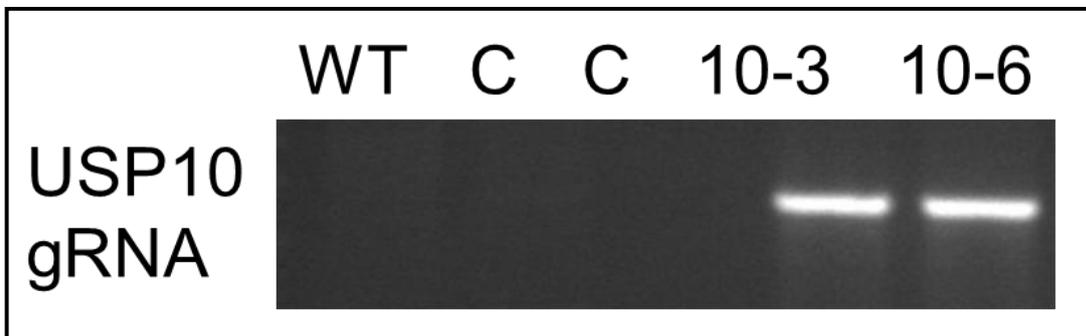


Anteil GFP positiver Zellen relativ zur Expression in Wildtyp (WT) Zellen ohne Stimulation durch LiCl. Die Ergebnisse sind angegeben als Mittelwert  $\pm$  Standardabweichung. n=2

**Abbildung 24: Nachweis der WNT-Signalwegaktivität in 10-6 und HEK293T-Wildtyp Zellen durch den TOP GFP Reporter**

## 4.6 USP10 in HT29 Zellen

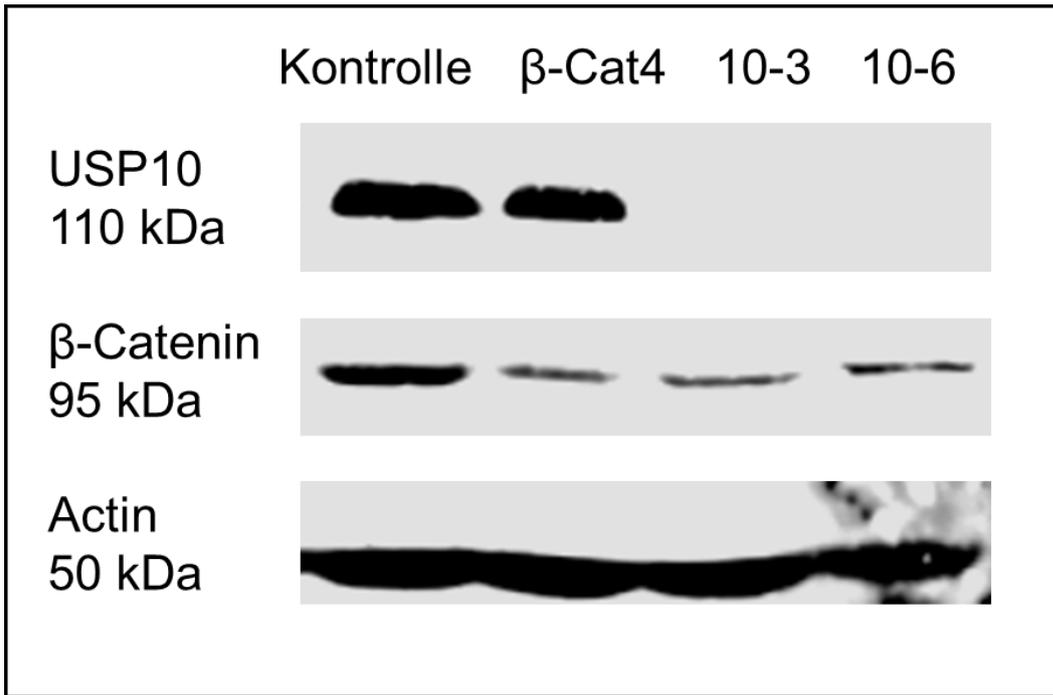
Um die Relevanz der oben aufgeführten Ergebnisse in Tumorerkrankungen zu überprüfen, untersuchten wir die mit dem CRISPR-Ansatz behandelten KRK-Tumorzellen der Zelllinie HT29. Auch hier wurden zwei der in Kolonien gewachsenen Zellen gewählt und als Zellklone expandiert: Klon 10-3 und 10-6. Simultan zu den oben beschriebenen Experimenten in HEK293T konnten auch in HT29 Zellen nach Infektion mit dem hergestellten Lentivirus in der genomischen PCR die sgRNA gegen das Exon 5 im USP10 Gen nachgewiesen werden, nicht aber in Kontrollzellen, die mit dem Lentivirus mit *Crispr.V2* ohne sgRNA-Kassette infiziert wurden (Abbildung 25).



Zell-Lysate aus Wildtyp (WT), mit CrisprV2 Leervektor infizierten (C) und CrisprV2 mit gRNA gegen USP10 infizierten Zellen (10-3, 10-6), Primer: U10rev, U6 fwd.

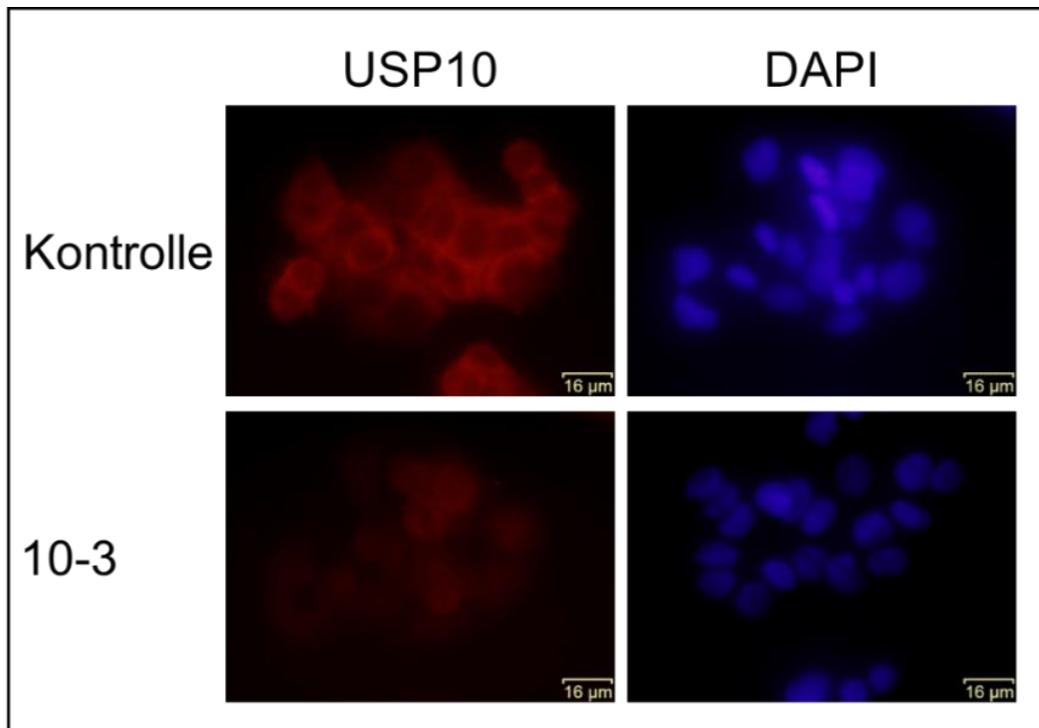
**Abbildung 25: PCR-Nachweis der gRNA für USP10 in HT29 Zellen**

In den Zellen mit sgRNA gegen USP10 zeigte sich im Western Blot sowohl eine Abschwächung des Signals von USP10 Antikörpern als auch von  $\beta$ -Catenin Antikörpern, im Vergleich mit den Kontrollzellen, in denen der Leervektor infiziert wurde. Als weitere Kontrolle für die Spezifität der beobachteten Effekte auf  $\beta$ -Catenin verwendeten wir HT29 Zellen, welche mit einem Lentivirus infiziert wurden, welcher 2 sgRNAs gegen *CTNNB1* kodierte. Auch in diesen Zellen konnte eine Reduktion von  $\beta$ -Catenin mittels Immunoblot beobachtet werden, nicht jedoch für USP10 (Abbildung 26). Diese Daten weisen darauf hin, dass  $\beta$ -Catenin nicht die Menge an USP10 kontrolliert, sowie dass HT29 Zellen eine gewisse Menge  $\beta$ -Catenin benötigen, um zelluläres Überleben zu gewährleisten. In der Immunofluoreszenz konnte eine Erniedrigung des Signals für USP10 in den USP10-CRISPR Zellen (HT29-10-3) nachgewiesen werden (Abbildung 27).



Vergleich von Zellen die mit Leervektor *CrisprV2* (Kontrolle), *CrisprV2* mit 2 sgRNA gegen *CTNNB1* ( $\beta$ -Cat4) und *CrisprV2* mit sgRNA gegen USP10 (10-3, 10-6) Antikörper: USP10 (ms),  $\beta$ -Catenin (rb), Actin (ms)

**Abbildung 26: Expression von USP10 und  $\beta$ -Catenin in HT29 Zellen**

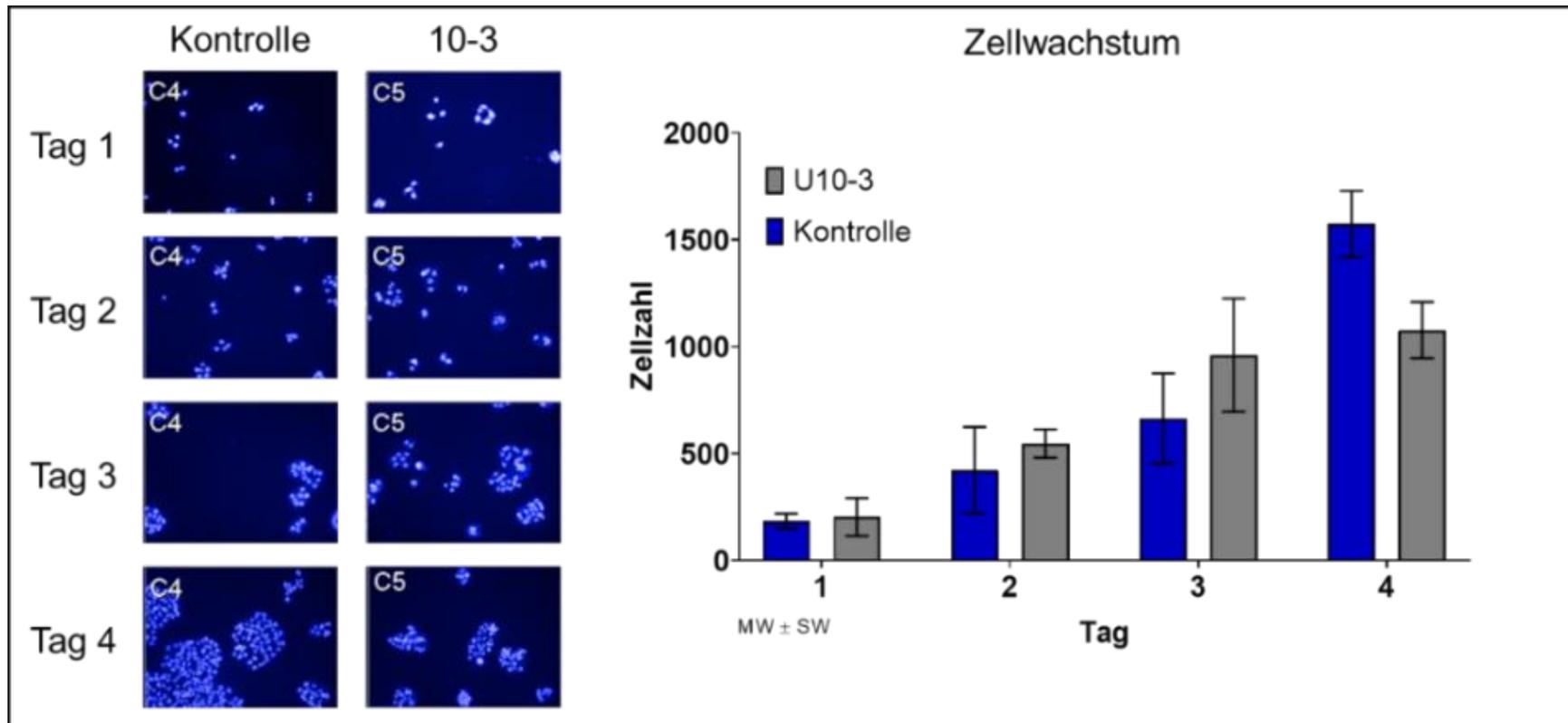


Antikörper: USP10 (rb), Kernfärbung mit DAPI, repräsentative Bildausschnitte

**Abbildung 27: Expression von USP10 mit Immunofluoreszenz in 10-3 und Kontrollen in HT29 Zellen**

Nachdem sich die Koinzidenz von geringerer Expression von USP10 und  $\beta$ -Catenin in den USP10-CRISPR Zellen auch in HT29 Zellen zeigte, sollte in einem nächsten Schritt eine physiologische Konsequenz dieser Protein-Interaktion untersucht werden. Hierfür beobachteten wir das Zellwachstum, da KKK Zellen  $\beta$ -Catenin benötigen um zu proliferieren. Reduktionen in der vorhandenen Proteinmenge sollten sich direkt negativ auf das Zellwachstum auswirken.

In diesem Wachstumsassay verglichen wir das Wachstum der USP10-CRISPR HT29 Zellen (10-3) mit Leervektor-Kontrollen. Es zeigte sich in der Auswertung nach 4 Tagen ein verzögertes Wachstum der 10-3 HT29 Zellen im Vergleich mit den Leervektor-Kontrollen (Abbildung 28).



Vergleich von HT29 Zellen mit *CrisprV2* mit gRNA gegen USP10, Kontrollen sind mit Leervektor infiziert. Gezählt wurden mit DAPI gefärbte Zellkerne, links sind Beispielbilder der durch die *Operetta*-Maschine erfassten Felder. Die Ergebnisse sind dargestellt als Mittelwerte  $\pm$  Standardabweichung. Färbung und Auszählen wurden durchgeführt von Dr. Ursula Eilers und Dr. Christina Schüle-Völk. n=1; technische Triplikate

**Abbildung 28:** Wachstum von HT29 Zellen über einen Zeitraum von 4 Tagen

## 5 Diskussion

Ziel dieser Doktorarbeit war es neue Ziele für eine mögliche Beeinflussung der Aktivität des WNT-Signalweges im KRK zu identifizieren. Hierbei zeigten die Ergebnisse der vorgelegten Arbeit die DUB USP10 als Kandidaten, welcher die Proteinstabilität von  $\beta$ -Catenin und hierdurch die Aktivität des WNT-Signalwegs beeinflusst.

### 5.1 Der WNT-Signalweg als essenzieller Bestandteil von Tumorwachstum

Wie bereits in der Einleitung erwähnt, stellt die WNT-Signalwegaktivität auch in späteren Stadien von Darmkrebszellen einen essenziellen Wachstumsanreiz dar. Dies wurde durch eine Reduktion der Translation von  $\beta$ -Catenin mittels RNA-Interferenz gezeigt [30]. Es wurde auch gezeigt, dass durch Wiederherstellung der Expression von wildtypischem APC in KRK-Tumorzellen eine Differenzierung hervorgerufen werden kann, trotz Mutationen wie *KrasG12D* und *TP53*. Im Gegensatz hierzu wurde am Beispiel von Mammakarzinomzellen durch Mutationen von *KRAS* und *TP53* ein Verlust der Abhängigkeit von WNT-Signalwegaktivität gezeigt [88].

Diese Erkenntnis macht eine negative Beeinflussung der WNT-Signalwegaktivität zu einem attraktiven Ansatz für die Therapie von KRK.

Es wurden bereits mehrere Möglichkeiten gefunden den WNT-Signalweg an verschiedenen Stellen zu hemmen. Es gibt physiologische Inhibitoren wie DKK1, ein Protein, welches die WNT-Rezeptoraktivierung inhibiert. Pharmakologische Inhibitionen wurden für verschiedene Zielstrukturen im WNT-Signalweg entwickelt [100]. Das *small molecule* XAV939 fördert über eine Blockade der Tankyrase (*TRF1-interacting Ankyrin-related ADP-Ribose polymerase*) 1 und 2 die Stabilisierung von AXIN und so den Abbau von  $\beta$ -Catenin [101, 102]. Ein etwas außergewöhnlicherer Ansatz ist ein Fusionsprotein, welches  $\beta$ -TRCP und  $\beta$ -Catenin bindet und so die Interaktion auch ohne intakten *destruction complex* ermöglicht. Dieses Fusionsprotein wirkt antiproliferativ in KRK [103].

Eine weitere Möglichkeit den WNT-Signalweg zu beeinflussen, ist die Translation von  $\beta$ -Catenin mittels RNA-Interaktion zu hemmen. Dies wurde in Tierversuchen an Mäusen mit *xenograft* KRK-Lebermetastasen gezeigt. Mit tumorspezifischen Lipidnanopartikeln, welche mit dicer-RNA beladen waren, wurde  $\beta$ -Catenin Translation in den Tumorzellen gehemmt und eine Wachstumsverzögerung der Tumore in den behandelten Mäusen gezeigt [89].

## 5.2 Deubiquitylierung von $\beta$ -Catenin als Ziel

Mit *APC* als das am häufigsten mutierte Gen im deregulierten WNT-Signalweg in KRK ist die posttranslationale Regulation von  $\beta$ -Catenin verändert und somit die Proteinstabilität erhöht. Die oben erwähnten Ansätze, die Produktion von  $\beta$ -Catenin posttranskriptional zu vermindern, befinden sich *upstream* der Deregulation des WNT-Signalwegs. Es bietet sich aber eine pharmakologische Beeinflussung *downstream* der Deregulation, also innerhalb des Ubiquitin-Proteasom Weges an. Für eine solche Beeinflussung ist eine molekulare Zielstruktur, die möglichst spezifisch pharmakologisch gehemmt werden kann, wichtig. Hier bieten sich DUBs mit ihrer Proteasefunktion an. Proteasehemmer als Medikamente sind vor allem aus der antiretroviralen Therapie bei Infektionen mit dem humanen Immundefizienz-Virus (HIV) bekannt, wo sie seit 1995 angewendet werden [90].

Um Proteasehemmer für diesen Zweck einzusetzen ist es wichtig DUBs zu identifizieren, welche mit ubiquityliertem  $\beta$ -Catenin interagieren. In den letzten Jahren wurden, wie in der Einleitung vorgestellt, bereits einige dieser DUBs gefunden und ihr Einfluss auf KRK-Zellwachstum untersucht. Auch das Ziel dieser Studie war es weitere Kandidaten zu identifizieren und näher zu untersuchen.

In dieser Arbeit wurde die DUB USP10 als neuer Kandidat für eine Beeinflussung der Proteinstabilität von  $\beta$ -Catenin gefunden. Durch den CRISPR/Cas9 Ansatz konnten stabile Zellen der Zelllinien HEK-293T und HT29 in Zellkultur genommen werden, in denen eine im Vergleich mit Kontrollen niedrigere Expression von USP10 mit einer niedrigeren Expression von  $\beta$ -Catenin einherging (Abbildungen 17-19 und 25-27). In HEK293T Zellen war diese Koinzidenz durch Blockade des Proteasoms reversibel (Abbildung 20). Auch zeigte sich hier in den genveränderten Zellen eine geringere

Aktivierbarkeit des WNT-Signalwegs durch LiCl (Abbildungen 20, 23 und 24). Bei den genveränderten Zellen der KRK Tumorzellreihe HT29 zeigte sich ein Hinweis auf langsames Wachstum (Abbildung 28).

Zu der untersuchten DUB USP10 wurden in den letzten Jahren zahlreiche Interaktionen mit zentralen Proteinen verschiedener intrazellulärer Signalwege, die über den Ubiquitin-Proteasom-Weg abgebaut werden, untersucht. Hier sollen nun die in Bezug auf mögliche Interaktionen mit den Ergebnissen oder der WNT-Signalwegaktivität für diese Studie relevanten Erkenntnisse dargestellt werden.

### 5.3 USP10 in Tumorzellen

In den histologischen Färbungen in dieser Studie und den Recherchen in den Datenbanken zeigte sich kein Hinweis auf eine eindeutige Rolle von USP10 als Onkogen oder Tumorsuppressor in kolorektalen Tumoren. In den Färbungen der TMAs war kein eindeutiges Muster erkennbar, Recherchen auf *cbioportal* zeigten keine Häufungen von Mutationen im *USP10* Gen und die Korrelationen von USP10 Expression und Überleben der Tumorpatienten zeigte je nach Stadium ein unterschiedliches Bild (Abbildungen 13 - 15). Dies deckt sich mit den Ergebnissen der Literatur: Über die Rolle von USP10 in Krebszellen wird uneinheitlich berichtet. So korrelieren USP10 mRNA Spiegel zum Beispiel in einer mRNA Analyse von Magenkrebs negativ mit der Mortalität, es besteht auch eine Korrelation mit dem mit  $\beta$ -Catenin in Zell-Zellkontakten assoziierten E-Cadherin. USP10 wird als unabhängiger Faktor für die Mortalität von Magenkrebs vorgeschlagen [91]. In Kombination mit dem Tumorsuppressor p14ARF (*alternate reading frame tumor suppressor*) ist eine erniedrigte Expression von USP10 in Krebserkrankungen des oberen Gastrointestinaltraktes beschrieben [92]. Dagegen ist in Studien in Glioblastomproben und Brustkrebszellen eine erhöhte Expression beschrieben [93, 94]. Es zeigte sich in einer Studie kein signifikanter Unterschied zwischen USP10 Proteinexpression in Nebennierentumoren und normalen Gewebe, aber eine signifikante Erniedrigung dieser in Phäochromozytombgewebe [95].

In unserer Untersuchung wuchsen in HT29 Zellen nach USP10 *knockout* mittels CRISPR/Cas9 Klone, während sich in SW480 Zellen nach Behandlung mit CRISPR kein Wachstum zeigte (Abbildung 10). Ouyang et al. zeigten 2019, dass die Spiegel von

USP10 in Darmkrebszelllinien unterschiedlich sind. Gerade in HT29 Zellen sind die Proteinspiegel von USP10 im Vergleich mit SW480 Zellen relativ gering [96]. Dies führt zu der Annahme, dass SW480 Zellen abhängiger von USP10 Aktivität sind und ein Wachstum der SW480 Zellen nach *knockout* von USP10 nicht möglich war.

Generell zeigte sich in dieser Studie bei 32 KRK-Proben kein eindeutiges Bild einer Erniedrigung oder Erhöhung der mRNA Expression von *USP10* im Vergleich zu normalem Gewebe [96]. Ein möglicher Grund hierfür ist, dass die Hauptwirkung der Aktivität von USP10 im Gegensatz zu zum Beispiel APC nicht nur auf der Interaktion mit  $\beta$ -Catenin beruht, sondern die Aktivität der DUB einen Einfluss auf weitere zentrale Signalwege hat. Dies könnte einen Einfluss auf die Auswirkungen einer Hemmung von USP10 Aktivität in Tumorzellen haben, aber auch durch Interaktion der betroffenen Proteine die Ergebnisse dieser Studie beeinflusst haben. Die im Zusammenhang für das KRK wichtigen bekannten Interaktionen sollen hier zusammengefasst werden.

In der wohl bekanntesten Publikation über *USP10* wurde 2010 die Deubiquitinylierung des zentralen Tumorsuppressor TP53 durch die DUB vorgestellt [97]. Es wurde gezeigt, dass USP10 TP53 durch die Entfernung von K48-Ubiquitinketten stabilisiert. Im Gegensatz zu der schon bekannten DUB für TP53 USP7 stabilisierte USP10 nicht die E3-Ligase MDM2. Durch seine Lokalisation im Zytosol deubiquitinyliert USP10 TP53 dort, USP10 kann aber durch Phosphorylierung von ATM (*ataxia telangiectasia mutated*) über seine NLS (Kernlokalisationssequenz, *nuclear localization signal*) bei Zellstress in den Nukleus gelangen um dort TP53 zu stabilisieren [97-99]. Die Interaktion von USP10 und TP53 ist abhängig von einer Hydroxylierung von TP53 [100]. Die Deubiquitinylierung von TP53 wird durch Interaktion von IGF3BP2 (*Insulin like growth 3 factor binding protein 2*) mit USP10 unterstützt [101]. Für das *scaffolding protein* TRAF4 (*TNF receptor associated factor*) wurde gezeigt, dass es über eine Bindung von USP10 die Deubiquitinylierung von TP53 verhindert, und so an der Entwicklung von Keloiden beteiligt ist [102].

In diesem Zusammenhang wurden bereits einige weitere Akteure gezeigt, welche Einfluss auf die Interaktion zwischen USP10 und TP53 haben. So wurde gezeigt, dass der Tumorsuppressor Beclin1 (*coiled-coil myosin-like BCL2-interacting protein*) die Aktivität von USP10 reguliert und darüber auch die von TP53 [103].

Ein weiterer Mechanismus, wie USP10 die Stabilität von TP53 reguliert, ist die Stabilisierung der E3-Ligase P14ARF. Diese ubiquitinyliert die E3 Ligase MDM2, welche wiederum TP53 ubiquitinyliert [104]. Eine niedrige Expression von P14ARF und USP10 wurden bereits in Adenokarzinomen des oberen Gastrointestinaltraktes und Ovarial-Karzinomen beschrieben [92, 105].

Über die Deubiquitinylierung der Kinase RAF1 wurde eine Aktivierung des MAPK-Signalweges durch USP10 in Endometriosezellen gezeigt [106].

Eine Aktivierung des TGF $\beta$  (*transforming growth factor beta 1*)-Signalwegs durch USP10 ist sowohl über die Stabilisierung der Integrine  $\beta$ 1 und  $\beta$ 5 als auch über SMAD4 (*mothers against decapentaplegic homolog 4*) beschrieben [107, 108]. SMAD4 inhibiert wiederum die Transkription des *CTNGB1*-Gens. Relevant wird dieses vor allem bei mutiertem *APC* [109]. Bei Überexprimierung von dominant-negativen SMAD4 wird  $\beta$ -Catenin unabhängig von TGF $\beta$ -Aktivierung posttranslational stabilisiert [110]. SMAD4 ist das Produkt eines Gens, dessen Mutation mit einem schlechteren Überleben von KRK Patienten einhergeht. Hierbei scheint die Interaktion der Krebszellen mit Immunzellen eine Rolle zu spielen [108, 111, 112]. Die Rolle von USP10 bei der Stabilisierung von SMAD4 ist bedeutsam für die Ergebnisse dieser Studie, da der Effekt des geringeren Nachweises von  $\beta$ -Catenin in den USP10 *knockout* Zellen durch die fehlende Stabilisierung von SMAD4 durch USP10 zumindest teilweise vermittelt sein könnte. Hier wäre eine nähere Untersuchung, ob transkriptionelle Veränderungen des *CTNGB1* Gens vorliegen, zum Beispiel durch qPCR, sinnvoll. Ebenso muss eine direkte Interaktion von USP10 und  $\beta$ -Catenin genau untersucht werden.

Die geringere Aktivierung des WNT-Signalwegs in USP10 CRISPR Zellen bei Behandlung mit LiCl wurde mit *Reporterassays* festgestellt (Abbildungen 23 und 24). Diese *Assays* basieren auf der Aktivität von  $\beta$ -Catenin als Transkriptionsfaktor. Es wurden bereits zwei Proteine beschrieben, welche durch USP10 Aktivität stabilisiert werden und für die eine Rolle bei der Regulation der Aktivität von  $\beta$ -Catenin als Transkriptionsfaktor beschrieben ist:

Eine Erhöhung der Aktivierung des NOTCH-Signalweges durch USP10 konnte gezeigt werden. Der Signalwegeffektor NICD1 (*NOTCH1 intracellular domain*), welcher als Teil

von NOTCH durch DLL4 (*delta like canonical notch ligand 4*) abgespalten wird, wurde durch USP10 auf Proteinebene stabilisiert [113]. Es wurde bereits gezeigt, dass NICD1 mit  $\beta$ -Catenin kolokalisiert und ein *knockdown* von NICD1 die Aktivität des WNT-Reporterassays erniedrigt [114]. Hier besteht die Möglichkeit, dass die Ergebnisse der Reporterassays der Studie durch die fehlende Stabilisierung von NICD1 mit beeinflusst wurden. USP10 stabilisiert den Tumorsuppressor KLF4 (*Krüppel like factor 4*) [115]. Von diesem ist eine antagonisierende Wirkung auf WNT-Zielgenexpression bekannt. Dies geschieht zum einen durch Deacetylierung von Histonen im Bereich von Zielgenen des Signalwegs, zum anderen durch eine Deacetylierung von  $\beta$ -Catenin selbst, was die Aktivität als Transkriptionsfaktor erniedrigt [116, 117]. Über die fehlende Stabilisierung von NICD1 und/oder KLF4 könnten die Ergebnisse der geringeren Aktivierung der WNT-Reporterassays bei USP10 CRISPR teilweise erklärt werden. Da der Effekt aber vor allem bei Aktivierung durch Blockade des *destruction complexes* durch LiCl auftritt, weist aber wiederum eher darauf hin, dass der Effekt durch die fehlende Stabilisierung von  $\beta$ -Catenin zustande kommt.

Die Aktivierung des WNT-Signalweges in diesen Experimenten durch LiCl ist allerdings keine hochspezifische Beeinflussung. LiCl hemmt die im *destruction complex* wichtige Kinase GSK3 [82]. Dies ist einer der Schritte, bevor die E3 Ligase  $\beta$ -TRCP  $\beta$ -Catenin ubiquitinyliert. Zwei veröffentlichte Zielproteine von USP10-Deubiquitinylierung, das im EMT (*epithelial–mesenchymal transition*) Signalweg vorkommende SLUG (*snail family transcriptional repressor 2*) und das oben erwähnte TGF $\beta$  Protein SMAD4 werden ebenfalls durch GSK3 phosphoryliert, um anschließend durch  $\beta$ -TRCP ubiquitinyliert zu werden [118-120].

Eine weitere bekannte Rolle von USP10 mit möglichem Einfluss auf Ergebnisse der Studie ist die posttranslationale Stabilisierung des Androgenrezeptors [121, 122]. Der Androgenrezeptor interagiert mit  $\beta$ -Catenin, im Gegenzug beeinflusst  $\beta$ -Catenin über TCF4/LEF1 Promotoren die Transkription des Androgenrezeptors und verstärkt dessen transkriptionellen Effekte [123, 124]. Weiterhin ist beschrieben, dass der Androgenrezeptor, abhängig von Dihydrotestosteron, die Translokation von  $\beta$ -Catenin in den Nukleus unterstützt [125-127]. Die Rolle von Testosteron in KRK ist umstritten, doch sowohl für HEK293T als auch HT29 Zellen wurde gezeigt, dass ihr Wachstum mittels

Testosteron beeinflusst werden kann [128]. So könnten die in der Studie beobachteten Effekte des USP10 CRISPR Ansatzes auf  $\beta$ -Catenin Proteinstabilität durch die Wechselwirkungen zwischen USP10,  $\beta$ -Catenin und dem Androgenrezeptor verstärkt worden sein.

## 5.4 Inhibitoren

Sollten sich die Rolle von USP10 als Stabilisator von  $\beta$ -Catenin in weiteren Studien bestätigen, würde eine Inhibition in kolorektalen Krebserkrankungen eine neue Behandlungsoption zur Hemmung des WNT-Signalweges darstellen. Da USP10, wie oben dargestellt, in vielen weiteren Signalwegen Schlüsselproteine durch Deubiquitylierung stabilisiert, wäre ein Einsatz wohl vom Mutationszustand des jeweiligen Tumors abhängig. Ein Einsatz solcher Inhibitoren im Rahmen des neuen Feldes der personalisierten Krebstherapie ist also denkbar.

Hierbei gehen die pharmakologischen Interventionsmöglichkeiten bei Krebserkrankungen in jüngerer Zeit weit über die konventionelle Chemotherapie hinaus. Durch den Einsatz von gezielten Hemmungen oder Stimulationen von intrazellulären Signalwegen oder Immunreaktionen mit den Tumoren können pharmakologische Effekte zielgerichteter eingesetzt werden. So wird in Studien zur FAP beispielsweise neben der Vorsorge durch die Endoskopie und der frühen Kolektomie Chemoprävention mit EGF (*epidermal growth factor*)-*small molecule inhibitors* erforscht, was die Bildung von Polypen des Duodenums reduziert [129, 130].

Die Proteaseaktivität von DUBs ist ein attraktives Ziel für pharmakologische Inhibitoren. In Studien über USP10 wurden bereits Inhibitoren des Enzyms eingesetzt. Häufig handelte es sich hierbei um Spautin1, ein Inhibitor der DUBs USP10 und USP13. Durch die Deubiquitylierung von USP10 durch USP13 beeinflusst dieser Inhibitor neben der Inhibition der USP10 Aktivität auch die Proteinstabilität der DUB negativ [103]. Von Spautin1 ist des Weiteren unabhängig von der Inhibition der beiden DUBs eine Inhibition der Phosphorylierung von EGFR (*epidermal growth factor receptor*) und MEKK (*MAP3K1; Mitogen-Activated Protein Kinase Kinase Kinase*) beschrieben [131]. Es wurde auch eine von Mykoplasmen produzierte DNA-Kinase entdeckt, welche über eine Inhibition von USP10 TP53 hemmt [132, 133].

Ein Ansatz, um hochspezifische Inhibitoren von DUBs herzustellen wurde, von Zhang et al. veröffentlicht. Mutierte Ubiquitinmoleküle, die spezifisch DUBs binden, wurden in einem Screen untersucht. In der Studie wurden USP7 und USP10 aufgrund ihrer bekannten Interaktion mit dem Tumorsuppressor TP53 ausgewählt. Hierbei wurde der Inhibitor UbV10 entdeckt, welcher USP10 spezifisch bindet und für eine Translokalisierung von TP53 aus dem Zellkern sorgte [134].

Ein Mechanismus, wie die Deubiquitinaseaktivität von USP10 pharmakologisch gesteigert werden kann, ist anhand von Resveratrol beschrieben. Dieses schwächt die Bindung von G3BP1 (*GTPase activating protein (SH3 domain) binding protein 1*) mit USP10, wodurch dieses TP53 stärker posttranslational stabilisieren kann [135].

Als weiterer Aspekt pharmakologischer Beeinflussung von USP10 Aktivität sollte die in Endometriosegewebe von Ratten untersuchte Herabregulierung von hohem USP10 Spiegel erwähnt werden. Diese wurde erreicht durch die Verabreichung der im Rahmen traditioneller chinesischer Medizin eingesetzter *Cai's Neiyi Prescription (CNYP)* [136].

Die vielen unterschiedlichen Rollen der DUB USP10 zeigen, dass selbst eine für dieses Protein hochspezifische Inhibitionstherapie viele verschiedene Auswirkungen auf Tumor- und gesundes Gewebe haben wird. Durch unterschiedliche Rollen in Stressreaktionen, als positiver Regulator von Tumorsuppressoren, aber auch die positive Beeinflussung von proliferationstreibenden Signalwegen weisen auf ein kompliziertes Abwägen hin, in welchen Erkrankungen sich eine Inhibition von USP10 als therapeutischer Schritt lohnen würde. Die in dieser Arbeit gezeigten Hinweise auf eine positive Beeinflussung des WNT-Signalweges weisen auf ein neues Feld für den Einsatz von USP10 in WNT-Signalweg abhängigen Tumoren wie KRK hin.

## **5.5 Limitationen**

Über USP10 ist bekannt, dass es eine Rolle bei Proteininstabilität von zentralen Proteinen der DNA-Reparatur und in zellulären Stressantworten hat, durch *knockdown* von USP10 veränderte sich die Vulnerabilität von Zellen für DNA-Schäden [137-141]. Durch die angewandten Methoden: Infektion mit Lentiviren, Expressierung der Cas9 Nuklease, sowie die Einführung von Doppelstrangbrüchen sind Wechselwirkungen mit

Stressantworten der Zelle sehr wahrscheinlich. Da diese durch USP10 reguliert werden ist es möglich, dass dadurch unterschiedliche Effekte zustande kommen. Deren Einfluss auf die hier dargestellten Ergebnisse konnte im Rahmen dieser Studie nicht untersucht werden.

Außerdem ist beschrieben, dass USP10 im Zusammenspiel mit P62 (*Sequestosome 1*) durch Bildung von Aggregasomen Apoptose inhibiert. Es unterstützt die Ansammlung ubiquitinylierter Proteine und garantiert so eine gewisse Toleranz nach Behandlung mit Proteasominhibitoren. Dieser Effekt wurde als unabhängig von der Proteasefunktion von USP10 beschrieben und könnte bei Experimenten mit Proteasominhibitoren wie MG132 (Abbildung 20) einen Einfluss auf die Ergebnisse haben [142].

## 5.6 Ausblick

Um die Interaktion von USP10 mit  $\beta$ -Catenin und seinen Einfluss auf den kanonischen WNT-Signalweg genauer zu untersuchen, sind weitere Experimente nötig. Es werden qPCR- und Cycloheximidexperimente benötigt, um zu zeigen, dass die Veränderungen von  $\beta$ -Catenin auf posttranslationalen Veränderungen beruhen. Die Deubiquitinylierung von  $\beta$ -Catenin durch USP10 könnte in einem *in vitro UbiPulldown* Experiment im Vergleich zu einer im katalytischen Zentrum mutierten USP10 Variante C424A ohne Deubiquitylaseaktivität untersucht werden [97]. Aufgrund der unterschiedlichen Spiegel von USP10 sind Untersuchungen in weiteren Zelllinien sinnvoll. Es besteht die Möglichkeit durch Kolonorganoide 3D-Modelle, welche die Kryptenformation simulieren, als Normaltypen oder Tumororganoide herzustellen und so einer *in vivo* Situation zur Untersuchung der Rolle von USP10 näher zu kommen [143]. Auch Tiermodelle können weitere Hinweise auf dem Weg zu einer therapeutischen Anwendung von USP10 Inhibition geben.

## 6 Zusammenfassung

Der WNT-Signalweg ist ein hochkonservierter Signalweg, dessen zentraler intrazellulärer Regulationsschritt die Proteinstabilität des Proteins  $\beta$ -Catenin ist. Deregulierende Mutationen in diesem sind frühe Ereignisse bei der Entstehung von Darmtumoren. Ist der Abbau von  $\beta$ -Catenin gestört, so ist unabhängig von äußerer Kontrolle der Signalweg konstitutiv aktiviert und liefert ein Wachstumssignal. Untersuchungen haben aber gezeigt, dass beim Vorliegen solcher Mutationen immer noch eine – unzureichende – Ubiquitinylierung und ein Abbau von  $\beta$ -Catenin stattfindet. Ziel dieser Studie war Deubiquitinasen (DUBs) zu finden, die  $\beta$ -Catenin durch ihre Aktivität den Abbau von  $\beta$ -Catenin verhindern. Mithilfe eines siRNA Screens in der Vorarbeit konnten DUBs als Kandidaten für einen CRISPR Ansatz ausgewählt werden. *APC* Wildtyp HEK293T Zellen und Darmkrebszellen wurden mit lentiviralen CRISPR/Cas9 Vektoren infiziert, in welche sgRNAs gegen exonische Sequenzen von DUBs geklont waren. Einzelne Zellklone von USP10 CRISPR Zellen wurden weiter untersucht. In Western Blots und Immunofluoreszenz zeigte sich bei den USP10 CRISPR Zellen eine verminderte Expression von USP10 und damit einhergehend  $\beta$ -Catenin. Proteinstabilitätsversuche mit MG132 und Cycloheximid zeigten einen erhöhten Abbau von  $\beta$ -Catenin in HEK293T USP10 CRISPR Zellen, vor allem nach Stimulierung des WNT-Signalwegs durch LiCl. In Aktivierungsassays (*Luciferase* und *TOP-GFP FACS*) des WNT-Signalwegs zeigte sich in HEK293T Zellen nach Behandlung mit LiCl eine geringere Aktivierung in den USP10 CRISPR Zellen. In einem Wachstumsassay zeigten HT29 USP10 CRISPR ein geringeres Wachstum als Kontrollzellen. Während in einer histologischen Färbung von Mausgewebe eine erhöhte Expression von USP10 nachweisbar war, zeigten sich in einer TMA Färbung kein eindeutiger Unterschied zwischen gesundem Gewebe und Tumorgewebe.

Die Studie identifiziert USP10 als eine mögliche DUB für  $\beta$ -Catenin und potenzielles Ziel für eine Beeinflussung des mutierten WNT-Signalwegs in Darmkrebszellen.

## 7 Literaturverzeichnis

1. Bray, F., et al., *Global cancer statistics 2018: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries*. CA Cancer J Clin, 2018. **68**(6): p. 394-424.
2. Arvelo, F., F. Sojo, and C. Cotte, *Biology of colorectal cancer*. Ecanermedicalscience, 2015. **9**: p. 520.
3. Waller, A., S. Findeis, and M.J. Lee, *Familial Adenomatous Polyposis*. J Pediatr Genet, 2016. **5**(2): p. 78-83.
4. Soyer, T., *Polypoid disease of colon in children*. Pediatr Surg Int, 2020.
5. Deutsche Krebsgesellschaft, D.K., AWMF. *S3- Leitlinie Kolorektales Karzinom, Langversion 2.1*. 2019 [cited 2020 2020, March 19]; Available from: <http://www.leitlinienprogramm-onkologie.de/leitlinien/kolorektales-karzinom/>
6. Cui, S. and P.Y. Chang, *Current understanding concerning intestinal stem cells*. World J Gastroenterol, 2016. **22**(31): p. 7099-110.
7. Dinu, D., et al., *Prognostic significance of KRAS gene mutations in colorectal cancer--preliminary study*. J Med Life, 2014. **7**(4): p. 581-7.
8. Tan, C. and X. Du, *KRAS mutation testing in metastatic colorectal cancer*. World J Gastroenterol, 2012. **18**(37): p. 5171-80.
9. Fearon, E.R. and B. Vogelstein, *A genetic model for colorectal tumorigenesis*. Cell, 1990. **61**(5): p. 759-67.
10. Leslie, A., et al., *The colorectal adenoma-carcinoma sequence*. Br J Surg, 2002. **89**(7): p. 845-60.
11. Starker, B.-S., Kraywinkel, Kuhnert, *Inanspruchnahme der Darmspiegelung in Deutschland*. Journal of Health Monitoring, 2017. **2**: p. 81–87.
12. van der Flier, L.G. and H. Clevers, *Stem cells, self-renewal, and differentiation in the intestinal epithelium*. Annu Rev Physiol, 2009. **71**: p. 241-60.
13. Yan, K.S., et al., *The intestinal stem cell markers Bmi1 and Lgr5 identify two functionally distinct populations*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2012. **109**(2): p. 466-71.
14. Nusse, R. and H. Clevers, *Wnt/beta-Catenin Signaling, Disease, and Emerging Therapeutic Modalities*. Cell, 2017. **169**(6): p. 985-999.

15. Valenta, T., G. Hausmann, and K. Basler, *The many faces and functions of  $\beta$ -catenin*. *Embo j*, 2012. **31**(12): p. 2714-36.
16. Cai, J., et al., *The role of ubiquitination and deubiquitination in the regulation of cell junctions*. *Protein Cell*, 2018. **9**(9): p. 754-769.
17. Peifer, M., et al., *The vertebrate adhesive junction proteins beta-catenin and plakoglobin and the Drosophila segment polarity gene armadillo form a multigene family with similar properties*. *J Cell Biol*, 1992. **118**(3): p. 681-91.
18. Pinto, D., et al., *Canonical Wnt signals are essential for homeostasis of the intestinal epithelium*. *Genes Dev*, 2003. **17**(14): p. 1709-13.
19. Korinek, V., et al., *Depletion of epithelial stem-cell compartments in the small intestine of mice lacking Tcf-4*. *Nat Genet*, 1998. **19**(4): p. 379-83.
20. Gregorieff, A., et al., *Expression pattern of Wnt signaling components in the adult intestine*. *Gastroenterology*, 2005. **129**(2): p. 626-38.
21. Groden, J., et al., *Identification and characterization of the familial adenomatous polyposis coli gene*. *Cell*, 1991. **66**(3): p. 589-600.
22. Galiatsatos, P. and W.D. Foulkes, *Familial adenomatous polyposis*. *Am J Gastroenterol*, 2006. **101**(2): p. 385-98.
23. Aoki, K. and M.M. Taketo, *Adenomatous polyposis coli (APC): a multi-functional tumor suppressor gene*. *J Cell Sci*, 2007. **120**(Pt 19): p. 3327-35.
24. Zhang, L. and J.W. Shay, *Multiple Roles of APC and its Therapeutic Implications in Colorectal Cancer*. *J Natl Cancer Inst*, 2017. **109**(8).
25. Rubinfeld, B., et al., *Association of the APC gene product with beta-catenin*. *Science*, 1993. **262**(5140): p. 1731-4.
26. Choi, S.H., et al., *alpha-Catenin interacts with APC to regulate beta-catenin proteolysis and transcriptional repression of Wnt target genes*. *Genes Dev*, 2013. **27**(22): p. 2473-88.
27. Albuquerque, C., et al., *The 'just-right' signaling model: APC somatic mutations are selected based on a specific level of activation of the beta-catenin signaling cascade*. *Hum Mol Genet*, 2002. **11**(13): p. 1549-60.
28. Flanagan, D.J., E. Vincan, and T.J. Phesse, *Wnt Signaling in Cancer: Not a Binary ON:OFF Switch*. *Cancer Res*, 2019. **79**(23): p. 5901-5906.

29. Korinek, V., et al., *Constitutive transcriptional activation by a beta-catenin-Tcf complex in APC<sup>-/-</sup> colon carcinoma*. Science, 1997. **275**(5307): p. 1784-7.
30. Scholer-Dahirel, A., et al., *Maintenance of adenomatous polyposis coli (APC)-mutant colorectal cancer is dependent on Wnt/beta-catenin signaling*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2011. **108**(41): p. 17135-40.
31. Polakis, P., *Drugging Wnt signalling in cancer*. Embo j, 2012. **31**(12): p. 2737-46.
32. Lecarpentier, Y., et al., *Multiple Targets of the Canonical WNT/beta-Catenin Signaling in Cancers*. Front Oncol, 2019. **9**: p. 1248.
33. Aberle, H., et al., *beta-catenin is a target for the ubiquitin-proteasome pathway*. Embo J, 1997. **16**(13): p. 3797-3804.
34. Mathieson, T., et al., *Systematic analysis of protein turnover in primary cells*. Nat Commun, 2018. **9**(1): p. 689.
35. Clague, M.J., J.M. Coulson, and S. Urbe, *Cellular functions of the DUBs*. J Cell Sci, 2012. **125**(Pt 2): p. 277-86.
36. Xu, P., et al., *Quantitative proteomics reveals the function of unconventional ubiquitin chains in proteasomal degradation*. Cell, 2009. **137**(1): p. 133-45.
37. Grice, G.L. and J.A. Nathan, *The recognition of ubiquitinated proteins by the proteasome*. Cell Mol Life Sci, 2016. **73**(18): p. 3497-506.
38. Christensen, D.E. and R.E. Klevit, *Dynamic interactions of proteins in complex networks: identifying the complete set of interacting E2s for functional investigation of E3-dependent protein ubiquitination*. Febs j, 2009. **276**(19): p. 5381-9.
39. Iconomou, M. and D.N. Saunders, *Systematic approaches to identify E3 ligase substrates*. Biochem J, 2016. **473**(22): p. 4083-4101.
40. Glickman, M.H. and A. Ciechanover, *The ubiquitin-proteasome proteolytic pathway: destruction for the sake of construction*. Physiol Rev, 2002. **82**(2): p. 373-428.
41. Leestemaker, Y. and H. Ovaa, *Tools to investigate the ubiquitin proteasome system*. Drug Discov Today Technol, 2017. **26**: p. 25-31.
42. Budenholzer, L., et al., *Proteasome Structure and Assembly*. J Mol Biol, 2017. **429**(22): p. 3500-3524.

43. Kumar Deshmukh, F., et al., *The Contribution of the 20S Proteasome to Proteostasis*. *Biomolecules*, 2019. **9**(5).
44. Li, V.S., et al., *Wnt signaling through inhibition of beta-catenin degradation in an intact Axin1 complex*. *Cell*, 2012. **149**(6): p. 1245-56.
45. Clevers, H. and R. Nusse, *Wnt/beta-catenin signaling and disease*. *Cell*, 2012. **149**(6): p. 1192-205.
46. Chitalia, V.C., et al., *Jade-1 inhibits Wnt signalling by ubiquitylating beta-catenin and mediates Wnt pathway inhibition by pVHL*. *Nat Cell Biol*, 2008. **10**(10): p. 1208-16.
47. Leedham, S.J., et al., *A basal gradient of Wnt and stem-cell number influences regional tumour distribution in human and mouse intestinal tracts*. *Gut*, 2013. **62**(1): p. 83-93.
48. Voloshanenko, O., et al., *Wnt secretion is required to maintain high levels of Wnt activity in colon cancer cells*. *Nat Commun*, 2013. **4**: p. 2610.
49. Xue, J., et al., *Tumour suppressor TRIM33 targets nuclear beta-catenin degradation*. *Nat Commun*, 2015. **6**: p. 6156.
50. Dominguez-Brauer, C., et al., *E3 ubiquitin ligase Mule targets beta-catenin under conditions of hyperactive Wnt signaling*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2017. **114**(7): p. E1148-e1157.
51. Reyes-Turcu, F.E., K.H. Ventii, and K.D. Wilkinson, *Regulation and cellular roles of ubiquitin-specific deubiquitinating enzymes*. *Annu Rev Biochem*, 2009. **78**: p. 363-97.
52. Davis, M.I. and A. Simeonov, *Ubiquitin-Specific Proteases as Druggable Targets*. *Drug Target Rev*, 2015. **2**(3): p. 60-64.
53. Mennerich, D., K. Kubaichuk, and T. Kietzmann, *DUBs, Hypoxia, and Cancer*. *Trends Cancer*, 2019. **5**(10): p. 632-653.
54. D'Arcy, P., X. Wang, and S. Linder, *Deubiquitinase inhibition as a cancer therapeutic strategy*. *Pharmacol Ther*, 2015. **147**: p. 32-54.
55. Shi, J., et al., *Deubiquitinase USP47/UBP64E Regulates  $\beta$ -Catenin Ubiquitination and Degradation and Plays a Positive Role in Wnt Signaling*. *Mol Cell Biol*, 2015. **35**(19): p. 3301-11.

56. Zhou, J., et al., *USP7: Target Validation and Drug Discovery for Cancer Therapy*. Med Chem, 2018. **14**(1): p. 3-18.
57. Ma, P., et al., *The ubiquitin ligase RNF220 enhances canonical Wnt signaling through USP7-mediated deubiquitination of beta-catenin*. Mol Cell Biol, 2014. **34**(23): p. 4355-66.
58. Novellademunt, L., et al., *USP7 Is a Tumor-Specific WNT Activator for APC-Mutated Colorectal Cancer by Mediating  $\beta$ -Catenin Deubiquitination*. Cell Rep, 2017. **21**(3): p. 612-627.
59. Su, Y., et al., *APC is essential for targeting phosphorylated beta-catenin to the SCFbeta-TrCP ubiquitin ligase*. Mol Cell, 2008. **32**(5): p. 652-61.
60. An, T., et al., *USP7 inhibitor P5091 inhibits Wnt signaling and colorectal tumor growth*. Biochem Pharmacol, 2017. **131**: p. 29-39.
61. Ji, L., et al., *USP7 inhibits Wnt/beta-catenin signaling through promoting stabilization of Axin*. Nat Commun, 2019. **10**(1): p. 4184.
62. Wu, C., et al., *USP20 positively regulates tumorigenesis and chemoresistance through  $\beta$ -catenin stabilization*. Cell Death Differ, 2018. **25**(10): p. 1855-1869.
63. Yun, S.I., et al., *Ubiquitin specific protease 4 positively regulates the WNT/beta-catenin signaling in colorectal cancer*. Mol Oncol, 2015. **9**(9): p. 1834-51.
64. Kim, J., et al., *Ubiquitin-specific peptidase 2a (USP2a) deubiquitinates and stabilizes beta-catenin*. Am J Cancer Res, 2018. **8**(9): p. 1823-1836.
65. Murray, R.Z., L.A. Jolly, and S.A. Wood, *The FAM deubiquitylating enzyme localizes to multiple points of protein trafficking in epithelia, where it associates with E-cadherin and beta-catenin*. Mol Biol Cell, 2004. **15**(4): p. 1591-9.
66. Taya, S., et al., *The deubiquitinating enzyme Fam interacts with and stabilizes beta-catenin*. Genes Cells, 1999. **4**(12): p. 757-67.
67. Yang, B., et al., *Deubiquitinase USP9X deubiquitinates beta-catenin and promotes high grade glioma cell growth*. Oncotarget, 2016. **7**(48): p. 79515-79525.
68. Sun, K., et al., *Tre2 (USP6NL) promotes colorectal cancer cell proliferation via Wnt/ $\beta$ -catenin pathway*. Cancer Cell Int, 2019. **19**: p. 102.
69. Lui, T.T., et al., *The ubiquitin-specific protease USP34 regulates axin stability and Wnt/ $\beta$ -catenin signaling*. Mol Cell Biol, 2011. **31**(10): p. 2053-65.

70. Hou, P.M., X Zhang, Q Wu, CJ Liao, W Li, J Wang, H Zhao, J Zhou, X, *USP21 deubiquitinase promotes pancreas cancer cell stemness via Wnt pathway activation*. 2019.
71. Sun, K., et al., *Tre2 (USP6NL) promotes colorectal cancer cell proliferation via Wnt/beta-catenin pathway*. *Cancer Cell Int*, 2019. **19**: p. 102.
72. van AnDEL, H., et al., *Loss of CYLD expression unleashes Wnt signaling in multiple myeloma and is associated with aggressive disease*. *Oncogene*, 2017. **36**(15): p. 2105-2115.
73. Madan, B., et al., *USP6 oncogene promotes Wnt signaling by deubiquitylating Frizzleds*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2016. **113**(21): p. E2945-54.
74. Tauriello, D.V., et al., *Loss of the tumor suppressor CYLD enhances Wnt/beta-catenin signaling through K63-linked ubiquitination of Dvl*. *Mol Cell*, 2010. **37**(5): p. 607-19.
75. The, L., *CRISPR-Cas9: a world first?* *Lancet*, 2018. **392**(10163): p. 2413.
76. Jacinto, F.V., W. Link, and B.I. Ferreira, *CRISPR/Cas9-mediated genome editing: From basic research to translational medicine*. *J Cell Mol Med*, 2020.
77. Garneau, J.E., et al., *The CRISPR/Cas bacterial immune system cleaves bacteriophage and plasmid DNA*. *Nature*, 2010. **468**(7320): p. 67-71.
78. Genovese, P., et al., *Targeted genome editing in human repopulating haematopoietic stem cells*. *Nature*, 2014. **510**(7504): p. 235-240.
79. Veeman, M.T., et al., *Zebrafish prickles, a modulator of noncanonical Wnt/Fz signaling, regulates gastrulation movements*. *Curr Biol*, 2003. **13**(8): p. 680-5.
80. Horst, D., et al., *Differential WNT activity in colorectal cancer confers limited tumorigenic potential and is regulated by MAPK signaling*. *Cancer Res*, 2012. **72**(6): p. 1547-56.
81. Klein, P.S. and D.A. Melton, *A molecular mechanism for the effect of lithium on development*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1996. **93**(16): p. 8455-9.
82. Hedgepeth, C.M., et al., *Activation of the Wnt signaling pathway: a molecular mechanism for lithium action*. *Dev Biol*, 1997. **185**(1): p. 82-91.
83. Nagy, Á., G. Munkácsy, and B. Györffy, *Pancancer survival analysis of cancer hallmark genes*. *Sci Rep*, 2021. **11**(1): p. 6047.

84. Cerami, E., et al., *The cBio cancer genomics portal: an open platform for exploring multidimensional cancer genomics data*. *Cancer Discov*, 2012. **2**(5): p. 401-4.
85. Gao, J., et al., *Integrative analysis of complex cancer genomics and clinical profiles using the cBioPortal*. *Sci Signal*, 2013. **6**(269): p. p11.
86. Ren, J., et al., *The application of Apc(Min/+) mouse model in colorectal tumor researches*. *J Cancer Res Clin Oncol*, 2019. **145**(5): p. 1111-1122.
87. Schneider-Poetsch, T., et al., *Inhibition of eukaryotic translation elongation by cycloheximide and lactimidomycin*. *Nat Chem Biol*, 2010. **6**(3): p. 209-217.
88. Dow, L.E., et al., *Apc Restoration Promotes Cellular Differentiation and Reestablishes Crypt Homeostasis in Colorectal Cancer*. *Cell*, 2015. **161**(7): p. 1539-1552.
89. Ganesh, S., et al., *Direct Pharmacological Inhibition of  $\beta$ -Catenin by RNA Interference in Tumors of Diverse Origin*. *Mol Cancer Ther*, 2016. **15**(9): p. 2143-54.
90. Lv, Z., Y. Chu, and Y. Wang, *HIV protease inhibitors: a review of molecular selectivity and toxicity*. *HIV AIDS (Auckl)*, 2015. **7**: p. 95-104.
91. Zeng, Z., et al., *Prognostic significance of USP10 as a tumor-associated marker in gastric carcinoma*. *Tumour Biol*, 2014. **35**(4): p. 3845-53.
92. Song, J.S., et al., *Dual loss of USP10 and p14ARF protein expression is associated with poor prognosis in patients with small intestinal adenocarcinoma*. *Tumour Biol*, 2018. **40**(10): p. 1010428318808678.
93. Grunda, J.M., et al., *Increased expression of thymidylate synthetase (TS), ubiquitin specific protease 10 (USP10) and survivin is associated with poor survival in glioblastoma multiforme (GBM)*. *J Neurooncol*, 2006. **80**(3): p. 261-74.
94. Deng, S., et al., *Over-expression of genes and proteins of ubiquitin specific peptidases (USPs) and proteasome subunits (PSs) in breast cancer tissue observed by the methods of RFDD-PCR and proteomics*. *Breast Cancer Res Treat*, 2007. **104**(1): p. 21-30.
95. Zeng, Z., et al., *USP10 Expression in Normal Adrenal Gland and Various Adrenal Tumors*. *Endocr Pathol*, 2015. **26**(4): p. 302-8.

96. Ouyang, S.W., et al., *USP10 regulates Musashi-2 stability via deubiquitination and promotes tumour proliferation in colon cancer*. FEBS Lett, 2019. **593**(4): p. 406-413.
97. Yuan, J., et al., *USP10 regulates p53 localization and stability by deubiquitinating p53*. Cell, 2010. **140**(3): p. 384-96.
98. Reece, K.M. and W.D. Figg, *A novel regulator (USP10) of p53: Implications for tumor suppression and therapeutic targeting*. Cancer Biol Ther, 2010. **9**(8): p. 583-4.
99. Jochemsen, A.G. and Y. Shiloh, *USP10: friend and foe*. Cell, 2010. **140**(3): p. 308-10.
100. Rodriguez, J., et al., *PHD3 Regulates p53 Protein Stability by Hydroxylating Proline 359*. Cell Rep, 2018. **24**(5): p. 1316-1329.
101. Zhao, W., et al., *Insulin-like growth factor 2 mRNA binding protein 3 (IGF2BP3) promotes lung tumorigenesis via attenuating p53 stability*. Oncotarget, 2017. **8**(55): p. 93672-93687.
102. Deng, C.C., et al., *TRAF4 Promotes Fibroblast Proliferation in Keloids by Destabilizing p53 via Interacting with the Deubiquitinase USP10*. J Invest Dermatol, 2019. **139**(9): p. 1925-1935.e5.
103. Liu, J., et al., *Beclin1 controls the levels of p53 by regulating the deubiquitination activity of USP10 and USP13*. Cell, 2011. **147**(1): p. 223-34.
104. Ko, A., et al., *Oncogene-induced senescence mediated by c-Myc requires USP10 dependent deubiquitination and stabilization of p14ARF*. Cell Death Differ, 2018. **25**(6): p. 1050-1062.
105. Han, G.H., et al., *Loss of Both USP10 and p14ARF Protein Expression Is an Independent Prognostic Biomarker for Poor Prognosis in Patients With Epithelial Ovarian Cancer*. Cancer Genomics Proteomics, 2019. **16**(6): p. 553-562.
106. Chen, Q., et al., *USP10 promotes proliferation and migration and inhibits apoptosis of endometrial stromal cells in endometriosis through activating the Raf-1/MEK/ERK pathway*. Am J Physiol Cell Physiol, 2018. **315**(6): p. C863-c872.
107. Gillespie, S.R., et al., *The deubiquitylase USP10 regulates integrin beta1 and beta5 and fibrotic wound healing*. J Cell Sci, 2017. **130**(20): p. 3481-3495.

108. Yuan, T., et al., *Deubiquitinating enzyme USP10 promotes hepatocellular carcinoma metastasis through deubiquitinating and stabilizing Smad4 protein*. Mol Oncol, 2020. **14**(1): p. 197-210.
109. Freeman, T.J., et al., *Smad4-mediated signaling inhibits intestinal neoplasia by inhibiting expression of  $\beta$ -catenin*. Gastroenterology, 2012. **142**(3): p. 562-571.e2.
110. Romero, D., et al., *Functional blockade of Smad4 leads to a decrease in beta-catenin levels and signaling activity in human pancreatic carcinoma cells*. Carcinogenesis, 2008. **29**(5): p. 1070-6.
111. Wasserman, I., et al., *SMAD4 Loss in Colorectal Cancer Patients Correlates with Recurrence, Loss of Immune Infiltrate, and Chemoresistance*. Clin Cancer Res, 2019. **25**(6): p. 1948-1956.
112. Ogawa, R., et al., *Loss of SMAD4 Promotes Colorectal Cancer Progression by Recruiting Tumor-Associated Neutrophils via the CXCL1/8-CXCR2 Axis*. Clin Cancer Res, 2019. **25**(9): p. 2887-2899.
113. Lim, R., et al., *Deubiquitinase USP10 regulates Notch signaling in the endothelium*. Science, 2019. **364**(6436): p. 188-193.
114. Ishiguro, H., et al., *NOTCH1 activates the Wnt/beta-catenin signaling pathway in colon cancer*. Oncotarget, 2017. **8**(36): p. 60378-60389.
115. Wang, X., et al., *The deubiquitinase USP10 regulates KLF4 stability and suppresses lung tumorigenesis*. Cell Death Differ, 2019.
116. Evans, P.M., et al., *KLF4 interacts with beta-catenin/TCF4 and blocks p300/CBP recruitment by beta-catenin*. Mol Cell Biol, 2010. **30**(2): p. 372-81.
117. Sellak, H., S. Wu, and T.M. Lincoln, *KLF4 and SOX9 transcription factors antagonize  $\beta$ -catenin and inhibit TCF-activity in cancer cells*. Biochim Biophys Acta, 2012. **1823**(10): p. 1666-75.
118. Demagny, H. and E.M. De Robertis, *Point mutations in the tumor suppressor Smad4/DPC4 enhance its phosphorylation by GSK3 and reversibly inactivate TGF- $\beta$  signaling*. Mol Cell Oncol, 2016. **3**(1): p. e1025181.
119. Wu, Z.Q., et al., *Canonical Wnt signaling regulates Slug activity and links epithelial-mesenchymal transition with epigenetic Breast Cancer 1, Early Onset (BRCA1) repression*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2012. **109**(41): p. 16654-9.

120. Ouchida, A.T., et al., *USP10 regulates the stability of the EMT-transcription factor Slug/SNAI2*. *Biochem Biophys Res Commun*, 2018. **502**(4): p. 429-434.
121. Faus, H., et al., *The ubiquitin-specific protease USP10 modulates androgen receptor function*. *Mol Cell Endocrinol*, 2005. **245**(1-2): p. 138-46.
122. Draker, R., E. Sarcinella, and P. Cheung, *USP10 deubiquitylates the histone variant H2A.Z and both are required for androgen receptor-mediated gene activation*. *Nucleic Acids Res*, 2011. **39**(9): p. 3529-42.
123. Truica, C.I., S. Byers, and E.P. Gelmann, *Beta-catenin affects androgen receptor transcriptional activity and ligand specificity*. *Cancer Res*, 2000. **60**(17): p. 4709-13.
124. Yang, X., et al., *Complex regulation of human androgen receptor expression by Wnt signaling in prostate cancer cells*. *Oncogene*, 2006. **25**(24): p. 3436-44.
125. Mulholland, D.J., et al., *The androgen receptor can promote beta-catenin nuclear translocation independently of adenomatous polyposis coli*. *J Biol Chem*, 2002. **277**(20): p. 17933-43.
126. Wang, G., J. Wang, and M.D. Sadar, *Crosstalk between the androgen receptor and beta-catenin in castrate-resistant prostate cancer*. *Cancer Res*, 2008. **68**(23): p. 9918-27.
127. Khurana, N. and S.C. Sikka, *Interplay Between SOX9, Wnt/ $\beta$ -Catenin and Androgen Receptor Signaling in Castration-Resistant Prostate Cancer*. *Int J Mol Sci*, 2019. **20**(9).
128. Farahmandlou, N., et al., *ASSOCIATION OF TESTOSTERONE WITH COLORECTAL CANCER (HT29), HUMAN GLIOBLASTOMA (A172) AND HUMAN EMBRYONIC KIDNEY (HEK293) CELLS PROLIFERATION*. *Acta Endocrinol (Buchar)*, 2017. **13**(2): p. 144-149.
129. Samadder, N.J., et al., *Effect of Sulindac and Erlotinib vs Placebo on Duodenal Neoplasia in Familial Adenomatous Polyposis: A Randomized Clinical Trial*. *Jama*, 2016. **315**(12): p. 1266-75.
130. Kidambi, T.D., et al., *Hereditary Polyposis Syndromes*. *Curr Treat Options Gastroenterol*, 2019. **17**(4): p. 650-665.
131. Liao, Y., et al., *Inhibition of EGFR signaling with Spautin-1 represents a novel therapeutics for prostate cancer*. *J Exp Clin Cancer Res*, 2019. **38**(1): p. 157.

132. Zella, D., et al., *Mycoplasma promotes malignant transformation in vivo, and its DnaK, a bacterial chaperone protein, has broad oncogenic properties*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2018. **115**(51): p. E12005-e12014.
133. Benedetti, F., et al., *Role of Mycoplasma Chaperone DnaK in Cellular Transformation*. Int J Mol Sci, 2020. **21**(4).
134. Zhang, W., et al., *Generation and Validation of Intracellular Ubiquitin Variant Inhibitors for USP7 and USP10*. J Mol Biol, 2017. **429**(22): p. 3546-3560.
135. Oi, N., et al., *Resveratrol induces apoptosis by directly targeting Ras-GTPase-activating protein SH3 domain-binding protein 1*. Oncogene, 2015. **34**(20): p. 2660-71.
136. Li, S., et al., *Cai's Neiyi Prescription promotes apoptosis and inhibits inflammation in endometrial stromal cells with endometriosis through inhibiting USP10*. Biotechnol Appl Biochem, 2019. **66**(2): p. 231-239.
137. Guturi, K.K.N., et al., *RNF168 and USP10 regulate topoisomerase IIalpha function via opposing effects on its ubiquitylation*. Nat Commun, 2016. **7**: p. 12638.
138. Dodgson, S.E., et al., *The pleiotropic deubiquitinase Ubp3 confers aneuploidy tolerance*. Genes Dev, 2016. **30**(20): p. 2259-2271.
139. Park, J.M., et al., *Modification of PCNA by ISG15 plays a crucial role in termination of error-prone translesion DNA synthesis*. Mol Cell, 2014. **54**(4): p. 626-38.
140. Yang, Q., et al., *NRAGE promotes cell proliferation by stabilizing PCNA in a ubiquitin-proteasome pathway in esophageal carcinomas*. Carcinogenesis, 2014. **35**(7): p. 1643-51.
141. Zhang, M., et al., *Ubiquitin-specific Peptidase 10 (USP10) Deubiquitinates and Stabilizes MutS Homolog 2 (MSH2) to Regulate Cellular Sensitivity to DNA Damage*. J Biol Chem, 2016. **291**(20): p. 10783-91.
142. Takahashi, M., et al., *USP10 Is a Driver of Ubiquitinated Protein Aggregation and Aggresome Formation to Inhibit Apoptosis*. iScience, 2018. **9**: p. 433-450.
143. Tan, C.W., Y. Hirokawa, and A.W. Burgess, *Analysis of Wnt signalling dynamics during colon crypt development in 3D culture*. Sci Rep, 2015. **5**: p. 11036.

## Appendix

### I Abkürzungsverzeichnis

Abkürzung	Bedeutung
Amp	Ampicillin
APC	Adenomatous polyposis coli
ARM	Armadillo
ATM	Ataxia Telangiectasia Mutated
ATP	Adenosintriphosphat
AXIN	Axis Inhibition Protein
Beclin1	Coiled-Coil Myosin-Like BCL2-Interacting Protein
BMI1	B lymphoma Mo-MLV insertion region 1 homolog
Carb	Carbenicillin
CCR5	C-C Motif Chemokine Receptor 5
CK1	Casein Kinase 1
c-MYC	MYC Proto-Oncogene
CRISPR/(sp)Cas9	Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats/(streptococcus pyogenes) CRISPR associated protein
CTNNB1	das für $\beta$ -Catenin kodierende Gen
CYLD	Cylindromatosis Lysine 63 Deubiquitinase
DAB	Diaminobenzidin
DAPI	4',6-Diamidin-2-phenylindol
DKK1	Dickkopf WNT Signaling Pathway Inhibitor 1
DLL4	Delta Like Canonical Notch Ligand 4
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle's Medium
DNA	Deoxyribonucleic acid
DTT	Dithiothreitol
DUB	Deubiquitinase
DVL	Dishevelled

<b>Abkürzung</b>	<b>Bedeutung</b>
E-Cadherin	(Epithelial) Cadherin 1
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EGF	Epidermal Growth Factor
EGFR	Epidermal Growth Factor Receptor
EMT	epithelial–mesenchymal transition
et al.	et alii (und weitere)
EtOH	Ethanol
FACS	Fluorescence-activated cell sorting
FAP	Familiäre adenomatöse Polyposis
FCS	Fetal calf serum
FZD	Frizzled Class Receptor
G3BP1	GTPase Activating Protein (SH3 Domain) Binding Protein 1
GDP	Guanosindiphosphat
GFP	Green fluorescent protein
(s)gRNA	Single guide ribonucleic acid
GSK3	Glycogen Synthase Kinase 3
GTP	Guanosintriphosphat
h	Stunde
HAUSP	Herpes Virus-Associated Ubiquitin-Specific Protease (USP7)
HCT	Human colon tumor
HDR	Homology directed repair
HEK	Human embryonic kidney
HNPCC	Hereditary non-polyposis Colorectal Cancer
HT	Human tumor
HUWE1	HECT, UBA And WWE Domain Containing E3 Ubiquitin Protein Ligase 1
IF	Immunofluoreszenz
IGF3BP2	Insulin Like Growth 3 Factor Binding Protein 2
IHC	Immunhistochemie

<b>Abkürzung</b>	<b>Bedeutung</b>
IP	Immunopräzipitation
JADE1	Jade Family PHD Finger 1
JAMM	Jab1/Mov34/Mpr1 Pad1 N-terminal <sup>+</sup>
KI67	Marker Of Proliferation Ki-67
KLF4	Krüppel Like Factor 4
KRAS	Kirsten rat sarcoma
KRK	Kolorektales Karzinom
LB-medium	Lauria Broth medium
LEF1	Lymphoid Enhancer Binding Factor 1
LGR5 <sup>+</sup>	leucine rich repeat containing G protein-coupled receptor 5
LHC-9	LHC Basal Medium (Lechner and LaVeck medium)
LiCl	Lithiumchlorid
LRP	LDL Receptor Related Protein
MAPK	Mitogen activated protein Kinase
MDM2	mouse double minute 2 homolog
MDA-MB-231	Brustkrebszelllinie, Adenokarzinom aus Pleuraerguss
MEKK	MAP3K1; Mitogen-Activated Protein Kinase Kinase Kinase
MeOH	Methanol
min	Minuten
MLH1	MutL homolog 1
ms	mouse
MSH2	MutS Homolog 2
NBF	Neutrally buffered formalin
NHEJ	Non homologous end joining
NICD1	NOTCH1 intracellular domain
NLS	Nuclear Localization Signal
dNTP	(deoxy) Nukleotidtriphosphat
P14ARF	Alternate reading frame tumor suppressor
P62	Sequestosome 1

<b>Abkürzung</b>	<b>Bedeutung</b>
PAM	protospacer adjacent motif
PBS	phosphate-buffered saline
(q)PCR	Quantitative Polymerase chain reaction
PEI	Polyethylenimin
Pen	Penicillin
PFA	Paraformaldehyd
PKC	Protein Kinase C
RAF1	Raf-1 Proto-Oncogene, Serine/Threonine Kinase
rb	rabbit
RIPA	Radioimmunpräzipitationsassaypuffer
RNA	Ribonucleic acid
RNF220	Ring Finger Protein 220
rpm	Rounds per minute
SDS	Natriumdodecylsulfat (SDS)
shRNA	Short hairpin ribonucleic acid
siRNA	Small interfering ribonucleic acid
SLUG	Snail Family Transcriptional Repressor 2
SMAD4	(small) Mothers Against Decapentaplegic Homolog 4
Strep	Streptomycin
SW480	Im Baylor Scott & White Medical Center etablierte Kolontumorzelllinie
<i>TAE-buffer</i>	TRIS-Acetat-EDTA-Puffer
TALEN	Transcription activator-like effector nuclease
Tankyrase	TRF1-Interacting Ankyrin-Related ADP-Ribose Polymerase
TCF4	Transcription Factor 4
TEMED	Tetramethylethylendiamin
TGF $\beta$	Transforming Growth Factor Beta 1
TMA	Tissue-Microarray
TP53	Tumorsuppressor Protein 53

<b>Abkürzung</b>	<b>Bedeutung</b>
TRABID	TRAF-Binding Protein Domain
TRAF4	TNF Receptor Associated Factor
TRE2	Tre2 Oncogene (USP6)
TRIM33	Tripartite Motif Containing 33
Tris	Tris(hydroxymethyl)aminomethan
USP	Ubiquitin Specific Protease
USP9X	Ubiquitin Specific Peptidase 9 X-Linked
WB	Western Blot
WNT	Zusammengesetzt aus Wingless und Int1
WNT3a	Wnt Family Member 3A
$\beta$ -Catenin	Cadherin-Associated Protein, Beta 1
$\beta$ -TRCP	Beta-Transducin Repeat Containing Protein

## II Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1:	Schematische Darstellung der Adenom-Karzinom-Sequenz von KKK mit typischen Mutationsakkumulationen, modifiziert nach [7].....	2
Abbildung 2:	Schematische Darstellung der Rolle des WNT-Signalwegs bei der Proliferation in Dickdarmkrypten .....	5
Abbildung 3:	Schematische Darstellung des kanonischen WNT-Signalwegs im physiologischen Zustand (a-c) und bei Mutation von <i>APC</i> (d) .....	8
Abbildung 4:	Schematische Darstellung des Ubiquitin-Proteasom Systems.....	11
Abbildung 5:	Erweitertes Schema des WNT- Signalweges bei <i>APC</i> -Mutation .....	15
Abbildung 6:	Funktionsweise des CRISPR/Cas9 Systems, modifiziert nach [76] .....	19
Abbildung 7:	Schematische Darstellung des siRNA Screens Zur Verfügung gestellt von Dr. Markus Diefenbacher. ....	46
Abbildung 8:	Vergleich der $\beta$ -Catenin Proteinspiegel in den genutzten Zelllinien ....	47
Abbildung 9:	Schematische Darstellung des Zeitplans der Infektion und Selektion der Zellklone .....	48
Abbildung 10:	Übersicht des Wachstums der Kolonien nach Selektion mit Puromycin .....	48
Abbildung 11:	Beispielhafte Bilder der Kolonien von infizierten HEK293T Zellen zum Zeitpunkt 7 Tage nach Puromycin-Selektion.....	49
Abbildung 12:	Schematische Darstellung des Proteins USP10, sowie der erwarteten Bindestelle der gRNA .....	50
Abbildung 13:	Kaplan-Meier-Kurven: Überleben von Rektumkarzinom-Patienten nach mRNA Expression von USP10 und USP45 .....	51
Abbildung 14:	Vergleich der Mutationsfrequenzen in KKK mittels c-Bioportal .....	52
Abbildung 15:	DAB-Färbung von menschlichen Kolon TMA's .....	53
Abbildung 16:	Färbung der Kolonmukosa von <i>APC<sup>min/+</sup></i> Mäusen.....	55
Abbildung 17:	PCR-Nachweis der gRNA für USP10 in HEK293T Zellen .....	56

Abbildung 18: Expression von USP10 und $\beta$ -Catenin in 10-6 und Wildtyp (WT) HEK293T Zellen.....	57
Abbildung 19: Expression von USP10 und $\beta$ -Catenin mit Immunofluoreszenz in 10-6 und Wildtyp (WT) HEK293T Zellen .....	57
Abbildung 20: Expression von USP10 und $\beta$ -Catenin nach MG132 Behandlung in HEK293T Zellen.....	58
Abbildung 21: Expression von USP10 und $\beta$ -Catenin nach Behandlung mit Cycloheximid in 10-6 und Wildtyp (WT) HEK293T Zellen.....	59
Abbildung 22: Nachweis von USP10 nach Immunopräzipitation von $\beta$ -Catenin .....	59
Abbildung 23: Nachweis der WNT-Signalweg Aktivität in 10-6 und HEK293T-Wildtyp Zellen durch den TOP-FOP Luciferase Assay.....	60
Abbildung 24: Nachweis der WNT-Signalwegaktivität in 10-6 und HEK293T-Wildtyp Zellen durch den TOP GFP Reporter.....	61
Abbildung 25: PCR-Nachweis der gRNA für USP10 in HT29 Zellen.....	62
Abbildung 26: Expression von USP10 und $\beta$ -Catenin in HT29 Zellen .....	63
Abbildung 27: Expression von USP10 mit Immunofluoreszenz in 10-3 und Kontrollen in HT29 Zellen.....	63
Abbildung 28: Wachstum von HT29 Zellen über einen Zeitraum von 4 Tagen.....	65

### **III Tabellenverzeichnis**

Tabelle 1: In dieser Arbeit genutzte Vektoren.....	21
Tabelle 2: In dieser Arbeit genutzte Antikörper.....	22
Tabelle 3: In dieser Arbeit genutzte Primer .....	23
Tabelle 4: In dieser Arbeit genutzte Enzyme .....	24
Tabelle 5: In dieser Arbeit genutzte Bausätze .....	24
Tabelle 6: In dieser Arbeit genutzte Chemikalien.....	24
Tabelle 7: In dieser Arbeit genutzte Lösungen.....	27
Tabelle 8: In dieser Arbeit genutzte Nährmedien für die Zellkultur .....	29
Tabelle 9: In der Zellkultur genutzte Zelllinien.....	29
Tabelle 10: In dieser Arbeit genutzte Bakterienstränge .....	30
Tabelle 11: In dieser Arbeit genutzte technische Geräte.....	30
Tabelle 12: Zur Erstellung der Arbeit genutzte Software und Homepages.....	31
Tabelle 13: Plattengrößen Zellkultur.....	37

## **IV Danksagung**

An dieser Stelle möchte ich allen Personen danken, die mich bei der Anfertigung meiner Doktorarbeit unterstützt haben.

Mein Dank gilt Dr. Markus Diefenbacher und Prof. Dr. Martin Eilers für die Überlassung des Themas und die Betreuung bei der Durchführung und Umsetzung der gesamten Arbeit. Ich danke Prof. Dr. Alexander Buchberger und Prof. Dr. Armin Wiegering für die Übernahme der Referentenämter. Ebenso möchte ich Dr. Christina Schüle-Völk und Dr. Ursula Eilers, sowie Dr. Stefanie Schmidt, Julia Hauptstein und Bastian Krenz für die Hilfe danken.

Außerdem möchte ich mich besonders bei Dr. Steffi Herold bedanken für die Bemühungen bei der Durchsicht und die Anregungen.

Nicht zuletzt möchte ich zudem Dr. Cristian Prieto-Garcia, Angela Grün und Barbara Bauer, sowie allen weiteren Mitgliedern der AG Diefenbacher meinen Dank äußern, die meine Arbeit durch ihre Unterstützung geprägt haben.

Meiner ganzen Familie danke ich von Herzen für ihre Geduld, die Ermutigungen und die tatkräftige Unterstützung während der Arbeit an dieser Doktorarbeit.