



Charakterisierung der Funktionen der unterschiedlichen Isoformen des humanen Transkriptionsfaktors Grainyhead-like 3

Inaugural-Dissertation

zur Erlangung des Doktorgrades
der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät
der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

vorgelegt von

Arne Mlynek
aus Münster

Düsseldorf, September 2012

aus dem IUF-Leibniz-Institut für umweltmedizinische Forschung

Gedruckt mit der Genehmigung der
Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät der
Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

Referent: PD. Dr. Judith Haendeler
Korreferent: Prof. Dr. William Martin

Tag der mündlichen Prüfung: 19.10.2012

Erklärung

Hiermit erkläre ich, die vorliegende Dissertation eigenständig und ohne unerlaubte Hilfe verfasst und diese in der vorgelegten oder ähnlichen Form noch bei keiner anderen Institution eingereicht zu haben. Alle Angaben, die veröffentlichten Schriften entnommen sind, wurden als solche gekennzeichnet.

(Arne Mlynek)

Düsseldorf, 14. September 2012

Inhaltsverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis	vii
1 Einleitung	1
1.1 Kardiovaskuläre Alterung	1
1.2 Das Endothel	2
1.3 NO – Endotheliale Funktion/Dysfunktion	2
1.4 Regulation der endothelialen Stickstoffmonoxid-Synthase (eNOS)	4
1.5 Apoptose und Migration – NO bedingte Effekte und Mechanismen	5
1.6 Die Familie der <i>Grainyhead</i> Transkriptionsfaktoren	7
1.7 Der Transkriptionsfaktor grainyhead-like 3 (GRHL3)	8
1.8 GRHL3 Isoformen im Menschen	10
1.9 Fragestellungen	12
2. Material und Methoden	13
2.1 Materialien	13
2.1.1 Chemikalien	13
2.1.2 spezielle Reagenzien und Enzyme	13
2.1.3 Kommerzielle Kits und Assays	14
2.1.4 Geräte	14
2.1.5 Antikörper	15
2.1.6 Basisplasmide	16
2.1.7 Desoxyoligonukleotide	17
2.1.8 Bakterienstämme	18
2.2 Methoden	19
2.2.1 Zellkultur	19
2.2.1.1 Medien und Puffer	19
2.2.1.2 Kultivierung von humanen embryonalen Nierenzellen	20
2.2.1.3 Kultivierung von primären humanen Nabelschnur-Endothelzellen	20
2.2.1.4 Ernte und Lyse von eukaryotischen Zellen	21
2.2.1.5 Zellzahlbestimmung	22
2.2.1.6 Auftauen von Zellen	22
2.2.1.7 Einfrieren von Zellen	23
2.2.1.8 Liposomale Transiente Transfektion von HEK293-Zellen	23
2.2.1.9 Transiente Transfektion von HUVEC	24
2.2.2 Bakterienkultur	24
2.2.2.1 Anzucht der Bakterien	24
2.2.2.2 Herstellung und Transformation kompetenter <i>E.coli</i>	25
2.2.3 Nukleinsäure-Techniken	26
2.2.3.1 Agarose-Gelelektrophorese	26
2.2.3.2 Fällung von DNA mit Ethanol	27
2.2.3.3 Plasmid-Mini- und Plasmid-Maxi-präparation	28
2.2.3.4 Assoziation einzelsträngiger Oligonukleotide	28
2.2.3.5 Ligation von DNA	28
2.2.3.6 Verdau von DNA mit Restriktionsendonukleasen	29
2.2.3.7 Extraktion von DNA-Fragmenten aus Agarose-Gelen	29
2.2.3.8 Reinigung von DNA-Fragmenten	29
2.2.3.9 Isolierung von RNA	29
2.2.3.10 Quantifizierung und Reinheitsbestimmung von Nukleinsäuren	30

2.2.3.11 Reverse Transkription (cDNA Synthese)	31
2.2.3.12 Amplifikation von DNA-Sequenzen mit Hilfe der der PCR	32
2.2.3.13 Overlap-extension PCR	33
2.2.3.14 Herstellung rekombinanter Plasmide	35
2.2.3.15 DNA-Sequenzierung	35
2.2.4 Proteinanalytik	35
2.2.4.1 Proteinbestimmung nach Bradford	35
2.2.4.2 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)	36
2.2.4.3 Proteintransfer auf eine PVDF Membran (Westernblot)	37
2.2.4.4 Immundetektion immobilisierter Proteine	38
2.2.4.5 Entfernung eines Antikörpers von einer PVDF Membran	39
2.2.4.6 Immunfluoreszenzmikroskopie	39
2.2.5 Funktionelle Analysen	41
2.2.5.1 Luziferase-Reportergen-Assay	41
2.2.5.2 Apoptosemessung mittels Durchflusszytometrie	42
2.2.5.3 Migrationsstudien (Scratch wound assay)	43
2.2.5.4 Microarray-Analysen	43
2.2.5.5 <i>In vitro</i> Transkription und RNA Injektion in Zebrafisch (<i>Danio rerio</i>) Embryonen	44
3 Ergebnisse	46
3.1 Analyse der Expression von GRHL3-1 und GRHL3-3 in Endothelzellen	46
3.2 Einfluss von GRHL3-1 und GRHL3-3 auf die Migration von Endothelzellen	47
3.3 Einfluss von GRHL3-1 und GRHL3-3 auf die Apoptose von Endothelzellen	48
3.4 Analyse der Aktivierung von eNOS und Akt durch GRHL3-1 und GRHL3-3	50
3.5 Transkriptions-regulatorische Aktivität von GRHL3-1 und GRHL3-3	52
3.5.1 Klonierung eines Luziferase Reportergen Konstrukts mit GRHL3 responsiven Elementen	53
3.5.2 Einfluss von GRHL3-1 und GRHL3-3 auf ein GRHL3-responsives Reporterkonstrukt	54
3.6 Identifizierung von GRHL3-1 und GRHL3-3 Zielgenen	55
3.6.1 Microarray-Analysen	55
3.6.2 Validierung ausgewählter GRHL3-1 und GRHL3-3 Zielgene	58
3.7 <i>In vivo</i> Effekte nach Überexpression von GRHL3-1 und GRHL3-3	60
3.7.1 Klonierung von GRHL3-1 und GRHL3-3 kodierender Sequenz in den Vektor pCS2plus61	
3.7.2 <i>in vitro</i> Transkription von pCS2+-GRHL3 Vektoren, RNA Injektion in Zebrafischembryonen und phänotypische Analyse	61
3.8 Identifizierung eines Nukleären Lokalisationssignal (NLS) im Transkriptionsfaktor GRHL3	63
3.8.1 Klonierung eines N-terminalen myc-Epitop-Tag 5' der GRHL3 kodierenden Sequenz	66
3.8.2 Klonierung putativ NLS defizienter GRHL3 Deletionsmutanten	67
3.8.3 Lokalisationsanalysen von putativen NLS Deletionsmutanten von GRHL3 in HEK 293-Zellen	68
4 Diskussion	71
4.1 Expression von GRHL3-1 und GRHL3-3	71
4.2 Einfluss von GRHL3-1 und GRHL3-3 auf die Migration und Apoptose von Endothelzellen	72
4.3 Transkriptionelle Aktivität von GRHL3-1 und GRHL3-3	74

4.4 Identifikation und Verifikation von GRHL3-1 und GRHL3-3 Zielgenen	76
4.6 Identifizierung eines Nukleären Lokalisationssignal (NLS) im Transkriptionsfaktor GRHL3	80
5 Zusammenfassung	82
Summary	83
6 Literaturverzeichnis	84
7 Anhang	94
Danksagung	109

Abkürzungsverzeichnis

7-AAD	7-Aminoactinomycin
°C	Grad Celsius
Abb.	Abbildung
Abs.	Absorption
Akt	Proteinkinase B
Amp	Ampicillin
AmpR	Ampicillin-Resistenzgen
APS	Ammoniumperoxodisulfat
ATP	Adenosintriphosphat
bp	Basenpaar(e)
BSA	Bovines Serumalbumin
bzw.	beziehungsweise
ca.	circa
CaCl ₂	Calciumchlorid
CaM	Calmodulin
cDNA	complementary DNA
cm ²	Quadratcentimeter
CMV	Cytomegalie-Virus
DAPI	4',6-Diamidin-2-phenylindol
dH ₂ O	demineralisiertes Wasser
ddH ₂ O	zweifach destilliertes Wasser
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle's Medium
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DNase	Desoxyribonuklease
dNTP	Desoxynucleotidtriphosphat
ds	doppelsträngig
dsRNA	doppelsträngige RNA
DTT	Dithiothreitol
EBM	Endotheliales Basalmedium
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EDTA	Ethylendiamin-N,N,N',N'-tetraazetat
eNOS	endotheliale Stickstoffmonoxid Synthase
et al.	et alias (und andere)
EtOH	Ethanol
evtl.	eventuell

Fa.	Firma
FACS	fluorescence activated cell sorting
FCS	Fötale Kälberserum
FITC	Fluoresceinisothiocyanat
g	Gramm
GAPDH	Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase
ggf.	gegebenenfalls
x g	x-fache der Erdbeschleunigung
h	Stunde
HEK	Human Embryonic Kidney cells
HUVEC	Human Umbilical Vein Endothelial cells
IF	Immunfluoreszenz
Kap.	Kapitel
kb	Kilobase
kDa	Kilodalton
kPa	Kilopascal
LB	lysogeny broth
M	Molar
m-	Milli (10^{-3})
min	Minuten
MOPS	3-(N-Morpholino)-Propansulfonsäure
mRNA	messenger RNA
mut	Mutante
MW	Mittelwert
Mxi1	Max interactor 1
n-	nano (10^{-9})
NaCl	Natriumchlorid
NeoR	Neomycinresistenzgen
nm	Nanometer
nt	Nukleotid(e)
N-terminal	aminoterminal
OD	Optische Dichte
OEP	Overlap-extension-PCR
ori	Origin of Replication
p.a.	pro analysi
PAA	Polyacrylamid
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese

PBS	Phosphat buffered saline
PCR	Polymerasekettenreaktion
Pen/Strep	Penicillin/Streptomycin Antibiotika-Mix
PMSF	Phenylmethylsufonylfluorid
PVDF	Polyvinylidenfluorid
RbCl	Rubidiumchlorid
RIPA	Radioimmunoprecipitation assay
RLB	Reporter-Lysis-Buffer
RNA	Ribonukleinsäure
ROS	Reaktive Sauerstoffspezies
RQ1	RNA qualified
RT	Raumtemperatur
RT	Reverse Transkriptase
SDS	Natriumdodecylsulfat; (<i>Sodium Dodecyl Sulfate</i>)
Tab.	Tabelle
Taq	<i>Thermophilus aquaticus</i>
TBS	Phosphat gepufferte Salzlösung
TBS-T	Phosphat gepufferte Salzlösung mit Tween 20
TE	Tris-EDTA
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylenethylendiamin
Tris	Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan
U	Unit
u.a.	unter anderem
UpM	Umdrehungen pro Minute
UV	Ultraviolett
V	Volt
vgl.	vergleiche
v/v	Volumen pro Volumen
w/v	Gewicht pro Volumen
WB	Westernblot
wt	Wildtyp
z.B.	zum Beispiel
μ	Mikro (10 ⁻⁶)

1 Einleitung

1.1 Kardiovaskuläre Alterung

Deutschland, aber auch andere westliche Nationen sind stark vom demografischen Wandel betroffen. Neben dem anteilmäßigen Zuwachs älterer Menschen, spielt die Art wie wir Menschen altern eine große Rolle. Neben dem „normalen“ Altern kann der Alterungsprozess durch eine Reihe von Umwelteinflüssen wie z.B. Ernährung und physische Aktivität beeinflusst werden. Der Gerontologe Leonard Hayflick definierte den Prozess des Alterns als *„die Summe aller Veränderungen, die in einem Organismus während seines Lebens auftreten und zu einem Funktionsverlust von Zellen, Geweben, Organen und schließlich zum Tod führen“* (Hayflick, 2007). Diese „Veränderungen“ können in unterschiedlichen Organen und Geweben verschiedene Effekte in Form von z.B. Funktionsverlusten hervorrufen.

Stark vom Alterungsprozess betroffen ist das kardiovaskuläre System, mit zunehmendem Alter verliert es an Leistungsfähigkeit. Zusätzlich schwindet die Fähigkeit sich äußeren Einflüssen anzupassen und auf diese adäquat zu reagieren. Zu diesen Einflüssen zählen Risikofaktoren wie physische Inaktivität, Rauchen, übermäßiger Alkoholkonsum, ungesunde Ernährung und oftmals damit einhergehendes Übergewicht. Häufig sind kardiovaskuläre Erkrankungen das Resultat dieser sinkenden Leistungsfähigkeit und verringerter Kompensation von Risikofaktoren. Statistische Untersuchungen zeigten, dass kardiovaskuläre Erkrankungen die häufigste Todesursache in den USA, Europa und Japan sind (Ross, 1993). Diese Erkrankungen haben oftmals ihren Ursprung in endothelialer Dysfunktion, welche ebenfalls in Relation zum Alter zunimmt (El Assar, et al., 2012). Daher ist es sowohl für die Aufklärung kardiovaskulären Alterns, als auch für damit einhergehende kardiovaskuläre Erkrankungen notwendig die der endothelialen Dysfunktion zugrunde liegenden molekularen Mechanismen zu untersuchen.

Zu den dabei auftretenden Fehlfunktionen des Endothels zählen hauptsächlich die verringerte Migrationsfähigkeit von Endothelzellen, als auch die erhöhte Sensitivität gegenüber apoptotischen Stimuli. Beide Funktionen werden durch das Molekül Stickstoffmonoxid (NO) stark beeinflusst, dessen Verfügbarkeit mit dem Alter abnimmt.

1.2 Das Endothel

Das Endothel ist ein Plattenepithel, welches die innerste Auskleidung aller Blutgefäße bildet. Es besteht aus einer einlagigen Schicht von Endothelzellen, die auf der einen Seite im Kontakt zum zirkulierenden Blut stehen und auf der anderen im Kontakt mit subendothelialelem Bindegewebe und einer Schicht glatter Muskelzellen. Zu den Aufgaben des Endothels zählt die Versorgung der umliegenden Gewebe mit Nährstoffen und Sauerstoff. Zudem kontrolliert das Endothel den Blutfluss, zum einen über die Regulation des Gefäßtonus und zum anderen über die Sekretion von Gerinnungsfaktoren, welche die Fluidität des Blutes verändern (Michiels, 2003). Des Weiteren fungiert das Endothel als Vermittler von inflammatorischen Prozessen. So wird bei Entzündungsreaktionen das Endothel aktiviert, was zu einer verstärkten Expression von Adhäsionsmolekülen führt (Collins, et al., 1995). Dadurch kommt es zu einer Anlagerung von Leukozyten, welche ihrerseits, nach Aktivierung, durch das Endothel wandern (endotheliale Transmigration) und im darunterliegenden Gewebe eine Immunantwort hervorrufen. Weitere Funktionen erfüllt das Endothel bei der Angiogenese sowohl unter physiologischen, als auch unter pathophysiologischen Bedingungen.

Ein Großteil der aufgeführten Funktionen des Endothels wird durch das Signalmolekül NO beeinflusst, auf welches ich im nächsten Abschnitt genauer eingehen möchte.

1.3 NO – Endotheliale Funktion/Dysfunktion

Die molekularen Mechanismen altersbedingter endothelialer Dysfunktion sind vielfältig und komplex, doch eine verringerte NO-Bioverfügbarkeit und eine gestörte NO-Synthese gehören zu den Hauptgründen. Stickstoffmonoxid ist ein hochreaktives Signalmolekül im kardiovaskulären System, welches durch NO-Synthasen synthetisiert wird. Indirekt wurde NO und seine Synthese durch das Endothel im Jahr 1980 durch Furchgott & Zawadzki entdeckt. Sie beschrieben, dass die Behandlung von präparierten Blutgefäßen mit Acetylcholin zur Gefäßerweiterung führte, wohingegen Blutgefäße ohne Endothel oder mit beschädigtem Endothel keine Gefäßerweiterung zeigten (Furchgott und Zawadzki, 1980). Nachfolgende Versuche zeigten, dass es zur Freisetzung eines kurzlebigen Faktors durch das Endothel kam, welcher vorerst als *endothelium-derived relaxing factor* (EDRF) beschrieben wurde. Einige Jahre später wurden parallel zueinander Vermutungen geäußert, dass es sich bei EDRF um NO handelt (Furchgott, 1987, Ignarro, et al., 1988). Kurze Zeit später konnten Moncada et al. zeigen, dass NO, unter Freisetzung von L-Citrullin, durch NO-Synthasen aus L-Arginin synthetisiert wird (Moncada, et al., 1989). Für ihre Untersuchungen

an NO und die damit einhergehenden Aufklärungen der Funktion dieses Gases als Signalmolekül im kardiovaskulären System erhielten die Forscher Robert Furchgott, Ferid Murad und Louis J. Ignarro 1998 den Nobelpreis für Physiologie und Medizin.

NO entfaltet seine gefäßerweiternde Wirkung unter anderem über die Aktivierung der löslichen Guanylatzyklase (sGC, soluble Guanylate Cyclase) in den glatten Muskelzellen. Die sGC, ein α/β Heterodimer, katalysiert die Umwandlung von zyklischem Guanosinmonophosphat (cGMP) aus Guanosintriphosphat (GTP). Das freigesetzte cGMP führt zur Aktivierung zellulärer Signalwege, welche eine Relaxation der glatten Muskelzellen und eine damit einhergehende Gefäßerweiterung hervorrufen (Arnold, et al., 1977, Zhao, et al., 1999).

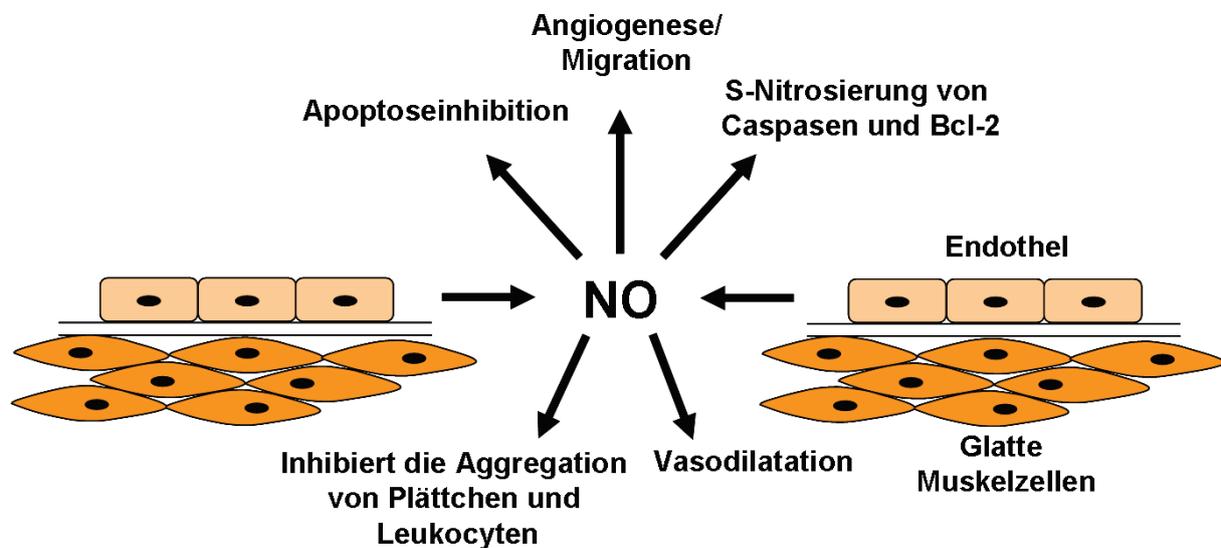


Abbildung 1.1: Funktionen von NO im Gefäß. Das von der eNOS in den Endothelzellen synthetisierte NO erfüllt eine Reihe von Funktionen im Gefäß. So führt NO in glatten Muskelzellen über den cGMP-Signalweg zur Vasodilatation des Gefäßes. Zudem verhindert NO die Aggregation von Blutzellen an die Gefäßwand. Außerdem wirkt NO über die S-Nitrosierung von Caspasen und Bcl-2 antiapoptotisch und hat darüber hinaus eine promigratorische Wirkung auf Endothelzellen.

Die Synthese von NO erfolgt im Menschen durch drei verschiedene NO-Synthasen (NOS), welche jeweils durch ein eigenes Gen kodiert sind. Die endotheliale NOS (eNOS oder NOS3) und die neuronale NOS (nNOS oder NOS1) sind beide konstitutiv aktiv und produzieren moderate Mengen NO (im picomolaren Bereich). Die dritte Isoform ist die induzierbare NOS (iNOS oder NOS2), welche z.B. durch mikrobielle Endotoxine oder proinflammatorische Zytokine aktiviert wird und NO-Mengen im nanomolaren Bereich produziert (Tsutsui, et al., 2009). Eine Gemeinsamkeit aller Isoformen ist, dass sie im aktiven Zustand Homodimere bilden, welche mit Hilfe von Kofaktoren (FMN, FAD, Ca^{2+} /Calmodulin (Cam), Eisen und Tetrahydrobiopterin) und Kosubstraten (NADPH, O_2) aus L-Arginin, über das Zwischenprodukt N^G -Hydroxy-L-Arginin, L-Citrullin und NO synthetisieren (Stuehr, et al., 1991). Die meisten durch NO vermittelten Funktionen im kardiovaskulären System, wie z.B. die Gefäßtonusmodulation, haben ihren Ursprung in der Synthese von NO durch die

endotheliale NOS (eNOS). Daher möchte ich im folgenden Abschnitt auf die Regulation der eNOS detaillierter eingehen.

1.4 Regulation der endothelialen Stickstoffmonoxid-Synthase (eNOS)

Die Endothelzelle verfügt über zahlreiche Mechanismen zur direkten oder indirekten Regulation der eNOS. Eine Möglichkeit der eNOS-Regulation besteht in der intrazellulären Lokalisation des Proteins. Schon während der Translation des eNOS-Proteins kommt es zur irreversiblen Myristoylierung an einem N-terminalen Glycin (Shaul, et al., 1996) und zu einer reversiblen Palmitoylierung an den Cysteinen 15 und 26 (Shaul, 2002). Das führt zur Translokation zu den Caveolae, kleinen sackförmigen Einbuchtungen der Plasmamembran, wo eNOS über die Acylierungen in der Membran verankert wird. Die Caveolae sind mit dem gleichnamigen membranständigen Protein Caveolin-1 besetzt, welches dort an eNOS bindet und sich inhibitorisch auswirkt (Michel, et al., 1997). Trotz der Caveolin-1 (Cav-1) bedingten Hemmung der eNOS, ist die Lokalisation an den Caveolae essentiell, da hier eine Reihe von eNOS-Agonisten aufeinandertreffen, die für die NO-Synthese der eNOS gebraucht werden. So wirken sich Veränderungen des Ca^{2+} -Spiegels positiv auf die NO-Synthese aus. Ein Anstieg des intrazellulären Ca^{2+} -Spiegels führt zur Bindung von Calmodulin (CaM) an eNOS, bei gleichzeitiger Verdrängung von Cav-1 (Michel, et al., 1997). Des Weiteren erfolgt eine Regulation der eNOS über Phosphorylierungen bzw. Dephosphorylierungen. So konnte gezeigt werden, dass eine Phosphorylierung an Serin-1177 (Aminosäure Nummern korrespondierend zum humanen eNOS) die Dissoziation von CaM verhindert, den Elektronentransfer innerhalb des Protein-Dimers verbessert und sich dadurch aktivierend auf die eNOS auswirkt (Dimmeler, et al., 1999, Fulton, et al., 1999). Die Phosphorylierung der Serine-617 und -635 wirkt sich stimulierend auf die eNOS-Aktivität aus, indem die Bindung von CaM verbessert wird bzw. Schubspannung („shear stress“) einen stärker aktivierenden Effekt hervorruft (Michell, et al., 2002). Negativ wirken sich hingegen die Phosphorylierungen an Threonin-495 und Serin-116 aus. Diese führen zu einer verminderten CaM-Bindung bzw. einer verringerten eNOS-Aktivität (Fulton, et al., 2001, Kou, et al., 2002).

Mechanische Kräfte innerhalb des Gefäßes haben ebenfalls eine regulatorische Funktion bei der NO-Synthese. Die sogenannte Schubspannung („Shear stress“) führt zu einer Aktivierung des Phosphoinositid-3-Kinase (PI3K)/Akt Signalweges und aktiviert/phosphoryliert auf diesem Wege die eNOS (Fisslthaler, et al., 2000).

Neben den bisher genannten Steuerungsmechanismen bietet die Interaktion mit anderen Proteinen, wie schon für CaM und Cav-1 beschrieben, eine Möglichkeit der Regulation. Eine große Rolle in diesem Zusammenhang spielt das Hitzeschock Protein 90 (HSP90), von dem bekannt ist, dass es die Affinität von eNOS zu CaM (Pritchard, et al., 2001) erhöht und

gleichzeitig für eine Rekrutierung der Proteinkinase B/Akt sorgt (Takahashi und Mendelsohn, 2003). Einhergehend damit kommt es zu einer Akt vermittelten Erhöhung der eNOS-Phosphorylierung an Serin 1177 und somit zu einer verstärkten Aktivierung (Dimmeler, et al., 1999, Fulton, et al., 1999). HSP90 ist essentiell für die Bindung von Akt an eNOS. Zu diesem Zweck besitzt HSP90 Bindesequenzen für beide Proteine (Fontana, et al., 2002). Das Hitzeschock Protein fungiert in diesem Zusammenhang als Bindungsplattform für den ternären Komplex aus HSP90, Akt und an CaM gebundener eNOS (Takahashi und Mendelsohn, 2003).

Ein weiterer Regulationsmechanismus, in Form einer posttranslationalen Modifikation, besteht in der Nitrosierung von Thiol-Gruppen. Es konnte gezeigt werden, dass eine S-Nitrosierung an den Cysteinen 94 und 99 sich inhibierend auf die eNOS auswirkt, wohingegen eine De-Nitrosierung, z.B. ausgelöst durch den eNOS Agonisten Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF), die Aktivität steigert (Erwin, et al., 2005, Ravi, et al., 2004). Zusätzlich konnte gezeigt werden, dass eine S-Nitrosierung von HSP90 die eNOS-Aktivität ebenfalls vermindert (Martinez-Ruiz, et al., 2005). Zusammen mit der Beobachtung, dass die S-Nitrosierung von eNOS und die Aktivität stark miteinander verknüpft sind, wurde die Hypothese aufgestellt, dass es sich hierbei um einen negativen Rückkopplungsmechanismus handelt (Martinez-Ruiz, et al., 2005).

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass es diverse Regulationsmechanismen unterschiedlichster Art für die eNOS gibt, die die NO-Synthese beeinflussen. Im nächsten Abschnitt dieser Arbeit möchte ich darstellen, welche Effekte NO in der Endothelzelle hervorrufen kann und welche Mechanismen dem zugrunde liegen.

1.5 Apoptose und Migration – NO bedingte Effekte und Mechanismen

In einer Reihe von Experimenten konnte nachgewiesen werden, dass sowohl exogenes NO, in Form von NO-Donoren, als auch endogen synthetisiertes NO, Endothelzellen vor Apoptose schützen kann. NO-Donoren, in physiologischer Konzentration, sind im Stande, Endothelzellen vor dem Zelltod, induziert durch proinflammatorische Stimuli wie TNF α oder ROS, zu schützen (Dimmeler, et al., 1999). Zudem können NO-Donoren Endothelzellen vor Apoptose, induziert durch proatherosklerotische Faktoren, wie Angiotensin II und oxidiertem LDL, schützen (Dimmeler, et al., 1997). Eine Induktion der endogenen NO-Synthese, vermittelt durch Schubspannung, ist im Stande durch TNF α oder ROS induzierte Apoptose zu inhibieren (Dimmeler, et al., 1996).

Zahlreiche Mechanismen werden von NO ausgelöst und resultieren in einer antiapoptotischen Wirkung. So konnte gezeigt werden, dass NO direkt mit den Caspasen, den Schlüsselenzymen der Apoptose, interagiert. Von besonderer Bedeutung ist hierbei die

Caspase-3, eine sogenannte Effektor-Caspase, welche durch NO an Cystein-163 im aktiven Zentrum der p17 Untereinheit des Enzyms S-nitrosiert und dadurch inhibiert wird (Dimmeler, et al., 1997, Haendeler, et al., 1997). Ein weiteres Protein, welches in apoptotische Prozesse involviert ist und durch NO reguliert werden kann, ist B-cell lymphoma-2 (Bcl-2). Es konnte durch Azad et al. gezeigt werden, dass eine S-Nitrosierung des antiapoptisch wirkenden Proteins Bcl-2 an den Cysteinen-158 und -229 eine proteasomale Degradation des Proteins verhindern kann (Azad, et al., 2006). Andere Studien zeigten, dass NO einen destabilisierenden Effekt auf die mRNA der MAP kinase phosphatase-3 (MKP-3) hat (Rossig, et al., 2000). Die MKP-3 dephosphoryliert und inaktiviert die MAP Kinase ERK1/2, welche wiederum im aktiven Zustand Bcl-2 durch Phosphorylierung vor proteasomaler Degradation schützt (Dimmeler, et al., 1999).

Neben dem Schutz vor Apoptose ist die Angiogenese von Endothelzellen ein wichtiger Faktor für die Integrität des Gefäßes. Die beiden Funktionen sind miteinander verknüpft: so führt Apoptose von Endothelzellen zu endothelialer Dysfunktion und einer Schädigung der Blutgefäße, welche im Prozess der Angiogenese durch neue Blutgefäße kompensiert wird. Zudem führt der proangiogene Faktor VEGF, neben einer Stimulation der Angiogenese, auch zu einem Schutz vor Apoptose (Gerber, et al., 1998). VEGF ist der wohl wichtigste proangiogene Faktor in Endothelzellen. Er führt über den VEGF-Rezeptor 2 (VEGFR2) zur Aktivierung des PI3K/Akt Signalweges, welcher unter anderem die eNOS über die Phosphorylierung an Serin-1177 aktiviert (Gelinias, et al., 2002). Es konnte gezeigt werden, dass eNOS defiziente Knockout Mäuse nicht mehr im Stande sind eine VEGF-induzierte Angiogenese hervorzurufen (Murohara, et al., 1998). Neben der Aktivierung der NO-Synthese über VEGF, konnte in Experimenten ebenfalls gezeigt werden, dass NO im Stande ist die VEGF-Expression zu beeinflussen.

Der Transkriptionsfaktor HIF (Hypoxia inducible factor) vermittelt unter hypoxischen Bedingungen die Expression von VEGF und induziert damit die Gefäßneubildung, um der Hypoxie entgegenzuwirken. Es wurde sowohl *in vitro* als auch *in vivo* gezeigt, dass eine S-Nitrosierung von HIF den Transkriptionsfaktor stabilisiert und eine Aktivierung der VEGF-Expression auch unter normoxischen Bedingungen ermöglicht (Li, et al., 2007, Lima, et al., 2009).

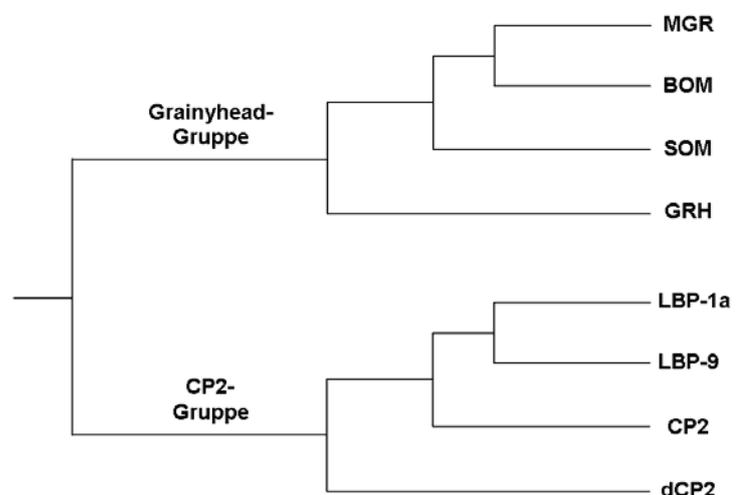
Jedoch gibt es neben der VEGF-induzierten Angiogenese, auch eine VEGF unabhängige Angiogenese/Migration in Endothelzellen, welche durch NO ausgelöst werden kann. So führte eine Behandlung mit Endostatin, welches über die Phosphatase PP2A eNOS mittels Dephosphorylierung inaktiviert, zu einer Inhibition der VEGF-induzierten Migration von Endothelzellen. Eine exogene NO-Zugabe, über den NO-Donor S-nitroso-N-acetylpenicillamine (SNAP), konnte diesen Effekt hingegen umkehren (Urbich, et al., 2002).

1.6 Die Familie der *Grainyhead* Transkriptionsfaktoren

Das namensgebende Gen *Grainyhead* (*grh*), welches ebenfalls unter den Synonymen *Elf-1* (E74-like factor 1) und *NTF-1* (neuronal transcription factor 1) bekannt ist, bildet den Ursprung der Transkriptionsfaktor-familie *Grainyhead*. Entdeckt und erstmalig beschrieben wurde es in der Taufliege *Drosophila* (Bray, et al., 1989). Es konnte gezeigt werden, dass *grh* defiziente *Drosophila* Embryonen in einer späten Phase der Embryogenese sterben. Charakteristisch für die mutanten Embryonen ist eine veränderte Cuticula- und Kopfstruktur. Der Kopf weist „granuläre“ Strukturen auf, welche zu dem Namen *Grainyhead* (Grainy (engl.) = Körnig (dt.)) führten. In *Drosophila* Embryonen wird der Transkriptionsfaktor *Grainyhead* hauptsächlich in der Epidermis und dem Nervensystem exprimiert. Es konnte gezeigt werden, dass *Grainyhead* die Expression der Dopadecarboxylase (*Ddc*) in der Epidermis steigert. *Ddc* wird in der späten Phase der Embryogenese exprimiert, wenn auch die Cuticula sezerniert/sekretiert wird und ist für die Härtung (Wright, et al., 1976) und Farbgebung cuticulärer Strukturen verantwortlich (Bray und Kafatos, 1991).

Die Familie der *Grainyhead* Transkriptionsfaktoren lässt sich phylogenetisch in zwei Untergruppen aufspalten, die *Grainyhead*-Gruppe und die *CP2*-Gruppe, welche beide von der Fliege bis zum Menschen hoch konserviert sind. Zu der *Grainyhead*-Gruppe gehören neben dem *Drosophila*-Gen *grainyhead* noch die Homologen Gene, Mammalian-*Grainyhead* (*MGR*, *GRHL1*, *grainyhead-like 1*), Brother-of-Mammalian *Grainyhead* (*BOM*, *GRHL2*, *grainyhead-like 2*) und Sister-of-Mammalian *Grainyhead* (*SOM*, *GRHL3*, *grainyhead-like 3*). Die *CP2*-Gruppe besteht aus den Genen *CP2*, *dCP2* (*CP2* aus *Drosophila*), *LBP-1a* und *LBP-9*.

Abbildung 1.2: Phylogenetischer Stammbaum der Familie der *Grainyhead*-like Transkriptionsfaktoren. Der Stammbaum stellt die Verwandtschaftsverhältnisse der einzelnen Transkriptionsfaktoren untereinander dar und ordnet sie der *Grainyhead*- oder *CP2*-Gruppe zu (modifiziert nach Ting *et al.*, 2003).



Charakteristisch für alle Transkriptionsfaktoren der *Grainyhead*-Familie ist eine ca. 110 Aminosäuren lange DNA-Binde-Domäne (DBD) und eine C-terminale Dimerisierungs-Domäne (DD). Die DD ermöglicht es den Transkriptionsfaktoren Homo- oder Heterodimere

zu bilden. Es konnte gezeigt werden, dass die Mitglieder der Grainyhead-Gruppe im Stande sind sowohl Homodimere, als auch Heterodimere untereinander auszubilden (Ting, et al., 2003, Wilanowski, et al., 2002), jedoch nicht mit Transkriptionsfaktoren der CP2-Gruppe (Uv, et al., 1994). Die Ausbildung von Dimeren ermöglicht eine verbesserte Bindung an die DNA, ist jedoch nicht notwendig für die Bindung an diese (Uv, et al., 1994).

1.7 Der Transkriptionsfaktor grainyhead-like 3 (GRHL3)

Der Transkriptionsfaktor GRHL3 (Sister-of-Mammalian Grainyhead, SOM) wurde durch Ting et al. in einer Datenbanksuche mit der hochkonservierten Dimerisierungs-Domäne von *MGR* und *BOM* gefunden (Ting, et al., 2003). Untersuchungen an GRHL3 defizienten Mäusen zeigten, dass diese kurz nach der Geburt an einer *spina bifida* sterben. Hierbei handelt es sich um eine Neuralrohrfehlbildung, die in einem „offenen Rücken“ resultiert. Zudem konnte eine gestörte Barriere der Epidermis und ein Defekt in der Wundheilung festgestellt werden. Ein phänotypischer Vergleich der GRHL3 defizienten Maus mit anderen für die Wundheilung defizienten Mäusen, zeigte Parallelen zum Phänotyp einer TGase1 defizienten Maus (Ting, et al., 2005). Nachfolgende Northern-Blot-Analysen zeigten, dass die TGase1 Expression in GRHL3 defizienten Mäusen auf weniger als ein Fünftel reduziert ist. Analog zueinander führen die für Grainyhead (*grh*) aus *Drosophila* und GRHL3 aus Säugern identifizierte Zielgene *Dopadecarboxylase (Ddc)* und *Transglutaminase 1 (TGase1)* ähnliche Funktionen aus. So katalysiert die Ddc eine Härtung der Cuticula über die Bildung von Chinonen, welche für die Vernetzung von Proteinen verantwortlich sind (Scholnick, et al., 1986). Die TGase1 katalysiert ebenfalls die Verknüpfung von Proteinen über eine Isopeptidbindung zwischen den Aminosäuren Glutamin und Lysin (Bakker, et al., 2008). Ein weiteres Indiz für die starke Konservierung der Grainyhead Transkriptionsfaktoren, nicht nur auf genetischer Ebene, sondern auch auf funktioneller Ebene, zeigt sich in der Identifikation identischer Konsensus-Sequenzen für *grh* und GRHL3.

Neben allen Gemeinsamkeiten zwischen den Transkriptionsfaktoren, wurden für GRHL3 auch zahlreiche neue Funktionen entdeckt. So konnte eine Beteiligung von GRHL3 an migratorischen Prozessen nachgewiesen werden. Es wurde in der humanen Keratinozyten-Zelllinie HaCAT in einem Wundheilungsexperiment nachgewiesen, dass GRHL3 die Wundheilung über eine verstärkte Migration, jedoch nicht über die Proliferation, beeinflusst (Caddy, et al., 2010, Ting, et al., 2005). Zudem konnte dabei *RhoGEF19* als Zielgen von GRHL3 identifiziert werden. Das zugehörige Protein ist in die RhoA-Aktivierung involviert und reguliert darüber die Aktin-Polymerisation, welche einen entscheidenden Einfluss auf die Motilität einer Zelle hat (Caddy, et al., 2010).

Unabhängig davon konnte gezeigt werden, dass die Überexpression von GRHL3 einen promigratorischen Effekt auf HUVEC (human umbilical vein endothelial cells) hat, vergleichbar zu dem des promigratorischen Faktors VEGF. Zudem konnte die starke proangiogene Funktion von GRHL3 in einem 3D-Sphäroid Versuch (Sprouting-Assay) nachgewiesen werden (Guardiola-Serrano, et al., 2008). In Experimenten unserer Arbeitsgruppe zeigte sich, dass der promigratorische Effekt von GRHL3 in HUVEC nicht über eine Stimulation von VEGF vermittelt wird (Lukosz, Mlynek et al., 2011).

Neben der promigratorischen Wirkung von GRHL3 konnte auch eine antiapoptotische Wirkung festgestellt werden. Die Identifikation von GRHL3 in einer Suche nach TNF α -regulierten Genen in der Brustkrebszelllinie MCF-7 lieferte erste Hinweise darauf (Guardiola-Serrano, et al., 2008), da das Zytokin TNF α in eine Reihe von apoptotischen Prozessen involviert ist (Aggarwal, 2000). In HUVEC durchgeführte Apoptose-Messungen, nach GRHL3-Überexpression, bestätigten die Annahme des antiapoptotischen Effektes von GRHL3 (Lukosz, Mlynek et al., 2011). Wie schon in vorherigen Teilen dieser Arbeit beschrieben, spielt NO eine entscheidende Rolle in den für Endothelzellen wichtigen Funktionen Migration und Apoptose. Es konnte in Experimenten zur Apoptose von Endothelzellen nachgewiesen werden, dass der durch GRHL3 hervorgerufene antiapoptotische Effekt, durch Behandlung der GRHL3 überexprimierenden Zellen mit dem eNOS Inhibitor L-N^G-monomethyl Arginin (L-NMMA), komplett aufgehoben wird (Lukosz, Mlynek et al., 2011). Weitere Untersuchungen zeigten, dass eine Überexpression von GRHL3 eine Phosphorylierung der Kinase Akt und der nachgeschalteten endothelialen NOS, an den Serinen 473 (Akt) und 1177 (eNOS), zur Folge hat. Die Aktivierung dieser beiden Proteine nach Phosphorylierung führt zu einer erhöhten NO-Synthese, welche indirekt über eine verstärkte S-Nitrosierung von Proteinen nach GRHL3 Überexpression nachgewiesen werden konnte (Lukosz, Mlynek et al., 2011). Zudem konnte gezeigt werden, dass nicht nur GRHL3 im Stande ist die NO-Synthese zu stimulieren, sondern auch umgekehrt eine Zugabe von NO in physiologischen Konzentrationen die GRHL3-mRNA-Menge erhöht (Lukosz, Mlynek et al., 2011). Alle in diesem Kapitel aufgeführten Experimente und Erkenntnisse beziehen sich auf die Isoform 2 des Transkriptionsfaktors GRHL3 (GRHL3-2, SOM2), welche sowohl in der Maus als auch im Menschen vorkommt. Es gibt im Menschen jedoch noch zwei weitere GRHL3 Isoformen, die in der Maus nicht exprimiert werden und die ich im nächsten Abschnitt vorstellen möchte.

1.8 GRHL3 Isoformen im Menschen

Im Menschen konnten drei verschiedene Isoformen des Transkriptionsfaktors GRHL3 identifiziert werden. Sie unterscheiden sich in der Anzahl ihrer Aminosäuren aufgrund von der Benutzung unterschiedlicher erster Exons oder sind Spleißvarianten. Die erste Isoform (GRHL3-1, SOM1) unterscheidet sich von der zweiten Isoform (GRHL3-2, SOM2), welche als einzige auch in der Maus vorkommt, nur in der Benutzung eines anderen ersten Exons. GRHL3-1 benutzt das in der Maus nicht existierende Exon 1B, wohingegen GRHL3-2 Exon 1A nutzt. So unterscheiden sich die aus den RNAs resultierenden Proteine in ihrer Länge nur marginal und sind fast identisch. GRHL3-1 besteht aus 607 Aminosäuren, GRHL3-2 dagegen nur aus 602 Aminosäuren. Die GRHL3-Isoform GRHL3-3 entsteht durch alternatives Spleißen des Primärtranskripts, das auch für GRHL3-1 kodiert. Der für GRHL3-3 kodierenden RNA fehlt das zweite Exon, wodurch ein Stopcodon im Leseraster des GRHL3-1 Initiationscodons entsteht, welches einen Abbruch der Translation bewirkt. Ein alternativer Translationsstart der Isoform GRHL3-3 im vierten Exon führt zu einem verkürzten Protein mit einer Länge von 509 Aminosäuren.

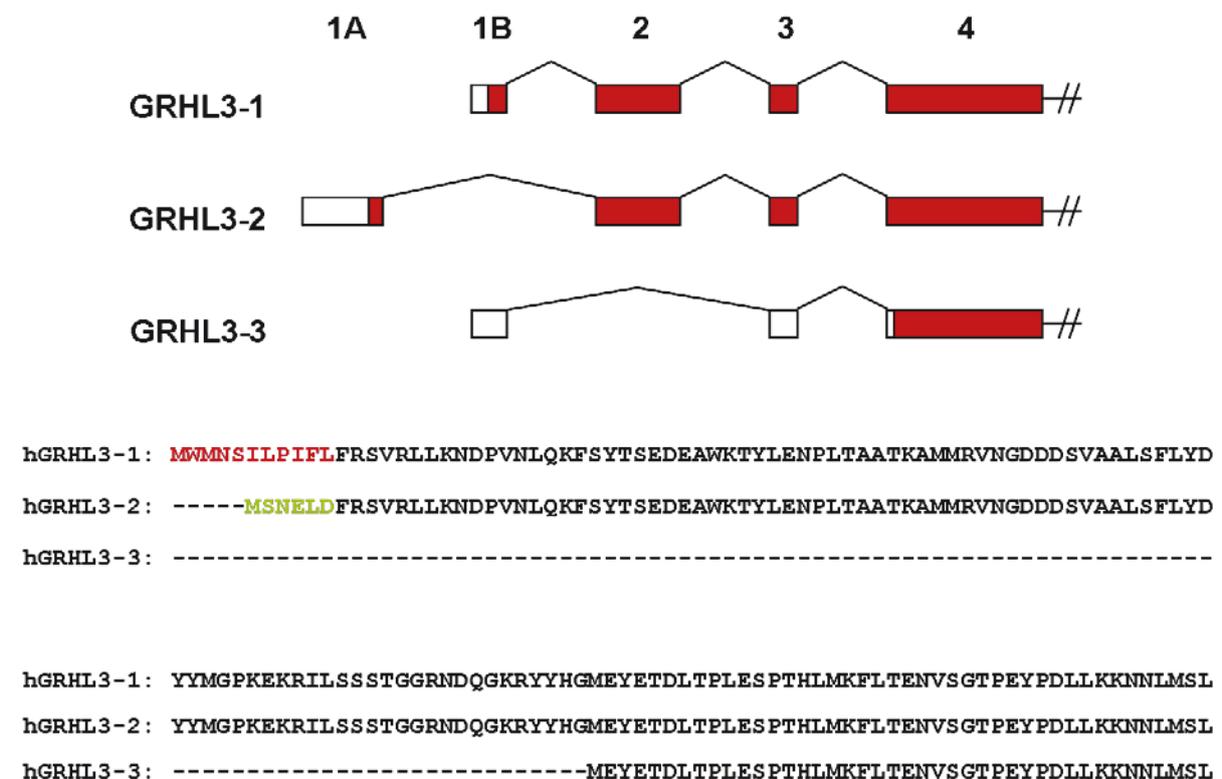


Abbildung 1.3: Humane GRHL3 Isoformen. (A) Schematische Darstellung des 5'-Endes der Isoform spezifischen Transkripte von GRHL3-1, GRHL3-2 und GRHL3-3. Die ersten vier Exons (Kästen) sind maßstabsgetreu als Rechtecke dargestellt. Translatierte Bereiche sind rot gekennzeichnet. Die dazwischen liegenden Introns (nicht maßstabsgetreu) sind mit Strichen gekennzeichnet. (B) Aminosäure-Sequenzvergleich des N-terminalen Bereiches der einzelnen GRHL3-Isoformen; Unterschiede zwischen GRHL3-1 und GRHL3-2 sind farblich markiert (modifiziert nach Ting *et al.*, 2003).

Kurz nach der Entdeckung von GRHL3 und seinen Isoformen im Jahre 2003 wurden erste Untersuchungen zur transkriptionellen Aktivität dieser Isoformen von Ting et al. durchgeführt. Dabei wurde ein kommerzielles „two-hybrid“ System benutzt. Hierfür wurden N-terminale Fragmente der einzelnen Isoformen mit einer GAL4-DNA-Bindedomäne in einem Expressionsvektor fusioniert. Zusammen mit einem Reportergenkonstrukt, welches fünf aufeinander folgende GAL4 DNA Bindestellen enthielt, wurden beide Vektoren in HEK293T-Zellen kotransfiziert. Aufgrund der fehlenden Aktivität in mit dem N-Terminus von GRHL3-3 transfizierten Proben schlussfolgerten Ting et al., dass GRHL3-3 über keine Domäne zur Aktivierung der Transkription verfügt (Ting, et al., 2003). Überlegungen zur Folge könnte nach Ting et al. GRHL3-3 als Repressor wirken, welcher mit GRHL3-1 um DNA-Bindestellen konkurriert oder gar über eine Heterodimerisierung mit anderen Isoformen als dominant-negative Isoform fungiert (Ting, et al., 2003).

1.9 Fragestellungen

Im Vergleich zur Maus existieren im Menschen drei verschiedene Isoformen des Transkriptionsfaktors GRHL3 (GRHL3-1, GRHL3-2 und GRHL3-3). Bisher wurde nur die Isoform GRHL3-2, welche das Homolog zur einzigen in der Maus vorkommenden GRHL3-Isoform darstellt, in Endothelzellen analysiert. Hierbei konnte gezeigt werden, dass GRHL3-2 einen promigratorischen und antiapoptotischen Einfluss auf Endothelzellen hat. Dieser wurde über die aktivierend wirkende Phosphorylierung der für die NO Synthese essentiellen Proteine Akt und eNOS vermittelt und führte darüber hinaus zu einer gesteigerten Menge an S-nitrosierten Proteinen.

Aufgrund dieser Ergebnisse sollte untersucht werden,

- (1.) welchen Einfluss die Isoformen GRHL3-1 und GRHL3-3 auf die Apoptose und Migration von Endothelzellen haben.
- (2.) ob die beiden Isoformen im Stande sind aktivierend auf die Transkription von Zielgenen zu wirken, und, falls dies der Fall ist, welche spezifischen Zielgene die beiden Transkriptionsfaktoren aktivieren.
- (3.) welchen Einfluss die beiden Isoformen *in vivo* in einem Ganztier-Modell haben.
- (4.) worüber der Transport des Proteins vom Zytoplasma in den Nukleus gesteuert wird, indem ein nukleäres Lokalisationssignal in der Sequenz von GRHL3 identifiziert werden soll.

2. Material und Methoden

2.1 Materialien

2.1.1 Chemikalien

Die verwendeten Materialien und Chemikalien wurden, wenn nicht anders angegeben, von Sigma-Aldrich (München), Merck (Darmstadt) oder Carl Roth (Karlsruhe) bezogen. Puffer und Lösungen wurden mit Reinstwasser aus einer MilliQ-Anlage (Millipore, Eschborn) hergestellt und gegebenenfalls autoklaviert oder mit einem Membranfilter (0,22 µm) sterilfiltriert (Millipore, Eschborn). Die Verbrauchsmaterialien der Zellkultur waren Produkte der Greiner Bio-One GmbH (Frickenhausen) oder der Fa. TPP (Trasadingen, Schweiz).

2.1.2 spezielle Reagenzien und Enzyme

Name	Hersteller
5x RLB-Puffer	Promega (Mannheim)
Bio-Rad Protein Assay	BioRad (München)
DAPI (4',6-Diamidin-2-phenylindol)	Carl Roth (Karlsruhe)
Desoxyoligonukleotid (dNTP) Mix (10mM)	Invitrogen (Karlsruhe)
Chemilumineszenzreagenz ECL	GE Healthcare (Freiburg)
Chemilumineszenzreagenz ECL Plus™	GE Healthcare (Freiburg)
GeneRuler™ 1 kb Plus DNA Ladder	Invitrogen (Karlsruhe)
GeneRuler™ Low Range DNA Ladder	Invitrogen (Karlsruhe)
T4-DNA-Ligase (6 U/µl)	New England Biolabs (Frankfurt)
T4-DNA-Ligase Puffer (10x)	New England Biolabs (Frankfurt)
Mito-Tracker	
MyTaq™ HS DNA Polymerase	Bioline GmbH (Luckenwalde)
Pfx50™ DNA Polymerase	Invitrogen (Karlsruhe)
Precision Plus Protein™ Kaleidoscope™ Standard	BioRad (München)
Prolong® Gold Antifade Reagent	Invitrogen (Karlsruhe)
Phalloidin Alexa Fluor® 568	Invitrogen (Karlsruhe)
Restore PLUS Westernblot Stripping-Buffer	Pierce (Rockford, USA)

Restriktionsenzyme & Puffer	New England Biolabs (Frankfurt)
RNAse OUT (40U/μl)	Invitrogen (Karlsruhe)
Roti®-Quant	Roth (Karlsruhe)
RQ1 RNase freie DNase	Promega (Mannheim)
TRIzol®	Invitrogen (Karlsruhe)
Ultrapure™ DNase/RNase freies destilliertes Wasser	Invitrogen (Karlsruhe)

2.1.3 Kommerzielle Kits und Assays

Name	Hersteller
Annexin-V-FITC Apoptosis Detection Kit I	BD Pharmingen™ (San Diego, USA)
Hispeed® Plasmid Maxi Kit	Qiagen (Hilden)
QIAprep® Spin Miniprep Kit	Qiagen (Hilden)
QIAquick® Gel Extraction Kit	Qiagen (Hilden)
QIAquick® PCR Purification Kit	Qiagen (Hilden)
RNeasy® Mini Kit	Qiagen (Hilden)
SuperScript® III First-Strand Synthesis-System	Invitrogen (Karlsruhe)

2.1.4 Geräte

Gerät	Hersteller
Absaugapparatur „Vacusafe“	IBS INTEGRA Bioscience (Fernwald)
Autoklav „Varioklav“	Thermo Fischer Scientific (Waltham, USA)
Automatische Pipette „Cell Mate II“	Thermo Fischer Scientific (Waltham, USA)
Bakterienschüttler „Ecotron“	Infors HT (Basel, Schweiz)
Brutschrank „Heraeus Function Line“	Thermo Fischer Scientific (Waltham, USA)
Durchflusszytometer „FACSCalibur™“	BD (Franklin Lakes, USA)
Feinwaage „CP124S“	Sartorius Research (Göttingen)
Fluoreszenzmikroskop „Axio Observer D1“	Carl Zeiss Inc. (Jena)
„HERAcell® 240“ CO ₂ -Inkubator	Thermo Fischer Scientific (Waltham, USA)
Kühlzentrifuge „Heraeus Fresco 17“	Thermo Fischer Scientific (Waltham, USA)
Kühlzentrifuge „Rotina 420R“	Hettich (Tuttlingen)
Kühlzentrifuge „5810“	Eppendorf (Hamburg)
Luminometer „LB 96 V-Injektor“	EG&G Berthold (Bad Wildbad)

Magnetrührer "RH basic 2"	IKA (Staufen)
Mikrowelle "MS2987U"	LG (Willich)
Mikroskop "Axio Observer A1"	Carl Zeiss Inc. (Jena)
Mini-Protean Tetra System (SDS-Page & Westernblot)	BioRad (München)
Orbitalschüttler "HS 260 basic"	IKA (Staufen)
PerfectBlue™ Mini Gel-System	Peqlab (Erlangen)
Photometer „SmartSpec™ Plus“	BioRad (München)
pH-Meter SevenGo™	Mettler Toledo (Schwerzenbach, Schweiz)
Spannungsquellen „EV202“	Peqlab (Erlangen)
Sicherheitswerkbank „HERAsafe®“	Thermo Fischer Scientific (Waltham, USA)
Thermomixer comfort	Eppendorf (Hamburg)
Thermocycler "GS482"	G-Storm (Somerton, United Kingdom)
Geldokumentationssystem "Fluorchem IS-8900"	ProteinSimple (Santa Clara, USA)
Vortexer "Vortex Genie 2"	Scientific Industries Inc. (Bohemia, USA)
Waage "440-43N"	Kern & Sohn GmbH (Baldingen-Frommern)

2.1.5 Antikörper

Tabelle 2.1: Erstantikörper

Antigen	Hersteller	Spezies	Eingesetzte Verdünnung	
			WB	IF
γ-Aktin	Santa Cruz Biotechnology	Maus (monoklonal)	1:20000	-
AKT	Becton & Dickinson	Kaninchen (monoklonal)	1:500	-
AKT2	Cell Signaling Technologies	Kaninchen (monoklonal)	1:1000	-
c-myc	Biomol	Maus (monoklonal)	-	1:50
eNOS	Becton & Dickinson	Kaninchen (polyklonal)	1:1000	-
GAPDH	abcam	Maus (monoklonal)	1:10000	-
Mxi1	Santa Cruz Biotechnology	Kaninchen (monoklonal)	1:100	-
p-AKT (S473)	Becton & Dickinson	Kaninchen (polyklonal)	1:500	-
p-eNOS (S1179)	Becton & Dickinson	Kaninchen (polyklonal)	1:500	-
α-Tubulin	Dianova	Maus (monoklonal)	1:10000	-
V5	Invitrogen	Maus (monoklonal)	1:1000	-

Die in Tab.2.1 aufgeführten Abkürzungen: WB = Westernblot und IF = Immunfluoreszenz.

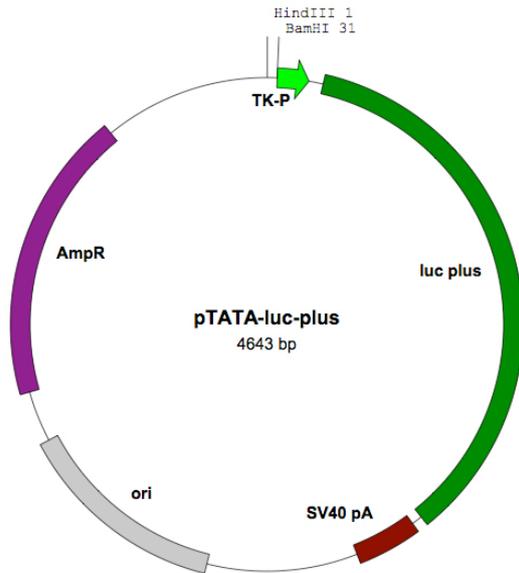
Tabelle 2.2: Zweitantikörper

Antigen	Hersteller	Eingesetzte Verdünnung	
		WB	IF
Anti-Maus (Alexa Fluor® 488 gekoppelt)	Santa Cruz Biotechnology	-	1:500
Anti-Maus (HRP gekoppelt)	GE Healthcare	1:5000	-
Anti-Kaninchen (HRP gekoppelt)	GE Healthcare	1:5000	-

Die in Tab.2.2 aufgeführten Abkürzungen: WB = Westernblot und IF = Immunfluoreszenz.

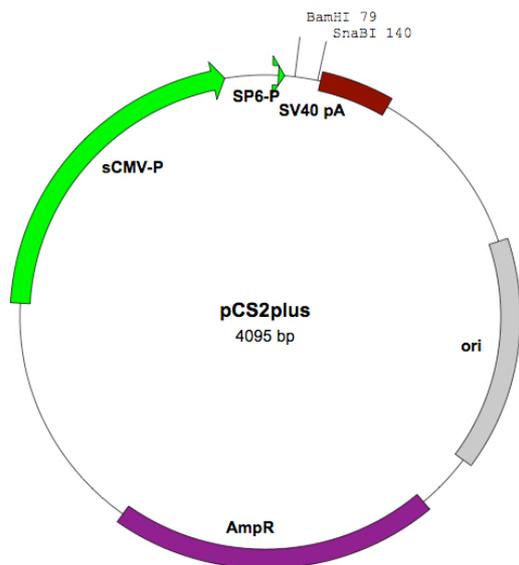
2.1.6 Basisplasmide

Vektor	Beschreibung
<p style="text-align: center;">pCMV-V5-neo 5368 bp</p>	<p>pCMV- V5-neo</p> <p>Eukaryotischer Expressionsvektor zur Expression der GRHL3 Isoformen 1 und 3, zusätzlich als Leervektor ohne eukaryontische cDNA vorhanden. Der Vektor wurde ursprünglich aus dem Vektor pcDNA6/V5-His durch Austausch des Blasticidin Resistenzgens gegen das Neomycin Resistenzgen generiert. Der Vektor besitzt einen CMV Promotor (CMV-P) gefolgt von der cDNA für die jeweilige GRHL3 Isoform (in diesem Beispiel nicht zu sehen) und als Selektionsmarker ein Amicillin- und ein Neomycin-Resistenzgen (AmpR und NeoR). Der Vektor besitzt ein V5-Epitop (V5) und ein Hexa-Histidin-Tag (in der Karte nicht verzeichnet). Die kodierenden Sequenzen der GRHL3-Isoformen wurden mit einer Kozak-Sequenz hinter dem CMV-Promotor inseriert. Auf das Strukturgen für die jeweilige GRHL3-Isoform und die Neomycin-Phosphotransferase folgen jeweils RNA-Prozessierungssignale (bGH pA und SV40 pA) zur Polyadenylierung. Zur Replikation der Plasmid-DNA in <i>E. coli</i> besitzt der Vektor einen Replikationsursprung (ori).</p>



pTATA-luc+ (Altschmied und Duschl, 1997)

Der Vektor enthält eine Transkriptionseinheit bestehend aus dem Promotor des Thymidinkinasegens in einer verkürzten Version (TK-P) (McKnight und Kingsbury, 1982). Dabei handelt es sich um den Bereich von 32 bp oberhalb des Transkriptionsstarts bis 105 bp dahinter, wodurch als Promotorelement nur noch die TATA-Box verbleibt (Smale und Kadonaga, 2003). Dem Promotor folgt die kodierende Region des Luziferase Gens in modifizierter Form (luc plus) konstruiert von der Fa. Promega (Madison, USA) und einem Gen für die Polyadenylierung der mRNA (SV40 pA). Zusätzlich enthält der Vektor zur Vermehrung des Plasmids in *E. coli* eine Replikationsursprung (ori) und als Selektionsmarker ein Ampicillin Resistenzgen (AmpR).



pCS2+ (Rupp, et al., 1994)

Der Vektor pCS2+ ist ursprünglich zur Expression von Proteinen in Embryos des Krallenfrosches (*Xenopus laevis*) konstruiert worden. Er wird aber auch häufig zur *in vitro* Transkription von mRNA benutzt. Der Vektor enthält den sCMV Promotor (sCMV-P), welcher im Gegensatz zum humanen CMV Promotor eine größere Speziesvariabilität und eine stärkere Promotoraktivität aufweist (Jeang, et al., 1987). Zusätzlich enthält er einen SP6 Promotor (SP6-P) gefolgt von einem Polylinker (durch Restriktionsschnittstellen BamHI und SnaBI gekennzeichnet) und einer SV40 Polyadenylierungsstelle (SV40 pA). Diese Transkriptionseinheit kann für die *in vitro* Transkription von über den Polylinker eingebrachten Sequenzen genutzt werden. Zusätzlich enthält der Vektor zur Vermehrung des Plasmid einen Replikationsursprung (ori) und als Selektionsmarker ein Ampicillin Resistenzgen (AmpR).

2.1.7 Desoxyoligonukleotide

Die Synthese von Desoxyoligonukleotiden als Primer für die PCR und Sequenzierungen wurde von der Firma Sigma-Aldrich (Hamburg) durchgeführt. Die Desoxyoligonukleotide wurden lyophilisiert geliefert, mit Ultrapure™ DNase/RNase freiem Wasser wurden Stammlösungen mit einer Konzentration von 100 µM hergestellt. Von diesen Stammlösungen wurden Verdünnungen mit einer Konzentration von 10 µM in PCR-Reaktionen verwendet.

Eine Liste der in dieser Arbeit verwendeten Oligonukleotide befindet sich im Anhang (A3).

2.1.8 Bakterienstämme

Zur Propagation von Plasmiden wurde der *Escherichia coli* Stamm TG1 verwendet.

Er hat den Genotyp: K-12 *supE thi-1 Δ(lac-proAB) Δ(mcrB-hsdSM)5, (r_K⁻m_K⁻)* und enthält zusätzlich das F-Episom: [*traD36 proAB⁺ lacI^q lacZΔM15*].

2.2 Methoden

2.2.1 Zellkultur

Sämtliche Arbeiten, die direkt oder indirekt mit der Zellkultur zu tun hatten, wurden unter sterilen Bedingungen in einer Sicherheitswerkbank durchgeführt.

Sämtliche Chemikalien und Zusätze der Zellkultur wurden unter der Sicherheitswerkbank geöffnet und verwendet, sowie gegebenenfalls zusätzlich sterilfiltriert.

2.2.1.1 Medien und Puffer

Dulbecco`s modified Eagle`s-Glutamax-Medium (DMEM-Glutamax, Gibco, Karlsruhe):

Komplettmedium: DMEM-Glutamax (4,5 g/l Glukose)
 + 1% (v/v) Pen/Strep
 + 10% (v/v) FCS hitzeinaktiviert

Serumfreies Medium: DMEM-Glutamax (4,5 g/l Glukose)

Endothelial Basal Medium (EBM, Lonza, Köln):

Komplettmedium: EBM
 + 10% (v/v) FCS nicht hitzeinaktiviert
 + EGMTM SingleQuots[®]:
 - 0,5ml Gentamicin-Amphotericin B (GA-1000)
 - 0,5ml Hydrocortison
 - 0,5ml rekombinanter humaner epidermaler Wachstumsfaktor
 - 0,5ml Ascorbinsäure
 - 2ml Rinderhirn-Extrakt (BBE).

Serumfreies Medium: EBM

FCS (fötale Kälberserum) (Gibco/Invitrogen, Karlsruhe):

- nicht inaktiviert (HUVEC) oder 1 h bei 56°C inaktiviert (HEK293-Zellen)

Pen/Strep (PAA, Pasching, Österreich):

10000 U/ml Penicillin

10000 µg/ml Streptomycin

PBS (Gibco/Invitrogen, Karlsruhe)

2,6 mM KCl

1,4 mM KH₂PO₄

137 mM NaCl

6,4 mM Na₂HPO₄

pH 7,4

Trypsin-EDTA (Gibco/Invitrogen, Karlsruhe)

0,5 g/l Trypsin in PBS (1x Trypsin)

2.2.1.2 Kultivierung von humanen embryonalen Nierenzellen (HEK293, Human Embryonic Kidney cells)

Bei der Zelllinie HEK293 handelt es sich um eine Ende der 70er Jahre etablierte Zelllinie, welche aus der Transformation von menschlichen embryonalen Nierenzellen mit Teilen der DNA des humanen Adenovirus 5 entstand (Graham, et al., 1977). Diese hypotriploiden Epithelzellen wachsen adhärent und bilden einen einschichtigen Zellrasen aus. Die HEK293-Zellen wurden in DMEM-Glutamax Komplettmedium kultiviert. Zur Passage und zum Ausbringen in Zellkulturschalen wurden die Zellen bei einer 70-90%igen Konfluenz nach Entfernung des Mediums mit PBS gewaschen und in Trypsin-EDTA-Lösung vom Boden der Zellkulturflasche abgelöst. Durch leichtes Klopfen gegen die Zellkulturflasche wurde das Ablösen der Zellen beschleunigt. Nach etwa 2 min wurde die Trypsinaktivität durch die Zugabe von DMEM Komplettmedium abgestoppt, um eine Schädigung der Zellen zu verhindern. Die Zellen wurden resuspendiert und zur weiteren Passagierung mit Komplettmedium verdünnt. Die Aussaat in neue 75cm² Zellkulturflaschen erfolgte in Verdünnung zu einem bestimmten Verhältnis, oder aber in definierter Zellzahl. Die Zellen wurden bei einer wasserdampfgesättigten, 37°C warmen Atmosphäre mit 5% (v/v) Kohlendioxid in einem "HERAcell[®] 240" CO₂-Inkubator (Thermo Fischer Scientific, Waltham, USA) kultiviert.

2.2.1.3 Kultivierung von primären humanen Nabelschnur-Endothelzellen (HUVEC, Human Umbilical Vein Endothelial cells)

HUVEC sind primäre humane Endothelzellen aus den Nabelschnurvenen von Neugeborenen (Jaffe, et al., 1973). Bei den in dieser Arbeit verwendeten HUVEC handelt es

sich um gepoolte Zellen, sie wurden demnach aus den Nabelschnurvenen verschiedener Neugeborener gewonnen, diese wurden von der Firma Lonza (Köln) bezogen. Die Zellen wurden in EBM Komplettmedium gehalten und wurden bei einer wasserdampfgesättigten, 37°C warmen Atmosphäre mit 5% (v/v) Kohlendioxid in einem "HERAcell® 240" CO₂-Inkubator (Thermo Fischer Scientific, Waltham, USA) kultiviert. Nach jeweils zwei Tagen wurde unabhängig von der Konfluenz der Zellen ein Mediumwechsel durchgeführt. Bei 70-90%iger Konfluenz der Zellen wurden diese entweder passagiert oder auf Zellkulturschalen ausgebracht. Hierzu wurden die Zellen einmal mit PBS gewaschen und mit Trypsin-EDTA Lösung für wenige Minuten inkubiert. Das Ablösen der Zellen wurde mikroskopisch kontrolliert. Nachdem sich die Zellen abzurunden begannen, wurde das Trypsin durch die Zugabe von EBM Komplettmedium inaktiviert. Zum vollständigen Ablösen der Zellen von der Zellkulturflasche wurden diese mithilfe eines Zellschabers vom Flaschenboden geschabt. Die erhaltene Zellsuspension wurde resuspendiert und mit Komplettmedium verdünnt und in einem bestimmten Verhältnis oder aber in definierter Zellzahl in Zellkulturflaschen oder auf Zellkulturschalen ausgebracht.

2.2.1.4 Ernte und Lyse von eukaryotischen Zellen

RIPA-Puffer

- 50mM Tris-HCl pH 8,0
- 1% (v/v) NONIDET P-40
- 150mM NaCl
- 0,1% (w/v) SDS
- 0,5% (w/v) Desoxycholat

→ es wurde auf 10ml Puffer noch je eine Complete Mini Protease Inhibitor Tablette (Roche, Mannheim) zugegeben.

5x RLB-Puffer (Reporter-Lysis-Buffer, Promega, Mannheim)

Um sowohl die HEK293-Zellen als auch die HUVEC zu lysieren, mussten diese aus den Zellkulturschalen abgeerntet werden. Hierzu wurde in einem ersten Schritt das Kulturmedium abgesaugt. Im Anschluss daran wurden die Zellen zweimal mit PBS gewaschen. Dadurch sollten vor allem tote Zellen und im Komplettmedium enthaltene Proteine, welche spätere Experimente beeinflussen könnten, entfernt werden. In einer geringen Menge PBS wurden die adhärennten Zellen mithilfe eines Zellschabers (Sarstedt, Nümbrecht) von der Zellkulturflasche gelöst und mittels Pipette in ein Zentrifugenröhrchen überführt. Diese Zellsuspension wurde bei 800xg und 4°C für 5 min zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das verbliebene Zellpellet wurde in 1ml PBS resuspendiert und in ein 1,5ml

Reaktionsgefäß überführt. Dieses wurde erneut bei 800xg und 4°C für 5 min zentrifugiert, der Überstand abgenommen und verbliebene Reste sehr sorgfältig mit der Pipette abgenommen. Das trockene Zellpellet wurde in Abhängigkeit des nachfolgenden Versuches in dem jeweiligen Lysepuffer lysiert. Für die Immundetektion von Proteinen mittels Westernblot wurden die Zellpellets in RIPA-Puffer, für die Verwendung in Luziferase-Reporter-Gen-Assays in RLB-Puffer, lysiert. Bei mit RIPA-Puffer zu lysierenden Zellen wurde das Zellpellet in einer der Pelletgröße entsprechenden Menge Lysepuffer resuspendiert und für 30 min auf Eis inkubiert. Bei mit RLB-Puffer zu lysierenden Zellen wurden diese ebenfalls in Lysepuffer resuspendiert und stattdessen direkt bei -80°C eingefroren, aufgetaut und für 10 min bei RT inkubiert. Das Zellhomogenat wurde jeweils für 10 min bei 16.000xg und 4°C zentrifugiert und der Überstand, das Zelllysate, in ein neues Reaktionsgefäß überführt. Die Proteinbestimmung erfolgte nach der Methode von Bradford (vgl. Kap. 2.2.4.1). Das Zelllysate wurde bis zur weiteren Nutzung bei -20°C gelagert.

2.2.1.5 Zellzahlbestimmung

Die Zelldichte (Zellen/ml) wurde durch Auszählen in einem definierten Volumen bestimmt. Hierzu wurden eine Neubauer-Zählkammer und ein Lichtmikroskop benutzt. Es wurde ein Deckglas leicht befeuchtet und auf die Neubauer-Zählkammer aufgesetzt. Zeigten sich nun die sogenannten Newton-Ringe, hatte das Deckglas die richtige Lage. Nun wurden 10µl der Zellsuspension an ein Ende des Deckglases der Neubauer-Zählkammer pipettiert und durch dort herrschende Kapillarkräfte in die Zählkammer gesogen. Die Auswertung erfolgte durch Auszählen der vier großen Eckquadrate. Nach Einsetzen des Ergebnisses n in die folgende Formel konnte die totale Zellzahl bestimmt werden.

$$Z (\text{Zellzahl}) = n/4 \cdot 10^4 \cdot x \text{ ml} \quad (x = \text{Volumen der Zellsuspension in ml})$$

2.2.1.6 Auftauen von Zellen

Eine 75cm² Zellkulturflasche wurde mit 25ml Komplettmedium, in Abhängigkeit vom jeweiligen Zelltyp, gefüllt. Die in einem Kryoröhrchen (Greiner Bio-One, Frickenhausen) eingefrorenen Zellen wurden aus dem flüssigen Stickstofftank entnommen und in der Hand schnell aufgetaut. Sobald die Zellen aufgetaut waren, wurden sie in die mit Medium gefüllte Kulturflasche überführt, resuspendiert und im CO₂-Inkubator inkubiert. Nach ca. 5 Stunden hatten sich die Zellen an den Boden der Kulturflasche geheftet und es konnte ein Mediumwechsel durchgeführt werden, um das im Einfriermedium befindliche DMSO zu entfernen und eine mögliche Zellschädigung zu verhindern.

2.2.1.7 Einfrieren von Zellen

Zum Einfrieren von Zellen wurden diese kultiviert bis eine 70-90%ige Konfluenz erreicht war. Bevor die Zellen vom Boden der Zellkulturflasche durch Zugabe von Trypsin abgelöst wurden, erfolgte ein Waschschrift mit PBS. Die Trypsinreaktion wurde durch Zugabe des jeweiligen Komplettmediums gestoppt und die Zellen durch Klopfen (HEK293) oder Schaben (HUVEC) komplett vom Flaschenboden gelöst. Nach Bestimmung der Zellzahl (vgl. Kap. 2.2.1.5) wurde die Zellsuspension in ein Zentrifugenröhrchen überführt. Es folgte eine Zentrifugation für 10 min bei 800xg und 4°C. Der Überstand wurde komplett abgenommen und das Zellpellet in Einfriermedium (10% (v/v) DMSO, 90% (v/v) FCS) zu einer Dichte von $1-2 \times 10^6$ Zellen/ml resuspendiert und in 1 ml-Aliquots in Kryoröhrchen eingefroren. Die Kryoröhrchen wurden in einen auf 4°C vorgekühlten Einfrierbehälter gestellt und in diesem über Nacht auf -80°C abgekühlt. Die kurzfristige Lagerung der gefrorenen Zellen erfolgte bei -80°C. Zur längerfristigen Lagerung wurden die Kryoröhrchen in einen mit flüssigem Stickstoff befüllten Tank überführt.

2.2.1.8 Liposomale Transiente Transfektion von HEK293-Zellen mittels Lipofectamine® Transfektionsreagenz

Lipofectamine® Transfection Reagent (Invitrogen, Karlsruhe), bestehend aus Plus™ Reagenz und Lipofectamine® Reagenz

Die HEK293-Zellen wurden in einer Anzahl von 500.000 Zellen pro Zellkulturschale mit einem Durchmesser von 60mm ausgebracht und über Nacht in DMEM-Glutamax Komplettmedium inkubiert. Am nächsten Tag fand die Transfektion der HEK293-Zellen mit 1,3µg Plasmid DNA pro Zellkulturschale statt. Dazu wurden 1,3µg DNA der zu transfizierenden Plasmide, 250µl serumfreies DMEM-Glutamax-Medium und 8µl Plus Reagenz zu einem Transfektionsansatz zusammen pipettiert, kurz gemischt und für 15 min bei Raumtemperatur inkubiert. Zusätzlich wurden 11µl Lipofectamine und 250µl serumfreies DMEM-Glutamax-Medium in einem zweiten Transfektionsansatz zusammen pipettiert und ebenfalls gemischt. Während der 15 minütigen Inkubationszeit wurde bei den zu transfizierenden Zellkulturschalen das Medium abgesaugt, die Zellen zweimal mit serumfreiem DMEM-Glutamax-Medium gewaschen und im Anschluss daran 2ml serumfreies DMEM-Glutamax-Medium pro Zellkulturschale zugegeben. Nach Ablauf der 15 minütigen Inkubation wurden beide Transfektionsansätze vereint und für weitere 15 min bei Raumtemperatur inkubiert. Nach Abschluss der Inkubation wurden 500µl des Lipofectamine-DNA Gemisches auf die Zellen gegeben und für 3 h im Brutschrank inkubiert. Hiernach wurden 3ml DMEM-Glutamax Komplettmedium pro Zellkulturschale hinzugegeben und die

Zellen über Nacht im CO₂-Inkubator inkubiert. Nach 24 h Inkubation wurde das Medium abgesaugt und es wurden zu jeder Zellkulturschale 3ml frisches Komplettmedium hinzugefügt. Die Zellen wurden für weitere 24 h im Inkubator gehalten, um im Anschluss geerntet zu werden (vgl. Kapitel 2.2.1.4) und Protein- oder RNA-Lysate aus ihnen anzufertigen.

2.2.1.9 Transiente Transfektion von HUVEC mittels Superfect® Transfektionsreagenz

Superfect® Transfection Reagent (Qiagen, Hilden)

Es wurden 300.000 Zellen pro 60mm Zellkulturschale ausgebracht und über Nacht in EBM Komplettmedium inkubiert. Am darauffolgenden Tag wurde jede Zellkulturschale mit jeweils 3µg des entsprechenden Plasmids transfiziert. Hierzu wurden 3µg DNA, 150µl serumfreies EBM-Medium und 25µl Superfect Transfektionsreagenz zu einem Ansatz zusammen pipettiert, gemischt und für 10min bei Raumtemperatur inkubiert. In der Zwischenzeit wurden die zu transfizierenden Zellen zweimal mit serumfreien EBM-Medium gewaschen. Nach Ablauf der 10 minütigen Inkubation wurde 1ml EBM Komplettmedium zum Transfektionsansatz gegeben und 1,1ml dieses Ansatzes auf die Medium freie Zellkulturschale gegeben. Die so transfizierten Zellkulturschalen wurden für 3 h im CO₂-Inkubator inkubiert, danach wurde der Transfektionsansatz komplett abgesaugt und es wurden 3ml EBM Komplettmedium zu den Zellen gegeben. Nach einer weiteren Inkubationszeit von 24 h im CO₂-Inkubator wurden die Zellen geerntet (vgl. Kapitel 2.2.1.4) und für weitere Versuche eingesetzt.

2.2.2 Bakterienkultur

2.2.2.1 Anzucht der Bakterien

Das LB-Flüssigmedium wurde bei einer Temperatur von 121°C und einem Druck von 200 kPa autoklaviert. Das hitzelabile Antibiotikum Ampicillin wurde vor Verwendung mit einem Membranfilter (Millipore, Eschborn) sterilfiltriert und dem autoklavierten Medium bei einer Temperatur unterhalb von 60 °C nachträglich zugesetzt.

LB-Medium

- 10 g/l Trypton
- 5 g/l Hefeextrakt
- 5 g/l NaCl

LB-Agar

- 10g/l Trypton
- 5 g/l Hefeextrakt
- 5 g/l NaCl
- 15 g/l Agar

Ampicillin-Stammlösung

- 50 mg/ml Ampicillin-Natriumsalz

→ in H₂O gelöst, sterilfiltriert und bei -20°C gelagert

Die Anzucht der *E. coli* vom Typ TG1 (vgl. Kap. 2.1.7) erfolgte, in Abhängigkeit von der Plasmid vermittelten Antibiotikaresistenz, unter Selektionsdruck bei 37°C. Die Anzucht erfolgte über Nacht im Brutschrank (LB-Agar Platten) oder im Schüttler bei 200 UpM (Flüssigkulturen).

2.2.2.2 Herstellung und Transformation kompetenter *E.coli*

TFB1-Puffer

- 100mM RbCl
- 10mM CaCl₂
- 50mM MnCl₂
- 15% (v/v) Glyzerin

TFB2-Puffer

- 10mM 3-(N-Morpholino)-Propansulfonsäure (MOPS); pH 6,5
- 75mM CaCl₂
- 10mM RbCl
- 15% (v/v) Glyzerin

→ beide Lösungen wurden sterilfiltriert und bei 4°C gelagert

Die natürliche Kompetenz, d.h. die Aufnahmebereitschaft für Fremd-DNA, ist für gewöhnlich bei Bakterien nur gering, jedoch kann diese z.B. durch die Behandlung mit Rubidiumchlorid erhöht werden.

Bei der hier durchgeführten Rubidiumchlorid-Methode (Hanahan, 1983) zur Erstellung transformationskompetenter *E.coli* Bakterien wurden 5ml LB-Medium in einem 12ml Kulturröhrchen mit einer Kolonie angeimpft und über Nacht bei 37°C und 200 UpM geschüttelt. Am nächsten Tag wurden 100ml LB-Flüssigmedium in einem 250ml Schikanenkolben mit 1ml der Über-Nacht-Kultur angeimpft und bei 37°C geschüttelt bis eine

optische Dichte bei 600nm Wellenlänge von 0,4-0,6 erreicht war. Daraufhin wurden die Zellen in ein Zentrifugenröhrchen überführt und für 5 min bei 4.000xg und 4°C zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen, das Pellet wurde in 30ml Puffer TFB1 resuspendiert und für 30 min auf Eis inkubiert. Im Anschluss wurden die Bakterien erneut bei 4.000xg, 4°C für 5 min zentrifugiert und der Überstand verworfen. Das Pellet wurde in 4ml eiskaltem TFB2-Puffer resuspendiert und die Zellsuspension zu je 100µl in Reaktionsgefäßen aliquotiert. Die aliquotierten Zellen wurden in flüssigem N₂ schockgefroren und bei -80°C gelagert.

Bei der Transformation wird freie, lösliche DNA in kompetente Bakterien eingebracht (Hanahan, 1983). Hierzu wurden die zu transformierenden Bakterien auf Eis aufgetaut und 70µl kompetente Bakterien mit 1µl Plasmid bzw. 10µl Ligationsreaktion (vgl. Kap. 2.2.3.5) in einem 1,5ml Reaktionsgefäß vermischt. Nach einer 30 minütigen Inkubation auf Eis wurde der gesamte Ansatz in einem auf 42°C temperierten Heizblock für 90 Sekunden einem Hitzeschock ausgesetzt. Darauf folgte eine Inkubation auf Eis für 2 min und eine anschließende Zugabe von 500µl LB-Medium. Dieser Ansatz wurde für 30 min bei 37°C schüttelnd 200 UpM inkubiert und danach bei 1.500xg für 5 min zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen, das Bakterienpellet in einem kleinen Volumen LB-Medium resuspendiert. Es wurden jeweils zwei verschiedene Verdünnungen der transformierten und resuspendierten Bakterien ausgestrichen. In 50µl LB-Medium wurden jeweils 1µl oder 10µl der Bakteriensuspension verdünnt, auf LB-Agarplatten (vgl. Kap. 2.2.2.1) mit Ampicillin (Endkonzentration: 50µg/ml) ausgestrichen und über Nacht bei 37°C inkubiert

2.2.3 Nukleinsäure-Techniken

2.2.3.1 Agarose-Gelelektrophorese

50x TAE-Puffer

2 M Tris-Base

50 mM EDTA

Mit Eisessig auf pH 8,3 einstellen

6x Probenpuffer

10 mM Tris-HCl, pH 7,5

1 mM EDTA

30% (v/v) Glycerin

0,25% (w/v) Bromphenolblau

Die Agarose-Gelelektrophorese ist eine Methode zur Auftrennung von Nukleinsäuren nach ihrer Größe und Konformation. Durch ihr negativ geladenes Phosphat-Rückgrat wandern die Nukleinsäuren bei angelegter Spannung zur Anode. Das Agarose-Gel wirkt dabei wie ein Sieb aus Agarose-Polymeren, wobei die Agarose-Konzentration die Porengröße dieses Siebes bestimmt, je höher die Agarose konzentriert ist je kleiner sind die Poren. Durch diese Agarose-Gel-Matrix bewegen sich kleine Nukleinsäuremoleküle schneller als Große. In dieser Arbeit fand die Agarose-Gelelektrophorese Anwendung bei der Qualitätsbestimmung nach RNA-Isolierung (vgl. Kap. 2.2.3.9), der Analyse oder präparativen Isolierung von DNA-Fragmenten nach Restriktionsverdauungen (vgl. Kap. 2.2.3.6) und der Konzentrationsbestimmung von gering konzentrierten DNA-Fragmenten vor einer Ligation (vgl. Kap. 2.2.3.5).

Zur Herstellung der Gele wurde Agarose (UltraPure™ Agarose, Invitrogen, Karlsruhe) gemäß der gewünschten Prozentigkeit (0,8% (w/v) - 2,0% (w/v)) abgewogen, zusammen mit 1x TAE-Puffer in einen Erlenmeyerkolben gegeben und im Mikrowellenherd aufgeköcht bis die Agarose komplett gelöst war. Im Anschluss wurde die Agarose auf ca. 60°C abgekühlt, Ethidiumbromid zu einer Endkonzentration von 0,2 – 0,4 µg/µl hinzugegeben, in eine horizontale Gel-Apparatur „PerfectBlue™ Mini Gel-System“ (Peqlab, Erlangen) gegossen und ein Gel-Kamm mit der benötigten Taschenzahl eingesetzt.

Die zu analysierenden Nukleinsäuren wurden zu 1/5 Volumen mit 6x Probenpuffer versetzt und in die Taschen des Gels pipettiert. Die Elektrophorese fand in 1x TAE-Puffer statt bei einer Feldstärke von 4 – 7 V/cm. Zur Abschätzung der Größe der aufgetrennten DNA-Fragmente wurden jedem Gel 5µl Größenstandard (0,1µg/µl) zugefügt. Die Detektion der DNA-Banden nach Abschluss des Gellaufs erfolgte an einem Fluorchem 8900 Gel-Dokumentationssystem (Cell Biosciences, Santa Clara, USA), bei durchscheinendem UV-Licht.

2.2.3.2 Fällung von DNA mit Ethanol

TE-Puffer

10 mM	Tris-HCl, pH 7,5
1 mM	EDTA

Die Präzipitation von DNA mittels Ethanolfällung ist eine Methode zur Reinigung von DNA und bietet zudem eine Möglichkeit Lösungen mit geringer DNA Konzentration höher zu konzentrieren.

Die Fällung der Nukleinsäuren erfolgte durch die Zugabe von 1/9 des Ausgangsvolumens einer 3 M Natrium-Acetat-Lösung (pH 5,2) und 2,5 Volumen Ethanol. Im Anschluss wurde für

1 h bei -80°C die DNA gefällt und danach für 30 min bei $17.000\times g$, 4°C pelletiert. Die präzipitierte DNA wurde je einmal mit 70% p.a. und 96% p.a. EtOH gewaschen, getrocknet bis keine Ethanol Reste mehr vorhanden waren und in TE-Puffer resuspendiert.

2.2.3.3 Plasmid-Mini- und Plasmid-Maxi-präparation

Für die Präparation von Plasmiden wurde mit einer Pipettenspitze eine Einzelkolonie, von vorher mit dem benötigten Plasmid transformierten (vgl. Kap. Trafo) Bakterien, gepickt und in LB-Medium mit Ampicillin (Endkonzentration: $50\mu\text{g/ml}$) überführt. Für die Plasmid-Mini-Präparation wurden jeweils 2ml LB-Medium in einem sterilen 12ml Kulturröhrchen mit einer Einzelkolonie angeimpft und bei 37°C und 200 UpM inkubiert. Für die Plasmid-Maxi-Präparation wurde eine Bakterienkultur mit 2ml LB-Medium als Vorkultur verwendet, mit dieser wurden 150-250ml LB-Medium in einem 500ml Schikanenkolben angeimpft und bei 37°C und 200 UpM inkubiert.

Die Isolierung von Plasmid-DNA in kleinem Maßstab (2ml Bakterienkultur) als auch im Großen (150-250ml Bakterienkultur) fand nach dem Prinzip der alkalischen Lyse mit Hilfe von Plasmidextraktionskits der Fa. Qiagen (Hilden) statt. Für die 2ml Kulturen wurde das Qiaprep[®] Spin Miniprep Kit (Qiagen, Hilden) verwendet, für große Kulturen von 150-250ml wurde das Hispeed[®] Plasmid Maxi Kit (Qiagen, Hilden) verwendet. Es wurde nach den Vorschriften des Herstellers vorgegangen. Die präparierte Plasmid-DNA wurde bei -20°C gelagert.

2.2.3.4 Assoziation einzelsträngiger Oligonukleotide

Für die Assoziation einzelsträngiger komplementärer Oligonukleotide wurden die in TE-Puffer gelösten Einzelstränge in gleichen molaren Mengen und einer Konzentration von $1\text{pmol}/\mu\text{l}$ in einem Reaktionsgefäß gemischt. Dieses wurde mit einem Schaumstoff-Schwimmer in ein Gefäß mit 95°C heißen Wasser gegeben, welches langsam auf Raumtemperatur abkühlte. So war eine optimale Hybridisierung der beiden Einzelstränge gewährleistet. Die so generierten Oligonukleotid Doppelstränge wurden dann bei -20°C gelagert.

2.2.3.5 Ligation von DNA

T4-DNA-Ligase ($6\text{ U}/\mu\text{l}$) (New England Biolabs, Frankfurt)

T4-DNA-Ligase Reaktionspuffer (10x) (New England Biolabs, Frankfurt)

Vor der Verknüpfung von DNA-Fragmenten mit kompatiblen Enden wurden Teile davon auf einem Agarose-Gel aufgetragen, um die ungefähren Konzentrationen anhand der bekannten Mengen der einzelnen DNA-Fragmente des Größenstandards zu bestimmen. Daraufhin wurden Vektor-DNA und Insert-DNA in einem molaren Verhältnis von ca. 1:3, in 1x Reaktionspuffer und 3 Einheiten T4-DNA-Ligase zusammen pipettiert. Das Reaktionsvolumen betrug jeweils 20µl und der Ligationsansatz wurde für 1 h bei Raumtemperatur inkubiert. Im Anschluss daran wurden 10µl direkt in einer Transformation eingesetzt.

2.2.3.6 Verdau von DNA mit Restriktionsendonukleasen

Der Verdau von DNA mit sequenzspezifischen Restriktionsendonukleasen diente zur Gewinnung von Vektor- und Insert-DNA für Ligationen oder zur Überprüfung von DNA-Molekülen. In den Reaktionen wurden je nach Restriktionsenzym Mengen zwischen 2 und 10 Units pro µg DNA eingesetzt. Es wurden je nach Experiment unterschiedliche Mengen DNA verdaut, zur Präparation von DNA-Fragmenten für Ligationen wurden 5µg DNA verdaut, bei der Überprüfung von DNA-Molekülen hingegen nur 1µg DNA. Die Inkubationstemperaturen und Pufferbedingungen richteten sich nach den Herstellerangaben. Die Inkubationsdauer war abhängig von DNA- und Enzymmengen.

2.2.3.7 Extraktion von DNA-Fragmenten aus Agarose-Gelen

Zur Isolierung und Reinigung von DNA-Fragmenten nach elektrophoretischer Trennung im Agarose-Gel wurde der QIAquick® Gel Extraction Kit (Qiagen, Hilden) nach Herstellerangaben benutzt.

2.2.3.8 Reinigung von DNA-Fragmenten

Um DNA-Fragmente aus Polymerase-Kettenreaktionen oder Restriktions-Verdauungen von Verunreinigungen (z.B. Salze oder Enzyme) zu befreien wurde das QIAquick PCR Purification Kit (Qiagen, Hilden) verwendet. Bei der Reinigung wurde nach den Herstellerangaben verfahren.

2.2.3.9 Isolierung von RNA

TRIzol® (Invitrogen, Karlsruhe)

Ultrapure™ DNase/RNase freies destilliertes Wasser (Invitrogen, Karlsruhe)

RNeasy® Mini Kit (Qiagen, Hilden)

Bei der Isolierung von RNA wurden alle Schritte unter einem Abzug durchgeführt und es wurden ausschließlich gestopfte Spitzen und Reaktionsgefäße verwendet, die zuvor noch verpackt und damit RNase frei waren.

Die Isolierung der RNA aus Zellpellets (vgl. Kap. 2.2.1.4) wurde mit dem Reagenz TRIzol® der Fa. Invitrogen (Karlsruhe) nach einem modifizierten Protokoll von Chomczynski und Sacchi durchgeführt (Chomczynski und Sacchi, 1987). Hierbei wurden die Zellpellets in 1ml TRIzol resuspendiert und 5 min bei Raumtemperatur inkubiert. Im Anschluss wurden 200µl mit H₂O überschichtetes Chloroform zugegeben und für 15 Sekunden auf einem Vortex-Mixer gemischt. Es folgte eine 3 minütige Inkubation bei Raumtemperatur, gefolgt von einer Zentrifugation bei 12.000xg, 4°C für 15 min. Die dabei entstandene obere Phase wurde sorgfältig mit einer Pipette in ein neues Reaktionsgefäß überführt. Es wurden 500µl Isopropanol (99% p.a.) zugefügt, weitere 10 min bei Raumtemperatur inkubiert und erneut bei 12.000xg, 4°C für 10 min zentrifugiert. Das dabei entstandene RNA-Pellet wurde einmal mit 1ml 75% p.a. EtOH gewaschen, auf dem Vortexer gemischt und für 5 min bei 7.500xg 4°C zentrifugiert. Danach wurde der Überstand abgenommen, das Pellet im Reaktionsgefäß mit geöffnetem Deckel in einem Heizblock bei 37°C getrocknet und daraufhin in 30µl DNase/RNase freiem Wasser inkubiert. Die RNA wurde anschließend für 10 min in einem Heizblock bei 55°C inkubiert, um sie vollständig zu lösen. Darauffolgend wurde photometrisch die Konzentration bestimmt (vgl. Kap. 2.2.3.10) und die Integrität der RNA auf einem Agarose-Gel überprüft. Dafür wird ein Agarose-Gel, mit nur für diesen Zweck verwendeter Agarose, in eine komplett mit EtOH gereinigte Elektrophorese-Kammer gegossen und 1µg RNA aufgetrennt (vgl. Kap. 2.2.3.1). Die isolierte RNA wird bei -80°C gelagert.

Wurde die RNA nachfolgend zur Durchführung einer Microarray-Analyse benutzt, wurde diese vorher mit Hilfe des RNeasy® Mini Kit der Fa. Qiagen (Hilden) nach Angaben des Herstellers gereinigt.

2.2.3.10 Quantifizierung und Reinheitsbestimmung von Nukleinsäuren

UltraPure™ DNase/RNase-freies destilliertes Wasser (Invitrogen, Karlsruhe)

Die Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren erfolgte photometrisch bei einer Wellenlänge von $\lambda = 260 \text{ nm}$ (OD_{260}) in UV-Einmal-Küvetten (Brand GmbH, Wertheim) in einem SmartSpec™ Plus Spectrophotometer (BioRad, München). Es wurde die zu bestimmende Nukleinsäure in DNase/RNase freiem Wasser verdünnt, als Referenz diente DNase/RNase freies Wasser. Beruhend auf dem Lambert-Beerschen-Gesetz entsprach eine OD_{260} von 1 einer DNA Konzentration von 50µg/ml bzw. einer RNA Konzentration von 40µg/ml. Die Beurteilung der Reinheit der Nukleinsäuren erfolgte durch eine zweite

Extinktionsmessung bei einer Wellenlänge von $\lambda = 280 \text{ nm}$ (OD_{280}). Das Verhältnis OD_{260}/OD_{280} liegt für reine DNA bei 1,8 für RNA bei 2,0. Kleinere Werte weisen auf Kontamination mit Proteinen (aromatische Gruppen) und/oder im TRIzol[®] vorkommendes Phenol hin.

2.2.3.11 Reverse Transkription (cDNA Synthese)

Um die isolierte RNA mittels Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR) analysieren zu können, musste die einzelsträngige RNA in doppelsträngige DNA umgeschrieben werden. Dies erfolgte mit Hilfe der Reversen Transkription (RT, cDNA Synthese), bei der die einzelsträngige RNA als Matrize dient und eine Reverse Transkriptase, eine RNA abhängige DNA-Polymerase, anhand dieser die komplementäre DNA (cDNA) synthetisiert.

Um auch letzte Spuren genomischer DNA zu entfernen, wurde mit der RNA ein DNase-Verdau durchgeführt. Hierzu wurden 5 μg RNA pro Probe mit einer RQ1 RNase freien DNase (Promega, Mannheim) verdaut. Der Reaktionsansatz ist in Tabelle 2.3 dargestellt.

Tabelle 2.3: DNase-Reaktionsansatz

Ansatz pro Probe	
5 μg RNA	x μl
RQ1 DNase 10x Puffer	2 μl
RQ1 DNase 1U/ μl	5 μl
RNase freies Wasser	ad 20 μl

Die Proben wurden zunächst 30 min bei 37°C im Heizblock inkubiert, anschließend wurden zur Inaktivierung der DNase jeweils 5 μl RQ1 DNase Stop Solution zupipettiert und für 10 min bei 65°C inkubiert. Von der so mit DNase verdauten RNA wurden direkt 2 μg (10 μl) in eine cDNA Synthese mit einer modifizierten Reversen Transkriptase eingesetzt. Die cDNA Synthese wurde in 200 μl Reaktionsgefäßen in einem zyklisch programmierbaren Thermoblock (GS482, G-Storm, Somerton, United Kingdom) durchgeführt. Der Reaktionsansatz ist in Tabelle 2.4 dargestellt.

Tabelle 2.4: RT-Reaktionsansatz I

Ansatz pro Probe	
2 μg RNA	10 μl
Hexamere (50 μM)	1 μl
dNTP-Mix (10mM)	1 μl

Der Reaktionsansatz I (siehe Tabelle 2.4) wurde für 5 min auf 65°C erhitzt und anschließend auf Eis gestellt. Es wurde der Reaktionsansatz II (siehe Tabelle 2.5) hinzupipettiert und für 2 min bei 37°C im Heizblock inkubiert.

Tabelle 2.5: RT-Reaktionsansatz II

Ansatz pro Probe	
Erststrang 5x Puffer	4µl
DTT (0,1M)	2µl
RNaseOUT (40 u/µl)	1µl

Im Anschluss wurde zu jeder Probe 1µl der modifizierten Reversen Transkriptase (SuperScript III, Invitrogen, Ort, 200U/µl) zugegeben, 10 min bei 25°C, 50 min bei 37°C und abschließend 15 min bei 70°C inkubiert. Danach wurde der Thermoblock auf 4°C gekühlt, die Proben entnommen und bis zur weiteren Verwendung bei -20°C eingefroren.

2.2.3.12 Amplifikation von DNA-Sequenzen mit Hilfe der der PCR (Polymerase-Ketten-Reaktion)

Zur Amplifikation von DNA-Sequenzen wurde die Standard-Polymerase-Ketten-Reaktion verwendet (Mullis, et al., 1986).

Die Reaktionsansätze mit einem Volumen von 30µl wurden wie folgt zusammen pipettiert:

Tabelle 2.6: PCR Reaktionsansatz

Komponenten	eingesetzte Volumina in µl	Endkonzentration
Forward Primer (10µM)	1	5nM
Reverse Primer (10µM)	1	5nM
dNTP-Mix (10mM)	1	0,2mM
PCR-Puffer 10x konzentriert	5	1x
Template	x	1-2ng/µl
Thermostabile-DNA-Polymerase (5U/µl)	0,5	0,05 U/µl
DNA freies ddH ₂ O	ad 50µl	

Die PCR erfolgte in einem Thermocycler (GS482, G-Storm, Somerton, United Kingdom), die DNA-Sequenzen wurden nach folgendem PCR-Profil amplifiziert:

Tabelle 2.7: PCR-Profil für eine Standard-Reaktion

Schritt	Zeit (sec)	Temperatur (°C)	Zyklen
Initiale Denaturierung	300	94°C	
Denaturierung	30	94°C	25-45
Oligonukleotid-Annealing	30	56-65°C	25-45
Elongation	60sec /kb	72°C	25-45
Finale Elongation	300	72°C	
Kühlung	∞	4°C	

Die Temperatur während des *Annealing* Schrittes richtete sich nach den benutzten Primern und die Dauer des *Elongation* Schrittes nach der Länge der zu amplifizierenden DNA-Sequenz, wobei ca. 1000 bp pro Minute amplifiziert wurden. Nach Abschluss der PCR-Reaktion wurden die Proben bei -20°C gelagert.

2.2.3.13 Overlap-extension PCR

Die Overlap-extension PCR (OEP) (Ho, et al., 1989) wurde zur spezifischen Mutagenese von GRHL3-Plasmiden (vgl. Kap. 3.8.2) oder zur Fusion von Tags (vgl. Kap. 3.8.1) verwendet. Bei dieser Methode wurden zwei DNA-Sequenzen ohne die Verwendung von Restriktionsschnittstellen miteinander fusioniert. Hierfür wurden zwei separate, sich um 8-10 bp überlappende, DNA-Fragmente amplifiziert. Diese wurden gelelektrophoretisch getrennt (vgl. Kap. 2.2.3.1), aus dem Gel isoliert (vgl. Kap. 2.2.3.7) und in äquimolaren Verhältnissen als Templates in einer dritten PCR, der eigentlichen OEP, eingesetzt. In dieser OEP wurden Vektor-spezifische Oligonukleotide als Primer benutzt um ein Vollängen-Fragment zu amplifizieren, welches den zu deletierenden Bereich nicht mehr enthält (Abb. 2.2), bzw. das zu insertierende Fragment enthält (Abb. 2.1). Dieses Fragment musste nur noch gelelektrophoretisch getrennt, aus dem Gel isoliert und mit passenden Restriktionsenzymen geschnitten werden (vgl. Kap. 2.2.3.6), um anschließend in den Zielvektor ligiert zu werden (vgl. Kap. 2.2.3.5).

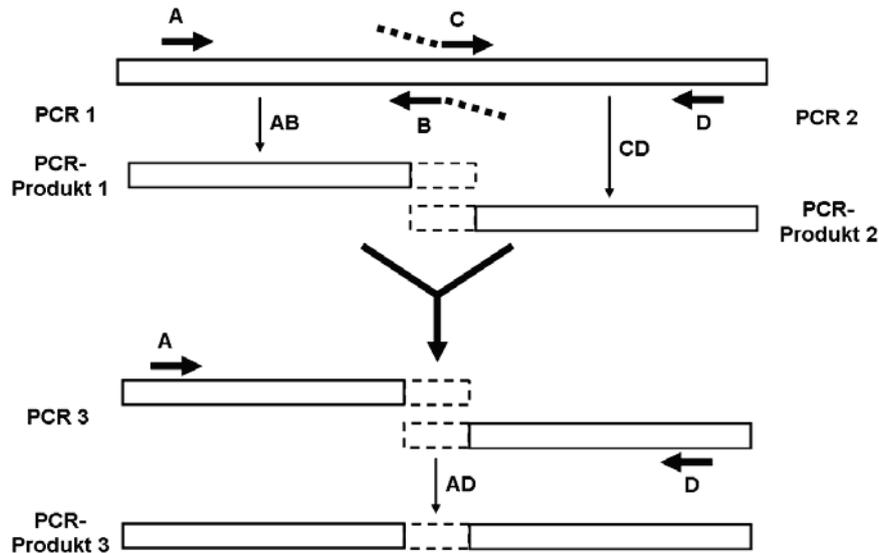


Abb. 2.1: Insertion von DNA-Fragmenten mit Hilfe der Overlap-extension PCR (OEP). Die Oligonukleotide B und C wurden benutzt um ein DNA-Fragment in eine DNA-Sequenz einzufügen. Die Oligonukleotide binden 5'- und 3'- des zu insertierenden Bereichs und besitzen überhängende und überlappende Bereiche (gestrichelter Teil des Pfeils), welche für die zu insertierende Sequenz kodieren. Im ersten Schritt wurden in zwei einzelnen PCRs (1 und 2), die Oligonukleotide B und C zusammen mit Vektor-spezifischen Oligonukleotiden (A und D) benutzt. In einer dritten Reaktion (PCR 3) dienen die Produkte aus den vorherigen PCRs als templates, diese überlappen in einem kurzen Bereich wodurch eine Anlagerung beider templates möglich wurde. Mit den Vektor-spezifischen Oligonukleotiden (A und D) wurde daraufhin ein Volllängen-Fragment amplifiziert welches den zu insertierenden Bereich (gestrichelter Bereich) enthielt.

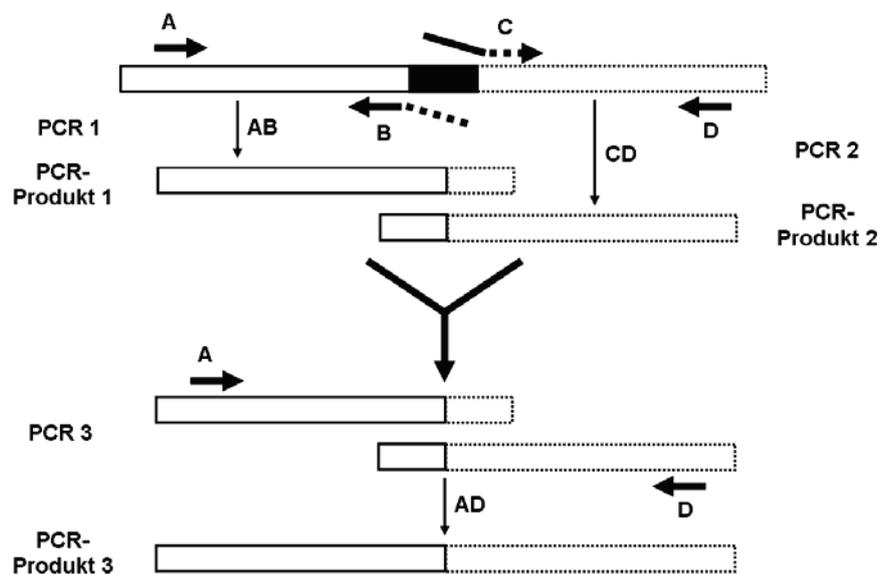


Abb. 2.2: Deletion von DNA-Fragmenten mit Hilfe der Overlap-extension PCR (OEP). Die Oligonukleotide B und C wurden benutzt um DNA-Fragmente 5'- und 3'- des zu deletierenden Bereichs (schwarzer Bereich) zu amplifizieren. Dazu wurden sie in zwei einzelnen PCRs (1 und 2) zusammen mit Vektor-spezifischen Oligonukleotiden (A und D) benutzt. In einer dritten Reaktion (PCR 3) dienen die Produkte aus den vorherigen PCRs als templates, diese überlappen in einem kurzen Bereich wodurch eine Anlagerung beider templates möglich wurde. Mit den Vektor-spezifischen Oligonukleotiden (A und D) wurde daraufhin ein Volllängen-Fragment amplifiziert welches den zu deletierenden Bereich nicht mehr enthielt.

2.2.3.14 Herstellung rekombinanter Plasmide

Zur Erzeugung neuer rekombinanter Plasmide wurden die Ziel-Vektoren als auch die zu insertierenden DNA-Fragmente mit Restriktionsendonukleasen geschnitten (vgl. Kap. 2.2.3.6). Die zu insertierenden DNA Abschnitte wurden entweder direkt aus Vektoren herausgeschnitten oder zuerst mittels Overlap-extension PCR (vgl. Kap. 2.2.3.13) amplifiziert und anschließend geschnitten. Die Vektor- und Insert-DNA-Fragmente wurden danach elektrophoretisch getrennt (vgl. Kap. 2.2.3.1), aus dem Gel isoliert (vgl. Kap. 2.2.3.7) und in einer Ligation eingesetzt (vgl. Kap. 2.2.3.5). Es wurden 50% des Ligationsansatzes zur Transformation in TG1 Bakterien (vgl. Kap. 2.2.2.2) benutzt. Die auf LB-Agar Platten mit Antibiotika Resistenz gewachsenen Bakterien wurden in LB-Flüssigmedium kultiviert und die Plasmide wurden anschließend in einer Plasmid-Mini-Präparation (vgl. Kap. 2.2.3.3) isoliert. Diese wurden mittels Restriktionsanalyse überprüft und gegebenenfalls von der Fa. Starseq (Mainz) sequenziert.

2.2.3.15 DNA-Sequenzierung

Die Sequenzierung von DNA erfolgte bei der Fa. Starseq (Mainz). Hierfür wurden, gemäß dem U-Mix Protokoll, 400-700 ng DNA und 10pmol des jeweiligen Primers mit DNase/RNase freiem Wasser in einem Gesamtvolumen von 7µl verdünnt und zur Sequenzierung versendet. Nach Abschluss der Sequenzierung wurden die erhaltenen .txt Dateien mit der Sequenz und das in einer .ab1 Datei enthaltene Chromatogramm ausgewertet.

2.2.4 Proteinanalytik

2.2.4.1 Proteinbestimmung nach Bradford

Die Bestimmung der Proteinkonzentration erfolgte nach Bradford (Bradford, 1976) unter Verwendung des „Bio-Rad Protein Assays“ (BioRad, München) oder von „Roti[®]-Quant“ (Roth, Karlsruhe). Hierzu wurden 1µl Proteinlösung und 799µl dH₂O in einer Einmal-Halbmikroküvette (Sarstedt, Nümbrecht) zusammen pipettiert und 200µl des Coomassie-Farbstoffes hinzugegeben. Anschließend wurde das Ganze gut gemischt und für 5 min bei RT inkubiert. Daraufhin wurde die Absorption bei 595nm in einem SmartSpecTM Plus Spectrophotometer (BioRad, München) gemessen und die Proteinkonzentration anhand einer BSA-Eichgerade bestimmt.

2.2.4.2 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)

6x SDS-Ladepuffer

- 350mM Tris-HCl, pH 6,8
- 10% (w/v) SDS
- 30% (v/v) Glyzerin
- 5% (v/v) β -Mercaptoethanol
- 0,05% (w/v) Bromphenolblau

Acrylamid-Mix

- 30% (w/v) Acrylamid
- 0,8% (w/v) N,N'-Methylenbisacrylamid

Elektrophorese-Laufpuffer

- 25mM Tris
- 192mM Glycin
- 1% (w/v) SDS

Bei der SDS-PAGE handelt es sich um eine diskontinuierliche gelelektrophoretische Auftrennung von Proteinen nach ihrem Molekulargewicht (Laemmli, 1970). Aufgetrennt werden die Proteine über ein engporiges Trenngel, welches je nach Vernetzungsgrad als ein Molekularsieb fungiert. Dieses ist überschichtet von einem weitporigen Sammelgel, das der Konzentration der Proteinproben dient.

Die in RIPA-Puffer lysierten Proteinproben (vgl. Kap. 2.2.1.4) wurden mit RIPA-Puffer auf ein einheitliches Endvolumen aufgefüllt und 6x SDS-Ladepuffer zugegeben. Anschließend wurden die Proben für 5 min bei 95°C in einem Heizblock (Eppendorf, Hamburg) denaturiert. Das im Ladepuffer befindliche SDS (Natriumdodecylsulfat) ist ein anionisches Detergenz und bildet einen Komplex mit den hydrophoben Bereichen von Proteinen und maskiert diese dadurch mit einer negativen Ladung. Zusätzlich enthält der Puffer β -Mercaptoethanol zur Reduktion der Disulfidbrücken in Proteinen. Die negativ geladenen und denaturierten Proteine wandern in einem elektrischen Feld nun entsprechend ihrem Molekulargewicht durch die Polyacrylamid-Matrix.

Für das SDS-Polyacrylamidgel wurde zwischen zwei mit EtOH gereinigte und mit Spacern getrennte Glasplatten zuerst das Trenngel mit einer Konzentration zwischen 10% (w/v) und 12% (w/v), in Abhängigkeit von der Größe der zu detektierenden Proteine, gegossen. Nachdem dieses polymerisiert war, wurde darüber das Sammelgel mit einer Acrylamidkonzentration von 5% (w/v) gegossen und zur Erstellung von Taschen im Gel ein Kamm eingesetzt.

Der Proteinstandard *Precision Plus Protein™ Kaleidoscope™ Standard* (BioRad, München) und die vorbereiteten Proben wurden in die Taschen pipettiert. Im Sammelgel erfolgte die Konzentrierung der Proben bei 80V für ca. 15 min, im Trenngel wurden die Proben bei 100-120V für ca. 60 min aufgetrennt. Dazu wurde eine vertikale Elektrophoresekammer (Mini-PROTEAN® Tetra Cell, BioRad, München) mit Elektrophorese-Laufpuffer verwendet.

Tabelle 2.8: Pipettierschema für 10 ml Trenngel und 3 ml Sammelgel

Komponente	Sammelgel (4%)	Trenngel (10%)	Trenngel (12%)
30 % (w/v) Acrylamid-Mix	500 µl	3,3 ml	4 ml
1,5 M Tris-HCl (pH 8,8)	-	2,5 ml	2,5 ml
1,0 M Tris-HCl (pH 6,8)	380 µl	-	-
10 % (w/v) SDS	30 µl	100 µl	100 µl
10 % (w/v) APS	30 µl	100 µl	100 µl
TEMED	3 µl	4 µl	4 µl
H ₂ O	2,1 ml	4 ml	3,3 ml

2.2.4.3 Proteintransfer auf eine PVDF Membran (Westernblot)

Transferpuffer für kleine Proteine

- 24mM Tris-Base
- 193mM Glycin
- 200ml Methanol

Transferpuffer für große Proteine

- 48mM Tris-Base
- 386mM Glyzin
- 0,05% (w/v) SDS
- 200ml Methanol

Nach Abschluss der SDS-PAGE wurden die aufgetrennten Proteine in einem elektrischen Feld vom SDS-Polyacrylamidgel auf eine „Hybond-P“ PVDF (GE Healthcare, Freiburg) Membran transferiert und darauf immobilisiert. Der Transfer fand in einer Mini-PROTEAN® Tetra Cell Apparatur der Fa. BioRad statt. Abhängig von der Größe der zu transferierenden Proteine wurden zwei verschiedene Transferpuffer benutzt: 1. für Proteine größer als 75 kDa wurde der „Transferpuffer für große Proteine“ benutzt und 2. für Proteine mit einer Größe kleiner als 75 kDa der „Transferpuffer für kleine Proteine“. Vor dem Transfer wurde die PVDF Membran für 15 Sekunden in Methanol aktiviert und anschließend zusammen mit den

Whatman-Filterpapieren, Schwämmen und dem SDS-Polyacrylamidgel in Transferpuffer äquilibriert. Im Anschluss wurde der Blot nach dem in Abbildung 2.3 gezeigten Schema in Transferpuffer aufgebaut. Dabei wurde darauf geachtet, dass sich keine Luftblasen im „Blot-Sandwich“ befanden. Der Transfer fand bei 80V für 1h (Transferpuffer für kleine Proteine) bzw. 2h (Transferpuffer für große Proteine) statt. Die Apparaturen enthielten dabei einen Kühlakku. Aufgrund der größeren Wärmeentwicklung bei dem Transfer der „großen Proteine“ wurde dieser zusätzlich mit Eiswasser von außen gekühlt.

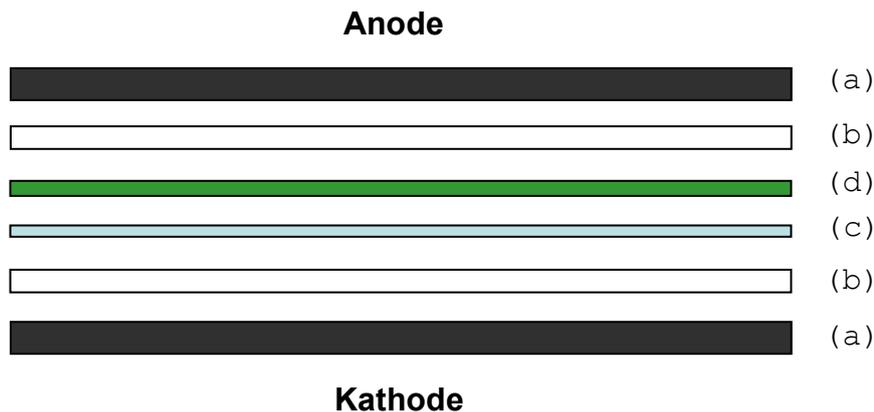


Abb. 2.3: Schematischer Aufbau eines Westernblot: (a) Schwämme, (b) Whatman-Filterpapier, (c) SDS-Polyacrylamidgel, (d) PVDF Membran

2.2.4.4 Immundetektion immobilisierter Proteine

TBS-T

- 50mM Tris-Base
- 150mM NaCl
- 0,1 % (v/v) Tween 20

Nach Abschluss des Proteintransfers (vgl. Kap. 2.2.4.3) wurde die Membran für 1h in TBS-T mit 5% (w/v) Magermilchpulver (Carl Roth, Karlsruhe) auf einem Orbitalschüttler „HS 260 basic“ (IKA, Staufen) inkubiert, um unspezifische Bindungsstellen abzusättigen. Die nachfolgende Inkubation mit dem Primärantikörper fand über Nacht bei 4°C statt. Hierzu wurde der Boden einer quadratischen Petrischale mit Parafilm® M (Brand GmbH, Wertheim) bedeckt, auf den Parafilm wurden für eine 8,5 x 7,5 cm große PVDF Membran ca. 3ml des entsprechend verdünnten Primärantikörpers gegeben und darauf die PVDF Membran mit der Proteinseite (die im „Blot-Sandwich“ dem SDS-Gel zugewandte Seite) nach unten gelegt. Nach Abschluss der Inkubation mit dem Primärantikörper wurde die Membran dreimal für jeweils 10 min in TBS-T gewaschen und anschließend in einer Schale mit dem jeweiligen Sekundärantikörper inkubiert. Die Inkubation mit dem Zweitantikörper erfolgte für 1-1,5 h bei

RT auf einem Orbitalschüttler. Abschließend wurde die Membran viermal für jeweils 10 min in TBS-T gewaschen.

Die Detektion der auf der Membran gebundenen Proteine erfolgte über den gebundenen Zweitantikörper, in diesem Fall ein Antikörper-Enzym-Konjugat. Die an den Zweitantikörper gekoppelte Meerrettichperoxidase ließ sich mit Hilfe eines Chemilumineszenzreagenz nachweisen. Dem Antikörper und der Konzentration des zu detektierenden Proteins entsprechend wurde entweder das weniger sensitive ECL oder das sensitivere ECL PlusTM, jeweils von der Fa. GE Healthcare (Freiburg) nach den Angaben des Herstellers verwendet. Im Anschluss an die Inkubation mit dem Chemilumineszenzreagenz wurde die Membran zwischen Filterpapieren getrocknet, in Klarsichtfolie eingeschlagen und in eine lichtdichte Filmkassette geklebt. In einer Dunkelkammer wurde anschließend die Chemilumineszenz durch Exposition der Membran auf sensitiven Röntgenfilmen (HyperFilmTM ECL, GE Healthcare, Freiburg) detektiert.

2.2.4.5 Entfernung eines Antikörpers von einer PVDF Membran

Die Verwendung von PVDF-Membran und der Antigen-Nachweis mittels des ECL-Systems ermöglichten durch sogenanntes „Stripping“ die Primärantikörper zu entfernen und die Membran mit einem anderen primären Antikörper erneut zu inkubieren. Dazu wurde die Membran für 20 min in TBS-T gewaschen und anschließend für 10 min in „Restore PLUS Westernblot Stripping Buffer“ (Pierce, Rockford, USA) inkubiert. Im Anschluss wurde der Puffer entfernt und die Membran dreimal für jeweils 10 min mit TBS-T gewaschen. Daraufhin konnte die Membran erneut blockiert und mit Primärantikörpern inkubiert werden.

2.2.4.6 Immunfluoreszenzmikroskopie

4% (w/v) Paraformaldehyd (PFA) in PBS

Permeabilisierungs-Lösung

- 3% (w/v) BSA
- 0,3% (v/v) Triton X-100

→ gelöst in PBS

Phalloidin-Lösung

- 2,5% (v/v) Alexa Fluor[®] 568 Phalloidin (Invitrogen, Karlsruhe)
- 1% (w/v) BSA

→ gelöst in PBS

Mounting-Reagenz

- Prolong[®] Gold Antifade Reagent (Invitrogen, Karlsruhe)

DAPI-Lösung

- 0,01% (w/v) 4',6-Diamidin-2-phenylindol in PBS

Vor dem Versuch wurden Deckgläschen angeätzt, um eine verbesserte Oberfläche zur Adhäsion von Zellen zu schaffen. Hierfür wurden die Deckgläschen für 2 h in 7%iger Essigsäure inkubiert und anschließend fünfmal für 10 min mit dH₂O gewaschen. Danach wurden sie über Nacht unter dem Abzug getrocknet, in Alufolie-Päckchen zu je 12 Deckgläschen aliquotiert und autoklaviert.

HEK293-Zellen als auch HUVEC wurden in 6-well Platten auf Deckgläschen, zu je 100.000 Zellen pro well ausgebracht (vgl. Kap. 2.2.1.2 und 2.2.1.3) und am darauffolgenden Tag transfiziert (vgl. Kap. 2.2.1.8 und 2.2.1.9). HUVEC wurden einen Tag nach der Transfektion, HEK293-Zellen zwei Tage danach fixiert. Dafür wurden die Zellen vorsichtig mit PBS gewaschen und zur Fixierung für 15 min bei Raumtemperatur in 4% (w/v) Paraformaldehyd in PBS inkubiert. Nachfolgend wurden die Zellen erneut vorsichtig mit PBS gewaschen und zur Permeabilisierung der Zellen für 15 min in Permeabilisierungs-Lösung inkubiert. Es folgte ein zweimaliges Waschen mit PBS gefolgt von der Inkubation mit dem Primärantikörper. Als Erstantikörper wurde ein gegen das myc-Epitop-Tag gerichteter Antikörper (Anti-c-myc, Klon 9E10, Maus, Biomol, Hamburg) 1:50 in PBS verdünnt verwendet. Zur Inkubation mit dem Primärantikörper wurden die Deckgläschen mit der Zellseite nach unten auf 100µl Antikörperlösung gelegt und über Nacht bei 4°C inkubiert. Zur Überprüfung der Spezifität des Zweitantikörpers wurde ein Deckglas mit transfizierten Zellen mit PBS anstelle des Primärantikörpers inkubiert. Am Folgetag wurden die Deckgläschen wieder umgedreht und dreimal mit PBS gewaschen. Danach erfolgte die Inkubation mit dem Zweitantikörper (Alexa Fluor[®] 488 Anti-Maus-Antikörper (Invitrogen, Karlsruhe); 1:500 in PBS verdünnt) für 1 h bei RT unter Ausschluss von Licht, gefolgt von dreimaligem Waschen mit PBS. Zur Anfärbung des Zytoskeletts wurden die Zellen mit dem spezifisch an Aktin bindenden, fluoreszenzmarkierten Cyclopeptid Phalloidin inkubiert. Nach 20 minütiger Inkubation mit Phalloidin-Lösung bei RT wurden die Zellen zweimal mit PBS gewaschen und anschließend zur Markierung des Zellkerns mit DAPI-Lösung (2mg/ml 4',6-Diamidin-2-phenylindol in Dimethylformamid), 1:1000 in PBS verdünnt, für 2 min inkubiert. Abschließend wurden die Zellen dreimal mit PBS gewaschen und mit je einem Tropfen Mounting-Reagenz auf Objektträgern fixiert. Die Präparate wurden 2-3 Tage bei Dunkelheit getrocknet und anschließend mit Nagellack versiegelt. Die Analyse und Dokumentation der subzellulären

Lokalisation der unterschiedlichen GRHL3 Deletionsmutanten erfolgte an einem Fluoreszenzmikroskop (Axio Observer D1, Zeiss, Jena).

2.2.5 Funktionelle Analysen

2.2.5.1 Luziferase-Reportergen-Assay

Luziferase-Reagenz

- 20mM Tricine
- 0,1mM EDTA
- 8mM MgCl₂
- 33,3mM DTT
- 270mM Coenzyme A (CoA)
- 530mM ATP
- 470mM D-Luziferin

5x RLB-Puffer (Reporter-Lysis-Buffer, Promega Mannheim)

Es wurden Luziferase-Reportergen-Assays durchgeführt, um die Fähigkeit zur transkriptionellen Aktivierung der einzelnen GRHL3-Isoformen zu analysieren. Dazu wurden HEK293-Zellen mit einem Reportergen-Plasmid und einem für eine GRHL3-Isoform kodierenden Expressionsvektor transient kotransfiziert. Hierbei wurden pro Transfektionsansatz für eine 60mm Kulturschale 1,0 µg Reporterplasmid und 0,3 µg GRHL3-Expressionsvektor zur Transfektion benutzt. Alle weiteren Schritte hinsichtlich Zellkultur, transienter Transfektion und Zellernte erfolgten wie in den Kapiteln 2.2.1.2, 2.2.1.8 und 2.2.1.4 beschrieben.

Die daraus resultierenden Zellpellets wurden zur Lyse, ihrer Größe entsprechend, in 50-100µl 1x RLB-Puffer resuspendiert und direkt bei -80°C eingefroren. Nachdem die Proben komplett durchgefroren waren, wurden sie bei Raumtemperatur aufgetaut und weitere 10 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Danach wurde für 10 Minuten bei 17.000xg zentrifugiert und die Überstände in ein neues 1,5ml Reaktionsgefäß überführt. Nach der Bestimmung der Proteinkonzentration (vgl. Kap. 2.2.4.1), wurden jeweils 6µg Protein mit 1x RLB-Puffer auf 20µl aufgefüllt und in eine lichtdichte 96well Mikrotiterplatte pipettiert. Zur Bestimmung der Hintergrund-Lumineszenz wurde eine Kontrollprobe, nur aus RLB-Puffer bestehend, gemessen. Die indirekte Messung der Luziferase Expression über die entstehende Lumineszenz erfolgte in einem Luminometer mit Injektionsapparatur (Microplate Luminometer LB 96 V-Injektor; EG&G Berthold, Bad Wildbad). Die Zugabe von 100µl

Luziferase-Reagenz über den Injektor des Gerätes, startete die Reaktion, in der die Luziferase des Leuchtkäfers *Photinus pyralis* das im Reagenz befindliche D-Luziferin zu Oxyluziferin umsetzte. Das dabei entstandene Licht wurde 5 sec nach Zugabe des Reagenz für 20 sec in „relative light units“ (RLU) gemessen und notiert.

2.2.5.2 Apoptosemessung mittels Durchflusszytometrie (FACS, fluorescence activated cell sorting)

Annexin-V-FITC Apoptosis Detection Kit I (BD PharmingenTM, San Diego, USA)

Zur Messung der Apoptoserate untersucht man die Bindung von Annexin V an Phosphatidylserin, das durch Veränderungen der Zellmembran zu einem frühen Zeitpunkt des programmierten Zelltods an die Oberfläche gelangt (Koopman, et al., 1994). Hierfür kann ein fluoreszenzmarkierter Antikörper genutzt werden, der gegen Annexin V gerichtet ist. Im Durchflusszytometer kann die Intensität dieses Fluoreszenzfarbstoffes gemessen werden und gilt als Maß für die Apoptoserate innerhalb einer Zellpopulation. Um zwischen apoptotischen und nekrotischen Zellen unterscheiden zu können, werden die Zellen zusätzlich mit dem Farbstoff 7-Aminoactinomycin (7-AAD) angefärbt. Dabei interkaliert 7-AAD ausschließlich in die DNA von nekrotischen Zellen, die keine intakte Zellmembran mehr aufweisen (Schmid, et al., 1994).

Zur Bestimmung der Apoptoserate in HUVEC wurden diese einer Doppelfärbung mit Annexin V und 7-AAD unterzogen (BD PharmingenTM, San Diego, USA) und die Fluoreszenzintensitäten durchflusszytometrisch ermittelt. Hierfür wurden 3×10^5 Zellen auf 60mm Zellkulturschalen ausgebracht. Am nächsten Tag wurden die Zellen mit Expressionsvektoren für die zu untersuchenden GRHL3-Isoformen transient transfiziert (vgl. Kap 2.2.1.9). Am darauf folgenden Tag wurden die Zellen einmal mit PBS gewaschen und mit je 300µl Trypsin-EDTA (Gibco/Invitrogen, Karlsruhe) abgelöst. Die Trypsinreaktion wurde mit 900µl 10% (v/v) FCS (Gibco Invitrogen, Karlsruhe) in PBS gestoppt. Mit einer Pasteurpipette (LLG-Einweg-Pasteurpipetten, Peter Oehmen GmbH, Essen) wurden die Zellen in ein FACS-Röhrchen (BD, Franklin Lakes, USA) überführt. Die Zellen wurden für 6 min bei 300xg und 4°C zentrifugiert. Das Zellpellet wurde zweimal mit 1x Annexin-V-Binding-Puffer (BD PharmingenTM, San Diego, USA) gewaschen, dabei wurde darauf geachtet, dass die Zellen dauerhaft auf Eis gekühlt wurden. Nach Absaugen des Puffers, wurden die Zellen in 50µl Annexin-V-Binding-Puffer, 2,5µl Annexin-V-FITC und 2,5µl 7-AAD (0,05µg/µl) resuspendiert. Die resuspendierten Zellen wurden für 30 min im Dunkeln inkubiert. Im Anschluss wurden weitere 200µl Annexin-V-Binding-Puffer zugegeben und die Zellen in einem FACSCaliburTM Durchflusszytometer (BD, Franklin Lakes, USA) analysiert. Die Auswertung der Daten erfolgte mit dem Programm FlowJo (Treestar inc., Ashland, USA).

2.2.5.3 Migrationsstudien (Scratch wound assay)

Der Scratch wound assay wurde zur Untersuchung der Migrationskapazität von HUVEC *ex vivo* durchgeführt. Die Methode basiert auf der Beobachtung, dass Endothelzellen in der Lage sind eine Wunde in ihrer Einzelschicht durch Migration zu schließen (Malinda, et al., 1998).

Zur Untersuchung der Migrationskapazität von HUVEC wurden diese in einer definierten Zellzahl (3×10^5 Zellen) auf 60mm Zellkulturschalen ausgebracht und am darauf folgenden Tag mit Expressionsvektoren für die GRHL3-Isoformen 1 und 3 transient transfiziert (vgl. Kap. 2.2.1.9). Am nächsten Tag wurde im konfluenten Monolayer mit einem Zellschaber eine artifizielle Wunde gesetzt, der sog. „Scratch“. Die Ränder dieser Wunde wurden auf der Unterseite der Zellkulturschale markiert und dienten als Migrationsstartpunkt. Ausgehend von dieser Markierung wurden die Zellen gezählt, die nach 18 h in die Wunde einmigriert waren. Hierfür wurden die Zellen mit dem Lebendfarbstoff Mito-Tracker (Invitrogen, Karlsruhe) angefärbt. Die Farbstoff-Stammlösung (1mmol) wurde 1:2500 verdünnt dem Medium der Zellen hinzugegeben. Nach einer 30 minütigen Inkubation bei 37°C wurde das Medium abgenommen und die Zellen zweimal mit PBS gewaschen, bevor diese durch Zugabe von 4% (w/v) Paraformaldehyd in PBS für 15 min bei RT fixiert wurden. Nach Absaugen der Fixierlösung wurden die Zellen mit PBS überschichtet. Die Ermittlung der migrierten HUVEC erfolgte mikroskopisch durch Auszählung (drei Personen, verblindet).

2.2.5.4 Microarray-Analysen

Im Rahmen dieser Arbeit wurde in Kooperation mit dem Biomedizinischen Forschungszentrum (BMFZ) der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf eine DNA-Microarray-Analyse zur differentiellen Genexpressionsanalyse von HUVEC, welche mit Expressionsvektoren für die GRHL3-Isoformen 1 und 3 transient transfiziert wurden, durchgeführt. Dafür wurde ein SurePrint G3 Human GE 8x60k Chip der Fa. Agilent (Santa Clara, USA) verwendet. Zur Generierung der Proben für den Microarray wurden wie in Abschnitt 2.2.1.3 beschrieben HUVEC in einer definierten Zellzahl von 3×10^5 auf 60 mm Zellkulturschalen ausgebracht und am Folgetag mit Expressionsvektoren für die GRHL3-Isoformen 1 und 3 transient transfiziert (vgl. Kap. 2.2.1.9). Als Kontrolle dazu wurden parallel Zellen mit einem Leervektor (pCMV-V5-neo) transient transfiziert. Zwei Tage nach dem Ausbringen der Zellen wurden diese wie in Abschnitt 2.2.1.4 beschrieben geerntet. Aus den Zellpellets wurde die Gesamt RNA mit TRIzol isoliert und mithilfe des RNeasy[®] Mini Kit (Qiagen, Hilden) weiter gereinigt (vgl. Kap. 2.2.3.9). Die isolierte und gereinigte RNA aus den transfizierten HUVEC wurde in je 3 biologischen Replikaten an das Labor für „Genomics and

Transcriptomics“ des BMFZ übergeben. Alle im Folgenden beschriebenen Arbeitsschritte wurden von Mitarbeitern des BMFZ durchgeführt.

Zuerst wurde die RNA-Integrität mithilfe des „2100 Bioanalyzer“ der Fa. Agilent gemessen. Es wurden nur RNA-Proben mit einer RIN (RNA integrity Number) größer als 9 verwendet. Im Anschluss daran wurde die RNA-Konzentration photometrisch über eine Nanodrop Messung ermittelt. Die anschließende cDNA Synthese und die nachfolgende *in vitro* Transkription mit gleichzeitiger Einlagerung der mit Fluoreszenzfarbstoffen (Cy3) gelabelten Nukleotide erfolgte mit jeweils 100ng RNA, unter Anwendung des „One-Color Microarray-Based Gene Expression Analysis / Low Input Quick Amp Labeling“ Kits (Agilent) nach Herstellerangaben. Die Fluoreszenz markierte cRNA wurde für 17 h bei 65°C mit dem SurePrint G3 Human GE 8x60k Microarray hybridisiert. Im Anschluss daran wurden die Chips nach Herstellerangaben gewaschen und mit dem „Array Scanner G250B“ (Agilent) gescannt.

Die Auswertung der Signalintensitäten erfolgte mit der „Feature Extraction Software“ (Agilent) und die Datenanalyse mithilfe der „GeneSpring GX Software 10.5“ (Agilent).

2.2.5.5 *In vitro* Transkription und RNA Injektion in Zebrafisch (*Danio rerio*) Embryonen

Die hier geschilderten Experimente wurden, abgesehen von der Klonierung der für die GRHL3-Isoformen 1 und 3 kodierenden Regionen in den pCS2+ Vektor, in der AG Winkler am „Department of Biological Sciences“ an der National University of Singapore durchgeführt.

Für die *in vitro* Transkription und spätere Injektion von mRNA's, welche für die GRHL3-Isoformen 1 und 3 kodieren, wurden die kodierenden Abschnitte in den Expressionsvektor pCS2+ (vgl. Kap. 2.17) kloniert (vgl. Kap. 2.2.3.14).

Zur Synthese von, mit einer Cap-Struktur versehenen, mRNA wurden 1µg linearisierter pCS2+-GRHL3-X (X = Isoform 1 oder 3) Vektor transkribiert. Die *in vitro* Transkription erfolgte mithilfe des „mMESSAGE mMACHINE® SP6“ Kit's der Fa. Invitrogen (Karlsruhe). Die transkribierte RNA wurde mittels Phenol/Chloroform/Isoamylalkohol präzipitiert und über RNeasy Säulen (Qiagen, Hilden) gereinigt. Die Qualität der RNA wurde mittels Agarose-Gelelektrophorese überprüft. Es wurden entsprechend der Länge der mRNA unterschiedliche Konzentrationen (GRHL3-1: 80ng/µl; GRHL3-3: 68ng/µl) injiziert. Die Injektion erfolgte in den Dottersack von Zebrafisch Embryonen während ihres Einzell-Stadiums. Die Zebrafisch Embryonen wurden nach der Injektion über Nacht bei 28°C in Zebrafisch-Medium inkubiert. Unbefruchtete Embryonen wurden 2 h und 8 h nach Injektion der mRNA entfernt. 24 h nach der Befruchtung der Zebrafisch Eier wurden die Überlebensraten bestimmt und die Embryos nach ihrem Phänotyp klassifiziert. Als Kontrolle

dienten in diesem Versuch nicht injizierte Wildtyp Embryonen. Der Phänotyp der Embryonen wurde 34 h nach der Befruchtung der Eier mit einem Stereomikroskop und einer daran angeschlossenen Kamera dokumentiert.

3 Ergebnisse

Eine der Hauptursachen für mit dem Alterungsprozess korrelierende Erkrankungen der Vaskulatur ist die endotheliale Dysfunktion. Zu den dabei auftretenden Fehlfunktionen des Endothels zählen hauptsächlich die verringerte Migrationsfähigkeit von Endothelzellen sowie die erhöhte Sensitivität gegenüber apoptotischen Stimuli. Beide Funktionen werden durch das Molekül Stickstoffmonoxid (NO) stark beeinflusst. Es wurde bereits gezeigt, dass der Transkriptionsfaktor Grainyhead-like-3 (GRHL3) Einfluss auf den Schutz von Endothelzellen vor Apoptose und die Migrationsfähigkeit hat. Zudem wurde gezeigt, dass GRHL3 einen Einfluss auf die Phosphorylierung der eNOS und den Gehalt an S-nitrosylierten Proteinen hat. Die aufgeführten Ergebnisse wurden mit der Isoform 2 des Transkriptionsfaktors GRHL3 (GRHL3-2) erzielt (Lukosz, Mlynek et al., 2011). Neben dieser werden im Menschen noch die Isoformen 1 und 3 (GRHL3-1 und GRHL3-3) exprimiert, deren Einfluss auf die beschriebenen Funktionen in Endothelzellen bis dato gänzlich unbekannt war.

In dem hier vorliegenden ersten Teil der Arbeit wurde die Expression von GRHL3-1 und GRHL3-3 in Endothelzellen analysiert und der Einfluss beider Isoformen auf die Funktionen Apoptose und Migration untersucht. Zudem wurde die Auswirkung einer Überexpression beider Isoformen auf Phosphorylierung der Proteine Akt und eNOS in Endothelzellen untersucht.

3.1 Analyse der Expression von GRHL3-1 und GRHL3-3 in Endothelzellen

In einem ersten Experiment sollte geklärt werden ob die Isoformen GRHL3-1 und GRHL3-3 in Endothelzellen exprimiert werden. Da zu diesem Zeitpunkt auf keinen funktionierenden Antikörper gegen GRHL3 zurückgegriffen werden konnte, wurde die Expression der beiden Isoformen auf Transkript-Ebene nachgewiesen. Dazu wurde RNA aus primären humanen Endothelzellen isoliert und mittels reverser Transkription in cDNA umgeschrieben. Über eine PCR mit Isoform spezifischen Primern wurde die Expression der beiden Isoformen 1 und 3 analysiert. Die Primersequenzen für die zu untersuchenden GRHL3 Isoformen wurden zur eindeutigen Unterscheidung so gewählt, dass nur ein spezifisches PCR-Produkt entsteht, welches aufgrund der Lage der Primer jeweils einer spezifischen Isoform zuzuordnen ist. Der Forward-Primer für die Isoform 3 wurde daher so konstruiert, dass er übergreifend an Exon 1b und 3 bindet (siehe Abbildung 3.1 A).

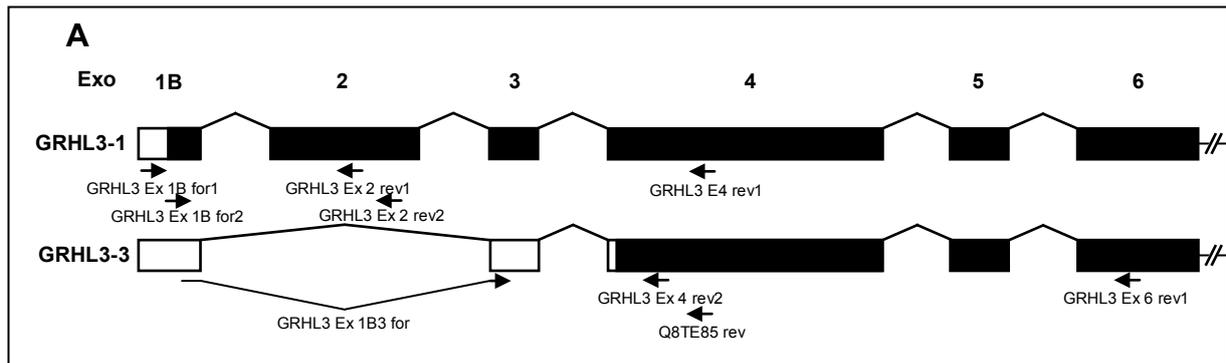


Abbildung 3.1 (A) Schematische Darstellung der Isoform spezifischen Transkripte von GRHL3-1 und GRHL3-3. Die ersten 6 Exons (Kästen) sind maßstabsgetreu als Rechtecke dargestellt. Translatierte Bereiche sind schwarz gekennzeichnet. Die dazwischen liegenden Introns (nicht maßstabsgetreu) sind mit Strichen gekennzeichnet. Die Lage der verwendeten Primer ist schematisch abgebildet. Der Primer Ex1B3 for1 hybridisiert Exon übergreifend mit Exon 1B und 3.

In Abbildung 3.1C sind die Produkte der Isoform spezifischen Amplifikationen nach gelelektrophoretischer Auftrennung dargestellt. Die Größen der PCR-Produkte entsprechen den zu erwartenden Fragmenten (Abb. 3.1 B), womit eindeutig gezeigt ist, dass beide Isoformen, GRHL3-1 und GRHL3-3, in Endothelzellen exprimiert werden.

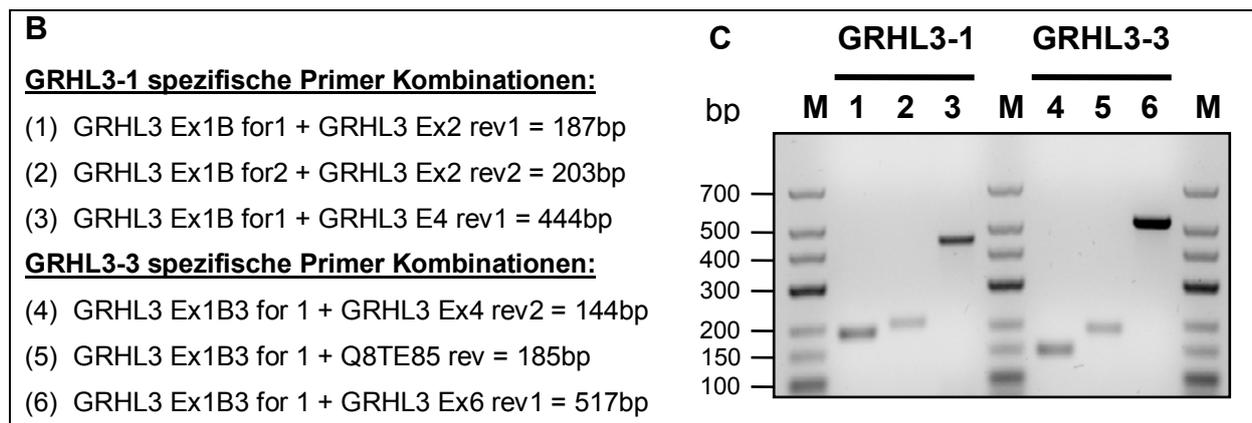


Abbildung 3.1 (B und C): Expressionsanalyse der GRHL3 Isoformen, GRHL3-1 und GRHL3-3, mittels RT-PCR. (B) Auflistung der Primer Kombinationen der Isoform spezifischen PCRs und die daraus resultierenden Produktgrößen. **(C)** Analyse der Isoform spezifischen PCR-Produkte nach 45 Zyklen und gelelektrophoretischer Auftrennung auf einem 2%igen Agarose-Gel. Die Spuren 1-3 zeigen PCR-Produkte von PCRs mit GRHL3-1 spezifischen Primern, die Spuren 4-6 von PCRs mit für GRHL3-3 spezifischen Primern. In den mit M gekennzeichneten Spuren ist ein DNA-Größenstandard aufgetragen.

3.2 Einfluss von GRHL3-1 und GRHL3-3 auf die Migration von Endothelzellen

In diesem Experiment sollte untersucht werden, ob und wenn ja, wie eine Überexpression von GRHL3-1 und GRHL3-3 die Migrationsfähigkeit von primären humanen Endothelzellen beeinflusst. Hierfür wurden diese in Zellkulturschalen ausgebracht und transient mit dem für die jeweilige Isoform kodierenden Plasmid transfiziert. Als Kontrolle wurde zusätzlich der entsprechende Leervektor pCMV-V5-neo transfiziert. Für die Migrationsstudien wurde ein

Scratch-Wound-Assay durchgeführt. Die in Abbildung 3.2 dargestellten Ergebnisse zeigen dass nach Überexpression von GRHL3-1, im Vergleich zu den Leervektor (EV) transfizierten Zellen, wesentlich mehr Endothelzellen in die artifiziell gesetzte „Wunde“ einmigriert sind. Im Gegensatz dazu konnte ich beobachten, dass eine geringere Anzahl an GRHL3-3 transfizierten Endothelzellen in diesen Bereich migriert (Abb. 3.2A) ist. Dieser Effekt konnte in vier unabhängig voneinander durchgeführten Experimenten dieser Art bestätigt werden. Die Quantifizierung dieser Versuche ist in Abb. 3.2B dargestellt. Nach Überexpression von GRHL3-1 migrierten durchschnittlich $129,4 \pm 49,0$ Zellen pro Bildausschnitt (high power field, hpf) in den vorher von Zellen befreiten Bereich, bei GRHL3-3 überexprimierenden Endothelzellen hingegen nur $1,0 \pm 1,9$ Zellen pro hpf. Mit einem Leervektor transfizierte Endothelzellen migrierten durchschnittlich $6,8 \pm 2,9$ pro hpf in die artifiziell gesetzte „Wunde“.

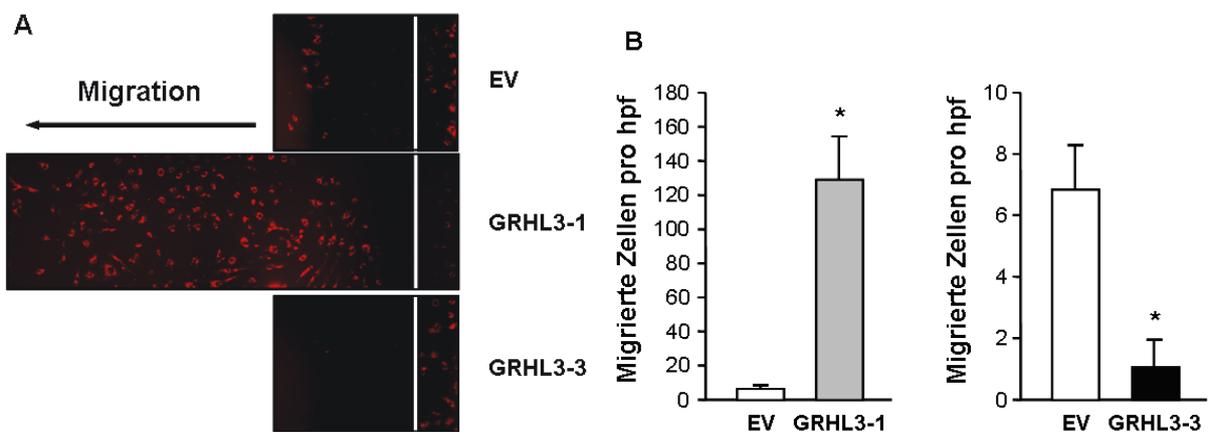


Abbildung 3.2 Analyse der Migrationsfähigkeit von primären humanen Endothelzellen nach Überexpression von GRHL3-1 oder GRHL3-3. (A) Repräsentative Darstellung eines Scratch-Wound-Assays nach Transfektion mit einem Leervektor (EV) oder Expressionsvektoren für die GRHL3 Isoformen 1 (GRHL3-1) bzw. 3 (GRHL3-3). Die Zellen wurden fixiert und zur Visualisierung mit dem Farbstoff Mito-Tracker rot angefärbt. Die weiße Linie stellt den mit dem Zellschaber entfernten Bereich (Scratch) da, der Pfeil zeigt die Migrationsrichtung der Zellen an. **(B)** Quantitative Auswertung der Scratch-Wound-Assays ($n = 4$, Mittelwert \pm Standardfehler). Darstellung der migrierten Zellen pro Bildausschnitt (hpf) jeweils im Vergleich zu EV transfizierten Zellen. (* = $p < 0,05$).

3.3 Einfluss von GRHL3-1 und GRHL3-3 auf die Apoptose von Endothelzellen

In diesem Experiment sollte ermittelt werden, ob sich eine Überexpression der beiden Isoformen GRHL3-1 und GRHL3-3, auf die basale Apoptoserate von primären humanen Endothelzellen auswirkt. Hierfür wurden GRHL3-1 und GRHL3-3 überexprimierende HUVEC durchflusszytometrisch mittels Annexin-V-FITC/7-AAD-Färbung auf Apoptose untersucht. In Abbildung 3.3A ist ein repräsentativer Immunoblot mit Zelllysaten von Leervektor (pCMV-V5-neo), GRHL3-1 (pCMV-GRHL3-1-V5-neo) und GRHL3-3 (pCMV-GRHL3-3-V5-neo) Expressionsvektor transfizierten Zellen zur Expressionskontrolle dargestellt. Die hierfür verwendeten Zelllysate entstammen den in der Apoptosemessung verwendeten Zellen,

diese wurden dafür bei 800xg pelletiert, in 20µl RIPA-Puffer resuspendiert, für 30 min auf Eis lysiert und anschließend bei 16.000xg und 4°C pelletiert. Die abgenommenen Überstände wurden mit SDS-Ladepuffer versetzt und in Immunoblot-Analysen zur Kontrolle der Expression eingesetzt. Hierbei wurde ein gegen das V5-Tag der GRHL3-V5/His Fusionsproteine gerichteter Antikörper verwendet. Als Ladungskontrolle diente ein gegen GAPDH gerichteter Antikörper. Die für die einzelnen Isoformen spezifischen Banden sind mit einem Stern gekennzeichnet.

Die Auswertung der Apoptosemessungen von drei unabhängig voneinander durchgeführten Experimenten ist in Abbildung 3.3B dargestellt. Das Balkendiagramm zeigt die relative Anzahl Annexin-V positiver/7-AAD negativer Zellen normiert auf die Anzahl apoptotischer Zellen die mit dem Leervektor pCMV-V5-neo (EV) transfiziert wurden. Es ist zu sehen, dass eine Überexpression von GRHL3-1 zu einer deutlichen und signifikanten Reduktion der Annexin-V positiven/7-AAD negativen Zellen auf 53,43 % \pm 7,05 % führt, wohingegen eine Überexpression von GRHL3-3 zu einer Erhöhung Annexin-V positiver/7-AAD negativer Zellen auf 128,41 % \pm 65,22 % führt, welche nicht signifikant ist. Abschließend lässt sich daher festhalten, dass eine GRHL3-1 Überexpression zu einer Reduktion der Apoptoserate in primären humanen Endothelzellen führt, hingegen GRHL3-3 Expression zu einer tendenziellen Erhöhung führt, letzterer Effekt jedoch nicht signifikant ist.

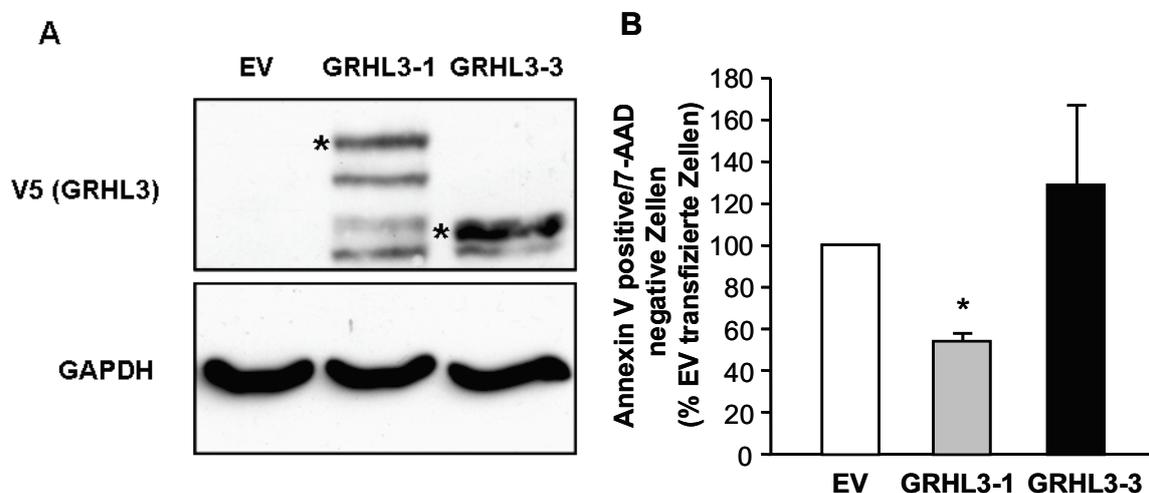


Abbildung 3.3 Analyse Annexin-V positiver Zellen nach Transfektion mit EV, GRHL3-1 oder GRHL3-3. (A) Repräsentative Expressionskontrolle mittels Immunoblot-Analyse. Detektion der GRHL3-Isoformen über einen Anti-V5 Antikörper (V5 (GRHL3)), Ladungskontrolle durch GAPDH Antikörper. Die mit einem * gekennzeichneten Banden entsprechen dem theoretischen Molekulargewicht der einzelnen GRHL3-Isoformen (B) Quantitative Auswertung von Durchflusszytometrischen Messungen Annexin-V positiver Zellen (n = 3, Mittelwert \pm Standardfehler), jeweils normiert auf Anzahl Annexin-V positiver Zellen nach Transfektion mit pCMV-V5-neo (EV). (* = p<0,05 vs EV).

3.4 Analyse der Aktivierung von eNOS und Akt durch GRHL3-1 und GRHL3-3

Es konnte von mir gezeigt werden, dass die Transkriptionsfaktoren GRHL3-1 und GRHL3-3 einen Einfluss auf die Migration (Kap. 3.2) von Endothelzellen haben. Zudem konnte ich zeigen, dass eine GRHL3-1 Überexpression antiapoptotisch in diesen Zellen wirkt (Kap. 3.3). Es ist bekannt, dass Stickstoffmonoxid einen promigratorischen (Urbich, et al., 2002) und antiapoptotischen (Dimmeler und Zeiher, 1997, Haendeler, et al., 1999) Effekt auf Endothelzellen hat. Die wohl wichtigste Quelle für Stickstoffmonoxid in Endothelzellen ist die endotheliale NO-Synthase (eNOS), welche konstitutiv durch die Protein Kinase B/Akt aktiviert wird (Urbich, et al., 2002). Daher wurde in den im Folgenden beschriebenen Experimenten die Aktivität dieser beiden Proteine anhand ihrer Phosphorylierung an Serin 473 (Akt) und Serin 1179 (eNOS) untersucht. Hierfür wurden Zelllysate aus GRHL3-1 oder GRHL3-3 überexprimierenden primären humanen Endothelzellen benutzt, um in Westernblot Analysen und anschließender Immundetektion den Phosphorylierungsgrad an den oben genannten Serinen zu bestimmen. Als Kontrolle wurden mit dem Leervektor pCMV-V5-neo transfizierte HUVEC verwendet. Als Maß für die Aktivität der Proteine Akt und eNOS, wurden die Signalintensitäten für das jeweilige phosphorylierte Protein in Verhältnis zum jeweiligen Gesamt-Protein gesetzt und anschließend auf die Signalintensitäten von Leervektor transfizierten Zellen normiert. In Abbildung 3.4A sieht man repräsentative Immunoblots. Es wurden für jedes Lysat jeweils Immunoblot Analysen mit Antikörpern gegen an Serin 473 phosphoryliertes Akt (P-Akt (S473), aktives Akt), Gesamt Akt, an Serin 1179 phosphorylierte eNOS (P-eNOS (S1179), aktives eNOS) und Gesamt eNOS durchgeführt. Es ist zu sehen, dass bei nahezu gleicher Intensität in den Gesamt-Akt Banden die Bande für P-Akt (S473) in den Lysaten GRHL3-1 überexprimierender Zellen intensiver ist als nach Überexpression von GRHL3-3 oder in den Lysaten von Leervektor-transfizierten Zellen. Ähnliches ist bei den P-eNOS (S1179) Banden zu sehen. Auch hier ist bei der GRHL3-1 Probe eine intensivere Bande, im Vergleich zu den Proben GRHL3-3 und EV, zu erkennen. Die Gesamt-eNOS Banden zeigen hier unterschiedliche Intensitäten, am schwächsten ist die Bande der GRHL3-1 transfizierten Lysate, gefolgt von der Bande der Leervektor transfizierten Zelllysate und am stärksten ist die Bande der mit GRHL3-3 transfizierten Zelllysate. Da die Banden aber densitometrisch analysiert in Verhältnis gesetzt und anschließend auf EV Banden normiert werden ist das nicht relevant. Es wurden drei Experimente dieser Art unabhängig voneinander durchgeführt und die Banden der einzelnen Immunoblots densitometrisch ausgewertet. Die Resultate der semiquantitativen Analysen sind in den Abbildungen 3.4B und 3.4C zu sehen. Es sind jeweils die Verhältnisse von phosphoryliertem Protein zum Gesamtprotein dargestellt, welche anschließend auf die Ergebnisse der mit dem Leervektor transfizierten Zellen normiert sind. Die Balkendiagramme zeigen, ähnlich wie der

repräsentative Immunoblot, eine verstärkte Phosphorylierung der Proteine eNOS (3,43-fache \pm 0,62 Erhöhung) und Akt (3,09-fache \pm 0,36 Erhöhung) an den für ihre Aktivität spezifischen Serinen nach Überexpression von GRHL3-1 im Vergleich zur Kontrolle. Nach Überexpression von GRHL3-3 ist hingegen eine signifikante Reduktion in der Phosphorylierung von eNOS auf 67% \pm 5% zu sehen und nur eine schwache und nicht signifikante Verinngerung der Phosphorylierung von Akt auf 91% \pm 7% zu beobachten.

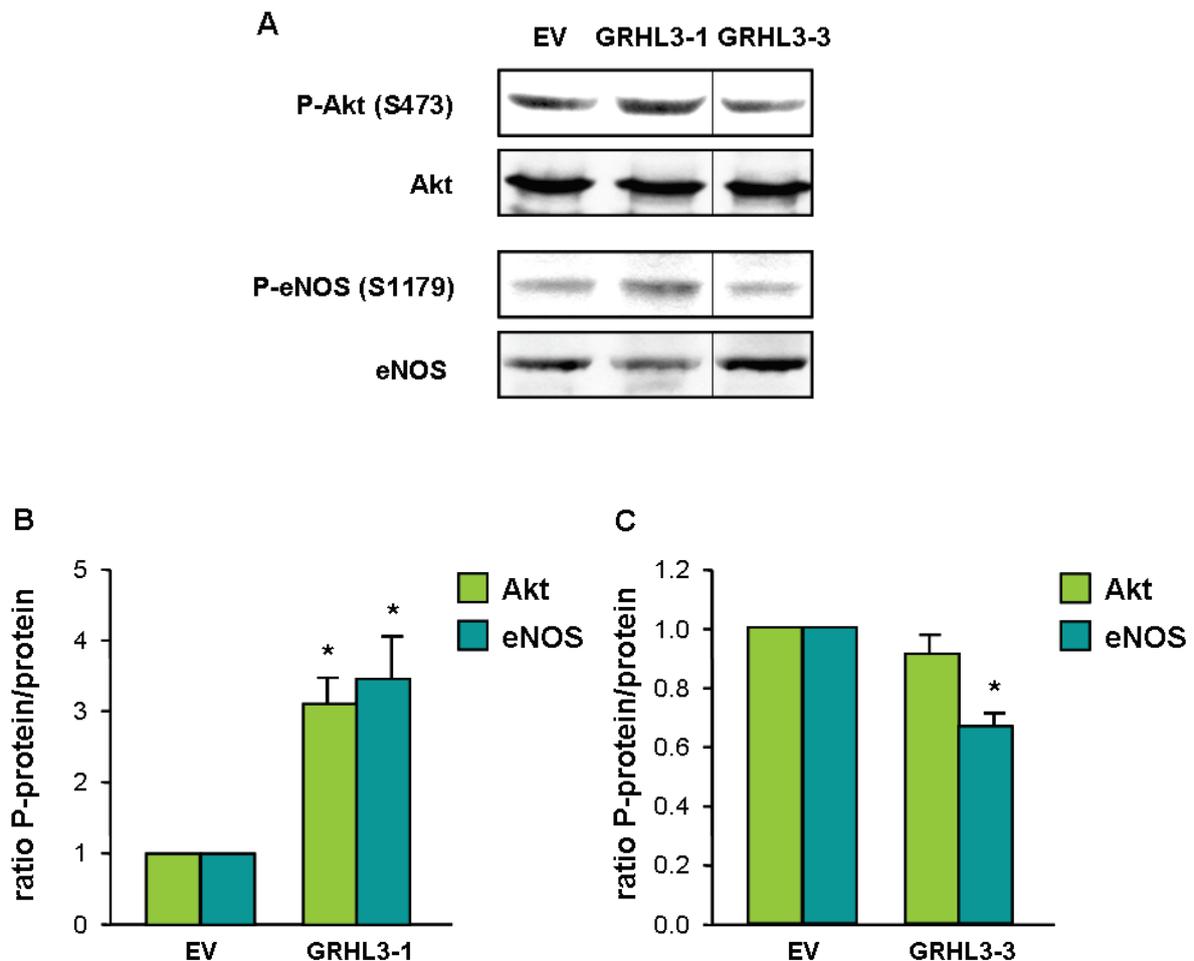


Abbildung 3.4 Analyse des Phosphorylierungsgrad von Akt und eNOS an den Serinen (473) und (1179) nach Überexpression von GRHL3-1 oder GRHL3-3 mittels Immunoblot-Analyse.

(A) Repräsentative Darstellung von Immunoblots mit Zellysaten von mit dem Leervektor pCMV-V5-neo (EV) bzw. Expressionsvektoren für GRHL3-1 oder GRHL3-3 transfizierten HUVEC unter Verwendung von Antikörpern gegen Akt, an Serin 473 phosphoryliertes Akt, eNOS und an Serin 1179 phosphorylierte eNOS. (B und C) Semi-quantitative Auswertung des Phosphorylierungsgrades von Akt und eNOS anhand des Verhältnis von phosphoryliertem Protein zu Gesamtprotein, mit anschließender Normierung auf Leervektor (EV) transfizierte Zellen. (B) Mit Zellysaten aus GRHL3-1 überexprimierenden primären humanen Endothelzellen, bzw. (C) mit Zellysaten aus GRHL3-3 überexprimierenden HUVEC. (n = 3, Mittelwert \pm Standardfehler). (* = p<0,05 vs EV)

3.5 Transkriptions-regulatorische Aktivität von GRHL3-1 und GRHL3-3

In den vorherigen Kapiteln konnte gezeigt werden, dass die Transkriptionsfaktoren GRHL3-1 und GRHL3-3 teilweise gegensätzlich Endothelzellfunktionen wie Apoptose und Migration, als auch den Phosphorylierungsgrad von eNOS und Akt beeinflussen. Da es sich bei GRHL3-1 um einen Transkriptionsfaktor handelt, ist es höchst unwahrscheinlich, dass die beobachteten Effekte wie die vermehrte Phosphorylierung von eNOS und Akt, auf eine direkte Interaktion von GRHL3-1 mit den phosphorylierten Proteinen zurückzuführen sind. Es ist daher anzunehmen, dass GRHL3-1 eine transkriptionelle Aktivierung von Zielgenen hervorruft, welche in der Signalkaskade oberhalb von eNOS und Akt liegen und zu der vermehrten Phosphorylierung führen. Einhergehend mit diesen Ergebnissen wurde 2003 von Ting et al. beschrieben, dass GRHL3-3 aufgrund des fehlenden Exons 2 kein aktiver Transkriptionsfaktor ist (Ting, et al., 2003). Dazu stellten Ting et al. die These auf, dass GRHL3-3 eine dominant negative Form des Transkriptionsfaktors sein könnte. Dies wurde damit begründet, dass GRHL3-3 zwar keine Aktivierungs-Domäne mehr enthält, aber die DNA-Binde-Domäne und die Dimerisierungs-Domäne noch vorhanden sind. Somit könnte GRHL3-3 einen Heterodimer mit anderen GRHL3 Isoformen bilden und diese damit an der Aktivierung von Zielgenen hindern.

Da es für weitere Experimente von essentieller Bedeutung war zu wissen, ob die hervorgerufenen Effekte von GRHL3-1 und GRHL3-3 auf der Aktivierung von Zielgenen beruhen oder nicht, wurde von mir ebenfalls ein Versuch durchgeführt, um die beiden Transkriptionsfaktoren auf ihre Fähigkeit zur transkriptionellen Aktivierung zu überprüfen. Ting et al. nutzten für ihre Analysen Fusionsproteine, die nur aus dem N-Terminus der Transkriptionsfaktoren fusioniert mit einer GAL4-DNA-Binde-Domäne bestanden. Diese wurden zusammen mit einem Reportergenkonstrukt bestehend aus fünf aneinandergereihten GAL4 DNA-Bindestellen, gefolgt von einem Gen für Chloramphenicol Acetyltransferase (CAT), in HEK293T-Zellen kotransfiziert. Anhand der CAT Aktivität wurden Rückschlüsse auf die Fähigkeit zur transkriptionellen Aktivierung von Zielgenen durch die einzelnen Isoformen getroffen.

Das von Ting et al. durchgeführte Experiment weist einige Schwächen auf, so werden nicht die kompletten Transkriptionsfaktoren analysiert, sondern nur kurze N-terminale Fragmente. Zudem wird keine natürliche GRHL3 Bindedomäne verwendet, sondern eine heterologe, hefespezifische, DNA-Bindedomäne. Daher wollte ich in einem Transaktivierungs-Assay mit Vollängenproteinen von GRHL3-1 und GRHL3-3 und einem GRHL3 responsiven Element die zellulären Gegebenheiten besser widerspiegeln und somit näher an einer *in vivo* Situation sein.

3.5.1 Klonierung eines Luziferase Reportergen Konstrukts mit GRHL3 responsiven Elementen

Vor der Durchführung des Experimentes zur Analyse der transkriptionellen Aktivierung mussten zwei Reportergenkonstrukte erstellt werden. Es wurde sowohl ein Reportergenkonstrukt mit einem funktionsfähigen GRHL3 responsiven Element (wt GRHL3-RE) erstellt, als auch ein Vektor mit einem mutierten GRHL3 responsiven Element (mut GRHL3-RE), welches einen Austausch von zwei zentralen Basenpaaren aufweist, erstellt. Es wurde gezeigt, dass ein Austausch dieser beiden Basenpaare, die Bindung von GRHL3 an die GRHL3 DNA-Bindesequenz komplett aufhebt (Ting, et al., 2005), daher sollte das mut GRHL3-RE als Negativ-Kontrolle in den Analysen zur Transkriptionsfaktoraktivität eingesetzt werden. Die jeweiligen responsiven Elemente bestehen aus zwei in Tandemwiederholungen angeordneten GRHL3 DNA-Bindesequenzen (mutiert oder wildtypisch), welche in einem Abstand von 32 bp hintereinander folgen. Diese Anordnung und die Benutzung von zwei Bindesequenzen wurden gewählt, da gezeigt werden konnte, dass dies bei richtigem Abstand synergistische Effekte hervorrufen kann, die auf der Kooperativität von Transkriptionsfaktoren beruhen (Schule, et al., 1988).

Auf diese responsiven Elemente folgte eine verkürzte Variante des Thymidinkinase Promotors aus dem Herpes Simplex Virus, der nur noch eine TATA-Box enthält (McKnight und Kingsbury, 1982). Es wurde dieser verwendet, da in Voruntersuchungen zur Aktivität der Promotoren sich zeigte, dass dieser eine ausreichend hohe Aktivität aufwies (Daten nicht gezeigt). Auf den Promotor folgte das Reportergen, eine modifizierte Variante des Luziferasegens (*luc+*) aus dem Leuchtkäfer *Photinus phyalis*. In dieser wurde die Sequenz so verändert, dass verborgene regulatorische Elemente entfernt wurden und unspezifische Luziferase Expression damit minimiert wurde.

Die für das GRHL3-responsive Element benötigten komplementären Oligonukleotide enthielten jeweils zwei GRHL3-responsive Elemente und überhängende Enden, welche komplementär zu BamHI und HindIII Restriktionsschnittstellen sind (siehe Abbildung 3.5). Zudem wurde der in Kapitel 2.1.7 beschriebene Vektor pTATA_luc_plus mit den Restriktionsenzymen BamHI und HindIII enzymatisch verdaut. Es wurden die doppelsträngigen Oligonukleotide mit dem wt GRHL3-RE bzw. dem mut GRHL3-RE in den BamHI und HindIII geschnittenen Vektor pTATA_luc_plus ligiert, um im Anschluss die Vektoren pGRHL3REwt_TATA_luc_plus bzw. pGRHL3REmut_TATA_luc_plus zu erhalten. Diese wurden nach Abschluss der Klonierung durch eine Sequenzierung verifiziert.

wt GRHL3-RE

AGCTTGATACGGATCCAACCTAGATAAACCGGTTTACTAGTTAGATCCAACCTAGATAAACCGGTTTACTAGTTA
 ACTATGCCTAGGTTGATCTATTTGGCCAAAATGATCAATCTAGGTTGATCTATTTGGCCAAAATGATCAATCTAG

mut GRHL3-RE

AGCTTGATACGGATCCAACCTAGATAAAACGTTTACTAGTTAGATCCAACCTAGATAAAACGTTTACTAGTTA
 ACTATGCCTAGGTTGATCTATTTTGCAAAATGATCAATCTAGGTTGATCTATTTTGCAAAATGATCAATCTAG



Abbildung 3.5 Schematische Darstellung der doppelsträngigen Oligonukleotide, die für die Klonierung der Reporterengenkonstrukte, pGRHL3REwt_TATA_luc_plus und pGRHL3REmut_TATA_luc_plus, genutzt wurden. Darstellung der für die Restriktionsenzyme HindIII und BamHI spezifischen Restriktionsschnittstellen und die daraus resultierenden überhängenden Enden (Schnittstellen mit Pfeilen markiert).

3.5.2 Einfluss von GRHL3-1 und GRHL3-3 auf ein GRHL3-responsives Reporterkonstrukt

Zur Analyse der Aktivität der beiden Transkriptionsfaktoren GRHL3-1 und GRHL3-3 wurde jeweils ein GRHL3 Expressionsvektor (z.B. pCMV-GRHL3-1-V5-neo, vgl. Kap. 2.1.7) bzw. der Leervektor pCMV-V5-neo und ein Reporterengenkonstrukt (z.B. pGRHL3REwt_TATA_luc_plus) in HEK293-Zellen transient kotransfiziert. Als Spezifitätskontrolle wurde statt dem Reporterengenkonstrukt pGRHL3REwt_TATA_luc_plus, das Reporterengenkonstrukt pGRHL3REmut_TATA_luc_plus verwendet, welches nicht aktiviert werden sollte. Es wurde die Luziferase-Aktivität in den daraus resultierenden Zelllysaten bestimmt. Über die gemessene Luziferaseaktivität in den jeweiligen Proben kann man Rückschlüsse auf die Fähigkeit der einzelnen Isoformen zur transkriptionellen Aktivierung von Genen mit GRHL3 Bindestellen ziehen. Diese Fähigkeit zur transkriptionellen Aktivierung wiederum erlaubt es den Transkriptionsfaktoren vermutlich auch *in vivo* zelluläre Zielgene zu aktivieren.

In Abbildung 3.6A ist noch einmal schematisch der Aufbau der Reporterengenkonstrukte dargestellt, bestehend aus den zwei GRHL3 responsiven Elementen (wt GRHL3-RE oder mut GRHL3-RE), dem Minimalpromotor der Thymidin Kinase der nur noch aus einer TATA-Box besteht (TATA) und dem optimierten Luziferasegen (luc+). In Abbildung 3.6B sind die quantitativen Auswertungen der Luziferaseaktivitäten der GRHL3-Isoformen, GRHL3-1 und GRHL3-3, nach Kotransfektion mit den Vektoren pGRHL3REwt_TATA_luc_plus oder pGRHL3REmut_TATA_luc_plus dargestellt. In dem Balkendiagramm ist die Auswertung von sechs unabhängig voneinander durchgeführten Experimenten dargestellt, welche jeweils auf Expressionsvektor ohne GRHL3 cDNA mit Reporterengenkonstrukt kotransfizierte Zellen normiert wurden. Es ist sowohl bei GRHL3-1 (Verringerung auf 94% ± 7%) als auch bei

GRHL3-3 (1,48-fache \pm 0,35 Erhöhung) zu sehen dass es keine signifikante Steigerung der Luziferaseaktivität in den mit dem mutierten GRHL3-responsiven Reporterkonstrukt kotransfizierten Proben gibt. Dagegen sieht man eine Steigerung der Luziferaseaktivität bei GRHL3-1 mit wt Reportergerkonstrukt transfizierten Proben um das 2,41-fache \pm 1,27 und bei GRHL3-3 mit wt Reportergerkonstrukt transfizierten Proben um das 83,6-fache \pm 39,2. Die nicht vorhandene Aktivität nach Kotransfektion mit dem mutierten Reportergerkonstrukt stellt ein klares Indiz für die Spezifität des GRHL3-responsiven Elements dar. Ich konnte damit eindeutig zeigen, dass beide GRHL3-Isoformen Transkriptionsaktivatoren sind und somit in der Lage sein sollten die Transkription von zellulären Zielgenen zu aktivieren.

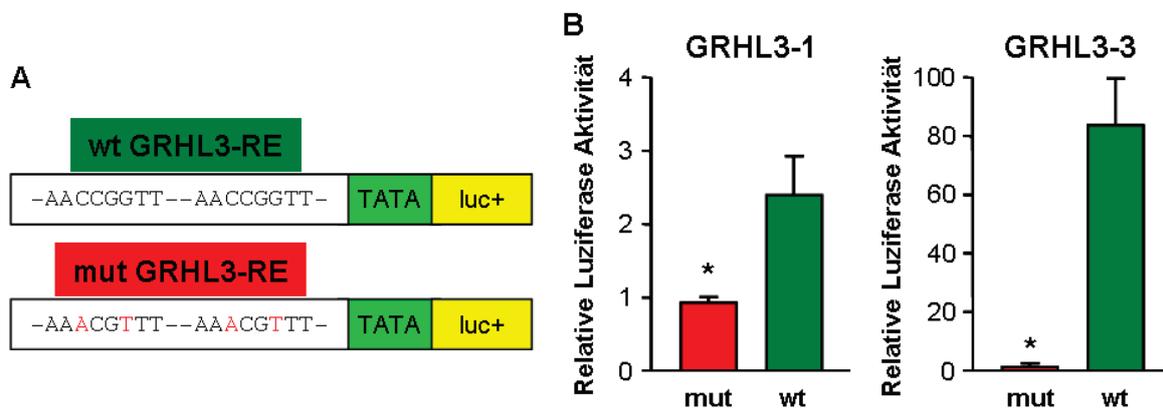


Abbildung 3.6: Analyse der transkriptionellen Aktivität von GRHL3-1 und GRHL3-3 anhand eines Luziferase-Reporterger-Assays (A) Schematische Darstellung der Reportergerkonstrukte pGRHL3REwt_TATA_luc_plus und pGRHL3REmut_TATA_luc_plus. pGRHL3REwt_TATA_luc_plus weist zwei GRHL3-DNA-Bindestellen auf, die in pGRHL3REmut_TATA_luc_plus mutiert sind (farblich gekennzeichnet). (TATA) Minimalpromotor der Thymidin Kinase, bestehend aus einer TATA-Box; (luc+) Luziferasegen. (B) Transkriptionelle Aktivität von GRHL3-1 und GRHL3-3 (n = 6, Mittelwert \pm Standardfehler), (* = $p < 0,05$ vs wt GRHL3-RE).

3.6 Identifizierung von GRHL3-1 und GRHL3-3 Zielgenen

3.6.1 Microarray-Analysen

Nachdem gezeigt werden konnte, dass sowohl GRHL3-1 als auch GRHL3-3, obwohl gegensätzlich in der Literatur beschrieben, Transkriptionsaktivatoren sind, sollten in einem weiteren Experiment spezifische Zielgene der Isoformen identifiziert werden. Hierzu wurde die Oligonukleotid-Microarray Technik zur differentiellen Genexpressionsanalyse nach Überexpression von GRHL3-1 und GRHL3-3 eingesetzt. Dazu wurde RNA aus primären humanen Endothelzellen, die mit Expressionsvektoren für GRHL3-1 und GRHL3-3 bzw. dem Leervektor pCMV-V5-neo transient transfiziert worden waren isoliert und über RNeasy Säulen der Firma Qiagen gereinigt. Es wurden jeweils drei unabhängig voneinander erstellte RNA Proben an das Zentrallabor für „Genomics and Transcriptomics“ des Biologisch-

Medizinischen-Forschungszentrum (BMFZ) in Düsseldorf übergeben, wo die folgenden Schritte durchgeführt wurden: (1) Die RNA wurde in einem Bioanalyzer 2100 der Fa. Agilent auf ihre Integrität überprüft. Alle Proben wiesen eine hohe RNA Qualität auf und erhielten „RNA-Integrity Numbers“ (RIN) zwischen 9,7 und 10 (Maximum RIN = 10). (2) Im Anschluss wurden jeweils 100 ng RNA in cDNA umgeschrieben und danach in eine *in vitro* Transkription eingesetzt, bei der die entstandene cRNA über den Einbau von mit dem Fluoreszenzfarbstoff Cy3 gekoppelten Cytidintriphosphat (CTP) markiert wurde. (3) Unterschiede im Genexpressionsmuster wurden nach Hybridisierung auf einem „SurePrint G3 Human GE 8x60k“ Microarray über die Fluoreszenzintensität ermittelt. (4) Die Konvertierung der Microarray Bilddaten, in Form von 20 bit Tiff Dateien, in numerische Informationen der einzelnen untersuchten Gene erfolgte mit dem Programm „Feature Extraction“ (Version 10.7.1.1; Agilent Technologies). Die Signalintensitäten wurden berechnet und zusätzlich fand eine Qualitätskontrolle der Datensätze zu den einzelnen Proben statt. Eine GRHL3-1 Probe bestand diese Qualitätskontrolle nicht und wurde daher in den weiteren Analysen nicht berücksichtigt. (5) Die nachfolgenden Datenanalyse wurde mit dem Programm „GeneSpring GX“ (Version 10.5; Agilent Technologies) durchgeführt. Es wurden die Datensätze normalisiert und die Replikate jedes Probenotyps (GRHL3-1, GRHL3-3 und Leervektor) gruppiert. Damit ein Transkript als reguliert galt, musste es in mindestens zwei von drei Datensätzen (bzw. zwei Datensätzen für GRHL3-1) herauf oder herunter reguliert sein. Die differentielle Genexpressionsanalyse wurde statistisch mit Hilfe des nach Welch modifiziertem t-Test bewertet.

Es wurden vom Zentrallabor für „Genomics and Transcriptomics“ des Biologisch-Medizinischen-Forschungszentrums (BMFZ) in Düsseldorf Listen mit den darin aufgeführten regulierten Transkripten übergeben (siehe Anhang A1 und A2). Diese zeigten, dass nach GRHL3-1 Überexpression 367 Transkripte, im Vergleich zum Leervektor, differentiell exprimiert sind und nach GRHL3-3 Überexpression 251 Transkripte, gegenüber dem Leervektor, differentiell exprimiert sind. 28 dieser Transkripte wurden sowohl von GRHL3-1 als auch von GRHL3-3, gegenüber dem Leervektor, in ihrer Expression reguliert und sind daher für die Suche nach GRHL3-Isoform spezifischen Zielgenen irrelevant (siehe Abb. 3.7). Aus diesen Listen wurden jeweils zwei von GRHL3-1 und GRHL3-3 differentiell regulierte Transkripte ausgewählt, deren Proteine der Literatur nach funktionell in die Prozesse Migration und Apoptose involviert sind. Hierbei wurden nur hochregulierte Transkripte gewählt, da ich auf der Suche nach direkt durch GRHL3-Isoformen regulierten Genen war und eine direkte negative Regulation durch einen Transkriptionsfaktor nur möglich ist wenn dieser als Repressor wirkt.

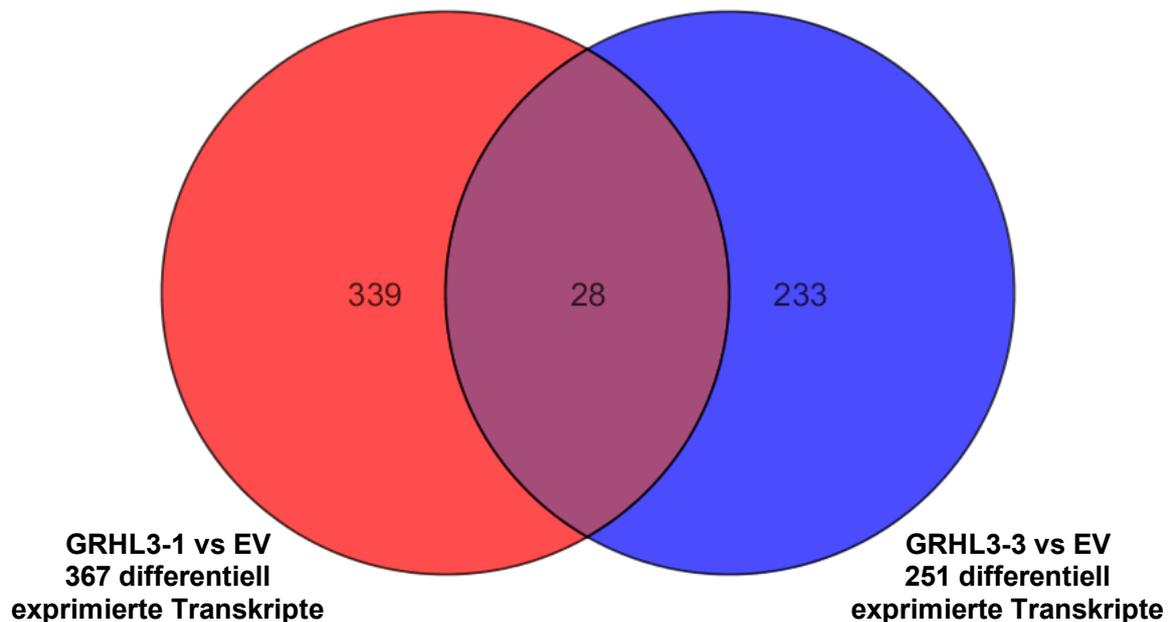


Abbildung 3.7 Venn-Diagramm einer Genexpressionsanalyse mit GRHL3-1 und GRHL3-3. Der rote Kreis stellt die nur durch GRHL3-1 regulierten Transkripte (339 Transkripte) dar. Der blaue die nur durch GRHL3-3 regulierten Transkripte (233 Transkripte) gegenüber dem Leervektor. Die Schnittmenge (blau-roter Bereich) beider Kreise symbolisiert die durch GRHL3-1 und GRHL3-3, gegenüber dem Leervektor regulierten Transkripte (28 Transkripte).

Bei den von GRHL3-1 regulierten Zielgenen wurden die Gene *MXI1* - Max interactor 1 (1,47-fach hochreguliert) und *AKT2* - Proteinkinase B beta (1,46-fach hochreguliert) für weiterführende Untersuchungen ausgewählt. *MXI1* kodiert für ein Protein welches mit dem Protein Max dimerisiert, genau wie das Protein c-myc und daher als c-myc Antagonist fungiert. Es ist nachgewiesen, dass c-Myc Apoptose in verschiedenen Zelltypen induziert, so z.B. in Endothelzellen (Lopez-Farre, et al., 1997) oder glatten Muskelzellen (Bennett, et al., 1994). *AKT2* kodiert für die Proteinkinase B beta, welche zur Kinase-Familie Akt gehört. Akt2 ist ein negativer Regulator der Phosphatase PTEN, welche alle Akt Isoformen negativ reguliert. Dadurch führt eine verstärkte Akt2 Expression zu einer verstärkten Aktivität aller Akt Isoformen (Polytarchou, et al., 2011), welche als Regulatoren von Angiogenese und Apoptose bekannt sind (Somanath, et al., 2006).

Bei den von GRHL3-3 regulierten Zielgenen entsprachen *ATF3* - activating transcription factor 3 (1,71-fach hochreguliert) und *TPTE* – transmembrane phosphatase and tensin homolog (1,27-fach hochreguliert) den zuvor benannten Kriterien. *ATF3* kodiert für den activating transcription factor 3, hierbei handelt es sich um einen p53 nachgeschalteten Transkriptionsfaktor, der als Effektor des p53 vermittelten Zelltods fungiert und somit die Apoptose von Zellen beeinflusst (Zhang, et al., 2002). *TPTE*, auch bekannt als *PTEN2*, ist ein funktionell uncharakterisiertes Homolog von *PTEN* (Walker, et al., 2001). *PTEN* ist ein

Tumor-Suppressor und Antagonist der PI3K und reguliert darüber negativ die Kinase Akt, welche wie schon bei Akt2 beschrieben als Regulator von Angiogenese und Apoptose bekannt ist (Somanath, et al., 2006).

3.6.2 Validierung ausgewählter GRHL3-1 und GRHL3-3 Zielgene

Die Validierung der GRHL3-1 und GRHL3-3 Zielgene erfolgte auf Protein-Ebene mittels Immunoblots, weil aufgrund veränderter Protein-Level eher Rückschlüsse auf zelluläre Effekte zu ziehen sind, als bei veränderter RNA-Menge. Es wurden Immunoblotanalysen mit Zelllysaten aus GRHL3-1 und GRHL3-3 überexprimierenden primären humanen Endothelzellen durchgeführt. Als Kontrolle dienten Lysate von Zellen, die mit dem Leervektor pCMV-V5-neo transfiziert worden waren.

Die gegen die Proteine „activating transcription factor 3“ (Gen: *ATF3*) und „transmembrane phosphatase with tensin homology“ (Gen: *TPTE*) gerichteten Antikörper zeigten keine ausreichende Spezifität. In den Immunoblotanalysen mit verschiedenen getesteten Antikörpern war eine große Anzahl unspezifischer Banden zu beobachten, so dass diese für eine Validierung ungeeignet waren. Daher wurden im Folgenden nur GRHL3-1 Zielgene validiert.

Nachfolgend sind Immunoblotanalysen mit Antikörpern gegen die Proteine Mxi1 und Akt2 dargestellt und analysiert worden. Hierfür wurde in drei unabhängigen Experimenten nach GRHL3-1 und GRHL3-3 Überexpression, die GRHL3 Überexpression normiert auf die GAPDH Expression und die Akt2 und Mxi1 Expression normiert auf die γ -Aktin Expression nachgewiesen.

In Abbildung 3.8A sind Ausschnitte eines repräsentativen Immunoblots mit Zelllysaten von Leervektor, GRHL3-1 und GRHL3-3 Expressionsvektor transfizierten Zellen zu sehen. Es sind die Proteinmengen, der Proteine Akt2, Mxi1 und der Ladungskontrolle γ -Aktin in Bezug auf die GRHL3-1 oder GRHL3-3 Expression analysiert worden. In Abbildung 3.8B ist eine repräsentative Expressionskontrolle mittels Detektion der GRHL3-Isoformen über einen Anti-V5 Antikörper (V5 (GRHL3)) zu sehen.

Abbildung 3.8C zeigt eine semiquantitative Analyse der Mxi1-Expression in den GRHL3-1, GRHL3-3 bzw. Leervektor transfizierten Zelllysaten. Hierfür wurden drei unabhängig voneinander durchgeführte Immunoblotanalysen zur Mxi1 Expression (siehe Abb. 3.8A) durchgeführt und densitometrisch ausgewertet. Es wurde die Mxi1 Expression jeder Probe auf die γ -Aktin Expression normiert. Das Balkendiagramm zeigt die Mxi1 Expression der drei durchgeführten Immunoblotanalysen normiert auf die Mxi1 Expression der mit dem Leervektor pCMV-V5-neo transfizierten Zellen. Ausgehend von der auf 100% gesetzten Mxi1 Expression der EV Probe war eine deutliche Steigerung der Mxi1 Expression nach GRHL3-1

Überexpression um das 2,18-fache \pm 0,38 zu verzeichnen. Die Überexpression von GRHL3-3 zeigte mit einer Steigerung um das 1,02-fache \pm 0,45 keinen erkennbaren Effekt auf die Mxi1 Expression. In Abbildung 3.8D ist die Analyse der Akt2-Expression in den GRHL3-1, GRHL3-3 bzw. Leervektor transfizierten Zelllysaten zu sehen. Hierfür wurden drei unabhängig voneinander durchgeführte Immunoblotanalysen zur Akt2 Expression (siehe 3.8A) durchgeführt und densitometrisch ausgewertet. Auch hier wurden die densitometrisch ermittelten Signalintensitäten jeder einzelnen Analyse auf die γ -Aktin Expression normiert und anschließend alle drei Analysen auf gegen die auf 100% gesetzte Akt2 Expression der Leervektor transfizierten Zellen normiert. Die Analyse zeigte das die Überexpression von GRHL3-1 zu einer Steigerung der Akt2 Expression um das 1,55-fache \pm 0,18. Eine Überexpression von GRHL3-3 in HUVEC hingegen führte zu einer Reduktion der Akt2 Expression auf 36,6% \pm 14,3%. Somit konnten die im Microarray identifizierten GRHL3-1 Zielgene, *MXI1* und *AKT2*, auf Protein-Ebene verifiziert werden. Zudem ist mit der verstärkten Expression der beiden Proteine auch eine eventuelle Erklärung für die in den *ex vivo* Experimenten beobachteten Effekte, bezüglich der Migration und Apoptose von primären humanen Endothelzellen, gefunden worden.

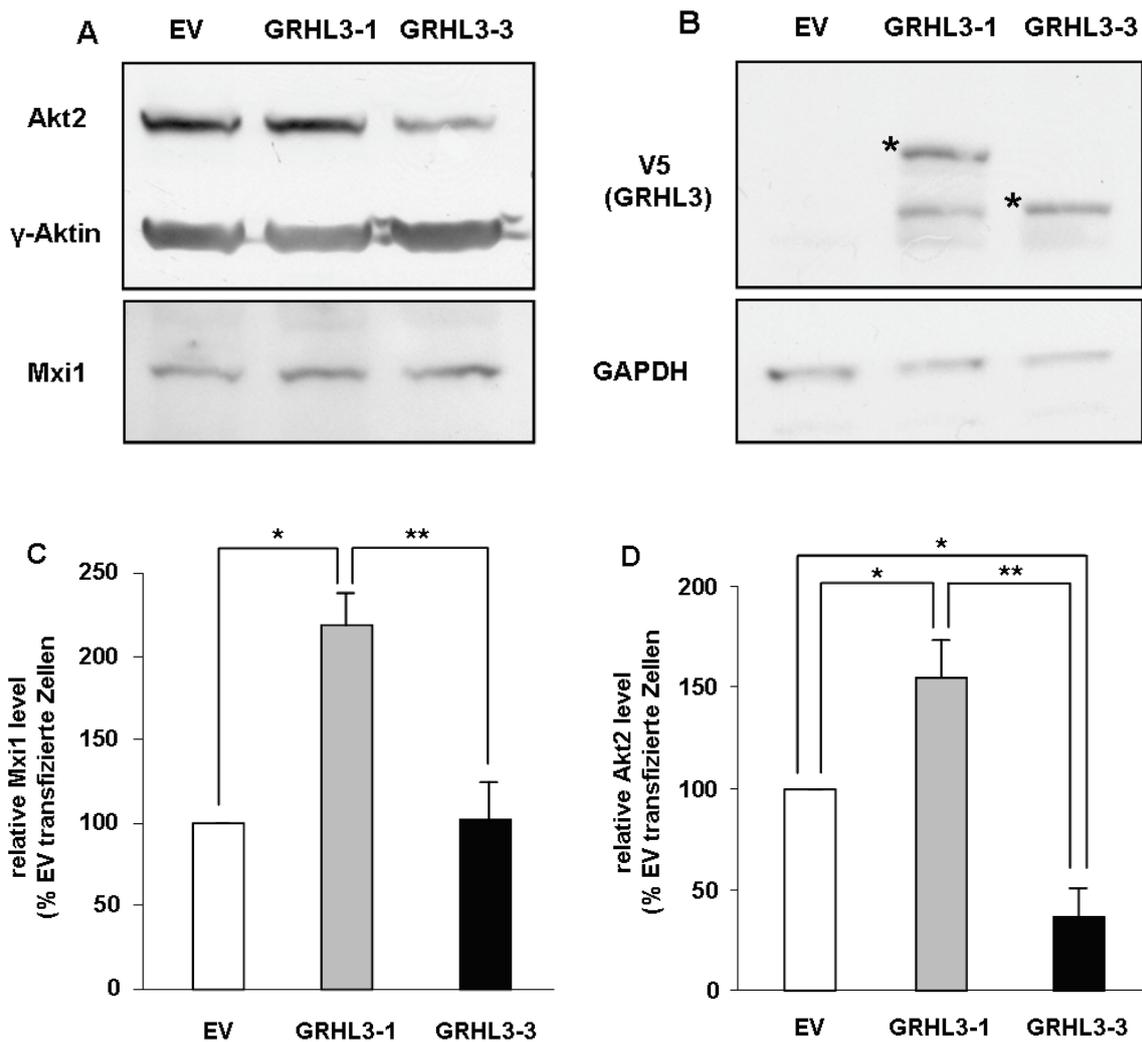


Abbildung 3.8 Expressionsanalyse der Proteine Mxi1 und Akt2 in GRHL3-1 oder GRHL3-3 überexprimierenden HUVEC. (A und B) Repräsentative Darstellung von Immunoblots mit Zelllysaten von mit dem Leervektor pCMV-V5-neo (EV) bzw. Expressionsvektoren für GRHL3-1 oder GRHL3-3 transfizierten HUVEC unter Verwendung von Antikörpern gegen (A) Akt2, γ -Aktin und Mxi1 oder (B) V5-Epitop-Tag und GAPDH. (C und D) Semi-quantitative Auswertung der Proteinlevel von Mxi1 (C) und Akt2 (D) anhand densitometrischer Analysen von Immunoblot-Analysen (siehe A). Anschließende Normierung auf Leervektor (EV) transfizierte Zellen. (n = 3, Mittelwert \pm Standardfehler; * = p<0,05 vs EV; ** = p<0,05 vs GRHL3-1)

3.7 *In vivo* Effekte nach Überexpression von GRHL3-1 und GRHL3-3

Nachdem in einer Reihe von *ex vivo* Experimenten unterschiedliche Effekte von GRHL3-1 und GRHL3-3 beobachtet werden konnten, sollten beide GRHL3-Isoformen in einem *in vivo* Experiment untersucht werden. Hierfür wurde der Zebrafisch (*danio rerio*) gewählt, da er eine Reihe von Vorteilen mit sich bringt. So ist er durchscheinend und ermöglicht eine einfache Phänotypische Analyse. Zudem ist die Haltung einer großen Individuen Zahl und die technische Durchführung von Experimenten mit diesen, relativ günstig und gut handhabbar. Des Weiteren ist es möglich *in vitro* transkribierte RNA, für Überexpressionsexperimente, in

den Zebrafisch zu injizieren. Daher wurden von mir cDNA Sequenzen, der GRHL3-Isoformen, in einen für die *in vitro* Transkription geeigneten Vektor kloniert. Mit diesen Vektoren wurden in Kooperation mit Dr. Martin Graf und Dr. Christoph Winkler vom „Department of Biological Sciences“ an der National University of Singapore Überexpressionsexperimente durchgeführt.

3.7.1 Klonierung von GRHL3-1 und GRHL3-3 kodierender Sequenz in den Vektor pCS2plus

Der pCS2plus Vektor ist ein häufig benutzter Vektor zur Überexpression von Proteinen im Zebrafisch und anderen Modellorganismen (Rupp, et al., 1994). Er zeichnet sich durch eine hohe Effizienz und Zuverlässigkeit bei *in vitro* Transkriptionen aus. Zur Umklonierung der kodierenden Sequenzen für GRHL3-1 und GRHL3-3 in den pCS2plus Vektor wurden die Vektoren pCMV-GRHL3-1-V5-neo und pCMV-GRHL3-3-V5-neo zunächst mit den Restriktionsenzymen PmeI und BamHI verdaut. Zusätzlich wurde der Vektor pCS2plus mit den Restriktionsenzymen SnaBI und BamHI geschnitten. Die Ligation der zu insertierenden Fragmente in den pCS2+ Vektor war trotz der Benutzung unterschiedlicher Restriktionsenzyme (SnaBI und PmeI) möglich, da beide Restriktionsenzyme glatte Enden, so genannte „blunt ends“, erzeugen. Die enzymatisch verdauten Vektoren wurden elektrophoretisch auf einem Agarose-Gel aufgetrennt, die DNA-Fragmente für die GRHL3-1 bzw. GRHL3-3 kodierenden Regionen und den Vektor pCS2plus, dem nur ein kleiner Bereich in der multiplen Klonierungstelle entfernt wurde, ausgeschnitten und gereinigt. Die Insert- (GRHL3-1 bzw. GRHL3-3) und Vektor-DNA-Fragmente wurden in äquimolaren Verhältnissen in einer Ligation eingesetzt. Nach Transformation in den *E.Coli* Stamm TG1 wurde DNA aus Kulturen einzelner Kolonien isoliert, mit dem Restriktionsenzym HincII überprüft und Plasmide mit dem korrekten Restriktionsmuster mittels Sequenzierung verifiziert.

3.7.2 *in vitro* Transkription von pCS2+-GRHL3 Vektoren, RNA Injektion in Zebrafischembryonen und phänotypische Analyse

Die *in vitro* Transkription der Vektoren pCS2plus-GRHL3-1 und pCS2plus-GRHL3-3, die Injektion der GRHL3-mRNA in die Zebrafischembryonen und die anschließende Analyse der Tiere erfolgte in der Arbeitsgruppe von Herrn Prof. C. Winkler am „Department for Biological Science“ an der Universität Singapur durch Dr. Martin Graf. Die *in vitro* Transkription wurde mit dem mMESSAGING mMACHINE® SP6 Kit (Invitrogen, Karlsruhe) durchgeführt. Die daraus resultierende, mit einer Cap-Struktur versehene, GRHL3-1- bzw. GRHL3-3-mRNA wurde in

äquimolaren Mengen in Zebrafisch-Embryonen im Einzellstadium injiziert. Die Embryonen wurden 24 h nach Fertilisation ihrem Phänotyp entsprechend klassifiziert (Abbildung 3.9B) und 34 h nach Befruchtung photographisch dokumentiert (Abbildung 3.9A). Die phänotypische Einordnung der Zebrafischembryonen erfolgte in die Kategorien „normaler Phänotyp“, „mittlerer Phänotyp“ und „schwerwiegender Phänotyp“, repräsentativ dargestellt in Abbildung 3.9A. Der „mittlere Phänotyp“ ist charakterisiert durch mehrere der hier aufgeführten morphologischen Veränderungen: gebogener Schwanz, kleine Augen, kleiner Kopf, Apoptose in der Kopfregion und eine geringe Körpergröße. Für den „schwerwiegenden Phänotyp“ typische Charakteristika sind: massiv deformierter Embryo, kein Kopf, offenes Rückenmark, gegabelter Schwanz und massive Apoptose in allen Körperbereichen. In vier unabhängig voneinander durchgeführten mRNA-Injektions-Experimenten wurde in insgesamt 336 Embryonen GRHL3-1-mRNA injiziert und in 307 Embryonen GRHL3-3-mRNA. 737 Embryonen, in die keine mRNA injiziert wurde, dienten als Kontrolle. In Abbildung 3.9B ist eine prozentuale Verteilung der auftretenden Phänotypen, die nach GRHL3-mRNA-Injektionen in den Zebrafischembryonen und den Kontrolltieren zu beobachten waren, dargestellt. Es sind nach Injektion von GRHL3-1-mRNA $1,53\% \pm 1,11\%$, nach Injektion von GRHL3-3-mRNA $11,04\% \pm 5,88\%$ und aus der Kontrollgruppe $0,41\% \pm 0,28\%$ der Embryonen gestorben. Einen „normalen Phänotyp“ weisen $83,12\% \pm 9,18\%$ der GRHL3-1-Embryonen auf, hingegen nur $36,26\% \pm 12,70\%$ der GRHL3-3 überexprimierenden Embryonen. $98,55\% \pm 1,09\%$ der uninjizierten Embryonen weisen einen „normalen Phänotyp“ auf. Ein „mittlerer Phänotyp“ ist bei $0,59\% \pm 0,59\%$ der Kontroll-Embryonen, bei $12,78 \pm 7,86\%$ der GRHL3-1-Embryonen und $22,75 \pm 4,68\%$ der GRHL3-3-Embryonen festzustellen. Es zeigte sich bei $0,45\% \pm 0,28\%$ der Kontroll-Embryonen, bei $2,57\% \pm 1,62\%$ der GRHL3-1-Embryonen und bei $29,96\% \pm 6,27\%$ der GRHL3-3-Embryonen der „schwerwiegende Phänotyp“. Zusammenfassend lässt sich feststellen, dass der größte Teil der GRHL3-3 überexprimierenden Embryonen tot oder schwer deformiert ist (41%) und sich nur 36% der GRHL3-3 überexprimierenden Embryonen normal entwickeln. Im Gegensatz dazu, weisen mehr als 80% der GRHL3-1-Embryonen einen normalen Phänotyp auf. Somit konnte ich auch *in vivo* zeigen, dass sich die Überexpression von GRHL3-3 nachteilig auswirkt und die Überexpression von GRHL3-1 nicht und damit die Ergebnisse der *ex vivo* Untersuchungen bestätigen.

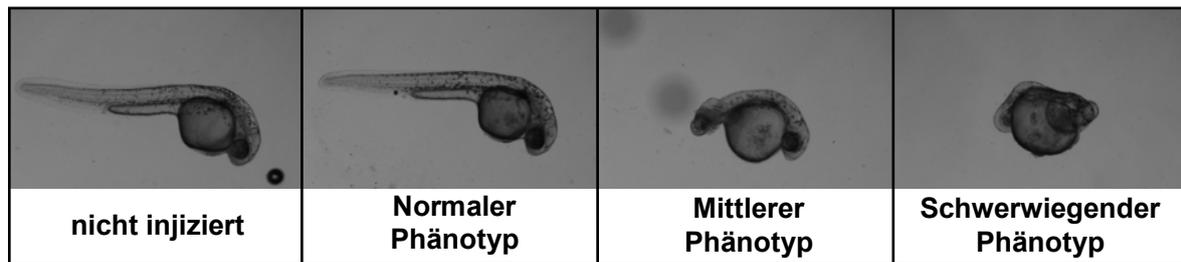
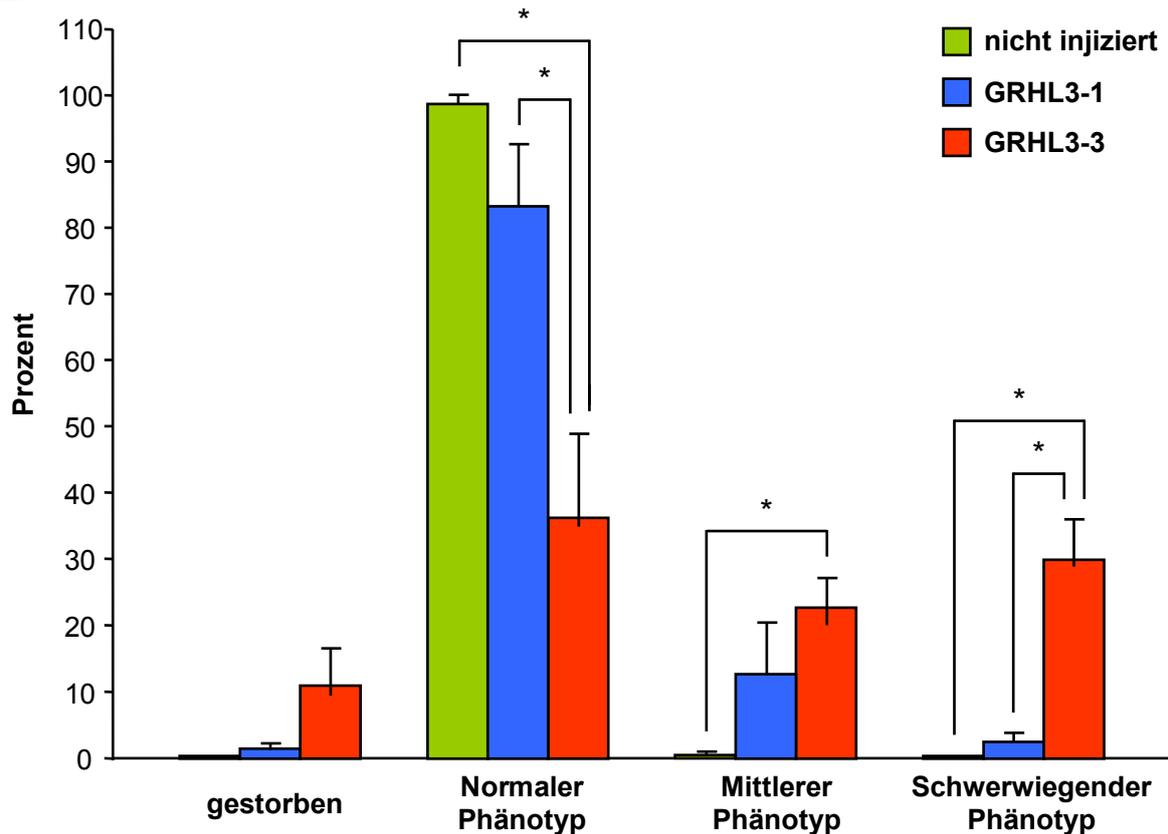
A**B**

Abbildung 3.9 Entwicklungsbiologische-Analyse von Zebrafischembryonen nach Überexpression von GRHL3-1 bzw. GRHL3-3. (A) Repräsentative Darstellung der Auswirkung einer GRHL3-Überexpression auf den Phänotyp von Zebrafischembryonen. (B) Prozentuale Verteilung der unterschiedlichen Phänotypen von Zebrafischembryonen nach Überexpression von GRHL3-1 (blau) und GRHL3-3 (rot). Nicht injizierte Kontrollembryonen sind in grün dargestellt.

3.8 Identifizierung eines Nukleären Lokalisationssignal (NLS) im Transkriptionsfaktor GRHL3

Aufgrund der Tatsache, dass es sich bei GRHL3 um einen Transkriptionsfaktor handelt, welcher sich entsprechend seiner Funktion vornehmlich im Nukleus befinden sollte, wurde in diesem Experiment nach einem eventuell vorhandenen nukleären Lokalisationssignal (NLS) in der Sequenz von GRHL3 gesucht. Der Kerntransport von GRHL3 stellt eventuell eine Möglichkeit zur funktionellen Modulation des Transkriptionsfaktors oder seiner Isoformen dar.

Eine Reihe von Transkriptionsfaktoren wird über den Kernimport reguliert z.B. transloziert NF- κ B erst nach Abspaltung und proteasomaler Degradation des Inhibitors I κ B in den Nukleus (Scheidereit, 2006). Glucocorticoid-Rezeptoren verändern ihre Position erst nach Bindung eines Liganden und damit einhergehender Dissoziation von HSP90 vom Zytoplasma in den Nukleus (Pratt und Toft, 1997). Es ist für den Transkriptionsfaktor GRHL3 weder eine Modulation des Kernimportes noch ein NLS bekannt, daher wurden unterschiedliche Ansätze verfolgt um ein NLS in der Sequenz von GRHL3 zu identifizieren. Dieses für den Import des Transkriptionsfaktors vom Zytoplasma in den Nukleus verantwortliche Signal sollte identifiziert und anschließend mutiert werden. Nukleäre Lokalisationssignale können unterschiedliche Charakteristika aufweisen. Viele NLS haben eine hohe Anzahl positiv geladener Aminosäuren (Conti und Kuriyan, 2000). Andere NLS haben oftmals an ihren Enden eine Anhäufung von basischen Aminosäuren getrennt durch einige unbestimmte Aminosäuren (Truant und Cullen, 1999).

Ein verfolgter Ansatz zur Identifikation eines NLS in der Sequenz von GRHL3 waren *in silico* Analysen. Hierfür wurden die Sequenzen von GRHL3-1 und GRHL3-3 mit den Programmen *NLS-Mapper* (nls-mapper.iab.keio.ac.jp/) (Kosugi, et al., 2009) und *PredictProtein* (<https://www.predictprotein.org/>) (Cokol et al., 2000) analysiert.

Des Weiteren wurde manuell nach Regionen mit einer Vielzahl positiv geladener Aminosäuren oder einer Anhäufung basischer Aminosäuren getrennt durch zufällige Aminosäuren gesucht.

Die Tabelle 3.1 zeigt die auf diese Weise selektionierten Abschnitte der GRHL3 Sequenz anhand einer Analyse von GRHL3-1.

Art der Suche	Aminosäuresequenz	Bezeichnung der Mutante
<i>NLS-Mapper</i>	RLPLKRTCSPFTEEFELPSKQAKEGDLQRV	Δ bi_NLS
<i>PredictProtein</i>	Kein Ergebnis	-
Manuell	RKMRDDDERKQFRRKVKCP	Δ RKM
Manuell	KVYKKCKR	Δ KR

Tabelle 3.1: Ergebnisse der Suche nach potentiellen NLS.

Diese definierten Aminosäureabfolgen wurden deletiert und zusätzlich noch einige großflächige Deletionsmutanten erstellt, bei denen z.B. ein großer Teil des C-Terminus entfernt wurde. Eine schematische Übersicht über alle Deletionsmutanten ist in Abbildung 3.10 zu sehen.

Die Analyse putativ NLS-defizienter GRHL3-Deletionsmutanten sollte mittels Immunfluoreszenzmikroskopie erfolgen. Um die Problematik eines funktionsfähigen GRHL3-Antikörpers und eines Anti-V5-Antikörpers, der für Immunfluoreszenzfärbungen als ungeeignet erwies, zu umgehen, wurde ein myc-Epitop-Tag, N-terminal vor die GRHL3 kodierende Sequenz, kloniert.

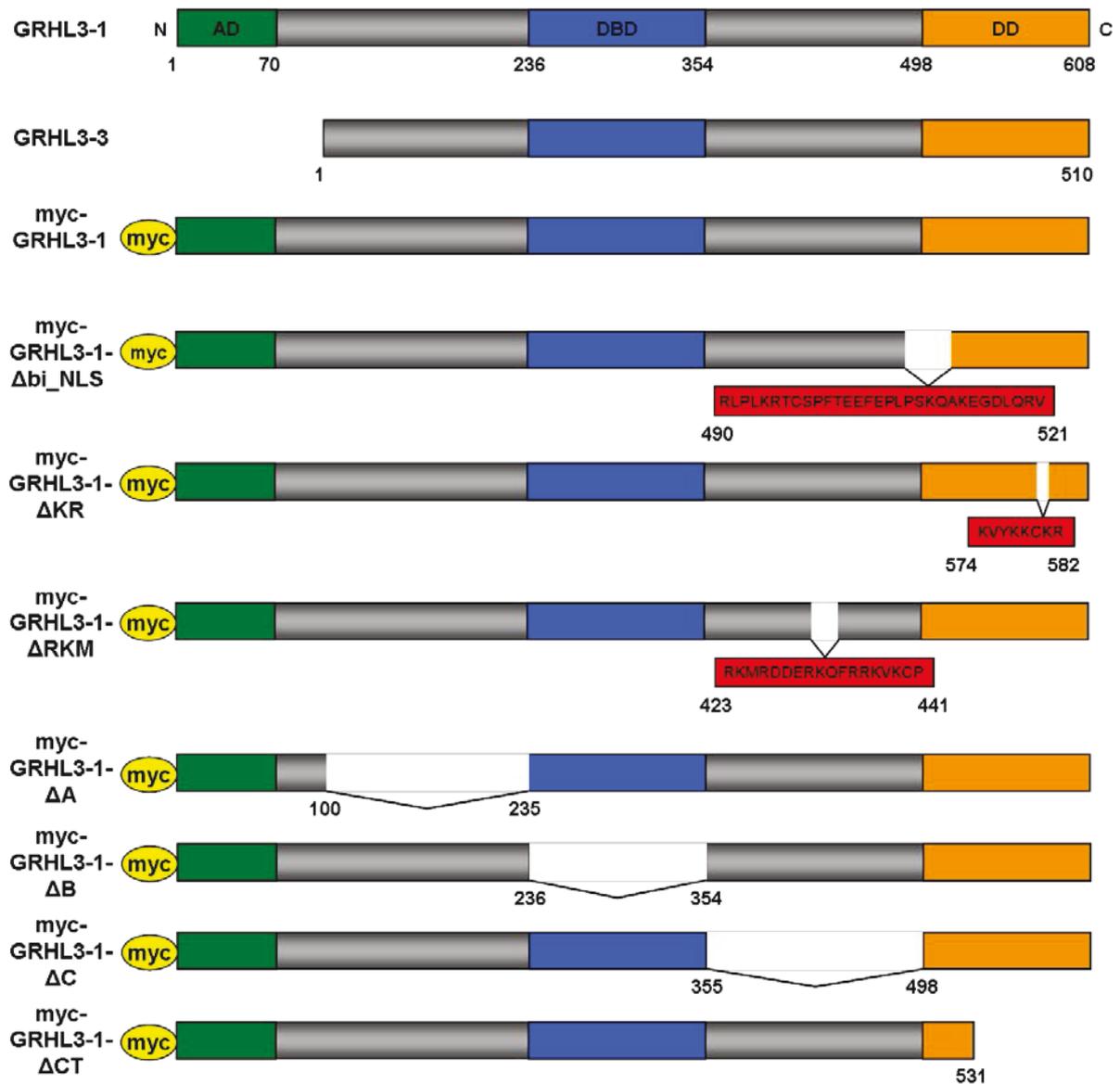


Abbildung 3.10 Schematische Darstellung der Proteine GRHL3-1 und GRHL3-3 und der darauf basierenden Deletionsmutanten am Beispiel von GRHL3-1. In den Farben grün, blau und orange sind gemäß Ting et. al 2003 die Domänen der GRHL3-Proteine dargestellt. (grün) Aktivierungsdomäne, (blau) DNA-Binde-Domäne, (orange) Dimerisierungs-Domäne. In Rot sind die mutierten Bereiche der Deletionsmutanten zu sehen. In Gelb ist das N-terminale myc-Epitop-Tag abgebildet. Die Zahlen zeigen an welcher Aminosäure eine Domäne oder ein mutierter Bereich beginnt und endet.

3.8.1 Klonierung eines N-terminalen myc-Epitop-Tag 5` der GRHL3 kodierenden Sequenz

Zur Fusion eines myc-Epitop-Tags an das 5'-Ende kodierende Region des GRHL3-1 bzw. GRHL3-3 Proteins wurde das Prinzip der Overlap-extension PCR (OEP) (Ho, et al., 1989) angewandt. Ziel war es ein DNA-Fragment zu synthetisieren, welches eine Restriktionsschnittstelle für die Ligation in den Zielvektor, gefolgt von dem myc-Epitop-Tag und einer Abfolge von drei Glycinen als Abstandshalter (Glycin-Spacer) enthält. Zusätzlich musste das Fragment einen Bereich des GRHL3 Proteins mit einer weiteren Restriktionsschnittstelle enthalten. Die einzelnen Schritte der OEP und die dabei entstehenden PCR-Produkte sind in der Abbildung 3.11 schematisch dargestellt. In einer ersten PCR-Reaktion wurde ein myc-Epitop-Tag enthaltendes Plasmid als Matrize eingesetzt und mit den Primern Bam-myc for1 und myc-Tag rev1 das myc-Epitop-Tag amplifiziert. Zusätzlich wird über die Primer eine BamHI-Schnittstelle, ein Start Codon, ein Glycin Spacer und das 5'-Ende der für GRHL3 codierenden Sequenz amplifiziert (siehe Abb. 3.11, PCR1 und Produkt PCR1). Parallel dazu wurde in einer zweiten PCR-Reaktion mit den Primern myc-GRHL3- (1 bzw. 3) for1 und GRHL3 Ex6 rev1 ein 722 (GRHL3-1) bzw. 428 (GRHL3-3) bp, entsprechend dem N-Terminus der jeweiligen Isoform, langer Abschnitt aus dem 5'-Ende der für GRHL3 codierenden Sequenz amplifiziert, welcher eine Schnittstelle für das Restriktionsenzym SbfI enthält. Durch Nutzung des Primers myc-GRHL3- (1 bzw. 3) for1 wurde ein überlappender Bereich zum ersten PCR Produkt amplifiziert (siehe Abb. 3.11, PCR2 und Produkt PCR2). Die auf diese Art amplifizierten DNA-Fragmente wurden als Matrize in einer dritten PCR Reaktion eingesetzt. In dieser binden die beiden Matrizen aufgrund ihrer Komplementarität aneinander. Durch den Einsatz der endständigen Primer Bam-myc for1 und GRHL3 Ex6 rev1 wurde das finale DNA-Fragment amplifiziert. Dieses wurde anschließend, wie auch der Zielvektor pCMV-GRHL3- (1 bzw. 3) -V5-neo, mit den Restriktionsenzymen BamHI und SbfI geschnitten. Die erhaltenen Vektor- und Insert-DNA-Fragmente wurden miteinander ligiert, um den Vektor pCMV-myc-GRHL3- (1 oder 3) -V5-neo zu erhalten.

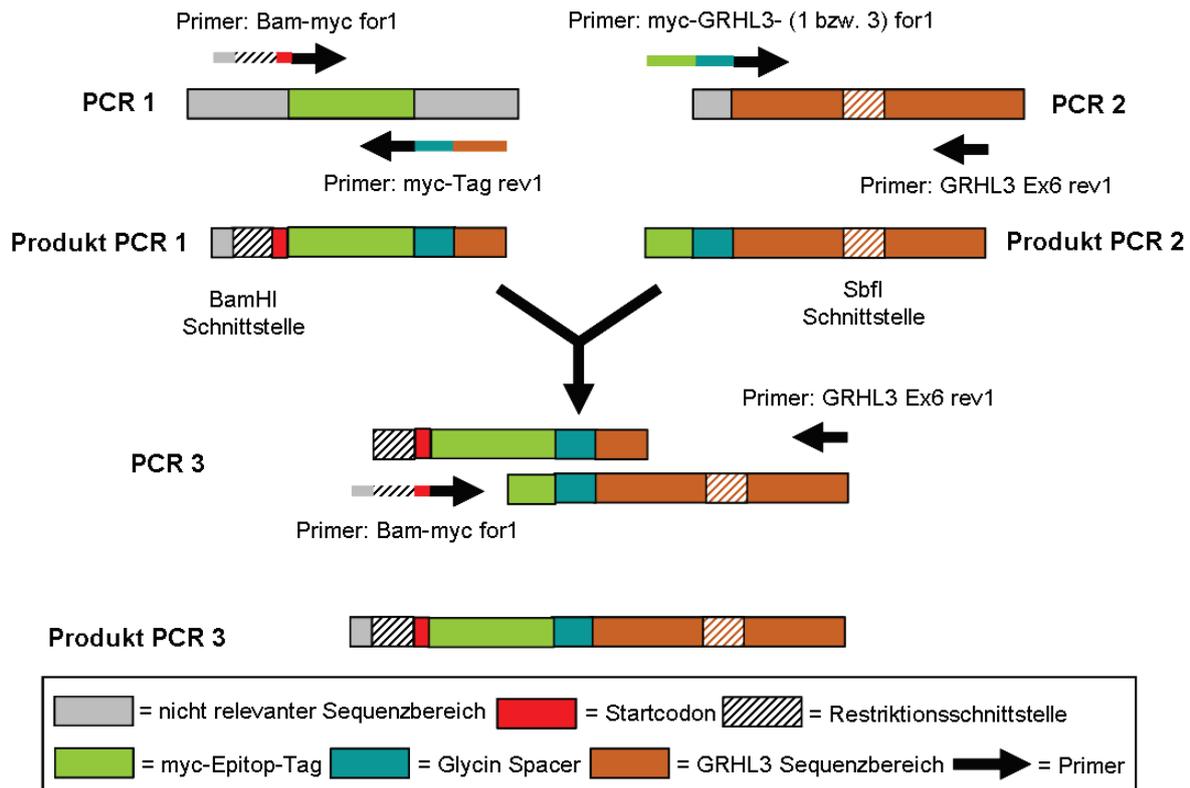


Abbildung 3.11 Schematische Darstellung einer Overlap-extension PCR (OEP) zur Klonierung von Expressionsvektoren für myc-GRHL3 Fusionsproteine.

3.8.2 Klonierung putativ NLS defizienter GRHL3 Deletionsmutanten

In dem folgendem Abschnitt wird die Herstellung einer putativ NLS-defizienten GRHL3-Deletionsmutante exemplarisch für alle anderen Deletionsmutanten anhand der Klonierung des Plasmid pCMV-myc-GRHL3-1- Δ bi_NLS-V5-neo dargestellt. Für die Erstellung aller Deletionsmutanten wurde, wie schon bei der Fusion der codierenden Region für das myc-Epitop-Tag an die GRHL3 Sequenz, das Prinzip der Overlap-extension PCR (OEP) angewandt. Im Gegensatz zur Klonierung des myc-Epitop-Tags, wurde allerdings keine zusätzliche DNA-Sequenz in ein vorhandenes Plasmid eingefügt, sondern ein Abschnitt daraus entfernt. Die einzelnen Schritte der OEP und die daraus resultierenden Produkte sind in Abbildung 3.12 schematisch dargestellt. In einer ersten PCR-Reaktion wurde, ausgehend von dem als Matrize dienenden Vektor pCMV-myc-GRHL3- (1 bzw. 3) -V5-neo, mit Hilfe der Primer GRHL3 Ex4 for1 und bi_NLS rev1 ein Bereich der kodierenden Sequenz des GRHL3 Proteins 5' zu dem zu deletierenden Bereich amplifiziert. Dieser enthält zudem einen kurzen Bereich der komplementär zur GRHL3-Sequenz 3' zu der gewünschten Deletion ist (siehe Abb. 3.12, PCR1 und Produkt PCR1). Parallel dazu wird in einer zweiten PCR-Reaktion ein DNA-Fragment amplifiziert, welches einen großen Bereich 3' zu der Deletion abdeckt und nur einen kurzen komplementären Bereich 5' zu der Deletion enthält (siehe Abb. 3.12 PCR2 und Produkt PCR2). In diesen beiden DNA-Fragmenten ist der zu deletierende Bereich nicht

mehr vorhanden. Sie können als Template in einer dritten PCR-Reaktion genutzt werden. In dieser PCR-Reaktion werden die endständigen Primer GRHL3 Ex4 for1 und GRHL3 CT rev genutzt, um mit Hilfe der Matrize einen Bereich der GRHL3-Sequenz zu amplifizieren, aus dem das putative NLS entfernt wurde. Dieses DNA-Fragment wurde, genau wie der Zielvektor (z.B. pCMV-myc-GRHL3-1-V5-neo), mit den Restriktionsenzymen BspEI und XbaI enzymatisch verdaut, elektrophoretisch aufgetrennt, die gewünschten Fragmente gereinigt und anschließend ligiert, um den Vektor pCMV-myc-GRHL3-1- Δ bi_NLS-V5-neo zu erhalten.

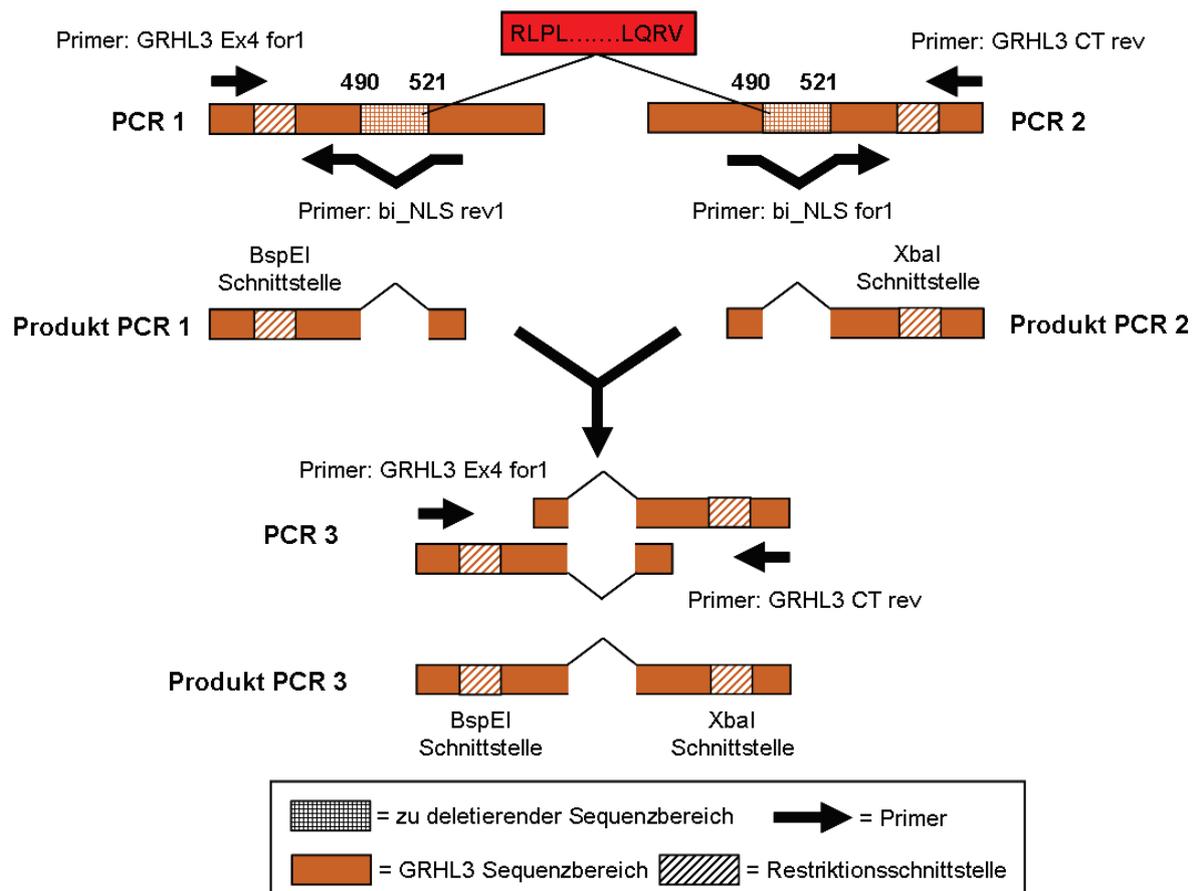


Abbildung 3.12 Schematische Darstellung einer Overlap-extension PCR (OEP) zur Klonierung der Deletionsmutante pCMV-myc-GRHL3-1- Δ bi_NLS-V5-neo.

3.8.3 Lokalisationsanalysen von putativen NLS Deletionsmutanten von GRHL3 in HEK 293-Zellen

In Immunfluoreszenzmikroskopischen Analysen wurden die, putativ NLS-defizienten, GRHL3-Deletionsmutanten auf ihre Lokalisation hin untersucht. Hierfür wurden HEK 293-Zellen auf Deckgläschen ausgebracht und mit den zu untersuchenden GRHL3-Deletionsmutanten transfiziert. Als Positiv-Kontrolle dienten HEK 293-Zellen die mit myc-GRHL3 Plasmiden ohne Deletion transfiziert wurden, als Negativ-Kontrolle dienten mit dem Leervektor pCMV-V5-neo transfizierte Zellen. Zur Visualisierung des Zellkerns wurden die

Zellen mit DAPI-Lösung (blau) gefärbt und zur Darstellung des Zytoplasmas, wurde das Zytoskelett der Zelle, mit Phalloidin Alexa Fluor[®] 568 (rot) gefärbt. Die Markierung der GRHL3 Proteine erfolgte über das myc-Epitop-Tag mit Hilfe eines gegen das Tag gerichteten Antikörper und einem gegen den Erstantikörper gerichteten Alexa Fluor[®] 488 Anti-Maus-Antikörper (grün). In Abbildung 3.13 sind repräsentativ Immunfluoreszenzmikroskopische Aufnahmen von pCMV-myc-GRHL3-3-Deletionsmutanten dargestellt. Die beiden Isoformen verhielten sich bezüglich ihrer Lokalisation, sowohl in den mutierten Varianten als auch den wildtypischen stets gleich. Daher wurde im Folgenden der Einfluss der Deletionen auf die Lokalisation von GRHL3 anhand der GRHL3-3 Deletionsmutanten besprochen.

Die als Negativ-Kontrolle verwendeten pCMV-V5-neo (A) transfizierten Zellen zeigten, wie zu erwarten, keine spezifische Grün-Färbung und belegen damit, dass der Antikörper gegen das myc-Epitop-Tag nicht unspezifisch in HEK293-Zellen bindet. Es ist nur eine schwache grüne Hintergrundfluoreszenz zu erkennen (A). Die als Positiv-Kontrolle benutzten mit dem wildtypischen Vektor pCMV-myc-GRHL3-3-V5-neo (B) transfizierten HEK 293-Zellen zeigen wie zu erwarten eine starke Grün-Färbung im Kern (B). Dies zeigt eindeutig dass der Transkriptionsfaktor GRHL3-3 nach Überexpression hauptsächlich im Kern lokalisiert ist.

Die Aufnahmen für die Mutanten Δ KR (C), Δ CT (D), Δ RKM (E), Δ A (G) und Δ B (H) zeigen genau wie wildtypisches GRHL3-3 eine Lokalisation ausschließlich im Nukleus. Dagegen zeigen die Deletionsmutanten Δ bi_NLS (F) und Δ C (I) ein starkes grünes Fluoreszenzsignal im gesamten Zytoplasma. Zusätzlich dazu ist auch eine Grün-Färbung des Nukleus zu beobachten, wobei nicht genau unterschieden werden kann ob diese Grünfärbung auf Zytoplasma vor dem Nukleus beruht oder es sich um eine direkte Färbung des Nukleus handelt. Zusammenfassend lässt sich sagen, dass die Deletionsmutanten pCMV-myc-GRHL3-3- Δ bi_NLS-V5-neo und pCMV-myc-GRHL3-3- Δ C-V5-neo im Zytoplasma der Zelle zu finden sind, was auf einen gestörten Transport des Proteins vom Zytoplasma in den Nukleus hinweist. Aufgrund der Tatsache dass sich GRHL3-3- Δ bi_NLS- und GRHL3-3- Δ C-Protein eventuell auch im Nukleus befindet ist es wahrscheinlich, dass die deletierten Aminosäureabfolgen zwar ein NLS beinhalten, es aber falls die nukleäre Lokalisation bestätigt wird wahrscheinlich noch andere Import-Mechanismen oder weitere NLS gibt. Alle anderen überprüften putativen NLS sind nicht am nukleo-zytoplasmatischen Transport beteiligt.

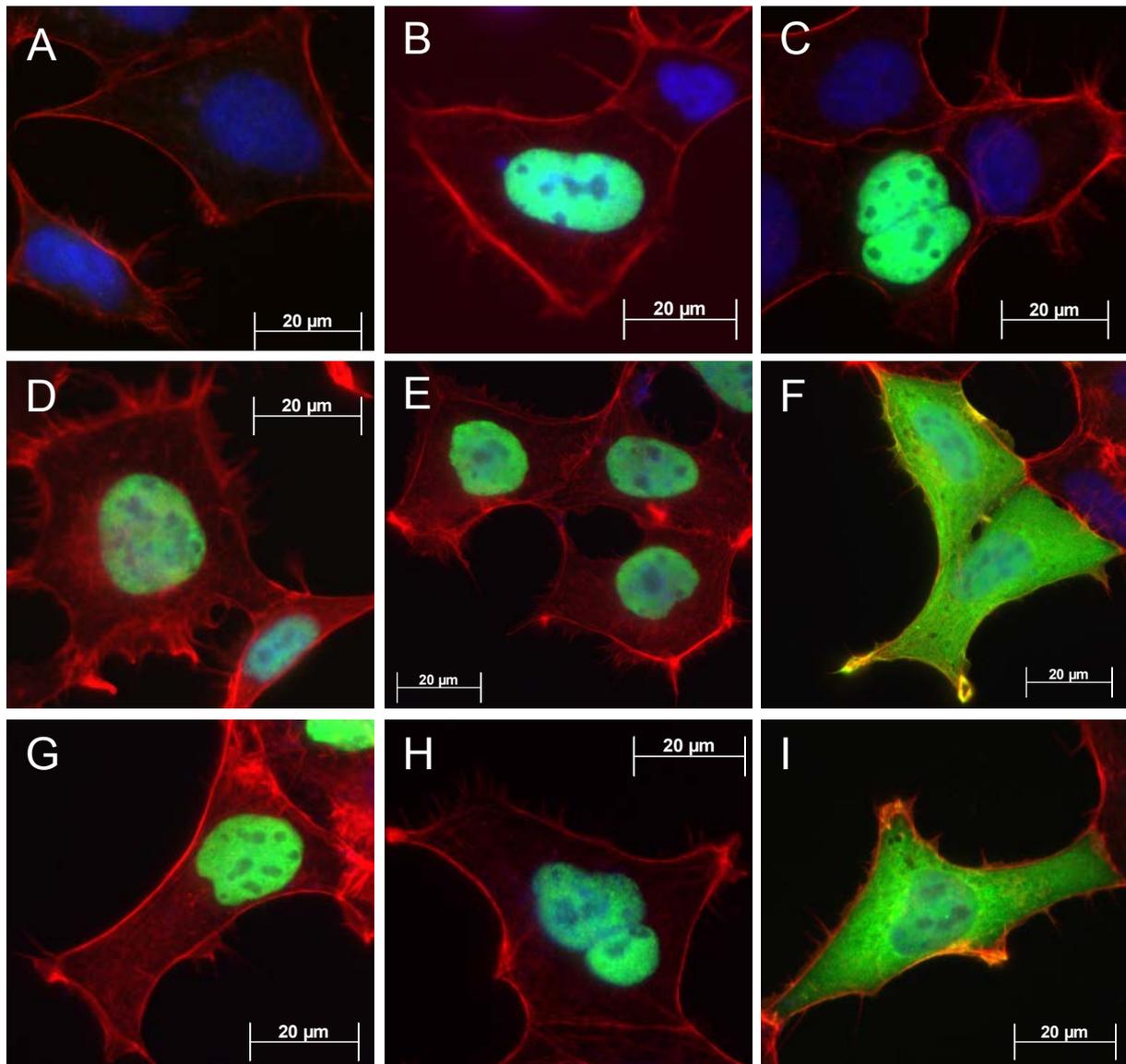


Abbildung 3.13 Immunfluoreszenzmikroskopische Aufnahmen von GRHL3-3 und entsprechenden putativen NLS-Deletionsmutanten in HEK293-Zellen. Darstellung von myc-GRHL3-3 Protein (grün), dem Aktin-Zytoskelett (rot) und dem Nukleus (blau). Darstellung von HEK-293-Zellen transfiziert mit pCMV-V5-neo (A), pCMV-GRHL3-3-V5-neo (B) oder den Deletionsmutanten Δ KR (C), Δ CT (D), Δ RKM (E), Δ bi-NLS (F), Δ A (G), Δ B (H) und Δ C (I).

4 Diskussion

In der hier vorliegenden Arbeit wurden zum ersten Mal die zellulären Funktionen der Isoformen 1 und 3 des Transkriptionsfaktors GRHL3 untersucht. Dabei wurde die Expression in HUVEC und der Einfluss auf die Migration und Apoptose von Endothelzellen analysiert. Als weiteres wurden in einem Microarray Zielgene der beiden Isoformen identifiziert und deren Regulation durch GRHL3 anschließend mittels Westernblot validiert. *In vivo* Experimente im Zebrafisch *Danio rerio* sollten erste Erkenntnisse darüber geben, ob die beiden Isoformen auch unterschiedliche Effekte in einem Ganztier-Vertebraten-Modell hervorrufen. Im abschließenden Teil dieser Arbeit versuchte ich ein Nukleäres Lokalisationssignal in der GRHL3-Sequenz zu identifizieren.

4.1 Expression von GRHL3-1 und GRHL3-3

Es wurde von der Arbeitsgruppe um Ting et al. beschrieben, dass die beiden Isoformen GRHL3-1 und GRHL3-3 teilweise, aber nicht in allen Geweben, koexprimiert werden. So wurde nachgewiesen, dass Transkripte der beiden Transkriptionsfaktoren in den Geweben: Gehirn, Pankreas und Hoden exprimiert werden, wogegen in den Geweben Plazenta, Prostata, Darm und Nieren nur die Isoform GRHL3-1 detektiert wurde (Ting, et al., 2003).

In den ersten Untersuchungen der hier vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, dass die beiden, durch alternatives Spleißen entstandenen GRHL3-Isoformen, GRHL3-1 und GRHL3-3, in primären humanen Endothelzellen exprimiert werden (vgl. Kap. 3.1) und es sich nicht, wie bei anderen Proteinen, wie z.B. Interleukin-6 (IL-6) (Annibalini, et al., 2012) und neuron-derived orphan receptor 1 (NOR1) (Xiang, et al., 2011), um eine Gewebe-spezifische Expression der unterschiedlichen Spleißvarianten handelt.

Es bleibt zu untersuchen, unter welchen Bedingungen GRHL3-1 bzw. GRHL3-3 verstärkt exprimiert wird und wie diese Expression reguliert wird. So wäre aufgrund der positiven Effekte von GRHL3-1 eine verstärkte Expression unter physiologischen Bedingungen zu erwarten, wohingegen die durch GRHL3-3 hervorgerufenen Effekte eher pathophysiologischen Mechanismen zuzuordnen wären.

4.2 Einfluss von GRHL3-1 und GRHL3-3 auf die Migration und Apoptose von Endothelzellen

Es konnte in den Experimenten dieser Arbeit gezeigt werden, dass die Überexpression von GRHL3-1 zu einer Steigerung der Migration, bzw. die Überexpression von GRHL3-3 im Gegensatz dazu, zu einer Verringerung der Migration von HUVEC führt (vgl. Kap. 3.2). Der promigratorische Effekt nach GRHL3-1 Überexpression ist zu vergleichen mit dem erzielten Effekt nach GRHL3-2 Überexpression (Guardiola-Serrano, et al., 2008, Lukosz, Mlynek et al., 2011), welcher wiederum mit der Wirkung des proangiogenen und promigratorischen Stimulus von VEGF vergleichbar war. Dieser Wachstumsfaktor ist einer der stärksten bekannten Aktivatoren von Angiogenese unter physiologischen, als auch pathophysiologischen Bedingungen (Ferrara, 2001). Die promigratorische Wirkung von VEGF auf Endothelzellen wird über die Rekrutierung von HSP90 (Veikkola, et al., 2000) oder eine, über den PI3K/Akt-Signalweg vermittelte, Phosphorylierung der eNOS ausgelöst (Papapetropoulos, et al., 1999). Diese Akt vermittelte Phosphorylierung der eNOS an Serin-1179 wird, wie auch schon für GRHL3-2 beschrieben (Lukosz, Mlynek et al., 2011), ebenfalls durch die Überexpression von GRHL3-1 verstärkt, jedoch nicht durch GRHL3-3 (vgl. Kap. 3.4). Untersuchungen an GRHL3-2 zeigten, dass die promigratorische Wirkung und die verstärkte Phosphorylierung der eNOS durch den Transkriptionsfaktor nicht auf einer Regulation von oder durch VEGF beruht (Lukosz, Mlynek et al., 2011). Aufgrund zahlreicher funktioneller Parallelen und einem Unterschied von nur 11 Aminosäuren zwischen GRHL3-1 und GRHL3-2 ist zu erwarten, dass dies auch für GRHL3-1 nicht der Fall ist. Die promigratorische Wirkung von GRHL3 Transkriptionsfaktoren ist mehrfach in der Literatur beschrieben worden. So wurde in GRHL3 knockout-Mäusen, in denen aufgrund des fehlenden Exons 1B nur das GRHL3-2 Homolog existiert, eine *spina bifida* festgestellt (Ting, et al., 2003). Hierbei handelt es sich um eine Neuralrohrfehlbildung die während der primären Neurulation auftritt. Sie resultiert in einem „offenen Rücken“ und beruht unter anderem auf epidermalen Migrationsdefekten (Hislop, et al., 2008). Des Weiteren wurde gezeigt, dass ein Knockdown von GRHL3 in HaCAT-Zellen zu einer stark verringerten Migration der humanen Keratinozyten führte, welche nicht auf eine verringerte Proliferation zurückzuführen war (Caddy, et al., 2010). Es ist nicht bekannt, ob in den verwendeten humanen Keratinozyten alle drei GRHL3-Isoformen exprimiert werden. Ein Knockdown der Isoformen GRHL3-1 und GRHL3-2 würde diesen Phänotyp jedoch erklären.

Dies zeigt die hohe Konservierung von promigratorischen Effekten, ausgelöst durch GRHL3-Isoformen in unterschiedlichen Zelltypen. Hierfür werden, je nach Zelltyp, unterschiedliche Signalwege aktiviert. So beeinflusst GRHL3 die Migration von Keratinozyten nicht über die Endothel-spezifische eNOS, sondern über den *planar cell polarity* Signalweg und reguliert

dafür das Zielgen *RhoGEF19*. Dieses kodiert für einen Aktivator der GTPase RhoA, welche wichtige Funktionen in der Organisation des Aktin-Zytoskeletts übernimmt und dadurch die Migration der Keratinozyten reguliert (Caddy, et al., 2010). In Endothelzellen wird die Migration über eine Phosphorylierung von Akt und eNOS, mehrfach beschriebene Auslöser von promigratorischen Effekten, und eine damit einhergehende Verstärkung der NO-Synthese reguliert (Ma und Han, 2005). Es konnte jedoch auch nachgewiesen werden, dass eine Aktivierung von RhoA durch VEGF einen positiven Effekt auf die Migration von Endothelzellen hat (van Nieuw Amerongen, et al., 2003). In den in dieser Arbeit beschriebenen Microarray Analysen (vgl. Kap. 3.6.1) wurden ebenfalls regulierte Transkripte gefunden die mit Rho oder RhoA interagieren. Diese wurden jedoch noch nicht weiter auf einen promigratorischen Einfluss hin untersucht, könnten aber parallel zum PI3K/Akt Signalweg die Migration von Endothelzellen beeinflussen.

Neben den unterschiedlichen Funktionen der beiden Isoformen bei der Migration von Endothelzellen zeigen diese auch gegensätzliche Effekte in der Protektion vor Apoptose. So zeigen GRHL3-1 überexprimierende HUVEC eine verringerte Apoptoserate im Vergleich zu Leervektor transfizierten Zellen. Dahingegen weisen GRHL3-3 überexprimierende Endothelzellen eine tendenzielle, aber nicht signifikante, Steigerung der Apoptose auf (vgl. Kap. 3.3). Wie bereits für GRHL3-2 beschrieben (Lukosz, Mlynek et al., 2011), zeigt auch die Überexpression von GRHL3-1 einen antiapoptotischen Effekt in Endothelzellen. Es wurde in Experimenten mit GRHL3-2 überexprimierenden HUVEC gezeigt, dass die Schutzfunktion vor Apoptose durch die Inkubation mit einem eNOS-Inhibitor (L-NMMA) komplett aufgehoben wird (Lukosz, Mlynek et al., 2011). Die Aktivierung der eNOS durch eine verstärkte Phosphorylierung der Proteine Akt und eNOS über GRHL3-1, bzw. die Nichtaktivierung der eNOS durch GRHL3-3, aufgrund einer ausbleibenden Phosphorylierung von Akt oder einer verringerten Phosphorylierung der eNOS, führen zu einer erhöhten (GRHL3-1) bzw. erniedrigten (GRHL3-3) Synthese von NO. Diese vermehrte bzw. verminderte NO-Synthese ist wahrscheinlich, wie schon für GRHL3-2 beschrieben, der Auslöser der antiapoptotischen (GRHL3-1) bzw. tendenziell proapoptotischen (GRHL3-3) Wirkung der einzelnen Isoformen in primären humanen Endothelzellen. Dadurch, dass NO hochreaktiv und relativ kurzlebig ist, wird es häufig in Form von S-Nitrosierungen nachgewiesen. Von diesen konnte in zahlreichen Versuchen gezeigt werden, dass sie Proteinfunktionen modifizieren können.

So wird eventuell die NO-vermittelte antiapoptotische Funktion über die Inhibition der Caspase 3, mittels S-Nitrosierung des im aktiven Zentrum der Protease liegenden Cysteins-163, vermittelt (Dimmeler, et al., 1997, Haendeler, et al., 1997). Weitere NO vermittelte antiapoptotische Funktionen, die als Auslöser der antiapoptotischen Wirkung von GRHL3-1 in Frage kommen, sind die stabilisierend wirkende S-Nitrosierung des antiapoptotischen Proteins Bcl-2 (Azad, et al., 2006) oder die Stabilisierung von Bcl-2 mittels Phosphorylierung

durch ERK1/2, welche über eine NO bedingte Destabilisierung von MKP-3 erreicht wird (Rossig, et al., 2000).

Die gegensätzlichen Effekte von GRHL3-1 und GRHL3-3 auf die Apoptose und Migration von HUVEC sind nicht ungewöhnlich. Andere Transkriptionsfaktoren die aufgrund von alternativem Spleißen unterschiedliche Isoformen aufweisen, zeigen ähnlich divergente Funktionen. So zeigen verschiedene Isoformen des Transkriptionsfaktors TCF7L2 gegensätzliche Effekte bzgl. Überleben und Funktion von Beta-Zellen im Pankreas (Le Bacquer, et al., 2011) oder Isoformen des Transkriptionsfaktors Oct-2 induzieren bzw. reprimieren neuronale Differenzierungsprozesse (Theodorou, et al., 2009). Ein weiteres Beispiel ist im vaskulären System zu finden. Der Helix-Loop-Helix (HLH) Transkriptionsfaktor Inhibitor-of-Differentiation (Id3) induziert die Proliferation von glatten Muskelzellen über die Inhibition des Zellzyklus-Inhibitors p21^{CIP1}. Ein alternativ gespleißtes Transkript kodiert für die C-terminal veränderte Isoform Id3a. Diese wird nicht in der gesunden Karotis von Ratten exprimiert, sondern besonders stark nach Verletzung dieser. Im Gegensatz zu Id3 reprimiert Id3a die Proliferation, ist nicht im Stande p21^{CIP1} zu inhibieren und stimuliert die Apoptose der glatten Muskelzellen (Forrest, et al., 2004, Matsumura, et al., 2001).

4.3 Transkriptionelle Aktivität von GRHL3-1 und GRHL3-3

Es wurde von Ting et al. im Jahr 2003 beschrieben, dass die GRHL3-Isoform GRHL3-3 keine funktionsfähige Aktivierungsdomäne enthält. Erste Indizien dafür sahen Ting et al. in dem Fehlen eines N-terminalen Bereichs der Isoform, welcher in den anderen Isoformen und auch den verwandten Transkriptionsfaktoren GRHL1 und GRHL2 vorhanden ist und als Aktivierungsdomäne beschrieben wurde.

Zudem führten Ting et al. ein Experiment zur transkriptionellen Aktivität aller drei GRHL3-Isoformen durch. Hierbei verwendeten sie Fusionsproteine, die nur aus dem isolierten N-Terminus der Isoformen gekoppelt mit einer GAL4-DNA-Binde-Domäne bestanden. Diese wurden zusammen mit einem Reportergenkonstrukt, bestehend aus GAL4 DNA-Bindestellen, gefolgt von einem Gen für die Chloramphenicol Acetyltransferase (CAT), in HEK293T-Zellen kotransfiziert. Anhand der CAT Aktivität wurden Rückschlüsse auf die Fähigkeit zur transkriptionellen Aktivierung von Zielgenen durch die einzelnen Isoformen getroffen (Ting, et al., 2003). Aufgrund der fehlenden transkriptionellen Aktivität des N-Terminus der Isoform GRHL3-3, im Vergleich zu den beiden anderen Isoformen, vermuteten sie eine Funktion als Repressor, wie bei Isoformen des Transkriptionsfaktors Egr3 beschrieben (O'Donovan und Baraban, 1999), oder über eine Heterodimerisierung mit GRHL3-1, eine dominant-negative Funktion, wie sie in ähnlicher Weise bereits für *grh*/NTF-1 beschrieben wurde (Attardi, et al., 1993).

In den von mir durchgeführten Experimenten zur Bestimmung der transkriptionellen Aktivität der GRHL3-Isoformen wurden im Vergleich zu Ting et al. Vollängenproteine von GRHL3-1 und GRHL3-3, an Stelle von isolierten N-terminalen Domänen, untersucht. Dadurch wurden alle Bereiche der Transkriptionsfaktoren auf eine potentielle Fähigkeit zur transkriptionellen Aktivierung untersucht und auch die kooperative Funktion von in der Sequenz voneinander entfernten Domänen oder die Interaktion mit anderen Proteinen nicht ausgeschlossen. Zudem wurden keine „two-hybrid“ Systeme eingesetzt, welche eine heterologe DNA-Binde-Domäne des Hefeproteins GAL4 nutzen, sondern ein Reportergenkonstrukt mit einem GRHL3-responsiven-Element (GRHL3-RE), welches bereits mehrfach erfolgreich zur bioinformatischen Identifikation von GRHL3-Zielgenen benutzt wurde (Caddy, et al., 2010). Auf diesem Wege konnte ich einer potentiellen sterischen Maskierung von, für die transkriptionelle Aktivierung, wichtigen Domänen durch die heterologe GAL4 DNA-Binde-Domäne aus dem Wege gehen und einem realistischen Szenario möglichst nahekommen. Die in Kapitel 3.6.2 aufgeführten Ergebnisse zeigen, dass sowohl GRHL3-1 als auch GRHL3-3 die Fähigkeit besitzen Promotoren mit GRHL3-Bindestellen zu binden und nachgeschaltete Gene transkriptionell zu aktivieren. Woraus sich schlussfolgern lässt, dass die beiden Transkriptionsfaktoren auch im Stande wären auf zellulärer Ebene Zielgene transkriptionell zu aktivieren.

Im Vergleich zu GRHL3-1 zeigt GRHL3-3 sogar eine sehr hohe transkriptionelle Aktivität, was darin begründet sein könnte, dass die Regulation des alternativen Spleißens einen „molekularen Schalter“ darstellt, der es ermöglicht kurzfristig, über die verstärkte Expression von GRHL3-3 Transkripten, einen Einfluss auf die Apoptose von Endothelzellen zu nehmen. Die hohe transkriptionelle Aktivität der Isoform GRHL3-3 könnte darauf beruhen, dass nach dem Auslösen dieses „molekularen Schalters“ ein sehr schneller und drastischer Effekt, als Antwort auf zelluläre Veränderungen, ausgelöst werden soll. Die von mir erzielten Ergebnisse zur transkriptionellen Aktivität von GRHL3-3 stehen im Kontrast zu den von Ting et al. beschriebenen. Aufgrund der Analyse der gesamten Proteine und der Nutzung eines GRHL3-RE ist es jedoch als sicher anzusehen, dass GRHL3-3 eine Aktivierungsdomäne zur Aktivierung der Transkription von Zielgenen besitzt und diese sich nicht in den von Ting et al. untersuchten 30 N-terminalen Aminosäuren befindet.

Daher sind die funktionellen Unterschiede zwischen GRHL3-1 und GRHL3-3 nicht darauf zurückzuführen, dass GRHL3-3 als Repressor oder als dominant-negativ gegenüber GRHL3-1 wirkt. Ebenso kommen weitere häufig bei gegensätzlicher Funktion von Spleißvarianten auftretende Phänomene, wie der Verlust eines Teils des nukleären Lokalisationssignals (NLS) in einer Spleißvariante, zum Beispiel bei dem Tumorsuppressor ING4 (Unoki, et al., 2006) oder ein Fehlen der DNA-Binde-Domäne, z.B. in einer Spleißvariante des Transkriptionsfaktors KLF-6 (DiFeo, et al., 2009), nicht in Frage, da beide

Isoformen im Stande sind ein Reportergenkonstrukt mit GRHL3-Bindestellen zu aktivieren und auch die Lokalisation im Kern sowohl in dieser Arbeit (vgl. Kap 3.8.3) und schon zuvor (Guardiola-Serrano, et al., 2008) nachgewiesen wurde.

Die funktionellen Unterschiede von GRHL3-1 und GRHL3-3 und die dadurch auftretenden Effekte müssen ihren Ursprung in der Aktivierung unterschiedlicher Zielgene haben. Da beide Transkriptionsfaktoren aber im Stande sind dasselbe GRHL3-RE zu binden, sollte diese unterschiedliche Aktivierung von Zielgenen auf einer Interaktion mit unterschiedlichen Transkriptionsfaktoren und Mediatoren beruhen. So könnten die beiden Transkriptionsfaktoren, aufgrund ihrer genetischen Unterschiede, in Abhängigkeit des jeweiligen Promotors, mit verschiedenen Transkriptionsfaktoren heterodimerisieren und dadurch spezifische Zielgene aktivieren.

Ein zukünftiges Experiment dieses Forschungsprojektes könnte auf die Untersuchung spezifischer Domänen oder Aminosäuren, die für die Heterodimerisierung der GRHL3-Isoformen und somit für deren transkriptionelle Aktivierung verantwortlich sind, absehen. Dies könnte ermöglichen Proteine zu identifizieren, die spezifisch mit diesen Domänen interagieren. Zudem könnte dies auch einen Erklärungsansatz bieten für die stärkere transkriptionelle Aktivität von GRHL3-3.

4.4 Identifikation und Verifikation von GRHL3-1 und GRHL3-3 Zielgenen

Aufgrunddessen, dass beide GRHL3-Isoformen eine transkriptionelle Aktivität aufweisen, wurde mit GRHL3-1 bzw. GRHL3-3 überexprimierenden HUVEC ein Microarray durchgeführt, um Isoform-spezifisch regulierte Transkripte zu identifizieren. Hierbei wurden die Microarray Datensätze der beiden Isoformen mit denen von Leervektor transfizierten Proben verglichen. Dabei wurden 339 spezifisch von GRHL3-1 regulierte Transkripte und 233 spezifisch von GRHL3-3 regulierte Transkripte identifiziert (vgl. Kap. 3.7.1). Es kamen für die weitere Analyse von potentiellen Zielgenen nur positiv regulierte Transkripte in Frage. Da es sich bei der negativen Regulation von Zielgenen, abgesehen von repressiven Transkriptionsfaktoren, meist um einen sekundären Effekt z.B. über die Aufregulation eines Repressors handelt. Bei positiv regulierten Transkripten ist dies auch nicht auszuschließen, jedoch ist die Wahrscheinlichkeit für eine direkte Aktivierung auf transkriptioneller Ebene erhöht. Aus dieser Liste positiv regulierter Transkripte wurden, aufgrund der vorherigen funktionellen Analysen, solche ausgewählt, die der Literatur nach in die Prozesse Migration und/oder Apoptose involviert sind.

So wurden von den durch GRHL3-1 regulierten Genen *AKT2* und *MX11* ausgewählt. Das Gen *AKT2* kodiert für die Proteinkinase B beta, auch als Akt2 bekannt. Diese ist nah mit den anderen Akt-Isoformen, Akt1 und Akt3 verwandt. Es ist bekannt, dass Akt2 unter

hypoxischen Bedingungen die Phosphatase PTEN (*Phosphatase and Tensin homolog*) über die Micro-RNA-21 negativ reguliert (Polytarchou, et al., 2011). PTEN selbst ist wiederum ein negativer Regulator des PI3K/Akt Signalweges (Stambolic, et al., 1998). Demnach führt eine Inaktivierung von PTEN über Akt2 zu einer verstärkten Aktivierung aller Akt-Isoformen und damit zu einer verstärkten Angiogenese und einer verringerten Apoptose (Manning und Cantley, 2007). In Westernblots konnte die Regulation von Akt2 durch GRHL3-1 nach Überexpression validiert werden. Es konnte eine 1,55-fach erhöhte Menge Akt2 Protein nachgewiesen werden (vgl. Kap. 3.7.2). Damit konnte ich sowohl auf transkriptioneller Ebene, als auch auf Proteinebene eine erhöhte Akt2 Expression nachweisen. Diese könnte für die erhöhte Migration und die verringerte Apoptose in primären Endothelzellen verantwortlich sein. Zudem ist dadurch die erhöhte Phosphorylierung von Akt und eNOS zu erklären.

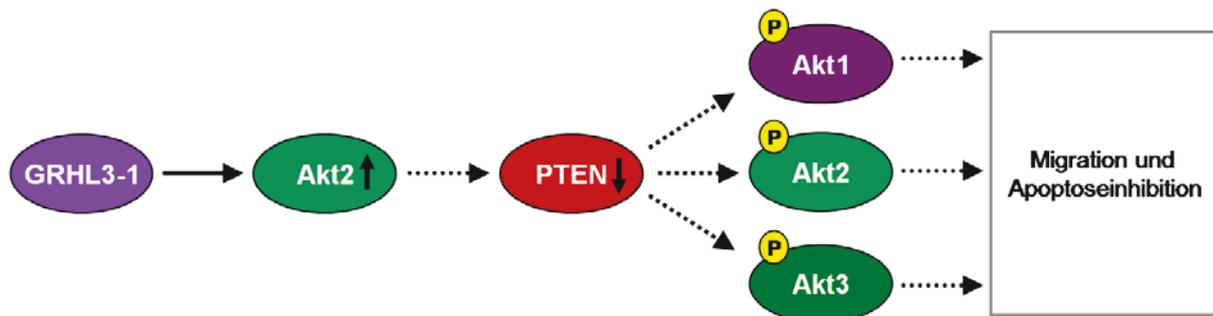


Abbildung 4.1 Modell zur Regulation der Prozesse Migration und Apoptose in Endothelzellen durch GRHL3-1. Hypothetisches Modell basierend auf der in der Microarray-Analyse und der Validierung mittels Westernblot nachgewiesenen Aufregulation von Akt2 (vgl. Kap. 3.6.2). Es ist beschrieben, dass Akt2 über die Micro-RNA-21 die Phosphatase PTEN runterreguliert (Polytarchou, et al., 2011), welche wiederum über Dephosphorylierung den PI3K/Akt Signalweg hemmt (Stambolic, et al., 1998). Daher kann eine reduzierte PTEN Expression zu einer indirekten Aktivierung aller Akt-Isoformen führen, von denen nachgewiesen wurde, dass sie die Migration und Apoptose positiv regulieren (Manning und Cantley, 2007). (gestrichelte Pfeile stellen eine indirekte, durchgezogene Pfeile eine direkte Regulation dar; P = Phosphorylierung)

Das zweite von mir untersuchte, von GRHL3-1 regulierte Gen war *MXI1*, welches für das Protein Max interactor 1 kodiert. Es konnte gezeigt werden, dass eine GRHL3-1 Überexpression zu einer 2,18-fach erhöhten Mxi1-Proteinmenge führt (vgl. Kap. 3.7.2). Dieses Protein interagiert, wie der Name schon zeigt, mit Proteinen der Max-Familie. Mxi1 bildet Heterodimere mit Max bei der Bindung an E-Box DNA Sequenzen. Hierbei konkurriert Mxi1 mit dem Protein c-Myc um die Bindung an Max. Daher wird Mxi1 auch als c-Myc-Antagonist beschrieben. Es ist nachgewiesen, dass c-Myc Apoptose in verschiedenen Zelltypen induziert, so z.B. in Endothelzellen (Lopez-Farre, et al., 1997) oder glatten Muskelzellen (Bennett, et al., 1994). Daher wäre es möglich, dass GRHL3-1 seine vor Apoptose schützende Funktion über die Aufregulation von Mxi1 und damit einhergehende Inhibition von c-Myc in Endothelzellen vermittelt. Mxi1 besitzt eine Sin3 Interaktions Domäne (SID) über die Sin3 an Mxi1 bindet. Sin3 wiederum fungiert als Adapter-Protein für Histon-

Deacetylasen und andere Co-Repressoren, welche ein Gen-Silencing und eine transkriptionelle Inaktivierung hervorrufen (Dugast-Darzacq, et al., 2004), von der eventuell Gene betroffen sind, die für proapoptotische Proteine kodieren.

Es konnte für die beiden von GRHL3-3 regulierten Transkripte *ATF3* und *TPTE*, nachdem diese im Micorarray identifiziert wurden, mangels funktionierender Antikörper, keine Validierung auf Proteinebene durchgeführt werden. Ungeachtet dessen sind die beiden regulierten Gene potentielle Kandidaten, um die Effekte einer GRHL3-3 Überexpression in primären Endothelzellen zu erklären. Das Gen *ATF3* kodiert für das Protein activating transcription factor 3 (Atf3). Hierbei handelt es sich um einen p53 nachgeschalteten Transkriptionsfaktor, der als Effektor des p53 vermittelten Zelltods fungiert (Zhang, et al., 2002). Atf3 verhindert zudem durch eine Bindung an p53 dessen Ubiquitinierung, so dass der proapoptotische Effekt von p53 aufrechterhalten wird und ist darüber im Stande p53 zu regulieren (Yan, et al., 2005). Es wurde außerdem beschrieben, dass Atf3 40% aller bekannten p53 Zielgene bindet und die Apoptose über die Regulation proapoptotischer Gene aktiviert (Tanaka, et al., 2011). Somit besteht eine Erklärung der leicht erhöhten Apoptose von Endothelzellen nach GRHL3-3 Überexpression in der Aktivierung von ATF3 durch GRHL3-3. Das zweite von GRHL3-3 regulierte Gen, welches validiert werden sollte, ist *TPTE*. *TPTE*, auch bekannt als *PTEN2*, ist ein funktionell uncharakterisiertes Homolog von *PTEN* (Walker, et al., 2001). *PTEN* ist ein Tumor-Supressor und Antagonist der PI3K, welche wiederum die nachgeschaltete Kinase Akt aktiviert. Daher ließe sich über eine verstärkte Expression des Proteins *PTEN* die verringerte Migration und die leichte Erhöhung der Apoptose in primären humanen Endothelzellen nach GRHL3-3 Überexpression erklären.

Im Zusammenhang mit der Aktivierung der GRHL3-1 Zielgene *AKT2* und *MXI1* wäre es interessant zu untersuchen, ob die durch GRHL3-1 vermittelten promigratorischen und antiapoptotischen Effekte in Endothelzellen tatsächlich auf die Proteine Akt2 und Mxi1 zurückzuführen sind. Hierzu würden Knockdown-Experimente mit shRNAs gegen die beiden Proteine Aufschluss geben welche der beobachteten Prozesse von ihnen beeinflusst werden.

4.5 *In vivo* Effekte nach Überexpression von GRHL3-1 und GRHL3-3

In einer Reihe von *ex vivo* Experimenten konnten gegensätzliche Effekte von GRHL3-1 und GRHL3-3 beobachtet werden. Daher sollte in weiteren Experimenten analysiert werden, ob diese gegensätzlichen Effekte sich auch *in vivo zeigen*. Dazu wurden, in einer Kooperation mit der Arbeitsgruppe von Herrn Prof. C. Winkler am „Department for Biological Science“, Versuche im Zebrafisch (*Danio rerio*) von Dr. Martin Graf an der Universität Singapur durchgeführt. Der Zebrafisch vereint, als Modellsystem, zahlreiche Vorteile wie z.B. relativ

geringe Kosten, Handhabbarkeit großer Individuenzahlen, schnelle Reproduktion und Transparenz der Embryonen. Es wurden Überexpressions-Experimente statt Knockdown-Experimente von Dr. Martin Graf im Zebrafisch durchgeführt, weil der Mensch und der Zebrafisch evolutionär weit voneinander entfernt sind und es dadurch schwer ist ein direktes Homolog der einzelnen GRHL3-Isoformen zu identifizieren. Zudem weist der Zebrafisch viele Genduplikationen auf (Lu, et al., 2012) die das Identifizieren und Ausschalten eines spezifischen GRHL3 Homologs zusätzlich erschweren.

Damit sind die in Kooperation durchgeführten Experimente die ersten *in vivo* Experimente, die mit den GRHL3-Isoformen GRHL3-1 und GRHL3-3 jemals durchgeführt wurden. Sie zeigen, dass eine GRHL3-1 Überexpression nur in ca. 4% aller Fälle zu einem schwerwiegenden Defekt in der Entwicklung oder gar dem Tod führen. Wohingegen 41% aller GRHL3-3 überexprimierenden Embryonen sterben oder gravierende Entwicklungsdefekte aufweisen. Die erhaltenen Ergebnisse sind aufgrund fehlender *in vivo* Experimente mit GRHL3-1 und GRHL3-3 nur schwer vergleichbar mit anderen in der Literatur beschriebenen Ergebnissen. Die einzigen anderen *in vivo* Untersuchungen in einem Ganztiermodell fanden in der Maus statt (Ting, et al., 2003). Wobei hier anzumerken ist, dass es sich hierbei um Knockout-Experimente mit GRHL3 handelte und in der Maus, aufgrund des fehlenden Exons 1B, die Isoformen GRHL3-1 und GRHL3-3 nicht existieren und daher ein Vergleich mit dem hier durchgeführten Experiment nicht möglich ist. In Untersuchungen zum Grainyhead Transkriptionsfaktor in *Drosophila* konnte gezeigt werden, dass eine induzierbare Überexpression von wildtypischem, als auch einer N-terminal verkürzten Version, zu gravierenden Entwicklungsdefekten, je nach Entwicklungsstadium, führt (Attardi, et al., 1993). Aber auch hier ist zu erwähnen, dass es auch in *Drosophila* nur ein Homolog zu GRHL3-2 gibt und daher ein Vergleich zu den in dieser Arbeit beschriebenen Experimenten mit GRHL3-1 und GRHL3-3 nicht möglich ist.

Die hauptsächlich nach GRHL3-3 Überexpression beobachteten Phänotypen im Zebrafisch, wie Apoptose in der Kopfreion und verkürzte Körperregionen, sind Indizien für eine gestörte Apoptose. Diese Ergebnisse bedürfen aber einer genaueren Untersuchung.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass genau wie in den von mir durchgeführten *ex vivo* Untersuchungen auch in den *in vivo* Untersuchungen am Zebrafisch, sich „negative“ Effekte nach Überexpression von GRHL3-3 zeigen.

4.6 Identifizierung eines Nukleären Lokalisationssignal (NLS) im Transkriptionsfaktor GRHL3

In den Immunfluoreszenzmikroskopischen Aufnahmen zur Analyse von putativ NLS defizienten GRHL3 Deletionsmutanten konnte gezeigt werden, dass sowohl GRHL3-1 (hier nicht gezeigt) als auch GRHL3-3 Wildtyp nach Überexpression in HEK293-Zellen im Kern lokalisiert sind. Zudem konnte dadurch auch gezeigt werden, dass beide Isoformen im Kern lokalisiert sind und es sich bei der durch alternatives Spleißen entstandenen Isoform GRHL3-3 nicht um eine für den Kernimport defiziente Isoform handelt, wie es bei Spleißvarianten des Tumor Suppressors ING4 gezeigt wurde (Unoki, et al., 2006). Dies wäre aber nach dem bereits zuvor erfolgten Nachweis der Transkriptionsaktivierung durch GRHL3-3 (vgl. Kap. 3.5.2) auch unwahrscheinlich. Es konnte gezeigt werden, dass die Mutanten Δ bi_NLS und Δ C eine zytoplasmatische Lokalisation aufweisen. Bei dem von der Software *NLS-Mapper* gefundenen zweigeteilten (bipartite) NLS in der Sequenz von GRHL3 scheint es sich tatsächlich um ein funktionierendes Kernimport-Signal zu handeln. Dadurch, dass die ebenfalls im Zytoplasma lokalisierte Deletionsmutante Δ C ihre einzige Gemeinsamkeit mit der Δ bi_NLS Deletionsmutante in acht fehlenden Aminosäuren (RLPLKRTC) hat, ist davon auszugehen, dass diese acht Aminosäuren für den Kernimport entscheidend sind. Es ist jedoch nicht auszuschließen, dass es weitere NLS Sequenzen in dem in der Mutante Δ C deletierten Bereich gibt. Von den 143 entfernten Aminosäuren der Δ C Mutante kommen nur 18 Aminosäuren nicht in Frage, da sie bereits durch die Δ RKM Mutante abgedeckt werden und von dieser gezeigt wurde, dass sie keinen Einfluss auf den Kernimport hat. Eine weitere Eingrenzung der für die zytoplasmatische Lokalisation verantwortlichen Aminosäuren aus den durch die Mutanten Δ bi_NLS und Δ C abgedeckten Bereichen, durch die Erstellung neuer Deletionsmutanten, wird zeigen welche Aminosäuren essentiell für den Import in den Nukleus sind.

In den durchgeführten Analysen konnte nicht genau bestimmt werden ob die Mutanten Δ bi_NLS und Δ C rein zytoplasmatisch lokalisiert sind oder diese auch noch im Kern zu finden sind. Dies könnte über die Benutzung eines konfokalen Fluoreszenzmikroskops ermittelt werden, in dem die Ebene in der der Nukleus liegt und die darüber und darunter befindlichen auf die Lokalisation der Mutanten hin untersucht werden. Eine weitere Möglichkeit bestünde in der subzellulären Fraktionierung von mit Δ bi_NLS oder Δ C transfizierten Zellen und der Quantifizierung der beiden Mutanten in den einzelnen Zellkompartimenten mit Hilfe von Immunoblot-Analysen.

Abschließend lässt sich festhalten, dass es zum ersten Mal gelungen ist ein NLS bzw. einen Bereich in dem ein NLS vorhanden ist für GRHL3 zu identifizieren. Dies ermöglicht die Generierung von Deletionsmutanten die zytoplasmatisch lokalisiert sind. Mit diesen wäre es

möglich zu überprüfen ob es GRHL3 Funktionen außerhalb des Kerns gibt. Dafür könnte man die bisher durchgeführten funktionellen Analysen mit den Deletionsmutanten durchführen und überprüfen, ob zuvor beschriebene Auswirkungen nach wie vor bestehen.

In der hier vorliegenden Arbeit wurden zum ersten Mal die GRHL3-Isoformen GRHL3-1 und GRHL3-3 funktionell beschrieben. Die Ergebnisse zeigen, dass beide Isoformen die Prozesse Migration und Apoptose in Endothelzellen beeinflussen, jedoch gegensätzlich. Durch die gewonnenen Resultate zur Untersuchung der transkriptionellen Aktivität dieser Transkriptionsfaktoren und der Microarray-Daten lassen sich Rückschlüsse darauf ziehen, dass die beobachteten gegensätzlichen Effekte auf einer potentiellen Interaktion mit weiteren Proteinen, der Expression unterschiedlicher Zielgene und damit verbundener Signalwege beruhen. Dies muss in weiteren Untersuchungen geklärt werden.

Außer Frage steht, dass die Prozesse Migration und Apoptose von essentieller Bedeutung für die Integrität des Endothels sind. Auch wenn es schwierig ist einen Transkriptionsfaktor als Ziel eines therapeutischen Ansatzes zu definieren, da die Effekte von pleiotroper Natur sind, stellen GRHL3-1 und GRHL3-3 interessante Kandidaten in diesem Hinblick für weiterführende Untersuchungen dar

5 Zusammenfassung

Epidemiologischen Untersuchungen zufolge stellen Kardiovaskuläre Erkrankungen die häufigste Todesursache in westlichen Industrienationen dar. Ihren Ursprung haben diese Erkrankungen oftmals in endothelialer Dysfunktion, welche genau wie die Erkrankungen die sie zur Folge hat, mit dem Alter zunimmt. Ein wichtiges Kennzeichen endothelialer Dysfunktion ist eine verringerte Stickstoffmonoxid (NO) Bioverfügbarkeit, welche einhergeht mit erhöhter Apoptosesensitivität und verringerter Migrationsfähigkeit der Endothelzellen. Vor kurzem haben wir nachgewiesen, dass der Transkriptionsfaktor Grainyhead-like 3 (GRHL3) Einfluss auf die für Endothelzellen essentiellen Funktionen Apoptose und Migration hat. Die Untersuchungen wurden mit dem humanen Homolog des murinen GRHL3 durchgeführt. Hierbei handelt es sich um die zweite (GRHL3-2) von drei im Menschen vorkommenden Isoformen dieses Transkriptionsfaktors. Im Gegensatz zu GRHL3-2, sind die Funktionen der beiden aus einem Primärtranskript durch alternatives Spleißen hervorgehenden Isoformen GRHL3-1 und GRHL3-3 bisher unbekannt. Ziel dieser Arbeit war es ihren Einfluss auf Migration und Apoptose von Endothelzellen und die zugrunde liegenden molekularen Mechanismen zu charakterisieren.

Ich konnte zeigen, dass beide Isoformen in Endothelzellen exprimiert werden und transkriptionsaktivierend wirken, jedoch gegensätzliche Effekte bei der Endothelzellmigration und -apoptose hervorrufen. Während die Überexpression von GRHL3-1 promigratorisch und antiapoptotisch auf Endothelzellen wirkt, führte die GRHL3-3 Überexpression zu keinem Schutz vor Apoptose und wirkte migrationshemmend. Zudem wirkte GRHL3-1 aktivierend auf die eNOS, die wichtigste NO Quelle in Endothelzellen, wohingegen GRHL3-3 gegenteilige Effekte zeigte. Microarray Analysen zeigten, dass die gegenteiligen Effekte auf der Aktivierung unterschiedlicher Zielgene beruhen. Die von GRHL3-1 regulierten, in promigratorische und antiapoptotische Prozesse involvierten Gene *Mxi1* und *Akt2* wurden zudem in Westernblot-Analysen validiert. In Kooperation mit der National University of Singapore durchgeführte Experimente im Zebrafisch (*Danio rerio*) zeigten, dass eine Überexpression von GRHL3-3 im Gegensatz zu GRHL3-1 zu massiven entwicklungsbiologischen Defekten führt und bestätigten damit die zuvor in Endothelzellen nachgewiesenen negativen Effekte dieser Isoform *in vivo*.

Zusammenfassend wurden zum ersten Mal die Isoformen 1 und 3 des Transkriptionsfaktors GRHL3 funktionell charakterisiert und Zielgene dieser beiden Isoformen identifiziert. In Zukunft könnte durch eine gezielte Aufregulation der GRHL3-1 und/oder Herabregulation der GRHL3-3 Expression die Endothelzellintegrität nachhaltig verbessert werden und somit kardiovaskulären Erkrankungen vorgebeugt werden.

Summary

According to epidemiological studies cardiovascular diseases are the leading cause of mortality in western industrialized countries. The origin of cardiovascular diseases is often endothelial dysfunction, which, like the resulting diseases, increases with age. A characteristic attribute of endothelial dysfunction is a reduced bioavailability of nitric oxide (NO), which is accompanied by an increased apoptosis sensitivity and a reduced migratory capacity of endothelial cells (EC). Recently, we have provided evidence that the transcription factor Grainyhead-like 3 (GRHL3) affects EC migration and apoptosis, fundamental processes in EC function. These investigations have been performed with the murine homolog of GRHL3, GRHL3-2, one of three isoforms present in humans. In contrast to GRHL3-2, the functions of the other two isoforms GRHL3-1 and GRHL3-3, which are translation products of an alternatively spliced primary transcript, were previously unknown. The aim of this thesis was to characterize their influence on apoptosis and migration of EC and the underlying molecular mechanisms.

I could show that both isoforms are expressed in EC and are transcriptional activators, but induce opposing effects with respect to apoptosis and migration of primary human EC. While overexpression of GRHL3-1 acts promigratory and antiapoptotic in EC, GRHL3-3 leads to a reduced migratory capacity and does not mediate protection against apoptosis. In addition, GRHL3-1 leads to an activation of eNOS, the most important source of NO in EC, whereas GRHL3-3 had an opposite effect on eNOS activation.

Microarray analyses revealed that the opposing effects are mediated through the activation of a different set of target genes. I have validated the GRHL3-1 regulated genes *Mxi1* and *Akt2*, which are involved in promigratory and antiapoptotic processes, using Westernblot analyses. Experiments in zebrafish (*Danio rerio*) performed in cooperation with the National University of Singapore have shown that overexpression of GRHL3-3, in contrast to GRHL3-1, leads to massive developmental defects. These results corroborate the deleterious effects of GRHL3-3 observed in EC as well *in vivo*.

Taken together, my data provide the first functional characterization of the isoforms 1 and 3 of the transcription factor GRHL3 and identification of target genes for both isoforms. In the future, a specific upregulation of GRHL3-1 and/or downregulation of GRHL3-3 could maintain the integrity of the endothelium and thereby prevent cardiovascular diseases.

6 Literaturverzeichnis

1. Aggarwal, B. B., 2000. Tumour necrosis factors receptor associated signalling molecules and their role in activation of apoptosis, JNK and NF-kappaB. *Ann Rheum Dis* 59 Suppl 1, i6-16.
2. Altschmied, J., and Duschl, J., 1997. Set of optimized luciferase reporter gene plasmids compatible with widely used CAT vectors. *Biotechniques* 23, 436-438.
3. Annibalini, G., Guescini, M., Agostini, D., Matteis, R. D., Sestili, P., Tibollo, P., Mantuano, M., Martinelli, C., and Stocchi, V., 2012. The expression analysis of mouse interleukin-6 splice variants argued against their biological relevance. *BMB Rep* 45, 32-37.
4. Arnold, W. P., Mittal, C. K., Katsuki, S., and Murad, F., 1977. Nitric oxide activates guanylate cyclase and increases guanosine 3':5'-cyclic monophosphate levels in various tissue preparations. *Proc Natl Acad Sci U S A* 74, 3203-3207.
5. Attardi, L. D., Von Seggern, D., and Tjian, R., 1993. Ectopic expression of wild-type or a dominant-negative mutant of transcription factor NTF-1 disrupts normal *Drosophila* development. *Proc Natl Acad Sci U S A* 90, 10563-10567.
6. Azad, N., Vallyathan, V., Wang, L., Tantishaiyakul, V., Stehlik, C., Leonard, S. S., and Rojanasakul, Y., 2006. S-nitrosylation of Bcl-2 inhibits its ubiquitin-proteasomal degradation. A novel antiapoptotic mechanism that suppresses apoptosis. *J Biol Chem* 281, 34124-34134.
7. Bakker, E. N., Pisteia, A., and VanBavel, E., 2008. Transglutaminases in vascular biology: relevance for vascular remodeling and atherosclerosis. *J Vasc Res* 45, 271-278.
8. Bennett, M. R., Evan, G. I., and Newby, A. C., 1994. Deregulated expression of the c-myc oncogene abolishes inhibition of proliferation of rat vascular smooth muscle cells by serum reduction, interferon-gamma, heparin, and cyclic nucleotide analogues and induces apoptosis. *Circ Res* 74, 525-536.
9. Bradford, M. M., 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* 72, 248-254.

10. Bray, S. J., Burke, B., Brown, N. H., and Hirsh, J., 1989. Embryonic expression pattern of a family of *Drosophila* proteins that interact with a central nervous system regulatory element. *Genes Dev* 3, 1130-1145.
11. Bray, S. J., and Kafatos, F. C., 1991. Developmental function of Elf-1: an essential transcription factor during embryogenesis in *Drosophila*. *Genes Dev* 5, 1672-1683.
12. Caddy, J., Wilanowski, T., Darido, C., Dworkin, S., Ting, S. B., Zhao, Q., Rank, G., Auden, A., Srivastava, S., Papenfuss, T. A., Murdoch, J. N., Humbert, P. O., Parekh, V., Boulos, N., Weber, T., Zuo, J., Cunningham, J. M., and Jane, S. M., 2010. Epidermal wound repair is regulated by the planar cell polarity signaling pathway. *Dev Cell* 19, 138-147.
13. Chomczynski, P., and Sacchi, N., 1987. Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Anal Biochem* 162, 156-159.
14. Collins, T., Read, M. A., Neish, A. S., Whitley, M. Z., Thanos, D., and Maniatis, T., 1995. Transcriptional regulation of endothelial cell adhesion molecules: NF-kappa B and cytokine-inducible enhancers. *Faseb J* 9, 899-909.
15. Conti, E., and Kuriyan, J., 2000. Crystallographic analysis of the specific yet versatile recognition of distinct nuclear localization signals by karyopherin alpha. *Structure* 8, 329-338.
16. DiFeo, A., Narla, G., and Martignetti, J. A., 2009. Emerging roles of Kruppel-like factor 6 and Kruppel-like factor 6 splice variant 1 in ovarian cancer progression and treatment. *Mt Sinai J Med* 76, 557-566.
17. Dimmeler, S., Breitschopf, K., Haendeler, J., and Zeiher, A. M., 1999. Dephosphorylation targets Bcl-2 for ubiquitin-dependent degradation: a link between the apoptosome and the proteasome pathway. *J Exp Med* 189, 1815-1822.
18. Dimmeler, S., Fleming, I., Fisslthaler, B., Hermann, C., Busse, R., and Zeiher, A. M., 1999. Activation of nitric oxide synthase in endothelial cells by Akt-dependent phosphorylation. *Nature* 399, 601-605.
19. Dimmeler, S., Haendeler, J., Galle, J., and Zeiher, A. M., 1997. Oxidized low-density lipoprotein induces apoptosis of human endothelial cells by activation of CPP32-like proteases. A mechanistic clue to the 'response to injury' hypothesis. *Circulation* 95, 1760-1763.
20. Dimmeler, S., Haendeler, J., Nehls, M., and Zeiher, A. M., 1997. Suppression of apoptosis by nitric oxide via inhibition of interleukin-1beta-converting enzyme (ICE)-like and cysteine protease protein (CPP)-32-like proteases. *J Exp Med* 185, 601-607.

21. Dimmeler, S., Haendeler, J., Rippmann, V., Nehls, M., and Zeiher, A. M., 1996. Shear stress inhibits apoptosis of human endothelial cells. *FEBS Lett* 399, 71-74.
22. Dimmeler, S., and Zeiher, A. M., 1997. Nitric oxide and apoptosis: another paradigm for the double-edged role of nitric oxide. *Nitric Oxide* 1, 275-281.
23. Dugast-Darzacq, C., Purity, M., Blanck, J. K., Scherl, A., and Schreiber-Agus, N., 2004. Mxi1-SRalpha: a novel Mxi1 isoform with enhanced transcriptional repression potential. *Oncogene* 23, 8887-8899.
24. El Assar, M., Angulo, J., Vallejo, S., Peiro, C., Sanchez-Ferrer, C. F., and Rodriguez-Manas, L., 2012. Mechanisms involved in the aging-induced vascular dysfunction. *Front Physiol* 3, 132.
25. Erwin, P. A., Lin, A. J., Golan, D. E., and Michel, T., 2005. Receptor-regulated dynamic S-nitrosylation of endothelial nitric-oxide synthase in vascular endothelial cells. *J Biol Chem* 280, 19888-19894.
26. Ferrara, N., 2001. Role of vascular endothelial growth factor in regulation of physiological angiogenesis. *Am J Physiol Cell Physiol* 280, C1358-1366.
27. Fisslthaler, B., Dimmeler, S., Hermann, C., Busse, R., and Fleming, I., 2000. Phosphorylation and activation of the endothelial nitric oxide synthase by fluid shear stress. *Acta Physiol Scand* 168, 81-88.
28. Fontana, J., Fulton, D., Chen, Y., Fairchild, T. A., McCabe, T. J., Fujita, N., Tsuruo, T., and Sessa, W. C., 2002. Domain mapping studies reveal that the M domain of hsp90 serves as a molecular scaffold to regulate Akt-dependent phosphorylation of endothelial nitric oxide synthase and NO release. *Circ Res* 90, 866-873.
29. Forrest, S. T., Barringhaus, K. G., Perlegas, D., Hammarskjold, M. L., and McNamara, C. A., 2004. Intron retention generates a novel Id3 isoform that inhibits vascular lesion formation. *J Biol Chem* 279, 32897-32903.
30. Fulton, D., Gratton, J. P., McCabe, T. J., Fontana, J., Fujio, Y., Walsh, K., Franke, T. F., Papapetropoulos, A., and Sessa, W. C., 1999. Regulation of endothelium-derived nitric oxide production by the protein kinase Akt. *Nature* 399, 597-601.
31. Fulton, D., Gratton, J. P., and Sessa, W. C., 2001. Post-translational control of endothelial nitric oxide synthase: why isn't calcium/calmodulin enough? *J Pharmacol Exp Ther* 299, 818-824.
32. Furchgott, R. F., 1987. An historical survey and prospects of research on EDRF. *Nihon Heikatsukin Gakkai Zasshi* 23, 435-440.

33. Furchgott, R. F., and Zawadzki, J. V., 1980. The obligatory role of endothelial cells in the relaxation of arterial smooth muscle by acetylcholine. *Nature* 288, 373-376.
34. Gelinas, D. S., Bernatchez, P. N., Rollin, S., Bazan, N. G., and Sirois, M. G., 2002. Immediate and delayed VEGF-mediated NO synthesis in endothelial cells: role of PI3K, PKC and PLC pathways. *Br J Pharmacol* 137, 1021-1030.
35. Gerber, H. P., McMurtrey, A., Kowalski, J., Yan, M., Keyt, B. A., Dixit, V., and Ferrara, N., 1998. Vascular endothelial growth factor regulates endothelial cell survival through the phosphatidylinositol 3'-kinase/Akt signal transduction pathway. Requirement for Flk-1/KDR activation. *J Biol Chem* 273, 30336-30343.
36. Graham, F. L., Smiley, J., Russell, W. C., and Nairn, R., 1977. Characteristics of a human cell line transformed by DNA from human adenovirus type 5. *J Gen Virol* 36, 59-74.
37. Guardiola-Serrano, F., Haendeler, J., Lukosz, M., Sturm, K., Melchner, H., and Altschmied, J., 2008. Gene trapping identifies a putative tumor suppressor and a new inducer of cell migration. *Biochem Biophys Res Commun* 376, 748-752.
38. Haendeler, J., Weiland, U., Zeiher, A. M., and Dimmeler, S., 1997. Effects of redox-related congeners of NO on apoptosis and caspase-3 activity. *Nitric Oxide* 1, 282-293.
39. Haendeler, J., Zeiher, A. M., and Dimmeler, S., 1999. Nitric oxide and apoptosis. *Vitam Horm* 57, 49-77.
40. Hanahan, D., 1983. Studies on transformation of *Escherichia coli* with plasmids. *J Mol Biol* 166, 557-580.
41. Hayflick, L., 2007. Biological aging is no longer an unsolved problem. *Ann N Y Acad Sci* 1100, 1-13.
42. Hislop, N. R., Caddy, J., Ting, S. B., Auden, A., Vasudevan, S., King, S. L., Lindeman, G. J., Visvader, J. E., Cunningham, J. M., and Jane, S. M., 2008. Grhl3 and Lmo4 play coordinate roles in epidermal migration. *Dev Biol* 321, 263-272.
43. Ho, S. N., Hunt, H. D., Horton, R. M., Pullen, J. K., and Pease, L. R., 1989. Site-directed mutagenesis by overlap extension using the polymerase chain reaction. *Gene* 77, 51-59.
44. Ignarro, L. J., Byrns, R. E., Buga, G. M., Wood, K. S., and Chaudhuri, G., 1988. Pharmacological evidence that endothelium-derived relaxing factor is nitric oxide: use of pyrogallol and superoxide dismutase to study endothelium-dependent and nitric oxide-elicited vascular smooth muscle relaxation. *J Pharmacol Exp Ther* 244, 181-189.

45. Jaffe, E. A., Nachman, R. L., Becker, C. G., and Minick, C. R., 1973. Culture of human endothelial cells derived from umbilical veins. Identification by morphologic and immunologic criteria. *J Clin Invest* 52, 2745-2756.
46. Jeang, K. T., Rawlins, D. R., Rosenfeld, P. J., Shero, J. H., Kelly, T. J., and Hayward, G. S., 1987. Multiple tandemly repeated binding sites for cellular nuclear factor 1 that surround the major immediate-early promoters of simian and human cytomegalovirus. *J Virol* 61, 1559-1570.
47. Koopman, G., Reutelingsperger, C. P., Kuijten, G. A., Keehnen, R. M., Pals, S. T., and van Oers, M. H., 1994. Annexin V for flow cytometric detection of phosphatidylserine expression on B cells undergoing apoptosis. *Blood* 84, 1415-1420.
48. Kosugi, S., Hasebe, M., Tomita, M., and Yanagawa, H., 2009. Systematic identification of cell cycle-dependent yeast nucleocytoplasmic shuttling proteins by prediction of composite motifs. *Proc Natl Acad Sci U S A* 106, 10171-10176.
49. Kou, R., Greif, D., and Michel, T., 2002. Dephosphorylation of endothelial nitric-oxide synthase by vascular endothelial growth factor. Implications for the vascular responses to cyclosporin A. *J Biol Chem* 277, 29669-29673.
50. Laemmli, U. K., 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227, 680-685.
51. Le Bacquer, O., Shu, L., Marchand, M., Neve, B., Paroni, F., Kerr Conte, J., Pattou, F., Froguel, P., and Maedler, K., 2011. TCF7L2 splice variants have distinct effects on beta-cell turnover and function. *Hum Mol Genet* 20, 1906-1915.
52. Li, F., Sonveaux, P., Rabbani, Z. N., Liu, S., Yan, B., Huang, Q., Vujaskovic, Z., Dewhirst, M. W., and Li, C. Y., 2007. Regulation of HIF-1alpha stability through S-nitrosylation. *Mol Cell* 26, 63-74.
53. Lima, B., Lam, G. K., Xie, L., Diesen, D. L., Villamizar, N., Nienaber, J., Messina, E., Bowles, D., Kontos, C. D., Hare, J. M., Stamler, J. S., and Rockman, H. A., 2009. Endogenous S-nitrosothiols protect against myocardial injury. *Proc Natl Acad Sci U S A* 106, 6297-6302.
54. Lopez-Farre, A., Sanchez de Miguel, L., Caramelo, C., Gomez-Macias, J., Garcia, R., Mosquera, J. R., de Frutos, T., Millas, I., Rivas, F., Echezarreta, G., and Casado, S., 1997. Role of nitric oxide in autocrine control of growth and apoptosis of endothelial cells. *Am J Physiol* 272, H760-768.

55. Lu, J., Peatman, E., Tang, H., Lewis, J., and Liu, Z., 2012. Profiling of gene duplication patterns of sequenced teleost genomes: evidence for rapid lineage-specific genome expansion mediated by recent tandem duplications. *BMC Genomics* 13, 246.
56. Lukosz, M., Mlynek, A., Czypiorski, P., Altschmied, J., and Haendeler, J., 2011. The transcription factor Grainyhead like 3 (GRHL3) affects endothelial cell apoptosis and migration in a NO-dependent manner. *Biochem Biophys Res Commun* 412, 648-653.
57. Ma, F. X., and Han, Z. C., 2005. Statins, nitric oxide and neovascularization. *Cardiovasc Drug Rev* 23, 281-292.
58. Malinda, K. M., Sidhu, G. S., Banaudha, K. K., Gaddipati, J. P., Maheshwari, R. K., Goldstein, A. L., and Kleinman, H. K., 1998. Thymosin alpha 1 stimulates endothelial cell migration, angiogenesis, and wound healing. *J Immunol* 160, 1001-1006.
59. Manning, B. D., and Cantley, L. C., 2007. AKT/PKB signaling: navigating downstream. *Cell* 129, 1261-1274.
60. Martinez-Ruiz, A., Villanueva, L., Gonzalez de Orduna, C., Lopez-Ferrer, D., Higuera, M. A., Tarin, C., Rodriguez-Crespo, I., Vazquez, J., and Lamas, S., 2005. S-nitrosylation of Hsp90 promotes the inhibition of its ATPase and endothelial nitric oxide synthase regulatory activities. *Proc Natl Acad Sci U S A* 102, 8525-8530.
61. Matsumura, M. E., Li, F., Berthoux, L., Wei, B., Lobe, D. R., Jeon, C., Hammarskjold, M. L., and McNamara, C. A., 2001. Vascular injury induces posttranscriptional regulation of the Id3 gene: cloning of a novel Id3 isoform expressed during vascular lesion formation in rat and human atherosclerosis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 21, 752-758.
62. McKnight, S. L., and Kingsbury, R., 1982. Transcriptional control signals of a eukaryotic protein-coding gene. *Science* 217, 316-324.
63. Michel, J. B., Feron, O., Sase, K., Prabhakar, P., and Michel, T., 1997. Caveolin versus calmodulin. Counterbalancing allosteric modulators of endothelial nitric oxide synthase. *J Biol Chem* 272, 25907-25912.
64. Michell, B. J., Harris, M. B., Chen, Z. P., Ju, H., Venema, V. J., Blackstone, M. A., Huang, W., Venema, R. C., and Kemp, B. E., 2002. Identification of regulatory sites of phosphorylation of the bovine endothelial nitric-oxide synthase at serine 617 and serine 635. *J Biol Chem* 277, 42344-42351.
65. Michiels, C., 2003. Endothelial cell functions. *J Cell Physiol* 196, 430-443.

66. Moncada, S., Palmer, R. M., and Higgs, E. A., 1989. Biosynthesis of nitric oxide from L-arginine. A pathway for the regulation of cell function and communication. *Biochem Pharmacol* 38, 1709-1715.
67. Mullis, K., Faloona, F., Scharf, S., Saiki, R., Horn, G., and Erlich, H., 1986. Specific enzymatic amplification of DNA in vitro: the polymerase chain reaction. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol* 51 Pt 1, 263-273.
68. Murohara, T., Asahara, T., Silver, M., Bauters, C., Masuda, H., Kalka, C., Kearney, M., Chen, D., Symes, J. F., Fishman, M. C., Huang, P. L., and Isner, J. M., 1998. Nitric oxide synthase modulates angiogenesis in response to tissue ischemia. *J Clin Invest* 101, 2567-2578.
69. O'Donovan, K. J., and Baraban, J. M., 1999. Major Egr3 isoforms are generated via alternate translation start sites and differ in their abilities to activate transcription. *Mol Cell Biol* 19, 4711-4718.
70. Papapetropoulos, A., Rudic, R. D., and Sessa, W. C., 1999. Molecular control of nitric oxide synthases in the cardiovascular system. *Cardiovasc Res* 43, 509-520.
71. Polytarchou, C., Iliopoulos, D., Hatziapostolou, M., Kottakis, F., Maroulakou, I., Struhl, K., and Tsiichlis, P. N., 2011. Akt2 regulates all Akt isoforms and promotes resistance to hypoxia through induction of miR-21 upon oxygen deprivation. *Cancer Res* 71, 4720-4731.
72. Pratt, W. B., and Toft, D. O., 1997. Steroid receptor interactions with heat shock protein and immunophilin chaperones. *Endocr Rev* 18, 306-360.
73. Pritchard, K. A., Jr., Ackerman, A. W., Gross, E. R., Stepp, D. W., Shi, Y., Fontana, J. T., Baker, J. E., and Sessa, W. C., 2001. Heat shock protein 90 mediates the balance of nitric oxide and superoxide anion from endothelial nitric-oxide synthase. *J Biol Chem* 276, 17621-17624.
74. Ravi, K., Brennan, L. A., Levic, S., Ross, P. A., and Black, S. M., 2004. S-nitrosylation of endothelial nitric oxide synthase is associated with monomerization and decreased enzyme activity. *Proc Natl Acad Sci U S A* 101, 2619-2624.
75. Ross, R., 1993. The pathogenesis of atherosclerosis: a perspective for the 1990s. *Nature* 362, 801-809.
76. Rossig, L., Haendeler, J., Hermann, C., Malchow, P., Urbich, C., Zeiher, A. M., and Dimmeler, S., 2000. Nitric oxide down-regulates MKP-3 mRNA levels: involvement in endothelial cell protection from apoptosis. *J Biol Chem* 275, 25502-25507.

77. Rupp, R. A., Snider, L., and Weintraub, H., 1994. Xenopus embryos regulate the nuclear localization of XMyoD. *Genes Dev* 8, 1311-1323.
78. Scheidereit, C., 2006. IkappaB kinase complexes: gateways to NF-kappaB activation and transcription. *Oncogene* 25, 6685-6705.
79. Schmid, I., Uittenbogaart, C. H., and Giorgi, J. V., 1994. Sensitive method for measuring apoptosis and cell surface phenotype in human thymocytes by flow cytometry. *Cytometry* 15, 12-20.
80. Scholnick, S. B., Bray, S. J., Morgan, B. A., McCormick, C. A., and Hirsh, J., 1986. CNS and hypoderm regulatory elements of the *Drosophila melanogaster* dopa decarboxylase gene. *Science* 234, 998-1002.
81. Schule, R., Muller, M., Kaltschmidt, C., and Renkawitz, R., 1988. Many transcription factors interact synergistically with steroid receptors. *Science* 242, 1418-1420.
82. Shaul, P. W., 2002. Regulation of endothelial nitric oxide synthase: location, location, location. *Annu Rev Physiol* 64, 749-774.
83. Shaul, P. W., Smart, E. J., Robinson, L. J., German, Z., Yuhanna, I. S., Ying, Y., Anderson, R. G., and Michel, T., 1996. Acylation targets endothelial nitric-oxide synthase to plasmalemmal caveolae. *J Biol Chem* 271, 6518-6522.
84. Smale, S. T., and Kadonaga, J. T., 2003. The RNA polymerase II core promoter. *Annu Rev Biochem* 72, 449-479.
85. Somanath, P. R., Razorenova, O. V., Chen, J., and Byzova, T. V., 2006. Akt1 in endothelial cell and angiogenesis. *Cell Cycle* 5, 512-518.
86. Stambolic, V., Suzuki, A., de la Pompa, J. L., Brothers, G. M., Mirtsos, C., Sasaki, T., Ruland, J., Penninger, J. M., Siderovski, D. P., and Mak, T. W., 1998. Negative regulation of PKB/Akt-dependent cell survival by the tumor suppressor PTEN. *Cell* 95, 29-39.
87. Stuehr, D. J., Kwon, N. S., Nathan, C. F., Griffith, O. W., Feldman, P. L., and Wiseman, J., 1991. N omega-hydroxy-L-arginine is an intermediate in the biosynthesis of nitric oxide from L-arginine. *J Biol Chem* 266, 6259-6263.
88. Takahashi, S., and Mendelsohn, M. E., 2003. Synergistic activation of endothelial nitric-oxide synthase (eNOS) by HSP90 and Akt: calcium-independent eNOS activation involves formation of an HSP90-Akt-CaM-bound eNOS complex. *J Biol Chem* 278, 30821-30827.
89. Tanaka, Y., Nakamura, A., Morioka, M. S., Inoue, S., Tamamori-Adachi, M., Yamada, K., Taketani, K., Kawauchi, J., Tanaka-Okamoto, M., Miyoshi, J., Tanaka,

- H., and Kitajima, S., 2011. Systems analysis of ATF3 in stress response and cancer reveals opposing effects on pro-apoptotic genes in p53 pathway. *PLoS One* 6, e26848.
90. Theodorou, E., Dalembert, G., Heffelfinger, C., White, E., Weissman, S., Corcoran, L., and Snyder, M., 2009. A high throughput embryonic stem cell screen identifies Oct-2 as a bifunctional regulator of neuronal differentiation. *Genes Dev* 23, 575-588.
91. Ting, S. B., Caddy, J., Hislop, N., Wilanowski, T., Auden, A., Zhao, L. L., Ellis, S., Kaur, P., Uchida, Y., Holleran, W. M., Elias, P. M., Cunningham, J. M., and Jane, S. M., 2005. A homolog of *Drosophila* grainy head is essential for epidermal integrity in mice. *Science* 308, 411-413.
92. Ting, S. B., Wilanowski, T., Auden, A., Hall, M., Voss, A. K., Thomas, T., Parekh, V., Cunningham, J. M., and Jane, S. M., 2003. Inositol- and folate-resistant neural tube defects in mice lacking the epithelial-specific factor Grhl-3. *Nat Med* 9, 1513-1519.
93. Ting, S. B., Wilanowski, T., Cerruti, L., Zhao, L. L., Cunningham, J. M., and Jane, S. M., 2003. The identification and characterization of human Sister-of-Mammalian Grainyhead (SOM) expands the grainyhead-like family of developmental transcription factors. *Biochem J* 370, 953-962.
94. Truant, R., and Cullen, B. R., 1999. The arginine-rich domains present in human immunodeficiency virus type 1 Tat and Rev function as direct importin beta-dependent nuclear localization signals. *Mol Cell Biol* 19, 1210-1217.
95. Tsutsui, M., Shimokawa, H., Otsuji, Y., Ueta, Y., Sasaguri, Y., and Yanagihara, N., 2009. Nitric oxide synthases and cardiovascular diseases: insights from genetically modified mice. *Circ J* 73, 986-993.
96. Unoki, M., Shen, J. C., Zheng, Z. M., and Harris, C. C., 2006. Novel splice variants of ING4 and their possible roles in the regulation of cell growth and motility. *J Biol Chem* 281, 34677-34686.
97. Urbich, C., Dernbach, E., Zeiher, A. M., and Dimmeler, S., 2002. Double-edged role of statins in angiogenesis signaling. *Circ Res* 90, 737-744.
98. Urbich, C., Reissner, A., Chavakis, E., Dernbach, E., Haendeler, J., Fleming, I., Zeiher, A. M., Kaszkin, M., and Dimmeler, S., 2002. Dephosphorylation of endothelial nitric oxide synthase contributes to the anti-angiogenic effects of endostatin. *Faseb J* 16, 706-708.

99. Uv, A. E., Thompson, C. R., and Bray, S. J., 1994. The *Drosophila* tissue-specific factor Grainyhead contains novel DNA-binding and dimerization domains which are conserved in the human protein CP2. *Mol Cell Biol* 14, 4020-4031.
100. van Nieuw Amerongen, G. P., Koolwijk, P., Versteilen, A., and van Hinsbergh, V. W., 2003. Involvement of RhoA/Rho kinase signaling in VEGF-induced endothelial cell migration and angiogenesis in vitro. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 23, 211-217.
101. Veikkola, T., Karkkainen, M., Claesson-Welsh, L., and Alitalo, K., 2000. Regulation of angiogenesis via vascular endothelial growth factor receptors. *Cancer Res* 60, 203-212.
102. Walker, S. M., Downes, C. P., and Leslie, N. R., 2001. TPIP: a novel phosphoinositide 3-phosphatase. *Biochem J* 360, 277-283.
103. Wilanowski, T., Tuckfield, A., Cerruti, L., O'Connell, S., Saint, R., Parekh, V., Tao, J., Cunningham, J. M., and Jane, S. M., 2002. A highly conserved novel family of mammalian developmental transcription factors related to *Drosophila* grainyhead. *Mech Dev* 114, 37-50.
104. Wright, T. R., Bewley, G. C., and Sherald, A. F., 1976. The genetics of dopa decarboxylase in *Drosophila melanogaster*. II. Isolation and characterization of dopa-decarboxylase-deficient mutants and their relationship to the alpha-methyl-dopa-hypersensitive mutants. *Genetics* 84, 287-310.
105. Xiang, B., Wang, W., Yi, M., Li, W., Zhou, M., Li, X., and Li, G., 2011. Distribution and expression of alternative splice isoforms of NOR1 in human tissues and cell lines. *Zhong Nan Da Xue Xue Bao Yi Xue Ban* 36, 597-603.
106. Yan, C., Lu, D., Hai, T., and Boyd, D. D., 2005. Activating transcription factor 3, a stress sensor, activates p53 by blocking its ubiquitination. *Embo J* 24, 2425-2435.
107. Zhang, C., Gao, C., Kawauchi, J., Hashimoto, Y., Tsuchida, N., and Kitajima, S., 2002. Transcriptional activation of the human stress-inducible transcriptional repressor ATF3 gene promoter by p53. *Biochem Biophys Res Commun* 297, 1302-1310.
108. Zhao, Y., Brandish, P. E., Ballou, D. P., and Marletta, M. A., 1999. A molecular basis for nitric oxide sensing by soluble guanylate cyclase. *Proc Natl Acad Sci U S A* 96, 14753-14758.

7 Anhang

A.1 Microarray-Analyse GRHL3-1 versus Leervektor (EV)

ProbeName	GeneSymbol	RefSeqAccession	regulation	Fold change	p-value
A_33_P3395650	PCDHGA5	NM_032054	up	6,56	0,0428
A_33_P3368144	LOC652614	XM_942149	down	4,22	0,0035
A_19_P00812311			down	4,21	0,0376
A_19_P00330326			down	3,88	0,0051
A_24_P339560	SIGLEC11	NM_052884	down	3,58	0,0338
A_33_P3333003			down	3,37	0,0086
A_19_P00806490			down	3,36	0,0205
A_19_P00803051			down	2,97	0,0218
A_33_P3279708	RNU2-2	NR_002761	down	2,47	0,0393
A_33_P3374180			down	2,44	0,0174
A_24_P65060	MEX3B	NM_032246	up	2,35	0,0320
A_33_P3418992	LOC645769	XR_015325	up	2,28	0,0317
A_33_P3382595	RN7SK	NR_001445	down	2,26	0,0497
A_33_P3353622	RBAK	NM_021163	up	2,24	0,0138
A_23_P431179	HIST1H4A	NM_003538	down	2,24	0,0013
A_23_P167497	EFNA5	NM_001962	down	2,16	0,0163
A_33_P3229122	HIST1H2BF	NM_003522	down	2,14	0,0358
A_33_P3229335	HIST3H2BB	NM_175055	down	2,14	0,0430
A_33_P3404989	HIST1H3H	NM_003536	down	2,04	0,0494
A_33_P3254695	RNU105A	NR_004404	down	2,03	0,0474
A_33_P3421674	LOC284620	XR_017656	down	1,99	0,0127
A_33_P3248962	LOC100131742	XR_078213	down	1,96	0,0355
A_33_P3377380	LOC100130494	XM_001725351	down	1,94	0,0148
A_24_P55496	OSR2	NM_053001	down	1,94	0,0496
A_19_P00329986			down	1,90	0,0418
A_24_P940411	CXorf36	NM_176819	up	1,86	0,0459
A_33_P3265394	WDR74		up	1,85	0,0475
A_24_P156748	SLC30A2	NM_001004434	down	1,84	0,0292
A_23_P359540	HIST1H4F	NM_003540	down	1,82	0,0436
A_33_P3816266	ZNF253		up	1,80	0,0250
A_24_P225616	RRM2	NM_001034	up	1,79	0,0351
A_19_P00319741			down	1,78	0,0375
A_19_P00324351			down	1,74	0,0090
A_24_P20873	HIST1H4I	NM_003495	down	1,74	0,0385
A_33_P3407564	LOC647188	XM_001717128	down	1,73	0,0330
A_33_P3786807	SNAR-E		up	1,70	0,0242
A_33_P3393135			down	1,70	0,0199
A_33_P3421867	MDGA1		down	1,70	0,0499
A_24_P252794	CUL2	NM_003591	up	1,69	0,0409

A_23_P430558	CHRND	NM_000751	down	1,69	0,0237
A_24_P82135	SECISBP2L	NM_014701	up	1,68	0,0322
A_33_P3380372			down	1,68	0,0169
A_33_P3289541	MLLT1	NM_005934	up	1,67	0,0075
A_19_P00812901			down	1,67	0,0322
A_24_P918843	RALGAPA1	NM_194301	up	1,67	0,0313
A_33_P3418130	UPRT	NM_145052	up	1,66	0,0470
A_33_P3345350	DRGX	NM_001080520	down	1,66	0,0270
A_23_P416894	PION	NM_017439	up	1,66	0,0338
A_24_P322908	USP27X	NM_001145073	down	1,64	0,0270
A_19_P00322724			down	1,64	0,0409
A_24_P55148	HIST1H2BJ	NM_021058	down	1,64	0,0331
A_33_P3273854	NAALADL2	NM_207015	down	1,62	0,0292
A_33_P3258362	HBA2	NM_000517	down	1,62	0,0449
A_33_P3294598	PCDH10	NM_020815	up	1,61	0,0464
A_33_P3238433	ALDH3A1	NM_001135168	down	1,60	0,0061
A_33_P3422429			down	1,59	0,0332
A_33_P3250055			down	1,59	0,0216
A_19_P00315716			down	1,59	0,0109
A_23_P148737	MYBPH	NM_004997	down	1,57	0,0211
A_19_P00329786			down	1,56	0,0068
A_33_P3241771	LOC440313	XR_041904	down	1,56	0,0405
A_24_P940149	C2CD2	NM_015500	up	1,56	0,0408
A_19_P00315943			down	1,53	0,0242
A_23_P140434	MYO5C	NM_018728	up	1,53	0,0424
A_33_P3420762			down	1,53	0,0381
A_33_P3283201			down	1,52	0,0221
A_33_P3241081	AKNAD1	NM_152763	down	1,52	0,0278
A_33_P3317731			down	1,51	0,0484
A_33_P3380751	ST8SIA1	NM_003034	down	1,51	0,0323
A_23_P146922	GAS6	NM_000820	up	1,51	0,0120
A_33_P3363091			up	1,50	0,0192
A_19_P00801387			up	1,49	0,0169
A_33_P3230526	MPRIP	NM_015134	up	1,49	0,0423
A_23_P251303	SEC16A	NM_014866	up	1,49	0,0063
A_23_P141738	SS18	NM_001007559	up	1,49	0,0448
A_23_P118095	RPL3L	NM_005061	down	1,49	0,0475
A_33_P3336262			down	1,48	0,0242
A_24_P374973			up	1,48	0,0028
A_19_P00808731			down	1,47	0,0007
A_19_P00315499			down	1,47	0,0440
A_33_P3416588	RIT2	NM_002930	down	1,47	0,0372
A_23_P59069	HIST1H2BO	NM_003527	down	1,47	0,0392
A_23_P161399	MXI1	NM_130439	up	1,47	0,0307
A_33_P3400171	AKT2	NM_001626	up	1,46	0,0279
A_23_P6398	AP1B1	NM_001127	up	1,46	0,0442
A_33_P3226755	LOC100131857		down	1,46	0,0057

A_19_P00320777			up	1,45	0,0320
A_19_P00807791			down	1,45	0,0105
A_23_P3956	C1QTNF1	NM_198594	up	1,45	0,0448
A_23_P388681	ELAVL1	NM_001419	up	1,44	0,0181
A_23_P111054	HIST1H2BB	NM_021062	down	1,44	0,0461
A_23_P74391	OPN3	NM_014322	up	1,44	0,0242
A_33_P3228445	FXVD2	NM_001680	down	1,44	0,0471
A_23_P33407	HERC2	NM_004667	up	1,44	0,0360
A_32_P178800	ITGA2	NM_002203	up	1,44	0,0229
A_33_P3253501	HIST2H2BF	NM_001161334	down	1,43	0,0422
A_33_P3292915	TCOF1	NM_001008657	up	1,43	0,0291
A_23_P366216	HIST1H2BH	NM_003524	down	1,43	0,0312
A_19_P00807159			down	1,43	0,0437
A_24_P373768	GIPR	NM_000164	down	1,42	0,0254
A_32_P528311	RTN4RL2	NM_178570	down	1,42	0,0289
A_23_P92349	FGFRL1	NM_001004356	up	1,42	0,0451
A_33_P3229083	HIST1H2BK	NM_080593	down	1,42	0,0344
A_24_P944144	DIDO1	NM_080797	up	1,42	0,0154
A_23_P8013	HIST1H2BL	NM_003519	down	1,42	0,0362
A_23_P111041	HIST1H2BI	NM_003525	down	1,41	0,0320
A_24_P399009	EDC4	NM_014329	up	1,41	0,0064
A_19_P00324163			down	1,41	0,0409
A_33_P3256033	CBL	NM_005188	up	1,41	0,0169
A_33_P3306442	QRICH2	NM_032134	up	1,41	0,0337
A_23_P93180	HIST1H2BC	NM_003526	down	1,41	0,0475
A_23_P340922	ZNF414	NM_032370	up	1,40	0,0411
A_24_P84880	LOC148709	NR_002929	up	1,40	0,0388
A_23_P113283	ZMAT3	NM_022470	up	1,39	0,0366
A_23_P104073	S100A3	NM_002960	down	1,39	0,0393
A_19_P00811747			down	1,39	0,0214
A_23_P72068	GMDS	NM_001500	up	1,39	0,0244
A_19_P00806178			down	1,39	0,0464
A_23_P4909	SNRNP70	NM_003089	up	1,38	0,0207
A_19_P00331764			down	1,38	0,0382
A_33_P3313597		XR_078912	down	1,38	0,0311
A_24_P392958	TBC1D20	NM_144628	up	1,38	0,0245
A_24_P356130	MAP2K5	NM_002757	up	1,37	0,0377
A_33_P3236563	ALDH3B1	NM_001161473	down	1,37	0,0106
A_19_P00811026			down	1,37	0,0363
A_33_P3359250			down	1,37	0,0372
A_23_P12079	KCNC4	NM_153763	up	1,37	0,0394
A_23_P116587	OMP	NM_006189	down	1,37	0,0436
A_23_P204052	PCBP2	NM_031989	up	1,37	0,0076
A_24_P225961	DAG1	NM_004393	up	1,37	0,0056
A_19_P00329758			down	1,36	0,0389
A_33_P3280157	SNORD116-19	NR_001290	down	1,36	0,0411
A_24_P192197	WRNIP1	NM_130395	up	1,35	0,0433

A_19_P00330445			down	1,35	0,0367
A_23_P39931	DYSF	NM_003494	up	1,35	0,0306
A_33_P3269879	FAM160B2	NM_022749	up	1,35	0,0499
A_33_P3338968	LOC100133737	XM_001722336	down	1,35	0,0206
A_19_P00316734			down	1,35	0,0288
A_33_P3269453			up	1,34	0,0478
A_19_P00327579			down	1,34	0,0029
A_24_P322709	SNTA1	NM_003098	up	1,34	0,0205
A_33_P3272663			down	1,34	0,0495
A_33_P3348469	ANKRD13C	NM_030816	up	1,34	0,0469
A_33_P3317725			up	1,34	0,0376
A_19_P00813244			down	1,33	0,0395
A_23_P121806	ENOPH1	NM_021204	up	1,33	0,0379
A_19_P00322276			down	1,33	0,0284
A_23_P32029	SLC35D2	NM_007001	up	1,33	0,0140
A_33_P3412438			up	1,33	0,0480
A_24_P176079	WASF3	NM_006646	up	1,33	0,0216
A_19_P00803850			down	1,33	0,0495
A_33_P3262069	OR2AG2	NM_001004490	down	1,33	0,0197
A_33_P3281171	LOC100130987	NR_024469	up	1,32	0,0414
A_33_P3308764	RXRG	NM_001009598	down	1,32	0,0314
A_23_P150064	MMRN2	NM_024756	up	1,32	0,0017
A_23_P368558	TMEM131	NM_015348	up	1,32	0,0273
A_23_P50946	RAMP1	NM_005855	down	1,32	0,0216
A_33_P3286616	IRAK1	NM_001569	up	1,32	0,0463
A_32_P206401	QSOX2	NM_181701	up	1,32	0,0332
A_24_P148750	SH3BP5	NM_004844	up	1,32	0,0088
A_19_P00318927			down	1,32	0,0091
A_19_P00328038			down	1,32	0,0348
A_19_P00331835			down	1,31	0,0311
A_19_P00807518			down	1,31	0,0452
A_19_P00316576			down	1,31	0,0021
A_19_P00321089			up	1,31	0,0079
A_33_P3399107	PI4KA	NM_058004	up	1,31	0,0486
A_33_P3315223	HNRNPA0	NM_006805	up	1,31	0,0478
A_19_P00809346			down	1,31	0,0267
A_19_P00801627			down	1,31	0,0399
A_24_P396375	ECE1	NM_001113347	up	1,31	0,0302
A_23_P94053	TRRAP	NM_003496	up	1,30	0,0427
A_24_P235049	MTHFD1L	NM_015440	up	1,30	0,0176
A_23_P160862	HNRNPU	NM_031844	up	1,30	0,0017
A_19_P00806063			down	1,30	0,0124
A_23_P123086	KIAA1908	NR_027329	up	1,30	0,0498
A_32_P100430	LOC100128737	XM_001715932	down	1,30	0,0044
A_33_P3414851	RNF220	NM_018150	up	1,30	0,0396
A_19_P00319843			down	1,30	0,0109
A_23_P358221	UBXN7	NM_015562	up	1,29	0,0261

A_19_P00813242			down	1,29	0,0444
A_33_P3288180	CDC2L1	NM_033489	up	1,29	0,0315
A_33_P3257784	TSPAN17	NM_012171	up	1,29	0,0381
A_33_P3373745	BRD4	NM_014299	up	1,29	0,0450
A_19_P00322525			down	1,29	0,0255
A_33_P3363100	LOC100294232	XM_002343989	down	1,29	0,0397
A_33_P3382271			down	1,29	0,0277
A_23_P501339	CDIPT	NM_006319	up	1,29	0,0323
A_33_P3317473			down	1,28	0,0215
A_23_P259012	BAP1	NM_004656	up	1,28	0,0000
A_23_P168443	EPHB4	NM_004444	up	1,28	0,0334
A_23_P414252	SNX8	NM_013321	down	1,28	0,0327
A_33_P3307910			down	1,28	0,0180
A_23_P74799	SLC25A24	NM_213651	up	1,28	0,0469
A_24_P15754	TOMM40	NM_006114	up	1,28	0,0488
A_33_P3420655	KDM4A	NM_014663	down	1,28	0,0311
A_23_P331598	IPO7	NM_006391	up	1,28	0,0408
A_33_P3322945	SPDYC	NM_001008778	down	1,27	0,0453
A_33_P3260605	CTNNA1	NM_003798	down	1,27	0,0426
A_19_P00800805			down	1,27	0,0485
A_33_P3325661	LOC100292270	XM_002346039	down	1,27	0,0078
A_23_P133923	BAT4	NM_033177	down	1,27	0,0446
A_23_P49674	ARHGEF15	NM_173728	up	1,27	0,0052
A_23_P64617	FZD4	NM_012193	up	1,27	0,0322
A_24_P33444	YWHAE	NM_006761	down	1,27	0,0385
A_23_P69513	RGS12	NM_198229	up	1,27	0,0362
A_23_P119344	TEAD2	NM_003598	up	1,26	0,0055
A_19_P00809859			down	1,26	0,0062
A_24_P82106	MMP14	NM_004995	up	1,26	0,0316
A_33_P3293529	LOC100129527	XM_001715665	down	1,26	0,0217
A_33_P3335590	CCDC64B	NM_001103175	down	1,26	0,0388
A_24_P286465	PURB	NM_033224	up	1,26	0,0273
A_23_P334282	BMP2K	NM_017593	up	1,26	0,0432
A_33_P3216869	CRABP1	NM_004378	down	1,26	0,0051
A_33_P3269359	UNQ1887	NM_139015	up	1,26	0,0221
A_23_P38219	PRPF8	NM_006445	up	1,26	0,0217
A_19_P00811288			down	1,26	0,0303
A_23_P157607	INTS10	NM_018142	up	1,26	0,0173
A_23_P105562	VWF	NM_000552	up	1,26	0,0086
A_33_P3235568	CAPZB	NM_004930	up	1,25	0,0322
A_33_P3214597	RP9P	NR_003500	down	1,25	0,0212
A_23_P55998	SLC1A5	NM_005628	up	1,25	0,0277
A_23_P342825	FBXW4	NM_022039	up	1,25	0,0163
A_24_P9321	HIST1H3I	NM_003533	down	1,25	0,0493
A_32_P114215	COMMD6	NM_203497	down	1,25	0,0285
A_23_P106016	PRKD1	NM_002742	up	1,25	0,0094
A_19_P00319537			down	1,25	0,0407

A_23_P128919	LGALS3	NM_002306	down	1,25	0,0397
A_23_P37778	FHOD1	NM_013241	up	1,25	0,0479
A_23_P12849	FBXO18	NM_178150	up	1,24	0,0334
A_33_P3378031	TMEM18	NM_152834	down	1,24	0,0159
A_24_P876408	C11orf95	NM_001144936	up	1,24	0,0121
A_32_P217655	LOC645166	NR_027355	down	1,24	0,0221
A_19_P00808120			down	1,24	0,0336
A_19_P00808774			up	1,24	0,0370
A_23_P58482	MGAT1	NM_002406	up	1,24	0,0236
A_23_P206369	TMEM208	NM_014187	down	1,24	0,0354
A_23_P69521	CCNI	NM_006835	up	1,24	0,0363
A_24_P348989	LILRA1	NM_006863	down	1,23	0,0351
A_24_P398130	USP6NL	NM_014688	up	1,23	0,0184
A_23_P136232	IMPAD1	NM_017813	up	1,23	0,0498
A_33_P3378644	PHC1	NM_004426	up	1,23	0,0328
A_33_P3411741	SIDT2	NM_001040455	up	1,23	0,0098
A_24_P497186	IRF2BP2	NM_182972	up	1,23	0,0188
A_24_P161973	ATP11A	NM_015205	up	1,23	0,0398
A_33_P3320403	LOC100128528	XM_001724199	down	1,23	0,0218
A_23_P73457	RUFY1	NM_025158	up	1,23	0,0282
A_23_P425502	DONSON	NM_017613	up	1,23	0,0354
A_33_P3299279	C5orf39	NM_001014279	down	1,23	0,0441
A_23_P74950	RCC2	NM_018715	up	1,22	0,0020
A_24_P14367	PTBP1	NM_002819	up	1,22	0,0244
A_23_P80336	TOMM22	NM_020243	down	1,22	0,0376
A_19_P00800454			down	1,22	0,0381
A_23_P142174	FOXA3	NM_004497	down	1,22	0,0372
A_23_P135857	EIF2AK3	NM_004836	up	1,22	0,0498
A_33_P3405754			down	1,22	0,0205
A_24_P271527	JOSD1	NM_014876	up	1,22	0,0383
A_33_P3281616	C22orf40	NM_207327	down	1,22	0,0321
A_23_P207194	GH1	NM_000515	down	1,22	0,0371
A_24_P228667	MRPL40	NM_003776	down	1,21	0,0025
A_23_P130531	CDC37	NM_007065	up	1,21	0,0333
A_23_P476	MPZL1	NM_003953	up	1,21	0,0292
A_33_P3232523			down	1,21	0,0381
A_23_P99811	MDP1	NM_138476	down	1,21	0,0308
A_23_P15182	ARL2BP	NM_012106	down	1,21	0,0352
A_23_P155147	ZBED4	NM_014838	up	1,21	0,0249
A_23_P47073	WDR37	NM_014023	up	1,21	0,0272
A_19_P00325103			down	1,21	0,0488
A_33_P3361817			up	1,21	0,0454
A_32_P183609	ASB1	NM_001040445	up	1,21	0,0334
A_33_P3377619	C10orf46	NM_153810	up	1,21	0,0364
A_23_P23924	CAPN2	NM_001748	up	1,20	0,0002
A_33_P3306327			up	1,20	0,0388
A_33_P3415216	MPV17	NM_002437	down	1,20	0,0235

A_19_P00806320			down	1,20	0,0439
A_33_P3502640	DTX2	NM_020892	up	1,20	0,0051
A_33_P3239195			down	1,20	0,0450
A_24_P353289	C22orf13	NM_031444	up	1,20	0,0155
A_32_P67623	FAM120C	NM_017848	up	1,19	0,0159
A_33_P3280213	CTSA	NM_001127695	up	1,19	0,0359
A_33_P3272563	NMT2	NM_004808	up	1,19	0,0237
A_23_P4425	FLII	NM_002018	up	1,19	0,0265
A_23_P329112	JAK3	NM_000215	down	1,19	0,0177
A_33_P3591972	GLYCTK	NM_001144951	up	1,19	0,0483
A_23_P306933	PPTC7	NM_139283	up	1,19	0,0385
A_23_P48717	NPC2	NM_006432	down	1,19	0,0178
A_23_P108244	COX6B1	NM_001863	down	1,19	0,0456
A_23_P30972	ASCC3	NM_022091	down	1,18	0,0479
A_23_P115137	HBXIP	NM_006402	down	1,18	0,0098
A_23_P254944	GSTT1	NM_000853	down	1,18	0,0490
A_33_P3418010	NUP62	NM_153719	up	1,18	0,0369
A_33_P3240229	CREBBP	NM_004380	up	1,18	0,0488
A_33_P3258091	RNPEP	NM_020216	up	1,18	0,0417
A_23_P129118	PDCD7	NM_005707	up	1,17	0,0220
A_24_P97197	CTDSP1	NM_182642	up	1,17	0,0452
A_23_P256682	APEX2	NM_014481	down	1,17	0,0256
A_33_P3318671	LYPLA2	NM_007260	down	1,17	0,0352
A_32_P59010	TNFAIP8L3	NM_207381	up	1,17	0,0475
A_33_P3237775	NR1H3	NM_005693	down	1,17	0,0484
A_23_P131737	VPS54	NM_016516	up	1,17	0,0320
A_19_P00325284			down	1,17	0,0411
A_23_P142750	EIF2AK2	NM_002759	up	1,16	0,0474
A_33_P3336915			down	1,16	0,0489
A_23_P302094	IMP4	NM_033416	down	1,16	0,0102
A_33_P3216337	FTSJ1	NM_177439	up	1,16	0,0140
A_23_P208937	TLE6	NM_024760	up	1,16	0,0490
A_24_P397107	CDC25A	NM_001789	up	1,16	0,0336
A_33_P3337131	LOC648691	NR_027426	up	1,16	0,0171
A_23_P110811	COX7C	NM_001867	down	1,16	0,0076
A_24_P409985	TMEM44	NM_001011655	up	1,16	0,0461
A_24_P143440	DYNLRB1	NM_014183	down	1,16	0,0200
A_23_P103476	UBIAD1	NM_013319	down	1,16	0,0005
A_24_P329600	UBQLN1	NM_013438	up	1,16	0,0474
A_24_P389959	COPZ1	NM_016057	down	1,15	0,0468
A_33_P3272160	REXO4	NM_020385	down	1,15	0,0406
A_33_P3351914	NDUFA10	NM_004544	down	1,15	0,0197
A_33_P3287922	KIAA0406	NM_014657	down	1,15	0,0399
A_19_P00316404			up	1,15	0,0252
A_33_P3377529	HOXA4	NM_002141	up	1,15	0,0367
A_23_P81690	COX7A2	NM_001865	down	1,15	0,0366
A_19_P00316758			down	1,15	0,0086

A_23_P34983	JTB	NM_006694	up	1,15	0,0152
A_23_P17287	IAH1	NM_001039613	down	1,15	0,0109
A_23_P32135	C9orf9	NM_018956	down	1,14	0,0403
A_23_P111487	SRRT	NM_001128853	up	1,14	0,0293
A_19_P00316326			down	1,14	0,0051
A_33_P3309911	PRAMEF5	NM_001013407	down	1,14	0,0358
A_23_P115223	HAX1	NM_006118	down	1,14	0,0181
A_33_P3422812	PL-5283	NM_001130929	up	1,14	0,0224
A_23_P252653	STK25	NM_006374	up	1,13	0,0253
A_23_P42884	MRPS24	NM_032014	down	1,13	0,0413
A_33_P3415211	MPV17	NM_002437	down	1,13	0,0211
A_33_P3415191	ATP8B1	NM_005603	up	1,13	0,0233
A_33_P3365037	ERCC1	NM_202001	down	1,13	0,0303
A_23_P113317	P4HTM	NM_177938	up	1,13	0,0390
A_23_P169838	UNC84A	NM_025154	up	1,13	0,0198
A_19_P00320731			down	1,13	0,0460
A_33_P3791123	ATP5L2	NM_001165877	down	1,12	0,0373
A_32_P109794	STYX	NM_145251	up	1,12	0,0231
A_33_P3241596			up	1,12	0,0239
A_23_P102412	PLEKHA3	NM_019091	up	1,12	0,0290
A_23_P63371	TAL1	NM_003189	up	1,12	0,0459
A_33_P3651994	GNL3LP		up	1,12	0,0279
A_33_P3361182	PDCD11	NM_014976	down	1,12	0,0326
A_23_P204850	RB1	NM_000321	up	1,12	0,0463
A_23_P46170	MED8	NM_052877	down	1,11	0,0376
A_23_P28279	ACTR1B	NM_005735	up	1,11	0,0167
A_23_P24375	OTUB1	NM_017670	down	1,11	0,0270
A_23_P421221	R3HCC1	NM_001136108	down	1,11	0,0494
A_33_P3422298			up	1,11	0,0069
A_33_P3392325	CDC16	NM_001078645	up	1,10	0,0180
A_33_P3357470	REPS2	NM_004726	down	1,10	0,0460
A_33_P3280721	GPR177	NM_001002292	down	1,10	0,0391
A_23_P114826	MRPS15	NM_031280	down	1,10	0,0496
A_19_P00803943			down	1,09	0,0023
A_33_P3378126	FBXO32	NM_058229	down	1,08	0,0412
A_23_P24755	STX5	NM_003164	down	1,08	0,0217
A_23_P211126	DYRK1A	NM_130436	up	1,08	0,0499
A_24_P118376	CEACAM20	NM_001102598	down	1,08	0,0110
A_32_P155416	ERI3	NM_024066	down	1,08	0,0263
A_33_P3268466	MPDU1	NM_004870	down	1,07	0,0399
A_23_P12992	TRMT112	NM_016404	down	1,06	0,0225
A_33_P3384442			down	1,05	0,0377
A_23_P152804	NME1	NM_198175	down	1,05	0,0260
A_23_P79161	PRELID1	NM_013237	up	1,05	0,0214
A_23_P252322	ATP5E	NM_006886	down	1,04	0,0476
A_23_P126716	ATPIF1	NM_178191	down	1,04	0,0455

A.2 Microarray-Analyse GRHL3-3 versus Leervektor (EV)

ProbeName	GeneSymbol	RefSeqAccession	regulation	Fold change	p-value
A_23_P110837	IRX4	NM_016358	up	13,44	0,0488
A_24_P183664	TRIL	NM_014817	up	11,39	0,0016
A_23_P121533	SPON2	NM_012445	up	9,05	0,0305
A_23_P164451	TBX2	NM_005994	up	8,36	0,0244
A_33_P3383296	OR6C6	NM_001005493	up	6,68	0,0100
A_33_P3385471	OR4A47	NM_001005512	up	6,56	0,0485
A_23_P95060	EPHB3	NM_004443	up	5,90	0,0449
A_33_P3285545	CLDN4	NM_001305	up	5,86	0,0421
A_33_P3381378	PAX1	NM_006192	up	5,48	0,0196
A_23_P17134	MAL	NM_002371	up	5,18	0,0333
A_32_P62963	LOC400578	NR_029392	up	4,42	0,0081
A_23_P129695	VASN	NM_138440	up	4,40	0,0356
A_23_P32165	LHX2	NM_004789	up	4,24	0,0437
A_23_P110957	FOXF2	NM_001452	up	4,06	0,0103
A_33_P3226850	hCG_2025798		up	3,98	0,0258
A_24_P365515	FOXA2	NM_021784	up	3,97	0,0189
A_32_P98072	TCHH	NM_007113	up	3,53	0,0186
A_19_P00316801			up	3,15	0,0388
A_33_P3253628			down	3,07	0,0457
A_23_P53370	RND1	NM_014470	up	3,01	0,0269
A_23_P38537	KRT16	NM_005557	up	2,85	0,0259
A_33_P3538279	PRO2852		up	2,84	0,0427
A_33_P3245665		XM_002346050	down	2,77	0,0369
A_19_P00800896			up	2,68	0,0342
A_23_P256158	ADRA2C	NM_000683	up	2,66	0,0452
A_23_P40108	COL9A3	NM_001853	up	2,65	0,0193
A_23_P370454	KCNAB3	NM_004732	up	2,56	0,0116
A_33_P3382309	PRDM16	NM_022114	up	2,55	0,0382
A_19_P00803855			up	2,52	0,0314
A_33_P3359590	DAZAP1	NM_170711	up	2,51	0,0179
A_19_P00323018			up	2,50	0,0431
A_24_P93633			down	2,49	0,0314
A_19_P00331747			up	2,46	0,0147
A_33_P3326730	KIAA1984	NM_001039374	up	2,46	0,0377
A_32_P176594	KIAA1614	NM_020950	down	2,45	0,0237
A_24_P11436	TTC22	NM_017904	up	2,43	0,0306
A_19_P00322557			down	2,29	0,0420
A_33_P3351920	LOC649941	XR_079479	down	2,28	0,0262
A_23_P23502	OR6N1	NM_001005185	down	2,27	0,0366
A_19_P00324550			up	2,17	0,0445
A_33_P3311845	FLJ38723	XR_041381	down	2,16	0,0086

A_19_P00329233			down	2,16	0,0095
A_23_P315836	BAIAP2	NM_017451	up	2,08	0,0249
A_33_P3418992	LOC645769	XR_015325	up	2,08	0,0350
A_33_P3404281	LOC51145	XR_041655	up	2,08	0,0400
A_19_P00812091			up	2,05	0,0337
A_19_P00315668			up	2,05	0,0415
A_23_P325690	ANKRD35	NM_144698	up	2,02	0,0226
A_33_P3321462	OR5B21	NM_001005218	up	1,96	0,0368
A_33_P3215720	PPP1R2	NM_006241	up	1,95	0,0380
A_33_P3354203			down	1,95	0,0004
A_33_P3295814	LOC100128031	XM_001720914	down	1,95	0,0103
A_33_P3365305	CHRNA1	NM_001039523	up	1,94	0,0395
A_33_P3347040	LOC100290344	XM_002347889	down	1,92	0,0453
A_19_P00315750			down	1,89	0,0284
A_19_P00318833			up	1,85	0,0259
A_33_P3377380	LOC100130494	XM_001725351	down	1,83	0,0288
A_23_P156809	FAM119A	NM_001127395	up	1,81	0,0310
A_19_P00806418			up	1,77	0,0124
A_19_P00802314			down	1,77	0,0178
A_19_P00811052			down	1,74	0,0376
A_19_P00323091			down	1,73	0,0194
A_19_P00331895			down	1,73	0,0497
A_19_P00811821			down	1,73	0,0373
A_33_P3223825	SRRM3	NM_001110199	up	1,72	0,0477
A_33_P3351356			up	1,71	0,0499
A_33_P3214105	ATF3	NM_001674	up	1,71	0,0388
A_19_P00810374			down	1,69	0,0385
A_23_P26511	GDPD3	NM_024307	up	1,67	0,0355
A_23_P500353	KCNN2	NM_021614	up	1,65	0,0363
A_23_P159741	BCOR	NM_017745	up	1,64	0,0422
A_23_P214144	COL10A1	NM_000493	down	1,63	0,0123
A_33_P3393135			down	1,63	0,0241
A_19_P00809217			up	1,61	0,0325
A_19_P00807595			down	1,61	0,0437
A_33_P3389363			down	1,61	0,0470
A_33_P3228709	KRTAP5-7	NM_001012503	up	1,60	0,0268
A_19_P00809146			down	1,60	0,0354
A_24_P940310	URB1	NM_014825	up	1,59	0,0105
A_33_P3305855	LOC645967	XR_040575	up	1,59	0,0269
A_33_P3273854	NAALADL2	NM_207015	down	1,58	0,0359
A_33_P3343828	FLJ42627		up	1,57	0,0470
A_19_P00813254			down	1,57	0,0147
A_19_P00806500			down	1,57	0,0050
A_23_P10542	HTRA3	NM_053044	up	1,56	0,0238
A_19_P00318098			down	1,56	0,0379
A_33_P3287258		XR_017668	up	1,54	0,0189
A_24_P314597			up	1,54	0,0268

A_19_P00315808			down	1,53	0,0488
A_23_P336929	MED29	NM_017592	up	1,51	0,0312
A_33_P3394972	OSBPL5	NM_020896	up	1,50	0,0142
A_24_P17302	UBE2J2	NM_194458	up	1,50	0,0475
A_24_P301454	NBR2	NR_003108	down	1,49	0,0410
A_24_P562369			down	1,49	0,0225
A_32_P211248	LOC100131138	XM_001717925	down	1,49	0,0236
A_19_P00322375			down	1,48	0,0368
A_33_P3328726	CCDC33	NM_182791	down	1,48	0,0452
A_19_P00328934			down	1,48	0,0098
A_33_P3356092	BTBD9	NM_052893	down	1,47	0,0400
A_19_P00810799			down	1,46	0,0075
A_33_P3328284			down	1,46	0,0215
A_33_P3256033	CBL	NM_005188	up	1,45	0,0229
A_33_P3230259	NCAPH	NM_015341	down	1,45	0,0273
A_19_P00811771			down	1,45	0,0023
A_19_P00321253			up	1,45	0,0367
A_19_P00325730			down	1,44	0,0427
A_33_P3283201			down	1,44	0,0171
A_33_P3371769			down	1,44	0,0471
A_23_P388681	ELAVL1	NM_001419	up	1,44	0,0136
A_19_P00802881			down	1,44	0,0319
A_33_P3256267			down	1,43	0,0418
A_33_P3343260	LOC100132433	XR_038594	down	1,43	0,0338
A_32_P95462	STXBP5L	NM_014980	down	1,42	0,0028
A_33_P3461416	GP6	NM_001083899	up	1,42	0,0436
A_24_P497186	IRF2BP2	NM_182972	up	1,42	0,0012
A_19_P00810613			down	1,42	0,0427
A_19_P00318165			down	1,41	0,0446
A_23_P33407	HERC2	NM_004667	up	1,41	0,0242
A_32_P1533	LOC202181	NR_026921	down	1,40	0,0463
A_33_P3325439	USP16	NM_001001992	down	1,39	0,0437
A_19_P00327579			down	1,39	0,0199
A_23_P360209			down	1,38	0,0402
A_24_P38276	FZD1	NM_003505	up	1,38	0,0415
A_19_P00800805			down	1,37	0,0232
A_33_P3416231	HOXA9	NM_152739	down	1,37	0,0419
A_33_P3325871	hCG_1993592		down	1,37	0,0199
A_23_P251303	SEC16A	NM_014866	up	1,37	0,0241
A_23_P66241	MT1M	NM_176870	down	1,37	0,0209
A_33_P3389376	MDM4	NM_002393	up	1,37	0,0318
A_19_P00800161			down	1,37	0,0449
A_33_P3310371	LOC283788	NR_027436	down	1,37	0,0475
A_23_P164042	ERN1	NM_001433	up	1,36	0,0436
A_33_P3236563	ALDH3B1	NM_001161473	down	1,35	0,0064
A_19_P00329691			down	1,35	0,0386
A_24_P69538	TLR4	NM_138554	down	1,34	0,0409

A_19_P00804546			down	1,33	0,0330
A_33_P3317473			down	1,33	0,0106
A_19_P00321685			down	1,33	0,0433
A_33_P3313652			down	1,33	0,0142
A_24_P119545			up	1,32	0,0274
A_33_P3363100	LOC100294232	XM_002343989	down	1,32	0,0194
A_19_P00320721			up	1,32	0,0066
A_23_P417282	IGF1R	NM_000875	up	1,32	0,0380
A_33_P3288774	RC3H1	NM_172071	up	1,32	0,0202
A_33_P3289541	MLLT1	NM_005934	up	1,32	0,0462
A_33_P3214027	CYTSA	NM_015330	down	1,32	0,0275
A_19_P00324577			down	1,31	0,0273
A_23_P112159	EIF2C2	NM_012154	up	1,31	0,0330
A_23_P69908	GLRX	NM_002064	down	1,31	0,0301
A_33_P3418516	E2F3	NM_001949	down	1,31	0,0234
A_23_P86182	MRPS21	NM_031901	down	1,30	0,0240
A_33_P3220827	PEA15	NM_003768	up	1,30	0,0312
A_19_P00320970			down	1,30	0,0226
A_33_P3802558	LOC441245		up	1,30	0,0437
A_23_P20894	EHMT1	NM_024757	up	1,30	0,0212
A_19_P00321664			down	1,30	0,0106
A_33_P3240787	LOC100131910		down	1,30	0,0383
A_24_P602507	AGPHD1	NM_001013619	down	1,30	0,0360
A_33_P3811287	HUWE1	NM_031407	up	1,30	0,0178
A_33_P3296991	FLJ42393	NR_024413	down	1,29	0,0216
A_33_P3313640			down	1,29	0,0102
A_33_P3377750	KLC3	NM_177417	up	1,29	0,0484
A_33_P3211633	WDR3	NM_006784	down	1,29	0,0246
A_24_P230938			down	1,28	0,0464
A_33_P3296497			up	1,28	0,0228
A_33_P3367073	LOC100128142	XM_001715360	down	1,28	0,0423
A_23_P351320	CDC40	NM_015891	down	1,28	0,0468
A_33_P3290714	HS6ST2	NM_001077188	down	1,28	0,0315
A_19_P00331719			down	1,28	0,0271
A_23_P143006	PRLH	NM_015893	down	1,27	0,0467
A_23_P424513	RANBP9	NM_005493	up	1,27	0,0425
A_23_P161352	PTPLA	NM_014241	down	1,27	0,0277
A_33_P3247392	TPTE	NM_199261	up	1,27	0,0297
A_33_P3239195			down	1,27	0,0183
A_19_P00811540			down	1,27	0,0358
A_19_P00319426			down	1,27	0,0496
A_19_P00811495			down	1,27	0,0026
A_33_P3613000	ZBTB10	NM_001105539	down	1,27	0,0220
A_19_P00801843			down	1,26	0,0443
A_33_P3410284			down	1,25	0,0017
A_33_P3281196	MRPS36	NM_033281	down	1,25	0,0379
A_33_P3259821	DOCK9	NM_001130050	down	1,25	0,0325

A_33_P3270639			down	1,25	0,0317
A_33_P3339066	RNPC3	NM_017619	down	1,24	0,0367
A_19_P00326177			down	1,24	0,0488
A_33_P3346473	PHF21A	NM_001101802	up	1,24	0,0400
A_33_P3311907	TBC1D7	NM_016495	down	1,24	0,0172
A_24_P235049	MTHFD1L	NM_015440	up	1,24	0,0240
A_33_P3414362	USP32	NM_032582	down	1,24	0,0488
A_33_P3372368	LOC100129362	XM_001721298	down	1,24	0,0488
A_23_P150379	MPZL2	NM_144765	down	1,24	0,0278
A_24_P253251	SLC7A1	NM_003045	up	1,23	0,0084
A_19_P00805076			down	1,23	0,0481
A_23_P110811	COX7C	NM_001867	down	1,22	0,0064
A_19_P00327603			down	1,22	0,0297
A_33_P3404775	PABPC4	NM_001135653	up	1,22	0,0460
A_33_P3380837	AMZ1	NM_133463	up	1,22	0,0404
A_23_P359854	BEND3	NM_001080450	up	1,22	0,0409
A_24_P944144	DIDO1	NM_080797	up	1,21	0,0471
A_33_P3331426	LOC100133086	XM_001723511	down	1,21	0,0294
A_33_P3286616	IRAK1	NM_001569	up	1,21	0,0340
A_33_P3216337	FTSJ1	NM_177439	up	1,21	0,0461
A_33_P3381410	ORC2L	NM_006190	down	1,21	0,0252
A_24_P322908	USP27X	NM_001145073	down	1,21	0,0474
A_23_P88865	CMTM3	NM_144601	up	1,21	0,0279
A_33_P3357573	MAML3	NM_018717	down	1,20	0,0452
A_33_P3246505			down	1,20	0,0339
A_23_P210869	COX4I2	NM_032609	down	1,20	0,0482
A_33_P3235987	PIN4	NM_006223	down	1,20	0,0263
A_19_P00315892			down	1,20	0,0350
A_23_P304543	NFX1	NM_147133	down	1,20	0,0405
A_23_P3775	OGFOD1	NM_018233	down	1,20	0,0139
A_33_P3359543	ZNF561	NM_152289	down	1,20	0,0486
A_23_P15272	ABCC6	NM_001079528	down	1,20	0,0103
A_19_P00316758			down	1,20	0,0031
A_19_P00327731			down	1,20	0,0050
A_23_P362824	CSTF1	NM_001324	down	1,20	0,0429
A_23_P81880	CTDSP2	NM_005730	up	1,20	0,0255
A_33_P3320301	LOC388789	NR_015432	down	1,19	0,0225
A_19_P00809343			down	1,19	0,0350
A_33_P3411384			up	1,19	0,0453
A_19_P00321143			down	1,18	0,0227
A_33_P3257538	AGPHD1	NM_001083612	down	1,18	0,0324
A_23_P98532	ZDHHC5	NM_015457	up	1,18	0,0115
A_24_P305467	GATAD2A	NM_017660	up	1,18	0,0368
A_33_P3322504			down	1,17	0,0115
A_33_P3264780	CDK8	NM_001260	up	1,17	0,0134
A_23_P120744	MCM3AP	NM_003906	up	1,17	0,0266
A_24_P98086	GNA12	NM_007353	up	1,17	0,0215

A_23_P127175	SAR1A	NM_020150	down	1,17	0,0192
A_23_P64083	SF3B2	NM_006842	up	1,16	0,0334
A_33_P3244181	HSBP1	NM_001537	down	1,16	0,0484
A_23_P210763	JAG1	NM_000214	up	1,16	0,0416
A_19_P00806152			up	1,16	0,0413
A_24_P229536	C21orf34	NR_027791	down	1,15	0,0255
A_33_P3351934	MSTO2P	NR_024117	up	1,15	0,0251
A_32_P99902	C15orf40	NM_144597	down	1,15	0,0057
A_33_P3286318	LOC440043	XR_015812	up	1,15	0,0474
A_24_P228667	MRPL40	NM_003776	down	1,15	0,0432
A_32_P82623	AGBL3	NM_178563	down	1,14	0,0276
A_23_P159833	NDUFA1	NM_004541	down	1,14	0,0235
A_33_P3347387			down	1,14	0,0341
A_33_P3209706	ARGFX	NM_001012659	down	1,13	0,0341
A_33_P3287922	KIAA0406	NM_014657	down	1,13	0,0500
A_23_P71148	BLVRA	NM_000712	down	1,12	0,0233
A_24_P41042	C12orf52	NM_032848	up	1,12	0,0430
A_23_P68866	UCRC	NM_001003684	down	1,12	0,0151
A_23_P102925	PWP2	NM_005049	up	1,11	0,0374
A_24_P101629	FAM127B	NM_001078172	down	1,11	0,0324
A_23_P62907	ATF6	NM_007348	down	1,11	0,0321
A_33_P3239587	MXRA7	NM_001008529	up	1,11	0,0162
A_32_P224149	FKBP15	NM_015258	down	1,11	0,0101
A_23_P45108	QRICH1	NM_017730	up	1,11	0,0225
A_33_P3376828	CMTM7	NM_138410	down	1,11	0,0193
A_23_P34983	JTB	NM_006694	up	1,10	0,0159
A_33_P3269408	FOXI2	NM_207426	up	1,10	0,0012
A_23_P80362	NHP2L1	NM_005008	down	1,09	0,0286
A_23_P17287	IAH1	NM_001039613	down	1,09	0,0345
A_23_P43566	NDUFA8	NM_014222	down	1,09	0,0448
A_32_P75299	TOMM5	NM_001134484	down	1,06	0,0302
A_23_P152107	UBE2I	NM_194259	up	1,05	0,0482

A.3 Oligonukleotidliste

Name	Sequenz	Verwendung/ Beschreibung
GRHL3 Ex1B for1	ggagatgtgccaaactgttaagag	GRHL3-1 Detektion
GRHL3 Ex1B for2	tctgagcagaagaatgtggatg	GRHL3-1 Detektion
GRHL3 Ex2 rev1	cagctgtcaacgggttttct	GRHL3-1 Detektion
GRHL3 Ex2 rev2	ccgcaacactgtcatcatct	GRHL3-1 Detektion
GRHL3 E4 rev1	cttgagcaaactctgggtactctgg	GRHL3-1 Detektion
GRHL3 Ex1B3 for1	cctatTTTTctggTcccaagg	GRHL3-3 Detektion
GRHL3 Ex4 rev2	ggaatttcatgaggtgtgtgg	GRHL3-3 Detektion
Q8TE85 rev	caaactctgggtactctgggg	GRHL3-3 Detektion
GRHL3 Ex6 rev1	gagcccagggtgtattcaaa	GRHL3-3 Detektion
GRHL3 RE2 wt top	agcttgatacggatccaactagataaaaccggTTTTact agttagatccaactagataaaaccggTTTTactagtta	wt GRHL3 Responsives Element
GRHL3 RE2 wt bottom	gatctaactagtaaaaccggTTTTatctagttggatcta actagtaaaaccggTTTTatctagttggatccgtatca	wt GRHL3 Responsives Element
GRHL3 RE2 mut top	agcttgatacggatccaactagataaaacgTTTTact agttagatccaactagataaaacgTTTTactagtta	mut GRHL3 Responsives Element
GRHL3 RE2 mut bottom	gatctaactagtaaaaaacgTTTTatctagttggatcta actagtaaaaaacgTTTTatctagttggatccgtatca	mut GRHL3 Responsives Element
Bam-myc for1	gcaggatccaccatggaacaaaaactcatctcaga	myc-Tag Klonierung
myc-tag rev1	tccaccgccagatcctcttctgagatga	myc-Tag Klonierung
myc-GRHL3-1 for1	aagaggatctgggCGGTGGATGGATGAATTCATTCTT CC	myc-Tag Klonierung
myc-GRHL3-3 for1	aagaggatctgggCGGTGGAGAATATGAGACGGACCTC AC	myc-Tag Klonierung
GRHL3 Ex6 rev1	gagcccagggtgtattcaaa	myc-Tag Klonierung
GRHL3 KxxRdel for1	agaacatttacggaatcttagtcaacatggac	Δ KR Deletionsmutante
GRHL3 KxxRdel rev1	actaagattccgtaaatgttctcttcagggaa	Δ KR Deletionsmutante
GRHL3 Ex4 for1	aatggctccctcaactcctt	Δ CT Deletionsmutante
hSOM deltaCT rev1	cgctctagatcattactgaaggctgccttccttggc	Δ CT Deletionsmutante
hGRHL3 RKM deletion for_1	agggagctgaggactccagcaacagtggcgctc	Δ RKM Deletionsmutante
hGRHL3 RKM deletion rev_1	ttgctggagtcctcagctcccttgtcacagaa	Δ RKM Deletionsmutante
bi_NLS for_2	gcagctccaacctgctgtatgtgCGGAGGGAG	Δ bi_NLS Deletionsmutante
hGRHL3 bi_NLS deletion rev_1	ctctctgaagggttggagctgctgggtcctgc	Δ bi_NLS Deletionsmutante
Primer_1A for1	gctagcgtttaaacttaagcttggtag	Δ A Deletionsmutante
Primer_2A rev1	tattcaaatccaccgcccagatcctctt	Δ A Deletionsmutante
Primer_3A for1	gcgggtggatttgaatacaccctgggctc	Δ A Deletionsmutante
Primer_4A/B rev1	gggcacttgaccttccctccggaactgc	Δ A und B Deletionsmutante
Primer_1B for1	caaggcagctccctccctgcaggcccca	Δ B Deletionsmutante
Primer_2B rev1	aacaccttgtcacttttgaggctgggggt	Δ B Deletionsmutante
Primer_3B for1	aaagtgacaagggtgttcatcggcgtaaa	Δ B Deletionsmutante
Primer_1C for1	gtcgatgctcttcccagatatcctgaa	Δ C Deletionsmutante
Primer_2C rev1	aagggcgacttggcctcttcattcacgt	Δ C Deletionsmutante
Primer_3C for1	aggccaagtcgccccttactgaggagtt	Δ C Deletionsmutante
Primer_4C rev1	taccttcgaagggccctctagacagct	Δ C Deletionsmutante

Danksagung

Mein besonderer Dank gilt PD Dr. Judith Haendeler für die Überlassung des überaus interessanten Themas, die ständige Diskussionsbereitschaft und die fachliche Betreuung während meiner Promotion.

Herrn Prof. Dr. William Martin danke ich für die Übernahme des Zweitgutachtens.

Ich danke Dr. Yogi Altschmied für die kritische Durchsicht meiner Arbeit und für die Unterweisung in die Welt der Nukleinsäuren und zahlreiche damit verbundene Methoden.

Vielen Dank auch an Dr. René Deenen und Prof. Dr. Karl Köhrer vom Zentrallabor für „Genomics and Transcriptomics“ des Biologisch-Medizinischen-Forschungszentrums in Düsseldorf für die Durchführung der Microarray Analyse.

Ich bedanke mich bei Dr. Martin Graf und Prof. Christoph Winkler vom „Department for Biological Science“ der Universität Singapur für die Durchführung und spätere Diskussion der Überexpressions-Experimente im Zebrafisch.

Ich danke Tim für die kleinen geistigen Wettkämpfe und gelegentlichen Gesangseinlagen ;-), die eine willkommene Abwechslung waren und für eine angenehme Arbeitsatmosphäre sorgten.

Ich danke meinen „Büro-Mitbewohnern“ Marius und Anika für lustige Momente, interessante Gespräche und den Spaß, den man mit ihnen haben konnte.

Ich danke allen aktuellen und ehemaligen Mitarbeitern der AG Haendeler für die angenehme Atmosphäre, die gemeinsamen Mittagessen und die lustige Zeit die wir zusammen hatten. Die gemeinsamen Kongressteilnahmen, Karnevals- und Promotionsfeiern werden mir hier immer in besonderer Erinnerung bleiben!

Meinen (ehemaligen und gegenwärtigen) Arbeitskollegen der Gurlittstrasse danke ich für die gemeinsame Zeit. Besonders danken möchte ich an dieser Stelle allen aktiven Fußballern der IUF-Mannschaft – mit euch hatte ich nicht nur viel Spass beim Kicken im Volksgarten, sondern habe mir dann auch endlich einen richtigen Verein gesucht ;).

Ich danke der gesamten 4. Mannschaft von S.C. Schwarz-Weiß 06 Düsseldorf für lustige Nachmittage/Abende und nervenaufreibende Fußballspiele, die besonders in der Zeit des „Zusammenschreibens“ einen fantastischen Ausgleich darstellten.

Danke auch an meine Freunde (Oli, David, Benni, Philipp, Iuri, Sascha, Thorsten und die „Jungs aus der Pokerunde“) die für mich auf andere Gedanken brachten wenn es nicht so gut lief oder sich mit mir freuten wenn es andersherum war.

Danke auch an Familie Lukosz – die Care-Pakete und die erholsamen Gartentage.

Ich möchte mich besonders bei Maga bedanken, der Liebe meines Lebens. Dafür, dass sie mich immer unterstützt und mir den Rücken freihält. Für all die Kleinigkeiten des Lebens - mit ihr wurde alles so viel leichter.

Ein großer Dank geht an meine Eltern und an meinen Bruder. Dafür, dass sie mich in allem was ich tue unterstützen und ich mich immer auf sie Verlassen kann.