

Funktionen der unterschiedlichen Isoformen des Transkriptionsfaktors Grainyhead-like 3 bei der Apoptose

Inaugural-Dissertation

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

vorgelegt von

Sabrina Farrokh
aus Minden

Düsseldorf, April 2015

aus dem IUF-Leibniz-Institut für umweltmedizinische Forschung

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

Referent: Prof. Dr. Judith Haendeler

Korreferent: Prof. Dr. Dieter Willbold

Tag der mündlichen Prüfung: 10.06.2015

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.

(Sabrina Farrokh)
Düsseldorf, 27. April 2015

Inhalt

Abkürzungsverzeichnis	vi
1 EINLEITUNG	1
1.1 Kardiovaskuläres System	1
1.2 Physiologische Funktionen des Endothels und die Rolle von NO als regulatorisches Signalmolekül	2
1.3 Apoptose	5
1.4 Der Transkriptionsfaktor GRHL3 und seine Funktionen im Endothel	8
1.4.1 Aufbau, Einteilung und Regulation von Transkriptionsfaktoren	8
1.4.2 Die Familie der Grainyhead Transkriptionsfaktoren	11
1.4.3 Humane GRHL3 Isoformen	12
1.4.4 Funktionen von GRHL3 im Endothel	15
1.5 Fragestellung	18
2 MATERIAL UND METHODEN	19
2.1 Materialien	19
2.1.1 Chemikalien	19
2.1.2 Reagenzien und Enzyme	19
2.1.3 Kommerzielle Kits und Assays	22
2.1.4 Geräte	23
2.1.5 Antikörper	24
2.1.6 Plasmide	25
2.1.7 Oligonukleotide	26
2.1.8 Bakterienstämme	29
2.1.9 Medien	29
2.1.10 DNA- und Proteinmarker	30
2.2 Methoden	30
2.2.1 Molekularbiologische Methoden	30
2.2.1.1 RNA Isolierung	30
2.2.1.2 Reverse Transkription	31
2.2.1.3 Polymerase-Kettenreaktion	32
2.2.1.3.1 Gerichtete Mutagenese	36
2.2.1.4 Aufreinigung von PCR-Produkten	38
2.2.1.5 Restriktionsverdau von DNA	38
2.2.1.6 Agarose Gelelektrophorese	38
2.2.1.7 Aufreinigung von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen	39
2.2.1.8 Ligation	39
2.2.1.9 Gibson Assembly	39
2.2.1.10 Kultivierung von Bakterien	40

2.2.1.11	Herstellung kompetenter Bakterien	41
2.2.1.12	Transformation	41
2.2.1.13	Plasmidisolierung	42
2.2.1.14	Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren	42
2.2.1.15	DNA Sequenzierung	43
2.2.2	Zellbiologische Methoden	43
2.2.2.1	Kultivierung von HEK293T Zellen	43
2.2.2.2	Kultivierung von HUVEC	44
2.2.2.3	Bestimmung der Zellzahl	44
2.2.2.4	Transfektion von HEK293T Zellen mittels Lipofectamin®	45
2.2.2.5	Transfektion von HUVEC mit SuperFect®	45
2.2.2.6	Transfektion von HUVEC mit HiPerFect	46
2.2.2.7	Zellernte	47
2.2.3	Proteinbiochemische Methoden	47
2.2.3.1	Lyse von Zellen mit RIPA-Puffer	47
2.2.3.2	Lyse von Zellen mit RLB-Puffer	47
2.2.3.3	Biochemische Fraktionierung von Kern und Zytoplasma	48
2.2.3.4	Konzentrationsbestimmung von Proteinen nach Bradford	48
2.2.3.5	SDS-PAGE	49
2.2.3.6	Western Blot und Immundetektion	50
2.2.3.7	Messung der Luziferase Aktivität	52
2.2.3.8	Annexin-V-Färbung	52
2.2.3.9	Immunfluoreszenzfärbung	54
3	ERGEBNISSE	55
3.1	Rolle von GRHL3-1 und GRHL3-3 bei der Apoptose	55
3.2	Einfluss von GRHL3-1 und GRHL3-3 auf die BCL-X_L Expression	56
3.3	Apoptotischer Effekt von GRHL3-1 und GRHL3-3 nach endogenem Knockdown	57
3.4	Herstellung großflächiger Deletionsmutanten	61
3.5	Analyse der transkriptionellen Aktivierung durch GRHL3-2 Varianten mit großflächigen Deletionen	67
3.6	Zelluläre Lokalisation der GRHL3-2 Mutanten mit großflächigen Deletionen	70
3.7	Herstellung von GRHL3-2 Mutanten mit kleinen Deletionen zwischen DNA-Bindedomäne und Dimerisierungsdomäne	73
3.8	Analyse der transkriptionellen Aktivierung durch die Deletionsmutanten GRHL3-2ΔC1 bis ΔC4	82
3.9	Zelluläre Lokalisation der GRHL3-2 Deletionsmutanten ΔC1 bis ΔC4	83
3.10	Einfluss der extranukleären GRHL3-2 Mutanten auf die Apoptose in Endothelzellen	85
3.11	Identifizierung des nukleären Lokalisationssignals	87
3.11.1	Klonierung eines Expressionsplasmids für die Substitutionsmutante GRHL3-2 R485E/K489E/R490D	88
3.11.2	Analyse der Expression von GRHL3-2 R485E/K489E/R490D	89
3.11.3	Zelluläre Lokalisation von GRHL3-2 R485E/K489E/R490D	90

3.11.4	Einfluss der Dreifachmutante Mutante GRHL3-2 R485E/K489E/R490D auf die Apoptose in Endothelzellen	91
<u>4</u>	<u>DISKUSSION</u>	<u>93</u>
4.1	Regulation von GRHL3-1 und GRHL3-3 durch externe Stimuli	93
4.2	Identifizierung funktioneller Domänen, die für die Aktivität von GRHL3 als Transkriptionsfaktor essentiell sind	97
4.3	Identifizierung des NLS	102
4.4	Einfluss GRHL3 auf die Apoptose von Endothelzellen	104
4.5	Ausblick	107
<u>5</u>	<u>ZUSAMMENFASSUNG</u>	<u>109</u>
<u>6</u>	<u>PUBLIKATIONEN MIT BEZUG ZUR DISSERTATION</u>	<u>111</u>
<u>7</u>	<u>LITERATURVERZEICHNIS</u>	<u>112</u>
	<u>DANKSAGUNG</u>	<u>121</u>

Abkürzungsverzeichnis

°C	Grad Celsius
μ-	mikro (10 ⁻⁶)
7-AAD	7-Aminoactinomycin
AD	Aktivierungsdomäne
AIF	Apoptose-induzierende Faktor
Akt	Proteinkinase B
AmpR	Ampicillin-Resistenzgen
AP-1	<i>activator protein-1</i>
APS	Ammoniumperoxodisulfat
AS	Aminosäure
ATF	<i>activating transcription factor</i>
ATP	Adenosintriphosphat
BH ₂	Dihydrobiopterin
BH ₄	Tetrahydrobiopterin
BOM	Brother-of-Mammalian Grainyhead
bp	Basenpaar(e)
BSA	Bovines Serumalbumin
bzw.	beziehungsweise
ca.	circa
CaCl ₂	Calciumchlorid
CARD	<i>caspase recruitment domain</i>
CASTing	<i>cyclic amplification and selection of targets</i>
CAT	Chloramphenicol Acetyltransferase
CBP	CREB <i>binding protein</i>
cDNA	<i>complementary DNA</i>
cGMP	<i>cyclic guanosine monophosphate</i>
cm	Zentimeter
CMV	Cytomegalie-Virus
CMV-P	CMV Promotor
CP2	<i>transcription factor CP2, TFCP2</i>
CRE	<i>cAMP response element</i>
CREB	<i>cAMP response element binding protein</i>
C-terminal	Carboxyterminal
Cys	Cystein
DAPI	4',6-Diamidin-2-phenylindol
DBD	DNA-Bindungsdomäne
DD	Dimerisierungsdomäne
DED	<i>death effector domain</i>
dH ₂ O	demineralisiertes Wasser
DISC	<i>death inducing signaling complex</i>
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle's Medium
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DNase	Desoxyribonuklease

dNTP	Desoxynukleotidtriphosphat
DTT	Dithiothreitol
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EBM	Endotheliales Basalmedium
EDTA	Ethylendiamin-N,N,N',N'-tetraazetat
Elf3	<i>E74-like factor 3</i>
ENG	Endoglin
eNOS	Endotheliale Stickstoffmonoxid Synthase
<i>et al.</i>	<i>et alias</i> (und andere)
EtOH	Ethanol
FACS	<i>fluorescence activated cell sorting</i>
FasL	Fas-Ligand
FCS	fötales Kälberserum
Fos	FBJ murine osteosarcoma viral oncogene homolog
g	Gramm
GAPDH	Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase
GAPDH	Glyzerinaldehyd-3-Phosphate-Dehydrogenase
Gas6	<i>growth arrest specific 6</i>
GFP	Grün fluoreszierendes Protein
Gpxs	Gluthathionperoxidasen
GRH	<i>Grainyhead</i>
GRHL	<i>Grainyhead-like</i>
Grxs	Glutaredoxine
GSH	Gluthathion
h	Stunde
H ₂ O ₂	Wasserstoffperoxid
HEK	Human Embryonic Kidney cells
His	Histidin
HRP	<i>horseradish peroxidase</i>
IF	Immunfluoreszenz
IκB	<i>inhibitor of κB</i>
Jun	jun proto-oncogene
K	Lysin
Kap.	Kapitel
kb	Kilobase
kDa	Kilodalton
kPa	Kilopascal
LB	Lysogeny broth
LBP-1a	<i>upstream binding protein 1</i> , UBP1
LBP-9	<i>transcription factor CP2-like 1</i> , TFCP2L1
L-NAME	L-N ^G -Nitroarginine Methyl Ester
L-NMMA	N ^G -Monomethyl-L-Arginin
LV	Leervektor
M	Molar

m-	milli (10 ⁻³)
Max	MYC <i>associated factor X</i>
MGR	Mammalian Grainyhead
min	Minuten
MKP-3	MAP Kinase Phosphatase-3
MLCK	<i>myosin light chain kinase</i>
MOPS	3-(N-Morpholino)-Propansulfonsäure
MP	Milchpulver
mRNA	<i>messenger RNA</i>
MXI1	MAX <i>interactor 1</i>
myc	<i>v-myc avian myelocytomatosis viral oncogene homolog</i>
n-	nano (10 ⁻⁹)
NaCl	Natriumchlorid
NeoR	Neomycinresistenzgen
NF-κB	<i>nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells</i>
NLS	nukleäres Lokalisationssignal
nm	Nanometer
NO	Stickstoffmonoxid
Noxs	NADPH Oxidasen
Nrf2	<i>nuclear factor, erythroid 2-like 2</i>
N-terminal	Aminotermal
O ₂ ⁻	Superoxid-Anion
OD	optische Dichte
OH ⁻	Hydroxyl-Radika
ori	Origin of Replication
p.a.	pro analysis
PAA	Polyacrylamid
PBS	Phosphat buffered saline
PCR	<i>Polymerase chain reaction</i>
PI	Propidium Iodid
Prxs	Peroxiredoxine
PTEN	<i>phosphatase and tensin homolog</i>
PVDF	Polyvenylidenfluorid
R	Arginin
RbCl	Rubidiumchlorid
RelA	<i>nuclear factor κB p65</i>
RIPA	Radioimmunoprecipitation assay
RLB	Reporter-Lysis-Buffer
RNA	Ribonukleinsäure
ROS	Reaktive Sauerstoffspezies
RT-PCR	Reverse Transkriptions-PCR
SDS	Sodium dodecyl sulfate (Natriumdodecylsulfat)
sGC	<i>soluble guanylyl cyclase</i>
siRNA	<i>small interfering RNA</i>

SODs	Superoxiddismutasen
SOM	Sister-of-Mammalian Grainyhead
SOX9	SRY- <i>box</i> 9
SRSF1	Serin-/Arginin-reiche Spleißfaktor
SRY	<i>sex determining region Y</i>
STAT	Signal Transducers and Activators of Transcription
SV40	Simian Virus 40
SV40-P	SV40 <i>early</i> Promotor
TAM	Tyro3-Axl-Mer
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
TNFR1	<i>tumor necrosis factor receptor 1</i>
TOPOI	Topoisomerase I
TRADD	TNFR1- <i>associated-DD</i>
Tris	Tris-(hydroxymethyl-aminomethan
Trxs	Thioredoxine
U	Unit
UpM	Umdrehungen pro Minute
UV	Ultraviolett
V	Volt
v/v	Volumen pro Volumen
VEGFA	<i>vascular endothelial growth factor A</i>
VEGFR2	VEGF-Rezeptor 2
w/v	Gewicht pro Volumen
WB	Westernblot
wt	Wildtyp
xg	x-fache der Erdbeschleunigung
XO	Xanthinoxidase
z.B.	zum Beispiel

1 Einleitung

1.1 Kardiovaskuläres System

Das kardiovaskuläre System besteht aus dem Herzen und den Blutgefäßen. Für eine optimale Versorgung der Organe werden täglich ca. 7000 Liter Blut durch die Gefäße gepumpt. Über das Blut als Transportmedium werden Sauerstoff und Nährstoffe zu den Organen und Kohlenstoffdioxid und andere Abbauprodukte des Stoffwechsels zu den exkretorischen Entsorgungsorganen transportiert. Dabei findet der Metabolitaustausch über die Gefäßwand statt. Blutgefäße können eingeteilt werden in Arterien, Venen und Kapillaren. Arterien, die das sauerstoffreiche Blut vom Herzen zu den Organen transportieren, haben eine sehr stark ausgeprägte Muskelzellschicht um den Druckänderungen im Gefäßsystem Stand zu halten. Venen, die das sauerstoffarme Blut zum Herzen zurück transportieren, haben im Vergleich dazu nur eine dünne Muskelschicht. Die Kapillaren als kleinste Gefäße im menschlichen Organismus mit einem Durchmesser von etwa 6 μm besitzen keine Muskelzell- und Bindegewebsschicht.

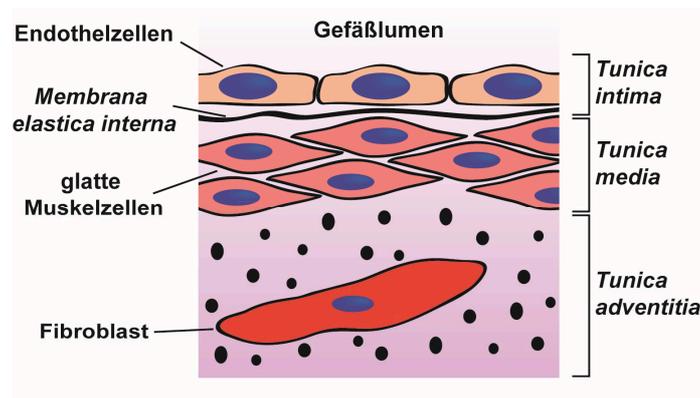


Abbildung 1.1: Aufbau der Gefäßwand. Dargestellt ist der Querschnitt durch ein Blutgefäß mit den verschiedenen Schichten (*Tunica intima*, *Tunica media* und *Tunica adventitia*) und den charakteristischen Zelltypen (Endothelzellen, glatte Muskelzellen und Fibroblasten). Die *Membrana elastica interna* ist die Grenzschrift zwischen Endothelzellen und der Muskulatur und gehört zu der *Tunica intima*.

Abbildung 1.1 zeigt schematisch den Aufbau einer Arterie. Die äußerste Schicht (*Tunica adventitia*) ist eine Bindegewebsschicht aus Fibroblasten, elastischen Fasern und Kollagenfasern. Darauf folgt eine Schicht aus glatten Muskelzellen (*Tunica media*) und im Inneren als Grenzschrift zum Blut ein Monolayer aus Plattenepithelzellen, die sogenannten Endothelzellen (*Tunica intima*).

1.2 Physiologische Funktionen des Endothels und die Rolle von NO als regulatorisches Signalmolekül

Das Endothel als direkte Grenzschrift zwischen zirkulierendem Blut und dem umgebenden Gewebe, spielt eine wichtige Rolle bei vielen physiologischen Prozessen, wie der Aufrechterhaltung des Gefäßtonus, Hämostase, Thrombozyten-Aggregation und Angiogenese. Lange Zeit wurde vermutet, dass das Endothel ausschließlich eine inerte Barrierefunktion hat. Im Jahr 1980 wurde erstmalig eine Endothel-abhängige Vasodilatation als Antwort auf Acetylcholin beschrieben (Furchgott und Zawadzki, 1980). Erst später stellte sich heraus, dass es sich bei dem Relaxation-auslösenden Signalmolekül um Stickstoffmonoxid (NO) handelt. NO wird im Endothel durch die endotheliale NO-Synthase (eNOS) synthetisiert, die die Umsetzung von L-Arginin zu L-Citrullin und NO katalysiert. Die Aktivierung der eNOS kann auf verschiedenen Wegen erfolgen, entweder über die Schubspannung, die durch den Blutfluss an der Gefäßwand entsteht, oder durch Mediatoren, wie Acetylcholin oder Bradykinin, die durch Bindung an Membranrezeptoren intrazelluläre Signale weiterleiten. Aus dem Endothel wird das gebildete NO unter anderem in die glatten Muskelzellen entlassen und aktiviert dort die lösliche Guanylatzyklase (sGC, *soluble guanylyl cyclase*), die dann den Botenstoff zyklisches Guanosinmonophosphat (cGMP, *cyclic guanosine monophosphate*) synthetisiert. Diese Signalkaskade führt zu einer Verringerung der intrazellulären Kalziumkonzentration, was wiederum die Aktivität der Myosin Leichtketten Kinase (MLCK, *myosin light chain kinase*) reduziert. Die MLCK aktiviert die Vasokonstriktion durch Phosphorylierung des Motorproteins Myosin, dementsprechend führt eine verminderte Aktivität des Enzyms zur Vasodilatation.

Eine weitere Funktion des Endothels ist die Regulation der Hämostase und der Thrombozyten-Aggregation. Als Hämostase wird der physiologisch ablaufende

Abwehrmechanismus gegen Blutungen bei Gefäßverletzungen bezeichnet. Dabei wird über intrinsische und extrinsische Koagulationskaskaden die Blutung gestoppt und die Voraussetzung für eine Wundheilung geschaffen. Diesem koagulativen System wirkt das Endothel unter physiologischen Bedingungen entgegen, indem es antikoagulative Substanzen produziert und durch die Freisetzung von Prostacyclinen und NO in das Gefäßlumen die Adhäsion und Aggregation von Monozyten und Thrombozyten verhindert. Ein Ungleichgewicht zwischen dem koagulativen und antikoagulativen System kann zur Thrombosebildung führen, bei der aggregierte Thrombozyten ein Blutgerinnsel bilden, das den Blutfluss stört und zu Herzinfarkt oder Schlaganfall führen kann.

Auch bei der Angiogenese nehmen die Endothelzellen eine wichtige Stellung ein. Dieser Prozess beschreibt die Neubildung von Gefäßen, bei der es nach einer Vasodilatation und anschließender Permeabilisierung und Destabilisierung der Gefäßwand zum sogenannten *Sprouting* kommt. Die Angiogenese ist ein komplexes Zusammenspiel von pro- und antiangiogenen Signalkaskaden und spielt z.B. bei Entwicklungsprozessen eine entscheidende Rolle. Im ausgewachsenen Menschen findet die Angiogenese unter physiologischen Bedingungen nur bei der Wundheilung und dem Menstruationszyklus statt. Eines der wichtigsten Signalmoleküle für die Initiation der Angiogenese ist der Wachstumsfaktor VEGFA (*vascular endothelial growth factor A*), der durch Bindung an den VEGF-Rezeptor 2 (VEGFR2) zum einen die Vasodilatation durch eNOS Aktivierung auslöst und zum anderen die Proliferation und Migration der Endothelzellen stimuliert (Klagsbrun und D'Amore, 1996).

Die verschiedenen Funktionen des Endothels machen deutlich, dass eine endotheliale Dysfunktion bei vielen kardiovaskulären Erkrankungen eine entscheidende Rolle spielt. Die eingeschränkte Funktionalität des Endothels wird unter anderem durch eine verringerte Migrationskapazität und erhöhte Apoptosesensitivität der Endothelzellen charakterisiert und ist mit einer erhöhten Produktion an reaktiven Sauerstoffspezies (ROS, *reactive oxygen species*) und einer verringerten NO-Bioverfügbarkeit assoziiert.

ROS entstehen als Zwischenprodukte bei der Reduktion von Sauerstoff zu Wasser. Dazu zählen unter anderem das Superoxid-Anion (O_2^-), Wasserstoffperoxid (H_2O_2) und das Hydroxyl-Radikal (OH^\cdot). Durch die hohe Reaktivität dieser Moleküle kann es zu einer Oxidation biologischer Makromoleküle, wie z.B. Proteinen, Lipiden und DNA,

kommen, wodurch eine zum Teil irreversible Zellschädigung entsteht. Dem gegenüber stehen die physiologischen Funktionen von ROS als Signalmoleküle bei der Regulation intrazellulärer Signalkaskaden (Bae *et al.*, 2011; Taniyama und Griendling, 2003). So können z.B. durch die Modulation von Phosphatasen und Kinasen verschiedene Signalwege aktiviert oder deaktiviert werden und auch die Regulation von Transkriptionsfaktoren durch Redox-Reaktionen hat einen Einfluss auf die Genexpression (Lukosz *et al.*, 2010).

Zu den physiologisch relevanten endogenen ROS Quellen zählen die NADPH Oxidasen (Noxs), Xanthinoxidase (XO) und die mitochondrielle Atmungskette. Vorwiegend sind die Noxs Familienmitglieder für die Produktion von Superoxid-Anionen verantwortlich, was im Endothel vor allem durch die Nox4 erfolgt (Bedard und Krause, 2007; Takac *et al.*, 2012). Ebenso werden Superoxid-Anionen als Nebenprodukte bei der durch XO katalysierten Oxidation von Hypoxanthin und Xanthin zu Harnsäure und bei der mitochondriellen Zellatmung in den Komplexen I und III generiert. Um eine unkontrollierte Akkumulation von ROS in den Zellen zu verhindern, besitzen diese für den Abbau von ROS antioxidative Systeme, wie z.B. die Superoxiddismutasen (SODs), Katalase, Gluthathionperoxidasen (Gpxs), Gluthathion (GSH), Glutaredoxine (Grxs), Peroxiredoxine (Prxs) und Thioredoxine (Trxs). Superoxid-Anionen werden durch die SOD zu H_2O_2 reduziert, welches dann durch die Katalase zu Wasser und molekularem Sauerstoff umgewandelt wird. Ebenso kann die Reduktion von H_2O_2 durch die Gpxs unter der Oxidation von GSH zu Glutathiondisulfid (GSSG) erfolgen. Anschließend wird GSH durch die NADPH-abhängige Gluthationreduktase regeneriert.

Die antioxidativen Moleküle Grxs, Prxs und Trxs regulieren den Redox-Status meistens durch die Reduktion von Proteinen. Diese Redoxregulatoren besitzen mindestens ein Cystein in ihrem katalytischen Zentrum, das durch Oxidation mit benachbarten Cysteinresten kovalente Disulfidbrücken bilden kann. Durch die Disulfidbrückenbildung reagieren die Regulatoren mit vielen oxidierten Proteinen, um deren reduzierten Zustand wiederherzustellen (Hanschmann *et al.*, 2013).

Wenn das Gleichgewicht zwischen oxidativen und antioxidativen System gestört ist spricht man von oxidativem Stress. Diese durch eine erhöhte ROS Produktion gekennzeichnete Stoffwechsellaage hat wiederum einen Einfluss auf die eNOS Aktivität und somit auf die NO-Produktion. Ein essentieller Cofaktor für die

katalytische Umsetzung von Arginin zu NO ist das Tetrahydrobiopterin (BH₄) (Alp und Channon, 2004). Bei oxidativen Stress wird BH₄ zu Dihydrobiopterin (BH₂) oxidiert, wodurch der Cofaktor für die NO-Produktion nicht mehr zur Verfügung steht und weniger NO generiert wird (Dumitrescu *et al.*, 2007). Als weitere Ursachen für eine verringerte NO Bioverfügbarkeit werden eine verminderte RNA Stabilität, Proteinmenge und Aktivierung der eNOS beschrieben, was ebenfalls in einer reduzierter NO Menge resultiert (Bloch, 1999; Chou *et al.*, 1998; Mount *et al.*, 2007).

In gealterten Endothelzellen werden eine verringerte NO-Bioverfügbarkeit und eine erhöhte Sensitivität der Endothelzellen gegenüber apoptotischer Stimuli beobachtet. Diese verringerte NO Menge bedingt, dass das Cys-163 in der katalytischen Untereinheit p17 der zentralen Caspase 3 weniger S-nitrosiert vorliegt und es daher zu einer gesteigerten Caspase 3 Aktivität kommt (Hoffmann *et al.*, 2001). Zudem konnte für NO gezeigt werden, dass es die enzymatische Aktivität von Thioredoxin-1 (Trx-1) durch S-Nitrosierung an Cys-69 und Cys-73 reguliert. Die Nitrosierung an Aminosäureposition 69 erhöht dabei die katalytische Aktivität des Enzyms (Haendeler *et al.*, 2002), während das NO von dem S-nitrosierten Cys-73 in einer Transnitrosierungsreaktion auf das Cys-163 der Caspase 3 übertragen werden kann und somit vor Apoptose schützt (Mitchell und Marletta, 2005).

1.3 Apoptose

Die Induktion von Apoptose durch verringertes NO stört die Integrität der Endothelzellschicht (Dimmeler *et al.*, 1997) und ist daher ein wichtiger Prozess sowohl bei der Gefäßalterung, als auch den dadurch bedingten Herz-Kreislaufkrankungen. Bereits im Jahr 2000 konnte in einer Primatenstudie mit Langschwanzmakaken (*Macaca fascicularis*) ein Zusammenhang zwischen Altern und Apoptose festgestellt werden (Asai *et al.*, 2000). Der Vergleich von jungen und alten Affen zeigte, dass in den Endothelzellen alter Affen die Apoptoserate stark erhöht ist. Auch in humanen Endothelzellen konnte gezeigt werden, dass gealterte Zellen eine erhöhte Sensitivität gegenüber apoptotischen Stimuli haben (Hoffmann *et al.*, 2001). Hier zeigte der Vergleich von jungen und alten Endothelzellen, dass alte Endothelzellen bei Behandlung mit Apoptose-induzierenden Stimuli eine erhöhte Apoptoserate aufweisen. Des Weiteren wurde gezeigt, dass sowohl die Aktivierung

als auch die Proteinmengen der Enzyme eNOS und Protein Kinase B (Akt) in gealterten Endothelzellen erniedrigt sind und die dadurch bedingte Verringerung der NO Menge mit einer erhöhten Apoptose im Alter zusammenhängt.

Unter physiologischen Bedingungen dient die Apoptose als protektiver Mechanismus dazu, die Akkumulation und Ausbreitung defekter Zellen zu reduzieren. Dementsprechend kann eine zu geringe Apoptose die Anzahl defekter Zellen erhöhen.

Morphologisch lässt sich die Apoptose in drei Phasen unterteilen (Messam und Pittman, 1998). In der ersten Phase sind die Zellen morphologisch unauffällig. In der darauf folgenden zweiten Phase kommt es dann ganz charakteristisch zu einer Bläschenbildung (*membrane blebbing*) und der Abschnürung von Vesikeln (*apoptotic bodies*). In den *apoptotic bodies* erfolgt eine Umverteilung der Membranproteine und Phospholipide, wodurch unter anderem Phosphatidylserine auf die Außenseite der Membran gelangen. Diese werden in der letzten Phase von benachbarten Zellen und Makrophagen über Rezeptorbindung erkannt und führen zur Phagozytose. Auf molekularer Ebene wird durch extrinsische oder intrinsische Signalwege die Caspasen-Kaskade aktiviert. Die für die morphologischen Veränderungen verantwortlichen Caspasen sind Proteasen, die ein Cystein im aktiven Zentrum enthalten und ihre Zielproteine an Asparaginsäureresten spalten. Dabei werden Initiator Caspasen (Caspase 2, 8, 9, 10) und Effektor Caspasen (Caspase 3, 6, 7) unterschieden. Die inaktiven Procaspasen besitzen alle eine große und eine kleine katalytische Untereinheit. Die Initiator Caspasen tragen N-Terminal zusätzlich eine lange Prodomäne, die als CARD (*caspase recruitment domain*) bei Caspase 2 und 9 oder DED (*death effector domain*) bei Caspase 8 und 10 bezeichnet wird (Lavrik *et al.*, 2005). Die Prodomänen der Initiator Caspasen können mit komplementären Domänen auf Adapterproteinen interagieren und aktivieren eine Autoproteolyse. Durch proteolytische Spaltung der Procaspasen bildet sich ein katalytisch aktives heterotetrameres Enzym mit je zwei kleinen und zwei großen Untereinheiten (Reed, 2000). Die aktivierten Initiator Caspasen aktivieren dann wiederum kaskadenartig die Effektor Caspasen. Für die Apoptose in Endothelzellen hat vor allem die Effektor Caspase 3 eine zentrale Rolle, die viele strukturelle und funktionell wichtige Proteine spaltet.

Die extrinsische Aktivierung der Caspasen wird über membranständige „Todesrezeptoren“ vermittelt, die zu der TNF- α -Rezeptorfamilie gehören, wie z.B. der Fas-Rezeptor oder der TNFR1 (*tumor necrosis factor receptor 1*) (Baker und Reddy, 1998; Higuchi *et al.*, 2004). Der Fas-Rezeptor wird durch Interaktion mit dem Fas-Liganden (FasL) aktiviert, was auf der intrazellulären Seite des Rezeptors zur Bindung des Fas-assoziierten-Proteins mit Todesdomäne (FADD, *Fas-associating protein with death domain*) führt (Chinnaiyan *et al.*, 1995; Juo *et al.*, 1999). Die am N-terminalen Ende von FADD lokalisierte DED ist dann in der Lage mit der DED der Procaspase 8 bzw. 10 zu interagieren und bilden den DISC-Komplex (*death inducing signaling complex*) (Gupta, 2001). Durch die Ausbildung des DISC-Komplexes werden die Caspasen 8 bzw. 10 und somit die Caspasen-Kaskade aktiviert. Vergleichbar mit dem Fas-Rezeptor bindet TNFR1 den Liganden TNF α und führt durch Interaktion mit dem Adapterprotein TRADD (*TNFR1-associated-DD*), ebenfalls zur Aktivierung der Caspasen-Kaskade (Ashkenazi und Dixit, 1998).

Die intrinsische Aktivierung der Apoptose erfolgt über eine Permeabilisierung der Mitochondrienmembran. Unter normalen Bedingungen stabilisieren die antiapoptotischen Mitglieder der BCL-2 Familie (BCL-2 und BCL-X_L) die Mitochondrienmembran durch Komplexierung der Proteine BAX und BAK. Die aktive Caspase 8 ist in der Lage das proapoptotisch wirkende Protein BID aus der BCL-2 Familie zu aktivieren, welches dann in die mitochondrielle Außenmembran translozieren kann und mit BCL-2 und BCL-X_L einen Komplex bildet (Li *et al.*, 1998). Dadurch werden BAX und BAK frei und formen einen Kanal (Antonsson *et al.*, 2000; Antonsson *et al.*, 2001). Durch diese Kanalbildung werden aus dem Intermembranraum der Mitochondrien verschiedene Proteine, wie z.B. Cytochrom C oder der Apoptose-induzierende Faktor (AIF) frei (Kroemer und Martin, 2005), die über Ausbildung des Apoptosom-Komplexes die Caspasen-Kaskade aktivieren.

Sowohl über den intrinsischen, als auch extrinsischen Signalweg wird durch die Aktivierung der Caspase 3 und anderen Effektor Caspasen die gleiche Endstrecke aktiviert. Diese führt letztendlich zur Aktivierung von DNAsen (*caspase activated DNase*, CAD), die zu einer Fragmentierung der DNA und somit zum Zelltod führen (Green und Kroemer, 1998).

1.4 Der Transkriptionsfaktor GRHL3 und seine Funktionen im Endothel

1.4.1 Aufbau, Einteilung und Regulation von Transkriptionsfaktoren

Transkriptionsfaktoren werden in generelle und spezifische Transkriptionsfaktoren unterteilt. Die generellen Transkriptionsfaktoren bilden zusammen mit der DNA-Polymerase die basale Transkriptionsmaschinerie, die für jede Transkription erforderlich ist. Im Gegensatz dazu können spezifische Transkriptionsfaktoren durch die gezielte Bindung an *cis*-regulatorische Elemente auf der DNA die Expression von multiplen Zielgenen regulieren. Dabei werden Haushaltsgene, deren Produkte permanent in der Zelle benötigt werden, konstitutiv exprimiert, während die Expression anderer Gene durch extrazelluläre Stimuli gezielt ein- oder ausgeschaltet werden kann.

Prinzipiell sind Transkriptionsfaktoren modular aus verschiedenen funktionellen Domänen aufgebaut. Dabei unterscheidet man die DNA-Bindedomäne, Aktivierungsdomänen und regulatorische Domänen. Hier ist zu erwähnen, dass zum einen die Anordnung der Domänen innerhalb eines Proteins variieren kann und zum anderen mehrere Aktivierungsdomänen und regulatorische Domänen in einem Transkriptionsfaktor enthalten sein können. Außerdem besitzen Transkriptionsfaktoren, die eine Funktion als Repressor haben keine Aktivierungsdomäne und können über bestimmte Proteinbereiche mit Corepressoren interagieren. Ebenso gibt es eine Gruppe von Repressorkomplexen, die keine eigene DNA-Bindedomäne besitzen und über die Interaktion mit Sequenz-spezifischen DNA-bindenden Proteinen die Transkription regulieren.

Die Sequenz-spezifische Erkennung und Bindung der DNA erfolgt über die DNA-Bindedomäne. Anschließend wird die Transkription durch die Interaktion mit Coaktivatoren oder Corepressoren reguliert. Diese Interaktionen können die Initiationsrate der Transkription sowohl positiv, im Fall von Transkriptionsaktivatoren, als auch negativ, im Fall von Repressoren beeinflussen.

Transkriptionsfaktoren können anhand der Struktur der stark konservierten DNA Bindedomänen in 9 Superklassen eingeteilt werden (Wingender *et al.*, 2013). Im Vergleich dazu sind die Aktivierungsdomänen nicht konserviert. Hier unterscheidet

man je nach Aminosäurezusammensetzung saure, Glutamin-reiche und Prolin-reiche Aktivierungsdomänen. Für die Regulation der Transkriptionsfaktoraktivität gibt es verschiedene Mechanismen, die im Folgenden näher erläutert werden.

Der Transkriptionsprozess findet im Zellkern statt, daher ist für die Aktivierung der Genexpression eine nukleäre Lokalisation der Transkriptionsfaktoren entscheidend. Für die Translokation in den Zellkern besitzen Proteine ein nukleäres Lokalisationssignal (NLS), das ganz charakteristisch aus basischen Aminosäuren aufgebaut ist, wobei hier wiederum einteilige und zweiteilige (*bipartite*) NLS unterschieden werden (Kosugi *et al.*, 2009). Ein Beispiel für einen Transkriptionsfaktor, der über seine zelluläre Lokalisation reguliert wird, ist *nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells* (NF- κ B). Im Zytoplasma liegt NF- κ B in inaktiver Form gebunden an den *inhibitor of κ B* (I κ B) vor. Durch verschiedenste extrazelluläre Signale kommt es zur Phosphorylierung und proteasomalen Degradation des Inhibitors (Chen *et al.*, 1995). Dabei wird in dem Transkriptionsfaktor ein NLS zugänglich, wodurch NF- κ B in den Zellkern transloziert wird und dort die Genexpression aktivieren kann (Beg *et al.*, 1992).

Ein weiterer häufig vorkommender Regulationsmechanismus zur Regulation der Transkriptionsfaktoraktivität ist die Dimerisierung. So können z.B. die Transkriptionsfaktoren der AP-1 (*activator protein-1*) Familie, zu denen die Mitglieder der Subfamilien Jun (*jun proto-oncogene*), Fos (*FBJ murine osteosarcoma viral oncogene homolog*) und ATF (*activating transcription factor*)/CREB (*cAMP response element binding protein*) gezählt werden, die über die Bildung von Homo- und Heterodimeren die Genexpression regulieren. Die Mitglieder der Fos Familie selbst können keine stabilen Homodimere bilden. Im Gegensatz dazu kann Jun entweder mit einem weiteren Jun ein Homodimer (Jun/Jun) oder mit Fos ein Heterodimer (Jun/Fos) bilden (Angel und Karin, 1991). Beide Dimere erkennen dieselbe DNA-Sequenz, wobei die Affinität des Heterodimers stärker ist als die des Homodimers. Weiterhin kann Jun mit den Mitgliedern der ATF/CREB Subfamilie dimerisieren. Diese Heterodimere binden an eine ähnliche, aber dennoch andere DNA-Sequenz als Jun/Fos Heterodimere (Hai und Curran, 1991). Außerdem ist es wie z.B. bei den Familienmitgliedern der STAT (*signal transducers and activators of transcription*)-Familie auch möglich, dass verschiedene Dimere innerhalb einer Familie komplett unterschiedliche DNA-Sequenzen erkennen (Aaronson und Horvath, 2002).

Neben einer aktivierenden Dimerisierung können Transkriptionsfaktoren auch mit Repressoren dimerisieren, wie z.B. bei der NF- κ B Familie (Barchowsky *et al.*, 2000; Wessells *et al.*, 2004). Eines der Heterodimere, die die Transkription aktivieren, besteht aus den Untereinheiten p65 und p50. Im Gegensatz dazu wirken p50 Homodimere reprimierend auf die Transkription. Weiterhin ist bekannt, dass Transkriptionsfaktoren von einem Repressor zu einem Aktivator transformiert werden können. Ein Beispiel hierfür ist der Thyroid Hormonrezeptor, der nach Ligandenbindung im Gegensatz zum Liganden-freien Status nun nicht mehr mit Corepressoren, sondern mit Coaktivatoren interagieren kann (Hu und Lazar, 2000).

Weiterhin können Transkriptionsfaktoren durch posttranslationale Modifikationen reguliert werden. Eine der häufigsten Modifikationen, die nicht nur von Transkriptionsfaktoren verwendet werden, ist die Phosphorylierung. Ein in der Literatur sehr gut beschriebenes Beispiel ist der Transkriptionsfaktor CREB. CREB ist ubiquitär exprimiert und bindet unter nicht stimulierten Bedingungen konstitutiv an die CRE (*cAMP response element*) Sequenz auf der DNA. Durch extrazelluläre Stimuli werden verschiedene Signalkaskaden in der Zelle eingeschaltet, die zu einer Phosphorylierung von CREB führen. Diese Phosphorylierung ermöglicht dann die Interaktion mit dem Cofaktor CBP (*CREB binding protein*). Dieser kann direkt oder indirekt mit den generellen Transkriptionsfaktoren interagieren und darüber die Transkription verstärken (Nakajima *et al.*, 1997). Es gibt jedoch noch viele weitere Modifikationen, die unter anderem den Transkriptionsfaktor selber z.B. durch Acetylierung/Deacetylierung stabilisieren oder die intrazelluläre Proteinmenge z.B. durch Ubiquitinierung regulieren. Beispielsweise verhindert die Acetylierung des Transkriptionsfaktor RelA (*nuclear factor* κ B p65), der zu der NF- κ B Familie gehört, die Ubiquitinierung des Transkriptionsfaktors (Li *et al.*, 2012). Die Akzeptorstelle für die Ubiquitinierung ist in dem Bereich, wo auch die Acetylierung stattfindet, somit kann der acetylierte Transkriptionsfaktor nicht ubiquitiniert werden, was zu einer Stabilisierung des Proteins führt.

Die Expression eines Gens wird durch die Kombination verschiedener Transkriptionsfaktoren reguliert. Dabei ermöglichen die verschiedenen Kombinationsmöglichkeiten und ihre Regulationsprinzipien eine differenzielle Genexpression und bestimmen wann, wo und wie stark ein Gen exprimiert wird.

1.4.2 Die Familie der Grainyhead Transkriptionsfaktoren

Grainyhead (*grh*)- und *Grainyhead-like* (*grhl*) Gene kodieren für eine Familie von Transkriptionsfaktoren, die evolutionär stark konserviert sind. Als erstes Mitglied dieser Proteinfamilie wurde Grainyhead (GRH) aus der Taufliege *Drosophila melanogaster* identifiziert, welches ursprünglich auch als Elf-1 (*E74-like factor1*) oder NTF-1 (*neuronal transcription factor 1*) bezeichnet wurde. Dabei hat der Name Grainyhead seinen Ursprung in dem Phänotyp von *grh*-defizienten Fliegen, welcher vor allem durch eine diskontinuierliche und granuläre Kopfstruktur charakterisiert ist (Bray und Kafatos, 1991; Nusslein *et al.*, 1984).

In Säugern sind insgesamt sechs verschiedene Familienmitglieder bekannt, die aufgrund der phylogenetischen Verwandtschaft in zwei Subfamilien eingeteilt werden (Abbildung 1.2) (Ting *et al.*, 2003b; Wilanowski *et al.*, 2002). Die erste Subfamilie besteht aus den Transkriptionsfaktoren CP2 (*transcription factor CP2*, TFCP2), LBP-1a (*upstream binding protein 1*, UBP1) und LBP-9 (*transcription factor CP2-like 1*, TFCP2L1), die alle Homologe des *Drosophila* Proteins dCP2 sind. Die zweite Subfamilie setzt sich aus den Grainyhead-Homologen Grainyhead-like 1 (GRHL1)/Mammalian Grainyhead (MGR), Grainyhead-like 2 (GRHL2)/Brother-of-Mammalian Grainyhead (BOM) und Grainyhead-like 3 (GRHL3)/Sister-of-Mammalian Grainyhead (SOM) zusammen.

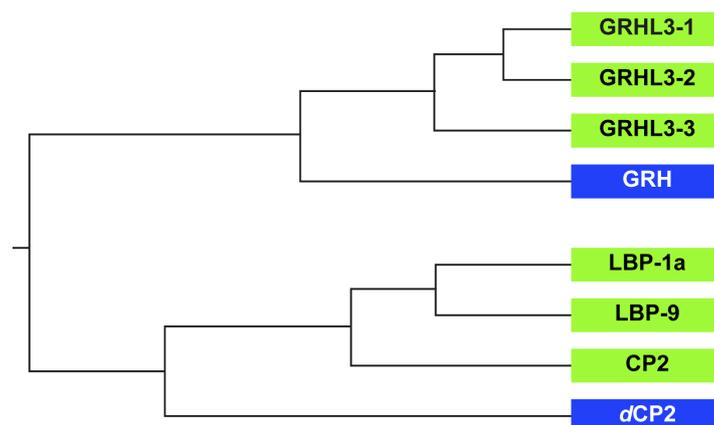


Abbildung 1.2: phylogenetischer Stammbaum der Grainyhead-Familie. Dargestellt sind die Verwandtschaftsverhältnisse der Grainyhead Proteine aus den Grainyhead- und CP2-Subfamilien. Die *Drosophila*-Proteine sind blau und die humanen Homologe grün unterlegt. (modifiziert nach Ting *et al.* (Ting *et al.*, 2003b))

Die GRH und GRHL Transkriptionsfaktoren sind einheitlich aufgebaut mit einer N-terminalen Aktivierungsdomäne, einer zentral liegenden DNA-Bindedomäne und einer C-terminalen Dimerisierungsdomäne (Attardi und Tjian, 1993; Ting *et al.*, 2003b; Uv *et al.*, 1994; Wilanowski *et al.*, 2002). Vor allem in dem Bereich der DNA-Bindedomäne und Dimerisierungsdomäne weisen die Sequenzen untereinander eine hohe Konservierung auf (Ting *et al.*, 2003b; Wilanowski *et al.*, 2002).

Für das Gründungsmitglied der GRH Familie wurde eine Isoleucin-reiche Aktivierungsdomäne nachgewiesen (Attardi und Tjian, 1993), die bei den Säugerhomologen GRHL1, 2 und 3 nicht enthalten ist, da diese im Vergleich zu GRH einen viel kürzeren Aminoterminus besitzen. Jedoch konnte anhand einer N-Terminal verkürzten GRHL1-Isoform gezeigt werden, dass auch der N-Terminus der GRHL-Proteine aus Säugern für die Transaktivierung erforderlich ist (Wilanowski *et al.*, 2002). Diese Aktivierungsdomäne konnte anhand ihrer Konservierung auch bei dem Transkriptionsfaktor GRHL3 identifiziert und durch Transaktivierungsanalysen bestätigt werden (Ting *et al.*, 2003b).

Aufgrund der Primärstruktur ihrer DNA Bindedomäne werden GRH und die GRHL Proteine der Superklasse von Transkriptionsfaktoren mit einer *Immunoglobulin fold* Domäne zugeordnet (Wingender *et al.*, 2013). Für die C-terminale Dimerisierungsdomäne wurde gezeigt, dass die Mitglieder der GRHL-Subfamilie sowohl Homo-, als auch Heterodimere ausbilden (Ting *et al.*, 2003b; Wilanowski *et al.*, 2002). Eine Dimerisierung mit den Mitgliedern der CP2-Subfamilie konnte nicht nachgewiesen werden (Uv *et al.*, 1994).

1.4.3 Humane GRHL3 Isoformen

Die verschiedenen GRH-Homologe GRHL1, GRHL2 und GRHL3 sind alle in Vertebraten vorhanden. Zusätzlich sind im Menschen für den Transkriptionsfaktor GRHL3 insgesamt drei verschiedene Isoformen beschrieben: GRHL3-1 (SOM1), GRHL3-2 (SOM2) und GRHL3-3 (SOM3), die sich in der Nutzung der ersten drei Exons unterscheiden (Abbildung 1.3). GRHL3-2 verwendet im Vergleich zu den anderen beiden Isoformen ein anderes erstes Exon (Exon 1A). Die Isoformen GRHL3-1 und GRHL3-3 entstehen durch alternatives Spleißen eines von Exon 1B ausgehenden Primärtranskripts, wodurch bei der GRHL3-3 mRNA im Vergleich zu

Isoform 1 das Exon 2 nicht enthalten ist. Ausgehend von dem durch Isoform 1 genutzten Startcodon kommt es durch das fehlende Exon 2 im offenen Leseraster zu einem *frameshift*, weswegen bei Isoform 3 ein alternatives Startcodon in Exon 4 verwendet wird, das bei Isoform 1 für ein internes Methionin codiert. In der Maus wird im Vergleich zum Menschen nur die Isoform GRHL3-2 exprimiert, da das Exon 1B nicht im Mausgenom enthalten ist.

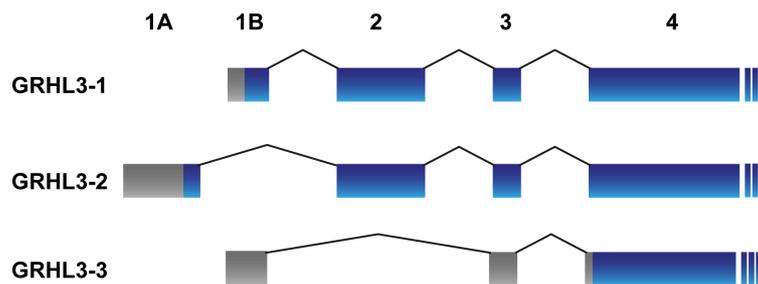


Abbildung 1.3: Struktur der menschlichen GRHL3 Transkripte und Isoformen. Dargestellt sind die ersten 4 Exons des humanen GRHL3-Gens und die durch Nutzung unterschiedlicher erster Exons und alternatives Spleißen entstehenden mRNAs. Die Zahlen bezeichnen die Exons im GRHL3 Locus, untranslatierte Bereiche sind in grau und translatierte Bereiche in blau dargestellt. (modifiziert nach Ting *et al.* (Ting *et al.*, 2003b))

Auf Proteinebene unterscheiden sich die Isoformen demensprechend ausschließlich in der N-terminalen Aminosäuresequenz (Abbildung 1.4) und ihrer Größe: GRHL3-1 (NP_067003.2): besteht aus 607 Aminosäuren (68,23 kDa), GRHL3-2 (NP_937816.1) aus 602 Aminosäuren (67,57 kDa) und GRHL3-3 (NP_937817.2) aus 509 Aminosäuren (56,93 kDa).

```

          10      20      30      40      50
          .      .      .      .      .
GRHL3-1 MWMNSILPIFLFRSVRLKNDPVNLQKFSYTSSEDAWKTYLENPLTAATK
GRHL3-2 -----MSNELDFRSVRLKNDPVNLQKFSYTSSEDAWKTYLENPLTAATK
GRHL3-3 -----
          .      .      .      .      .
          60      70      80      90     100
GRHL3-1 AMMRVNGDDDSVAALSFLYDYMGPKKRIILSSSTGGRNDQ GKRYYHGMME
GRHL3-2 AMMRVNGDDDSVAALSFLYDYMGPKKRIILSSSTGGRNDQ GKRYYHGMME
GRHL3-3 -----ME
          .      .      .      .      .
          110     120     130     140     150
GRHL3-1 YETDLTPLESPTHLMKFLTENASCTPEYPDLLKKNLMSLEGALPTPGKA
GRHL3-2 YETDLTPLESPTHLMKFLTENASCTPEYPDLLKKNLMSLEGALPTPGKA
GRHL3-3 YETDLTPLESPTHLMKFLTENASCTPEYPDLLKKNLMSLEGALPTPGKA

```

Abbildung 1.4: Primärstruktur des N-Terminus der humanen GRHL3 Isoformen.

Das Alignment zeigt den Vergleich der N-terminalen Aminosäuresequenzen von GRHL3-1, GRHL3-2 und GRHL3-3. Die sich unterscheidenden Aminosäuren bei GRHL3-1 (orange) und GRHL3-2 (rot) sind farblich markiert. Identische Aminosäuren in allen 3 Isoformen sind schwarz unterlegt. Das Alignment wurde erstellt mit Dialign und dargestellt mit GeneDoc.

Bei der ersten funktionellen Untersuchung der Isoformen wurden Fusionsproteine konstruiert, bei der die zuvor beschriebene konservierte Aktivierungsdomäne im N-terminalen Bereich der Isoformen 1 oder 2 oder die N-terminale Sequenz von GRHL3-3, welche diese Aktivierungsdomäne nicht besitzt, an die DNA-Bindedomäne des Transkriptionsfaktors GAL4 aus der Hefe *Saccharomyces cerevisiae* fusioniert wurden. Der Expressionsvektor für diese Fusionsproteine wurden mit einem Reportergenkonstrukt, das fünf konkatermerisierte GAL4 Bindestellen *upstream* zu einem CAT (Chloramphenicol Acetyltransferase) Gen besitzt, in HEK293T Zellen kotransfiziert (Ting *et al.*, 2003b). Hier wurde gezeigt, dass die Transkription des CAT Gens durch die konservierte Aktivierungsdomäne der Isoformen 1 und 2 aktiviert wird, während die N-terminale Sequenz von GRHL3-3 ohne diese Aktivierungsdomäne keine Transaktivierung zeigt. Diese Beobachtung führte zu der Hypothese, dass GRHL3-3 entweder als Repressor fungiert oder durch Heterodimerisierung mit GRHL3-1 dominant negativ wirkt. Die biologischen Funktionen dieser Isoformen wurden bisher noch nicht weiter untersucht.

1.4.4 Funktionen von GRHL3 im Endothel

Erste Untersuchungen in der Maus haben gezeigt, dass GRHL3 für die Entwicklung und Aufrechterhaltung der epidermalen Schutzschicht essentiell ist. Mausembryonen mit einem GRHL3 Knockout weisen einen Neuralrohrdefekt auf, der sich in Form eines offenen Rückens (*spina bifida*) äußert (Ting *et al.*, 2003a). Diese Mäuse sind nicht überlebensfähig und sterben kurz nach der Geburt. Weiterhin wurde gezeigt, dass in diesen GRHL3-defizienten Mäusen keine Wundheilung beim Setzen einer artifiziellen Wunde erfolgt (Ting *et al.*, 2005). Da für eine effiziente Barrierefunktion und Regenerierung der Epidermis die Migration von Keratinozyten essentiell ist (Peplow und Chatterjee, 2013), lieferten die zuvor gemachten Beobachtungen einen ersten Hinweis darauf, dass GRHL3 einen Einfluss auf die Migration hat. Die Bestätigung erfolgte *ex vivo* in einer humanen Keratinozytenzelllinie (HaCaT), bei der eine Depletion von GRHL3 zu einer verminderten Migrationsfähigkeit der Zellen führt (Caddy *et al.*, 2010).

In primären humanen Endothelzellen konnte die Expression des Transkriptionsfaktors ebenfalls nachgewiesen werden (Lukosz *et al.*, 2011). Hier wurde nach Überexpression von GRHL3 ein promigratorischer Effekt beobachtet, der mit der Migrationsinduktion durch VEGF, einem der potentesten Aktivatoren dieses Prozesses, vergleichbar ist (Guardiola-Serrano *et al.*, 2008). Nach Herunterregulation des endogenen Gens durch Knockdown konnte dann gezeigt werden, dass GRHL3 für die Endothelzellmigration notwendig ist, da schon unter basalen Bedingungen die Migration reduziert wurde (Lukosz *et al.*, 2011).

Da VEGF einen der wichtigsten Wachstumsfaktoren bei der Angiogenese darstellt und durch Aktivierung von verschiedenen Signalkaskaden zur Endothelzellmigration führt (Klagsbrun und D'Amore, 1996), wurde untersucht, ob dieser Wachstumsfaktor in den promigratorischen Effekt von GRHL3 involviert ist. Jedoch konnte gezeigt werden, dass die VEGF Spiegel durch GRHL3 nicht verändert werden (Lukosz *et al.*, 2011).

Neben VEGF spielt auch NO eine wichtige Rolle für die funktionelle Integrität des Endothels und ist in der Lage die Zellmigration unabhängig von VEGF zu induzieren (Urbich *et al.*, 2002). Physiologische NO-Konzentrationen haben einen promigratorischen und antiapoptotischen Effekt in Endothelzellen (Dimmeler *et al.*, 1999b; Haendeler *et al.*, 2002; Urbich *et al.*, 2002), und führen zudem zu einer erhöhten Transkriptmenge der GRHL3 mRNA (Lukosz *et al.*, 2011). Der Einfluss von

GRHL3 auf die NO-Produktion wurde über die Aktivierung der Proteinkinase B (Akt) und eNOS untersucht. Akt wird durch Phosphorylierung an Serin 473 aktiviert und ist dann in der Lage die NO-Produktion durch eine Phosphorylierung der eNOS an Serin 1179 zu erhöhen (Dimmeler *et al.*, 1999b). Nach Überexpression von GRHL3 in primären humanen Endothelzellen, konnte eine verstärkte Phosphorylierung und damit Aktivierung beider Proteine nachgewiesen werden (Lukosz *et al.*, 2011). Erhöhte Mengen an S-nitrosierten Proteinen bestätigten die gesteigerte NO-Produktion (Lukosz *et al.*, 2011). Zusätzlich wurde gezeigt, dass durch eine Reduktion der GRHL3 Genexpression die promigratorische Wirkung von NO aufgehoben wird (Lukosz *et al.*, 2011).

Bei Alterungsprozessen und der Ausbildung kardiovaskulärer Erkrankungen ist für die Integrität des Endothels neben einer funktionierenden Zellmigration, der Schutz vor Apoptose essentiell. Erste Hinweise auf eine Funktion von GRHL3 bei der Apoptose lieferte die Identifizierung des Transkriptionsfaktors in einem Screening für TNF α Zielgene (Guardiola-Serrano *et al.*, 2008). Weiterhin ist für die Proteine Akt und eNOS bekannt, dass sie Endothelzellen vor Apoptose schützen (Brazil *et al.*, 2002). Somit deutet die aktivierende Phosphorylierung dieser beiden Proteine durch GRHL3 auf eine protektive Funktion des Transkriptionsfaktors hin. Die antiapoptotische Wirkung von GRHL3 konnte nach Überexpression in primären humanen Endothelzellen bestätigt werden (Lukosz *et al.*, 2011). Durch Inhibierung der eNOS mit dem Inhibitor L-NMMA (N^G-Monomethyl-L-Arginin) wird dieser antiapoptotische Effekt komplett aufgehoben und ist somit ebenfalls von der eNOS-Aktivität abhängig (Lukosz *et al.*, 2011).

Zusammenfassend kann gesagt werden, dass GRHL3 durch die Induktion der Zellmigration und die Inhibierung der Apoptose eine wichtige protektive Funktion im Endothel hat, und dass diese in einem positiven Rückkopplungsmechanismus von eNOS und der NO-Produktion abhängig ist.

Da jedoch in humanen Zellen drei Isoformen von GRHL3 exprimiert werden (siehe Kap. 1.4.3), die alle in humanen Endothelzellen koexprimiert werden (Haendeler *et al.*, 2013), wurde in weiteren Studien die Transkriptionsaktivierung durch diese Isoformen untersucht.

Basierend auf einer ersten funktionellen Untersuchung der potentiellen Aktivierungsdomäne im N-Terminus war die Hypothese aufgestellt worden, dass GRHL3-3 entweder als Repressor fungiert oder durch Heterodimerisierung mit

GRHL3-1 die Transkriptionsaktivierung inhibiert (Ting *et al.*, 2003b). Jedoch konnte in unserer Arbeitsgruppe gezeigt werden, dass auch GRHL3-3 ein aktiver Transkriptionsfaktor ist (Haendeler *et al.*, 2013). Die von uns verwendete Nachweismethode der transkriptionellen Aktivierung beruht auf der Kotransfektion eines Expressionsplasmids für die komplette codierende Sequenz von GRHL3 mit einem GRHL3-spezifischen Luziferase-Reportergenkonstrukt. Dieses besitzt zwei Bindestellen für GRHL3 direkt *upstream* zu einem Minimalpromotor, so dass, anders als in dem experimentellen Ansatz von Ting *et al.* (Ting *et al.*, 2003b) nicht über Fusionen mit einer heterologen DNA-Bindedomäne gearbeitet werden muss, was die Situation in einer Säugerzelle wesentlich besser widerspiegelt. Die bisher beschriebenen GRHL3 Funktionen in der Apoptose und Migration von Endothelzellen bezieht sich auf die Isoform GRHL3-2, daher wurde im Folgenden die Rolle der Isoformen 1 und 3 bei der Migration genauer analysiert. Nach dem Expressionsnachweis der beiden Isoformen in humanen Endothelzellen, wurde in einem *Scratch wound* Assay die migratorische Wirkung der alternativ gespleißten Isoformen untersucht. Dabei zeigte sich, dass GRHL3-1 promigratorisch und GRHL3-3 antimigratorisch wirkt. Ebenso wie bei GRHL3-2 wurde anschließend untersucht, ob die unterschiedlichen Isoformen einen Einfluss auf die Aktivierung von Akt und eNOS haben. Nach Überexpression von GRHL3-1 konnte gezeigt werden, dass sowohl Akt, als auch eNOS verstärkt phosphoryliert und damit aktiviert werden. Im Gegensatz dazu wurde durch GRHL3-3 die Akt Phosphorylierung reduziert, zudem hatte die Überexpression keinen Effekt auf die eNOS Phosphorylierung. Die entgegengesetzten Funktionen der Isoformen 1 und 3 bei der Migration ließen vermuten, dass diese unterschiedliche Zielgene aktivieren. Die Analyse der von den beiden Isoformen abhängigen Genexpressionsprofile zeigte, dass diese vorwiegend unterschiedliche Zielgene haben (Haendeler *et al.*, 2013). Dabei wurden unter anderem die Proteine MXI1 (*MAX interactor 1*) und Akt2 identifiziert, die beide eine Rolle bei der Migration und Apoptose spielen. Zur Validierung wurde der Einfluss von GRHL3-1 und GRHL3-3 auf die Expression dieser Zielproteine untersucht. Nach Überexpression der Isoformen in humanen Endothelzellen, konnte gezeigt werden, dass GRHL3-1 die Expression beider Proteine hochreguliert, während Isoform 3 die Proteinspiegel reduziert.

1.5 Fragestellung

Aufgrund der zuletzt beschriebenen entgegengesetzten Funktionen von GRHL3-1 und GRHL3-3 bei der Zellmigration war das erste Ziel meiner Arbeit zu untersuchen:

- (1) welchen Einfluss die Isoformen GRHL3-1 und GRHL3-3 auf die Apoptose von Endothelzellen haben, und ob diese Funktionen, vergleichbar mit GRHL3-2, ebenfalls von der eNOS Aktivität abhängig sind (Haendeler *et al.*, 2013).

Im Weiteren sollte dann anhand der GRHL3-2 Isoform aufgeklärt werden, welche funktionellen Bereiche in dem Transkriptionsfaktor für den antiapoptotischen Effekt verantwortlich sind. Daher wurden als weitere Ziele meiner Arbeit folgende Fragestellungen bearbeitet:

- (2) Sind neben den durch Ting *et al.* vorhergesagten funktionellen Domänen, weitere funktionelle Bereiche in der GRHL3-2 Sequenz enthalten?
- (3) In welchem Bereich liegt das nukleäre Lokalisationssignal und welche Aminosäuren sind beteiligt?
- (4) Ist der durch GRHL3-2 vermittelte antiapoptotische Effekt von seiner Kernlokalisierung und der Funktion als Transkriptionsfaktor abhängig?

2 Material und Methoden

2.1 Materialien

2.1.1 Chemikalien

Das in den Versuchen eingesetzte Reinstwasser wurde mit Hilfe einer MilliQ-Anlage der Firma Merck Millipore (Darmstadt) hergestellt und wird im Folgenden mit dH₂O abgekürzt. Alle verwendeten Chemikalien waren von der Reinheit zur Analyse (p.a.) und wurden, wenn nicht anderes vermerkt, von den Firmen Sigma-Aldrich (München), Carl Roth (Karlsruhe) oder Merck Millipore (Darmstadt) verwendet.

2.1.2 Reagenzien und Enzyme

Tabelle 2.1: Enzyme

Enzyme	Hersteller
MyTaq™ HS DNA Polymerase	Bioline GmbH, Luckenwalde
Q5 Polymerase	New England Biolabs, Frankfurt
Restriktionsenzyme	New England Biolabs, Frankfurt
T4-DNA Ligase	New England Biolabs, Frankfurt
RNAse OUT	Life Technologies, Darmstadt

Tabelle 2.2: Transfektionsreagenzien

Transfektionsreagenzien	Hersteller
Lipofectamine® Transfection Reagent (bestehend aus Plus™ Reagent und Lipofectamine® Reagent)	Life Technologies, Darmstadt
Superfect®	Qiagen, Hilden
HiPerFect Transfection Reagent	Qiagen, Hilden

Tabelle 2.3: kommerzielle Puffer, Lösungen und Reagenzien

Puffer, Lösungen und Reagenzien	Hersteller
Amersham ECL Plus Western Blotting Detection Reagent	GE Healthcare Life Sciences, Freiburg
Amersham ECL Western Blotting Detection Reagent	GE Healthcare Life Sciences, Freiburg
cOmplete, Mini, Protease Cocktail	Roche Diagnostics, Mannheim
DAPI-Lösung (0,01% (w/v) 4',6-Diamidin-2-phenylindol in PBS)	Carl Roth, Karlsruhe
dNTP Mix	Life Technologies, Darmstadt
Gibco® 0,5% Trypsin-EDTA (10x)	Life Technologies, Darmstadt
Gibco® DPBS	Life Technologies, Darmstadt
NE-PER™ Nuclear and Cytoplasmic Extraction Reagents	Life Technologies, Darmstadt
PenStrep (10000 U/ml Penicillin 10000 µg/ml Streptomycin)	GE Healthcare Life Science, Freiburg
PhosSTOP Phosphatase Inhibitor Cocktail	Roche Diagnostics, Mannheim
Pierce™ ECL™ 2 Western Blotting Analysis System	Thermo Fisher Scientific, Schwerte
Pierce™ ECL™ Western Blotting Analysis System	Thermo Fisher Scientific, Schwerte
Prolong® Gold Antifade Reagent	Life Technologies, Darmstadt
Protein Assay Dye Reagent Concentrate	BioRad, München
RLB-Puffer (5x)	Promega, Mannheim
Röntgen-Entwickler-Konzentrat	Adefo, Dietzenbach
Röntgen-Fixierer-Konzentrat	Adefo, Dietzenbach
TRizol®	Life Technologies, Darmstadt
Ultrapure™ DNase/RNase freies destilliertes Wasser	Life Technologies, Darmstadt

Tabelle 2.4: selbst hergestellte Puffer und Lösungen

Puffer	Zusammensetzung
Annexin-Binding Puffer (10x)	10 mM HEPES (pH 7,4) 140 mM NaCl 2,5 mM CaCl ₂
DNA-Ladepuffer (6x)	30% (v/v) Glycerin 60 mM Tris-Cl, pH 7,4 60 mM EDTA 0,05% (w/v) Bromphenolblau 0,05% (w/v) Xylencyanol
Laemmli-Probenpuffer (5x)	312,5 mM Tris-HCl, pH 6,8 10% (w/v) SDS 50% (v/v) Glycerin 250 mM DTT 0,05% (w/v) Bromphenolblau
Luziferase Reagenz	20 mM Tricine KOH, pH7,8 0,1 mM EDTA 8 mM MgCl ₂ 33,3 mM DTT 270 mM Coenzym A 530 mM ATP 470 mM D-Luziferin
Phalloidin-Lösung	2,5% (v/v) Alexa Fluor® 568 Phalloidin 1% (w/v) BSA → gelöst in PBS
RIPA-Puffer	50 mM Tris-HCl pH 8,0 1% (v/v) NONIDET P-40 150 mM NaCl 0,1% (w/v) SDS 0,5% (w/v) Desoxycholat
SDS Laufpuffer	2,5 mM Tris 19,2 mM Glycin 0,1% (w/v) SDS
TAE (1x)	40 mM Tris 10 mM EDTA pH 8,3
TBS-T	50 mM Tris-Base 150 mM NaCl 0,1% (v/v) Tween 20
TFBI-Puffer	100 mM RbCl 10 mM CaCl ₂ 50 mM MnCl ₂ 15% (v/v) Glycerin

Puffer	Zusammensetzung
TFBII-Puffer	10 mM MOPS (3-(N-Morpholino)-Propansulfonsäure), pH 6,5 75 mM CaCl ₂ 10 mM RbCl 15% (v/v) Glycerin
Transferpuffer für große Proteine (Für Proteine ≥ 60 kDa)	48 mM Tris-Base 386 mM Glycin 0,05% (w/v) SDS 20% Methanol
Transferpuffer für kleine Proteine (Für Proteine < 60 kDa)	24 mM Tris-Base 193 mM Glycin 20% Methanol
Triton-Puffer	3% (w/v) BSA 0,3% (v/v) Triton X-100 → gelöst in PBS

2.1.3 Kommerzielle Kits und Assays

Tabelle 2.5: kommerzielle Kits und Assays

Kit	Firma
Gibson Assembly [®] Cloning Kit	New England Biolabs, Frankfurt
Hispeed [®] Plasmid Maxi Kit	Qiagen, Hilden
QIAprep [®] Spin Miniprep Kit	Qiagen, Hilden
QIAquick [®] Gel Extraction Kit	Qiagen, Hilden
QIAquick [®] PCR Purification Kit	Qiagen, Hilden
QuickChange II Site-Directed Mutagenesis Kit	Agilent Technologies, Santa Clara, USA
SuperScript [™] III First-Strand Synthesis System for RT-PCR	Life Technologies, Darmstadt

2.1.4 Geräte

Tabelle 2.6: Geräte

Gerät	Hersteller
ApoTome.2	Zeiss, Jena
Autoklav "Systec DX-150"	Systec, Linden
Autoklav „Varioklav“	Thermo Fischer Scientific, Waltham, USA
AxioCam MRm	Zeiss, Jena
Bakterienschüttler „Ecotron“	Infors HAT, Basel, Schweiz
CO ₂ -Inkubator „HERAcell® 240i“	Thermo Fischer Scientific, Waltham, USA
Elektrophoresis Power Supply	PeqLab, Erlangen
FACS Calibur™ Durchflusszytometer	BD, Franklin Lakes
Fluoreszenzmikroskop „Axio Observer D1“	Zeiss, Jena
Fluoreszenzmikroskop „Axio Imager M2“	Zeiss, Jena
Geldokumentationssystem „INTAS Gel iX Imager“	Royal Biotech, Frankfurt
Kühlzentrifuge „5810“	Eppendorf, Hamburg
Kühlzentrifuge „Rotina 420R“	Hettich, Tuttlingen
Lichtmikroskop „CKX31“	Olympus, Hamburg
Luminometer „LB96 V-Injektor“	EG&G Berthold, Bad Wildbad
Magnetrührer „yellow line MSC basic c“	IKA, Staufen
Mini-PROTEAN® Tetra Electrophoresis System	BioRad, München
MyCycler™ Thermal Cycler	BioRad, München
Orbitalschüttler „HS 260 basic“	IKA, Staufen
Stromgeber „Power Pac 1000“ und „Power Pac 200“	BioRad, München
PerfectBlue™ Mini Gel-System	Peqlab, Erlangen
pH-Meter SevenGo™	Mettler Toledo, Schwerzenbach, Schweiz
Pipettierhilfe „Pipetus®“	Hischmann Laborgeräte, Eberstadt
Sicherheitswerkbank „HERAsafe®“	Thermo Fischer Scientific, Waltham, USA
SmartSpec Plus Spectrophotometer	BioRad, München
Thermomixer comfort	Eppendorf, Hamburg
Vakuumpumpe WP6122050	Merck Millipore, Darmstadt
Vortexer „REAX top“	Heidolph, Schwabach
Waage „440-43N“	Kern & Sohn GmbH, Baldingen-Frommern
Waage „CP 124s“	Satorius, Göttingen

2.1.5 Antikörper

Tabelle 2.7: Primärantikörper (MP = Milchpulver; NDS = Normal Donkey Serum; WB = Western Blot; IF = Immunfluoreszenz)

Antigen	Hersteller	Spezies	Verwendung	Verdünnung
γ -actin	Santa Cruz Biotechnology, Heidelberg	Maus	WB	1:500 in 1% MP/TBS-T
Akt1	Becton & Dickinson	Kaninchen	WB	1:500 in 5% MP/TBS-T
Bcl-X _L (H-62)	Santa Cruz Biotechnology, Heidelberg	Kaninchen	WB	1:200 in
GAPDH	Abcam, Camdbrige, UK	Maus	WB	1:50000 in 5% MP/TBS-T
c-myc (9E10)	Biomol, Hamburg	Maus	IF	1:50 in PBS
myc-tag	Abcam, Camdbrige, UK	Kaninchen	WB	1:250 in 5% MP/TBS-T
TOPO I	Santa Cruz Biotechnology, Heidelberg	Kaninchen	WB	1:200 in 1% MP/TBS-T/5% NDS
V5	Life Technologies, Darmstadt	Maus	WB	1:500 in 5% MP/TBS-T

Tabelle 2.8: Sekundärantikörper (MP = Milchpulver; WB = Western Blot; IF = Immunfluoreszenz)

Antigen	Hersteller	Verwendung	Verdünnung
Anti-Maus (Alexa Fluor [®] 488 gekoppelt)	Santa Cruz Biotechnology, Heidelberg	IF	1:500 in PBS
Anti-Maus (HRP gekoppelt)	GE Healthcare Life Sciences, Freiburg	WB	1:5000 in 5% MP/TBS-T
Anti-Kaninchen (HRP gekoppelt)	GE Healthcare Life Sciences, Freiburg	WB	1:5000 in 5% MP/TBS-T

2.1.6 Plasmide

Als Ausgangsplasmide für die durchgeführten Klonierungen wurden die im Rahmen der Doktorarbeit von Arne Mlynek hergestellten Plasmide verwendet. Dabei handelt es sich um Expressionsvektoren für GRHL3-3, die großflächige Deletionen in der codierenden Sequenz enthalten. Abbildung 2.1 zeigt exemplarisch die Plasmidkarte des Expressionsplasmids für die komplette GRHL3-3 Isoform (pCMV GRHL3-3neo). Die Expressionsplasmide für die verschiedenen Deletionsmutanten sind identisch aufgebaut:

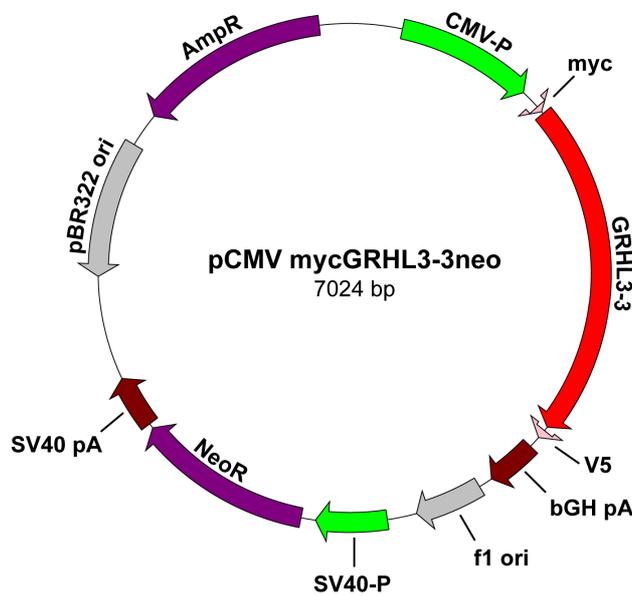


Abbildung 2.1: Vektorkarte pCMV mycGRHL3-3neo. Expressionsvektor für GRHL3-3 unter der Kontrolle eines CMV Promotors (CMV-P). Die codierende GRHL3-3 Sequenz ist durch ein myc-Epitop (myc) am 5'-Ende und ein V5-Epitop (V5) am 3'-Ende flankiert. Daran schließt sich ein RNA-Prozessierungssignal (bGH pA). Als Selektionsmarker für *E. coli* enthält der Vektor ein Ampicillin-Resistenzgen (AmpR). Zur Selektion in Säugerzellen kann das Neomycin-Resistenzgen (NeoR), das unter Kontrolle des *early* Promotors aus dem Affenvirus SV40 (SV40-P) steht, genutzt werden. 3' zu NeoR schließt sich ein Polyadenylierungssignal aus SV40 (SV40 pA) an. Für die Replikation in Bakterien sind zwei Replikationsursprünge (pBR322 ori und f1 ori) enthalten.

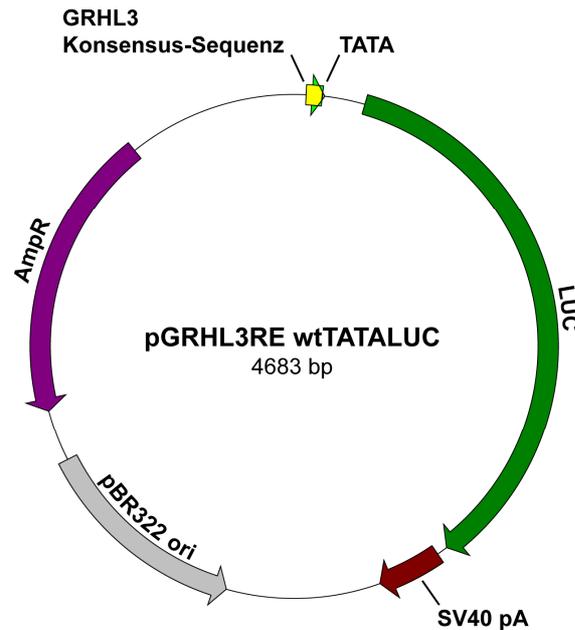


Abbildung 2.2: Vektorkarte pGRHL3RE wtTATALUC. Expressionsvektor für das Luziferase Gen aus *Photinus pyralis* (LUC) unter der Kontrolle eines Minimalpromotors, der nur noch die TATA-Box aus dem *thymidin kinase Gen* des *Herpes simplex Virus* enthält (TATA). Direkt 5' zu dem Minimalpromotor liegt die GRHL3 Konsensus-Sequenz. 3' zu der codierenden Luziferase Sequenz schließt sich ein RNA-Prozessierungssignal (SV40 pA) an. Als Selektionsmarker besitzt der Vektor ein Ampicillin-Resistenzgen (AmpR) mit dem dazugehörigen Promotor (AmpR-P). Für die Replikation in Bakterien besitzt der Vektor einen Replikationsursprung (pBR322 ori).

2.1.7 Oligonukleotide

Tabelle 2.9: Primer für die Herstellung von GRHL3-2 Expressionsplasmiden mit N-terminalem myc-tag und großflächigen Deletionen

Primer	Sequenz (5'→3')
GA hSOM2 for	ACGGGCCCTCTAGACTCGAGCCACCATGTCTGAATG AACTTGATTTTCAGGTCTGTGC
GA hSOM Δ A for	ACGGGCCCTCTAGACTCGAGCCACCATGTTTGAAT ACACCCTGGGCTCCC
GA hSOM rev	GTTTTTGTTTCGGGCCCAAGCTTCAGCTCCTTAAGGA TGATCTGAATTTTGCC
GA hSOM Δ CT rev	GTTTTTGTTTCGGGCCCAAGCTTCTGAAGGTCGCCTT CCTTGCC

Tabelle 2.10: Primer für die Herstellung von GRHL3-2 Expressionsplasmiden mit C-terminalem myc-tag und kleinen Deletionen zwischen DNA-Bindedomäne und Dimerisierungsdomäne

Primer	Sequenz (5'→3')
hSOM2 ΔC1.1 for	GATGCTCTTCCCAGATATCCTGAAAACCTCCCCG
hSOM2 ΔC1.1 rev	GCACGGTGCTTGGCCTCTTCATTAC
hSOM2 ΔC1.2 for	AGGCCAAGCACCGTGCTGTCTGCCAG
hSOM2 ΔC1.2 rev	AGTTTTTGTTCGGGCCCAAGCTTCAGCTCCTTAAGG ATGATC
hSOM2 ΔC2.1 for	GATGCTCTTCCCAGATATCCTGAAAACCTCCCCG
hSOM2 ΔC2.1 rev	TTGCTGGAGCCCAAGCCACAGTCATAG
hSOM2 ΔC2.2 for	GCTTGGGCTCCAGCAACAGTGGCGTC
hSOM2 ΔC2.2 rev	AGTTTTTGTTCGGGCCCAAGCTTCAGCTCCTTAAGG ATG
hSOM2 ΔC3.1 for	GATGCTCTTCCCAGATATCCTGAAAACCTCCCCG
hSOM2 ΔC3.1 rev	TTGGGGATCTTCCCTCCGGAAGTCTTC
hSOM2 ΔC3.2 for	GGAGGAAGATCCCCAATGTGCACTTC
hSOM2 ΔC3.2 rev	AGTTTTTGTTCGGGCCCAAGCTTCAGCTCCTTAAGG
hSOM2 ΔC4.1 for	GATGCTCTTCCCAGATATCCTGAAAACCTCCCCG
hSOM2 ΔC4.1 rev	AAGGGCGACGTCTCCAGGTCAGTCTC
hSOM2 ΔC4.2 for	TGGAGACGTGCCCTTCACTGAGGAG
hSOM2 ΔC4.2 rev	AGTTTTTGTTCGGGCCCAAGCTTCAGCTCCTTAAGG ATG

Tabelle 2.11: Primer für die Mutagenese des NLS von GRHL3

Primer	Sequenz (5'→3')
hSOM R485E/K489E/R490D for	GGACCCAGCAGCTCCAACGAGCTGCCTCTGGAGG ATAC
hSOM R485E/K489E/R490D rev	GTATCCTCCAGAGGCAGCTCGTTGGAGCTGCTGGG TCC
hSOM R485E for	GGACCCAGCAGCTCCAACGAGCTGCCTCTGAAGC GTAC
hSOM R485E rev	GTACGCTTCAGAGGCAGCTCGTTGGAGCTGCTGGG TCC
hSOM K489E/R490D for	CTCCAACAGGCTGCCTCTGGAGGATACCTGCTCGC CCTTAC
hSOM K489E/R490D rev	GTGAAGGGCGAGCAGGTATCCTCCAGAGGCAGCC TGTTGGAG

Tabelle 2.12: Primer für Sequenzierungen

Primer	Sequenz (5→'3')
CMV-P for2	GTACGGTGGGAGGTCTATATAAGCAG
bGH pA reverse	ACTAGAAGGCACAGTCGAGG
SOM Ex3 for1	GAAGCGGATATTGTCCTCCA
SOM Ex4 for1	AATGGCTCCCTCAACTCCTT
SOM Ex6 rev1	GAGCCCAGGGTGTATTCAAA
hSOM Ex13 for1	TCGCCCTTCACTGAGGAGTT
hSOM Ex14 rev1	ATTCTCAGCCCCTTCAGGT
hSOM Ex11 rev1	GTCGTCTCATTGCCCTGAA
hSOM2 ΔCmyc for	GGCTCCCTCAACTCCTTGTTT
hSOM2 ΔCmyc rev	GTCGACGGCGCTATTTCAGAT

Tabelle 2.13: Primer für reverse Transkriptions PCR (RT-PCR)

Primer	Sequenz (5→'3')
SOM Ex7 rev1	GGGACCTTCTCATTGTCGAA
SOM Ex1B for2	TCTGAGCAGAAGAATGTGGATG
hSOM E4 rev1	CTTGAGCAAATCTGGGTACTCTGG
SOM Ex1A for2	CTCGACACCCAAACCTCAACAT
SOM Ex2 rev1	CACAGGGTCATTCTTCAGCA
SOM Ex1B3 for1	CCTATTTTTCTGGTCCCAAGG
Q8TE85	CAAATCTGGGTACTCTGGGG
hmRPL32 Ex02 for1	GTGAAGCCCAAGATCGTCAA
hmRPL32 Ex03 rev1	TTGTTGCACATCAGCAGCAC

Tabelle 2.14: siRNAs

siRNA	Sequenz (5→'3')
siRNA GRHL3-1	CCTATTTTTCTTTTCAGGTCT
siRNA GRHL3-3	TTTTTCTGGTCCCAAGGAGAA

Die siRNAs sind am 5'-Ende mit Alexa Fluor 488® fluoreszenz-markiert.

2.1.8 Bakterienstämme

Tabelle 2.15: Genotypen der verwendeten kompetenten *E. coli* Stämme

Bakterienstamm	Genotyp
TG1	<i>F'</i> [<i>traD36 proAB⁺ lacI^q lacZΔM15</i>] <i>supE thi-1 Δ(lac-proAB) Δ(mcrB-hsdSM)5, (r_Km_K)</i>
NEB 5-alpha Competent <i>E. coli</i>	<i>fhuA2 Δ(argF-lacZ)U169 phoA glnV44 Φ80 Δ(lacZ)M15 gyrA96 recA1 relA1 endA1 thi-1 hsdR17</i>
XL1-Blue	<i>recA1 endA1 gyrA96 thi-1 hsdR17 supE44 relA1 lac [F' proAB lacI^q ZΔM15 Tn10 (Tet^r)]</i>

2.1.9 Medien

Die in Tabelle 2.16 aufgeführten LB-Medien wurden mit dH₂O angesetzt und bei 121°C und 200 kPa autoklaviert. Für die Selektion wurde das Medium nachträglich ab einer Temperatur von unter 60°C mit dem hitzelabilen Antibiotikum Ampicillin versetzt. Dieses wurde vor Gebrauch sterilfiltriert.

Tabelle 2.16: Nährmedien zur Kultivierung von Bakterien

Nährmedium	Zusammensetzung
LB-Medium	10 g/l Trypton 5 g/l Hefeextrakt 5 g/l NaCl
LB-Agar	10 g/l Trypton 5 g/l Hefeextrakt 5 g/l NaCl 15 g/l Agar

Tabelle 2.17: Wachstumsmedien für die Kultivierung von Zelllinien und primären Endothelzellen

Medium	Firma
DMEM-Glutamax (4,5 g/l Glukose)	Gibco, Karlsruhe
EBM	Lonza, Köln
FCS (fötales Kälberserum)	Life Technologies, Darmstadt

Tabelle 2.18: Zusammensetzung der Komplettmedien

Medium	Zusammensetzung
DMEM Komplettmedium	DMEM-Glutamax (4,5 g/l Glukose) 1% (v/v) Penicillin/Streptomycin (100 U/ml Penicillin, 100 µg/µl Streptomycin) 10% (v/v) hitzeinaktiviertes FCS (Inaktiviert für 1 h bei 56°C)
EBM Komplettmedium	EBM 10% (v/v) FCS EGM™ SingleQuots® (für 500 ml EBM): <ul style="list-style-type: none"> • 0,5 ml Gentamicin-Amphotericin B (GA-1000) • 0,5 ml Hydrocortison • 0,5 ml rekombinanter humaner epidermaler Wachstumsfaktor • 2 ml <i>bovine brain extract</i> (BBE)

2.1.10 DNA- und Proteinmarker

Tabelle 2.19: DNA und Proteinmarker

Marker	Hersteller
GeneRuler™ 1 kb Plus DNA Ladder	Life Technologies, Darmstadt
GeneRuler™ Low Range DNA Ladder	Life Technologies, Darmstadt
Protein™ Kaleidoscope™	BioRad, München

2.2 Methoden

2.2.1 Molekularbiologische Methoden

2.2.1.1 RNA Isolierung

Die Methode der RNA Isolierung erfordert ein absolut sauberes Arbeiten (Tragen von Handschuhen, Benutzung von gestopften Pipettenspitzen und RNase-freien Reaktionsgefäßen, usw.), daher wurde die Präparation der RNA unter einem Abzug durchgeführt.

Die RNA-Isolierung aus Zellpellets (Kap. 2.2.2.7) wurde mit der Trizol Methode nach einem modifizierten Protokoll von Chomczynski und Sacchi durchgeführt (Chomczynski und Sacchi, 1987). Für die Lyse der Zellen wurden die Zellpellets in 1 ml TRIzol® resuspendiert und für 15 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Danach wurde dem Lysat 200 µl von H₂O (RNase frei) überschichteten Chloroform zugegeben und für 15 Sekunden auf einem Vortex-Mixer gemischt. Nach einer weiteren 3 minütigen Inkubation bei Raumtemperatur wurden die Proben zur Trennung der Phasen für 15 Minuten bei 12000 xg und 4°C zentrifugiert. Im Anschluss wurde die obere wässrige Phase sorgfältig mit einer Pipette in ein neues Reaktionsgefäß überführt. Zur Fällung der RNA wurde die wässrige Phase mit 500 µl 99% Isopropanol versetzt, dann folgte eine Inkubation für 10 Minuten bei Raumtemperatur und ein weiterer Zentrifugationsschritt für 10 Minuten bei 12000 xg und 4°C. Das sedimentierte RNA-Pellet wurde einmal mit 1 ml 75% Ethanol gewaschen, auf dem Vortex-Mixer durchmischt und anschließend bei 7500 xg und 4°C für 5 Minuten zentrifugiert. Der Überstand wurde abgenommen und das RNA-Pellet im Reaktionsgefäß mit geöffneten Deckel in einem Heizblock bei 37°C getrocknet. Dann wurde die RNA in 30 µl DNase/RNase freiem Wasser aufgenommen. Zur besseren Lösung der RNA wurden die Proben für 10 Minuten in einem Heizblock bei 55°C inkubiert. Dann wurde die RNA Konzentration photometrisch bestimmt (Kap. 2.2.1.14) und ihre Integrität durch gelelektrophoretische Analyse (Kap. 2.2.1.6) überprüft.

2.2.1.2 Reverse Transkription

Die reverse Transkription dient der Herstellung von cDNA (*complementary DNA*). Dabei wird durch eine RNA-abhängige DNA-Polymerase (reverse Transkriptase) eine einzelsträngige RNA-Matrize in den komplementären DNA-Strang umgeschrieben.

Für die cDNA Synthese aus Gesamt-RNA (Kap. 2.2.1.1) wurde das SuperScript™ III First-Strand Synthesis System for RT-PCR verwendet. Insgesamt wurden pro Reaktionsansatz 2 µg RNA eingesetzt. Der in Tabelle 2.20 aufgeführte RT-Reaktionsansatz I wurde für 5 Minuten auf 65°C erhitzt und anschließend auf Eis wieder abgekühlt. Dann wurde der RT-Reaktionsansatz II (Tabelle 2.21) hinzugefügt

Tabelle 2.20: RT-Reaktionsansatz I

Komponente	Volumen
RNA (2µg)	X µl
Oligo dT ₂₀ (50 µM)	1 µl
Random hexameres (dN ₆) (50 ng/µl)	1 µl
hSOM Ex7 rev1 8 (2 pmol/µl)	0,5 µl
hSOM Ex14 rev1 (2 pmol/µl)	0,5 µl
dNTPs (10 mM)	1 µl
DNase/RNase freies Wasser	ad 10 µl

Tabelle 2.21: RT-Reaktionsansatz II

Komponente	Volumen
RT-Puffer (10x)	2 µl
25 mM MgCl ₂	4 µl
0,1 M DTT	2 µl
RNaseOUT (40 U/µl)	1 µl

Danach wurde pro Reaktion 1 µl von der reversen Transkriptase SuperScript III zugegeben und für 10 min bei 25°C, 50 min bei 50°C und 5 min bei 85°C inkubiert. Danach wurden die Proben auf Eis abgekühlt und dann mit je 1 µl RNase H versetzt und für 20 Minuten bei 37°C inkubiert. Die hergestellte cDNA wurde als *template* in der Polymerase-Kettenreaktion (Kap. 2.2.1.3) eingesetzt.

2.2.1.3 Polymerase-Kettenreaktion

Die Polymerase-Kettenreaktion (*Polymerase chain reaction, PCR*) ist eine *in vitro*-Technik, die der Amplifikation definierter DNA-Sequenzen dient (Saiki *et al.*, 1985). Die Spezifität dieser Methode wird durch den Einsatz von Primern gewährleistet, die zu der Zielsequenz komplementär sind. Durch wiederholtes Aufschmelzen der Doppelstrang-DNA (Denaturierung), Anlagerung der Primer (*Annealing*) und Neusynthese des zur Matrize komplementären DNA-Strangs (*Elongation*) wird theoretisch eine exponentielle Konzentrationszunahme der gewünschten DNA-Sequenz erreicht (Saiki *et al.*, 1985).

Als Polymerase für die Amplifikation wurde entweder die MyTaq oder Q5[®] High Fidelity DNA Polymerase verwendet. Letztere besitzt eine Exonuklease Aktivität, so dass fehlerhaft inkorporierte Nukleotide ausgeschnitten und durch das korrekte

Nukleotid ersetzt werden können (*proofreading*), was die Fehlerrate im Vergleich mit der DNA Polymerase aus *Thermus aquaticus* (*Taq*-Polymerase) reduziert und somit die Gefahr einer Inkorporation falscher Nukleotide in den Amplifikationsprodukten verringert. Die Q5 Polymerase wurde für alle Amplifikationsreaktionen im Rahmen der Klonierung von Plasmiden eingesetzt und die *Taq*-Polymerase MyTaq zum Nachweis der GRHL3 Isoformen und dem Haushaltsgen RPL32 mittels reverse Transkriptase PCR. Die Zusammensetzungen der unterschiedlichen Reaktionsansätze für die beiden Polymerasen sind in den Tabellen 2.22 und 2.23 gezeigt.

Tabelle 2.22: Reaktionsansatz für die Amplifikation mit MyTaq Polymerase

Komponente	Volumen	Endkonzentration
<i>template</i> (cDNA)	3 µl	
MyTaq Reaction Buffer (5x)	6 µl	1x
Forward Primer (10 µM)	1 µl	0,33 µM
Reverse Primer (10 µM)	1 µl	0,33 µM
Bioline MyTaq (5 U/µl)	0,2 µl	0,17 U/µl
dH ₂ O	ad 30 µl	

Tabelle 2.23: Reaktionsansatz für die Amplifikation mit Q5® High Fidelity DNA Polymerase

Komponente	Volumen	Endkonzentration
<i>template</i>	X µl	1 ng/µl
dNTP (10 mM)	1,0 µl	200 µM
Q5 Reaction Buffer (5x)	10,0 µl	1x
Forward Primer (10 µM)	2,5 µl	0,5 µM
Reverse Primer (10 µM)	2,5 µl	0,5 µM
Q5 HF DNA Polymerase (2 U/µl)	0,5 µl	0,02 U/µl
dH ₂ O	ad 50 µl	

Die Amplifikationsreaktionen wurden in einem My Cycler™ durchgeführt. Das verwendete „Standard“ PCR-Programm ist in Tabelle 2.24 aufgeführt. Die *Annealing*-Temperatur variiert in Abhängigkeit von der eingesetzten Primerkombination, die Elongationszeiten richtet sich nach der Länge der zu amplifizierenden Fragmente und wurde nach Herstellerangaben (20-30 sec/kb) berechnet.

Tabelle 2.24: Standard PCR-Programm

Schritt	Temperatur	Zeit	Zykluszahl
<i>Hot start</i>	94°C	5 min	x 1
Denaturierung	94°C	30 sec	x 35
<i>Annealing</i>	XX°C	30 sec	
<i>Elongation</i>	72°C	XX sec	
Finale Elongation	72°C	5 min	x 1
Lagerung	4°C	∞	x 1

Die eingesetzten Primerkombinationen zur Amplifikation der im Rahmen der Arbeit amplifizierten DNA-Abschnitte, sowie die angewendeten *Annealing* Temperaturen und Elongationszeiten und das für die jeweilige Amplifikation verwendete *template* sind in den Tabelle 2.25 und 2.26 aufgelistet.

Tabelle 2.25: Amplifikationsbedingungen für die Herstellung von GRHL3-2 Expressionsplasmiden mit N-terminalem myc-tag und großflächigen Deletionen

Fragment	Primerkombination	<i>template</i>	Annealing Temperatur	Elongationszeit
GRHL3-2	GA hSOM2 for GA hSOM rev	pCMV myc SOM2	57,0°C	2 min
GRHL3ΔA	GA hSOM Δ A for GA hSOM rev	pCMV myc SOM Δ A	57,0°C	2 min
GRHL3-2ΔB	GA hSOM2 for GA hSOM rev	pCMV myc SOM2 Δ B	57,0°C	2 min
GRHL3-2ΔC	GA hSOM2 for GA hSOM rev	pCMV myc SOM2 Δ C	57,0°C	2 min
GRHL3-2ΔCT	GA hSOM2 for GA hSOM Δ CT rev	pCMV myc SOM2 Δ CT	57,0°C	2 min
GRHL3-2ΔRKM	GA hSOM2 for GA hSOM rev	pCMV myc SOM2 Δ RKM	57,0°C	2 min
GRHL3-2ΔbiNLS	GA hSOM2 for GA hSOM rev	pCMV myc SOM2 Δ biNLS	57,0°C	2 min

Tabelle 2.26: Amplifikationsbedingungen für die Herstellung von GRHL3-2 Expressionsplasmiden mit C-terminalem myc-tag und kleinen Deletionen zwischen DNA-Bindedomäne und Dimerisierungsdomäne

Fragment	Primerkombination	template	Annealing Temperatur	Elongationszeit
Δ C1.1	hSOM2 Δ C1.1 for hSOM2 Δ C1.1 rev	pcDNA SOM Δ Amyc	61,0°C	30 sec
Δ C1.2	hSOM2 Δ C1.2 for hSOM2 Δ C1.2 rev	pcDNA SOM2myc	67,4°C	30 sec
Δ C2.1	hSOM2 Δ C2.1 for hSOM2 Δ C2.1 rev	pcDNA SOM Δ Amyc	65,0°C	30 sec
Δ C2.2	hSOM2 Δ C2.2 for hSOM2 Δ C2.2 rev	pcDNA SOM2myc	65,0°C	30 sec
Δ C3.1	hSOM2 Δ C3.1 for hSOM2 Δ C3.1 rev	pcDNA SOM Δ Amyc	65,0°C	30 sec
Δ C3.2	hSOM2 Δ C3.2 for hSOM2 Δ C3.2 rev	pcDNA SOM2myc	61,8°C	30 sec
Δ C4.1	hSOM2 Δ C4.1 for hSOM2 Δ C4.1 rev	pcDNA SOM Δ Amyc	65,0°C	30 sec
Δ C4.2	hSOM2 Δ C4.2 for hSOM2 Δ C4.2 rev	pcDNA SOM2myc	65,0°C	30 sec

Die Amplifikation der GRHL3 Isoformen und von RPL32 erfolgte bei einer *Annealing* Temperatur von 57°C und einer Elongationszeit von 45 Sekunden mit unterschiedlichen Zyklenzahlen (Tabelle 2.27). Für die reverse Transkriptions-PCR zum Nachweis der Expression des Haushaltsgens RPL32 wurde die als *template* verwendete cDNA 1:100 verdünnt.

Tabelle 2.27: Amplifikationsbedingungen zum Nachweis der RNAs für GRHL3 Isoformen und RLP32

	Primerkombination	Zyklusanzahl
GRHL3-1	SOM Ex1B for2 hSOM E4 rev1	50
GRHL3-2	SOM Ex1A for2 SOM Ex2 rev1	45
GRHL3-3	SOM Ex1B3 for1 Q8TE85	50
RPL32	hmRPL32 Ex02 for1 hmRPL32 Ex03 rev1	30

2.2.1.3.1 Gerichtete Mutagenese

Für die Mutation von Codons zum Austausch einzelner Aminosäuren wurde das QuickChange II Site-Directed Mutagenesis Kit nach Angaben des Herstellers eingesetzt. Die Mutagenese beruht auf einer Amplifikation unter Einsatz von sogenannten Mutageneseprimern und dem nachfolgenden Abbau der *template* DNA, die die gewünschte Mutation nicht enthält (Abbildung 2.3). Die Primer wurden so konstruiert, dass beide Primer die gewünschte Mutation tragen und über die volle Länge komplementär zueinander sind. Für eine stabile Anlagerung an die DNA wurde darauf geachtet, dass sowohl zum 5' als auch 3' Ende der Mutation jeweils 18 bis 19 Nukleotide vorhanden sind.

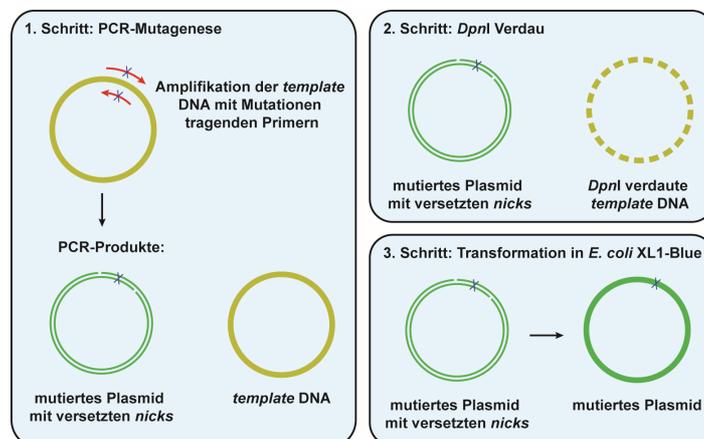


Abbildung 2.3: Überblick über die gerichteten Mutagenese mittels QuickChange II site-directed Mutagenesis Kit. Erläuterungen siehe Text.

Im ersten Schritt binden die Mutageneseprimere an die denaturierte *template* DNA und werden durch die im Kit enthaltene *Pfu*Ultra HF DNA Polymerase verlängert. Als Amplifikationsprodukt entsteht das Plasmid mit der gewünschten Mutation und versetzten Lücken in der Sequenz (*nicks*) an den 5'-Enden der Primer. Daraufhin wird im zweiten Schritt die methylierte *template* DNA und hemimethylierte Hybride aus *template* DNA und amplifizierter DNA mit der Endonuklease *DpnI* (Zielsequenz: 5'-Gm6ATC-3') geschnitten. Die Methylierung der *template* DNA erfolgt in *E. coli* durch Deoxyadenosin Methylase (*dam*) am N⁶ des Adenosinrests in der Sequenz 5'-GATC-3'. Die aus der Amplifikation erhaltene DNA dagegen ist unmethyliert, so dass der Verdau mit *DpnI* in einer Anreicherung der amplifizierten DNA mit der

gewünschten Mutation resultiert. Die *nicks* enthaltenden Plasmide wurden dann in kompetente *E. coli* Bakterien des Stamms XL1-Blue (Kap. 2.2.1.12) transformiert, der in der Lage ist die *nicks* zu reparieren.

Der Reaktionsansatz für die PCR-Mutagenese ist in Tabelle 2.28 und das verwendete PCR-Programm in Tabelle 2.29 aufgeführt. Für die Amplifikation der GRHL3-2 Substitutionsmutanten im My Cyclor™ wurden unterschiedliche Primerkombinationen und Ausgangsplasmide eingesetzt. Die Zuordnung der verschiedenen Primer und ihrer *template* DNA ist in Tabelle 2.30 zusammengefasst. Nach der PCR wurde je 1 µl des Restriktionsenzym *DpnI* (10 U/µl) zu den PCR Produkten gegeben und für 2 h bei 37°C inkubiert. Von dieser *DpnI* verdauten DNA wurde 1 µl direkt für die Transformation in kompetente Bakterien (XL1-Blue) eingesetzt (Kap. 2.2.1.12).

Tabelle 2.28: Reaktionsansatz für die gerichtete Mutagenese mit dem QuickChange II Site-Directed Mutagenesis Kit

Komponente	Volumen	Endkonzentration
<i>reaction buffer</i> (10x)	5 µl	1x
<i>template</i>	X µl	0,2 ng/µl
<i>Forward Primer</i> (100 ng/µl)	1,25 µl	2,5 ng/µl
<i>Reverse Primer</i> (100 ng/µl)	1,25 µl	2,5 ng/µl
dNTPmix	1 µl	
dH ₂ O	ad 50 µl	
<i>PfuUltra HF DNA Polymerase</i>	1 µl	2,5 U/µl

Tabelle 2.29: PCR-Programm für die Mutagenese-Reaktion

Schritt	Temperatur	Zeit	Zyklenzahl
<i>Hot start</i>	95°C	30 sec	x 1
<i>Denaturierung</i>	95°C	30 sec	x 18
<i>Annealing</i>	55°C	60 sec	
<i>Elongation</i>	68°C	7 min 18 sec	
<i>Lagerung</i>	4°C	∞	x 1

Tabelle 2.30: Primerkombinationen für die Herstellung von Substitutionsmutanten

Substitutionsmutante	Primerkombination	template
pcDNA SOM2 K489E/R490Dmyc	hSOM K489E/R490D for hSOM K489E/R490D rev	pcDNA SOM2myc
pcDNA SOM2 R485E/K489E/R490Dmyc	hSOM R485E/K489E/R490D for hSOM R485E/K489E/R490D rev	pcDNA SOM2 K489E/R490Dmyc

2.2.1.4 Aufreinigung von PCR-Produkten

Für die Aufreinigung von PCR-Produkten wurde das QIAquick PCR Purification Kit verwendet. Die Durchführung erfolgte nach Angaben des Herstellers.

2.2.1.5 Restriktionsverdau von DNA

Die Spaltung von Plasmid DNA für analytische Zwecke oder Klonierungsarbeiten wurde mit Sequenz-spezifischen Restriktionsendonukleasen nach Herstellerangaben durchgeführt. Die Inkubationszeit bei einer Temperatur von 37°C variierte dabei in Abhängigkeit von der eingesetzten DNA- und Enzymmenge; als Faustregel wurde zugrunde gelegt, dass 1 Unit eines Restriktionsenzym 1 µg DNA in 1 Stunde komplett schneidet. Die erzeugten DNA-Fragmente wurden mittels Agarose Gelelektrophorese (2.2.1.6) aufgetrennt.

2.2.1.6 Agarose Gelelektrophorese

Die Auftrennung und Größenbestimmung von DNA-Fragmenten erfolgte mittels Agarose Gelelektrophorese. DNA Moleküle sind aufgrund ihres Phosphodiester-Rückgrates negativ geladen und wandern im elektrischen Feld zur positiv geladenen Anode. Dabei bildet ein Netzwerk aus Agarose-Polymeren eine poröse Gelmatrix, die je nach Porengröße die Nukleinsäure-Moleküle mehr oder weniger stark zurückhält. Sowohl zur Größenbestimmung von DNA-Fragmenten, als auch zur Abschätzung der Nukleinsäure Konzentration, wurde bei jeder gelelektrophoretischen Auftrennung ein DNA Marker definierter Größe und Konzentration (GeneRuler™ 1kb Plus DNA Ladder oder GeneRuler™ Low Range DNA Ladder; Tabelle 2.19) mitgeführt.

Es wurden 1,0-1,5% (w/v)-ige Agarosegele in 1x TAE (Tris Acetat EDTA) Puffer mit 0,5 µg/ml Ethidiumbromid verwendet. Vor dem Beladen der Geltaschen wurden die

DNA Proben mit einem sechsfach konzentrierten (6x) DNA-Ladepuffer versetzt. Die Auftrennung im Gel erfolgte bei einer konstanten Feldstärke von 4 – 7 V/cm in 1x TAE als Laufpuffer. Durch Interkalation des planaren Fluorophors Ethidiumbromid in die doppelsträngige DNA wurden die DNA Banden nach der Gelelektrophorese auf einem UV Transilluminator bei einer Anregungswellenlänge von 312 nm sichtbar gemacht (Emission: 590 nm). Die Abschätzung von DNA Konzentrationen erfolgte über den Vergleich der Bandenintensitäten zwischen den Proben und dem DNA Marker. Für die Auftrennung von RNA wurde die Elektrophorese-Kammer zuvor gründlich mit Ethanol gereinigt und eine separate, hochreine Agarose verwendet. Zum Ansetzen des Ladepuffers für RNA-Proben wurde RNase-freies Wasser verwendet.

2.2.1.7 Aufreinigung von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen

Für die Aufreinigung von spezifischen DNA-Fragmenten für Ligationen (Kap. 2.2.1.8) wurden diese aus Agarosegelen mit dem QIAquick Gel Extraction Kit nach Angaben des Herstellers aufgereinigt.

2.2.1.8 Ligation

Die Ligation von DNA-Fragmenten erfolgte mit der T4 DNA-Ligase (Weiss *et al.*, 1968). In Anwesenheit von ATP knüpft die Ligase eine Phosphodiesterbindung zwischen dem 5´Phosphat- und 3´Hydroxyende der DNA. Für Ligrationsreaktionen zur Insertion von DNA-Fragmenten in Plasmide wurden diese in einem molaren Verhältnis von 3:1 unter Verwendung von 50-80 ng des Plasmidrückgrats eingesetzt. Der Reaktionsansatz (Gesamtvolumen 20 µl) wurde für 1 bis 16 Stunden bei Raumtemperatur inkubiert und dann für die Transformation in den *E. coli* Stamm TG1 (Kap. 2.2.1.12) eingesetzt.

2.2.1.9 Gibson Assembly

Bei dieser Klonierungsmethode können mehrere überlappende DNA Moleküle in einer isothermalen Reaktion unabhängig von Restriktionsschnittstellen in einem Arbeitsschritt zusammengefügt werden (Abbildung 2.4). Die mittels PCR

amplifizierten oder über Restriktionsverdau gewonnenen DNA-Fragmente sind so konstruiert, dass ihre Enden um 18-23 bp überlappen. Beim Gibson Assembly werden zuerst durch eine 5'-Exonuklease einzelsträngige 3'-Überhänge erzeugt, die an die komplementären Sequenzen des jeweils überlappenden DNA-Fragmentes binden. Die DNA Polymerase verlängert die 3'-Enden und die Ligase verbindet die Enden über eine Phosphodiesterbindung miteinander.

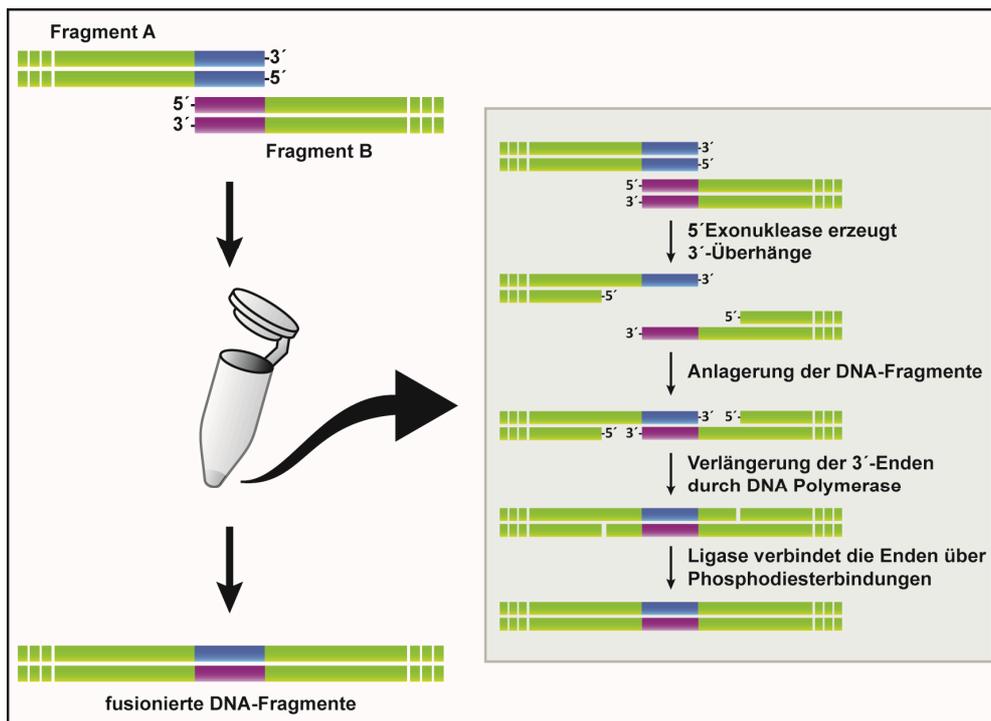


Abbildung 2.4: Schematische Darstellung des Gibson Assembly. Erläuterungen siehe Text.

Zur Restriktions-freien Klonierung wurde das Gibson Assembly® Cloning Kit nach Herstellerangaben unter Verwendung der mitgelieferten kompetenten *E. coli* NEB 5-alpha Bakterien für die Transformationen der Reaktionsansätze verwendet.

2.2.1.10 Kultivierung von Bakterien

Die Anzucht der verschiedenen *E. coli* Stämme (Tabelle 2.15) erfolgte bei 37°C über Nacht auf LB-Agarplatten im Brutschrank oder als Flüssigkultur auf einem Schüttler bei 200 UpM.

2.2.1.11 Herstellung kompetenter Bakterien

Der *E. coli* Stamm TG1 besitzt keine natürliche Kompetenz für die Aufnahme von freier DNA aus dem Medium. Daher wurden die verwendeten TG1 Zellen für die Transformation von Plasmid DNAs, Ligationsansätzen, Gibson Assembly Reaktionen und mutagenisierten Plasmiden nach der Rubidiumchlorid-Methode (Hanahan, 1983) kompetent gemacht. Als Ausgangsmaterial wurde eine Übernachtskultur in 3 ml LB-Medium mit einer Bakterienkolonie angeimpft und bei 37°C und 200 UpM für 16 Stunden geschüttelt. Am darauf folgenden Tag wurden 99 ml LB Medium mit 1 ml der Übernachtskultur angeimpft und bei 37°C und 200 UpM bis zu einer optischen Dichte (OD₆₀₀) von 0,4-0,5 kultiviert. Die Bakterien wurden für 5 Minuten bei 3220 xg und 4°C sedimentiert und der Überstand verworfen. Das Zellpellet wurde in 30 ml TFBII-Puffer resuspendiert und für 30 Minuten auf Eis inkubiert. Danach wurden die Zellen wieder für 5 Minuten bei 3220 xg und 4°C zentrifugiert und der Überstand verworfen. Das Zellpellet wurde daraufhin in 4 ml TFBII-Puffer resuspendiert und direkt zu je 100 µl in 1,5 ml Reaktionsgefäße aliquotiert. Die Aliquots wurden umgehend in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -80°C gelagert.

2.2.1.12 Transformation

Die Transformation kompetenter *E. coli* Bakterien erfolgte mittels Hitzeschock. Bei dieser Transformationsmethode führt die schnelle Temperaturänderung in Anwesenheit von Calciumchlorid zu einer kurzzeitigen Permeabilisierung der Bakterienmembran, wodurch die Plasmide aufgenommen werden (Hanahan, 1983).

Kommerziell erhältliche kompetente Bakterien wurden nach Herstellerangaben transformiert, für den im Labor hergestellten kompetenten Bakterienstamm TG1 wurde wie folgt vorgegangen. Pro Ansatz wurde ein Aliquot (100 µl) der kompetenten Bakterien auf Eis aufgetaut und mit der zu transformierenden DNA versetzt. Bei ungeschnittenen Plasmid DNA wurden 10-50 ng und bei Ligationen jeweils die Hälfte des Ligationsansatzes eingesetzt. Nach 30 minütiger Inkubation auf Eis erfolgte der Hitzeschock für 45 Sekunden bei 42°C. Dann wurde der Transformationsansatz für 2 Minuten auf Eis abgekühlt und in ein Kulturröhrchen mit 2 ml LB Medium ohne Antibiotikazusatz überführt. Die Bakterienkultur wurde für 1 Stunde bei 37°C und 200 UpM geschüttelt. Danach wurden die Zellen bei 3220 xg für 5 Minuten zentrifugiert. Nach Abgießen des Überstandes wurde das Zellpellet in dem verbliebenen

Mediumrest von ca. 100 μ l resuspendiert. Daraus wurden 10 μ l und der verbleibende Rest der Bakteriensuspension auf LB-Agarplatten mit Ampicillin-Zusatz ausplattiert und über Nacht bei 37°C inkubiert.

2.2.1.13 Plasmidisolierung

Zur Isolation von Plasmid DNA aus *E. coli* wurden entweder das QIAprep Spin Miniprep Kit oder das QIAfilter Plasmid Maxi Kit verwendet. Als Ausgangsmaterial für Plasmidisolierungen wurden Flüssigkulturen mit einem Volumen von 2,5 ml für das Miniprep Kit (Minipräparation) oder 150 ml für das Maxiprep Kit (Maxipräparation) verwendet. Die Durchführung erfolgte nach Angaben des Herstellers mit folgenden Modifikationen bei der Verwendung des Plasmid Maxi Kits:

- Puffer P1, P2 und P3 wurden in einem Volumen von je 12 ml eingesetzt.
- Die Lyse der Bakterien erfolgte für 4,5 Minuten.
- Der TE-Elutionspuffer wurde vor der Elution auf 65°C erhitzt.
- Die Elution erfolgte in 800 μ L TE-Puffer (erste Elution in 400 μ L, zweite Elution in weiteren 400 μ L).

2.2.1.14 Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren

Die Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren erfolgte durch photometrische Messung mit einem SmartSpec™ Plus Spectrophotometer und UV-Einmal-Küvetten. Nukleinsäuren haben ihr Absorptionsmaximum bei einer Wellenlänge von 260 nm. Bei dieser Wellenlänge entspricht gemäß dem Lambert-Beerschen-Gesetz eine Absorption von 1 einer Konzentration von 50 μ g/ml bei doppelsträngiger DNA und von 40 μ g/ml bei RNA. Zur Bestimmung des Reinheitsgrades der Nukleinsäuren wurde zusätzlich die Extinktion bei einer Wellenlänge von 280 nm (OD_{280}) gemessen. Bei dieser Wellenlänge haben die aromatischen Seitenketten von Proteinen ihr Absorptionsmaximum, aber auch andere UV absorbierende Substanzen, wie z.B. Alkohol und Puffersubstanzen, werden bei dieser Wellenlänge detektiert. Das Verhältnis OD_{260}/OD_{280} spiegelt die Reinheit der Probe wieder und liegt für reine DNA bei 1,8 und für RNA bei 2.

2.2.1.15 DNA Sequenzierung

Die Sequenzierung zur Verifizierung neu konstruierter Plasmide wurde extern von der Firma Starseq durchgeführt. Zur Probenvorbereitung wurde gemäß dem U-mix Protokoll (<http://www.starseq.com>) 0,5 µg DNA mit 1 pmol Oligonukleotid-Primer und Wasser auf ein Gesamtvolumen von 7 µl aufgefüllt. Die für die Sequenzierungen verwendeten Primer sind im Materialteil (Tabelle 2.12) aufgeführt. Aus der Sequenzierung wurden zwei Dateien erhalten, die Nukleotidsequenz als Textdatei (.txt), sowie das Chromatogramm in einem spezifischen Dateiformat (.abi), das mit dem Programm ApE (A Plasmid Editor, <http://biologylabs.utah.edu/jorgensen/wayned/ape/>) geöffnet werden kann. Zur Auswertung wurden die Sequenzen mittels BLAST (*Basic Local Alignment Search Tool*) (Altschul *et al.*, 1997) mit den erwarteten Plasmidsequenzen verglichen.

2.2.2 Zellbiologische Methoden

Alle zellbiologischen Arbeiten wurden unter sterilen Bedingungen in einer Sicherheitswerkbank durchgeführt. Die verwendeten Reagenzien wurden ausschließlich unter der Sicherheitswerkbank geöffnet. Die Verbrauchsmaterialien wurden, wenn nicht anders vermerkt, von den Firmen Greiner Bio-One GmbH (Frickenhausen) und TPP (Techno Plastic Products, Trasadingen, Schweiz) bezogen.

2.2.2.1 Kultivierung von HEK293T Zellen

Die permanente Zelllinie HEK293T (*human embryonic kidney cells*) stammt ursprünglich aus primären humanen embryonalen Nierenzellen, die mit gescherter Adenovirus Typ5 immortalisiert wurden (Graham *et al.*, 1977) und zusätzlich das große T-Antigen des Affenvirus SV40 exprimieren. Die Kultivierung erfolgte in einer T-75 Zellkulturflasche mit DMEM-Komplettmedium (Tabelle 2.18) bei 37°C in einem CO₂-Inkubator (5% CO₂). Nachdem die epithelial adhärent wachsenden Zellen eine Konfluenz von 70-90% erreicht hatten, wurden diese in eine neue T-75 Zellkulturflasche passagiert oder für Experimente in Zellkulturschalen ausgebracht. Dazu wurde der Zellmonolayer mit 6 ml PBS gewaschen und danach mit 2 ml Trypsin-EDTA Lösung unter leichtem Klopfen vom Boden der Zellkulturflasche

abgelöst. Sobald sich die Zellen vom Flaschenboden abgelöst haben, wurde die Trypsinierungsreaktion durch Zugabe von 8 ml DMEM Komplettmedium abgestoppt. Danach wurden die Zellen resuspendiert und die Zellzahl bestimmt (Kap. 2.2.2.3). Die Zellen wurden dann mit einer definierten Zellzahl in neue T-75 Zellkulturflaschen oder auf Zellkulturschalen ausgebracht.

2.2.2.2 Kultivierung von HUVEC

HUVECs (*human umbilical vein endothelial cells*) sind primäre humane Endothelzellen, die aus Nabelschnurvenen isoliert werden (Jaffe *et al.*, 1973). Im Vergleich zu immortalisierten Zelllinien, verlieren HUVECs nach nur wenigen Passagen ihren Endothelzellcharakter (Marin *et al.*, 2001). Um reproduzierbare Ergebnisse zu erhalten wurden alle Experimente in HUVECs mit Zellen aus Passage 4 (P4) durchgeführt.

Die Kultivierung der HUVECs erfolgte in einer T-75 Zellkulturflasche mit EBM Komplettmedium (Tabelle 2.18) bei 37°C im CO₂-Inkubator (5% CO₂). Bei einer Konfluenz von 95% wurden die Zellen entweder passagiert oder für die verschiedenen Versuche in Zellkulturschalen ausgebracht. Dazu wurden die adhärent wachsenden Zellen mit 6 ml PBS gewaschen und anschließend mit 2 ml Trypsin-EDTA-Lösung solange inkubiert, bis sich die Zellen abgerundet haben. Die Trypsinreaktion wurde mit 8 ml EBM Komplettmedium abgestoppt und die Zellen mit Hilfe eines Zellschabers (Sarstedt, Nümbrecht) vom Flaschenboden abgelöst. Die Zellen wurden dann zum Vereinzeln resuspendiert und gezählt (Kap. 2.2.2.3) und mit einer definierten Zellzahl in neue T-75 Zellkulturflaschen oder auf Zellkulturschalen ausgebracht.

2.2.2.3 Bestimmung der Zellzahl

Die Bestimmung der Zellzahl erfolgte mit Hilfe einer Neubauer Zählkammer. Dazu wurde die Kammer mit 10 µl einer Zellsuspension befüllt und 4 großen Eckquadrate mit einem definierten Volumen von je 10⁻⁴ml ausgezählt. Die Zellzahl Z (Zellen/ml) berechnete sich nach folgender Formel mit n, der Gesamtzellzahl in den 4 großen Eckquadraten:

$$Z = \frac{n}{4} \cdot 10^4$$

2.2.2.4 Transfektion von HEK293T Zellen mittels Lipofectamin®

Die Transfektion von HEK293T Zellen erfolgte mit dem Lipofectamin® Transfection Reagent und Plus™ Reagent. Bei dieser Methode bilden kationische Lipide im wässrigen Milieu sogenannte Liposomen aus, in die die zu transfizierende DNA eingelagert wird. Die Aufnahme in die Zelle erfolgt über Endozytose.

Es wurden 5×10^5 Zellen pro 60 mm Zellkulturschale ausgebracht und für 24 Stunden kultiviert (37°C, 5% CO₂) (Kap. 2.2.2.1). Für die Transfektion wurde 1,3 µg DNA mit 250 µl DMEM-Glutamax Medium und 8 µl Plus Reagenz für 15 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. In einem zweiten Transfektionsansatz wurden 250 µl DMEM-Glutamax Medium mit 11 µl Lipofectamin vermischt. Nach 15 Minuten wurden die beiden Ansätze vereint und nochmals für 15 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Während der Inkubationszeit wurden die Zellen zweimal mit DMEM-Glutamax Medium gewaschen und danach jeweils 2 ml DMEM-Glutamax Medium pro Zellkulturschale auf die Zellen gegeben. Von dem Transfektionsansatz wurden pro Zellkulturschale 500 µl zu den 2 ml vorgelegtem DMEM-Glutamax Medium gegeben und für 3 Stunden inkubiert (37°C, 5% CO₂). Nach Zugabe von 3 ml DMEM Komplettmedium pro Zellkulturschale wurden die Zellen über Nacht im Inkubator (37°C, 5% CO₂) kultiviert. Nach 24 Stunden wurde das Medium gegen 3 ml DMEM Komplettmedium ausgetauscht und für weitere 24 Stunden bis zur Zellernte (Kap. 2.2.2.7) inkubiert. Bei Kotransfektionen wurden 1,0 µg von dem Reporter-genplasmid und 0,3 µg von dem Expressionsplasmid eingesetzt.

2.2.2.5 Transfektion von HUVEC mit SuperFect®

Die Transfektion von HUVECs mit dem SuperFect® Transfection Reagent basiert auf dem Prinzip aktivierter Dendrimere. Dendrimere sind stark verzweigte Moleküle, die nach außen positiv geladene Aminosäuren tragen (Tang und Szoka, 1997). Durch die Anlagerung negativ geladener DNA entsteht ein aktivierter DNA-Dendrimer-Komplex, der über Endozytose in die Zelle aufgenommen wird.

Am Tag vor der Transfektion wurden 2×10^5 Zellen pro 60 mm Zellkulturschale ausgebracht und für 24 Stunden kultiviert (37°C, 5% CO₂) (Kap. 2.2.2.2). Für die Transfektion wurde 3 µg der jeweiligen Plasmid DNA mit 150 µl EBM Medium und 25 µl SuperFect Reagenz für 10 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. In der

Zwischenzeit wurden die Zellen zweimal mit EBM Medium gewaschen. Die Komplexbildung der DNA mit dem Dendrimer wurde nach exakt 10 Minuten durch die Zugabe von 1 ml EBM Komplettmedium gestoppt. 1,1 ml des Transfektionsansatzes wurde auf den Zellen für 3 Stunden inkubiert. Daran schließt sich ein Mediumwechsel mit EBM Komplettmedium an. Nach weiteren 18 Stunden im CO₂-Inkubator, wurden die Zellen von den Zellkulturschalen geerntet (2.2.2.7).

Für die Immunfluoreszenzfärbung wurden die Zellen auf einem Deckgläschen in einer 6 well-Platte (35 mm pro well) mit einer Zellzahl von 7×10^4 Zellen pro well ausgebracht. Für die Transfektion wurden 1,2 µg der Plasmid DNA mit 125 µl EBM Medium und 12 µl SuperFect vermischt. Nach der 10 minütigen Inkubation wurde die Komplexbildung durch Zugabe von 625 µl EBM Komplettmedium gestoppt. 750 µl des Transfektionsansatzes wurden für 3 Stunden auf den Zellen inkubiert und das Medium gegen EBM Komplettmedium ausgewechselt. Nach 18 Stunden Inkubation über Nacht wurden die Zellen für die Immunfluoreszenzfärbung (Kap. 2.2.3.9) eingesetzt.

2.2.2.6 Transfektion von HUVEC mit HiPerFect

Die Transfektion mit dem HiPerFect Transfection Reagent wurde für das Einbringen von siRNAs in HUVEC verwendet. Dazu wurde 1,3 ml Zellsuspension mit 4×10^5 Zellen pro 60 mm Zellkulturschale ausgebracht (Kap. 2.2.2.2) und direkt mit der siRNA transfiziert. Der Transfektionsansatz aus 600 µl EBM, 12 µl siRNA (20 pmol/µl) und 90 µl HiPerFect wurde in einem 1,5 ml Reaktionsgefäß angesetzt, kurz auf einem Vortex-Mixer gemischt und dann für 10 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Danach wurden 110 µl des Transfektionsansatzes pro Zellkulturschale zu den Zellen gegeben. Nach weiteren 3 Stunden Inkubation wurde 2,8 ml EBM Komplettmedium hinzugegeben. Am folgenden Tag wurden die Zellen entweder für die RNA Isolierung von den Zellkulturschalen geerntet (2.2.2.7) oder für die Messung am Durchflusszytometer präpariert. Für letzteres wurden die Zellen mit Trypsin vom Boden der Zellkulturschale abgelöst. Die Trypsinierungsreaktion wurde mit 10% FCS in PBS abgestoppt und für 5 Minuten bei 1000 xg und 4°C zentrifugiert. Das Pellet wurde in 200 µl PBS resuspendiert und für die Fluoreszenz-Messung am Durchflusszytometer eingesetzt.

2.2.2.7 Zellernte

Für die Ernte der adhärennten Zellen wurden diese auf Eis mit einem Zellschaber vom Boden der Zellkulturschale abgelöst und in ein vorgekühltes 50 ml Zentrifugenröhrchen überführt. Die Zellkulturschalen wurden mit kaltem PBS nachgespült, um alle Zellen vollständig zu entfernen. Die Zellsuspension wurde bei 800 xg und 4°C für 10 Minuten zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen, das Zellpellet in 500 µl kaltem PBS resuspendiert und in ein vorgekühltes 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt. Nach Zentrifugation bei 800 xg und 4°C für 10 Minuten wurde der Überstand vollständig entfernt. Das trockene Zellpellet wurde bei -20°C bzw. -80°C für RNA Isolierungen (2.2.1.1) gelagert oder direkt für die Zellyse weiter verwendet.

2.2.3 Proteinbiochemische Methoden

2.2.3.1 Lyse von Zellen mit RIPA-Puffer

Die Lyse von Zellen erfolgte in RIPA (*Radioimmunoprecipitation assay*)-Puffer, der nach Herstellerangaben mit Protease- und Phosphatase-Inhibitoren (cOmplete, Mini, Protease Cocktail und PhosSTOP Phosphatase Inhibitor Cocktail) versetzt wurde. Je nach Größe der Zellpellets wurden diese in einer entsprechenden Menge Lysepuffer resuspendiert (2-3-faches Volumen der Pellets). Nach 30 minütiger Inkubation auf Eis wurde das Lysat bei 16000 xg und 4°C für 10 Minuten zentrifugiert und der Überstand in ein neues, vorgekühltes 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt. Die Bestimmung der Proteinkonzentration erfolgte nach der Bradford-Methode (Kap. 2.2.3.4). Die Zellysate wurden bis zur weiteren Verwendung bei -20°C gelagert.

2.2.3.2 Lyse von Zellen mit RLB-Puffer

Zur Analyse der Luziferase Aktivität wurden Zellpellets in RLB-Puffer aufgeschlossen. Dazu wurden die Pellets ihrer Größe entsprechend in 50-100 µl 1x RLB-Puffer resuspendiert. Anschließend wurden die Proben für einen besseren Zellaufschluss bei -80°C eingefroren und wieder aufgetaut. Die wieder aufgetauten Proben wurden dann nach einer Inkubationszeit von 10 Minuten bei Raumtemperatur

bei 17000 xg und 4°C für 10 Minuten zentrifugiert. Der Überstand wurde in ein vorgekühltes 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt und nach der Bestimmung der Proteinkonzentration (Kap. 2.2.3.4) für die Luziferase Messung (Kap. 2.2.3.7) eingesetzt.

2.2.3.3 Biochemische Fraktionierung von Kern und Zytoplasma

Die biochemische Fraktionierung von Kern und Zytoplasma wurde mit dem NE-PER™ Nuclear and Cytoplasmic Extraction Reagents durchgeführt. Dabei wurden definierte Verhältnisse zwischen dem CERI, CERII und NER Puffer (200:11:100) eingesetzt, die jeweiligen Puffermengen richten sich dabei nach der Größe der Zellpellets.

CERI Puffer wurde in 2 bis 3-fachen Überschuss zum Volumen des Zellpellets zugegeben und für 15 Sekunden stark durchmischt. Nach 15 minütiger Inkubation auf Eis wurde CERII Puffer zugegeben und für 5 Sekunden stark durchmischt. Nach einer weiteren Inkubation für exakt 1 Minute auf Eis wurde das Lysat nochmals gemischt und für 5 Minuten bei 16000 xg und 4°C zentrifugiert. Der Überstand, der die zytosolische Fraktion enthält, wurde in ein frisches, vorgekühltes 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt. Das verbliebene Pellet wurde dreimal mit je 1 ml kaltem PBS gewaschen und für jeweils 3 Minuten bei 3000 xg und 4°C zentrifugiert. Anschließend wurde das Pellet in NER-Puffer aufgenommen und für 1 Stunde auf Eis inkubiert, wobei die Proben alle 10 Minuten für 15 Sekunden stark durchmischt wurden. Nach der Inkubation wurde das Lysat für 10 Minuten bei 16000 xg und 4°C zentrifugiert und der Überstand, der die nukleäre Fraktion enthält, in ein vorgekühltes 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt. Nach Bestimmung der Proteinkonzentrationen (Kap. 2.2.3.4) in den einzelnen Fraktionen wurden die Proben mittels Western Blot (Kap. 2.2.3.6) analysiert.

2.2.3.4 Konzentrationsbestimmung von Proteinen nach Bradford

Die Messung von Proteinkonzentrationen erfolgte mit dem BioRad Protein Assay Dye Reagent Concentrate nach der Bradford-Methode (Bradford, 1976).

Für die Herstellung einer Kalibrierungsgerade wurden eine Kalibrierungsreihe aus verschiedenen BSA-Lösungen mit einer Konzentration von 0 bis 10 µg/µl Protein angefertigt. Jeweils 1 µl der BSA-Lösungen wurden mit 799 µl dH₂O in einer Einmal-Halbmikroküvette (Sarstedt, Nümbrecht) verdünnt. Nach Zugabe von 200 µl des Reagenzes wurden die Ansätze gut durchmischt und für 5 Minuten inkubiert. Anschließend wurde die Absorptionsmessung als Dreifachbestimmung bei einer Wellenlänge von 595 nm an einem SmartSpec™ Plus Spectrophotometer durchgeführt. Die Mittelwerte der Dreifachbestimmungen wurden in einem Diagramm gegen die Proteinkonzentration aufgetragen und die Kalibrierungsgerade mittels linearer Regression bestimmt.

Die Messung der Proteinkonzentrationen aus 1 µl der Zelllysate erfolgte analog dazu in einer Zweifachbestimmung. Die Proteinkonzentrationen wurden anhand der erstellten Kalibrierungsgerade berechnet.

2.2.3.5 SDS-PAGE

Die Auftrennung von Proteinen entsprechend ihres Molekulargewichtes erfolgte mit Hilfe der Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE) unter denaturierenden und reduzierenden Bedingungen (Laemmli, 1970). Bei der Polyacrylamid Gelelektrophorese wird ein Netzwerk aus Acrylamid und N,N'-Methylenbisacrylamid generiert, das je nach Mischungsverhältnis eine definierte Porengröße hat und so eine Trennung von Proteinen entsprechend ihrer Größe ermöglicht.

Vor der Auftrennung im Gel wurde eine definierte Proteinmenge der Zelllysate mit Laemmli-Puffer versetzt und die Proteine für 5 min bei 95°C denaturiert. Der Laemmli-Puffer enthält zum einen Dodecylsulfationen, die einen negativ geladenen Komplex mit den Polypeptiden bilden und zum anderen reduzierende Agenzien, die für die Reduktion von Disulfid-Brücken verantwortlich sind. In die ausgesparten Geltaschen werden die Proben pipettiert. Durch Anlegen eines elektrischen Feldes wandern die Proteine in das Sammelgel und werden aufkonzentriert. Im Trenngel wandern die Proteine dann entsprechend ihrer Größe unterschiedlich schnell durch die Gelmatrix und werden der Größe nach aufgetrennt. Dies geschah bei einer konstanten Feldstärke von 11-15 V/cm in einer vertikalen Elektrophoresekammer

(Mini-PROTEAN® Tetra Cell). Je nach Größe der zu detektierenden Proteine wurden 10%-, 12%- oder 13%-ige Trenngele in Kombination mit einem 5%-igen Sammelgel verwendet (Tabelle 2.31). Zur Größenabschätzung der Proteinbanden wurde der Proteinmarker Precision Plus Protein™ Kaleidoscope™ verwendet.

Tabelle 2.31: Zusammensetzung der verwendeten Trenn- und Sammelgele

Komponente	Trenngel (10%)	Trenngel (12%)	Trenngel (13%)	Sammelgel (5%)
Acrylamid-Mix	10%	12%	13%	5%
Tris-HCl (pH 8,8)	390 mM	390 mM	390 mM	-
Tris-HCl (pH 6,8)	-	-	-	126 mM
SDS	0,1%	0,1%	0,1%	0,1%
APS	0,1%	0,1%	0,1%	0,1%
TEMED	0,04%	0,04%	0,04%	0,1%

2.2.3.6 Western Blot und Immundetektion

Die aufgetrennten Proteine wurden mittels Western Blot (Burnette, 1981) auf einer Membran immobilisiert und mit Hilfe der Immundetektion nachgewiesen. In einem ersten Schritt werden die Proteine durch Anlegen eines elektrischen Feldes aus dem SDS-Polyacrylamidgel auf eine PVDF (Polyvinylidenfluorid) Membran transferiert und dann unter Anwendung des Antigen-Antikörper-Bindungsprinzip sichtbar gemacht. Dabei bindet ein Antigen-spezifischer Primärantikörper an ein spezifisches Epitop auf dem Zielprotein. Ein sekundärer, an die Meerrettichperoxidase- (*horseradish peroxidase*, HRP) gekoppelter Markierungsantikörper bindet dann spezifisch an die FC-Region des Primärantikörpers. Die Detektion des so markierten Proteins erfolgt dann über eine Chemilumineszenzreaktion der Meerrettichperoxidase (Towbin *et al.*, 1979). Dabei wird die Oxidation von Luminol durch die Meerrettichperoxidase und Wasserstoffperoxid als Oxidationsmittel katalysiert. Das Reaktionsprodukt wird durch die chemische Reaktion in einen energetisch angeregten Zustand versetzt und stabilisiert sich wieder unter der Abgabe von Energie, in Form von Licht.

Der Proteintransfer auf die verwendeten PVDF Membranen erfolgte für Proteine ab einer Größe von mehr als 60 kDa für 2 Stunden bei 80 V und für Proteine kleiner als 60 kDa für 1 Stunde bei 100 V. Für den Transfer von Proteinen unterschiedlicher Größe wurden verschiedene Puffer verwendet (Transferpuffer für große bzw. kleine

Proteine, Tabelle 2.4). Vor dem Einsatz der PVDF Membran wurde diese für 60 Sekunden in Methanol aktiviert und dann in dem jeweiligen Transferpuffer zusammen mit den verwendeten Whatman-Filterpapieren und Blot-Schwämmen, sowie dem SDS-Polyacrylamidgel, äquilibriert. Der Aufbau des Western Blots ist in Abbildung 2.5 schematisch dargestellt. Um ein Erhitzen des Systems zu vermeiden, wurden Kühlakkus eingesetzt und der Western Blot in einer Kühlkammer oder in einem Eiswasserbad durchgeführt.

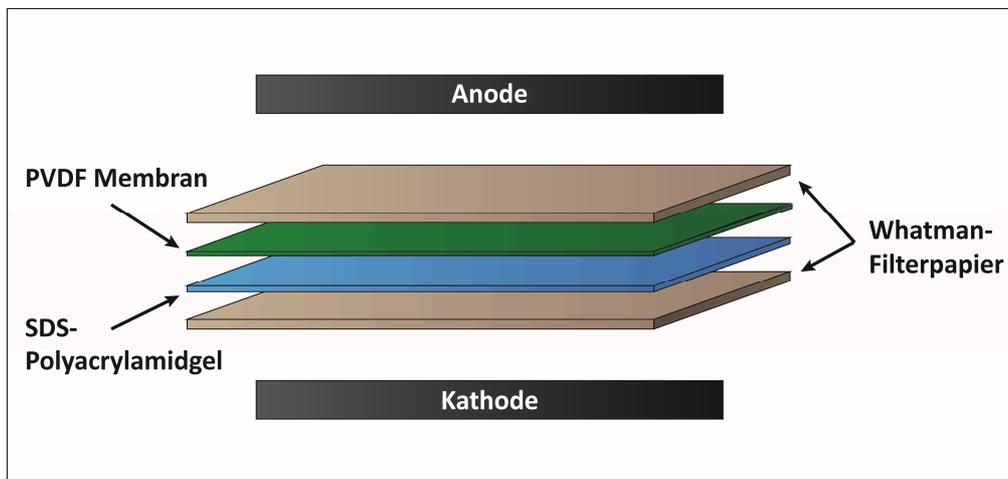


Abbildung 2.5: Schematischer Aufbau des Western Blot.

Das Blockieren der freien Bindungsstellen auf der Membran erfolgte mit 5% (w/v) Magermilchpulver in TBS-T für eine Stunde auf einem Horizontalschüttler bei 80 UpM und Raumtemperatur. Die Inkubation des Primärantikörpers erfolgte über Nacht bei 4°C. Um unspezifisch gebundene Antikörper von der Membran zu entfernen, wurde vor der Inkubation mit dem Zweitantikörper die Membran drei Mal für jeweils 10 Minuten in TBS-T gewaschen. Dann folgte die Inkubation mit dem entsprechenden Sekundärantikörper, der gegen Immunglobuline aus der Spezies, aus der der Primärantikörper stammt, gerichtet ist, für 1 Stunde auf dem Schüttler bei 80 UpM und Raumtemperatur. Abschließend wurde die Membran nochmals drei Mal für je 10 Minuten in TBS-T bei Raumtemperatur gewaschen. Die eingesetzten Primär- und Sekundärantikörper und ihre jeweiligen Verdünnungen sind in den Tabellen 2.7 und 2.8 aufgeführt. Für die Detektion der Proteine wurde das ECL Reagenz nach Angaben des Herstellers verwendet. Nach der Inkubation mit dem

Chemilumineszenzreagenz wurde die Membran in eine Autoradiographie Kassette gelegt. Die Detektion der Chemilumineszenz wurde in einer Dunkelkammer unter Zuhilfenahme von Röntgenfilmen (HyperFilm™ ECL, GE Healthcare) bei unterschiedlichen Expositionszeiten durchgeführt.

2.2.3.7 Messung der Luziferase Aktivität

Die im Rahmen der Arbeit verwendete Luziferase aus dem Leuchtkäfer *Photinus pyralis* katalysiert in Anwesenheit von Magnesium-Ionen unter Hydrolyse von ATP die Oxidation von D-Luziferin zu Oxyluziferin (Abbildung 2.6). Bei dieser Reaktion entsteht ein angeregter, instabiler Übergangszustand des Oxyluziferins, der unter Abgabe von Licht in einen stabilen Zustand übergeht; dabei ist die emittierte Lichtmenge direkt proportional zu der Luziferasemenge.

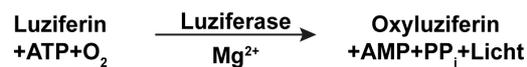


Abbildung 2.6: Luziferase Reaktion von *Photinus pyralis*. Erläuterung siehe Text.

Die Zellpellets aus den Kotransfektionen wurden in 1x RLB-Puffer aufgeschossen (Kap. 2.2.3.2) und die Luziferaseaktivität in den Zellysaten bestimmt. Dazu wurden je 6 µg der Proteinlysate mit 1x RLB-Puffer auf ein Gesamtvolumen von 20 µl aufgefüllt und in lichtundurchlässige 96well Mikrotiterplatten überführt. Die Messung der Lumineszenz erfolgte in einem Luminometer mit automatisierter Injektionsapparatur. Durch die Injektion von 100 µl Luziferase-Reagenz wurde die Reaktion gestartet und nach einer Verzögerung von 5 Sekunden das entstehende Licht für eine Messzeit von 20 Sekunden in relativen Lichteinheiten (*relative light units*, RLU) gemessen.

2.2.3.8 Annexin-V-Färbung

Bei der Annexin-V-Färbung handelt es sich um eine Lebendfärbung, mit deren Hilfe die Apoptoserate von Zellen untersucht werden kann. In der frühen Phase der

Apoptose verliert die Zellmembran ihre Asymmetrie und transloziert die nach innen gerichteten Phosphatidylserine an die Membranaußenseite (Koopman *et al.*, 1994). Annexin-V ist ein Kalziumabhängiges Bindungsprotein, das eine hohe Affinität für die Phosphatidylserin hat. Durch Kopplung von Annexin an ein Fluorochrom können die früh apoptotischen Zellen im Durchflusszytometer detektiert werden. Zur Abgrenzung von spät apoptotischen und nekrotischen Zellen wurden die Zellen zusätzlich mit PI oder 7-AAD (BD Pharmingen™, San Diego, USA) gefärbt. Diese Farbstoffe sind erst ab der späten Apoptose in der Lage, die perforierte Zellmembran zu passieren und interkalieren in die DNA. Als Messergebnis erhält man ein Dot Blot Diagramm, in dem das Annexin-V Signal (x-Achse) gegen das PI bzw. 7-AAD Signal (y-Achse) aufgetragen ist. Nach Auswertung der Daten kann eine Aussage über den Anteil an apoptotischen Zellen an der Population gemacht werden. Dabei entsprechen die apoptotischen Zellen den Annexin-V positiven und 7-AAD negativen Zellen.

Für die Bestimmung der Apoptoserate in HUVECs wurde eine Zellkulturschale pro Transfektionsansatz (Kap. 2.2.2.5) eingesetzt. Zuerst wurden die Zellen mit 2 ml PBS gewaschen. Zum Ablösen der adhären Zellen wurde dann pro Zellkulturschale 300 µL Trypsin-EDTA Lösung auf die Zellen gegeben und unter dem Lichtmikroskop beobachtet. Sobald die Zellen sich abgerundet hatten, wurde die Reaktion durch Zugabe von 900 µL 10% FCS in PBS abgestoppt und die Zellen mit einer Einweg-Transferpipette in vorgekühlte FACS-Röhrchen (Sarstedt, Nümbrecht) überführt. Die Zellen wurden dann bei 800 xg und 4°C für 5 Minuten zentrifugiert. Da die Annexin-V Bindung Kalziumabhängig ist, wird eine definierte Salzkonzentration für eine optimale Färbung benötigt. Deshalb wurden die trypsinierten Zellpellets anschließend zweimal mit je 500 µl kaltem 1x Annexin-V-Binding Puffer (Tabelle 2.4) gewaschen. Nach den Waschschritten wurden die Zellen in 50 µL kaltem 1x Annexin-V-Binding Puffer aufgenommen und mit 2,5 µL Annexin-V-APC und 2,5 µL PI (oder 7AAD) versetzt. Nach einer Inkubationszeit von 30 Minuten im Dunkeln bei Raumtemperatur wurde 200 µL 1x Annexin-V-Binding Puffer zu den Zellen pipettiert und die Anzahl apoptotischer Zellen zügig mit Hilfe des FACS Calibur™ Durchflusszytometer gemessen. Die Auswertung der erhaltenen Dot Blot Diagramme erfolgte mit dem Programm FlowJo (Treestar inc., Ashland, USA).

2.2.3.9 Immunfluoreszenzfärbung

Die Immunfluoreszenzfärbung transfizierter HUVEC wurde zum Lokalisationsnachweis mutierter Proteinvarianten durchgeführt. Nach dem Ausbringen und der Transfektion der Zellen auf einem Deckgläschen (Kap. 2.2.2.5) wurden die Zellen am folgenden Tag nach einmaligem Waschen mit 2 ml PBS für 15 Minuten mit 4% (w/v) Paraformaldehyd (PFA) bei Raumtemperatur fixiert. Die Fixierlösung wurde abgesaugt und durch dreimaliges Waschen mit PBS wieder entfernt. Dann wurden die Zellen durch die Zugabe von Triton-Puffer (Tabelle 2.4) für exakt 15 Minuten bei Raumtemperatur permeabilisiert. Nach der Permeabilisierung wurden die Zellen dreimal mit PBS gewaschen. Der Primär-Antikörper wurde daraufhin über Nacht bei 4°C inkubiert. Alle weiteren Arbeitsschritte wurden bei Raumtemperatur durchgeführt. Am folgenden Tag wurden die Zellen dreimal mit 2 ml PBS für je 5 Minuten gewaschen. Dann folgte eine einstündige Inkubation mit dem Zweitantikörper. Da die verwendeten Fluoreszenzfarbstoffe lichtempfindlich sind wurden die Zellen ab diesem Arbeitsschritt mit Alufolie abgedunkelt. Das Zytoskelett wurde mit Alexa Fluor® 568 Phalloidin für 20 Minuten und die Kerne mit DAPI für 5 Minuten gefärbt. Nach jeder Farbstoffinkubation wurden die Zellen jeweils dreimal mit 2 ml PBS für je 5 Minuten gewaschen. Im letzten Schritt wurden die Deckgläschen mit dem ProLong® Gold Antifade Reagenz auf einem Objektträger eingedeckt. Die Präparate wurden für 24 Stunden bei Dunkelheit getrocknet und anschließend mit Nagellack versiegelt. Die Aufnahme der Immunfluoreszenzfärbungen erfolgte an einem Fluoreszenzmikroskop.

3 Ergebnisse

In der Arbeitsgruppe Haendeler konnte nachgewiesen werden, dass GRHL3-2 antiapoptotisch und promigratorisch in Endothelzellen wirkt (Lukosz *et al.*, 2011). Jedoch codiert das menschliche Genom nicht nur für GRHL3-2, sondern insgesamt für drei verschiedene Isoformen: Isoform 1 (GRHL3-1), Isoform 2 (GRHL3-2) und Isoform 3 (GRHL3-3). Daher wurde zunächst untersucht, ob alle Isoformen in Endothelzellen exprimiert sind, und nachdem dieser Nachweis geführt worden war, welchen Einfluss GRHL3-1 und GRHL3-3 auf die Migration haben. Es zeigte sich, dass GRHL3-1 promigratorisch wirkt, wohingegen GRHL3-3 die Migration der Endothelzellen hemmt. Das erste Ziel meiner Arbeit war es nun den Einfluss von GRHL3-1 und GRHL3-3 auf die Apoptose in Endothelzellen zu untersuchen.

3.1 Rolle von GRHL3-1 und GRHL3-3 bei der Apoptose

Daher wurde zuerst der Effekt von GRHL3-1 und GRHL3-3 nach Überexpression in Endothelzellen auf die Apoptose untersucht. Dazu wurden Endothelzellen mit Expressionsvektoren für GRHL3-1, GRHL3-3 oder dem Leervektor (LV) pCMV V5neo transfiziert. Die Anzahl apoptotischer Zellen wurde durch Färbung mit Annexin-V-APC/7-AAD und anschließender durchflusszytometrischer Analyse ermittelt. Es zeigte sich, dass GRHL3-1 die Apoptose inhibiert, wohingegen GRHL3-3 keinen Einfluss auf die Apoptose hat (Abbildung 3.1).

Da in Vorarbeiten unserer Arbeitsgruppe gezeigt wurde, dass die antiapoptotische Funktion der Isoform GRHL3-2 von der eNOS Aktivität abhängig ist, wurde dies ebenfalls für GRHL3-1 untersucht. Dazu wurden die Zellen 6 Stunden nach der Transfektion mit dem eNOS Inhibitor L-N^G-Nitroarginine Methyl Ester (L-NAME) behandelt und nach weiteren 18 Stunden die Apoptoserate bestimmt. Abbildung 3.1 zeigt, dass durch Inhibierung der eNOS der antiapoptotische Effekt von GRHL3-1 vollständig aufgehoben wird.

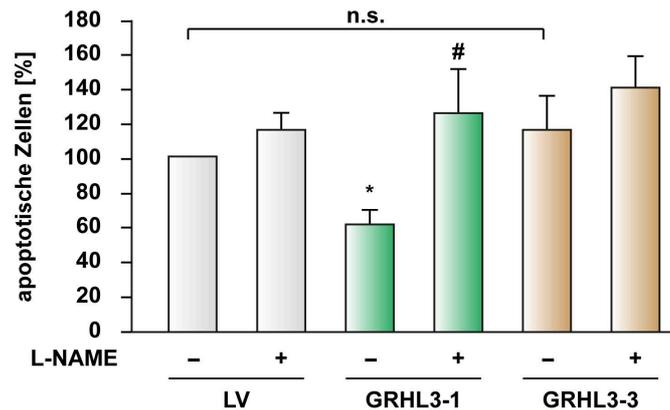


Abbildung 3.1: Wirkung von GRHL3-1 und GRHL3-3 auf Apoptose in Abhängigkeit der eNOS Aktivität. Endothelzellen wurden mit Expressionsplasmiden für GRHL3-1, GRHL3-3 oder einem Leervektor (LV) transfiziert. Die transfizierten Zellen wurden nach 6 Stunden mit 100 μmol L-N^G-Nitroarginine Methyl Ester (L-NAME) behandelt. Nach weiteren 18 Stunden wurde die Apoptose durchflusszytometrisch ermittelt. (n=4; * P <0,05 vs unbehandelte EV Zellen; # P <0,05 vs unbehandelte GRHL3-1 überexprimierende Zellen; n.s. = nicht signifikant)

Um eine Idee zu bekommen, wie GRHL3-1 in die Signaltransduktion bei der Apoptose eingreift, wurde im Folgenden der Einfluss von GRHL3-1 und GRHL3-3 auf die BCL-X_L Expression, als ein möglicher antiapoptotischer Mechanismus, untersucht.

3.2 Einfluss von GRHL3-1 und GRHL3-3 auf die BCL-X_L Expression

Das Transmembranprotein BCL-X_L ist in der äußeren Mitochondrienmembran lokalisiert (Gonzalez-Garcia *et al.*, 1994) und wirkt antiapoptotisch durch Stabilisierung des mitochondrialen Transmembranpotentials (Shimizu *et al.*, 1996).

Daher wurde als nächstes der Einfluss von GRHL3-1 und GRHL3-3 auf die Proteinmenge von BCL-X_L, als ein Mitglied der antiapoptotischen BCL2 Familie untersucht. Dazu wurden Endothelzellen mit den Expressionsvektoren für GRHL3-1, GRHL3-3 oder dem Leervektor (LV) pCMV V5neo transfiziert. In den daraus resultierenden Zelllysaten wurde das Proteinlevel von BCL-X_L mittels Western Blot analysiert. (Abbildung 3.2).

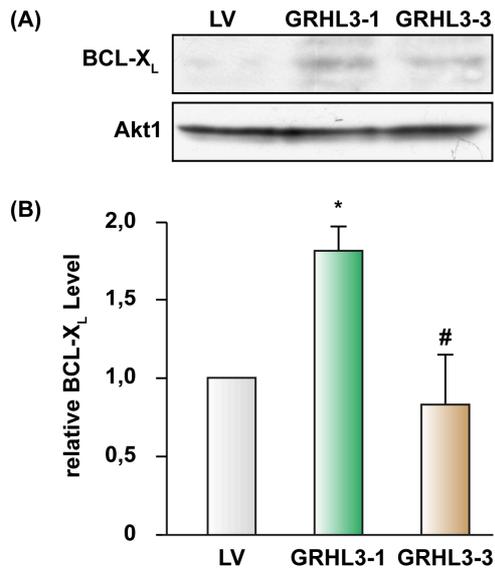


Abbildung 3.2: Einfluss von GRHL3-1 und GRHL3-3 auf die BCL-X_L Proteinmenge. Endothelzellen wurden mit Expressionsvektoren für GRHL3-1, GRHL3-3 oder einem Leervektor (LV) transfiziert. (A) Repräsentativer Immunoblot der Zelllysate nach Überexpression von GRHL3-1 und GRHL3-3 unter Verwendung von Antikörpern gegen BCL-X_L und Akt1 (Ladungskontrolle). (B) Semiquantitative Auswertung. (n=4, * $P < 0,05$ vs LV, # $P < 0,05$ vs GRHL3-1)

Nach Überexpression von GRHL3-1 ist ein signifikanter Anstieg der BCL-X_L Proteinmenge zu beobachten. Im Gegensatz dazu hat die Überexpression von GRHL3-3 keinen Einfluss auf die Expression. Diese Erhöhung der BCL-X_L Proteinmenge nach Überexpression von GRHL3-1 könnte ein Grund dafür sein, dass GRHL3-1 antiapoptotisch wirkt.

3.3 Apoptotischer Effekt von GRHL3-1 und GRHL3-3 nach endogenem Knockdown

Da eine Überexpression eine artifizielle Situation in Zellen darstellt, sollte die Apoptose ebenfalls nach Knockdown von GRHL3-1 und GRHL3-3 analysiert werden. Hierfür wurden Fluoreszenz-markierte siRNAs (5'-Alexa Fluor 488 markierte siRNA) konstruiert. Um gezielt eine der beiden Isoformen auszuschalten, wurden die Zielsequenzen so gewählt, dass die siRNA für GRHL3-1 über der Spleißposition zwischen Exon 1B und Exon 2 (siRNA GRHL3-1) und für GRHL3-3 über die Spleißposition zwischen Exon 1B und Exon 3 (siRNA GRHL3-3) bindet (Abbildung 3.3). Da bei Isoform 3 durch alternatives Spleißen das Exon 2 entfernt wird, kann so ein Isoform-spezifischer Knockdown gewährleistet werden.

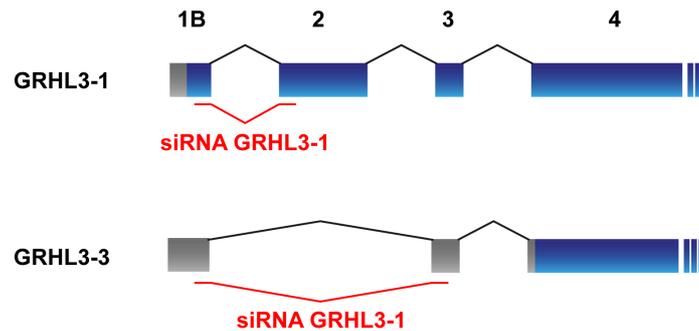


Abbildung 3.3: Schematische Darstellung der siRNA Bindung an GRHL3-1 und GRHL3-3 für den individuellen Knockdown der beiden Isoformen. Dargestellt sind die Exonstrukturen der GRHL3 Isoformen 1 und 3 im Vergleich. Untranslatierte Bereiche sind mit einem grauen Kasten und translatierten Bereiche mit einem blauen Kasten dargestellt. GRHL3-3 ist eine Spleißvariante von GRHL3-1, in der der Translationsstart in Exon 4 verschoben ist. Die siRNA GRHL3-1 bindet über der Exongrenze von Exon 1B und Exon 2, die siRNA GRHL3-3 bindet über der Exongrenze von Exon 1B und Exon 3.

Zur Beurteilung der Transfektionseffizienzen, wurden der Anteil der mit Fluoreszenzmarkierten siRNAs (siRNA GRHL3-1 oder siRNA GRHL3-3) transfizierten Endothelzellen durchflusszytometrisch gemessen (Abbildung 3.4). Die Transfektionseffizienzen liegen bei 96,2% für die siRNA GRHL3-1 und bei 95,9% für die siRNA GRHL3-3.

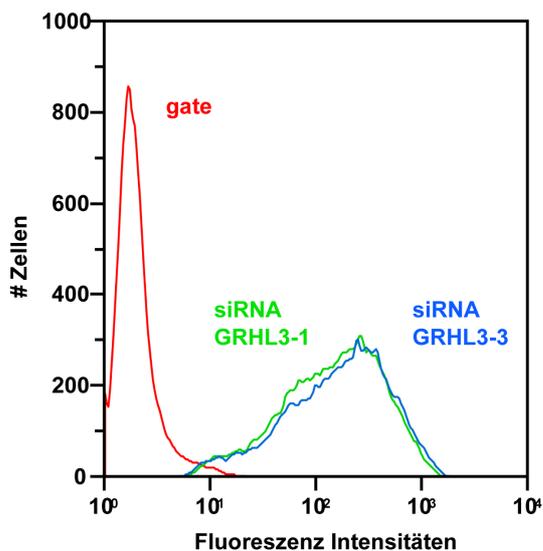


Abbildung 3.4: Transfektionseffizienz mit Fluoreszenz-markierter siRNA. Primäre humane Endothelzellen wurden mit 5'-Alexa Fluor 488-markierter siRNAs transfiziert. Der Anteil mit siRNA transfizierter Zellen wurde durchflusszytometrisch gemessen. Die Transfektionseffizienzen liegen bei 96,2% für die siRNA GRHL3-1 und bei 95,9% für die siRNA GRHL3-3.

Im nächsten Schritt wurde der Isoform-spezifische Knockdown nachgewiesen. Da kein funktioneller GRHL3 Antikörper zur Verfügung steht, erfolgte der Expressionsnachweis der Isoformen auf Transkriptebene über reverse Transkription und anschließender PCR (RT-PCR). Die Primer wurden so konstruiert, dass für jede Isoform eine spezifische DNA-Sequenz mit definierter Größe amplifiziert wird. Die Bindungspositionen der Primer sind schematisch in Abbildung 3.5 dargestellt (die Primersequenzen sind im Materialteil Tabelle 2.13 aufgelistet). Um ausschließen zu können, dass die siRNAs einen Einfluss auf die GRHL3-2 Expression haben, wurden zusätzlich Primer zum Nachweis von GRHL3 Isoform 2 verwendet.

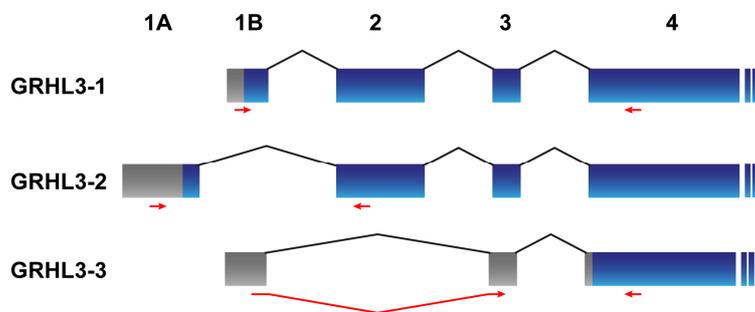


Abbildung 3.5: Schematische Darstellung der Primerbindung zum Expressionsnachweis der Isoformen GRHL3-1, GRHL3-2 und GRHL3-3. Dargestellt sind die Exonstrukturen von GRHL3-1, GRHL3-2 und GRHL3-3. Die Isoformen unterscheiden sich ausschließlich in den ersten 3 Exons und sind ansonsten in Richtung des C-terminalen Endes identisch. Untranslatierte Bereiche sind mit einem grauen Kasten und die translatierten Bereiche mit einem blauen Kasten dargestellt. Die roten Pfeile zeigen die Bindungsposition und Orientierung der Primer.

Es zeigte sich, dass die verwendeten siRNAs für GRHL3-1 und GRHL3-3 spezifisch für die jeweilige Isoform waren und keinen Einfluss auf GRHL3-2 hatten (Abbildung 3.6). Als Negativkontrolle wurde eine RT-PCR nach Transfektion ohne siRNA durchgeführt. Als weitere Kontrollen wurde zusätzlich eine RT-PCR ohne *template* und eine für das Haushaltsgen RLP32 mitgeführt.

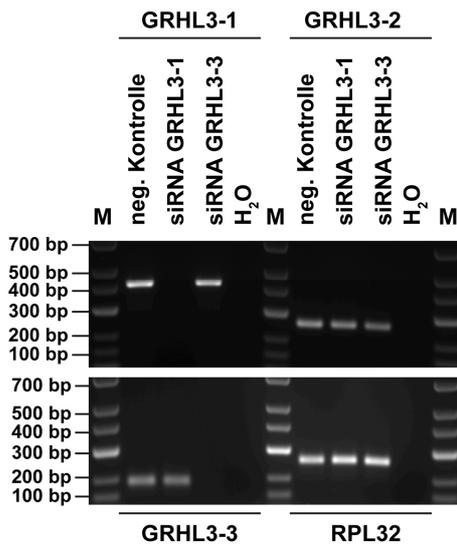


Abbildung 3.6: Nachweis des Knockdowns von endogenem GRHL3-1 und GRHL3-3.

Primäre humane Endothelzellen wurden mit 5'-Alexa Fluor 488-markierter siRNAs transfiziert, die gegen GRHL3-1 oder GRHL3-3 gerichtet sind. Als Negativkontrolle wurde eine RT-PCR nach Transfektion ohne siRNA durchgeführt. Die endogene Expression von GRHL3-1, GRHL3-2, GRHL3-3 und dem Haushaltsgen RPL32 wurde mittels reverse Transkriptions-PCR (RT-PCR) ermittelt. Die erwarteten Fragmentgrößen betragen 412 bp (GRHL3-1), 254 bp (GRHL3-2), 185 bp (GRHL3-3) und 257 bp (RPL32).

In parallel mit den siRNAs für GRHL3-1 oder GRHL3-3 transfizierten Endothelzellen wurde die Apoptoserate über Annexin-V-APC/7-AAD Färbung und anschließende durchflusszytometrische Messung ermittelt. Abbildung 3.7 zeigt, dass nach Knockdown von GRHL3-1 die Anzahl apoptotischer Zellen signifikant steigt, wohingegen der Knockdown von GRHL3-3 zu einer signifikanten Reduktion der Apoptoserate führt. Somit konnte der antiapoptotische Effekt von GRHL3-1, der nach Überexpression gefunden wurde (Abbildung 3.1), bestätigt werden. Darüber hinaus konnte für GRHL3-3 eine proapoptotische Funktion nachgewiesen werden.

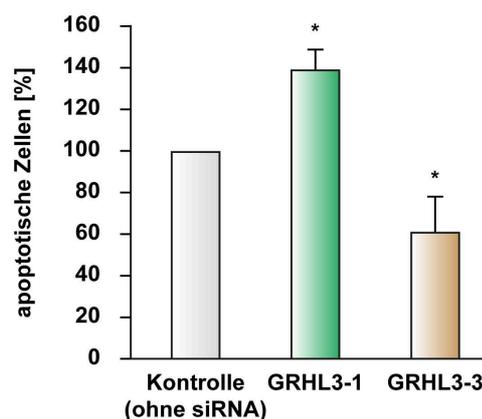


Abbildung 3.7: Effekt des Knockdowns von endogenem GRHL3-1 und GRHL3-3 auf die Apoptose. Endothelzellen wurden mit 5'-Alexa Fluor 488-markierter siRNAs transfiziert, die gegen GRHL3-1 oder GRHL3-3 gerichtet sind. Die Anzahl apoptotischer Zellen wurde nach Annexin-V-APC/7-AAD Färbung durchflusszytometrisch gemessen. (n=3, * $P < 0,05$ vs Kontrolle ohne siRNA)

Im ersten Teil meiner Arbeit konnte ich zeigen, dass die Isoformen 1 und 3 entgegengesetzte Effekte auf die Apoptose haben, und dass der antiapoptotische Effekt durch GRHL3-1 von der eNOS Aktivität abhängig ist. Weiterhin habe ich gezeigt, dass die Überexpression von GRHL3-1 einen Einfluss auf den antiapoptotischen BCL-X_L Mechanismus hat, indem es die BCL-X_L Expression stimuliert. Erste Vermutungen, dass es sich bei den Isoformen um einen Aktivator und Repressor handelt, konnten widerlegt werden. Beide Isoformen sind aktive Transkriptionsfaktoren und führen zur transkriptionellen Aktivierung unterschiedlicher Zielgene (Haendeler *et al.*, 2013). Es ist bekannt, dass alternatives Spleißen auch im Endothel regulatorische Funktionen hat und sich die Wahl der Spleißstellen durch externe Stimuli ändern kann (Farrokh *et al.*, 2015). Die dabei entstehenden Spleißvarianten haben zum Teil unterschiedliche oder, wie im Fall von GRHL3-1 und GRHL3-3, sogar entgegengesetzte zelluläre Wirkungen. So konnte für GRHL3-1 und GRHL3-3 gezeigt werden, dass sich das Expressionsverhältnis der beiden Spleißvarianten durch eine erhöhte NO-Produktion zu Gunsten von GRHL3-1 verschiebt (Haendeler *et al.*, 2013).

Nachdem die Funktionen der Isoformen bei der Apoptose aufgeklärt worden waren, sollte als weiteres Ziel meiner Arbeit untersucht werden, ob die Beeinflussung der Apoptose durch GRHL3 strikt an seine Kernlokalisierung gebunden ist. Zur Einengung und Definition des Kernlokalisierungssignals wurden Deletionen und Punktmutationen in GRHL3 eingeführt und die so erzeugten Mutanten auf ihre Lokalisation und Funktion untersucht.

3.4 Herstellung großflächiger Deletionsmutanten

Bei der initialen Charakterisierung des Transkriptionsfaktors GRHL3 durch Ting *et al.* wurden aufgrund der Konservierung mit den zu diesem Zeitpunkt bekannten verwandten Proteinen GRHL1 und GRHL2 eine N-terminale Aktivierungsdomäne (AD), eine zentral liegende DNA-Bindedomäne (DBD) und eine Dimerisierungsdomäne (DD) am C-terminalen Ende vorhergesagt (Ting *et al.*, 2003b). Allerdings gibt es bis dato keinerlei Untersuchungen bezüglich der Natur des Kernlokalisierungssignals von GRHL3 und seiner Lage im Protein.

Die GRHL3 Isoformen 1 bis 3 unterscheiden sich ausschließlich in der N-terminalen Aminosäuresequenz (siehe Sequenzvergleich Abbildung 1.4). Zudem sind alle drei Isoformen aktive Transkriptionsfaktoren (Haendeler *et al.*, 2013; Lukosz *et al.*, 2011), was eine Kernlokalisierung impliziert. Daher wurden die folgenden Untersuchungen an der in Endothelzellen prädominant exprimierten Isoform GRHL3-2 durchgeführt.

Zur Einengung des Kernlokalisierungssignals wurden für ein erstes Screening Expressionsplasmide mit großflächigen Deletionen in der codierenden Sequenz von GRHL3-2 kloniert, diese Deletionsmutanten wurden mit ΔB , ΔC und ΔCT bezeichnet (Abbildung 3.8).

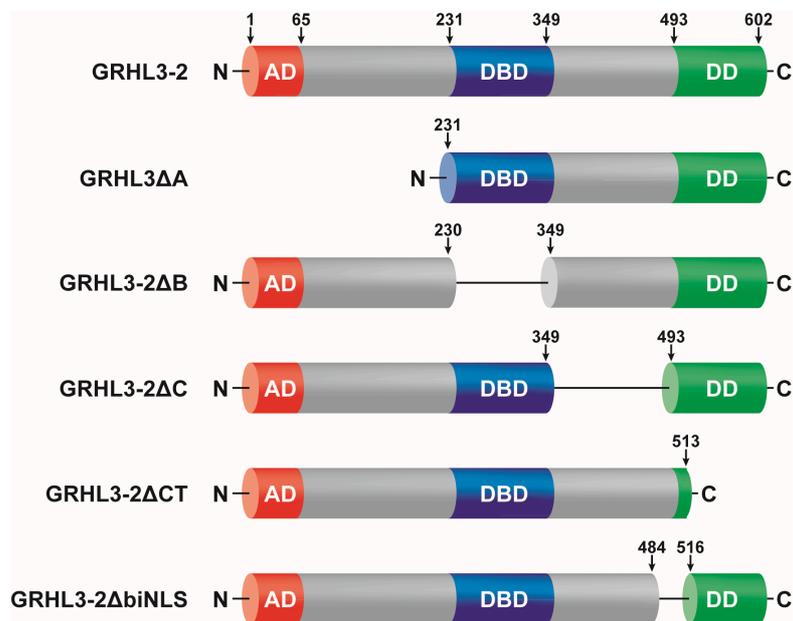


Abbildung 3.8: Schematische Darstellung der Primärstruktur der GRHL3-2 Deletionsmutanten im Vergleich zum kompletten Protein. Die Abbildung zeigt die in den verschiedenen GRHL3-2 Varianten deletierten Bereiche. Die von Ting *et al.* (Ting *et al.*, 2003b) vorhergesagte Aktivierungsdomäne (AD, Aminosäure 1-65) ist in rot, die DNA-Bindedomäne (DBD, Aminosäure 231-349) in blau und die Dimerisierungsdomäne (DD, Aminosäure 493-602) in grün dargestellt, die Zahlen bezeichnen Aminosäurepositionen. N markiert die N-terminalen und C die C-terminalen Enden der Proteinvarianten. In den einzelnen Proteinvarianten sind folgende Aminosäuren deletiert: GRHL3 Δ A AS 1-230, GRHL3-2 Δ B AS 231-348, GRHL3-2 Δ C AS 350-492, GRHL3-2 Δ CT AS 514-602, GRHL3-2 Δ biNLS AS 485-515.

Zusätzlich wurde eine Deletionsmutante hergestellt, bei der ein potentielles NLS deletiert ist. Die Sequenz für dieses potentielle NLS wurde unter Zuhilfenahme des

Freeware Programms cNLSMapper (Kosugi *et al.*, 2009) vorhergesagt. Dieses Programm vergibt Scores, deren Höhe mit der Wahrscheinlichkeit für die Lokalisation im Zellkern korreliert. So ist beispielsweise ein β -Glucuronidase-GFP Fusionsprotein, das mit einem NLS mit einem Score ≥ 10 fusioniert wurde, ausschließlich im Kern lokalisiert (Kosugi *et al.*, 2009). Die Suche mit einem *cut-off* Score von 7,0 über die komplette Aminosäuresequenz von GRHL3-2 ergab eine Vorhersage für ein zweiteiliges NLS mit einem Score von 11,1. Dieses NLS (RLPLKRTCSPFTEEFELPSKQAKE) erstreckt sich von Aminosäure 485 bis Aminosäure 509; die entsprechende Deletionsmutante wurde als Δ biNLS bezeichnet (Abbildung 3.8). Bei der als GRHL3 Δ A bezeichneten Proteinvariante, ist die N-terminale Sequenz bis zur DNA-Bindedomäne deletiert; somit ist diese Deletion nicht GRHL3-2 spezifisch, sondern betrifft alle drei Isoformen (Abbildung 3.9).

```

          10      20      30      40      50
          .      .      .      .      .
GRHL3-1  MWMNSILPIFLFRSVRLKNDPVNLQKFSYTSSEDAWKTYLENPLTAATK
GRHL3-2  -----MSNELDFRSVRLKNDPVNLQKFSYTSSEDAWKTYLENPLTAATK
GRHL3-3  -----
GRHL3 $\Delta$ A -----

          60      70      80      90      100
          .      .      .      .      .
GRHL3-1  AMMRVNGDDDSVAALSFLYDYMGPKKRIILSSSTGGRNDQ GKRYHGM E
GRHL3-2  AMMRVNGDDDSVAALSFLYDYMGPKKRIILSSSTGGRNDQ GKRYHGM E
GRHL3-3  -----ME
GRHL3 $\Delta$ A -----

          110     120     130     140     150
          .      .      .      .      .
GRHL3-1  YETDLTPLESPTHLMKFLTENASGTPEYPDLLKKNLMSLEGALPTPGKA
GRHL3-2  YETDLTPLESPTHLMKFLTENASGTPEYPDLLKKNLMSLEGALPTPGKA
GRHL3-3  YETDLTPLESPTHLMKFLTENASGTPEYPDLLKKNLMSLEGALPTPGKA
GRHL3 $\Delta$ A -----

          160     170     180     190     200
          .      .      .      .      .
GRHL3-1  APLPAGPSKLEAGSVDSYLLPTTDMYDNGSLNSLFESIHGVPPTQRWQPD
GRHL3-2  APLPAGPSKLEAGSVDSYLLPTTDMYDNGSLNSLFESIHGVPPTQRWQPD
GRHL3-3  APLPAGPSKLEAGSVDSYLLPTTDMYDNGSLNSLFESIHGVPPTQRWQPD
GRHL3 $\Delta$ A -----

          210     220     230     240     250
          .      .      .      .      .
GRHL3-1  STFKDDPQESMLFPDILKTSPEPPCPEDYPSLKSDFEYTLGSPKAIHIKS
GRHL3-2  STFKDDPQESMLFPDILKTSPEPPCPEDYPSLKSDFEYTLGSPKAIHIKS
GRHL3-3  STFKDDPQESMLFPDILKTSPEPPCPEDYPSLKSDFEYTLGSPKAIHIKS
GRHL3 $\Delta$ A -----MFEYTLGSPKAIHIKS

```

Abbildung 3.9: Alignment der N-terminalen Bereiche von GRHL3-1, GRHL3-2, GRHL3-3 und GRHL3 Δ A. Das Alignment zeigt den Vergleich der N-terminalen Aminosäuresequenzen der Proteine GRHL3-1, GRHL3-2, GRHL3-3 und der Deletionsmutante GRHL3 Δ A. Die in allen vier Proteinen bzw. Proteinvarianten identischen Aminosäuren sind schwarz unterlegt. Das Alignment wurde erstellt mit Dialign und dargestellt mit GeneDoc.

Als Ausgangsplasmide für die Klonierung wurden die im Rahmen der Doktorarbeit von Arne Mlynek hergestellten Expressionsplasmide verwendet, die für die gleichen Deletionen in GRHL3-3 mit einem N-terminalen myc- und einem C-terminalen V5-tag codieren. Da GRHL3-2 am N-Terminus 93 Aminosäuren länger ist als Isoform 3, die Proteine ansonsten aber identisch sind, wurde das 5'-Ende der codierenden Region von GRHL3-2 mit dem N-terminalen myc-tag in diese Expressionsplasmide für GRHL3-3 inseriert. Für die Insertion wurde das GRHL3-2 Fragment über einen Restriktionsverdau mit den Enzymen *SbfI* und *NdeI* aus dem analogen Expressionsvektor für GRHL3-2 isoliert und in das mit den gleichen Restriktionsenzymen geschnittene Plasmidrückgrat von pCMV mycGRHL3-3 mit der jeweils gewünschten Deletion eingesetzt. Die Klonierungsstrategie ist in Abbildung 3.10 schematisch dargestellt.

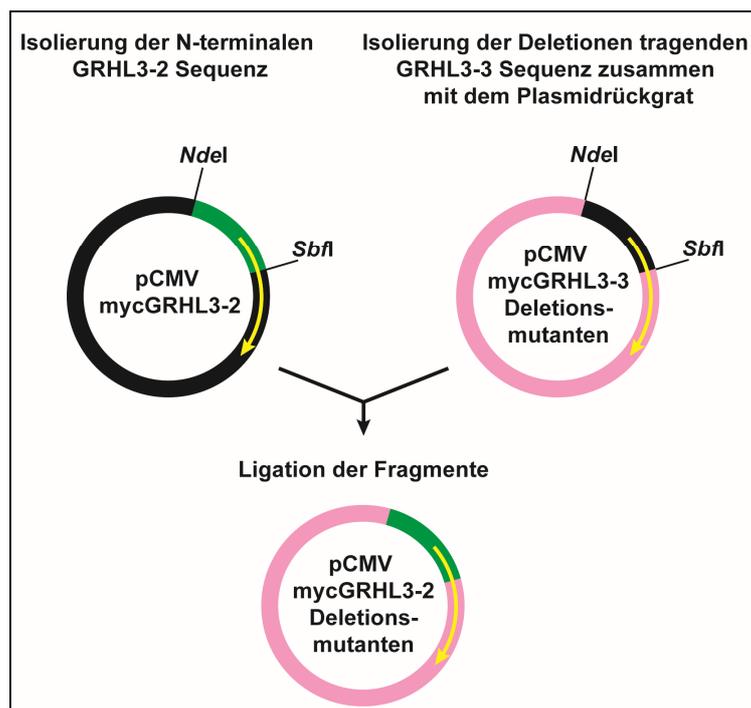


Abbildung 3.10: Klonierungsstrategie zur Herstellung von GRHL3-2 Deletionsvarianten mit N-terminalem myc- und C-terminalem V5-tag. Für die Klonierung der verschiedenen GRHL3-2 Varianten mit großflächigen Deletionen wurden die geeigneten Plasmide mit den Restriktionsenzymen *NdeI* und *SbfI* geschnitten. Die N-terminale GRHL3-2 Sequenz wurde aus pCMV mycGRHL3-2 isoliert (grün dargestellter Bereich). Das Plasmidrückgrat wurde zusammen mit den für die deletierten GRHL3-3 Sequenzen aus den entsprechenden Plasmiden isoliert (rosa dargestellter Bereich). Die für die verschiedenen GRHL3 Varianten codierenden Sequenzen sind mit einem gelben Pfeil dargestellt.

Im Folgenden wird exemplarisch die Herstellung des Konstruktes GRHL3-2 Δ C erklärt. Bei dem Restriktionsverdau von pCMV mycGRHL3-3 Δ C mit den Restriktionsenzymen *Nde*I und *Sbf*I wurden zwei Fragmente mit einer Größe von 5936 bp und 659 bp erwartet. Wie in Abbildung 3.11 zu sehen ist, sind bei der gelelektrophoretischen Analyse zwei Banden zwischen 5000 bp und 7000 bp zu erkennen. Diese Doppelbande lässt vermuten, dass trotz Inkubation der Restriktionsansätze über Nacht bei 37°C und optimalen Pufferbedingungen, eines der beiden Restriktionsenzyme nicht alle Spaltstellen erkannt hat. Für die weitere Klonierung wurde das kleinere der beiden Fragmente aus dem Gel ausgeschnitten. Der Verdau des Plasmids pCMV mycGRHL3-2 mit denselben Restriktionsenzymen ergibt zwei Banden mit einer Größe von 6365 bp und 938 bp. Auch hier wurde eine Doppelbande detektiert, die darauf hindeutet, dass auch dieses Plasmid nicht komplett geschnitten wurde. Hier wurde die Bande bei 938 bp für die weitere Klonierung ausgeschnitten.

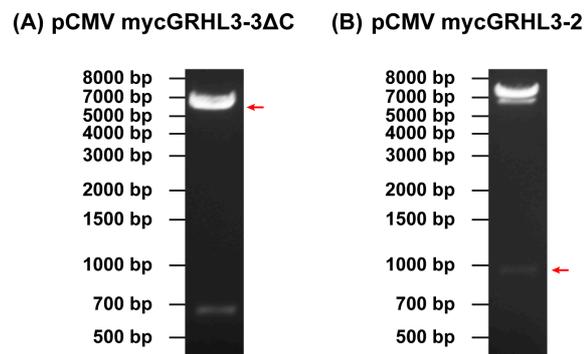


Abbildung 3.11: Gelelektrophoretische Analyse des *Nde*I/*Sbf*I Restriktionsverdaus. Die Gelbilder zeigen den *Nde*I/*Sbf*I Restriktionsverdau der Ausgangsplasmide pCMV mycGRHL3-3 Δ C (A) und pCMV mycGRHL3-2 (B). Die isolierten Fragmente (GRHL3-3 Δ C 5936 bp, GRHL3-2 938 bp) sind mit einem roten Pfeil gekennzeichnet.

Nach Aufreinigung der DNA-Fragmente wurden diese zur Kontrolle der sauberen Isolierung und zur Abschätzung der DNA-Konzentration erneut gelelektrophoretisch aufgetrennt. In Abbildung 3.12 ist zu erkennen, dass nur die gewünschten DNA-Fragmente aus GRHL3-3 Δ C und GRHL3-2 isoliert wurden.

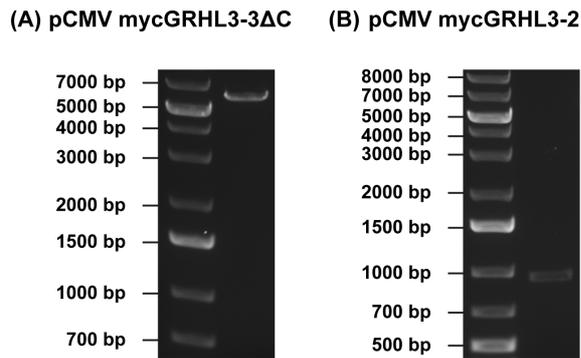


Abbildung 3.12: Gelelektrophoretische Analyse der aufgereinigten DNA-Fragmente. Die Gelbilder zeigen die aufgereinigten Fragmente von pCMV mycGRHL3-2ΔC mit einer Größe von 5936 bp (A) und pCMV mycGRHL3-2 mit 938 bp (B).

Nach Abschätzung der Konzentrationen, anhand der DNA-Fragmente des Größenmarkers, wurden die isolierten und aufgereinigten DNA-Fragmente für die Ligation eingesetzt. Nach Transformation in den *E. coli* Stamm TG1 wurden die Plasmide aus 6 Einzelkolonien im kleinen Maßstab (Minipräparation) isoliert und mit dem Restriktionsenzym *HincII* geschnitten (Abbildung 3.13).

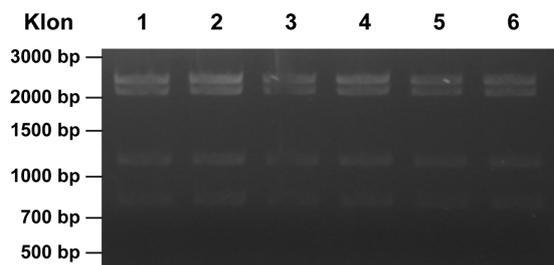


Abbildung 3.13: Gelelektrophoretische Analyse der mit *HincII* verdauten Plasmid DNAs aus 6 Einzelkolonien. Das Gelbild zeigt den *HincII* Restriktionsverdau der Plasmide, die aus 6 Einzelkolonien isoliert wurden (erwartete Fragmentgrößen: 2534 bp, 2188 bp, 1156 bp, 796 bp, 234 bp, 65 bp).

Alle präparierten Plasmide zeigen die erwarteten DNA-Fragmente für pcDNA mycGRHL3-2ΔC bei 2534 bp, 2188 bp, 1156 bp und 796 bp. Die beiden zusätzlich erwarteten Fragmente bei 234 bp und 65 bp konnten aufgrund ihrer geringen Größe und damit verbundenen schwachen Anfärbung mit Ethidiumbromid nicht detektiert werden. Für die Verifizierung der korrekten DNA-Sequenzen wurden 3 der 6 Plasmide sequenziert.

Abbildung 3.14 zeigt die Plasmidkarte des Expressionsplasmids für den GRHL3-2 Wildtyp (pCMV mycGRHL3-2). Die hergestellten Expressionsplasmide für die großflächigen Deletionsmutanten sind identisch aufgebaut, mit dem einzigen Unterschied, dass die codierende Sequenz von GRHL3-2 je nach Plasmid verschiedene Deletionen enthält (Abbildung 3.8 und Tabelle 3.1).

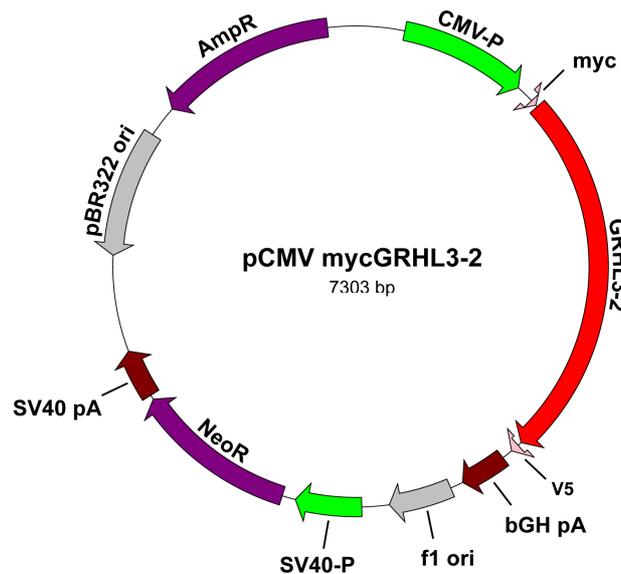


Abbildung 3.14: Vektorkarte des Expressionsvektors pCMV mycGRHL3-2. Der Vektor besitzt einen CMV Promotor (CMV-P) gefolgt von der für GRHL3-2 codierenden Sequenz (GRHL3-2), die durch ein myc-Epitop (myc) am 5'-Ende und ein V5-Epitop (V5) am 3'-Ende flankiert ist. Daran schließt sich ein RNA-Prozessierungssignal aus dem Rinder-Wachstumshormongen (bGH pA) an. Als Selektionsmarker für *E. coli* enthält der Vektor ein Ampicillin-Resistenzgen (AmpR). Zur Selektion in Säugerzellen kann das Neomycin-Resistenzgen (NeoR), das unter Kontrolle des *early* Promotors aus dem Affenvirus SV40 (SV40-P) steht, genutzt werden. 3' zu NeoR schließt sich ein Polyadenylierungssignal aus SV40 (SV40 pA) an. Für die Replikation in Bakterien sind zwei Replikationsursprünge (pBR322 ori und f1 ori) enthalten.

Tabelle 3.1: Übersicht über die deletierten Aminosäuren der verschiedenen GRHL3-2 Proteinvarianten

Proteinvariante	Deletierte Aminosäuren
GRHL3ΔA	1 – 230
GRHL3-2ΔB	231 – 348
GRHL3-2ΔC	350 – 492
GRHL3-2ΔCT	514 – 602
GRHL3-2ΔbiNLS	485 – 515

3.5 Analyse der transkriptionellen Aktivierung durch GRHL3-2 Varianten mit großflächigen Deletionen

Um zu analysieren, ob die hergestellten GRHL3-2 Deletionsvarianten noch in der Lage sind Transkription zu aktivieren, wurde ein GRHL3-spezifischer Luziferase-Assay durchgeführt. Hierzu wurde ein GRHL3-spezifisches Luziferase-

Reporter-genplasmid mit den Expressionsvektoren für die verschiedenen GRHL3-2 Deletionsmutanten in HEK293T Zellen kotransfiziert und die Luziferase-Aktivität in Lysaten dieser Zellen gemessen. Das hierfür eingesetzte Reporter-genkonstrukt besitzt zwei Konsensus-Bindestellen für GRHL3 mit einem Abstand von 32 bp direkt 5' zu einem Minimalpromotor, der oberhalb des Transkriptionsstart nur noch eine TATA-Box aus dem *thymidin-kinase*-Gen des Herpes simplex Virus enthält. Darauf folgt als Reporter-gen die für Luziferase codierende Sequenz aus dem Leuchtkäfer *Photinus pyralis* (Lukosz *et al.*, 2011) (Abbildung 3.15).

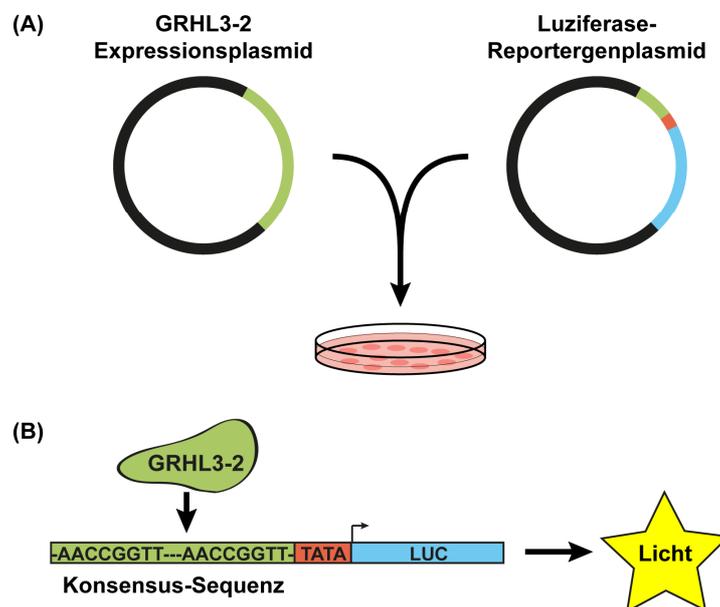


Abbildung 3.15: Prinzip des GRHL3-spezifischen Luziferase-Assays zur Analyse der Transkriptionsfaktoraktivität. (A) HEK293T Zellen werden mit einem Expressionsplasmid für GRHL3-2 und dem Luziferase-Reporter-genplasmid kotransfiziert. (B) Das überexprimierte GRHL3-2 kann dann an die Konsensus-Sequenz auf dem Reporter-genplasmid binden und die Transkription des Luziferase Gens (LUC) aktivieren. Das Reporter-genkonstrukt enthält zwei Konsensus-Bindestellen für GRHL3 (grün). Diese Bindestellen haben 32 bp Abstand zueinander. 3' dazu schließt sich die Sequenz für den Minimalpromotor (TATA) (rot) und die codierende Sequenz für das Luziferasegen (LUC) (blau) an. Die Aktivität der Luziferase wird anhand des Lichts, das bei der Nachweisreaktion für Luziferase entsteht, in *relative light units* (RLU) gemessen.

Nach seiner Expression bindet der Transkriptionsfaktor GRHL3-2 an die Konsensus-Bindestellen auf dem Reporterplasmid und ist in der Lage die Transkription des Luziferasegens zu aktivieren. Bei diesem Assay werden immer die gleiche Luziferase-mRNA und das gleiche Luziferaseprotein gebildet, so dass weder die

Stabilität der mRNA, noch die des Enzyms Luziferase eine Rolle spielen. Damit können Unterschiede in der Luziferaseaktivität ausschließlich in der unterschiedlichen Transkriptionsrate des Reportergens begründet sein. Eine verringerte Transkription der Luziferase nach Expression einer GRHL3-2 Mutante im Vergleich mit dem Wildtyp Protein kann somit entweder durch eine geringere Stabilität des jeweiligen GRHL3-2 Proteins oder durch Defizienzen bei der Kerntranslokation, DNA-Bindung oder Transkriptionsaktivierung hervorgerufen werden.

Um eine geringere Stabilität der GRHL3-Varianten auszuschließen, wurde zunächst die Expression der unterschiedlichen Proteine mittels Western Blot untersucht (Abbildung 3.16(A)). Für die Detektion der Proteinvarianten wurde ein gegen das V5-tag gerichteter Antikörper und für die Gleichladungskontrolle ein gegen β -Catenin gerichteter Antikörper verwendet. Sowohl der GRHL3-2 Wildtyp, als auch die verschiedenen Deletionsmutanten konnten nach Überexpression in HEK293T Zellen nachgewiesen werden, wobei keine der Deletionsmutanten geringer exprimiert wird als der Wildtyp. Der Vergleich zeigt, dass vor allem die Proteinvariante GRHL3 Δ A eine wesentlich höhere Expression aufweist als die anderen Mutanten und das komplette GRHL3-2 Protein.

Die Auswertung der Luziferasedaten ist in Abbildung 3.16 (B) dargestellt, hierbei wurde die Luziferaseaktivität nach Kotransfektion von GRHL3-2 mit dem Reportergenplasmid zu 100% gesetzt. Mit Ausnahme von GRHL3-2 Δ CT ist die Luziferaseaktivität nach der Überexpression bei allen Deletionsmutanten extrem vermindert. Da die Expression aller Proteinvarianten im Western Blot nachgewiesen wurde, muss die Ursache der verringerten Luziferaseaktivitäten entweder in einer gestörten Kerntranslokation, DNA-Bindung oder Transkriptionsfaktoraktivität liegen. Bei GRHL3 Δ A ist die Aktivierungsdomäne und bei GRHL3-2 Δ B die DNA-Bindedomäne deletiert, daher wurde hier mit einer verminderten Transaktivierung gerechnet. Interessanterweise ist die Mutante GRHL3-2 Δ CT, bei der die Dimerisierungsdomäne deletiert ist, als einzige so aktiv wie der Wildtyp. Obwohl beschrieben ist, dass GRHL3 Homodimere ausbildet und die Homodimerisierung zumindest bei dem GRH-Protein aus *Drosophila* die DNA-Bindung stabilisiert (Uv *et al.*, 1994), scheint die Dimerisierungsdomäne von GRHL3-2 in dem verwendeten Kotransfektionsansatz keinen Einfluss auf die Transkriptionsaktivierung zu haben.

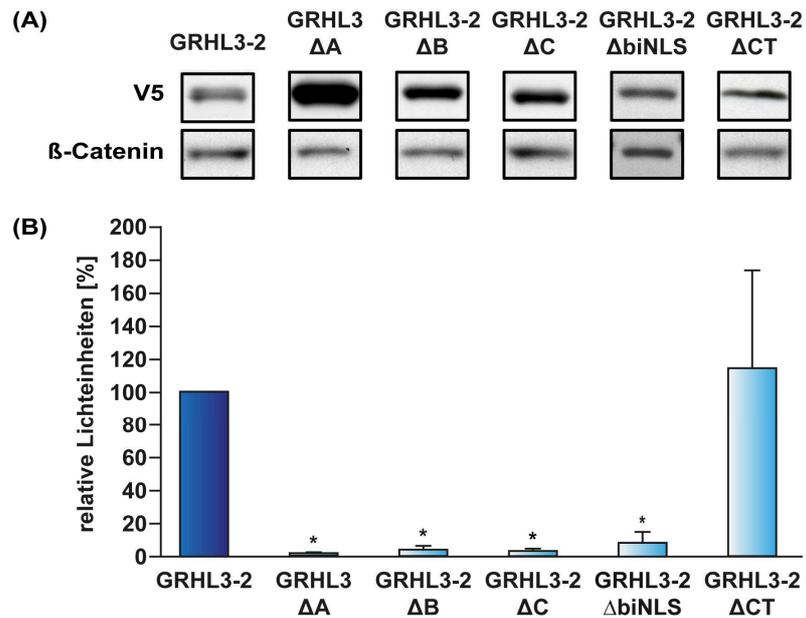


Abbildung 3.16: Transkriptionelle Aktivierung durch großflächige GRHL3-2 Deletionsmutanten. HEK293T Zellen wurden mit Expressionsplasmiden für GRHL3-2, GRHL3ΔA, GRHL3-2ΔB, GRHL3-2ΔC, GRHL3-2ΔbiNLS oder GRHL3-2ΔCT und einem GRHL3-spezifischen Luziferase Reporterplasmid kotransfiziert. (A) Repräsentativer Immunoblot der Zelllysate, die für die Luziferasemessung eingesetzt wurden. Die GRHL3 Proteine wurden mit einem Antikörper gegen das V5-tag nachgewiesen, als Gleichladungskontrolle wurde β-Catenin detektiert (B) Relative Luziferaseaktivität als Maß für die transkriptionelle Aktivität der GRHL3-2 Deletionsmutanten. Die für GRHL3-2 gemessene Luziferaseaktivität wurde zu 100% gesetzt. (n=3-4; * $P < 0,05$ vs GRHL3-2)

Die Proteinvarianten GRHL3-2ΔC und GRHL3-2ΔbiNLS sind die einzigen Mutanten mit Deletionen außerhalb der zuvor beschriebenen funktionellen Domänen. Um herauszufinden, ob die reduzierte Transkriptionsaktivierung auf einer gestörten Translokation in den Kern beruht, wurde im nächsten Schritt die zelluläre Lokalisation der Deletionsmutanten untersucht.

3.6 Zelluläre Lokalisation der GRHL3-2 Mutanten mit großflächigen Deletionen

Zur Identifizierung des Sequenzbereiches, der bei GRHL3-2 für die Translokation in den Zellkern verantwortlich ist, wurden zunächst Immunfluoreszenzmikroskopische Analysen durchgeführt. Dazu wurden Endothelzellen auf einem Deckglaschen mit den Expressionsplasmiden für GRHL3-2 oder einer mutierten Proteinvariante

transfiziert. Nach Fixierung der Zellen wurden die Proteine über einen gegen den myc-Epitop-tag gerichteten Antikörper markiert. Dann erfolgte die Inkubation mit einem gegen den Erstantikörper gerichteten Zweitantikörper (Alexa Fluor® 488 Anti-Maus, grün). Der Zellkern wurde mit DAPI in blau angefärbt und das Zytoskelett der Zelle mit Phalloidin Alexa Fluor® 568 in rot. In Abbildung 3.17 sind die Immunfluoreszenzmikroskopischen Aufnahmen dargestellt.

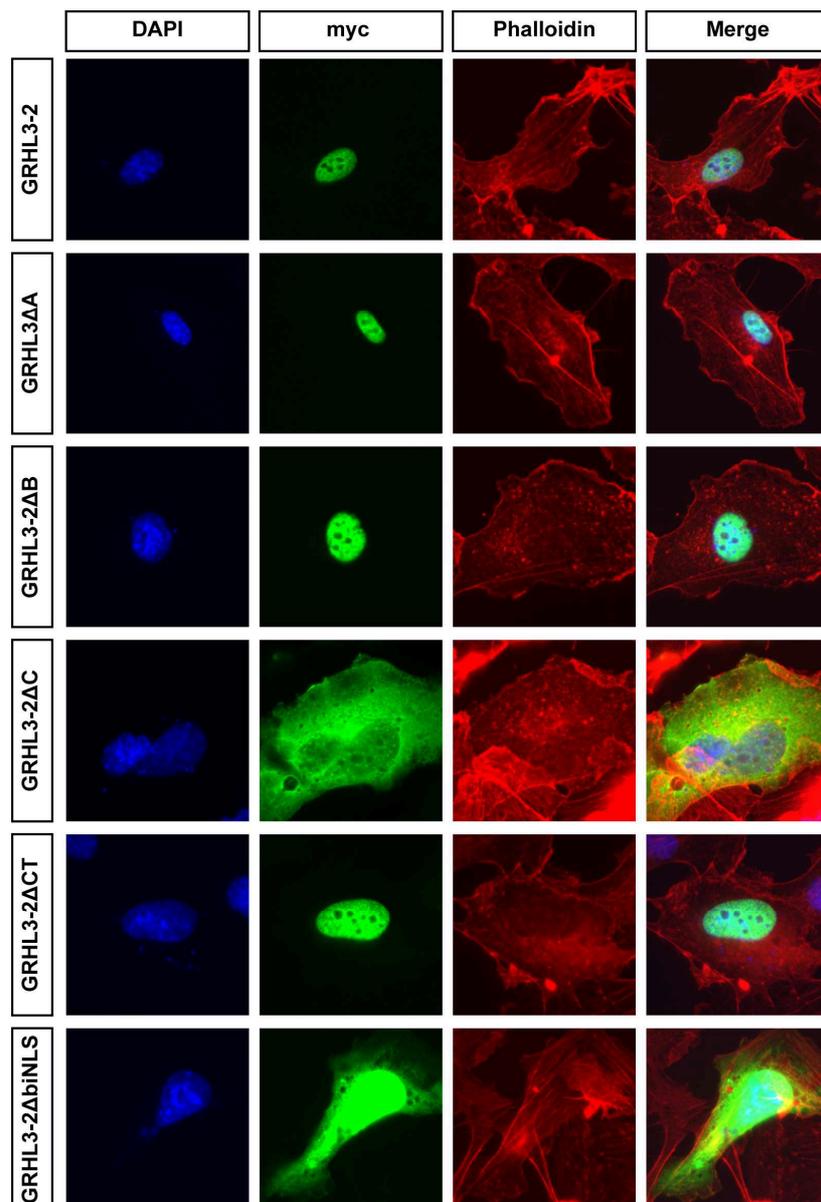


Abbildung 3.17: Immunfluoreszenzmikroskopische Aufnahmen der verschiedenen GRHL3-2 Proteinvarianten. Endothelzellen wurden mit Expressionsplasmiden für GRHL3-2 oder einer der Deletionsvarianten GRHL3ΔA, GRHL3-2ΔB, GRHL3-2ΔC, GRHL3-2ΔbiNLS oder GRHL3-2ΔCT transfiziert. Die Zellkerne sind in blau (DAPI), die GRHL3-2 Proteine in grün (myc) und das Zytoskelett in rot (Phalloidin) dargestellt.

Der Wildtyp GRHL3-2 zeigte eine nahezu vollständige Lokalisation im Zellkern. Für die Proteinvarianten GRHL3 Δ A, GRHL3-2 Δ B und GRHL3-2 Δ CT wurde ebenfalls eine Kernlokalisierung beobachtet. Im Gegensatz dazu zeigen die transfizierten Zellen bei den Mutanten GRHL3-2 Δ C und GRHL3-2 Δ biNLS eine deutliche grüne Fluoreszenz außerhalb des Zellkerns, was auf eine gestörte Translokation in den Nukleus hindeutet. Da eine Immunfärbung alleine keine eindeutige Aussage über die zelluläre Lokalisation geben kann, wurde zusätzlich eine biochemische Fraktionierung von Kern und Zytoplasma durchgeführt.

Dazu wurden Endothelzellen mit Expressionsplasmiden für den Wildtyp GRHL3-2 oder einer der entsprechenden extranukleären Varianten des Proteins (GRHL3-2 Δ C oder GRHL3-2 Δ biNLS) transfiziert. Als nukleär lokalisierte Deletionsmutante wurde zusätzlich GRHL3-2 Δ B mitgeführt. Nach der Zellernte erfolgte wie im Methodenteil (Kap. 2.2.3.3) beschrieben die Fraktionierung von Kern und Zytoplasma. Abbildung 3.18 zeigt die Immunoblots der Fraktionierung. Die Expression von GRHL3-2 und seinen Mutanten wurde über einen gegen den V5-tag gerichteten Antikörper detektiert. Zur Kontrolle der einzelnen Fraktionen wurden die Proteine Topoisomerase I (TOPOI) für die nukleäre Fraktion und Glycerinaldehyd-3-Phosphate-Dehydrogenase (GAPDH) für die zytosolische Fraktion über entsprechende Antikörper detektiert. Für den Wildtyp GRHL3-2 und für GRHL3-2 Δ B wurde sowohl in der nukleären, als auch in der zytosolischen Fraktion eine Bande detektiert. Im Gegensatz dazu war GRHL3-2 Δ C nur im Zytosol nachweisbar und für GRHL3-2 Δ biNLS war noch ein schwaches Signal in der Kernfraktion detektierbar.

Die Immunfluoreszenzmikroskopischen Aufnahmen und biochemischen Fraktionierungen zeigen, dass die Proteinvarianten GRHL3-2 Δ C und Δ biNLS hauptsächlich eine Lokalisation im Zytoplasma haben und lässt vermuten, dass in dem Deletionsbereich dieser beiden Mutanten das NLS lokalisiert ist. Da die beiden Deletionen eine Überlappung von 8 Aminosäuren haben und vor allem die Mutante GRHL3-2 Δ C keine Kernlokalisierung bei der Fraktionierung aufweist, wurde dieser Bereich näher untersucht. Dazu wurden im Folgenden für die weitere Einengung der NLS Sequenz Deletionsmutanten kloniert, bei denen der Bereich zwischen DNA-Bindedomäne und Dimerisierungsdomäne in kleinere Deletionsbereiche unterteilt ist.

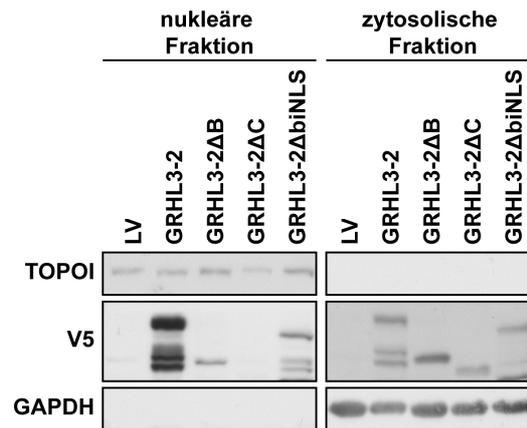


Abbildung 3.18: Lokalisation von GRHL3-2, GRHL3-2 Δ B und den extranukleären Deletionsmutanten nach biochemischer Fraktionierung. Endothelzellen wurden mit Expressionsplasmiden für GRHL3-2, GRHL3-2 Δ B, GRHL3-2 Δ C oder GRHL3-2 Δ biNLS transfiziert. Die Lyse erfolgte mittels biochemischer Fraktionierung von Zellkern und Zytoplasma. Der obere Blot zeigt die Reinheitskontrolle mit dem nukleären Protein Topoisomerase I (TOPO I), der untere die Reinheitskontrolle mit dem zytosolischen Protein Glycerinaldehyd-3-Phosphate-Dehydrogenase (GAPDH). Jeweils die erste Bande in jeder Spur entspricht den V5-getaggten GRHL3-2 Proteinen.

3.7 Herstellung von GRHL3-2 Mutanten mit kleinen Deletionen zwischen DNA-Bindedomäne und Dimerisierungsdomäne

Aufgrund von Nachweisproblemen bei der Detektion des N-terminalen *myc-tags* wurden für die weiteren Versuche zuerst Expressionsplasmide für die verschiedenen GRHL3-2 Varianten kloniert, die ein *myc-tag* am C-terminalen Ende tragen. Dazu wurden die codierenden Regionen für die verschiedenen GRHL3-2 Varianten mittels Gibson assembly in das Plasmid pcDNA3.1/*myc-His(-)A* (Abbildung 3.19), im Folgenden als Leervektor bezeichnet, inseriert. In diesem Leervektor befindet sich 3' zu der *Hind*III Schnittstelle in einem Abstand von 6 Basenpaaren die codierende Sequenz für ein *myc-Epitop*.

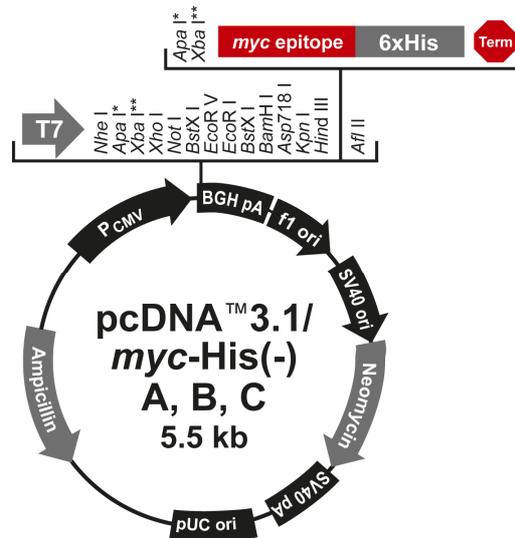


Abbildung 3.19: Vektorkarte von pcDNA 3.1/ myc-His(-)A. Der Vektor besitzt einen CMV Promotor (P_{CMV}) gefolgt von einer multiplen Klonierungsstelle, die die Zielsequenzen von verschiedenen Restriktionsenzymen enthält. Am 3'-Ende der multiplen Klonierungsstelle befindet sich ein myc-Epitop, gefolgt von einem Hexa-Histidin-tag (6xHis). Daran schließt sich ein RNA-Prozessierungssignal aus dem Rinder-Wachstumshormongen (BGH pA) an. Als Selektionsmarker für *E. coli* enthält der Vektor ein Ampicillin-Resistenzgen (AmpR). Zur Selektion in Säugerzellen kann das Neomycin-Resistenzgen (NeoR), das unter Kontrolle des *early* Promotors aus dem Affenvirus SV40 (SV40-P) steht, genutzt werden. 3' zu NeoR schließt sich ein Polyadenylierungssignal aus SV40 (SV40 pA) an. Für die Replikation in Bakterien sind drei Replikationsursprünge (f1 ori, SV40 ori und pUC ori) enthalten. (Invitrogen, https://tools.lifetechnologies.com/content/sfs/manuals/pcdna3_1mychisminus_man.pdf)

Das Plasmid wurde mit den Restriktionsenzymen *XhoI* und *HindIII* geschnitten und die codierenden Sequenzen für die verschiedenen GRHL3-2 Proteinvarianten mittels PCR amplifiziert. Die dafür genutzten Primer wurden so konstruiert, dass die 5'-Enden der Primer komplementär zu dem Leervektor und die 3'-Enden komplementär zu der codierenden Sequenz von GRHL3-2 sind. Die zu dem Plasmid bzw. GRHL3-2 komplementären Bereiche hatten eine Länge von 20-30 Nukleotiden. In den *Forward* Primern enthielt der Bereich dazwischen zusätzlich eine Kozak-Sequenz (Kozak, 1987) direkt 5' zum Startcodon, um eine optimale Translationsinitiation zu gewährleisten. Bei dem *Reverse* Primer folgt auf der zum Leervektor komplementären Sequenz direkt das 3'-Ende der codierenden GRHL3-2 Sequenz ohne Stopcodon, um ein durchgehendes Leseraster in das myc-tag zu erzeugen. Der Aufbau der Primersequenzen ist am Beispiel von GRHL3-2 in Abbildung 3.20 dargestellt. Für die Deletionsmutante GRHL3 Δ A (Deletion des 5'-Endes) wurde ein anderer *Forward* Primer und für GRHL3-2 Δ CT (Deletion des 3'-Endes) ein anderer

Abbildung 3.22 zeigt die Plasmidkarte des Expressionsplasmids für den GRHL3-2 Wildtyp (pcDNA GRHL3-2myc). Die Expressionsplasmide für die verschiedenen Deletionsmutanten sind identisch aufgebaut. Die Plasmide codieren für dieselben Proteinvarianten wie zuvor (Tabelle 3.1), mit dem Unterschied, dass das myc-tag am C-terminalen Ende lokalisiert ist.

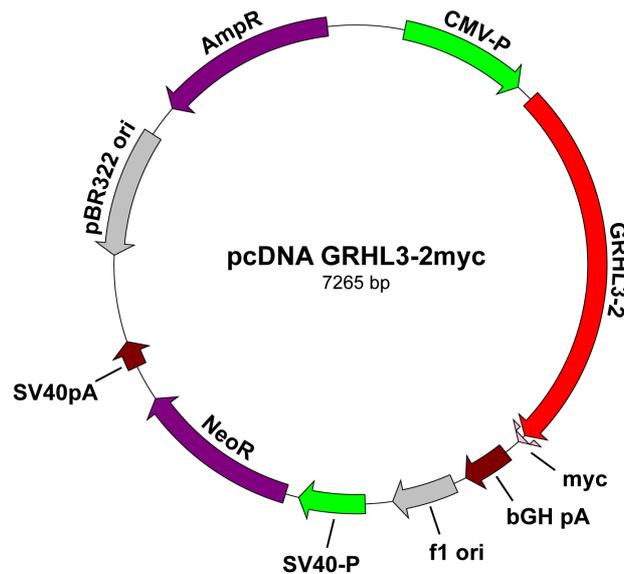


Abbildung 3.22: Vektorkarte des Expressionsvektors pcDNA GRHL3-2myc. Der Vektor besitzt einen CMV Promotor (CMV-P) gefolgt von der für GRHL3-2 codierenden Sequenz (GRHL3-2), auf die am 5'-Ende ein myc-Epitop (myc) folgt. Daran schließt sich ein RNA-Prozessierungssignal aus dem Rinder-Wachstumshormogen (bGH pA) an. Als Selektionsmarker für *E. coli* enthält der Vektor ein Ampicillin-Resistenzgen (AmpR). Zur Selektion in Säugerzellen kann das Neomycin-Resistenzgen (NeoR), das unter Kontrolle des *early* Promotors aus dem Affenvirus SV40 (SV40-P) steht, genutzt werden. 3' zu NeoR schließt sich ein Polyadenylierungssignal aus SV40 (SV40 pA) an. Für die Replikation in Bakterien sind zwei Replikationsursprünge (pBR322 ori und f1 ori) enthalten.

Bei den Immunfärbungen und der biochemischen Fraktionierung hatte sich herausgestellt, dass die Deletionsmutante GRHL3-2 Δ C im Zytoplasma lokalisiert ist. Daher wurden zur weiteren Einengung des NLS innerhalb des in dieser Mutante deletierten Bereichs, der sich zwischen der DNA-Bindedomäne und der Dimerisierungsdomäne befindet, kleinere Deletionen erzeugt und wie vorher beschrieben analysiert.

Für die Herstellung dieser Deletionsmutanten wurde ebenfalls das Gibson assembly genutzt, diesmal erfolgten die assembly-Reaktionen aus jeweils drei DNA-Fragmenten. Der in GRHL3-2 Δ C deletierte Abschnitt umfasst die Nukleotidpositionen 1979 bis 2407 auf dem Expressionsplasmid für intaktes GRHL3-2. Dieser Teil des Plasmids wurde in vier kleine Deletionsbereiche mit einer Überlappung von je 15 bp, entsprechend 5 Aminosäuren, aufgeteilt. Abbildung 3.23 zeigt schematisch die Lage der verschiedenen Deletionen, von denen drei jeweils 120 bp umfassen (GRHL3-2 Δ C1 bis Δ C3); die Deletion in GRHL3-2 Δ C4 umfasst 114 bp.

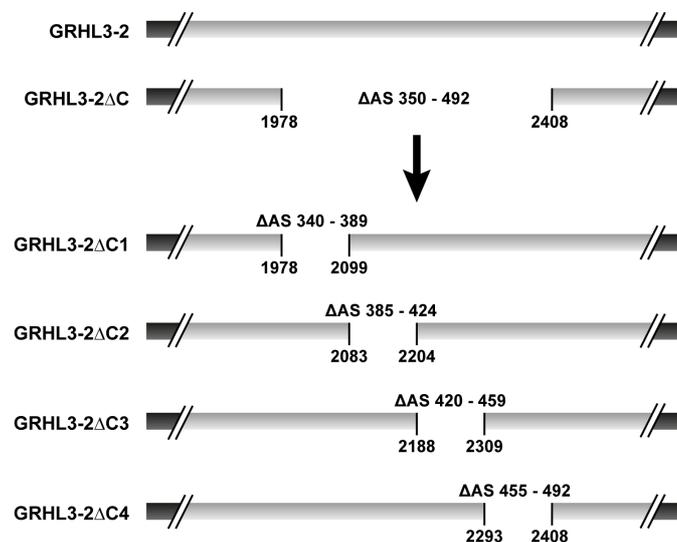


Abbildung 3.23: Aufteilung des Deletionsbereiches von GRHL3-2 Δ C in vier kleine Deletionen zwischen DNA-Bindedomäne und Dimerisierungsdomäne. Der von diesen Deletionen betroffene Ausschnitt der codierenden Sequenz von GRHL3-2 ist schematisch in grau und das restliche Plasmid in schwarz dargestellt. Die Zahlen unterhalb der codierenden Sequenzen geben jeweils die letzte bzw. erste Nukleotidposition vor bzw. hinter der Deletion im Vergleich zum Wildtyp (GRHL3-2) an, Δ AS bezeichnet die deletierten Aminosäuren.

Im Folgenden wird exemplarisch die Klonierung am Beispiel von GRHL3-2 Δ C1 erklärt (Abbildung 3.24). Da die codierende Sequenz wegen der einzuführenden internen Deletion nicht in einer PCR amplifiziert werden kann, wurden zwei separate PCRs durchgeführt: eine für den Bereich 5' zu der Deletion (Teilfragment Δ C1.1) und eine für den Bereich 3' zu der Deletion (Teilfragment Δ C1.2). Diese beiden PCR-Fragmente wurden genutzt, um den analogen Abschnitt in dem GRHL3-2 Expressionsplasmid zu ersetzen. Die Primer für die Amplifikation des vorderen Teilfragments wurden so gewählt, dass der *Forward* Primer im Bereich der *EcoRV*

Schnittstelle bindet und der *Reverse* Primer die gewünschte Deletion überspannt. Umgekehrt bindet der *Forward* Primer für die Amplifikation des zweiten Teilfragments über dem Deletionsbereich und der *Reverse* Primer im Bereich der *HindIII* Schnittstelle. Abbildung 3.24 (A) zeigt schematische die Bindungspositionen der Primer.

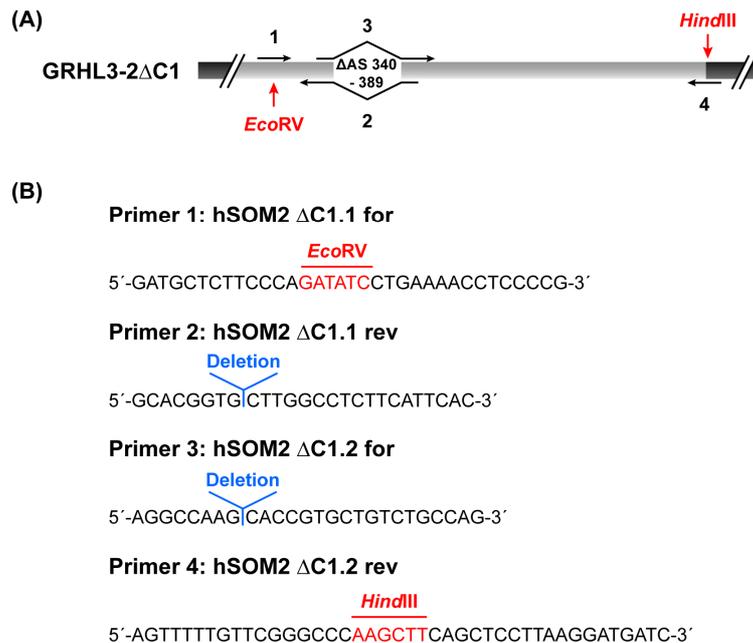
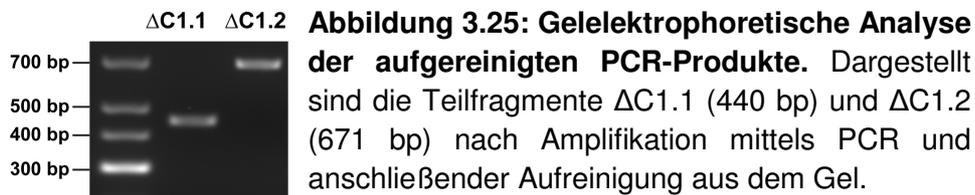


Abbildung 3.24: Primer zur Amplifikation der Teilfragmente ΔC1.1 und ΔC1.2. (A) Der relevante Ausschnitt aus der codierenden Sequenz von GRHL3-2ΔC1 ist in grau dargestellt. Die Schnittstellen von *EcoRV* und *HindIII* sind rot markiert. Die schwarzen Pfeile zeigen die Position und Orientierung der Primer (1: hSOM2ΔC1.1 for; 2: hSOM2ΔC1.1 rev; 3: hSOMΔC1.2 for; 4: hSOM2ΔC1.2 rev). (B) Sequenzen der Primer 1 – 4. Die Restriktionsschnittstellen von *EcoRV* (GAT/ATC) und *HindIII* (A/AGCTT) sind rot markiert. „Deletion“ (in blau) gibt die Position der Deletion im Vergleich zum Wildtyp an.

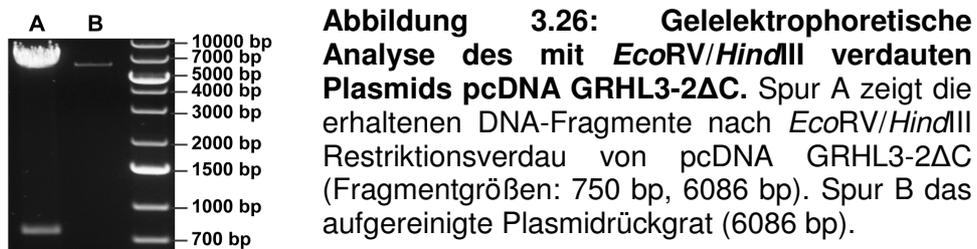
Durch die Wahl der Primer überlappen die beiden PCR-Fragmente um 16 bp; die Überlappung mit dem mit *EcoRV* und *HindIII* geschnittenen GRHL3-2 Expressionsvektor beträgt 19 bp bzw. 23 bp. Für die Amplifikation des Teilfragments ΔC1.1 wurde die Primerkombination hSOM2ΔC1.1 for/hSOM2ΔC1.1 rev eingesetzt und für das Teilfragment ΔC1.2 die Primer hSOM2ΔC1.2 for/hSOM2ΔC1.2 rev, die Sequenzen sind in Abbildung 3.24 (B) aufgeführt.

Der Erfolg der einzelnen Amplifikationen wurde zunächst gelelektrophoretisch überprüft und die benötigten Amplifikationsprodukte von 440 bp (Teilfragment ΔC1.1)

bzw. 671 bp (Teilfragment $\Delta C1.2$) nach Auftrennung in einem präparativen Agarosegel ausgeschnitten und für die Gibson assembly Reaktion aufgereinigt (Abbildung 3.25).



Für die Gewinnung des Plasmidrückgrats wurde das Plasmid pcDNA GRHL3-2 Δ Cmyc mit den Restriktionsenzymen *EcoRV* und *HindIII* geschnitten. Die Schnittstellen für *EcoRV* und *HindIII* liegen 5' bzw. 3' zu der gewünschten Deletion. Der Verdau mit diesen Restriktionsenzymen ergibt zwei Fragmente von 6086 bp und 750 bp. Nach gelelektrophoretischer Überprüfung des Restriktionsverbaus wurde das 6086 bp Fragment nach Auftrennung in einem präparativen Agarosegel ausgeschnitten und aufgereinigt (Abbildung 3.26).



Die zwei Teilfragmente wurden mit dem Plasmidrückgrat in einer Gibson assembly Reaktion inkubiert. Abbildung 3.27 zeigt schematisch, wie die einzelnen Fragmente in der Gibson Reaktion zusammengefügt werden.

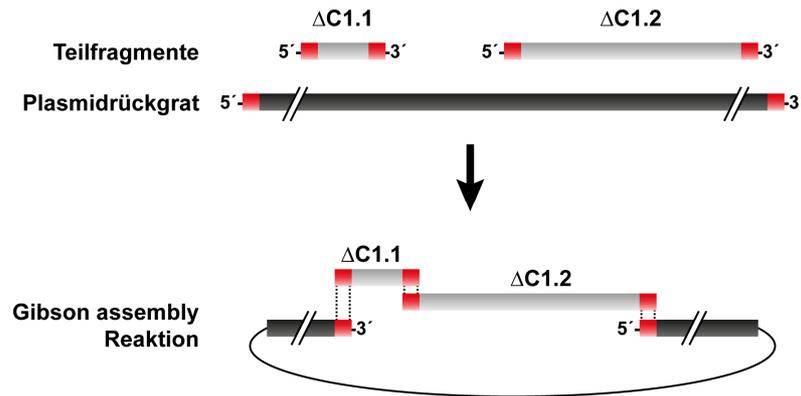


Abbildung 3.27: Gibson assembly Reaktion zur Herstellung der Deletionsmutante GRHL3-2 Δ C1myc. Die Teilfragmente Δ C1.1 und Δ C1.2 und das Plasmidrückgrat werden in der Gibson assembly Reaktion zu dem Plasmid pcDNA GRHL3-2 Δ C1 zusammengefügt. Die codierende Sequenz ist in grau und der Rest des Plasmides in schwarz dargestellt. Die überlappenden DNA-Abschnitte der einzelnen DNA-Fragmente sind rot gekennzeichnet.

Die Reaktionsansätze wurden direkt für die Transformation in den *E. coli* Stamm XL1-Blue eingesetzt. Aus 6 der gewachsenen Einzelkolonien wurden die Plasmide im kleinen Maßstab (Minipräparation) isoliert und zur Kontrolle mit dem Restriktionsenzym *Nco*I geschnitten. Die erwarteten Banden besitzen eine Größe von 3345 bp, 1998 bp, 735 bp, 594 bp und 437 bp (Abbildung 3.28). Zur Verifizierung wurden 3 der anhand der Restriktionsanalyse als korrekt identifizierte Plasmide sequenziert.

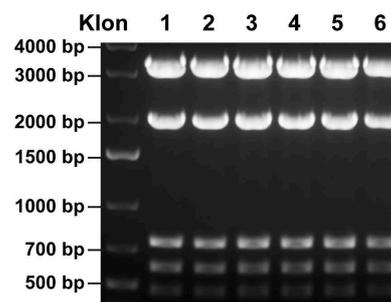


Abbildung 3.28: Gelelektrophoretische Analyse der mit *Nco*I verdauten Plasmid DNAs aus 6 Einzelkolonien. Die erwarteten Fragmentgrößen betragen 3345 bp, 1998 bp, 735 bp, 594 bp und 437 bp.

Die hergestellten Expressionsplasmide für die kleinen Deletionsmutanten sind analog zu dem Vektor pcDNA GRHL3-2myc in Abbildung 3.22 aufgebaut. Die deletierten

Aminosäurepositionen im Vergleich zum Wildtyp sind in Tabelle 3.2 aufgelistet und in Abbildung 3.29 graphisch dargestellt.

Tabelle 3.2: Übersicht über die deletierten Aminosäuren der verschiedenen GRHL3-2 Proteinvarianten

Proteinvariante	Deletierte Aminosäuren
GRHL3-2ΔC1	350 – 389
GRHL3-2ΔC2	385 – 424
GRHL3-2ΔC3	420 – 459
GRHL3-2ΔC4	455 – 492

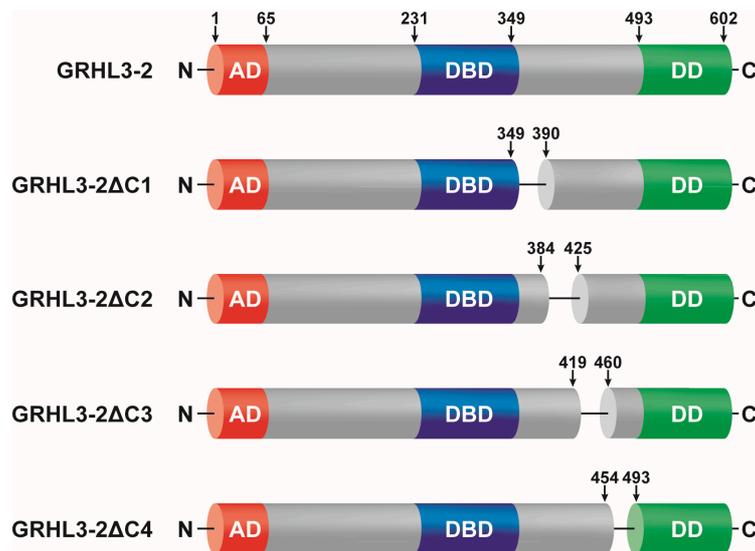


Abbildung 3.29: Schematische Darstellung der Primärstruktur der kleinen GRHL3-2 Deletionsmutanten im Vergleich zum Wildtyp. Die Abbildung zeigt die Deletionen in den verschiedenen GRHL3-2 Varianten im Vergleich zum Wildtyp. Die von Ting *et al.* (Ting *et al.*, 2003b) vorhergesagte Aktivierungsdomäne (AD, Aminosäure 1-65) ist in rot, die DNA-Bindedomäne (DBD, Aminosäure 231-349) in blau und die Dimerisierungsdomäne (DD, Aminosäure 493-602) in grün dargestellt. , die Zahlen bezeichnen Aminosäurepositionen. N markiert die N-terminalen und C die C-terminalen Enden der Proteinvarianten. In den einzelnen Proteinvarianten sind folgende Aminosäuren deletiert: GRHL3-2ΔC1 AS 350-389, GRHL3-2ΔC2 AS 385-424, GRHL3-2ΔC3 AS 420-459, GRHL3-2ΔC4 AS 455-492.

3.8 Analyse der transkriptionellen Aktivierung durch die Deletionsmutanten GRHL3-2 Δ C1 bis Δ C4

Um das Transaktivierungspotential der Deletionsmutanten GRHL3-2 Δ C1 bis Δ C4 zu analysieren, wurde analog zu Kapitel 3.5 vorgegangen. Dazu wurden HEK293T Zellen mit den Expressionsplasmiden für GRHL3-2 Δ C1, GRHL3-2 Δ C2, GRHL3-2 Δ C3 oder GRHL3-2 Δ C4 und dem zuvor beschriebenen Reportergenplasmid kotransfiziert (Abbildung 3.15). Die Expressionsanalyse mittels Western Blot (Abbildung 3.30 (A)) zeigt, dass alle vier GRHL3-2 Proteinvarianten ungefähr gleich stark exprimiert werden. Abbildung 3.30 (B) zeigt die relativen Luziferaseaktivitäten. Keine der vier GRHL3-2 Proteinvarianten ist in der Lage die Transkription der Luziferase zu aktivieren.

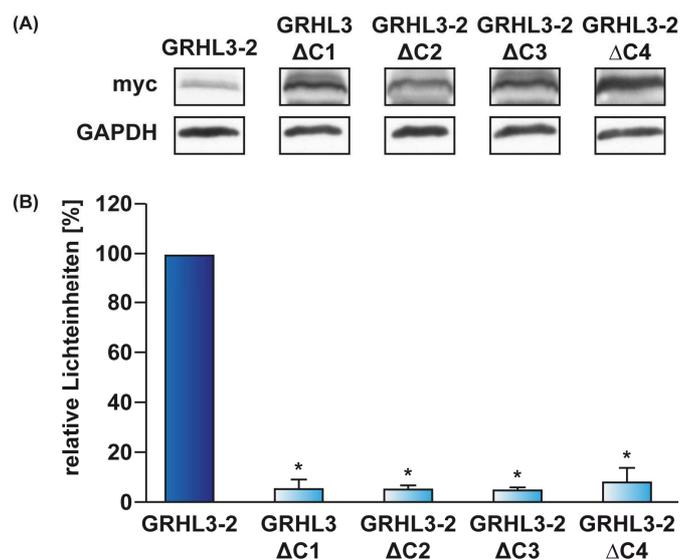


Abbildung 3.30: Transkriptionelle Aktivierung durch GRHL3-2 Varianten mit kleinen Deletionen zwischen DNA-Bindedomäne und Dimerisierungsdomäne. HEK293T Zellen wurden mit Expressionsplasmiden für GRHL3-2, GRHL3-2 Δ C1, GRHL3-2 Δ C2, GRHL3-2 Δ C3 oder GRHL3-2 Δ C4 und einem GRHL3-spezifischen Luziferase Reportergenplasmid kotransfiziert. (A) Repräsentativer Immunoblot der Zellysate, die für die Luziferasemessung eingesetzt wurden. Die GRHL3 Proteine wurden mit einem Antikörper gegen das myc-tag nachgewiesen, als Gleichladungskontrolle wurde GAPDH detektiert (B) Transkriptionelle Aktivität von GRHL3-2 und den Deletionsmutanten. Die für GRHL3-2 gemessene Luziferaseaktivität wurde zu 100% gesetzt. (n=3; * P <0,05 vs GRHL3-2)

Auch hier kann die reduzierte Transkriptionsfaktoraktivität der vier Deletionsmutanten entweder durch die Deletion einer weiteren funktionellen Domäne oder durch eine

gestörte Translokation in den Zellkern hervorgerufen werden. Daher wurde in einem nächsten Experiment die zelluläre Lokalisation der Mutanten untersucht.

3.9 Zelluläre Lokalisation der GRHL3-2 Deletionsmutanten $\Delta C1$ bis $\Delta C4$

Zur Untersuchung der zellulären Lokalisation wurde analog zu den großflächigen Deletionsmutanten (Kap. 3.6) zunächst eine Immunfärbung durchgeführt. Dazu wurden Endothelzellen auf ein Deckgläschen ausgebracht und mit Expressionsplasmiden für GRHL3-2 oder eine der Varianten $\Delta C1$, $\Delta C2$, $\Delta C3$ oder $\Delta C4$ transfiziert. Die Immunfluoreszenzmikroskopischen Aufnahmen sind in Abbildung 3.31 dargestellt. Die Detektion der GRHL3 Proteine erfolgte über einen gegen das myc-Epitop gerichteten Antikörper und der anschließenden Bindung eines gegen den Erstantikörper gerichteten Zweitantikörper (Alexa Fluor[®] 488 Anti-Maus, grün). Die Darstellung des Zellkerns erfolgte durch Färbung mit DAPI (blau) und die des Zytoskellets mit Phalloidin Alexa Fluor[®] 568 (rot).

Die Deletionsvarianten GRHL3-2 $\Delta C1$ bis $\Delta C3$ sind, wie der Wildtyp vorwiegend im Kern lokalisiert. Im Gegensatz dazu ist bei den mit dem Expressionsplasmid für GRHL3-2 $\Delta C4$ transfizierten Zellen eine deutliche grüne Fluoreszenz im Zytosol zu erkennen.

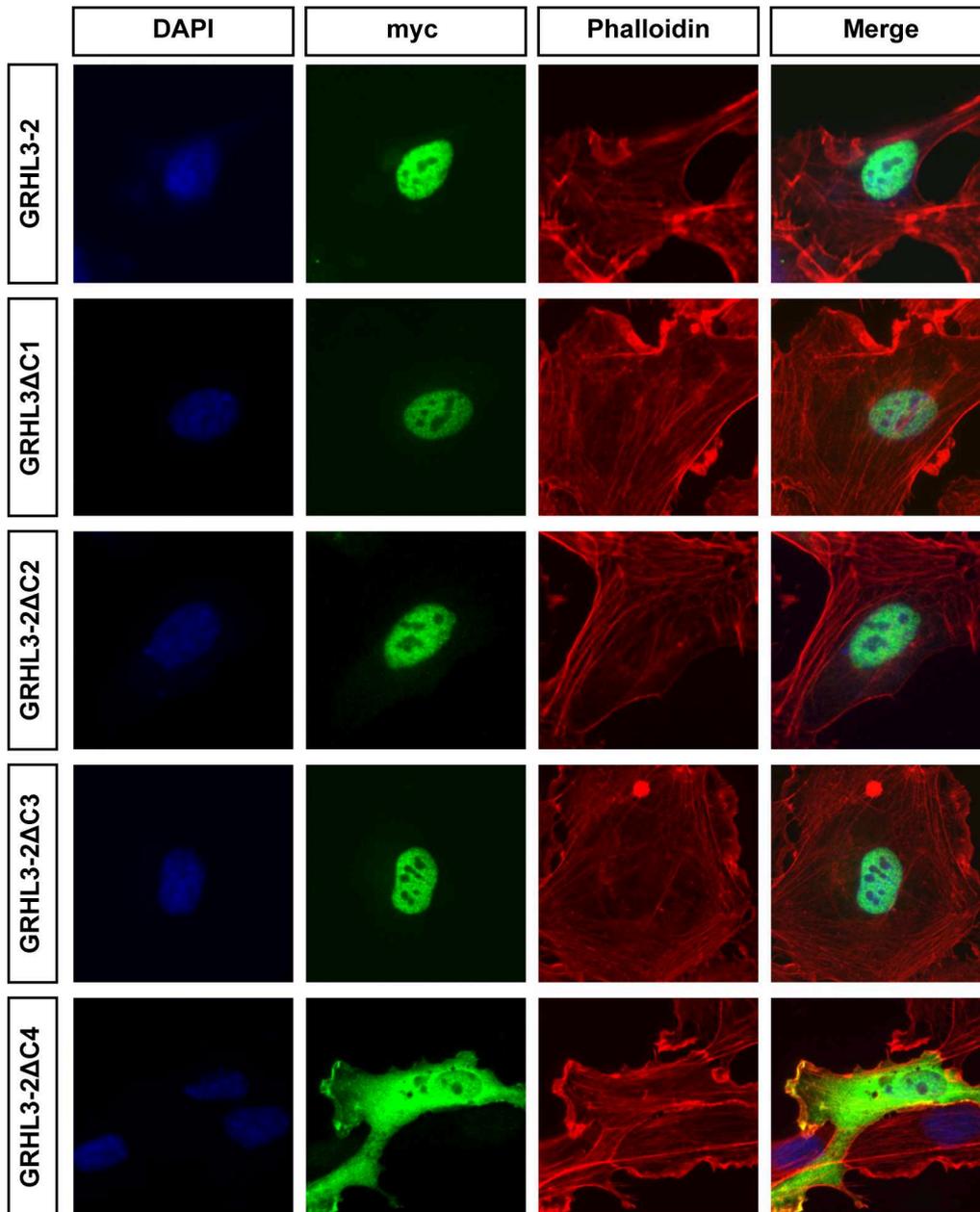


Abbildung 3.31: Immunfluoreszenzmikroskopische Aufnahmen der verschiedenen GRHL3-2 Proteinvarianten. Endothelzellen wurden mit Expressionsplasmiden für GRHL3-2, GRHL3-2ΔC1, GRHL3-2ΔC2, GRHL3-2ΔC3 oder GRHL3-2ΔC4 transfiziert. Die Zellkerne sind in blau (DAPI), die GRHL3-2 Proteine in grün (myc) und das Zytoskelett in rot (Phalloidin) dargestellt.

Da auch hier die Immunfärbung alleine keine eindeutige Aussage über die zelluläre Lokalisation geben kann, wurde für die Deletionsvariante GRHL3-2ΔC4 zusätzlich eine biochemische Fraktionierung von Kern und Zytoplasma durchgeführt. Hierfür wurden Endothelzellen mit Expressionsplasmiden für das wildtypische GRHL3-2 oder für die Deletionsmutante GRHL3-2ΔC4 transfiziert. Nach biochemischer

Fraktionierung, wurde die Expression von GRHL3-2 und der Deletionsmutante über einen gegen das myc-Epitop gerichteten Antikörper im Western Blot detektiert (Abbildung 3.32). Für die Kernfraktion wurde das Protein TOPOI und für die zytosolische Fraktion das Protein GAPDH mit entsprechenden Antikörpern detektiert. Wie zuvor wurde GRHL3-2 in beiden Fraktionen detektiert, wobei die Bande in der nukleären Fraktion eine höhere Intensität aufweist. Bei GRHL3-2 Δ C4 ist ausschließlich eine Bande in der zytosolischen Fraktion zu erkennen.

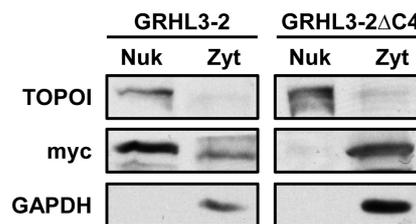


Abbildung 3.32: Lokalisation von GRHL3-2 und GRHL3-2 Δ C4 nach biochemischer Fraktionierung. Endothelzellen wurden mit Expressionsplasmiden für GRHL3-2 oder GRHL3-2 Δ C4 transfiziert. Die Lyse erfolgte mittels biochemischer Fraktionierung von Zellkern (Nuk) und Zytoplasma (Zyt). Der obere Blot zeigt die Reinheitskontrolle mit dem nukleären Protein Topoisomerase I (TOPO I), der untere die Reinheitskontrolle mit dem zytosolischen Protein Glycerinaldehyd-3-Phosphate-Dehydrogenase (GAPDH).

Diese Daten bestätigen die Immunfärbungen (siehe Abbildung 3.31) und zeigen eindeutig, dass es sich bei der Deletionsvariante GRHL3-2 Δ C4 um ein extranukleäres Protein handelt.

3.10 Einfluss der extranukleären GRHL3-2 Mutanten auf die Apoptose in Endothelzellen

Nachdem durch die großflächigen Mutanten und die Mutanten zwischen DNA-Bindedomäne und Dimerisierungsdomäne extranukleäre GRHL3-2 Proteinvarianten identifiziert wurden, sollte nun deren Einfluss auf die Apoptose von Endothelzellen untersucht werden. Dazu wurden Endothelzellen mit Expressionsplasmiden für Wildtyp GRHL3-2, GRHL3-2 Δ C4 und GRHL3-2 Δ biNLS transfiziert. Zusätzlich wurde die Mutante GRHL3-2 Δ CT mitgeführt, die noch im Kern lokalisiert ist und in der Lage ist die Transkription zu aktivieren. 18 Stunden nach der Transfektion wurden die

Zellen mit Annexin-V-APC und 7-AAD gefärbt. Die Anzahl der apoptotischen Zellen wurde anschließend im Durchflusszytometer gemessen. Die Auswertung der Apoptosedaten ist in Abbildung 3.33 dargestellt. Im Gegensatz zum Wildtyp GRHL3-2 sind die extranukleären Deletionsmutanten nicht mehr in der Lage antiapoptotisch zu wirken. Die Deletionsmutante GRHL3-2 Δ CT zeigt wie der Wildtyp GRHL3-2 einen antiapoptotischen Effekt. Diese Mutante trägt ihre Deletion im Bereich der Dimerisierungsdomäne und hat bereits bei der Luziferasemessung eine Transkriptionsaktivierung gezeigt. Somit konnte gezeigt werden, dass die Dimerisierungsdomäne für den antiapoptotischen Effekt von GRHL3-2 irrelevant ist.

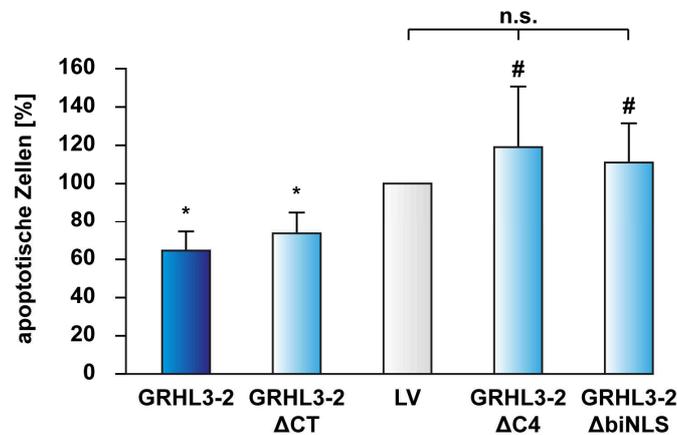


Abbildung 3.33: Apoptotischer Effekt extranukleärer Deletionsmutanten. Endothelzellen wurden mit Expressionsplasmiden für GRHL3-2, GRHL3-2 Δ CT, GRHL3-2 Δ C4, GRHL3-2 Δ biNLS oder dem Levektor (LV) transfiziert. Die Apoptose wurde durchflusszytometrisch ermittelt. (n=6-7, * P <0,05 vs GRHL3-2, # P <0,05 vs pcDNA3.1; n.s. = nicht signifikant)

Die Ergebnisse der Apoptosemessung zeigen, dass die antiapoptotische Wirkung von GRHL3-2 von der Kernlokalisierung abhängt. Um sicher zu gehen, dass die extranukleären Deletionsmutanten ihre antiapoptotische Wirkung aufgrund ihrer zellulären Lokalisation verloren haben und nicht aufgrund von deletionsbedingten Veränderungen in der Tertiärstruktur, sollten im Weiteren die Aminosäuren des NLS identifiziert und mutiert werden.

3.11 Identifizierung des nukleären Lokalisationssignals

Die zuvor beschriebenen Lokalisationsanalysen mit den Deletionsmutanten haben gezeigt, dass die GRHL3-2 Proteinvarianten $\Delta C4$ und $\Delta biNLS$ keine Kernlokalisierung aufweisen. Die Deletionen dieser beiden Mutanten überschneiden sich in insgesamt 8 Aminosäurepositionen. Aufgrund dieser Tatsachen lag die Vermutung nahe, dass das NLS wahrscheinlich in diesem Überlappungsbereich lokalisiert ist.

Für NLS-Sequenzen ist eine direkte oder indirekte Aneinanderreihung von basischen Aminosäuren charakteristisch. Dabei wird zwischen einteiligen und zweiteiligen NLS-Sequenzen unterschieden. Klassische Beispiele für NLS-Sequenzen sind die des *simian virus 40 large T-antigen* (einteiliges NLS: PKKKRKV; (Kalderon *et al.*, 1984)) und die des Nucleoplasmins (zweiteiliges NLS: KRPAATKKAGQAKK; (Robbins *et al.*, 1991)). Jedoch können auch starke Abweichungen von diesen klassischen NLS-Sequenzen auftreten.

Abbildung 3.34 zeigt das Alignment der beiden extranukleären Mutanten $\Delta C4$ und $\Delta biNLS$ im Vergleich zum GRHL3-2 Wildtyp. In dem Überlappungsbereich der beiden Mutanten sind insgesamt 3 basische Aminosäuren lokalisiert: Arginin (R) an Position 485, Lysin (K) an Position 489 und Arginin (R) an Position 490. Für die Überprüfung der Hypothese, dass diese Aminosäuren das NLS darstellen, wurde eine Substitutionsmutante hergestellt, bei der diese drei basischen Aminosäuren gegen saure Aminosäuren ausgetauscht sind. Diese so erzeugte Mutante wurde zur weiteren Analyse auf ihre zelluläre Lokalisation und ihre Funktion bei der Apoptose untersucht.

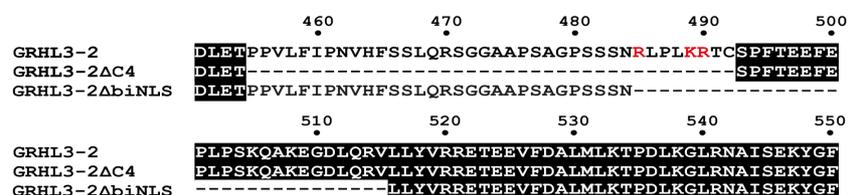


Abbildung 3.34: Vergleich von GRHL3-2, GRHL3-2 $\Delta C4$ und GRHL3-2 $\Delta biNLS$ im Bereich der beiden Deletionen. Gezeigt sind die Aminosäuresequenzen von GRHL3-2, GRHL3-2 $\Delta C4$ und GRHL3-2 $\Delta biNLS$ im Bereich der beiden Deletionen. In allen drei Proteinen vorhandene Aminosäuren sind schwarz unterlegt die basischen Aminosäuren im Überlappungsbereich der beiden Deletionsmutanten sind in rot dargestellt. Das Alignment wurde erstellt mit Dialign und dargestellt mit GeneDoc.

3.11.1 Klonierung eines Expressionsplasmids für die Substitutionsmutante GRHL3-2 R485E/K489E/R490D

Um die basischen Aminosäuren Arginin an Position 485, Lysin an Position 489 und Arginin an Position 490 in saure Aminosäuren umzuwandeln, wurde das QuickChange II Site-Directed Mutagenesis Kit verwendet. Die Mutagenese erfolgt in einer PCR mit Primern, die die gewünschte(n) Mutation(en) tragen und über ihre volle Länge komplementär zueinander sind. Für den Austausch der drei basischen Aminosäuren müssen insgesamt 5 Nukleotide ausgetauscht werden, deren Abstand allerdings zu groß ist, um alle Mutationen mit einem einzelnen Primerpaar abdecken zu können. Daher wurde die Klonierung in zwei Schritte unterteilt. Im ersten Schritt wurde ein Plasmid hergestellt, bei dem die Codons für die Aminosäurepositionen 489 und 490 simultan geändert wurden, so dass der entstehende Expressionsvektor für ein Protein codiert, in dem der Lysinrest an Position 489 durch einen Glutamatrest (K489E) und der Argininrest an Position 490 durch einen Aspartatrest (R490D) ersetzt ist. Dieses Plasmid (GRHL3-2 K489E/R490D) wurde dann für den Austausch des Argininrests an Position 485 gegen einen Glutamatrest (R485E) eingesetzt, um so die Dreifachmutante GRHL3-2 R485E/K489E/R490D zu generieren.

Die Mutagenesen wurden wie in Kapitel 2.2.1.3.1 beschrieben mit den in Abbildung 3.35 dargestellten Mutagenese-Primern durchgeführt. Nach der Transformation wurden die Plasmide aus jeweils 3 Einzelkolonien im kleinen Maßstab isoliert und zum Ausschluss von Amplifikationsbedingten Mutation, sequenziert. An dieser Stelle wurde keine Restriktionsanalyse durchgeführt, weil durch die Substitution die Größe des Wildtyp Plasmids erhalten bleibt und somit anhand eines Restriktionsverdaus keine Aussage über eine erfolgreiche Mutation gemacht werden kann.

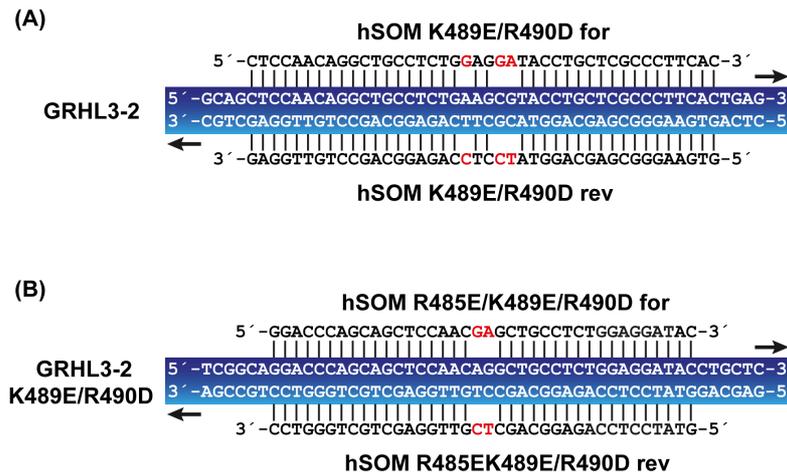


Abbildung 3.35: Mutagenese-Primer zum Austausch der Aminosäuren R485, K489 und R490. Die codierenden Sequenzen der jeweiligen *template* DNA sind in weißer Schrift auf blauem Hintergrund dargestellt; die in den Mutagenesen veränderten mutierten Nukleotide in rot. (A) Mutagenese-Primer zum simultanen Austausch von Lysin 489 und Arginin 490 in GRHL3-2 (B) Mutagenese-Primer zum Austausch von Arginin 485 in GRHL3-2 K489E/R490D.

3.11.2 Analyse der Expression von GRHL3-2 R485E/K489E/R490D

Bevor die GRHL3-2 R485E/K489E/R490D Mutante auf Lokalisation und Funktion bei der Apoptose untersucht wurde, sollte zunächst sichergestellt werden, dass dieses Protein in humanen Endothelzellen exprimiert werden kann. Dazu wurden diese Zellen mit Expressionsplasmiden für GRHL3-2, GRHL3-2 R485E/K489E/R490D oder einem Leervektor (LV) transfiziert und die Expression mittels Western-Blot nachgewiesen (Abbildung 3.36).

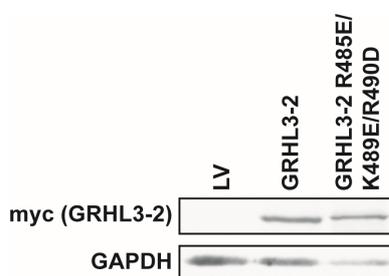


Abbildung 3.36: Expression der Substitutionsmutante GRHL3-2 R485R/K489E/R490D in Endothelzellen. Endothelzellen wurden mit Expressionsplasmiden für GRHL3-2, GRHL3-2 R485E/K489E/R490D oder einem Leervektor (LV) transfiziert. Die GRHL3 Proteine wurden mit einem Antikörper gegen das myc-tag nachgewiesen, als Gleichladungskontrolle wurde GAPDH detektiert.

Die Expressionsanalyse zeigt eindeutig, dass die Dreifachmutante ebenso gut in Endothelzellen exprimiert wird, die der Wildtyp. Somit konnte die Mutante in den folgenden Experimenten auf ihre Lokalisation und Funktion bei der Apoptose untersucht werden.

3.11.3 Zelluläre Lokalisation von GRHL3-2 R485E/K489E/R490D

Zur Untersuchung wurden wie für die anderen Mutanten zuvor Endothelzellen mit dem Expressionsplasmid für GRHL3-2 R485E/K489E/R490D transfiziert. Für die Visualisierung des Kerns wurde DAPI (blau) und für das Zytoskelett Phalloidin Alexa Fluor® 568 (rot) eingesetzt. Das mutierte Protein wurde über einen gegen das myc-Epitop gerichteten Antikörper markiert und durch Verwendung eines gegen den Erstantikörper gerichteten Alexa Fluor® 488 Anti-Maus Antikörper in grün sichtbar gemacht. Abbildung 3.37 zeigt die Lokalisation von GRHL3-2 R485E/K489E/R490D (3-fach) im Vergleich zum Wildtyp GRHL3-2. Die Substitutionsmutante zeigt, eine deutlich grüne Fluoreszenz im Zytoplasma und keine Kernfärbung. Diese Beobachtung lässt vermuten, dass das Protein exklusiv im Zytosol lokalisiert ist.

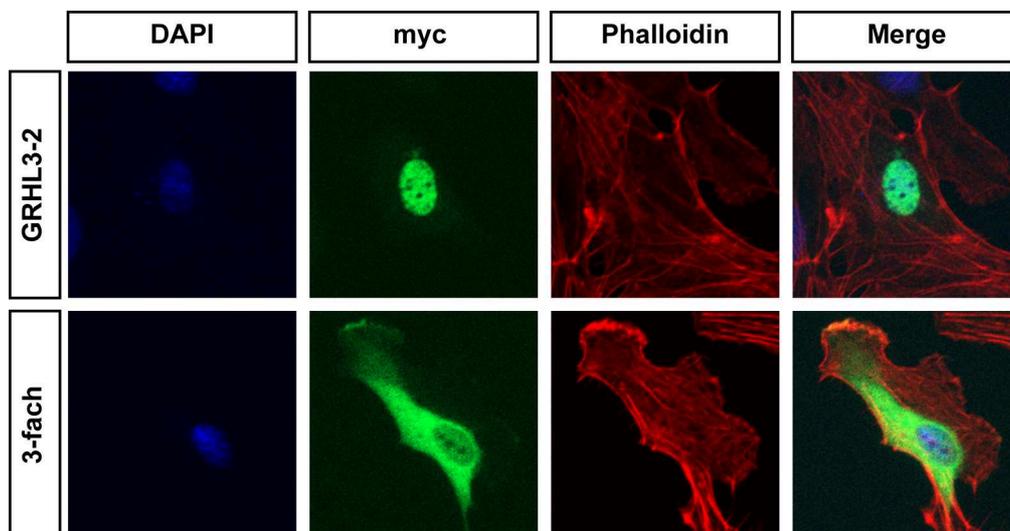


Abbildung 3.37: Immunfluoreszenzmikroskopische Aufnahmen von GRHL3-2 R485E/K489E/R490D. Endothelzellen wurden mit einem Expressionsplasmid für GRHL3-2 oder GRHL3-2 R485E/K489E/R490D (3-fach) transfiziert. Die Zellkerne sind in blau (DAPI), die GRHL3-2 Proteine in grün (myc) und das Zytoskelett in rot (Phalloidin) dargestellt.

Zur Bestätigung der Ergebnisse aus den Immunfärbungen wurde zusätzlich eine biochemische Fraktionierung durchgeführt. Die Reinheit der zytosolischen und der nukleären Fraktion wurde wie zuvor durch den Nachweis von Topoisomerase I (Nukleus) und von GAPDH (Zytosol) bestimmt. Aus Abbildung 3.38 geht hervor, dass die Dreifachmutante ausschließlich im Zytoplasma lokalisiert ist, wodurch bestätigt wurde, dass die drei basischen Aminosäuren R485, K489 und R490 das NLS darstellen.

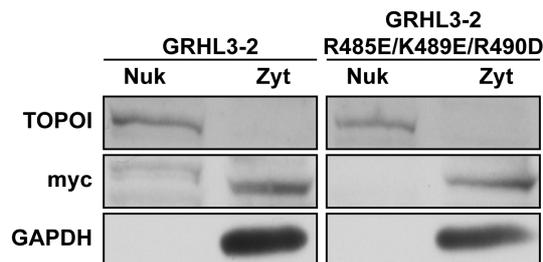


Abbildung 3.38: Lokalisation von GRHL3-2 und GRHL3-2 R485E/K489E/R490D nach biochemischer Fraktionierung. Endothelzellen wurden mit Expressionsplasmiden für GRHL3-2 oder GRHL3-2 R485E/K489E/R490D transfiziert. Die GRHL3-2 Proteine wurden mit einem Anti-myc Antikörper nachgewiesen. Für die nukleäre Fraktion (Nuk) wurde TOPOI und für die zytosolische Fraktion (Zyt) wurde GAPDH mit entsprechenden Antikörpern detektiert. Der obere Blot zeigt die Reinheitskontrolle mit dem nukleären Protein Topoisomerase I (TOPO I), der untere die Reinheitskontrolle mit dem zytosolischen Protein Glycerinaldehyd-3-Phosphate-Dehydrogenase (GAPDH).

3.11.4 Einfluss der Dreifachmutante Mutante GRHL3-2 R485E/K489E/R490D auf die Apoptose in Endothelzellen

Um abzuklären, ob die antiapoptotische Funktion von GRHL3-2 ausschließlich von der Kernlokalisierung abhängig ist, wurden Apoptosemessungen nach Überexpression der Dreifachmutante durchgeführt. Dazu wurden Endothelzellen mit Expressionsplasmiden für GRHL3-2, GRHL3-2 R485E/K489E/R490D oder einem Leervektor transfiziert. Die Auswertung der Apoptosedaten in Abbildung 3.39 zeigt, dass durch den Austausch der drei basischen Aminosäuren in GRHL3-2 R485E/K489E/R490D der antiapoptotische Effekt komplett aufgehoben wird. Somit konnte ich zeigen, dass der antiapoptotische Mechanismus von GRHL3-2 nur von der Lokalisation im Zellkern abhängig ist.

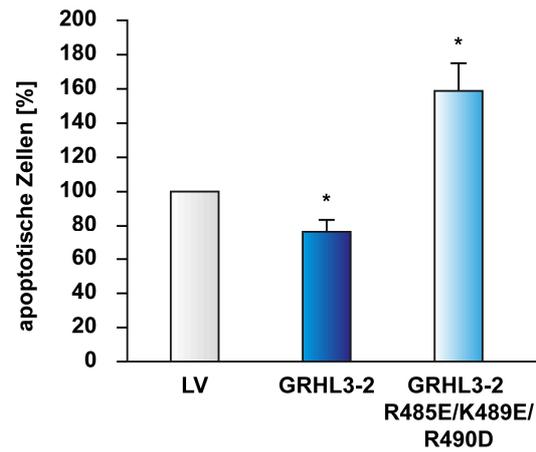


Abbildung 3.39: Einfluss von GRHL3-2 R485E/K489E/R490D auf die Apoptose. Endothelzellen wurden mit Expressionsplasmiden für GRHL3-2, GRHL3-2 R485E/K489E/R490D oder einem Leervektor (LV) transfiziert und die Apoptose mit Annexin-V-APC im Durchflusszytometer bestimmt. (n=3, * $P < 0,05$ vs LV)

4 Diskussion

Im humanen Endothel werden die Isoformen GRHL3-1, GRHL3-2 und GRHL3-3 koexprimiert (Haendeler *et al.*, 2013). Die Isoformen 1 und 3 entstehen dabei durch alternatives Spleißen eines Primärtranskripts, wobei durch externe Stimuli, wie z.B. NO reguliert wird, welche der Isoform stärker exprimiert wird (Farrokh *et al.*, 2015; Haendeler *et al.*, 2013). In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass GRHL3-1 antiapoptotisch und GRHL3-3 proapoptotisch wirkt. Zudem wurde erstmalig demonstriert, dass die antiapoptotische Funktion von der Kernlokalisierung abhängig ist. Als funktionelle Domäne wurde das NLS identifiziert und gezeigt, dass die durch Ting *et al.* vorhergesagte Dimerisierungsdomäne für die Aktivität des Transkriptionsfaktors nicht relevant ist. Dies deutet darauf hin, dass die GRHL3 Transkriptionsfaktoren durch die Aktivierung der Transkription von bestimmten Zielgenen den apoptotischen Prozess beeinflussen und regulieren.

4.1 Regulation von GRHL3-1 und GRHL3-3 durch externe Stimuli

Die GRHL3 Isoformen 1 und 3 sind beide aktive Transkriptionsfaktoren, die zur Aktivierung unterschiedlicher Zielgene führen. Die Analyse der Genexpressionsprofile bestätigte, dass durch GRHL3-1 367 Gene und durch GRHL3-3 261 Gene reguliert und nur 28 dieser Gene von beiden Isoformen beeinflusst werden (Haendeler *et al.*, 2013). Die unterschiedlichen Funktionen der Isoformen sind somit vermutlich auf eine Aktivierung unterschiedlicher Zielgene zurückzuführen. Isoform 1 ist in Bezug auf seine Funktion bei der Migration und Apoptose vergleichbar mit Isoform 2 (Lukosz *et al.*, 2011). Diese beiden Isoformen sind in ihrer Aminosäuresequenz nahezu identisch, bis auf die ersten 6 (GRHL3-1) bzw. 11 (GRHL3-2) Aminosäuren. Dieses N-terminale Ende der Sequenz ist bei GRHL3-3, das ansonsten identisch aufgebaut ist, nicht enthalten. Dies legt nahe, dass die Ursache für die entgegengesetzten Funktionen der Isoformen im Aminoterminus zu finden ist. Es könnte sein, dass über diesen die Interaktion mit anderen Transkriptionsfaktoren oder Coaktivatoren erfolgt, die bei Isoform 3 durch das Fehlen dieses Abschnitts im Protein nicht möglich ist. Das Expressionsmuster von Genen wird durch die Kombination verschiedener *cis*-regulatorischer Elemente auf der DNA und der Bindung der zugehörigen Transkriptionsfaktoren an diese

Elemente reguliert (Ogata *et al.*, 2003; Remenyi *et al.*, 2004). Um zu analysieren, ob die Isoformen 1 und 2 über ihre N-terminalen Enden mit anderen regulatorischen Proteinen interagieren und ob diese Interaktion aufgrund der N-Terminal kürzeren Sequenz bei GRHL3-3 nicht stattfindet, könnte nach Interaktionspartnern gesucht werden. Eine Möglichkeit zur Identifizierung von Interaktionspartnern ist die Durchführung eines *yeast-two-hybrid* Screenings, bei dem nur die N-terminale Sequenz von Isoform 1 und 2 als *bait* verwendet wird. Alternativ zu diesem genetischen Ansatz könnten die Interaktionspartner biochemisch durch eine Coimmunpräzipitation mit der isolierten N-terminalen Domäne und anschließender massenspektrometrischer Analyse identifiziert werden.

Es ist möglich, dass GRHL3-1 die Expression seiner Zielgene, wie z.B. Mxi1 und Akt2 direkt auf Transkriptionsebene hochreguliert. Im Gegensatz dazu muss die Herunterregulation dieser Proteine durch Isoform 3 auf indirektem Weg, als sekundärer Effekt stattfinden. Es ist denkbar, dass GRHL3-3, das selbst ein aktiver Transkriptionsfaktor ist, Proteine hochreguliert, die dann zu einer verminderten Expression der GRHL3-1 bzw. 3-2 Zielgene führen, oder direkt auf die anderen beiden Isoformen einwirken.

Da alle GRHL3 Isoformen die gleiche Dimerisierungsdomäne haben, ist davon auszugehen, dass sie untereinander Heterodimere bilden. Allerdings ist es möglich, dass unterschiedliche Homo- und Heterodimere unterschiedliche Gene regulieren und damit die Verschiebung der Konzentrationen einzelner Isoformen eine Veränderung des Transkriptomts zur Folge hat, was dann wiederum den zellulären Phänotyp bestimmt.

Die differentielle Regulation der Transkription durch die Bildung unterschiedlicher Dimere von Transkriptionsfaktoren innerhalb einer Familie ist weit verbreitet (Klemm *et al.*, 1998). Beispiele hierfür sind die Myc-Mad-Max Familie, die AP1 Familie, die STAT-Familie und die NF- κ B Familie. Der Transkriptionsfaktor Max aktiviert durch Dimerisierung mit Myc die Transkription von Zellproliferations-fördernden, sowie Apoptose-induzierenden Zielgenen. Die Heterodimerisierung von Max mit Mad hingegen führt zu einer Repression der Transkription, so dass dieses Dimer als Antagonist des Max/Myc Dimers fungiert (Amati und Land, 1994; Grandori *et al.*, 2000). AP-1 ist kein definierter Transkriptionsfaktor, sondern beschreibt die Homo- und Heterodimere zwischen verschiedenen Mitgliedern der basischen Leuzin-Zipper

Transkriptionsfaktor-Familie, zu der unter anderem Jun, Fos und ATF/CREB gezählt werden. Dabei können Jun-Proteine sowohl mit Fos-Proteinen, als auch mit ATF/CREB-Proteinen dimerisieren. Die unterschiedlichen Dimere können je nach Zusammensetzung Zellproliferation und Differenzierung sowohl positiv, als auch negativ beeinflussen (Hess *et al.*, 2004; Shaulian und Karin, 2001; van Dam und Castellazzi, 2001). Die STAT-Faktoren (STAT1, STAT3, STAT4, STAT5 und STAT6) können über eine SH2-Domäne untereinander dimerisieren; dabei unterscheiden sich die verschiedenen Dimere in ihrer Affinität zu unterschiedlichen Promotoren. Somit wird durch die Kombination verschiedener aktiver STAT-Faktoren das Genexpressionsprofil direkt beeinflusst (Aaronson und Horvath, 2002; Levy und Darnell, 2002). Im Gegensatz dazu wird bei dem Transkriptionsfaktor NF- κ B, der analog zu AP-1 ein Dimer aus unterschiedlichen Proteinen einer Familie bilden kann, durch Heterodimerisierung der Untereinheiten p65 und p50 die Transkription von Zielgenen aktiviert, während p50 Homodimere Transkription reprimieren (Gilmore, 2006; Perkins und Gilmore, 2006; Sun und Andersson, 2002).

Die Regulation von GRHL3, in Hinblick darauf ob Isoform 1 oder 3 verstärkt produziert wird, erfolgt durch alternatives Spleißen. Die Tatsache, dass in Endothelzellen nach Behandlung mit einem NO-Donor (PAPA NONOate) die Transkriptmenge von GRHL3-1 hochreguliert und die von GRHL3-3 reduziert wird (Haendeler *et al.*, 2013) weist darauf hin, dass die Verschiebung des Gleichgewichts zwischen den alternativ gespleißten Isoformen ein möglicher Regulationsmechanismus der Endothelzelle als Antwort auf extrazelluläre Signale sein könnte. Aufgrund von *deep sequencing* Analysen wird davon ausgegangen, dass ca. 95% aller humanen Multi-Exon Gene durch alternatives Spleißen reguliert werden (Pan *et al.*, 2008), was die Proteom-Komplexität ausgehend von einer fixen Anzahl von Genen erhöht. Alternatives Spleißen kommt bei vielen Transkriptionsfaktoren vor (Talavera *et al.*, 2009), spielt aber auch bei anderen Proteinen, die für die Funktionalität des Endothels kritisch sind, eine wesentliche Rolle (Farrokh *et al.*, 2015). Hier werden wie bei GRHL3 zum Teil Spleißvarianten gebildet, die entgegengesetzte Funktionen haben. Beispielsweise wurde für eNOS alternatives Spleißen in Intron 13 beschrieben, wodurch drei verschiedenen Spleißvarianten (eNOS13A, eNOS13B und eNOS 13C) produziert werden (Lorenz *et al.*, 2007). Im Vergleich zum kompletten eNOS sind alle drei Spleißvarianten C-Terminal verkürzt und enthalten keine Reduktasedomäne, die für die Bindung von

Cofaktoren essentiell ist. Am Beispiel von eNOS13A wurde gezeigt, dass diese verkürzte Spleißvariante katalytisch inaktiv ist und bei Coexpression mit dem kompletten eNOS trans-dominant negativ wirkt. Auch für den im Endothel wichtigen Wachstumsfaktor VEGF wurde alternatives Spleißen beschrieben, dabei werden die Spleißvarianten in eine proangiogene und eine antiangiogene Gruppe unterteilt (Harper und Bates, 2008). Das Transmembran-Glykoprotein Endoglin (ENG) wird im Endothel ebenfalls durch alternatives Spleißen reguliert. Die Spleißvarianten L- (*long*) und S- (*short*) ENG beeinflussen beide die durch TGF β induzierten Signalwege (Blanco *et al.*, 2008; Blanco *et al.*, 2005), wobei L-ENG die Zellproliferation stimuliert und S-ENG diese inhibiert (Lebrin *et al.*, 2004).

Die verschiedenen Beispiele für alternatives Spleißen im Endothel deuten darauf hin, dass dieser Prozess genutzt wird, um die Funktionen der Endothelzellen den herrschenden Bedingungen anzugleichen. Als Beleg hierfür kann gewertet werden, dass alternatives Spleißen in Endothelzellen durch hypoxische Bedingungen induziert und darüber sowohl die Bildung neuer Blutgefäße (Weigand *et al.*, 2012), als auch das Gleichgewicht zwischen Apoptose und Zellüberleben (Hang *et al.*, 2009) reguliert wird.

Spleißen ist ein komplexer Prozess, der durch verschiedene Spleißregulatorische Proteine reguliert wird, so dass Veränderungen in deren Expression oder Aktivität möglicherweise auch alternatives Spleißen beeinflussen. Dass es einen Zusammenhang zwischen Veränderungen in Spleißfaktoren und dem Zustand von Endothelzellen gibt, wurde in mehreren Arbeiten zur Endothelzellseneszenz gezeigt. Seneszente Endothelzellen sind gekennzeichnet durch eine veränderte Redoxhomöostase (Goy *et al.*, 2014) sowie eine erhöhte Sensitivität gegenüber apoptotischen Stimuli (Altschmied und Haendeler, 2009). Für den Spleißfaktor SNEV wurde gezeigt, dass seine Expression in seneszenten Endothelzellen reduziert ist und dass die Überexpression sowohl die Lebensdauer der Zellen verlängert als auch die Resistenz gegenüber Apoptoseinduktion erhöht (Voglauer *et al.*, 2006). Der Serin-/Arginin-reiche Spleißfaktor SRSF1, der unter anderem das alternative Spleißen von Endoglin reguliert, verändert seine intrazelluläre Lokalisation in seneszenten Endothelzellen, was mit einer Verschiebung der Endoglin-Isoformen hin zu S-ENG verbunden ist (Blanco und Bernabeu, 2011). Dies führte zu dem Postulat,

dass SRSF1 ein potentieller Marker für Endothelzellseneszenz ist (Blanco und Bernabeu, 2012).

Zumindest in Tumorzellen konnte ein direkter Einfluss von oxidativem Stress, der bei vielen Erkrankungen des Kardiovaskulären Systems auftritt (Fearon und Faux, 2009; Sugamura und Keaney, 2011) auf die Expression spezifischer Spleißfaktoren gezeigt werden. Hier kam es nach Behandlung mit Wasserstoffperoxid zur selektiven Herabregulation der Spleißrepressoren *polypyrimidine tract binding protein 1* und *heterogeneous nuclear ribonulceoprotein A2/B1* und in Verbindung damit zur Expression einer alternativ gespleißten Isoform der löslichen Guanylatzyklase (Cote *et al.*, 2012). Die vermehrt gebildete Spleißform C- α 1 ist resistenter gegenüber oxidativem Stress, weswegen das alternative Spleißen als zelluläre Adaptation gesehen werden kann.

Neben dem Umschalten zwischen den Isoformen spielt die Aktivität von GRHL3 eine entscheidende Rolle für seine Funktionen im Endothel. Die in GRHL3 identifizierten funktionellen Domänen werden im folgenden Kapitel diskutiert.

4.2 Identifizierung funktioneller Domänen, die für die Aktivität von GRHL3 als Transkriptionsfaktor essentiell sind

Die Untersuchung der Transkriptionsaktivierung durch GRHL3-2 Proteinvarianten mit großflächigen Deletionen in der codierenden Sequenz haben gezeigt, dass mit Ausnahme von GRHL3-2 Δ CT keines der mutierten Proteine (GRHL3 Δ A, GRHL3-2 Δ B, GRHL3-2 Δ C und GRHL3-2 Δ biNLS) in der Lage ist die Transkription eines GRHL3-spezifischen Luziferase-Reporters zu aktivieren. Dabei kann eine verringerte Aktivierung der Transkription unterschiedliche Ursachen haben, die im Folgenden näher diskutiert werden. Eine Möglichkeit für eine verringerte Transaktivierung kann wie im Fall von GRHL3-2 Δ B darin liegen, dass keine Wechselwirkung mit der DNA stattfindet. Bei GRHL3-2 Δ B ist die DNA-Bindedomäne deletiert, wodurch der Transkriptionsfaktor nicht mehr an die DNA binden und somit auch keine Transkription aktivieren kann. Weiterhin kann durch eine fehlende Aktivierungsdomäne, wie bei GRHL3 Δ A, ebenfalls keine Transaktivierung erfolgen.

Von Ting *et al.* war ebenfalls eine Aktivierungsdomäne im N-Terminus, der in der Mutante GRHL3 Δ A deletiert ist, beschrieben worden. Allerdings ist diese wesentlich kleiner und nur in den GRHL3 Isoformen 1 und 2, nicht aber in Isoform 3 enthalten, was dazu geführt hatte, dass GRHL3-3 als potentieller Repressor eingestuft wurde (Ting *et al.*, 2003b). Die experimentelle Durchführung zur Identifizierung der Aktivierungsdomäne durch Ting *et al.* weist einige Schwachpunkte auf. Zum einen wurde nicht die komplette Sequenz, sondern nur das N-terminale Ende verwendet und zum anderen wurde diese als ein Fusionsprotein mit einer heterologen, Gal4-DNA-Bindedomäne eingesetzt. Dieses Vorgehen ist prinzipiell aufgrund des modularen Aufbaus von Transkriptionsfaktoren (Frankel und Kim, 1991) möglich, stellt aber eine artifizielle Situation dar. Somit ist es vorstellbar, dass der N-terminale Abschnitt von Isoform 1 und 2 nur in diesem isolierten Kontext als Aktivierungsdomäne wirkt und im nativen GRHL3 aufgrund der Tertiärstruktur nicht zugänglich ist, was jedoch für die Interaktion mit Coaktivatoren absolut erforderlich ist (Lemon und Tjian, 2000). Da es bisher keinerlei Untersuchungen zur Struktur von GRHL3 gibt, kann diesbezüglich keine Aussage gemacht werden. Allerdings konnte in unserer Arbeitsgruppe gezeigt werden, dass auch die N-Terminus verkürzte Isoform GRHL3-3 ein starker Transkriptionsaktivator ist (Haendeler *et al.*, 2013). Daraus resultiert, dass in dem N-terminalen Ende von GRHL3-3, das in der Proteinvariante GRHL3 Δ A deletiert ist, und damit auch in den Isoformen 1 und 2 eine Aktivierungsdomäne lokalisiert sein muss, die in der Mutante entweder komplett deletiert oder zerschnitten ist. Um dies zu analysieren könnte ein *two-hybrid* Experiment durchgeführt werden. Dazu müsste der in Δ A deletierte N-terminale Bereich, oder auch ein größerer Abschnitt des Proteins an eine Gal4 DNA-Bindedomäne fusioniert werden. Durch Kotransfektion mit einem Gal4-abhängigen Reportergenkonstrukt kann dann untersucht werden, ob diese Abschnitte des GRHL3 Proteins eine Aktivierungsdomäne darstellen. Alternativ könnte die N-terminale Sequenz an die natürlich vorkommende GRHL3 DNA-Bindedomäne fusioniert werden und mit dem in dieser Arbeit verwendeten GRHL3-spezifischen Luziferase-Reportergenplasmid kotransfiziert werden. Die Verwendung dieses System ist möglich, da wie im Folgenden beschrieben die Dimerisierungsdomäne am C-terminalen Ende für die Transaktivierung nicht erforderlich ist. Allerdings sind beide Vorgehensweisen mit den gleichen Schwächen, wie oben besprochen verbunden, könnten aber dazu genutzt werden, die Aktivierungsdomäne in diesem Bereich von

GRHL3 durch Verwendung von Teilsequenzen aus dem N-Terminus weiter einzuengen. Die Funktionalität dieser Domäne könnte dann möglicherweise durch kleinere Deletionen im GRHL3 Protein bestätigt werden.

In dem für GRHL3-spezifischen Luziferase-Assay konnte gezeigt werden, dass die Proteinvariante GRHL3-2 Δ CT, bei der die C-terminale Dimerisierungsdomäne deletiert wurde, als einzige der Deletionsmutanten noch in der Lage ist die Transkription zu aktivieren, und sich hinsichtlich der Aktivität des Transkriptionsfaktors nicht von der durch GRHL3-2 vermittelten Aktivierung unterscheidet. Viele Transkriptionsfaktoren aus unterschiedlichsten Familien bilden Homo- und Heterodimere (Amoutzias *et al.*, 2008; Marianayagam *et al.*, 2004). Je nachdem welche Transkriptionsfaktoren miteinander dimerisieren, können viele verschiedene Gene reguliert werden. Zum einen können zwei unterschiedliche Dimere entweder an die selbe DNA-Sequenz binden und durch Competition die Genexpression sowohl positiv, als auch negativ beeinflussen, oder sie binden an unterschiedliche Sequenzen und bestimmen durch den Dimerisierungspartner, welches Gen ein- oder ausgeschaltet werden soll.

Auch für die Mitglieder der GRHL-Familie wurde beschrieben, dass sie untereinander sowohl homo- als auch heterodimerisieren können (Ting *et al.*, 2003b; Wilanowski *et al.*, 2002). Jedoch konnte bereits für GRH aus *Drosophila* gezeigt werden, dass die Dimerisierungsdomäne für die Interaktion mit der DNA nicht essentiell ist und der Transkriptionsfaktor auch als Monomer einen DNA/Protein Komplex bilden kann, allerdings stabilisiert die Dimerisierung die Wechselwirkung zwischen Transkriptionsfaktor und DNA (Uv *et al.*, 1994). Daher wurde angenommen dass die Dimerisierung kritisch für die DNA Bindung ist, vor allem in Situationen, wenn nicht sehr viel GRH Protein vorhanden ist oder es an Bindestellen mit geringer Affinität binden muss (Uv *et al.*, 1994). Da GRHL3-2 Δ CT in dem im Rahmen meiner Arbeit verwendeten experimentellen Systemen sowohl ein genauso potenter Transkriptionsaktivator ist wie GRHL3-2 und auch Apoptose-Schutz in Endothelzellen vermittelt, scheint hier die Dimerisierungsdomäne keinen Einfluss auf die Transaktivierung zu haben. Eine mögliche Ursache dafür könnte die Überexpression an sich sein. Eine weitere Ursache für diese Beobachtung, zumindest in dem GRHL3-abhängigen Luziferase-Reportersystem könnte auch die hierfür verwendete GRHL3-spezifische Konsensus-Sequenz sein. Diese Sequenz wurde mittels

CASTing (*cyclic amplification and selection of targets* (Wright *et al.*, 1991)) identifiziert (Ting *et al.*, 2005). Dabei wurden insgesamt 49 verschiedene Sequenzen, die *in vitro* von GRHL3 gebunden wurden, ermittelt und untereinander verglichen. Aus diesen wurde die Konsensus-Sequenz anhand des prozentualen Vorkommens eines Nukleotids an einer bestimmten Position festgelegt. Die auf diese Weise ermittelte Sequenz könnte eine optimale und hochaffine Bindestelle für GRHL3 darstellen, die unter natürlichen Bedingungen vielleicht gar nicht vorkommt. Bisher wurde für GRHL3 eine evolutionär konservierte DNA-Bindestelle in dem Promotor von PTEN (*phosphatase and tensin homolog*) beschrieben (humane DNA-Bindestelle für GRHL3: AACCAGTT), die von der Konsensus-Sequenz in einem Nukleotid abweicht (Darido *et al.*, 2011), sowie zwei Bindestellen in dem Promotor des humanen Transglutaminase 1 Gens (Ting *et al.*, 2005), die noch stärkere Abweichungen von der Konsensus-Sequenz zeigen (AACCTGGC und AAACCGGCC). Die in *Drosophila* identifizierten Bindestellen für GRH (CAGGTAG und CAGGCAG) zeigen keinerlei augenfällige Übereinstimmung (Harrison *et al.*, 2010). Da insgesamt nur sehr wenig über die Bindestellen von GRHL3 bekannt ist, kann keine Aussage darüber gemacht werden, ob die von uns verwendete Konsensus-Sequenz auch unter natürlichen Bedingungen vorkommt.

In einer Studie, bei der 104 DNA-bindende Proteine aus der Maus analysiert wurden, konnte gezeigt werden, dass ca. die Hälfte dieser Proteine variable Sequenzen erkennen können und sich diese durch unterschiedliche Affinitäten auszeichnen (Badis *et al.*, 2009). Eine weitere Untersuchung in der Hefe zeigte, dass auch DNA-Bindestellen, die nur mit einer geringen Affinität von Transkriptionsfaktoren erkannt werden, eine wichtige Rolle bei der Genexpression spielen (Tanay, 2006). Zudem konnte ein quantitatives Modell zur Transkriptionskontrolle im frühen *Drosophila* Embryo, welche letztendlich die Segmentierung steuert, die tatsächlich gefundenen Genexpressionsprofile mit hoher Genauigkeit vorhersagen. Auch in diesem Modell spielen sowohl Bindestellen mit hoher, als auch mit niedriger Affinität für die jeweiligen Transkriptionsfaktoren eine entscheidende Rolle (Segal *et al.*, 2008).

Solche niedrig affinen DNA-Bindestellen sind möglicherweise auch *in vivo* für die Expression von GRHL3-Zielgenen wichtig, was jedoch mit dem von uns verwendeten Reportergenkonstrukt nicht nachzustellen ist. Dennoch ermöglicht der Einsatz des

GRHL3-spezifischen Luziferase-Reporters die Identifizierung von zumindest Teilen der funktionell wichtigen Domänen.

Bei der Proteinvariante GRHL3-2 Δ biNLS ist ein mit Hilfe des Programms cNLSMapper (Kosugi *et al.*, 2009) vorhergesagtes zweiteiliges NLS deletiert. Daher ist die verringerte Transkriptionsaktivierung vermutlich darauf zurück zu führen, dass diese Mutante keine Kernlokalisierung hat, was durch Immunfluoreszenzanalysen und biochemische Fraktionierung bestätigt wurde (siehe Kap. 4.3). Ähnliches gilt auch für die Deletionsmutante GRHL3-2 Δ C, bei der die Sequenz zwischen DNA-Bindedomäne und Dimerisierungsdomäne, einschließlich der ersten 8 Aminosäuren der in GRHL3-2 Δ biNLS deletierten Region, fehlt. Daher könnte in beiden Mutanten dasselbe NLS durch die Deletion betroffen sein, wodurch keine Translokation in den Kern stattfindet und dementsprechend keine Regulation der Transkription erfolgen kann. Im Vergleich zu der Δ biNLS Mutante ist der Deletionsbereich von GRHL3-2 Δ C wesentlich größer, was bedeutet, dass hier noch andere funktionelle Bereiche enthalten sein können. Daher wurden Plasmide kloniert, die für GRHL3-2 Proteine mit kleineren Deletionen zwischen DNA-Bindedomäne und Dimerisierungsdomäne codieren.

Auch hier konnte in den durchgeführten Experimenten für keine der Deletionsmutanten (GRHL3-2 Δ C1 bis Δ C4) eine Transaktivierung des Luziferasegens nachgewiesen werden. Für die Proteinvariante GRHL3-2 Δ C4 konnte in folgenden Experimenten gezeigt werden, dass diese Mutante extranukleär ist, während die anderen drei Deletionsmutanten eine Kernlokalisierung aufwiesen (siehe Kap. 4.3). In *Drosophila* GRH wurde eine „core“ DNA Bindedomäne von Aminosäureposition 778 bis 837 identifiziert, die für eine sehr schwache DNA-Bindung ausreicht. Diese Bindung wird allerdings durch weitere 28 Aminosäuren (AS 837 bis 865), die C-Terminal zu dieser „core“ Region liegen, stabilisiert (Uv *et al.*, 1994). Die „core“ DNA Bindedomäne von GRH entspricht den Aminosäurepositionen 377 bis 442 in der GRHL3-2 Sequenz und die stabilisierende Sequenz den Aminosäuren 442 bis 461, somit liegen beide C-Terminal zu der durch Ting *et al.* postulierten DNA-Bindedomäne (Ting *et al.*, 2003b). Das lässt vermuten, dass die Deletionen in den Mutanten Δ C1 (AS 350-389), Δ C2 (AS 385-434) und Δ C3 (AS 420-459), die ebenfalls C-Terminal zu der von Ting *et al.* postulierten DNA-Bindedomäne liegen, weitere Sequenzen enthalten, die für die Interaktion mit der DNA

verantwortlich sein könnten und/oder diese stabilisieren. Um eine Aussage bezüglich der Beteiligung dieses Proteinabschnitts an der DNA-Bindung machen zu können müssten die entsprechenden Deletionsmutanten auf diese Eigenschaft untersucht werden. Dies kann *in vitro* mittels EMSA (*electrophoretic mobility shift assay*) (Hellman und Fried, 2007) erfolgen, mit dem sich auch Bindungskonstanten bestimmen lassen, wozu allerdings aufgereinigte Proteine vorliegen müssten. Alternativ könnte dies in lebenden Zellen mittels ChIP (Chromatin-Immunpräzipitation) analysiert werden. Dazu müssten die myc-getaggten GRHL3 Deletionsmutanten in Endothelzellen transfiziert werden und die anschließende Immunpräzipitation mit einem myc-Antikörper durchgeführt werden, um die Interaktion von DNA mit endogenem GRHL3 bei der Analyse ausschließen zu können. Für den Nachweis der Bindung an DNA könnten zumindest die wenigen Bindestellen in den Promotorbereichen der PTEN- und Transglutaminase 1-Gene untersucht werden.

4.3 Identifizierung des NLS

Durch die Analyse der zellulären Lokalisation der verschiedenen großflächigen Deletionsmutanten konnte der Sequenzbereich, der das NLS von GRHL3 enthalten muss, auf den Bereich zwischen DNA-Bindedomäne und Dimerisierungsdomäne eingegrenzt werden. Die Deletionsmutanten GRHL3-2 Δ C und GRHL3-2 Δ biNLS zeigten sowohl bei den Immunfluoreszenzmikroskopischen Aufnahmen, als auch bei der biochemischen Fraktionierung eine zytosolische Lokalisation. Alle anderen Deletionsmutanten (GRHL3-2 Δ A, Δ B und Δ CT) waren wie der Wildtyp im Kern lokalisiert. Da sich die Deletionen von GRHL3-2 Δ C und Δ biNLS in 8 Aminosäuren überlappen, wurde vermutet, dass dieser Bereich für die Translokation in den Zellkern eine entscheidende Rolle spielt. Jedoch ist bekannt, dass Transkriptionsfaktoren auch mehr als ein NLS enthalten können. Beispielsweise wurden für den Transkriptionsfaktor STAT3 insgesamt drei NLS-Sequenzen beschrieben, die sich in ihrem Translokationspotential unterscheiden (Bhattacharya und Schindler, 2003; Liu *et al.*, 2005; Ma *et al.*, 2003). Auch andere Transkriptionsfaktoren, wie z.B. SRY (*sex determining region Y*) und SOX9 (*SRY-box 9*) (Sudbeck und Scherer, 1997), der ETS Transkriptionsfaktor Elf3 (*E74-like factor 3*) (Do *et al.*, 2006) und Nrf2 (*nuclear factor, erythroid 2-like 2*) (Theodore *et al.*, 2008)

tragen mehr als nur ein NLS. Um auszuschließen, dass in dem in GRHL3-2 Δ C deletierten Abschnitt weitere NLS Sequenzen liegen, wurden Deletionsmutanten (GRHL3-2 Δ C1 bis Δ C4) mit kleineren Deletion zwischen DNA-Bindedomäne und Dimerisierungsdomäne kloniert. Bei den Immunfluoreszenzmikroskopischen Aufnahmen der Mutanten Δ C1 bis Δ C3 zeigte sich, wie beim GRHL3-2 Wildtyp eine Kernlokalisierung, weswegen für diese GRHL3 Varianten keine biochemische Fraktionierung durchgeführt wurde. Im Gegensatz dazu zeigte die Lokalisationsanalyse der Deletionsmutante GRHL3-2 Δ C4 sowohl bei der Immunfluoreszenzfärbung, als auch bei der biochemischen Fraktionierung keine Kernlokalisierung. Da die Deletion von GRHL3-2 Δ C4 dem 3'-Ende der Deletion von GRHL3-2 Δ C entspricht, wurde die Vermutung erhärtet, dass sich das NLS in dem Überlappungsbereich der Mutanten GRHL3-2 Δ biNLS und GRHL3-2 Δ C bzw. Δ C4 befindet. Dieser Sequenzabschnitt mit der Aminosäureabfolge RLPLKRTC (AS 485 bis 492) enthält insgesamt drei basische Aminosäuren an den Positionen R485, L489 und R490, von denen vermutet wurde, dass sie das NLS darstellen.

Im Allgemeinen werden NLS-Sequenzen als die kleinstmöglichen Sequenzen, die für eine Kernlokalisierung notwendig sind, definiert und bestehen vorwiegend aus basischen Aminosäuren. Viele der Kernproteine tragen eines der klassischen NLS-Sequenzen (einteilig oder zweiteilig). Die klassischen Prototypen sind für einteilige NLS die des „*simian virus 40 large T-antigen*“ aus einem Cluster von basischen Aminosäuren (PKKKRKV) (Kalderon *et al.*, 1984) oder für zweiteilige NLS die des Nucleoplasmins aus zwei basischen Clustern, die durch eine Sequenz von 10 bis 12 Aminosäuren voneinander getrennt sind (KRPAATKKAGQAKKKK) (Robbins *et al.*, 1991). Diese sind häufig von den Aminosäuren Prolin oder Glycin flankiert. Neben diesen klassischen Sequenzen können aber auch starke Variationen auftreten (Marfori *et al.*, 2011), wie z.B. das hydrophobe NLS der Phospholipid Scramblase 1 mit der Aminosäureabfolge GKISKHW, das dennoch Analogien zu anderen einteiligen NLS-Sequenzen aufweist (Chen *et al.*, 2005).

Obwohl für den Deletionsbereich von GRHL3-2 Δ biNLS ein zweiteiliges NLS mit dem Programm cNLSMapper vorhergesagt wurde, die Deletionsmutante Δ C4 aber auch im Zytosol lokalisiert ist, ist es sehr wahrscheinlich, dass die drei basischen Aminosäuren im Überlappungsbereich der beiden Mutanten für die Translokation in den Kern verantwortlich sind. Zur Überprüfung der Hypothese wurde ein

Expressionsplasmid für eine Substitutionsmutante (GRHL3-2 R485E/K489E/R490D) kloniert, bei der diese basischen Aminosäuren gegen saure ausgetauscht wurden. Beide Lokalisationsanalysen (Immunfluoreszenzfärbung und biochemische Fraktionierung) bestätigten, dass die Substitution dieser drei Aminosäuren für eine exklusive Lokalisation im Zytoplasma ausreicht. Das somit identifizierte NLS entspricht zwar nicht dem vorhergesagten zweiteiligen NLS, jedoch wurde bestätigt, dass ein Teil dieser Sequenz für die Kernlokalisierung verantwortlich ist. Da es sich hierbei um ein Cluster von basischen Aminosäuren handelt kann das NLS von GRHL3 zu der Gruppe der einteiligen NLS gezählt werden. Im Vergleich zu dem NLS aus SV40 mit insgesamt fünf basischen Aminosäuren, besteht die Sequenz bei GRHL3 nur aus drei basischen Aminosäuren, die allerdings das typische KR-Motif an den Aminosäureposition 489 und 490 enthalten. Außerdem ist innerhalb dieser Sequenz ein Prolin an Position 487, was ebenfalls ein Charakteristikum vieler NLSs ist.

Weiterhin ist bei jeder biochemischen Fraktionierung nachweisbar, dass das nukleäre GRHL3-2 eine höhere molekulare Masse aufweist, weil es in der SDS-PAGE langsamer läuft als das zytosolische GRHL3-2. Diese Beobachtung kann auf eine posttranslationale Modifikation hindeuten, die möglicherweise die Translokation in den Kern auslöst. Dies soll nun durch 2D Gelelektrophorese und anschließender massenspektrometrischer Analyse untersucht werden.

4.4 Einfluss GRHL3 auf die Apoptose von Endothelzellen

In den durchgeführten Experimenten wurde gezeigt, dass die Überexpression von GRHL3-1 in Endothelzellen die Apoptoserate reduziert, während GRHL3-3 keinen Effekt hat. Zudem wurde nachgewiesen, dass genau wie bei GRHL3-2 die Behandlung von Endothelzellen mit dem eNOS Inhibitor L-NAME den antiapoptotischen Effekt bei der Überexpression von GRHL3-1 komplett aufhebt. Der antiapoptotische Mechanismus, der dieser Beobachtung zu Grunde liegt, ist vermutlich derselbe wie bei Isoform 2 über die Aktivierung der eNOS und der damit verbundenen NO-Produktion. Für GRHL3-2 ist ein positiver Rückkopplungsmechanismus zwischen der Expression des Transkriptionsfaktors und NO bekannt. So erhöhen physiologische NO-Konzentrationen die GRHL3-2

Expression und GRHL3-2 wiederum erhöht bei Überexpression die Menge an S-nitrosierten Proteinen durch eine verstärkte Phosphorylierung und damit Aktivierung der Enzyme Akt1 und eNOS (Lukosz *et al.*, 2011). Dieser Mechanismus trifft sehr wahrscheinlich auch auf GRHL3-1 zu, da hier die GRHL3-1 mRNA Mengen ebenfalls durch physiologische NO-Konzentrationen erhöht werden (Haendeler *et al.*, 2013). Zudem kommt es auch zu einer verstärkten Aktivierung der Akt1 und eNOS.

Die Aktivierung von eNOS über den PI3K/Akt Signalweg in Endothelzellen ist dafür bekannt eine in Bezug auf Apoptose protektive Funktionen zu haben (Shiojima und Walsh, 2002). Die Protein Kinase Akt1 wird durch den Masterregulator aller Akt Isoformen (Akt2) aktiviert. Für die Akt2 wurde gezeigt, dass diese unter hypoxischen Bedingungen die Phosphatase PTEN über die miRNA-21 herunterreguliert (Polytarchou *et al.*, 2011). Durch die verringerte Konzentration der PTEN, als negativer Regulator des PI3K/Akt Signalweges (Stambolic *et al.*, 1998), wird die Phosphorylierung und damit die Aktivierung aller Akt-Isoformen erhöht, was wiederum die Angiogenese stimuliert und die Zellen vor Apoptose schützt. In unseren Microarray Analysen wurde Akt2 als Zielgen von GRHL3-1 identifiziert und die Expressionsanalyse hat gezeigt, dass Akt2 bei Überexpression des Transkriptionsfaktors hochreguliert wird (Haendeler *et al.*, 2013). Diese Beobachtung kann erklären warum bei der Überexpression von GRHL3-1 eine verstärkte Phosphorylierung der Akt1 und eNOS nachgewiesen wurde. Die verstärkte Aktivierung dieser beiden Enzyme resultiert in einer gesteigerten Produktion des protektiven Signalmoleküls NO (Sessa, 2004), das auf unterschiedlichen Wegen antiapoptotisch wirkt. Zum einen Inhibiert NO durch S-Nitrosierung des Cys-163 im aktiven Zentrum der zentralen Effektor Caspase 3 die Induktion der Apoptose (Dimmeler *et al.*, 1997; Haendeler *et al.*, 1997) zum anderen erhöht es durch S-Nitrosierung des Cys-69 im Trx-1 die Aktivität dieses Redox-regulatorischen Proteins, das in Endothelzellen antiapoptotisch wirkt (Haendeler *et al.*, 2002). Zusätzlich kann das NO von Cys-73 im Trx-1 in einer Transnitrosierungsreaktion auf die Caspase 3 übertragen werden (Mitchell und Marletta, 2005). Ein weiterer durch NO-vermittelter Mechanismus kann über die Stabilisierung des antiapoptotischen Proteins BCL-2 erfolgen. Dies geschieht zum einen direkt durch S-Nitrosierung (Azad *et al.*, 2006) und zum anderen indirekt durch Destabilisierung der MAP Kinase Phosphatase-3 (MKP-3) (Rossig *et al.*, 2000). MKP-3 inaktiviert durch Dephosphorylierung die MAP

Kinase ERK1/2, die wiederum das Protein BCL-2 durch Phosphorylierung vor einer proteasomalen Degradation schützt (Dimmeler *et al.*, 1999a).

Weiterhin konnte ich nachweisen, dass GRHL3-1 nach Überexpression in Endothelzellen die Expression des antiapoptotischen Proteins BCL-X_L erhöht, während GRHL3-3 keinen Einfluss auf die Expression hat. BCL-X_L ist neben BCL-2 eines der wichtigsten antiapoptotischen Familienmitglieder der BCL-2 Familie, die die Mitochondrienmembran stabilisieren und darüber die Freisetzung von Cytochrom C aus dem Intermembranraum der Mitochondrien und somit die Induktion der Apoptose verhindern. Die erhöhten BCL-X_L Level die bei Überexpression von GRHL3-1 zu beobachten sind, scheinen nicht auf einer Erhöhung der Transkriptmenge zu beruhen, da BCL-X_L in unserer Microarray Analyse nicht unter den regulierten RNAs erscheint (Haendeler *et al.*, 2013). Somit könnte die erhöhte Proteinmenge nach GRHL3-1 Überexpression auf einer Stabilisierung des Proteins beruhen, was im Licht der Befunde, dass die antiapoptotische Kapazität der Proteine der BCL-2 Familie hauptsächlich auf deren Stabilität beruht (Rooswinkel *et al.*, 2014), durchaus möglich erscheint. Allerdings sind aus der Microarray Analyse keine Hinweise zu entnehmen, welche der GRHL3-1 regulierten Proteine an einer derartigen Stabilisierung beteiligt sein könnten. Nichtsdestotrotz liefert diese Analyse zumindest einen indirekten Hinweis, dass es vielleicht doch zu einer Expressionsveränderung von BCL-X_L kommen könnte, die in den Microarrays nicht erfasst wurde. Eines der nach Überexpression von GRHL3-1 hochregulierten Transkripte war das von Gas6 (*growth arrest specific 6*), einem Liganden der TAM (Tyro3-Axl-Mer) Rezeptor-Tyrosinkinase Subfamilie. Es war gezeigt worden, dass die Gas6-Axl-Achse das Überleben von Endothelzellen positiv beeinflusst (Hasanbasic *et al.*, 2004; Healy *et al.*, 2001). Zudem gibt es aus einem anderen Zelltyp einen Hinweis, über welchen Mechanismus Gas6 zur Hochregulation von BCL-X_L beitragen kann. In Fibroblasten der Maus wurde gezeigt, dass Gas6 den Transkriptionsfaktor NF-κB aktiviert und darüber die BCL-X_L Expression erhöht (Demarchi *et al.*, 2001).

Bei der Analyse der Apoptoserate in Endothelzellen nach Überexpression der extranukleären Deletionsmutanten GRHL3-2ΔC4 und GRHL3-2ΔbiNLS konnte gezeigt werden, dass beide nicht mehr wie das Wildtyp-Protein antiapoptotisch wirken. Da es sich wie bereits erwähnt um extrazelluläre Proteinvarianten handelt, muss die Aufhebung des Apoptoseschutzes dadurch bedingt sein, dass diese Mutanten nicht mehr in den Kern transloziert werden und somit nicht mehr die

Transkription von Zielgenen im Kern aktivieren bzw. regulieren können. Da Deletionen einen Einfluss auf die Tertiärstruktur und somit auf die Aktivität eines Proteins haben können, konnte nicht vollständig davon ausgegangen werden, dass dieser Effekt ausschließlich durch die Lokalisation im Zytoplasma hervorgerufen wird. Daher wurde die Apoptosemessung nach Identifizierung des NLS mit dem mutierten Protein GRHL3-2 R485E/K489E/R490D wiederholt. Die Messung der Apoptoserate nach Überexpression der Substitutionsmutante in Endothelzellen bestätigte die zuvor gemachten Beobachtungen. Alleine der Austausch dieser drei basischen Aminosäuren führte im Vergleich zum Wildtyp-Protein zu einer signifikant gesteigerten Apoptose in Endothelzellen, wodurch gezeigt wurde, dass die antiapoptotische Funktion von der Kernlokalisierung abhängig ist. Wie zuvor beschrieben, wurden mehrere Kandidaten als potentielle Zielgene diskutiert, die für den Schutz vor Apoptose verantwortlich sind.

Abschließend zeigen die Ergebnisse dieser Arbeit, dass GRHL3 ein bisher unbekannter Regulator der Endothelzellfunktion ist. Aufgrund der großen Anzahl an potentiellen Zielgenen eines Transkriptionsfaktors wie GRHL3, hat dieser pleiotrope Effekte und eignet sich somit nicht als Ziel eines therapeutischen Ansatzes. Allerdings könnten einige der Zielgene möglicherweise diesen Kriterien genügen.

4.5 Ausblick

Die zuvor beschriebenen Ergebnisse, machen deutlich, dass die verschiedenen GRHL3 Isoformen durch die Aktivierung unterschiedlicher Zielgene anti- bzw. proapoptotisch wirken und dass diese Effekte von der Kernlokalisierung abhängig sind. Da neben der Apoptose auch die Zellmigration eine entscheidende Rolle für die Integrität der Endothelzellschicht spielt, soll in folgenden Experimenten untersucht werden, ob auch diese von der Kernlokalisierung und den damit verbundenen Transkriptomveränderungen abhängt.

Da bei den extranukleären GRHL3-2 Mutanten zum Teil eine vermehrte Lokalisation an der Plasmamembran beobachtet wurde, ist es möglich, dass GRHL3 weitere Funktionen im Endothel hat, die nicht von der Kernlokalisierung abhängig sind, was in weiteren funktionellen Analysen abgeklärt werden muss.

Weiterhin wurde bei den biochemischen Fraktionierungen das GRHL3-2 Protein in der nukleären Fraktion bei einer höheren molekularen Masse detektiert als in der zytosolischen Fraktion, was auf mögliche posttranslationale Modifikationen hindeutet. Bei vielen Transkriptionsfaktoren ist bekannt, dass diese z.B. durch Phosphorylierung aktiviert werden. Um zu analysieren, ob ein solcher Mechanismus auch bei GRHL3 vorkommt, soll im Weiteren untersucht werden, ob GRHL3 phosphoryliert wird und wenn ja, an welchen Aminosäurepositionen die Phosphorylierung stattfindet und ob diese einen Einfluss auf die Translokation in den Zellkern hat.

Die räumliche und zeitliche Dynamik von posttranslationalen Modifikationen ist Bestandteil von komplexen Signalkaskaden, die häufig durch externe Stimuli eingeschaltet oder reprimiert werden. Um herauszufinden, über welche Signale das Verhältnis der GRHL3 Isoformen verschoben werden kann, sollen für die Endothelzellularfunktion relevante Stimuli, z.B. Acetylcholin, oxidiertes *low density* Lipoprotein und Tumornekrosefaktor alpha untersucht werden.

5 Zusammenfassung

Kardiovaskuläre Alterung und kardiovaskuläre Erkrankungen gehen einher mit dem Auftreten endothelialer Dysfunktion. Diese ist gekennzeichnet durch eine verringerte Migrationsfähigkeit, eine erhöhte Apoptosesensitivität und eine verminderte NO-Bioverfügbarkeit der Endothelzellen. In unserer Arbeitsgruppe konnte für den Transkriptionsfaktor Grainyhead-like 3-2 (GRHL3-2) gezeigt werden, dass dieser promigratorisch und antiapoptotisch wirkt und die NO-Bioverfügbarkeit im Endothel erhöht. Das menschliche Genom kodiert für insgesamt drei verschiedene GRHL3 Isoformen, die im humanen Endothel koexprimiert sind. Daher wurden die Funktionen der anderen Isoformen, GRHL3-1 und GRHL3-3 genauer untersucht. Für GRHL3-1 – ähnlich wie für GRHL3-2 eine promigratorische Wirkung nachgewiesen, während GRHL3-3 die Migration hemmt. Ziel meiner Arbeit war es den Einfluss dieser beiden Isoformen auf die Apoptose zu untersuchen. Zudem sollte nachgewiesen werden welche Rolle die Kernlokalisierung und damit die Transkriptionsfaktorfunktion von GRHL3 spielt. Ich konnte zunächst nachweisen, dass GRHL3-1 antiapoptotisch wirkt, während GRHL3-3 eine proapoptotische Funktion hat. Wobei der antiapoptotische Effekt von GRHL3-1, vergleichbar mit Isoform 2 von der eNOS Aktivität abhängig ist. Als einen weiteren antiapoptotischen Mechanismus wurde gezeigt, dass GRHL3-1 die Expression des antiapoptotischen Proteins BCL-X_L erhöht. Weiterhin konnte ich zeigen, dass die antiapoptotische Wirkung von GRHL3 von der Kernlokalisierung und somit von seiner Funktion als Transkriptionsfaktor abhängig ist. Durch die Klonierung verschiedener GRHL3 Deletions- und Substitutionsmutanten, konnte neben der Identifizierung der NLS Sequenz (⁴⁸⁵RLPLKR⁴⁹⁰) weitere funktionelle Domänen identifiziert werden, die für Transkriptionsaktivierung erforderlich sind. Zudem wurde gezeigt, dass die durch Ting *et al.* vorhergesagte Dimerisierungsdomäne keinen Einfluss auf die Apoptoseprotektion hat.

Zusammenfassend konnten in dieser Doktorarbeit zum ersten Mal die Funktionen der Isoformen 1 und 3 bei der Apoptose näher charakterisiert werden und ein Zusammenhang zwischen dem antiapoptotischen Effekt und der Kernlokalisierung hergestellt werden. Zudem konnte das Kernlokalisierungssignal in GRHL3 identifiziert werden. Die Aufklärung der protektiven Wirkmechanismen von GRHL3 kann möglicherweise langfristig für eine Protektion des Endothels eingesetzt werden.

Summary

Aging and cardiovascular diseases are accompanied by endothelial dysfunction, which is characterized by a reduced migratory capacity, increased apoptosis sensitivity and a reduced NO bioavailability. In our group, we demonstrated that the transcription factor Grainyhead-like 3-2 (GRHL3-2) acts promigratory and antiapoptotic and increases NO bioavailability in endothelial cells. The human genome encodes three isoforms, which are all coexpressed in the endothelium. Therefore, the functions of the two other isoforms, namely GRHL3-1 and GRHL3-3, were analyzed in depth. GRHL3-1 acts promigratory, whereas GRHL3-3 inhibits migration. Therefore, the aim of my PhD thesis was to investigate the function of isoform 1 and 3 in endothelial cell apoptosis and whether the nuclear localization and, thus, the transcription factor activity plays a role. I have shown that GRHL3-1 acts antiapoptotic, whereas GRHL3-3 increases apoptosis. In addition, I have demonstrated that the antiapoptotic effect of GRHL3-1 - similar to GRHL3-2 - depends on eNOS activation. As one potential antiapoptotic mechanism I have shown that the protein levels of antiapoptotic protein BCL-X_L are increased by GRHL3-1. Furthermore, I could show that the antiapoptotic effect of GRHL3 is dependent on its nuclear localization and on its functions as a transcription factor. By cloning different deletion and substitution mutants, I have identified the NLS (⁴⁸⁵RLPLKR⁴⁹⁰) and additional functional domains, which are required for transcriptional activation. Moreover, the dimerization domain predicted by Ting *et al.* is not required for apoptosis protection by GRHL3.

Taken together, I characterized for the first time the opposite functions of isoform 1 and 3 on apoptosis and demonstrated the relationship between apoptosis protection and nuclear localization. Moreover, I identified the nuclear localization signal within GRHL3.

Thus, elucidating the protective signaling pathways induced by GRHL3 could potentially be used to protect the endothelium from damage.

6 Publikationen mit Bezug zur Dissertation

Farrokh S.*, Brillen A.L.*, Haendeler J., Altschmied J. und Schaal H. 2015. Critical Regulators of Endothelial Cell Functions: For a Change Being Alternative. *Antioxid Redox Signal*, 22, 1212-1229. (*Autoren zu gleichen Teilen am Manuskript beteiligt)

Haendeler J., Mlynek A., Büchner N., Lukosz M., Graf M., Guettler C., Jakob S., **Farrokh S.**, Kunze K., Goy C., Guardiola-Serrano F., Schaal H., Cortese-Krott M., Deenen R., Köhrer K., Winkler C. und Altschmied J. 2013. Two isoforms of Sister-Of-Mammalian Grainyhead have opposing functions in endothelial cells and in vivo. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 33,1639-1646.

Farrokh S., Ale-Agha N., Haendeler J. und Altschmied J. 2013. Defining Domains In The Transcription Factor Grainyhead-like 3 Required For Protective Functions In The Endothelium. *Circ Res* 113 suppl. 234

Altschmied J., Büchner N., Jakob S., **Farrokh S.**, Goy C., Schaal H. und Haendeler J. 2013. Opposing Functions of Two Splice Variants of the Human Transcription Factor Grainyhead-like 3 in Endothelial Cells And in vivo. *Circ Res* 113 suppl. 267

7 Literaturverzeichnis

- Aaronson D. S. und Horvath C. M. 2002. A road map for those who don't know JAK-STAT. *Science*, 296, 1653-5.
- Alp N. J. und Channon K. M. 2004. Regulation of endothelial nitric oxide synthase by tetrahydrobiopterin in vascular disease. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 24, 413-20.
- Altschmied J. und Haendeler J. 2009. Thioredoxin-1 and endothelial cell aging: role in cardiovascular diseases. *Antioxid Redox Signal*, 11, 1733-40.
- Altschul S. F., Madden T. L., Schaffer A. A., Zhang J., Zhang Z., Miller W. und Lipman D. J. 1997. Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. *Nucleic Acids Res*, 25, 3389-402.
- Amati B. und Land H. 1994. Myc-Max-Mad: a transcription factor network controlling cell cycle progression, differentiation and death. *Curr Opin Genet Dev*, 4, 102-8.
- Amoutzias G. D., Robertson D. L., Van De Peer Y. und Oliver S. G. 2008. Choose your partners: dimerization in eukaryotic transcription factors. *Trends Biochem Sci*, 33, 220-9.
- Angel P. und Karin M. 1991. The role of Jun, Fos and the AP-1 complex in cell-proliferation and transformation. *Biochim Biophys Acta*, 1072, 129-57.
- Antonsson B., Montessuit S., Lauper S., Eskes R. und Martinou J. C. 2000. Bax oligomerization is required for channel-forming activity in liposomes and to trigger cytochrome c release from mitochondria. *Biochem J*, 345 Pt 2, 271-8.
- Antonsson B., Montessuit S., Sanchez B. und Martinou J. C. 2001. Bax is present as a high molecular weight oligomer/complex in the mitochondrial membrane of apoptotic cells. *J Biol Chem*, 276, 11615-23.
- Asai K., Kudej R. K., Shen Y. T., Yang G. P., Takagi G., Kudej A. B., Geng Y. J., Sato N., Nazareno J. B., Vatner D. E., Natividad F., Bishop S. P. und Vatner S. F. 2000. Peripheral vascular endothelial dysfunction and apoptosis in old monkeys. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 20, 1493-9.
- Ashkenazi A. und Dixit V. M. 1998. Death receptors: signaling and modulation. *Science*, 281, 1305-8.
- Attardi L. D. und Tjian R. 1993. Drosophila tissue-specific transcription factor NTF-1 contains a novel isoleucine-rich activation motif. *Genes Dev*, 7, 1341-53.
- Azad N., Vallyathan V., Wang L., Tantishaiyakul V., Stehlik C., Leonard S. S. und Rojanasakul Y. 2006. S-nitrosylation of Bcl-2 inhibits its ubiquitin-proteasomal degradation. A novel antiapoptotic mechanism that suppresses apoptosis. *J Biol Chem*, 281, 34124-34.
- Badis G., Berger M. F., Philippakis A. A., Talukder S., Gehrke A. R., Jaeger S. A., Chan E. T., Metzler G., Vedenko A., Chen X., Kuznetsov H., Wang C. F., Coburn D., Newburger D. E., Morris Q., Hughes T. R. und Bulyk M. L. 2009. Diversity and complexity in DNA recognition by transcription factors. *Science*, 324, 1720-3.
- Bae Y. S., Oh H., Rhee S. G. und Yoo Y. D. 2011. Regulation of reactive oxygen species generation in cell signaling. *Mol Cells*, 32, 491-509.
- Baker S. J. und Reddy E. P. 1998. Modulation of life and death by the TNF receptor superfamily. *Oncogene*, 17, 3261-70.
- Barchowsky A., Frleta D. und Vincenti M. P. 2000. Integration of the NF-kappaB and mitogen-activated protein kinase/AP-1 pathways at the collagenase-1

- promoter: divergence of IL-1 and TNF-dependent signal transduction in rabbit primary synovial fibroblasts. *Cytokine*, 12, 1469-79.
- Bedard K. und Krause K. H. 2007. The NOX family of ROS-generating NADPH oxidases: physiology and pathophysiology. *Physiol Rev*, 87, 245-313.
- Beg A. A., Ruben S. M., Scheinman R. I., Haskill S., Rosen C. A. und Baldwin A. S., Jr. 1992. I kappa B interacts with the nuclear localization sequences of the subunits of NF-kappa B: a mechanism for cytoplasmic retention. *Genes Dev*, 6, 1899-913.
- Bhattacharya S. und Schindler C. 2003. Regulation of Stat3 nuclear export. *J Clin Invest*, 111, 553-9.
- Blanco F. J. und Bernabeu C. 2011. Alternative splicing factor or splicing factor-2 plays a key role in intron retention of the endoglin gene during endothelial senescence. *Aging Cell*, 10, 896-907.
- Blanco F. J. und Bernabeu C. 2012. The Splicing Factor SRSF1 as a Marker for Endothelial Senescence. *Front Physiol*, 3, 54.
- Blanco F. J., Grande M. T., Langa C., Ojso B., Velasco S., Rodriguez-Barbero A., Perez-Gomez E., Quintanilla M., Lopez-Novoa J. M. und Bernabeu C. 2008. S-endoglin expression is induced in senescent endothelial cells and contributes to vascular pathology. *Circ Res*, 103, 1383-92.
- Blanco F. J., Santibanez J. F., Guerrero-Esteo M., Langa C., Vary C. P. und Bernabeu C. 2005. Interaction and functional interplay between endoglin and ALK-1, two components of the endothelial transforming growth factor-beta receptor complex. *J Cell Physiol*, 204, 574-84.
- Bloch K. D. 1999. Regulation of endothelial NO synthase mRNA stability: RNA-binding proteins crowd on the 3'-untranslated region. *Circ Res*, 85, 653-5.
- 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, 248-54.
- Bray S. J. und Kafatos F. C. 1991. Developmental function of Elf-1: an essential transcription factor during embryogenesis in *Drosophila*. *Genes Dev*, 5, 1672-83.
- Brazil D. P., Park J. und Hemmings B. A. 2002. PKB binding proteins. Getting in on the Akt. *Cell*, 111, 293-303.
- Burnette W. N. 1981. "Western blotting": electrophoretic transfer of proteins from sodium dodecyl sulfate--polyacrylamide gels to unmodified nitrocellulose and radiographic detection with antibody and radioiodinated protein A. *Anal Biochem*, 112, 195-203.
- 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. und Jane S. M. 2010. Epidermal wound repair is regulated by the planar cell polarity signaling pathway. *Dev Cell*, 19, 138-47.
- Chen M. H., Ben-Efraim I., Mitrousis G., Walker-Kopp N., Sims P. J. und Cingolani G. 2005. Phospholipid scramblase 1 contains a nonclassical nuclear localization signal with unique binding site in importin alpha. *J Biol Chem*, 280, 10599-606.
- Chen Z., Hagler J., Palombella V. J., Melandri F., Scherer D., Ballard D. und Maniatis T. 1995. Signal-induced site-specific phosphorylation targets I kappa B alpha to the ubiquitin-proteasome pathway. *Genes Dev*, 9, 1586-97.
- Chinnaiyan A. M., O'rourke K., Tewari M. und Dixit V. M. 1995. FADD, a novel death domain-containing protein, interacts with the death domain of Fas and initiates apoptosis. *Cell*, 81, 505-12.

- Chomczynski P. und Sacchi N. 1987. Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Anal Biochem*, 162, 156-9.
- Chou T. C., Yen M. H., Li C. Y. und Ding Y. A. 1998. Alterations of nitric oxide synthase expression with aging and hypertension in rats. *Hypertension*, 31, 643-8.
- Cote G. J., Zhu W., Thomas A., Martin E., Murad F. und Sharina I. G. 2012. Hydrogen peroxide alters splicing of soluble guanylyl cyclase and selectively modulates expression of splicing regulators in human cancer cells. *PLoS One*, 7, e41099.
- Darido C., Georgy S. R., Wilanowski T., Dworkin S., Auden A., Zhao Q., Rank G., Srivastava S., Finlay M. J., Papenfuss A. T., Pandolfi P. P., Pearson R. B. und Jane S. M. 2011. Targeting of the tumor suppressor GRHL3 by a miR-21-dependent proto-oncogenic network results in PTEN loss and tumorigenesis. *Cancer Cell*, 20, 635-48.
- Demarchi F., Verardo R., Varnum B., Brancolini C. und Schneider C. 2001. Gas6 anti-apoptotic signaling requires NF-kappa B activation. *J Biol Chem*, 276, 31738-44.
- Dimmeler S., Breitschopf K., Haendeler J. und Zeiher A. M. 1999a. Dephosphorylation targets Bcl-2 for ubiquitin-dependent degradation: a link between the apoptosome and the proteasome pathway. *J Exp Med*, 189, 1815-22.
- Dimmeler S., Fleming I., Fisslthaler B., Hermann C., Busse R. und Zeiher A. M. 1999b. Activation of nitric oxide synthase in endothelial cells by Akt-dependent phosphorylation. *Nature*, 399, 601-5.
- Dimmeler S., Haendeler J., Nehls M. und 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, 601-7.
- Do H. J., Song H., Yang H. M., Kim D. K., Kim N. H., Kim J. H., Cha K. Y. und Chung H. M. 2006. Identification of multiple nuclear localization signals in murine Elf3, an ETS transcription factor. *FEBS Lett*, 580, 1865-71.
- Dumitrescu C., Biondi R., Xia Y., Cardounel A. J., Druhan L. J., Ambrosio G. und Zweier J. L. 2007. Myocardial ischemia results in tetrahydrobiopterin (BH4) oxidation with impaired endothelial function ameliorated by BH4. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 104, 15081-6.
- Farrokh S., Brillen A. L., Haendeler J., Altschmied J. und Schaal H. 2015. Critical Regulators of Endothelial Cell Functions: For a Change Being Alternative. *Antioxid Redox Signal*, 22, 1212-1229.
- Fearon I. M. und Faux S. P. 2009. Oxidative stress and cardiovascular disease: novel tools give (free) radical insight. *J Mol Cell Cardiol*, 47, 372-81.
- Frankel A. D. und Kim P. S. 1991. Modular structure of transcription factors: implications for gene regulation. *Cell*, 65, 717-9.
- Furchgott R. F. und Zawadzki J. V. 1980. The obligatory role of endothelial cells in the relaxation of arterial smooth muscle by acetylcholine. *Nature*, 288, 373-6.
- Gilmore T. D. 2006. Introduction to NF-kappaB: players, pathways, perspectives. *Oncogene*, 25, 6680-4.
- Gonzalez-Garcia M., Perez-Ballesteros R., Ding L., Duan L., Boise L. H., Thompson C. B. und Nunez G. 1994. bcl-XL is the major bcl-x mRNA form expressed during murine development and its product localizes to mitochondria. *Development*, 120, 3033-42.

- Goy C., Czypiorski P., Altschmied J., Jakob S., Rabanter L. L., Brewer A. C., Ale-Agha N., Dyballa-Rukes N., Shah A. M. und Haendeler J. 2014. The imbalanced redox status in senescent endothelial cells is due to dysregulated Thioredoxin-1 and NADPH oxidase 4. *Exp Gerontol*, 56, 45-52.
- Graham F. L., Smiley J., Russell W. C. und Nairn R. 1977. Characteristics of a human cell line transformed by DNA from human adenovirus type 5. *J Gen Virol*, 36, 59-74.
- Grandori C., Cowley S. M., James L. P. und Eisenman R. N. 2000. The Myc/Max/Mad network and the transcriptional control of cell behavior. *Annu Rev Cell Dev Biol*, 16, 653-99.
- Green D. und Kroemer G. 1998. The central executioners of apoptosis: caspases or mitochondria? *Trends Cell Biol*, 8, 267-71.
- Guardiola-Serrano F., Haendeler J., Lukosz M., Sturm K., Melchner H. und Altschmied J. 2008. Gene trapping identifies a putative tumor suppressor and a new inducer of cell migration. *Biochem Biophys Res Commun*, 376, 748-52.
- Gupta S. 2001. Molecular steps of death receptor and mitochondrial pathways of apoptosis. *Life Sci*, 69, 2957-64.
- Haendeler J., Hoffmann J., Tischler V., Berk B. C., Zeiher A. M. und Dimmeler S. 2002. Redox regulatory and anti-apoptotic functions of thioredoxin depend on S-nitrosylation at cysteine 69. *Nat Cell Biol*, 4, 743-9.
- Haendeler J., Mlynek A., Buchner N., Lukosz M., Graf M., Guettler C., Jakob S., Farrokh S., Kunze K., Goy C., Guardiola-Serrano F., Schaal H., Cortese-Krott M., Deenen R., Kohrer K., Winkler C. und Altschmied J. 2013. Two isoforms of Sister-Of-Mammalian Grainyhead have opposing functions in endothelial cells and in vivo. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 33, 1639-46.
- Haendeler J., Weiland U., Zeiher A. M. und Dimmeler S. 1997. Effects of redox-related congeners of NO on apoptosis and caspase-3 activity. *Nitric Oxide*, 1, 282-93.
- Hai T. und Curran T. 1991. Cross-family dimerization of transcription factors Fos/Jun and ATF/CREB alters DNA binding specificity. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 88, 3720-4.
- Hanahan D. 1983. Studies on transformation of Escherichia coli with plasmids. *J Mol Biol*, 166, 557-80.
- Hang X., Li P., Li Z., Qu W., Yu Y., Li H., Shen Z., Zheng H., Gao Y., Wu Y., Deng M., Sun Z. und Zhang C. 2009. Transcription and splicing regulation in human umbilical vein endothelial cells under hypoxic stress conditions by exon array. *BMC Genomics*, 10, 126.
- Hanschmann E. M., Godoy J. R., Berndt C., Hudemann C. und Lillig C. H. 2013. Thioredoxins, glutaredoxins, and peroxiredoxins--molecular mechanisms and health significance: from cofactors to antioxidants to redox signaling. *Antioxid Redox Signal*, 19, 1539-605.
- Harper S. J. und Bates D. O. 2008. VEGF-A splicing: the key to anti-angiogenic therapeutics? *Nat Rev Cancer*, 8, 880-7.
- Harrison M. M., Botchan M. R. und Cline T. W. 2010. Grainyhead and Zelda compete for binding to the promoters of the earliest-expressed Drosophila genes. *Dev Biol*, 345, 248-55.
- Hasanbasic I., Cuerquis J., Varnum B. und Blostein M. D. 2004. Intracellular signaling pathways involved in Gas6-Axl-mediated survival of endothelial cells. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 287, H1207-13.

- Healy A. M., Schwartz J. J., Zhu X., Herrick B. E., Varnum B. und Farber H. W. 2001. Gas 6 promotes Axl-mediated survival in pulmonary endothelial cells. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*, 280, L1273-81.
- Hellman L. M. und Fried M. G. 2007. Electrophoretic mobility shift assay (EMSA) for detecting protein-nucleic acid interactions. *Nat Protoc*, 2, 1849-61.
- Hess J., Angel P. und Schorpp-Kistner M. 2004. AP-1 subunits: quarrel and harmony among siblings. *J Cell Sci*, 117, 5965-73.
- Higuchi Y., Mctiernan C. F., Frye C. B., McGowan B. S., Chan T. O. und Feldman A. M. 2004. Tumor necrosis factor receptors 1 and 2 differentially regulate survival, cardiac dysfunction, and remodeling in transgenic mice with tumor necrosis factor-alpha-induced cardiomyopathy. *Circulation*, 109, 1892-7.
- Hoffmann J., Haendeler J., Aicher A., Rossig L., Vasa M., Zeiher A. M. und Dimmeler S. 2001. Aging enhances the sensitivity of endothelial cells toward apoptotic stimuli: important role of nitric oxide. *Circ Res*, 89, 709-15.
- Hu X. und Lazar M. A. 2000. Transcriptional repression by nuclear hormone receptors. *Trends Endocrinol Metab*, 11, 6-10.
- Jaffe E. A., Nachman R. L., Becker C. G. und Minick C. R. 1973. Culture of human endothelial cells derived from umbilical veins. Identification by morphologic and immunologic criteria. *J Clin Invest*, 52, 2745-56.
- Juo P., Woo M. S., Kuo C. J., Signorelli P., Biemann H. P., Hannun Y. A. und Blenis J. 1999. FADD is required for multiple signaling events downstream of the receptor Fas. *Cell Growth Differ*, 10, 797-804.
- Kalderon D., Roberts B. L., Richardson W. D. und Smith A. E. 1984. A short amino acid sequence able to specify nuclear location. *Cell*, 39, 499-509.
- Klagsbrun M. und D'amore P. A. 1996. Vascular endothelial growth factor and its receptors. *Cytokine Growth Factor Rev*, 7, 259-70.
- Klemm J. D., Schreiber S. L. und Crabtree G. R. 1998. Dimerization as a regulatory mechanism in signal transduction. *Annu Rev Immunol*, 16, 569-92.
- Koopman G., Reutelingsperger C. P., Kuijten G. A., Keehnen R. M., Pals S. T. und Van Oers M. H. 1994. Annexin V for flow cytometric detection of phosphatidylserine expression on B cells undergoing apoptosis. *Blood*, 84, 1415-20.
- Kosugi S., Hasebe M., Matsumura N., Takashima H., Miyamoto-Sato E., Tomita M. und Yanagawa H. 2009. Six classes of nuclear localization signals specific to different binding grooves of importin alpha. *J Biol Chem*, 284, 478-85.
- Kozak M. 1987. At least six nucleotides preceding the AUG initiator codon enhance translation in mammalian cells. *J Mol Biol*, 196, 947-50.
- Kroemer G. und Martin S. J. 2005. Caspase-independent cell death. *Nat Med*, 11, 725-30.
- Laemmli U. K. 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, 227, 680-5.
- Lavrik I. N., Golks A. und Krammer P. H. 2005. Caspases: pharmacological manipulation of cell death. *J Clin Invest*, 115, 2665-72.
- Lebrin F., Goumans M. J., Jonker L., Carvalho R. L., Valdimarsdottir G., Thorikay M., Mummery C., Arthur H. M. und Ten Dijke P. 2004. Endoglin promotes endothelial cell proliferation and TGF-beta/ALK1 signal transduction. *EMBO J*, 23, 4018-28.
- Lemon B. und Tjian R. 2000. Orchestrated response: a symphony of transcription factors for gene control. *Genes Dev*, 14, 2551-69.
- Levy D. E. und Darnell J. E., Jr. 2002. Stats: transcriptional control and biological impact. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 3, 651-62.

- Li H., Wittwer T., Weber A., Schneider H., Moreno R., Maine G. N., Kracht M., Schmitz M. L. und Burstein E. 2012. Regulation of NF-kappaB activity by competition between RelA acetylation and ubiquitination. *Oncogene*, 31, 611-23.
- Li H., Zhu H., Xu C. J. und Yuan J. 1998. Cleavage of BID by caspase 8 mediates the mitochondrial damage in the Fas pathway of apoptosis. *Cell*, 94, 491-501.
- Liu L., McBride K. M. und Reich N. C. 2005. STAT3 nuclear import is independent of tyrosine phosphorylation and mediated by importin-alpha3. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 102, 8150-5.
- Lorenz M., Hewing B., Hui J., Zepp A., Baumann G., Bindereif A., Stangl V. und Stangl K. 2007. Alternative splicing in intron 13 of the human eNOS gene: a potential mechanism for regulating eNOS activity. *FASEB J*, 21, 1556-64.
- Lukosz M., Jakob S., Buchner N., Zschauer T. C., Altschmied J. und Haendeler J. 2010. Nuclear redox signaling. *Antioxid Redox Signal*, 12, 713-42.
- Lukosz M., Mlynek A., Czypiorski P., Altschmied J. und 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, 648-53.
- Ma J., Zhang T., Novotny-Diermayr V., Tan A. L. und Cao X. 2003. A novel sequence in the coiled-coil domain of Stat3 essential for its nuclear translocation. *J Biol Chem*, 278, 29252-60.
- Marfori M., Mynott A., Ellis J. J., Mehdi A. M., Saunders N. F., Curmi P. M., Forwood J. K., Boden M. und Kobe B. 2011. Molecular basis for specificity of nuclear import and prediction of nuclear localization. *Biochim Biophys Acta*, 1813, 1562-77.
- Marianayagam N. J., Sunde M. und Matthews J. M. 2004. The power of two: protein dimerization in biology. *Trends Biochem Sci*, 29, 618-25.
- Marin V., Kaplanski G., Gres S., Farnarier C. und Bongrand P. 2001. Endothelial cell culture: protocol to obtain and cultivate human umbilical endothelial cells. *J Immunol Methods*, 254, 183-90.
- Messam C. A. und Pittman R. N. 1998. Asynchrony and commitment to die during apoptosis. *Exp Cell Res*, 238, 389-98.
- Mitchell D. A. und Marletta M. A. 2005. Thioredoxin catalyzes the S-nitrosation of the caspase-3 active site cysteine. *Nat Chem Biol*, 1, 154-8.
- Mount P. F., Kemp B. E. und Power D. A. 2007. Regulation of endothelial and myocardial NO synthesis by multi-site eNOS phosphorylation. *J Mol Cell Cardiol*, 42, 271-9.
- Nakajima T., Uchida C., Anderson S. F., Parvin J. D. und Montminy M. 1997. Analysis of a cAMP-responsive activator reveals a two-component mechanism for transcriptional induction via signal-dependent factors. *Genes Dev*, 11, 738-47.
- Nusslein H. G., Jahn H., Losch G., Guggenmoos-Holzmann I., Leibold W. und Kalden J. R. 1984. Association of HLA-Bw35 with mucocutaneous lesions in rheumatoid arthritis patients undergoing sodium aurothiomalate therapy. *Arthritis Rheum*, 27, 833-6.
- Ogata K., Sato K. und Tahirov T. H. 2003. Eukaryotic transcriptional regulatory complexes: cooperativity from near and afar. *Curr Opin Struct Biol*, 13, 40-8.
- Pan Q., Shai O., Lee L. J., Frey B. J. und Blencowe B. J. 2008. Deep surveying of alternative splicing complexity in the human transcriptome by high-throughput sequencing. *Nat Genet*, 40, 1413-5.

- Peplow P. V. und Chatterjee M. P. 2013. A review of the influence of growth factors and cytokines in in vitro human keratinocyte migration. *Cytokine*, 62, 1-21.
- Perkins N. D. und Gilmore T. D. 2006. Good cop, bad cop: the different faces of NF-kappaB. *Cell Death Differ*, 13, 759-72.
- Polytarchou C., Iliopoulos D., Hatzia Apostolou M., Kottakis F., Maroulakou I., Struhl K. und Tschlis P. N. 2011. Akt2 regulates all Akt isoforms and promotes resistance to hypoxia through induction of miR-21 upon oxygen deprivation. *Cancer Res*, 71, 4720-31.
- Reed J. C. 2000. Mechanisms of apoptosis. *Am J Pathol*, 157, 1415-30.
- Remenyi A., Scholer H. R. und Wilmanns M. 2004. Combinatorial control of gene expression. *Nat Struct Mol Biol*, 11, 812-5.
- Robbins J., Dilworth S. M., Laskey R. A. und Dingwall C. 1991. Two interdependent basic domains in nucleoplasmin nuclear targeting sequence: identification of a class of bipartite nuclear targeting sequence. *Cell*, 64, 615-23.
- Rooswinkel R. W., Van De Kooij B., De Vries E., Paauwe M., Braster R., Verheij M. und Borst J. 2014. Antiapoptotic potency of Bcl-2 proteins primarily relies on their stability, not binding selectivity. *Blood*, 123, 2806-15.
- Rossig L., Haendeler J., Hermann C., Malchow P., Urbich C., Zeiher A. M. und Dimmeler S. 2000. Nitric oxide down-regulates MKP-3 mRNA levels: involvement in endothelial cell protection from apoptosis. *J Biol Chem*, 275, 25502-7.
- Saiki R. K., Scharf S., Faloona F., Mullis K. B., Horn G. T., Erlich H. A. und Arnheim N. 1985. Enzymatic amplification of beta-globin genomic sequences and restriction site analysis for diagnosis of sickle cell anemia. *Science*, 230, 1350-4.
- Segal E., Raveh-Sadka T., Schroeder M., Unnerstall U. und Gaul U. 2008. Predicting expression patterns from regulatory sequence in Drosophila segmentation. *Nature*, 451, 535-40.
- Sessa W. C. 2004. eNOS at a glance. *J Cell Sci*, 117, 2427-9.
- Shaulian E. und Karin M. 2001. AP-1 in cell proliferation and survival. *Oncogene*, 20, 2390-400.
- Shimizu S., Eguchi Y., Kamiike W., Waguri S., Uchiyama Y., Matsuda H. und Tsujimoto Y. 1996. Bcl-2 blocks loss of mitochondrial membrane potential while ICE inhibitors act at a different step during inhibition of death induced by respiratory chain inhibitors. *Oncogene*, 13, 21-9.
- Shiojima I. und Walsh K. 2002. Role of Akt signaling in vascular homeostasis and angiogenesis. *Circ Res*, 90, 1243-50.
- Stambolic V., Suzuki A., De La Pompa J. L., Brothers G. M., Mirtsos C., Sasaki T., Ruland J., Penninger J. M., Siderovski D. P. und Mak T. W. 1998. Negative regulation of PKB/Akt-dependent cell survival by the tumor suppressor PTEN. *Cell*, 95, 29-39.
- Sudbeck P. und Scherer G. 1997. Two independent nuclear localization signals are present in the DNA-binding high-mobility group domains of SRY and SOX9. *J Biol Chem*, 272, 27848-52.
- Sugamura K. und Keaney J. F., Jr. 2011. Reactive oxygen species in cardiovascular disease. *Free Radic Biol Med*, 51, 978-92.
- Sun Z. und Andersson R. 2002. NF-kappaB activation and inhibition: a review. *Shock*, 18, 99-106.
- Takac I., Schroder K. und Brandes R. P. 2012. The Nox family of NADPH oxidases: friend or foe of the vascular system? *Curr Hypertens Rep*, 14, 70-8.

- Talavera D., Orozco M. und De La Cruz X. 2009. Alternative splicing of transcription factors' genes: beyond the increase of proteome diversity. *Comp Funct Genomics*, 905894.
- Tanay A. 2006. Extensive low-affinity transcriptional interactions in the yeast genome. *Genome Res*, 16, 962-72.
- Tang M. X. und Szoka F. C. 1997. The influence of polymer structure on the interactions of cationic polymers with DNA and morphology of the resulting complexes. *Gene Ther*, 4, 823-32.
- Taniyama Y. und Griendling K. K. 2003. Reactive oxygen species in the vasculature: molecular and cellular mechanisms. *Hypertension*, 42, 1075-81.
- Theodore M., Kawai Y., Yang J., Kleshchenko Y., Reddy S. P., Villalta F. und Arinze I. J. 2008. Multiple nuclear localization signals function in the nuclear import of the transcription factor Nrf2. *J Biol Chem*, 283, 8984-94.
- 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. und Jane S. M. 2005. A homolog of Drosophila grainy head is essential for epidermal integrity in mice. *Science*, 308, 411-3.
- Ting S. B., Wilanowski T., Auden A., Hall M., Voss A. K., Thomas T., Parekh V., Cunningham J. M. und Jane S. M. 2003a. Inositol- and folate-resistant neural tube defects in mice lacking the epithelial-specific factor Grhl-3. *Nat Med*, 9, 1513-9.
- Ting S. B., Wilanowski T., Cerruti L., Zhao L. L., Cunningham J. M. und Jane S. M. 2003b. The identification and characterization of human Sister-of-Mammalian Grainyhead (SOM) expands the grainyhead-like family of developmental transcription factors. *Biochem J*, 370, 953-62.
- Towbin H., Staehelin T. und Gordon J. 1979. Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 76, 4350-4.
- Urbich C., Reissner A., Chavakis E., Dernbach E., Haendeler J., Fleming I., Zeiher A. M., Kaszkin M. und Dimmeler S. 2002. Dephosphorylation of endothelial nitric oxide synthase contributes to the anti-angiogenic effects of endostatin. *FASEB J*, 16, 706-8.
- Uv A. E., Thompson C. R. und 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, 4020-31.
- Van Dam H. und Castellazzi M. 2001. Distinct roles of Jun : Fos and Jun : ATF dimers in oncogenesis. *Oncogene*, 20, 2453-64.
- Voglauer R., Chang M. W., Dampier B., Wieser M., Baumann K., Sterovsky T., Schreiber M., Katinger H. und Grillari J. 2006. SNEV overexpression extends the life span of human endothelial cells. *Exp Cell Res*, 312, 746-59.
- Weigand J. E., Boeckel J. N., Gellert P. und Dimmeler S. 2012. Hypoxia-induced alternative splicing in endothelial cells. *PLoS One*, 7, e42697.
- Weiss B., Thompson A. und Richardson C. C. 1968. Enzymatic breakage and joining of deoxyribonucleic acid. VII. Properties of the enzyme-adenylate intermediate in the polynucleotide ligase reaction. *J Biol Chem*, 243, 4556-63.
- Wessells J., Baer M., Young H. A., Claudio E., Brown K., Siebenlist U. und Johnson P. F. 2004. BCL-3 and NF-kappaB p50 attenuate lipopolysaccharide-induced inflammatory responses in macrophages. *J Biol Chem*, 279, 49995-50003.
- Wilanowski T., Tuckfield A., Cerruti L., O'connell S., Saint R., Parekh V., Tao J., Cunningham J. M. und Jane S. M. 2002. A highly conserved novel family of

- mammalian developmental transcription factors related to *Drosophila* grainyhead. *Mech Dev*, 114, 37-50.
- Wingender E., Schoeps T. und Donitz J. 2013. TFClass: an expandable hierarchical classification of human transcription factors. *Nucleic Acids Res*, 41, D165-70.
- Wright W. E., Binder M. und Funk W. 1991. Cyclic amplification and selection of targets (CASTing) for the myogenin consensus binding site. *Mol Cell Biol*, 11, 4104-10.

Danksagung

Vorab möchte ich allen danken, die mir bei der Anfertigung dieser Doktorarbeit zur Seite gestanden haben.

Mein herzlicher Dank gebührt zuallererst Frau Prof. Dr. Judith Haendeler für die Bereitstellung des Promotionsthemas, der tatkräftigen Unterstützung während der letzten drei Jahre und natürlich für die Möglichkeiten meine Arbeit auf nationalen und internationalen Kongressen zu präsentieren.

Herrn Prof. Dr. Dieter Willbold danke ich für die Übernahme des Zweitgutachtens.

Des Weiteren bedanke ich mich bei Dr. Yogi Altschmied, der mir auch in stressigen Situationen mit Rat und Tat zur Seite stand und meine Vorträge und Poster kritisch begutachtet hat.

Zudem bedanke ich mich für die Unterstützung der Graduiertenkollegs GRK1033 und dem IRTG1902 während meiner Promotion.

Bei meinen aktuellen (und auch ehemaligen) Arbeitskollegen bedanke ich mich für die stete Unterstützung und die angenehme Arbeitsatmosphäre. Besonders genossen habe ich die Mittagspausen mit euch. In diesem Sinne: Danke, Nilo, dass du dein Essen mit mir geteilt hast. Sascha danke ich dafür, dass er mich in seinem Büro aufgenommen hat und mich in den letzten Monaten meiner Doktorarbeit ertragen hat. Und danke Anna für deine klaren Worte. Die gesamte Arbeitsgruppe (Jojo, Yogi, Sabine, Fee, Flo, Anna, Nadine, Steffi, Maike, Nilo und Sascha) liegt mir sehr am Herzen.

Weiterhin möchte ich mich bei meinen Freunden aus der Studienzeit bedanken (Nina Renana, Claudia, Katja, Tanja, Daniel und Stefan). Ich hatte eine schöne Zeit mit euch in Bielefeld.

Ich danke auch meinen Schwiegereltern, Roswitha und Dr. Eghbal Farrokh für die Unterstützung und dem Verständnis in jeder meiner Lebenslagen.

Besonders bedanke ich mich bei meinen Eltern, Anette und Dr. Leslaw Pipa, die mich immer unterstütz und mein Studium ermöglicht haben und so den Grundstein zu dieser Promotionsarbeit gelegt haben. Danke, dass Ihr vor allem in schwierigen Zeiten an meiner Seite gestanden habt. Zudem Danke ich meinem Bruder Fabian, der immer einen festen Platz in meinem Herzen hat.

Zuletzt möchte ich mich bei dem wichtigsten Menschen in meinem Leben bedanken, meinem Ehemann Dr. André Farrokh. Du bist immer für mich da, hast immer für mich Verständnis und baust mich auf, wenn ich an mir zweifle. Ich freue mich von ganzem Herzen auf alles, was das Leben noch für uns bereithält.