

Modifikationen und Interaktionen des Transkriptionsfaktors *Grainyhead-like 3* im kardiovaskulären System

Inaugural-Dissertation

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

vorgelegt von

Stefanie Kohlgrüber
aus Leverkusen

Düsseldorf, September 2016

aus dem IUF-Leibniz-Institut für umweltmedizinische Forschung

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

Referent: PD Dr. Joachim Altschmied

Koreferent: Prof. Dr. William Martin

Tag der mündlichen Prüfung: 26.10.2016

Erklärung

Ich versichere an Eides Statt, dass die Dissertation von mir selbstständig und ohne unzulässige fremde Hilfe unter Beachtung der „Grundsätze zur Sicherung guter wissenschaftlicher Praxis an der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf“ erstellt worden ist und diese in der vorgelegten oder ähnlichen Form noch bei keiner anderen Institution eingereicht wurde. Alle Angaben, die veröffentlichten Schriften entnommen sind, wurden als solche gekennzeichnet.

(Stefanie Kohlgrüber)

Düsseldorf, 23. September 2016

Inhaltsverzeichnis

I. Abkürzungsverzeichnis	IV
1. Einleitung	1
1.1. Das Kardiovaskuläre System	1
1.2. Endothelfunktion und -dysfunktion - Rolle von NO als Signalmolekül	2
1.3. Struktur und Regulation von Transkriptionsfaktoren	5
1.3.1. Transkriptionsregulation	5
1.3.2. Sequenz-spezifische Transkriptionsfaktoren besitzen eine modulare Domänenstruktur	6
1.3.3. Mechanismen der post-translationalen Regulation von Sequenz-spezifischen Transkriptionsfaktoren	6
1.4. Der Transkriptionsfaktor Grainyhead-like 3	9
1.4.1. Die Transkriptionsfaktoren der Grainyhead-Familie	9
1.4.2. Struktureller Aufbau der GRH/GRHL-Unterfamilie	10
1.4.3. Die humanen Isoformen von GRHL3	11
1.4.4. Einfluss von GRHL3 auf die Endothelzellfunktion	12
1.5. Zielsetzung	16
2. Material und Methoden	17
2.1. Chemikalien	17
2.2. Kommerziell erworbene Puffer, Lösungen, Reagenzien und Kits .	17
2.3. Labormaterialien und Geräte	19
2.4. Molekularbiologische Methoden	22
2.4.1. Medien und Puffer	22
2.4.2. Verwendete Plasmide	23
2.4.3. Verwendete chemischkompetente <i>E. coli</i> -Stämme	23
2.4.4. Transformation in <i>E. coli</i>	24
2.4.5. Kultivierung und Lagerung von Bakterien	25
2.4.6. Plasmidisolierung	25
2.4.7. Restriktionsverdau	26
2.4.8. Reverse Transkription (cDNA-Synthese)	26
2.4.9. Polymerasettenreaktion (<i>polymerase chain reaction</i> , PCR)	27
2.4.10. Gerichtete Mutagenese	28
2.4.11. Agarose-Gelelektrophorese	31
2.4.12. Plasmidsequenzierung	31
2.5. Zellbiologische Methoden	33
2.5.1. Verwendete Zellen	33
2.5.2. Verwendete Kulturmedien	33
2.5.3. Kultivierung von humanen, embryonalen Nierenzellen (HEK 293FT)	33
2.5.4. Kultivierung von primären, humanen, venösen Endothel- zellen (HUVEC)	34
2.5.5. Bestimmung der Zellzahl	34
2.5.6. Transiente Transfektion	35
2.5.7. Zellernte	35

2.6.	Proteinbiochemische Methoden	37
2.6.1.	Zellyse	37
2.6.2.	Proteinbestimmung nach Bradford	37
2.6.3.	Immunpräzipitation	38
2.6.4.	Natriumdodecylsulfat (<i>sodium dodecyl sulfate</i>) - Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE)	40
2.6.5.	Western-Blot mit anschließender Immundetektion	41
2.6.6.	Coomassie-Brilliant-Blau Färbung	44
2.6.7.	Tryptischer In-Gel-Verdau	45
2.6.8.	Massenspektrometrische Analyse (MS)	46
2.6.9.	Immunfluoreszenzfärbung	48
3.	Ergebnisse	52
3.1.	Etablierung eines Antikörpers zur Untersuchung des endogenen GRHL3	53
3.1.1.	Analyse nativer Kaninchen-Seren	53
3.1.2.	Anwendung des gereinigten GRHL3-Antikörpers im Western-Blot	55
3.1.3.	Anwendung des GRHL3-Antikörpers in einer Immunpräzipitation	57
3.1.4.	Fluoreszenzmikroskopische Visualisierung des endogenen GRHL3-Proteins mit Hilfe des gereinigten GRHL3-Antikörpers	58
3.2.	Analyse der GRHL3-Phosphorylierung	59
3.2.1.	Untersuchung der Tyrosin- und Threoninphosphorylierung von GRHL3	59
3.2.2.	Regulation der Tyrosinphosphorylierung von GRHL3 durch externe Stimuli	60
3.2.3.	Verifizierung der NO-induzierten Tyrosinphosphorylierung von GRHL3 und Identifizierung der beteiligten Kinase	61
3.2.4.	Untersuchungen dreier GRHL3-Phosphomutanten	63
3.3.	Einfluss einer fettreichen Ernährung auf die Expression von GRHL3	66
3.3.1.	Untersuchung der GRHL3-Expression <i>in vitro</i>	66
3.3.2.	Analyse der GRHL3-Expression <i>in vivo</i>	68
3.4.	Nachweis der GRHL3 Expression in glatten Muskelzellen	71
3.4.1.	Nachweis der GRHL3-RNA	71
3.4.2.	Nachweis des GRHL3-Proteins	71
3.5.	Identifizierung neuer GRHL3 Interaktionspartner	72
4.	Diskussion	77
4.1.	Etablierung eines neuen GRHL3-Antikörpers	77
4.2.	Analyse der Phosphorylierung von GRHL3	78
4.3.	Untersuchung der GRHL3 Expression <i>ex vivo</i> und <i>in vivo</i>	83
4.4.	Identifizierung potentieller Interaktionspartner von GRHL3	84
4.5.	Ausblick	89
5.	Zusammenfassung	91

6. Summary	92
7. Publikationen mit Bezug zur Dissertation	93
8. Literaturverzeichnis	94
II. Danksagung	VII
III. Anhang	VIII
III.1. Auflistung der in Abschnitt 3.5 identifizierten Peptide	VIII

I. Abkürzungsverzeichnis

(v/v)	<i>volume per volume</i>
(w/v)	<i>weight per volume</i>
ADAM15	<i>a disintegrin and metalloproteinase domain 15</i>
α -SMA	<i>α-smooth muscle actin</i>
Akt1	Proteinkinase B α
Akt2	Proteinkinase B β
amu	<i>atomic mass unit</i>
AP-1	<i>activating protein-1</i>
ApoE	Apolipoprotein E
APS	Ammoniumperoxodisulfat
ATF	<i>activating transcription factor</i>
bp	Basenpaar(e)
BrdU	Bromdesoxyuridin
BSA	<i>bovine serum albumin</i>
C ₁₈	Kohlenstoffisotop 18
CD31	<i>cluster of differentiation 31</i>
cDNA	<i>complementary DNA</i>
c-FOS	<i>cytosolic FBJ murine osteosarcoma viral oncogene homolog</i>
cGMP	<i>cyclic guanosine monophosphate</i>
c-Jun	<i>cytosolic Jun proto oncogene</i>
CMV	Cytomegalie-Virus
CP2	<i>transcription factor CP2, TFCP2</i>
Da	Dalton
DAPI	4',6-Diamidin-2-phenylindol
DBHS	<i>Drosophila behavior/human splicing</i>
dH ₂ O	demineralisiertes Wasser
DMEM	<i>Dulbecco's Modified Eagle Medium</i>
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DNase	Desoxyribonuklease
dNTP	Desoxynukleotidtriphosphat
EBM	Endotheliales Basalmedium
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EGM	<i>endothelial growth media</i>
EGTA	Ethylenglycol-bis(aminoethylether)-N,N,N',N'-tetraessigsäure
EIF3L	<i>eukaryotic translation initiation factor 3 Subunit L</i>
Elf-1	<i>E74-like factor 1</i>
EMSA	<i>electrophoretic mobility shift assay</i>
eNOS	endotheliale NO-Synthase
ER	endoplasmatisches Retikulum
ERK	<i>extracellular signal-regulated kinases</i>
ESI	Elektrospray-Ionisation
FCS	<i>fetal calf serum</i>
Fgr	<i>Fgr proto oncogene</i>
FoxO	<i>forkhead box O protein</i>

FSG	<i>fish skin gelatin</i>
Fyn	<i>Fyn proto oncogene</i>
GAL4	<i>galactose-responsive transcription factor 4</i>
GRH	Grainyhead
GRHL1	Grainyhead-like 1 / <i>mammalian grainyhead (MGR)</i>
GRHL2	Grainyhead-like 2 / <i>brother of mammalian grainyhead (BOM)</i>
GRHL3	Grainyhead-like 3 / <i>sister of mammalian grainyhead (SOM)</i>
GTP	Guanosintriphosphat
HDAC	Histondeacetylase
HEK 293FT	<i>human embryonic kidney cells 293FT</i>
HRP	<i>horseradish peroxidase</i>
His	Histidin
HSPA9	<i>heat shock protein family A 9 / glucose regulated protein 75 (GRP75)</i>
HSPA5	<i>heat shock protein family A 5 / glucose regulated protein 78 (GRP78)</i>
HSP70	<i>heat shock protein 70</i>
HUVEC	<i>human umbilical vein endothelial cells</i>
IgG	Immunglobulin G
JAK	Janus-Kinase
JDP	<i>Jun dimerization protein</i>
JNK	<i>c-Jun N-terminale Kinase</i>
kb	Kilobase(n)
LB	<i>lysogeny broth</i>
LBP1a	<i>upstream binding protein 1, UBP1</i>
LBP9	<i>transcription factor CP2-like 1, TFCP2L1</i>
LDL	Lipoprotein niedriger Dichte
LMO4	<i>LIM domain only protein 4</i>
LRRC47	<i>leucine rich repeat containing protein 47</i>
[M+H] ⁺	Masse eines einfach protonierten Peptids
m/z	Masse- zu Ladung-Verhältnis
MP	Milchpulver
mRNA	<i>messenger RNA</i>
MS	Massenspektrometrie
myc	<i>v-myc avian myelocytomatosis viral oncogene homolog</i>
NF _κ B	<i>nuclear factor κ-light-chain-enhancer of activated B-cells</i>
NONO	<i>Non-POU domain-containing octamer-binding protein</i>
NTF-1	<i>neuronal transcription factor-1</i>
p. a.	<i>pro analysis</i>
PAGE	Polyacrylamidgelelektrophorese
PBS	<i>phosphate buffered saline</i>
PCR	<i>polymerase chain reaction</i>
Pen/Strep	Penicillin/Streptomycin
PKC	Proteinkinase C

POU5F1	<i>POU class 5 Homeobox 1 / octamer binding protein 4 (Oct-4)</i>
PP2	4-amino-5-(4-chlorophenyl)-7-(dimethylethyl)- pyrazolo[3,4-d]pyrimidine
PVDF	Polyvenylidenfluorid
RIPA	<i>radio-immunprecipitation-assay</i>
RNA	Ribonukleinsäure
rpl32	<i>ribosomal protein L32</i>
rpm	<i>rounds per minute</i>
rRNA	ribosomale RNA
SDS	Natriumdodecylsulfat
SEM	<i>standard error of the mean</i> (Standardabweichung)
SFPQ	<i>splicing factor, proline and glutamine rich</i>
SNP	Natrium-Nitroprussid
Src	<i>Src proto onogene</i>
STAT	<i>signal transducers and activators of transcription</i>
SV40	Simian Virus 40
TAE	Tris-Acetat-EDTA
TAF	<i>TBP associated factor</i>
Taq	<i>Thermophilus aquaticus</i>
TATA-Box	Thymin-Adenin-Thymin-Adenin-Box
TBP	<i>TATA-Box binding protein</i>
TBS-T	Tris-gepufferte Salzlösung mit Tween 20
TEMED	Tetramethylethylendiamin
TFIIB	<i>transcription factor II B</i>
TFIID	<i>transcription factor II D</i>
TFIIE	<i>transcription factor II E</i>
TFIIF	<i>transcription factor II F</i>
TFIIH	<i>transcription factor II H</i>
TNF α	<i>tumor necrosis factor α</i>
Tris	Tris-(hydrometyl)-aminomethan
tRNA	<i>transfer RNA</i>
TUNEL	<i>TdT-mediated dUTP-biotin nick end labeling</i>
U	<i>units</i>
VEGF	<i>vascular endothelial growth factor</i>
VSMC	<i>vascular smooth muscle cells</i>
WT	Wildtyp
xg	x-fache der Erdbeschleunigung
Yes	<i>Yes proto-oncogene</i>

1. Einleitung

1.1. Das Kardiovaskuläre System

Neben dem Herzen besteht das kardiovaskuläre System aus den durch den ganzen Körper verlaufenden Blutgefäßen, deren Aufgabe es ist pro Tag mehrere tausend Liter Blut zu den einzelnen Organen zu leiten. Über das Blut wird die Versorgung der Organe mit Sauerstoff und Nährstoffen gewährleistet, sowie der Abtransport von Stoffwechselabbauprodukten und Kohlendioxid ermöglicht. Die Blutgefäße werden unterteilt in Arterien, Venen und Kapillaren. Bei den Arterien handelt es sich um Blutgefäße, die das Blut vom Herzen weg leiten. Mit Ausnahme der Lungenarterie führen diese sauerstoffreiches Blut. Die Venen sind für den Transport des sauerstoffarmen Blutes zum Herzen verantwortlich, wobei die Lungenvene wiederum eine Ausnahme darstellt und sauerstoffreiches Blut führt. Bei den Kapillaren handelt es sich um die kleinsten Blutgefäße, welche im direkten Kontakt mit den Organen stehen.

Die Gefäßwand besteht aus mehreren Zellschichten. Das Lumen der Gefäße wird durch eine Einzelzellschicht aus Endothelzellen ausgekleidet (*Tunica intima*). Dieser folgt eine Schicht aus glatten Muskelzellen (*Tunica media*), welche durch eine elastische Membran (*Membrana elastica interna*) von den Endothelzellen separiert wird. Eine Bindegewebsschicht aus Kollagen-bildenden Fibroblasten bildet die äußerste Schicht der Gefäßwand. Der Aufbau der Gefäßwand ist in Abbildung 1 schematisch für Arterien und Venen dargestellt. Im Gegensatz zu den restlichen Blutgefäßen besitzen Arterien eine ausgeprägte Schicht an glatten Muskelzellen, sowie eine weitere elastischen Membran (*Membrana elastica externa*) zwischen der Muskelzellschicht und den Fibroblasten. Venen zeichnen sich neben einer wesentlich dünneren Muskelzellschicht durch die so genannten Venenklappen aus, die ein Zurückfließen des Blutes verhindern. Im Gegensatz zu diesen großen Blutgefäßen besitzen die Kapillaren weder Muskelzell-noch Bindegewebsschicht, wodurch ein optimaler Metabolit- und Gasaustausch zwischen dem Blut und den Organen über die Gefäßwand ermöglicht wird.

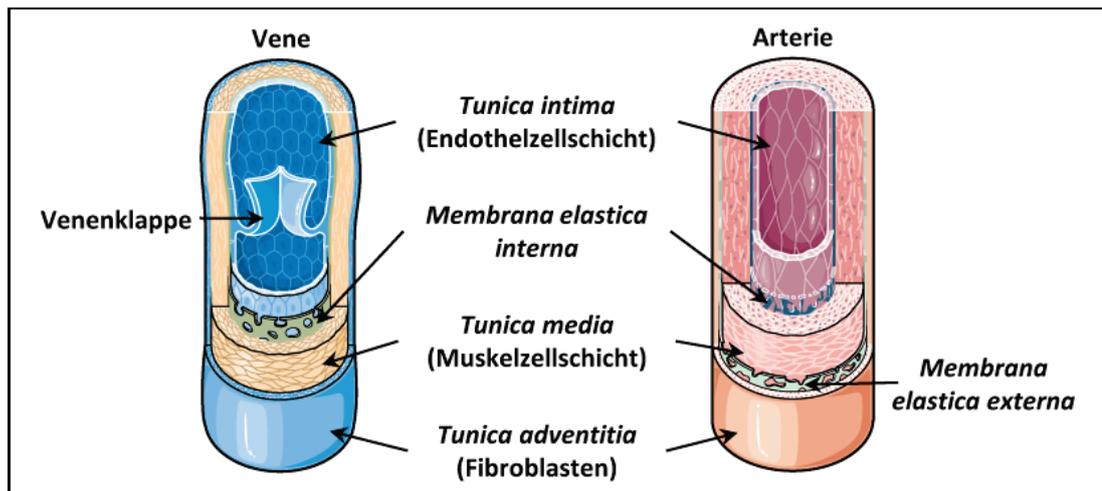


Abbildung 1: Schematischer Aufbau der Gefäße - Vergleich zwischen Arterien und Venen. Dargestellt ist der schematische Aufbau der Gefäßwand einer Vene, sowie einer Arterie. Neben den einzelnen Schichten sind auch die für die jeweilige Schicht charakteristischen Zelltypen angegeben. Einzelne Elemente der Abbildung wurden der Power-Point-Bilddatenbank von *Sevier Medical Art* (<http://www.servier.com/Powerpoint-image-bank>) entnommen, welche durch eine *Creative Commons Attribution 3.0 Unported License* (<https://creativecommons.org/licenses/by/3.0/>) lizenziert ist.

1.2. Endothelfunktion und -dysfunktion - Rolle von NO als Signalmolekül

Das Endothel bildet eine erste Barriere zwischen dem Blutstrom und dem umgebenden Gewebe. Es besteht aus einer Einzelzellschicht der so genannten Endothelzellen. Funktionell ist es unter anderem an der Aufrechterhaltung des Gefäßtonus, sowie der Hämostase, der Thrombozyten-Aggregation und der Angiogenese beteiligt.

In Folge von Gefäßverletzungen wird durch verschiedene Koagulationskaskaden eine Blutung zunächst gestoppt (Hämostase), anschließend werden geeignete Bedingungen für einen Wundverschluss geschaffen. Dies geschieht vor allem durch die Aggregation von Monozyten und Trombozyten. Dieser Aggregation wirkt ein antikoagulatives System entgegen, da eine unkontrollierte Aggregation zur Entstehung von Thrombosen führen könnte, welche den Blutfluss stören und im schlimmsten Fall einen Schlaganfall oder Herzinfarkt zur Folge haben. Eine Schlüsselfunktion des Endothels ist es dem koagulativen System entgegen zu wirken. Dazu werden antikoagulative Substanzen, wie Prostacycline und Stickstoffmonoxid (NO), von den Endothelzellen in das Lumen des Blutgefäßes sezerniert, was eine Aggregation von Monozyten und

Thrombozyten vermindert.

Neben der antikoagulativen Wirkung hat NO eine wichtige Funktion als Signalmolekül innerhalb der Gefäßwand. NO wird in Endothelzellen von der endothelialen NO-Synthase (eNOS) durch die Umsetzung von L-Arginin zu L-Citrullin gebildet. Die Aktivierung der eNOS kann sowohl durch mechanische Reize, wie die Schubspannung, die durch den Blutfluss an der Gefäßwand erzeugt wird, als auch durch verschiedene Substanzen wie Acetylcholin oder Bradykinin erfolgen. Im Endothel selbst spielt NO eine wichtige Rolle in der Aufrechterhaltung der funktionellen Integrität. Es konnte gezeigt werden, dass eine Stimulation von Endothelzellen mit einer physiologischen Konzentration von NO sowohl eine anti-apoptotische, als auch pro-migratorische Wirkung hat [27, 43, 116, 116]. Beide Funktionen sind in einem gesunden Endothel von entscheidender Bedeutung. Die Migration der Endothelzellen ist unter anderem bei der Ausbildung neuer Blutgefäße und bei Verletzungen der Gefäßwand wichtig, der Schutz vor Apoptose für die Aufrechterhaltung der Barrierefunktion. Die anti-apoptotische Wirkung von NO ist unter anderem auf eine inhibitorische S-Nitrosierung von Cystein 163 der p17 Untereinheit von Caspase 3 zurückzuführen [51, 70]. Diese S-Nitrosierung wird zum Beispiel durch Thio-redoxin 1 ermöglicht, welches an den Cysteinen 69 und 73 S-nitrosiert wird [43]. Die Nitrosierung an Cystein 69 reguliert dabei die Aktivität des Enzyms, während die Nitrosierung an Cystein 73 an einer Transnitrosierungsreaktion beteiligt ist, bei der das NO unter anderem auf das Cystein 163 der Caspase 3 übertragen wird und somit die Caspase 3-abhängige Apoptose inhibiert [43, 74].

Neben der reinen Barrierefunktion wurde zudem erstmals 1980 gezeigt, dass das Endothel an der Regulation der Vasodilatation beteiligt ist [35]. Das im Endothel gebildete NO wird in die vaskulären glatten Muskelzellen sezerniert und führt dort zur Aktivierung der zytosolischen Guanylatzyklase. Diese wandelt Guanosintriphosphat (GTP) in zyklisches Guanosinmonophosphat (cGMP) um. Über mehrere Signalkaskaden ist cGMP für eine Reduktion der intrazellulären Kalziumkonzentration verantwortlich, was eine Inhibition der Myosin-leichte-Ketten-Kinase, sowie eine Aktivierung der antagonistisch wirkenden Myosin-leichte-Ketten-Phosphatase zur Folge hat. Die daraus resultierende Dephosphorylierung des Motorproteins Myosin führt dazu, dass dessen Bindung an Aktinfilamente inhibiert wird, wodurch eine Kontraktion der Zelle nicht mehr möglich ist und es zur Vasodilatation kommt. Des Weiteren wird durch NO die Proliferation der glatten Muskelzellen inhibiert.

Eine weitere Rolle spielt das Endothel bei der Angiogenese, der Bildung neuer Blutgefäße aus bereits bestehenden Gefäßen. Zunächst kommt es dabei zu einer Dilatation des Blutgefäßes und anschließend zu einer Permeabilisierung der Gefäßwand. Es folgt das so genannte *Sprouting*, bei dem zunächst die Polarisation einer Endothelzelle (*Tip-Zelle*), mit anschließender Ausbildung von Filopodien, erfolgt. Danach kommt es zur Migration der Endothelzellen, wobei die so genannten Stiel-Zellen das neue Blutgefäß bilden [97]. Ähnlich wie bei der Hämostase handelt es sich auch bei der Angiogenese um ein Zusammenspiel von pro- und antiangiogenen Signalkaskaden. Der Wachstumsfaktor VEGFA (*vascular endothelial growth factor A*) spielt eine wichtige Rolle in der Initiation der Angiogenese. Durch die Bindung von VEGFA an den VEGF-Rezeptor 2 kommt es zu einer Aktivierung der eNOS und damit zur Vasodilatation. Des Weiteren wird die Proliferation, sowie die Migration der Endothelzellen stimuliert [57].

Die beschriebenen Prozesse machen klar, wie wichtig ein funktionsfähiges Endothel ist. Im Zuge des Alterungsprozesses oder bei kardiovaskulären Erkrankungen, wie Arteriosklerose, kommt es zu einem Verlust der Funktionalität des Endothels. Diese endotheliale Dysfunktion ist unter anderem durch eine verringerte Migrationskapazität der Endothelzellen, sowie einer erhöhten Sensitivität gegenüber apoptotischen Stimuli und einer Reduktion der NO-Synthese gekennzeichnet [51]. Letzteres trägt zudem zu einem Anstieg der zellulären Konzentration an reaktiven Sauerstoffspezies bei, da durch die Entkopplung der eNOS Superoxidanionen anstelle von NO gebildet wird [104]. Zu den Risikofaktoren, welche zu einer endothelialen Dysfunktion führen und somit kardiovaskuläre Erkrankungen als Folge haben können, gehören z. B. Fettleibigkeit oder Diabetes [18]. Eine Folge der endothelialen Dysfunktion ist, dass zirkulierende Zellen über das geschädigte Endothel in die Gefäßwand einwandern können. Dort differenzieren einige dieser Zellen zu Makrophagen welche die oxidierte Form des Lipoproteins niedriger Dichte abfangen und sich zu lipidgeladenen Schaumzellen entwickeln können. Eine Erhöhte Anzahl dieser Schaumzellen im Plaque führt schließlich zu dessen Destabilisierung, was ein Aufbrechen des Plaques zur Folge haben kann.

1.3. Struktur und Regulation von Transkriptionsfaktoren

1.3.1. Transkriptionsregulation

Extrazelluläre oder intrazelluläre Stimuli führen in vielen Fällen zu einer Adaptationsreaktion einzelner Zellen oder ganzer Gewebe. Ein großer Teil dieser adaptiven Prozesse ist durch eine Veränderung des Transkriptomts gekennzeichnet. Für die Transkription der DNA in RNA sind RNA-Polymerasen verantwortlich. In Eukaryoten wird zwischen drei unterschiedlichen RNA-Polymerasen unterschieden. Die RNA-Polymerase I ist für die Synthese der ribosomalen RNAs (rRNAs) und RNA-Polymerase III hauptsächlich für die Generierung der transfer-RNAs (tRNAs) verantwortlich, aber auch die 5s rRNA und einige kleinere RNAs werden durch die RNA-Polymerase III synthetisiert. Durch die RNA-Polymerase II werden unter anderem die Gene transkribiert, welche für Proteine codieren. Diese Gene besitzen typische Kern-Promotor-Elemente, wie zum Beispiel die TATA-Box, welche durch Bestandteile der basalen Transkriptionsmaschinerie erkannt wird [99]. Dabei handelt es sich um generelle Transkriptionsfaktoren, wie dem *transcription factor* II D (TFIID)-Komplex, welcher aus dem *TATA-Box binding protein* (TBP) und den *TBP associated factors* (TAFs) besteht [99]. Durch die Interaktion mit weiteren generellen Transkriptionsfaktoren, wie TFIIB, TFIIE, TFIIH und TFIIF kommt es schließlich zur Rekrutierung der RNA-Polymerase II und zu einer basalen Transkription [99]. Diese basale Transkriptionsrate wird durch die Proteinklasse der Sequenz-spezifischen Transkriptionsfaktoren weiter reguliert [75]. Solche Transkriptionsfaktoren binden an jeweils für sie spezifische regulatorische DNA-Elemente und rekrutieren weitere Ko-Aktivatoren oder -Repressoren. Dadurch wird die Rate der Transkriptionsiniation und somit die transkriptionelle Aktivität der jeweiligen Zielgene reguliert. Zudem können diese Ko-Regulatoren direkt, über eine enzymatische Funktion, oder indirekt, durch die Rekrutierung von Histon-Acetyl-Transferasen oder Histon-Deacetylasen zu einer Veränderung der Chromatinstruktur beitragen und so die Transkriptionsrate erhöhen oder erniedrigen [100]. Sequenz-spezifische Transkriptionsfaktoren werden als Antwort auf verschiedene Stimuli über viele verschiedene Signalkaskaden reguliert und sind selbst an der Regulation mehrerer hundert Gene beteiligt [54, 98, 125, 136], womit jeder einzelne Transkriptionsfaktor pleiotrope Effekte hat. Hinzu kommt, dass die Transkription von Genen nicht nur durch einzelne Transkriptionsfaktoren reguliert wird, sondern das Zusammenspiel vieler Transkriptionsfaktoren die Expression eines Gens bestimmt [96]. Dieser kombinatorische Effekt erfordert die Interaktion zwischen Transkriptionsfaktoren und hat zur Folge, dass die Zielgene eines spezifischen Transkriptionsfaktors

ko-reguliert sein können, aber nicht notwendigerweise müssen.

1.3.2. Sequenz-spezifische Transkriptionsfaktoren besitzen eine modulare Domänenstruktur

Sequenz-spezifische Transkriptionsfaktoren besitzen eine modulare Proteinstruktur aus einzelnen funktionellen Domänen. Diese lassen sich sowohl physikalisch voneinander trennen, als auch untereinander austauschen, da sie ihre Funktion unabhängig voneinander ausüben [34]. Innerhalb eines Transkriptionsfaktors können die einzelnen Domänen, mit Ausnahme der DNA-Bindedomäne, von der es in jedem Transkriptionsfaktor nur eine einzige gibt, in unterschiedlicher Anzahl und in beliebiger Reihenfolge vorkommen.

Essentiell für die Funktion eines jeden Transkriptionsfaktors ist seine DNA-Bindedomäne. Sie ermöglicht dem Protein eine Sequenz-spezifische Interaktion mit der DNA. Die DNA-Bindedomänen lassen sich je nach Struktur verschiedenen Klassen zuordnen, innerhalb welcher sie hoch konserviert sind. Generell ist der Grad der Konservierung der DNA-Bindedomäne höher als der anderer Bereiche innerhalb des Transkriptionsfaktors, was die Einteilung der Transkriptionsfaktoren in verschiedene Gruppen anhand ihrer DNA-Bindedomänen ermöglicht [69, 132]. Für die Regulation der Transkription sind Aktivierungs- oder Repressionsdomänen verantwortlich. Diese beeinflussen die Rekrutierung der RNA-Polymerase durch die Interaktion mit der basalen Transkriptionsmaschinerie oder verschiedenen Ko-Aktivatoren, bzw. Ko-Repressoren [81, 90]. Die Regulation der Aktivität von Transkriptionsfaktoren selbst erfolgt über regulatorische Domänen. Da Transkriptionsfaktoren durch eine Vielzahl von Stimuli beeinflusst werden können, existieren verschiedene Mechanismen, die für diese Regulation verantwortlich sind. Einige dieser Mechanismen sind in Abbildung 2 schematisch dargestellt und werden im nachfolgenden Abschnitt näher erläutert.

1.3.3. Mechanismen der post-translationalen Regulation von Sequenz-spezifischen Transkriptionsfaktoren

Die Aktivität eines Transkriptionsfaktors kann über verschiedene Mechanismen reguliert werden (siehe Abbildung 2). So kann zum Beispiel durch verschiedene Protein-Protein-Interaktionen nicht nur, wie bereits vorher beschrieben, die Regulation unterschiedlicher Zielgene erfolgen, sondern auch eine Veränderung der DNA-Bindeaktivität, bis hin zum kompletten Verlust der DNA-Bindung,

verursacht werden. Des Weiteren kann durch eine Homo- oder Heterodimerisierung von Proteinen innerhalb einer Transkriptionsfaktor-Familie oder mit nahen Verwandten z. B. die spezifische Sequenzerkennung beeinflusst werden. Ein Beispiel dafür stellen die nukleären Rezeptoren dar, welche je nach Dimerisierungspartner eine palindromische Sequenz oder direkte Sequenzwiederholungen eines DNA-Bindemotives mit unterschiedlichem Abstand erkennen [87]. Ein weiterer Mechanismus, der ebenfalls typisch für die Familie der nukleären Rezeptoren ist, ist die Ligandenbindung, welche eine Konformationsänderung des Transkriptionsfaktors zur Folge hat. Eine solche Konformationsänderung kann zum einen die DNA-Bindung regulieren oder auch einen Einfluss auf die subzelluläre Lokalisation haben [11, 76, 87]. Um ihren Funktionen als Transkriptionsfaktoren nachzukommen ist eine nukleäre Lokalisation dieser Proteine essentiell. In vielen Fällen sind Transkriptionsfaktoren nicht konstitutiv nukleär lokalisiert. Vielmehr ist ihr Kernimport und -export reguliert. Mitglieder der FoxO-Familie werden zum Beispiel als Antwort auf unterschiedliche Stimuli aus dem Zellkern exportiert [114]. Andere, wie zum Beispiel der Glukokortikoid-Rezeptor [31] oder *Nuklear factor κB* [38], liegen in einem inaktiven Zustand im Zytoplasma vor und müssen erst in den Zellkern importiert werden .

Zusätzlich zu der Regulation über regulatorische Domänen, kann die Aktivität von Transkriptionsfaktoren durch reversible post-translationale Modifikationen einzelner Aminosäuren beeinflusst werden. Dabei kommt es unter anderem zur Entstehung weiterer Modifikations-spezifischer Interaktionsdomänen [105]. Über diese Interaktionen können dann wiederum die DNA-Bindung, die subzelluläre Lokalisation oder die Proteinstabilität beeinflusst werden.

Eine der am besten charakterisierten Modifikationen ist die Phosphorylierung von Serin-, Threonin- und Tyrosinresten. Diese Modifikation reguliert vielseitige Funktionen wie die Stabilität, die Lokalisation, die DNA-Bindung oder die Protein-Protein-Interaktion von Transkriptionsfaktoren [128]. Neben der Phosphorylierung können einige wenige Transkriptionsfaktoren an Lysinresten acetyliert oder auch methyliert werden, was in der Regel in einer verbesserten DNA-Bindung resultiert [20, 24].

Zusätzlich zu diesen Modifikationen, bei denen kleine funktionelle Gruppen kovalent an Aminosäurereste gebunden werden, können Transkriptionsfaktoren auch durch die Fusion mit kleineren Proteinen, wie dem Ubiquitin modifiziert werden. Eine Ubiquitinierung hat in der Regel einen proteasomalen Abbau zur Folge. Es wurde jedoch auch eine nicht-proteolytische Funktion dieser Modifikation gezeigt, deren genauer Mechanismus noch nicht vollständig aufgeklärt

ist [37]. Interessanterweise werden manche Transkriptionsfaktoren erst durch die proteolytische Spaltung eines inaktiven Vorläufers aktiviert. Ein Beispiel dafür ist der *activating transcription factor 6* (ATF6), welcher als Vorläufermolekül in der Membran des endoplasmatischen Retikulums (ER) lokalisiert ist und in Folge von oxidativem Stress, bzw. ER Stress proteolytisch gespalten wird, um anschließend in den Zellkern transportiert zu werden [46, 77].

Die Regulation eines Transkriptionsfaktors durch solche post-translationalen Modifikationen muss nicht auf eine einzige Modifikation beschränkt sein, sondern kann auch durch mehrere Modifikationen erfolgen, wobei diese sich gegenseitig beeinflussen können. Die Nettoaktivität eines Transkriptionsfaktors wird durch die Summe der verschiedenen Modifikationen bestimmt [5, 32].

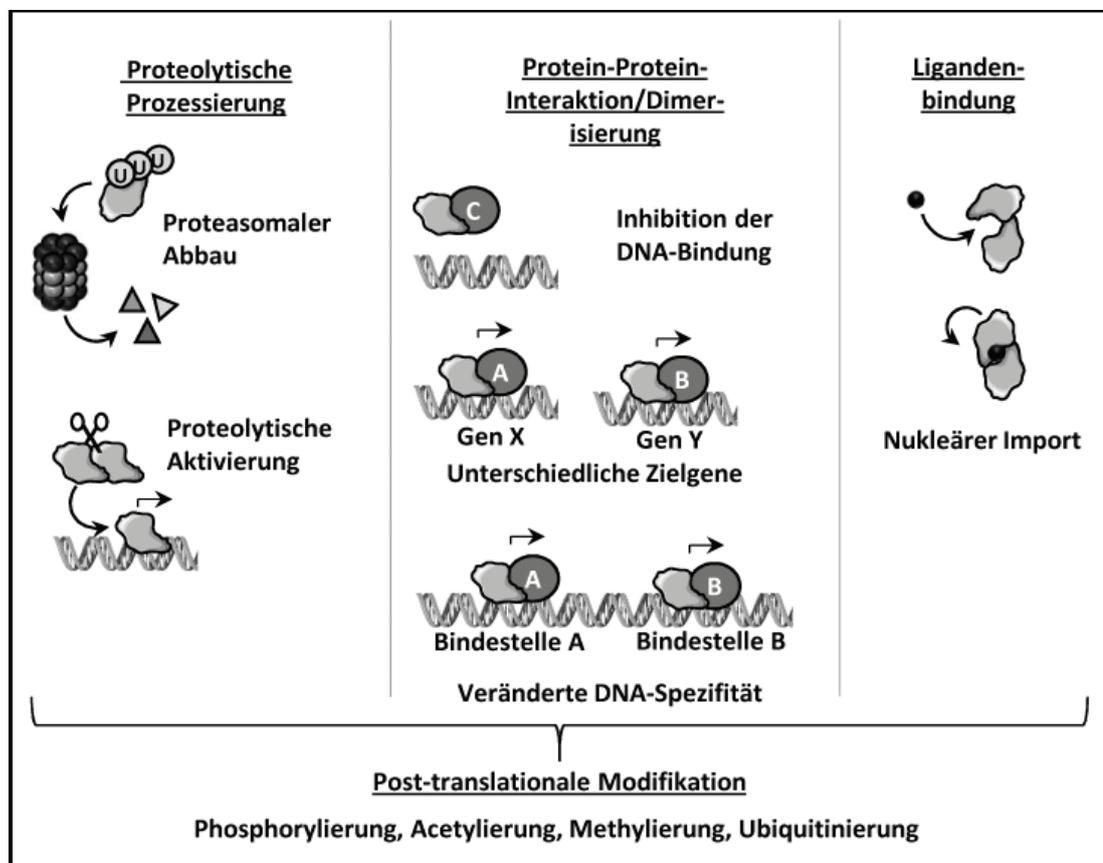


Abbildung 2: Post-translationale Regulation von Transkriptionsfaktoren. Exemplarisch sind die proteolytische Prozessierung, die Protein-Protein-Interaktion/Dimerisierung und die Ligandenbindung als Möglichkeiten der post-translationalen Regulation von Transkriptionsfaktoren gezeigt. Diese beeinflussen Funktionen wie die Stabilität, die Aktivität, die DNA-Bindung oder die Lokalisation von Transkriptionsfaktoren. Post-translationale Modifikationen einzelner Aminosäuren wiederum können alle gezeigten Prozesse regulieren.

1.4. Der Transkriptionsfaktor Grainyhead-like 3

1.4.1. Die Transkriptionsfaktoren der Grainyhead-Familie

Bei *grainyhead* (*grh*) und *grainyhead-like* (*grhl*) handelt es sich um Gene, welche für Mitglieder einer Transkriptionsfaktorfamilie codieren, die evolutionär stark konserviert ist. Der Transkriptionsfaktor Grainyhead (GRH), der auch als Elf-1 (*E74-like factor 1*), bzw. NTF-1 (*neuronal transcription factor 1*) bezeichnete wird, wurde als erstes Mitglied dieser Familie ursprünglich in *Drosophila melanogaster* identifiziert [13].

In Säugetieren wurden bisher insgesamt sechs verschiedene Mitglieder dieser Familie identifiziert. Diese werden wiederum in zwei Unterfamilien unterteilt (siehe Abbildung 3) [113, 129]. Zur ersten Unterfamilie gehören die Transkriptionsfaktoren CP2 (*transcription factor CP2*, TFCP2), LBP-1a/*upstream binding protein 1* (UBP1) und LBP-9/*transcription factor CP2-like 1* (TFCP2L1). Diese Transkriptionsfaktoren sind Homologe zu dem *Drosophila*-Protein dCP2.

Die zweite Unterfamilie besteht aus Grainyhead (GRH) und den Säuger-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).

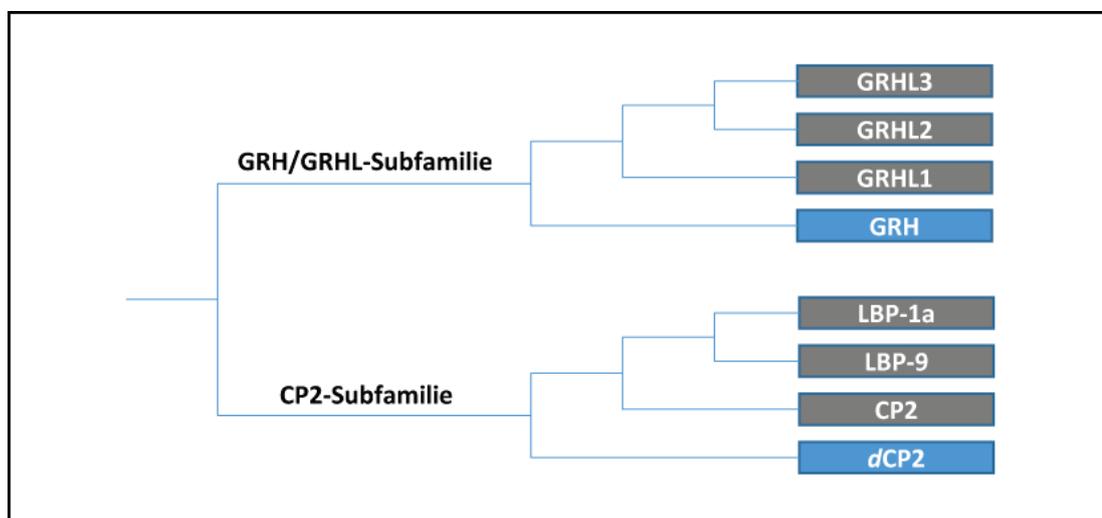


Abbildung 3: Stammbaum der Grainyhead-Familie. Dargestellt sind die Verwandtschaftsverhältnisse der zwei Protein-Unterfamilien GRH/GRHL und CP2. Die humanen Proteine sind grau, die entsprechenden Homologe aus *Drosophila melanogaster* blau, unterlegt. Das gezeigte Cladogramm wurde mit Hilfe des Internet-basierten Programms *Phylogeny.fr - Robust Phylogenetic Analysis For The Non-Specialist* erstellt [25]. Für die Analysen wurden die Aminosäuresequenzen mit den folgenden UniProtKB/SwissProt-Nummern verwendet: Q9NZI5-1 (GRHL1); Q6ISB3-1 (GRHL2); Q8TE85-5 (GRHL3); P13002-1 (GRH); Q12800-1 (TFCP2); Q8SY59 (dTFCP2); Q9NZI7-1 (UBP1); Q9NZI6-1 (TFCP2L1).

1.4.2. Struktureller Aufbau der GRH/GRHL-Unterfamilie

Die schematische Domänenstruktur von GRH sowie einem exemplarischen Säuger-Protein ist in Abbildung 4 dargestellt. Für das *Drosophila*-Homolog GRH ist eine N-terminale, Isoleucin-reiche Aktivierungsdomäne beschrieben worden [2]. Im Vergleich zu GRH besitzen die Säugerproteine einen verkürzten N-Terminus. Dennoch wurde gezeigt, dass auch bei GRHL1, GRHL2 und GRHL3 der N-Terminus für die Aktivierung der Transkription verantwortlich ist [113, 129].

Im zentralen Bereich von GRH, sowie der Säuger-Homologe befindet sich die DNA-Bindedomäne, welche strukturell eine hohe Homologie aufweist und den Proteinen die Bindung der gleichen Konsensussequenz ermöglicht [9, 129]. Aufgrund der Primärstruktur dieser Domäne werden die GRHL-Proteine auch den Transkriptionsfaktoren mit einer *immunoglobulin fold* Domäne zugeordnet. Eine solche strukturelle Domäne ist auch in Antikörpern zu finden und ermöglicht unter anderem Protein-Protein-Interaktionen [10, 130, 131].

Am C-terminalen Ende besitzen sowohl das *Drosophila*-, als auch die Säugerproteine eine Dimerisierungsdomäne [2, 113, 117, 129], welche die Heterodimerisierung zwischen GRHL1, GRHL2 und GRHL3 sowie die Homodimerisierung ermöglicht.

Obwohl die drei GRHL-Transkriptionsfaktoren eine hohe strukturelle Ähnlichkeit aufweisen, können sie nicht, oder nur teilweise für einander kompensieren [9]. In verschiedenen *knock out* Mäusen wurde gezeigt, dass GRHL2 und GRHL3 während der Wundheilung zwar eine gemeinsame Rolle spielen, für die Entwicklung der Hautbarriere jedoch voneinander unabhängige Funktionen haben.

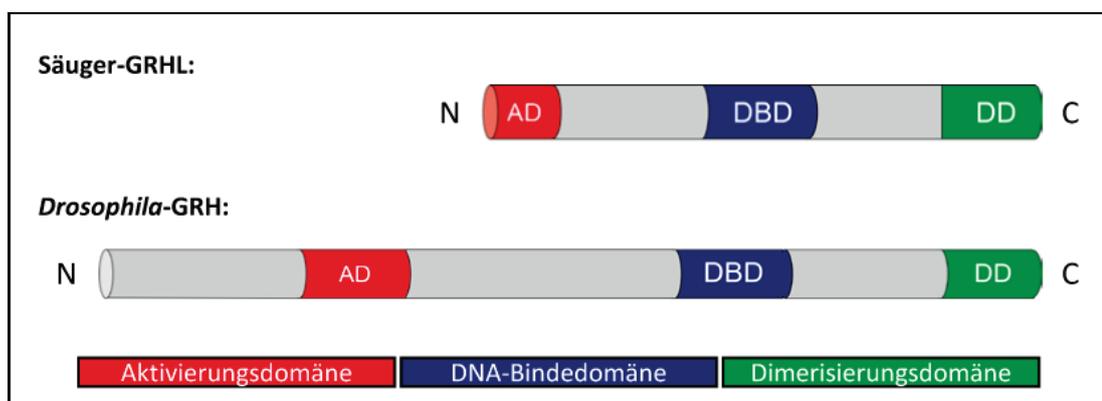


Abbildung 4: Vergleich der Domänenstruktur zwischen dem *Drosophila* GRH und dem homologen Säuger-Protein. Die vorhergesagte Aktivierungsdomäne, DNA-Bindedomäne und Dimerisierungsdomäne [113] sind farblich hervorgehoben. Der Bereich des Proteins für den bisher keine funktionellen Eigenschaften bekannt sind ist in Grau dargestellt.

1.4.3. Die humanen Isoformen von GRHL3

GRHL1, GRHL2 und GRHL3 kommen in allen Vertebraten vor. Darüber hinaus sind von GRHL3 mehrere Isoformen bekannt. Während in Mäusen lediglich eine Form des GRHL3-Proteins vorkommt, finden sich im Menschen drei unterschiedliche Isoformen dieses Transkriptionsfaktors (siehe Abbildung 5). Isoform 2 ist sowohl in Mäusen, als auch im Menschen exprimiert. Die Isoform 1 unterscheidet sich von dieser durch die Verwendung eines alternativen, humanspezifischen ersten Exons (Exon 1b). Das von Exon 1b ausgehende Primärtranskript kann zudem alternativ gespleißt werden, wodurch ein Primärtranskript gebildet wird, welchem Exon 2 fehlt. Durch das Ausspleißen von Exon 2 entsteht ein Stoppcodon, so dass ausgehend vom Translationsstart in Exon 1b lediglich ein kurzes unfunktionales Protein gebildet wird. Die Initiation der Translation für eine funktionale Variante von GRHL3 wird in Exon 4 verschoben, wodurch ein N-terminal verkürztes Protein entsteht [113].

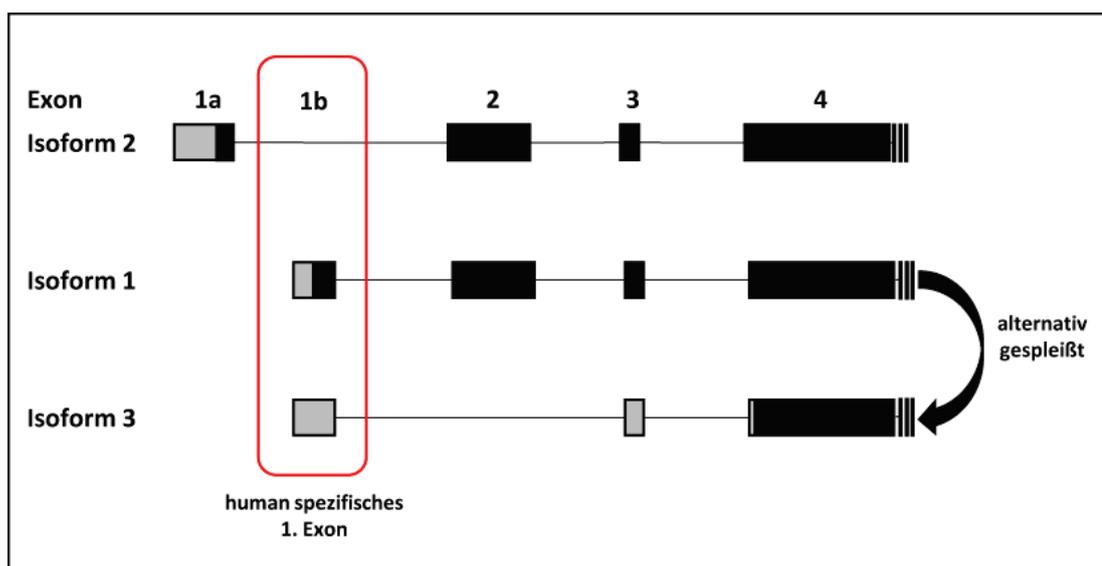


Abbildung 5: Struktur der humanen GRHL3-Isoform Transkripte. Dargestellt sind die ersten 4 Exons der, von den beiden alternativen ersten Exons 1a und 1b ausgehenden, Primärtranskripte und das, durch das Ausspleißen von Exon 2 entstehende, Primärtranskript, welches für die mRNA der Isoform 3 codiert. Der untranslatierte Bereich ist in grau, der für das Protein codierende Bereich schwarz dargestellt. 3' zu dem dargestellten Bereich sind alle drei Primärtranskripte identisch (Abbildung nach Ting *et al.* 2003 [113]).

In ersten funktionellen Untersuchungen wurde jeweils die Aktivierungsdomäne der Isoformen 1 und 2 (Aminosäuren 30-95), bzw. der N-terminale Teil der Isoform 3 (Aminosäuren 1-32) an die DNA-Bindedomäne des *galactose-responsive transcription factor 4* (GAL4) fusioniert. Die jeweiligen Expressionsvektoren wurden mit einem Reportergenkonstrukt in humane embryona-

le Nierenzellen kotransfiziert [113]. Die Expression des Reportergens wurde von einem Promotor, der fünf konkatemerierte GAL4-Bindestellen enthielt, gesteuert. Mit diesem experimentellen Ansatz wurde gezeigt, dass die vorhergesagten Aktivierungsdomänen von Isoform 1 und Isoform 2 tatsächlich die Transkription aktivieren, während der Amino-Terminus der Isoform 3 keine transaktivierende Eigenschaft besaß. Dies führte zu der Annahme, dass die Isoform 3 als Repressor fungiert oder durch die Heterodimerisierung mit anderen Isoformen einen dominant negativen Einfluss auf die Genexpression hat. Ähnliche Untersuchungen in primären humanen Endothelzellen zeigten jedoch, dass alle drei Isoformen Transkriptionsaktivatoren sind [44, 68]. Für diese Untersuchungen wurde ein Expressionsvektor der jeweiligen Isoform mit einem Reportergenkonstrukt, in dem gleichen Zellsystem wie es in den ersten Versuchen verwendet wurde, kotransfiziert. Bei dem verwendeten Reportergenkonstrukt handelte es sich um ein Luziferasegen unter der transkriptionellen Kontrolle eines Minimalpromotors und zweier, durch eine *in vitro* Selektion identifizierter, Konsensus-Bindesequenzen für GRHL3 [111]. Im Unterschied zu den zuvor publizierten Daten [113] wurde in diesen Experimenten jedoch keine Fusion isolierter Domänen von GRHL3 mit einer heterologen DNA-Bindedomäne verwendet, sondern die gesamten Proteine in Kombination mit der zugehörigen DNA-Bindestelle untersucht.

1.4.4. Einfluss von GRHL3 auf die Endothelzellfunktion

GRHL3-defiziente Mäuse lieferten erste Hinweise auf eine Rolle von GRHL3 in der Zellmigration. Diese Mäuse weisen einen Neuralrohrdefekt in Form eines offenen Rückens (*spina bifida*) auf und sterben kurz nach der Geburt [112]. Zudem wurde gezeigt, dass GRHL3 für die Entwicklung und Erhaltung der epidermalen Hautbarriere von zentraler Bedeutung ist. Neben einer gestörten Funktion der Hautbarriere zeigen GRHL3-defiziente Mausembryonen auch einen Defekt in der Wundheilung [111]. Um die Integrität der Hautbarriere zu erhalten und zum Wundverschluss ist die Migration von Keratinozyten von entscheidender Bedeutung. Auch hier konnte gezeigt werden, dass ein Verlust von GRHL3 in diesem Zelltyp die Migration beeinträchtigt [19, 89].

In primären humanen Endothelzellen wurde ebenfalls eine Expression von GRHL3 nachgewiesen [68]. Erste Analysen wurden hier mit der Isoform 2 durchgeführt, da diese Isoform das Homolog zum Maus-Protein darstellt. Eine Überexpression von GRHL3 führte zu einer deutlich erhöhten Zellmigration. Dieser Effekt war vergleichbar mit dem Einfluss des Wachstumsfaktors VEGF

(*vascular endothelial growth factor*) auf die Endothelzellmigration [41]. Die promigratorische Rolle von GRHL3 wurde zudem mittels eines *knock downs* bestätigt [68]. Da es sich bei VEGF um einen der potentesten pro-migratorischen Faktoren handelt, welcher über eine Vielzahl von Signalkaskaden die Migration induziert [57], wurde untersucht ob eine Überexpression von GRHL3 eine Rolle bei der VEGF-Expression hat. Es konnte jedoch keinerlei Einfluss von GRHL3 auf die VEGF-Spiegel der Zellen festgestellt werden, weshalb eine VEGF-abhängige Induktion der Migration ausgeschlossen wurde [68].

Neben VEGF spielt auch NO eine Rolle in der Migration von Endothelzellen (siehe Abschnitt 1.2). Zudem ist NO in der Lage unabhängig von VEGF die Endothelzell-Migration zu induzieren [116]. Es konnte gezeigt werden, dass eine Stimulation von Endothelzellen mit einer physiologischen Konzentration von NO die mRNA-Menge von GRHL3 erhöht. Zudem führte ein *knock down* von GRHL3 dazu, dass die NO-induzierte Migration der Endothelzellen inhibiert wurde [68]. Diese Ergebnisse legen nahe, dass es sich bei GRHL3 um einen wichtigen pro-migratorischen Faktor handelt. Des Weiteren wurde gezeigt, dass durch eine Überexpression von GRHL3 die Aktivität der eNOS reguliert wird [68]. Dazu wurde zum einen die Expression von eNOS, sowie deren Phosphorylierung an Serin 1179, über welche die eNOS durch die Proteinkinase B aktiviert wird [27], untersucht. Während GRHL3 keinen Einfluss auf die Proteinmenge der eNOS hatte, wurde eine erhöhte Phosphorylierung der eNOS, gleichbedeutend mit deren Aktivierung, nachgewiesen. Da GRHL3 als Transkriptionsfaktor selbst keine Kinaseaktivität besitzt, wurde untersucht ob die, für die Phosphorylierung von eNOS an Serin 1179, verantwortliche Proteinkinase B α (Akt1) durch GRHL3 reguliert wird. Für diese Kinase war durch die Überexpression von GRHL3 ebenfalls eine erhöhte Phosphorylierung an Serin 473, die indikativ für eine Aktivierung von Akt1 ist, nachweisbar [68].

Neben der Migration spielt die Apoptose eine wichtige Rolle für ein funktionelles Endothel. *Grainyhead-like 3* wurde in einem Genom-weiten *Screening* nach anti-apoptischen Genen identifiziert [41]. Des Weiteren wurde sowohl für eNOS, als auch für die Proteinkinase B eine anti-apoptische Rolle nachgewiesen [14]. Daher wurde untersucht ob GRHL3 die Apoptose von Endothelzellen beeinflussen kann. Nach der Überexpression von GRHL3 konnte in einem Apoptosetest eine anti-apoptische Wirkung von GRHL3 gezeigt werden [68]. Durch Verwendung eines spezifischen eNOS-Inhibitors wurde zudem nachgewiesen, dass dieser anti-apoptische Effekt NO-abhängig ist.

Die bisher beschriebenen Untersuchungen bezogen sich auf die Isoform 2 von GRHL3. Da die Isoform 1 im N-Terminus jedoch nur 6 Aminosäuren besitzt, welche nicht den ersten 11 Aminosäuren der Isoform 2 entsprechen, kann davon ausgegangen werden, dass die beschriebenen Funktionen auch für Isoform 1 zutreffen. Weitere Untersuchung der alternativ gespleißten Isoformen 1 und 3 in Endothelzellen ergaben, dass diese entgegengesetzte funktionelle Eigenschaften in Endothelzellen besitzen. Während Isoform 1 ebenso wie Isoform 2 pro-migratorisch und anti-apoptotisch wirkt, führte eine Überexpression der Isoform 3 zu einer Reduktion der basalen Migrationsrate und zu einem Verlust der anti-apoptotischen Wirkung [44]. Mittels eines Isoform-spezifischen *knock downs* konnte gezeigt werden, dass die Isoform 3 sogar eine pro-apoptotische Funktion besitzt. Da gezeigt wurde, dass NO eine zentrale Rolle in der pro-migratorischen Funktion von Isoform 2 spielt, wurde ebenfalls der Einfluss von NO auf die Transkripte, die für Isoform 1 und 3 codieren, untersucht. Dabei wurde gezeigt, dass sich durch NO das Verhältnis der jeweiligen Transkripte zueinander in Richtung der Isoform 1 verschiebt. In einer *Micro-Array*-Studie wurden die Zielgene der Isoformen 1 und 3 identifiziert. Dabei zeigte sich, dass beide Isoformen weitestgehend unterschiedliche Zielgene aktivieren, was eine mögliche Erklärung für die entgegengesetzte Funktionsweise darstellt [44]. So wurde z. B. die Proteinkinase B β (Akt2) als Zielgen für GRHL3-Isoform 1 identifiziert [44], welche als *master regulator* die Aktivität weiterer Akt-Isoformen beeinflusst [91] und zu einer erhöhten Phosphorylierung von Akt1 nach der Überexpression von GRHL3 führen könnte [68].

Eine Aktivierung unterschiedlicher Zielgene kann durch eine differentielle Regulation z. B. durch die Interaktion mit verschiedenen Kofaktoren erfolgen. Über die genauen Regulationsmechanismen von GRHL3 in Säugern ist jedoch nur wenig bekannt. Bisher wurde lediglich eine Homo- oder Heterodimerisierung innerhalb der GRH/GRHL-Unterfamilie gezeigt [113, 129]. Eine Dimerisierung zwischen den beiden Unterfamilien GRHL und CP2 wurde hingegen ausgeschlossen [117]. Des Weiteren war, über ein Hefe-Zwei-Hybrid-*Screening*, eine Interaktion mit dem Transkriptionsfaktor *LIM domain only protein 4* (LMO4) gezeigt worden [61]. Nachfolgend wurde jedoch festgestellt, dass es sich dabei um keine direkte Interaktion handelt [50]. Wie bereits vorher erwähnt, können auch post-translationale Modifikationen zur Regulation eines Transkriptionsfaktors beitragen. Auch hier ist zu GRHL3 oder den anderen Säuger-Homologen nichts bekannt. Lediglich für das Homolog von *Drosophila* ist bereits eine wichtige funktionelle Phosphorylierung beschrieben worden, welche sich jedoch in einem

Bereich des N-Terminus befindet, der in den Säuger-Proteinen nicht vorkommt [56, 66].

1.5. Zielsetzung

Im Rahmen dieser Arbeit sollten die bisher unbekannt regulatorischen Mechanismen von GRHL3 genauer untersucht werden. Da zu Beginn dieser Arbeit kein ausreichend spezifischer Antikörper für GRHL3 kommerziell erhältlich war, wurde im ersten Teil dieser Arbeit, in Zusammenarbeit mit Merck Millipore, ein neuer GRHL3 Antikörper etabliert. Mit diesem war es möglich das endogene GRHL3-Protein in den nachfolgend durchgeführten biochemischen Versuchen zu detektieren.

Zur Untersuchung der Regulation von GRHL3 wurden im weiteren Verlauf dieser Arbeit folgende Ziele verfolgt:

- Nachweis einer potentiellen post-translationalen Phosphorylierung von GRHL3, sowie die Untersuchung des Einflusses verschiedener Stimuli auf eine mögliche Phosphorylierung und die Identifizierung der verantwortlichen Kinase
- Die Identifizierung potentieller GRHL3 Interaktionspartner

Da bereits im Vorfeld eine NO-abhängige Regulation der GRHL3-Expression gezeigt wurde, war ein weiteres Ziel dieser Arbeit:

- Die Untersuchung der GRHL3-Expression in Abhängigkeit eines NO-beeinflussenden Stimulus *ex vivo* und *in vivo*

2. Material und Methoden

2.1. Chemikalien

Das im weiteren Verlauf als dH₂O bezeichnete Reinstwasser wurde mit Hilfe einer Filteranlage der Firma Merck Millipore (MilliQ-Anlage, Darmstadt) gewonnen. Alle Chemikalien waren vom Reinheitsgrad zur Analyse geeignet (p. a.) und wurden wenn nicht anders angegeben von den Firmen Sigma-Aldrich (München), Carl Roth (Karlsruhe) und Merck Millipore (Darmstadt) bezogen.

2.2. Kommerziell erworbene Puffer, Lösungen, Reagenzien und Kits

Tabelle 1: Übersicht über die kommerziell erworbenen Puffer, Lösungen, Reagenzien und Komplett-Reagenzsysteme

Puffer, Lösungen, Reagenzien und Komplett-Reagenzsysteme	Hersteller
10000 U/ml Penicillin / 10000 µg/ml Streptomycin (Pen/Strep)	GE Healthcare Life Sciences, Freiburg
4',6-Diamidin-2-phenylindol (DAPI) 1 mg/ml	Thermo Fisher Scientific, Massachusetts, USA
Bradfordreagenz „Bio-Rad Protein Assay Dye Reagent Concentrate“	BioRad, München
Demaskierungspuffer „Vector® Antigen unmasking solution citrate-based“	Vector Laboratories, Kalifornien, USA
DNA-Größenstandard „GeneRuler™ 1 kb Plus DNA Ladder“	Thermo Fisher Scientific, Schwerte
„Dulbecco's Modified Eagle Medium“ (DMEM) GlutaMAX (4,5 g/l Glukose)	Thermo Fisher Scientific, Schwerte
„Endothelial growth media (EGM)™ Single Quots®“ 2 ml Rinderhirnextrakt 0,5 ml Gentamicin-Amphotericin B (GA-100) 0,5 ml Hydrocortison	Lonza, Köln

Puffer, Lösungen, Reagenzien und Komplett-Reagenzsysteme	Hersteller
0,5 ml humaner epidermaler Wachstumsfaktor (<i>human epidermal growth factor</i> , hEGF)	
Einbettmedium „ProLong® Gold Antifade Mountant“	Thermo Fisher Scientific, Schwerte
Endotheliales basal Medium (<i>endothelial basal medium</i> , EBM)	Lonza, Köln
Fötale Kälberserum (<i>fetal calf serum</i> , FCS)	Thermo Fisher Scientific, Schwerte
G418, Genitacin®	Thermo Fisher Scientific, Schwerte
„Hispeed® Plasmid Maxi Kit“	Qiagen, Hilden
„Lipofectamine® Transfection Reagent with Plus™ Reagent“	Thermo Fisher Scientific, Schwerte
„Modified Trypsin, Porcine, Sequencing Grade“	Promega, Mannheim
„My Taq™ HS DNA Polymerase“	Bioline, Luckenwalde
„5x MyTaq™ Reaction Buffer“	Bioline, Luckenwalde
Natrium-Citrat Puffer „Antigen Unmasking Solution, Citric Acid Based“	Vector Laboratories, Kalifornien, USA
Nicht essentielle Aminosäuren	Thermo Fisher Scientific, Schwerte
„nProtein A Sepharose™ 4 Fast Flow“	GE Healthcare Life Sciences, Freiburg
„Phosphataseinhibitor Cocktail A“	BioTool, Houston, TX, USA
„Phosphataseinhibitor Cocktail B“	BioTool, Houston, TX, USA
Phosphat-gepufferte Salzlösung (<i>phosphate buffered saline</i> , PBS)	Invitrogen/Life Technologies, Darmstadt
„Pierce™ ECL Plus Western Blotting Substrat“	Thermo Fisher Scientific, Schwerte
„Pierce™ ECL Western Blotting Substrat“	Thermo Fisher Scientific, Schwerte
Proteingrößenstandard „Precision Plus Protein™ Standard Kaleidoscope™“	BioRad, München
„Proteaseinhibitor Cocktail“	BioTool, Houston, TX, USA

Puffer, Lösungen, Reagenzien und Komplett-Reagenzsysteme	Hersteller
„Protein G Sepharose™ 4 Fast Flow“	GE Healthcare Life Sciences, Freiburg
„QIAprep® Spin Miniprep Kit“	Qiagen, Hilden
„QuickChange II XL Site-Directed Mutagenesis Kit“	Agilent Technologies, Kalifornien, USA
Restriktionsenzyme	New England Biolabs, Massachusetts, USA
Röntgen-Entwickler-Konzentrat	Adefo, Dietzenbach
Röntgen-Fixierer-Konzentrat	Adefo, Dietzenbach
„SuperFect® Transfection Reagenz“	Qiagen, Hilden
„SuperScript™ III First-Strand Synthesis System for RT-PCR“	Thermo Fisher Scientific, Schwerte
Trypsin-EDTA (0,5 g/l in PBS) 10x	Thermo Fisher Scientific, Schwerte
„Trypsin Resuspension Buffer“	Promega, Mannheim
DNase/RNase freies destilliertes Wasser „Ultrapure™“	Life Technologies, Darmstadt

2.3. Labormaterialien und Geräte

Tabelle 2: Auflistung der verwendeten Labormaterialien

Material	Hersteller
0,2 ml Reaktionsgefäße	Eppendorf, Hamburg
0,5 ml ProteinLoBind Reaktionsgefäße	Eppendorf, Hamburg
1,5 ml Reaktionsgefäße	Eppendorf, Hamburg
50 ml Reaktionsgefäße / Zentrifugenröhrchen	TPP, Trasadingen, Schweiz
5 ml sterile Kulturröhrchen mit Deckel	Simport Scientific, Saint-Mathieu-de-Beloeil, Kanada
C ₁₈ -StageTip-Säulen	Thermo Fisher Scientific, Schwerte
Erlenmeyerkolben mit Schikaneboden NALGENE™	Thermo Fisher Scientific, Schwerte
Kryoröhrchen	Greiner, Kremsmünster, Österreich

Material	Hersteller
Metall-bedampfte Glaskapillaren „NanoES spray capillaries“	Thermo Fisher Scientific, Schwerte
„PAP-Pen“	Abcam, Cambridge, UK
Petrischalen 10 cm	Greiner, Kremsmünster, Österreich
Plastikküvetten	Sarstedt, Nümbrecht
Polyvinylidenfluorid (PVDF)-membran „Immobilion-P“ Porengröße 0,45 µM	Merck Millipore, Darmstadt
Röntgenfilme „Amersham HyperFilm™ ECL“	GE Healthcare Life Science, Freiburg
T75 Zellkulturflasche „CELLSTAR®“	Greiner, Kremsmünster, Österreich
Zellkulturschaber	TPP, Trasadingen, Schweiz
Zellkulturschalen	TPP, Trasadingen, Schweiz

Tabelle 3: Übersicht über die verwendeten Geräte

Geräte	Hersteller
Autoklav „Systec DX-150“	Systec, Linden
Autoradiographie Kassette	Carl Roth, Darmstadt
Bakterienkulturschüttler „Ecotron“	Infors HAT, Basel, Schweiz
CO ₂ -Inkubator „HERAcell® 240i“	Thermo Fisher Scientific, Massachusetts, USA
Elektrophoresesystem „Mini-PROTEAN®Tetra“	BioRad, München
Elektrophoresesystem „PerfectBlue™ Gelsystem Mini M“	PeqLab, Erlangen
Fluoreszenzmikroskop „Axiovert 200M“	Carl Zeiss, Jena
Feinwaage „CP124s“	Satorius, Göttingen
Geldokumentationssystem „INTAS Gel iX Imager“	Royal Biotech, Frankfurt
Heizblock „Thermomixer comfort“	Eppendorf, Hamburg
Ionenquelle „Nanospray™“	AB Sciex, Darmstadt
konfokales Lasermikroskop „LSM 880“	Carl Zeiss, Jena

Geräte	Hersteller
Kühlzentrifuge „5810“	Eppendorf, Hamburg
Kühlzentrifuge „Rotina 420R“	Hettich, Tutlingen
Leuchtplatte	REX Leuchtplatten, Blaustein
Lichtmikroskop „CKX31“	Olympus, Hamburg
Magnetrührer „yellow line MSC basic c“	IKA, Staufen
Massenspektrometer „Q-STAR® XL“	AB Sciex, Darmstadt
Neubauer Zählkammer	Marienfeld-Superior, Lauda Königshofen
Orbitalschüttler „DOS 3M Skyline“	ELMI, Riga, Lettland
pH-Meter „SevenGo™“	Mettler Toledo, Schwerzenbach, Schweiz
Pipettierhilfe „Pipetus®“	Hischmann Laborgeräte, Eberstadt
Reagenzglasschüttler „Vortex Genie 2“	Scientific Industries, New York, USA
Spektrophotometer „SmartSpec Plus“	BioRad, München
Sterilwerkbank „HERAsafe®“	Thermo Fischer Scientific, Massachusetts, USA
Spannungsquelle „Elektrophoresis Power Supply“	PeqLab, Erlangen
Spannungsquelle „Power Pac 200“ / „Power Pac 1000“	BioRad, München
<i>Thermocycler</i> „MyCycler™“	BioRad, München
Überkopfrötator „RM Multi-1“	StarLab, Hamburg
Ultraschallbad „SONOREX“	BANDELIN, Berlin
UV-Spektrophotometer „NanoDrop™ 2000c“	Thermo Fisher Scientific, Schwerte
Vakuumpumpe „WP6122050“	Merck Millipore, Darmstadt
Vakuumentrifuge „Concentrator 5301“	Eppendorf, Hamburg
Waage „440-43N“	Kern & Sohn GmbH, Baldingen-Frommern

2.4. Molekularbiologische Methoden

2.4.1. Medien und Puffer

Tabelle 4: Medien und Puffer für die molekularbiologischen Experimente

Puffer/Medium	Zusammensetzung
DNA-Probenpuffer (6x)	30 % (v/v) Glycerin 60 mM Tris-HCl, pH 7,4 60 mM EDTA 0,05 % (w/v) „Orange G“ 0,05 % (w/v) Xylencyanol
LB-Medium	10 g/l Trypton 5 g/l Hefeextrakt 5 g/l NaCl → autoklavieren und bei Raumtemperatur lagern, bei Bedarf vor der Verwendung Ampicillin zu einer Endkonzentration von 100 µg/ml zugeben.
LB-Agarplatten	10 g/l Trypton 5 g/l Hefeextrakt 5 g/l NaCl 15 g/l Agar → autoklavieren und auf 60 °C abkühlen lassen. Bei Bedarf Ampicillin zu einer Endkonzentration von 100 µg/ml zugeben. In 10 cm Petrischalen gießen, aushärten lassen und bei 4 °C lagern.
Tris-Acetat EDTA-Puffer (TAE) (1x)	40 mM Tris-Base 0,1 % (v/v) Essigsäure 1 mM EDTA pH 8,3

2.4.2. Verwendete Plasmide

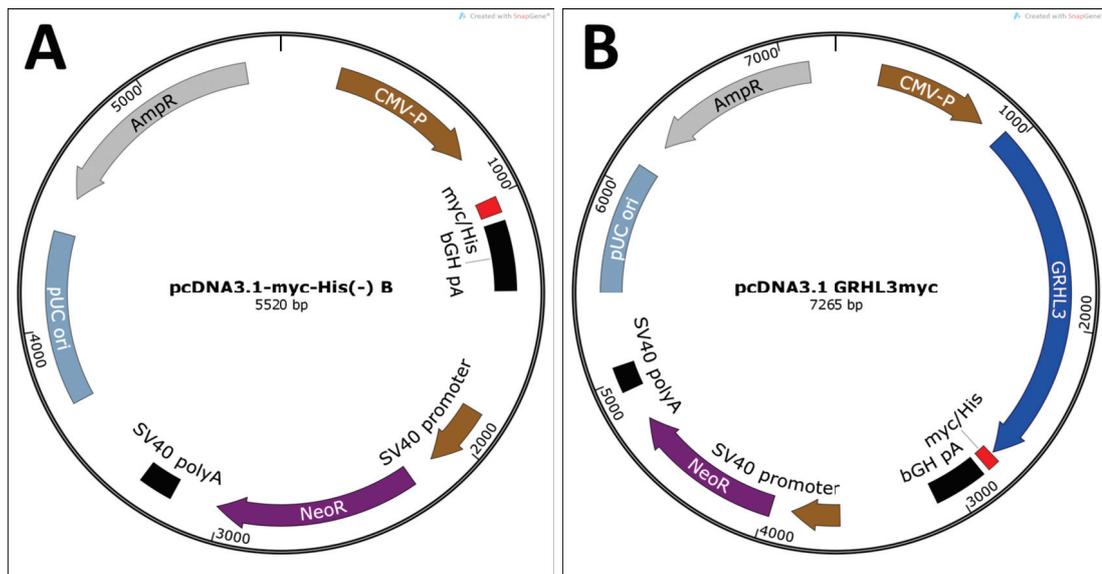


Abbildung 6: Vektorkarte der verwendeten Plasmide. (A) Das als Leervektor verwendete Plasmid pcDNA3.1/myc-His(-) B der Firma Invitrogen besitzt zur Replikation in Bakterien einen Replikationsursprung aus Plasmiden der pUC-Familie (pUC ori) [118]. Zur Selektion in *E.coli* diente ein Ampicillin-Resistenzgen (AmpR), für die in Säugerzellen ein Neomycin-Resistenzgen (NeoR). Letzteres steht unter der transkriptionellen Kontrolle des Promotors aus der frühen Region des Affenvirus SV40 (*simian virus 40*) (SV40-P). 3' zu NeoR liegt ein Polyadenylierungssignal aus SV40 (SV40 pA). Zur Expression inserierter cDNAs dient der Cytomegalovirus „immediate early“ Promotor (CMV-P). 3' zu diesem Promotor befindet sich die codierende Sequenz für ein myc-Epitop mit einem anschließenden Hexahistidin-*tag* (myc/His). Es folgt das RNA-Polyadenylierungssignal aus dem Rinderwachstumshormon Gen (bGH pA). (B) In dem Expressionsvektor für GRHL3 wurde die codierende Sequenz von GRHL3 so in pcDNA3.1/myc-His(-) B kloniert, dass sie sich unter der transkriptionellen Kontrolle des CMV-P befindet und an das C-terminale Ende des Proteins das myc-Epitop, sowie das Hexahistidin-*tag* fusioniert wird.

Beide Plasmide wurden zur transienten Transfektion verschiedener Zellen verwendet (siehe Abschnitt 2.5.6). Der Expressionsvektor für GRHL3 diente zudem als *Template* bei der gerichteten Mutagenese (siehe Abschnitt 2.4.10)

2.4.3. Verwendete chemischkompetente *E. coli*-Stämme

Es wurden die Bakterienstämme TG1 sowie XL10-Gold verwendet. Zur allgemeinen Nutzung wurden im Labor chemisch kompetente TG1-Bakterien generiert, während chemisch kompetente XL10-Gold-Bakterien als Bestandteil des „QuickChange II XL Site-Directed Mutagenesis Kit“ erworben wurde. Alle Bakterien wurden bei -80 °C gelagert. Die Bakterienstämme wiesen jeweils den folgenden Genotyp auf:

TG1:

F'[traD36 proAB⁺lacI^q lacZΔ M15] supE thi-1 Δ(lac-proAB) Δ(mcrB-hsdSM)5,
(r_K⁻m_K⁻)

XL10-Gold:

Tet^R Δ(mcrA)183 Δ(mcrCB-hsdSMR-mrr)178 endA1 supE44 thi-1 recA1 gy-
rA96 relA1 lac Hte [F ' proAB lacI^qZΔM15 Tn10 (Tet^R) Amy Cam^R]

2.4.4. Transformation in *E. coli*

Für die Transformation in TG1 wurden pro Ansatz 100 µl kompetenter Bakterien eingesetzt. Diese wurden auf Eis angetaut und mit 10 ng Plasmid-DNA versehen. Anschließend erfolgte eine Inkubation von 30 min auf Eis. Dieser Inkubation folgte der Hitzeschock, welcher für 90 s bei 42 °C durchgeführt wurde. Die Ansätze wurden für 2 min auf Eis abgekühlt, bevor die Bakterien in ein Kulturröhrchen mit 2 ml LB-Medium (ohne Antibiotikum) überführt wurden. Die Bakterienkulturen wurde für 30 min bei 37 °C und 200 rpm in einem Schüttelinkubator inkubiert. Anschließend wurden die Kulturen bei 3220 xg für 5 min abzentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das Pellet in 100 µl LB-Medium resuspendiert. Davon wurden jeweils 10 µl und 90 µl auf LB-Agar-Platten (mit Ampicillin) ausplattiert, da nur Plasmide verwendet wurden, welche eine Ampicillinresistenz vermitteln, und über Nacht bei 37 °C inkubiert.

Im Anschluss an die Mutagenese (siehe Abschnitt 2.4.10) wurde die mit *DpnI* inkubierte Plasmid-DNA in den *E. coli* Stamm XL10-Gold transformiert. Dazu wurden pro Ansatz 50 µl kompetenter Bakterien mit 2 µl β-Mercaptoethanol versehen (Endkonzentration 56 mM) und 10 min auf Eis inkubiert. Für die Transformation wurde 2 µl der *DpnI*-behandelten Mutagenesereaktion zu den Bakterien pipettiert und diese für 30 min auf Eis inkubiert. Anschließend folgte ein Hitzeschock für 30 s bei 42 °C. Zur Regeneration wurden die Bakterien in 1 ml LB-Medium (ohne Antibiotikum) überführt und für 1 h bei 37 °C und 200 rpm geschüttelt. Zum Ausplattieren wurde die Bakterienkultur zunächst bei 3220 xg für 5 min zentrifugiert und der Überstand verworfen. Das Bakterienpellet wurde in 100 µl LB-Medium resuspendiert und auf eine LB-Agarplatte (mit Ampicillin) ausplattiert. Diese wurde über Nacht bei bei 37 °C inkubiert

2.4.5. Kultivierung und Lagerung von Bakterien

Die Anzucht der Bakterien erfolgte standard mäßig bei 37 °C. Vereinzelausstriche auf LB-Agarplatten (mit Ampicillin) wurden dazu über Nacht in einem Brutschrank inkubiert. Anschließend wurden diese LB-Agarplatten bei 4 °C gelagert (Kurzzeitlagerung von maximal 6 Wochen). Diese Ausstriche wurden verwendet um Flüssigkulturen aus LB-Medium (mit Ampicillin) mit Einzelkolonien anzuimpfen. Diese Flüssigkulturen wurden in einem Erlenmeyerkolben mit Schikaneboden angesetzt und bei 200 rpm und 37 °C auf einem Schüttelinkubator inkubiert. Für eine dauerhafte Lagerung bei -80 °C wurde ein Aliquot (500 µl) der Bakterien-Flüssigkultur 1:1 mit 50%-igem Glycerin gemischt und in ein Kryogefäß überführt. Diese Dauerkulturen wurden wiederum für Vereinzelausstriche verwendet.

2.4.6. Plasmidisolierung

Die Plasmidisolierung kleiner Mengen (Minipräparation) erfolgte mit Hilfe des „QIAprep Spin Miniprep“ Komplett-Reagensystems, die großer Mengen (Maxipräparation) mit dem „QIAfilter Plasmid Maxi“ Komplett-Reagensystem. Für die Minipräparation wurde jeweils 2,5 ml LB-Medium mit einer Einzelkolonie von einer Agar-Platte angeimpft und für 16-20 h bei 37 °C geschüttelt. Für eine Maxipräparation wurde zunächst 2 ml LB-Medium (mit Ampicillin) mit einer Einzelkolonie angeimpft und für 5 h bei 37°C geschüttelt. Davon wurden je 200 µl verwendet um 100 ml LB-Medium (mit Ampicillin), in einem 500 ml Erlenmeyerkolben mit Schikaneboden, anzuimpfen. Diese Kultur wurde für 16 h bei 37°C geschüttelt. Die Plasmidisolierung wurde nach Herstellerangaben durchgeführt, wobei im Falle der Maxipräparation folgende Anpassungen durchgeführt wurden:

Die Puffer P1, P2 und P3 wurden in einem Volumen von 12 ml verwendet. Die Lyse mit Puffer P2 erfolgte für 4,5 min. Nach der Zugabe von Puffer P3 und vorsichtigem Mischen wurde das Lysat 15 min bei 3220xg bei Raumtemperatur zentrifugiert und der Überstand durch den QIAfilter filtriert. Der TE-Puffer für die Elution wurde auf 65 °C erwärmt. Die Elution selbst erfolgte mit 500 µl TE-Puffer. Dieses Eluat wurde nochmals durch den Präzipitator geführt. Anschließend erfolgte eine weitere Elution mit 300 µl frischem TE-Puffer. Beide Eluate wurden vereint und die DNA-Konzentration mit Hilfe eines NanoDrop™ 2000c und der entsprechenden Software (Version 1.5) bestimmt.

2.4.7. Restriktionsverdau

Bevor Plasmid-DNA für weitere Experimente verwendet wurde, wurde ihre Identität durch die Spaltung mit Sequenz-spezifischen Endonukleasen (Restriktionsenzymen) verifiziert. Die Restriktionsenzyme wurden nach Herstellerangaben eingesetzt. Die Inkubation der Plasmid-DNA mit den Enzymen erfolgte bei 37 °C über Nacht. Die erzeugten DNA-Fragmente wurden mittels einer Agarose-Gelelektrophorese analysiert (siehe Abschnitt 2.4.11). Neben dem Nachweis der Identität der Plasmid-DNAs wurde mithilfe der Gelelektrophorese gleichzeitig eine Verunreinigung durch genomischer DNA aus *E. coli* ausgeschlossen.

2.4.8. Reverse Transkription (cDNA-Synthese)

Zur cDNA-Synthese aus einem RNA-Template wurde das „SuperScript™ III First-Strand Synthesis System for RT-PCR“ verwendet. Dabei wurden alle Inkubationen in einem *Thermocycler* durchgeführt. Der in Tabelle 5 aufgeführte Reaktionsansatz I wurde dazu für 5 min bei 65 °C inkubiert und für 1 min auf Eis abgekühlt. Anschließend wurde der in Tabelle 6 aufgeführte Reaktionsansatz II hinzugegeben.

Tabelle 5: Reaktionsansatz I

Komponente	Volumen	Menge/Konzentration
RNA-Template	XX µl	1,4 µg
oligo dT ₂₀ (50 µM)	1 µl	5 µM
Random Hexamers (dN ₆) (50 ng/µl)	1 µl	5 ng/µl
dNTPs (10 mM)	1 µl	1 mM
DNase/RNase freies Wasser	ad 10 µl	-

Tabelle 6: Reaktionsansatz II

Komponente	Volumen	Menge/Konzentration
RT-Puffer (10x)	2 µl	1x
MgCl ₂ (25 mM)	4 µl	5 mM
DTT (0,1 M)	2 µl	10 mM
RNaseOUT (40 U/µl)	1 µl	2 U/µl

Zu jedem Reaktionsansatz wurde 1 µl reverse Transkriptase (SuperScript™ III, 200 U/µl) zugegeben und dieser für 10 min bei 25 °C, für 50 min bei 50 °C und für 5 min bei 85 °C inkubiert. Anschließend wurde die Reaktion auf Eis abgekühlt. Es folgte eine Inkubation mit 1 µl *E. coli* RNase H (2 U/µl) für 20 min bei 37 °C. Die so generierte cDNA wurde schließlich als Template in einer Polymerasettenreaktion eingesetzt (siehe Abschnitt 2.4.9)

2.4.9. Polymerasettenreaktion (*polymerase chain reaction*, PCR)

Über eine Polymerasettenreaktion (*polymerase chain reaction*, PCR) kann eine spezifische DNA-Sequenz exponentiell amplifiziert werden [101]. Die PCR wurde zum einen zur Amplifikation definierter cDNA-Sequenzen, zum anderen zur gerichteten Mutagenese (siehe Abschnitt 2.4.10) verwendet. Als *Template* wurde dabei entweder eine mittels reverser Transkription generierte cDNA oder eine Plasmid-DNA eingesetzt. Der für die Amplifikation von cDNA verwendeter Reaktionsansatz ist in Tabelle 7 dargestellt. Die Amplifikation im Rahmen der gerichteten Mutagenese wurde nach Herstellerangaben durchgeführt (siehe Abschnitt 2.4.10). Die einzelnen Komponenten wurden jeweils in ein 0,2 ml Reaktionsgefäß zusammen pipettiert. Die PCR selber wurde in einem *Thermocycler* durchgeführt und umfasste mehrere Schritte (siehe Tabelle 8). Nach einer initialen thermischen Denaturierung der doppelsträngigen DNA wurden folgende Schritte zyklisch wiederholt, die Denaturierung, gefolgt von der Anlagerung der Oligonukleotid-Primer (*Annealing*) und anschließender Synthese des neuen DNA-Strangs (*Elongation*). Nach Abschluss der zyklischen Wiederholungen wurde bei der Amplifikation von cDNA eine finale *Elongation* für 7 min bei 72 °C durchgeführt, die Proben auf 4 °C abgekühlt und gelagert. Die in der PCR verwendete Zyklenzahl war abhängig von der zu amplifizierenden DNA. Die *Annealing*-Temperatur richtete sich nach der Schmelztemperatur der Primer, bei deren Design darauf geachtet wurde, dass sie für ein *Annealing* bei 60 °C geeignet waren. Die zur Amplifikation einer cDNA verwendeten Primer sind in Tabelle 9 aufgeführt. Die *Elongation*-Zeit richtete sich nach der Länge der zu amplifizierenden Sequenz. Als Faustregel wurde 1 min pro kb angesetzt.

Tabelle 7: Reaktionsansatz zur Amplifikation von cDNA

Komponente	Volumen	Menge/Konzentration
<i>5x MyTaq™ Reaction Buffer</i>	6 µl	1x
cDNA-Template	2 µl	-
<i>Forward</i> Primer (10 µM)	1 µl	0,33 µM
<i>Reverse</i> Primer (10 µM)	1 µl	0,33 µMµl
MyTaq™ HS DNA Polymerase (5 U/µl)	0,2µl	0,17 U/µl
dH ₂ O	ad 30 µl	-

Tabelle 8: PCR-Programm zur Amplifikation von cDNA

Schritt	Temperatur	Zeit	Zyklenzahl
<i>Hot start</i>	95 °C	1 min	x1
Denaturierung	94 °C	30 s	abhängig von der zu amplifizierenden cDNA
<i>Annealing</i>	60 °C	30 s	
<i>Elongation</i>	72 °C	30 s	
<i>final Elongation</i>	72 °C	7 min	
Lagerung	4 °C	∞	x1

Tabelle 9: Zur Amplifikation von cDNA verwendete DNA-Oligonukleotid-Primer

Primer	Sequenz (5' → 3')
SOM Ex1A for2	CTCGACACCCAAACCTCAACAT
SOM Ex2 rev1	CAGCTGTCAACGGGTTTTCT
hmRPL32 Ex02 for1	GTGAAGCCCAAGATCGTCAA
hmRPL32 Ex03 rev1	TTGTTGCACATCAGCAGCAC

2.4.10. Gerichtete Mutagenese

Für die gerichtete Mutagenese, zum Austausch einzelner Nukleotide in Plasmiden, wurde das „QuickChange II XL Site-Directed Mutagenesis Kit“ der Firma

Agilent Technologies verwendet. Die Oligonukleotid-Primer wurden nach den im Kit-Handbuch genannten Vorgaben generiert (siehe Abbildung 7). In einem ersten Schritt wird von einer Plasmid-DNA als *Template* durch eine exponentielle Amplifikation mittels einer PCR unter Verwendung von zwei komplementären Oligonukleotid-Primern, welche beide die gewünschte Mutation tragen, eine doppelsträngige ringförmige Plasmid-DNA mit eben dieser Mutation generiert. Die Amplifikation erfolgt durch eine hitzestabile DNA-Polymerase, welche so modifiziert ist, dass sie eine Korrekturlese (*proof reading*)-Funktion besitzt. In einem zweiten Schritt wird die *Template*-DNA mittels der Endonuklease *DpnI* abgebaut. Die mutierte Plasmid-DNA wird anschließend in *E. coli* transformiert.

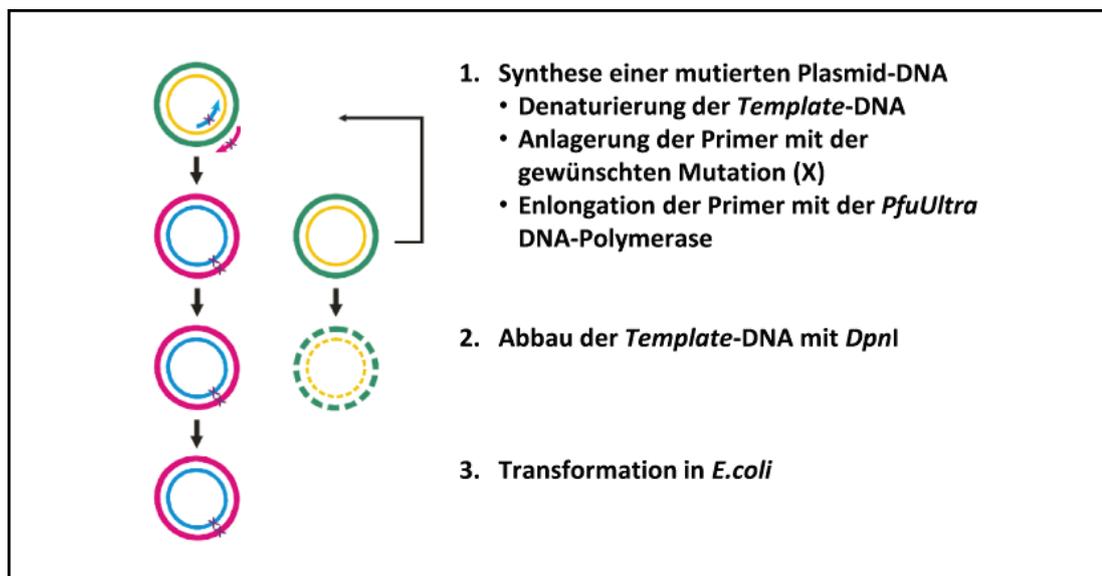


Abbildung 7: Prinzip der gerichteten Mutagenese Dargestellt ist der prinzipielle Ablauf der gerichteten Mutagenese (Abbildung modifiziert nach „QuikChange II XL Site-Directed Mutagenesis Kit“-Handbuch)

Die jeweiligen PCR-Ansätze wurden wie in dem in Tabelle 10 angegebenen Reaktionsschema angesetzt und unter den in Tabelle 11 genannten PCR-Bedingungen in einem Thermocycler inkubiert. Direkt im Anschluss an die Mutagenese-PCR erfolgte der enzymatische Abbau der template DNA mit Hilfe der Endonuklease *DpnI*. Dieses Enzym ist nicht in der Lage DNA zu schneiden, wenn der Adeninrest innerhalb seiner Erkennungssequenz 5'-GATC-3' unmethyliert ist. Da bei der Amplifikation im Zug der Mutagenese unmodifizierte Desoxynukleosidtriphosphate eingesetzt werden, können die Amplifikationsprodukte nicht geschnitten werden. Im Gegensatz dazu wird die als template eingesetzte Plasmid-DNA, sofern sie aus einem *E. coli* Stamm isoliert wurde der profizient für diese sogenannte dam-Methylierung ist, von *DpnI* geschnitten. Dies führt zu einer Anreicherung der Amplifikationsprodukte, die aufgrund der

eingesetzten Primer die gewünschten Mutationen tragen sollten. Von diesem Ansatz wurden 2 µl anschließend in den *E. coli*-Stamm XL10-Gold transformiert (siehe Abschnitt 2.4.4). Anschließend wurden mehrere Einzelkolonien zum animpfen von LB-Flüssigkulturen verwendet und eine Miniprep durchgeführt (siehe Abschnitt 2.4.6). Die Überprüfung auf eine erfolgreiche Mutation erfolgte durch eine DNA-Sequenzierung (siehe Abschnitt 2.4.12).

Tabelle 10: Schema des zur Mutagenese verwendeten PCR-Reaktionsansatzes

Komponente	Volumen	Menge/Konzentration
Reaktionspuffer (10x)	5 µl	1x
DNA-Template	X µl	10 ng
<i>Forward</i> Primer (10 ng/µl)	12,5 µl	2,5 ng/µl
<i>Reverse</i> Primer (10 ng/µl)	12,5 µl	2,5 ng/µl
dNTPmix	1 µl	k.A.
<i>Quick Solution</i>	3 µl	k.A.
PfuUltra HF DNA Polymerase (2,5 U/µl)	1 µl	2,5 U/µl
dH ₂ O	ad 50 µl	-

Tabelle 11: PCR-Programm für die Gerichtete Mutagenese

Schritt	Temperatur	Zeit	Zyklenzahl
<i>Hot start</i>	95 °C	1 min	x1
Denaturierung	95 °C	50 s	x18
<i>Annealing</i>	60 °C	50 s	
<i>Elongation</i>	68 °C	7 min	
Lagerung	4 °C	∞	x1

Tabelle 12: Zur Mutagenese von GRHL3 verwendete DNA-Oligonukleotid-Primer

Primer	Sequenz (5' → 3')
hSOM Y64F for	GGCCTTGAGCTTCCTCTtTGATTACTACATGGGTC
hSOM Y64F rev	GACCCATGTAGTAATCAaAGAGGAAGCTCAAGGCC
hSOM Y171F for	ACCCACCACTGATATGTtTGATAATGGCTCCCTCA
hSOM Y171F rev	TGAGGGAGCCATTATCAaACATATCAGTGGTGGGT
hSOM Y335F for	CAAAGGACAGTGCATTAaAGGCCACCTCCTCAATG
hSOM Y335F rev	CATTGAGGAGGTGGCCTtTAATGCACTGTCCTTTG

2.4.11. Agarose-Gelelektrophorese

Aufgrund ihres Zucker-Phosphatdiester-Rückgrates besitzt DNA eine negative Nettoladung anhand welcher die Auftrennung in einem elektrischen Feld möglich ist. Die Agarose-Gelelektrophorese diente der Auftrennung und Analyse von DNA-Fragmenten. Dazu wurde Agarose zu einem gewünschten Prozentsatz (w/v) in TAE (1x) durch Aufkochen gelöst. Nach dem Abkühlen auf 55 °C wurde 0,5 µg/ml Ethidiumbromid hinzugefügt, um die Fragmente später im Gel sichtbar zu machen. Dieses interkaliert in doppelsträngige DNA und emittiert bei einer Anregungswellenlänge von 312 nm Licht einer Wellenlänge von 590 nm. Zur Abschätzung der Fragmentgröße diente ein DNA-Größenstandard mit DNA-Fragmenten bekannter Größe. Durch das Anlegen eines elektrischen Feldes mit einer konstanten Feldstärke von 4-7 V/cm² wurden die einzelnen DNA-Fragmente entsprechend ihrer Größe in Richtung Anode aufgetrennt. Zur Detektion der DNA-Fragmente und der fotografischen Dokumentation wurde das Geldokumentationssystem „INTAS Gel iX Imager“ verwendet.

2.4.12. Plasmidsequenzierung

Die Sequenzierung von Plasmid-DNA wurde extern von der Firma StarSEQ GmbH durchgeführt. Die Proben wurden gemäß den von der Firma verlangten Kriterien (U-mix Protokoll) vorbereitet. In einem 0,2 ml Reaktionsgefäß wurden 0,5 µg DNA mit 1 pmol des jeweiligen Primers (siehe Tabelle 13) versehen und mit dH₂O auf ein Gesamtvolumen von 7 µl gebracht. Von StarSEQ wurde eine Textdatei mit der DNA-Sequenz sowie eine Datei mit einem Chromatogramm der Kapillarelektrophorese erhalten. Die Auswertung erfolgte durch

einen Vergleich der in der Textdatei enthaltenen Sequenz mit der erwarteten Sequenz. Dieser Sequenzvergleich wurde mit BLAST (*Basic Local Alignment Search Tool*) durchgeführt. Bei einer Abweichung während des Vergleiches wurde das Chromatogramm, welches mit dem Programm ApE (*A Plasmid Editor*, <http://biologylabs.utah.edu/jorgensen/wayned/ape/>) geöffnet wurde, zu Rate gezogen.

Tabelle 13: Zur Sequenzierung der GRHL3-Phosphomutanten verwendete DNA-Oligonukleotid-Primer

Primer	Sequenz (5' → 3')
CMV-P for2	GTACGGTGGGAGGTCTATATAAGCAG
hSOM Ex4 for1	AATGGCTCCCTCAACTCCTT
hSOM Ex11 rev1	GTCGTCTCATTGCCCTGAA
bGH pA reverse	ACTAGAAGGCACAGTCGAGG

2.5. Zellbiologische Methoden

Alle durchgeführten experimentellen Arbeiten erfolgten unter Sterilbedingungen an einer Sterilwerkbank. Die verwendeten Chemikalien, Medien und Zusätze wurden ausschließlich unter der Sterilwerkbank geöffnet und gegebenenfalls vor ihrem Einsatz autoklaviert oder steril filtriert.

2.5.1. Verwendete Zellen

Humane, venöse Nabelschnur-Endothelzellen (*human umbilical vein endothelial cells*, HUVEC), bezogen von Lonza, Köln

Humane, embryonale Nierenzellen (*human embryonal kidney*, HEK) 293FT

2.5.2. Verwendete Kulturmedien

DMEM-Komplettmedium

DMEM

+ 10 % (v/v) FCS 1 h hitzeinaktiviert bei 56 °C

+ 1 % (v/v) Pen/Strep

+ 1 % (v/v) nicht essentielle Aminosäuren

+ 1 % (v/v) Geneticin®

EBM-Komplettmedium

EBM

+ 10 % (v/v) FCS nicht hitzeinaktiviert

+ EGM™ SingleQuots®

2.5.3. Kultivierung von humanen, embryonalen Nierenzellen (HEK 293FT)

Bei HEK 293FT handelt es sich um eine adhärent wachsende, immortalisierte Zelllinie, welche als Modifikation das *large T-Antigen* des Affenvirus SV40 exprimiert. Nach dem Auftauen wurden die Zellen mit DMEM Komplettmedium in einer T-75 Zellkulturflasche bei 37 °C und 5 % CO₂ (Standardbedingungen) kultiviert. Bei einer Konfuenz von 70-90 % wurden die Zellen subkultiviert oder für den Einsatz im Experiment ausgebracht. Dazu wurde das Kulturmedium abgenommen und die Zellen einmal mit PBS gewaschen. Nach entfernen des PBS wurde 2 ml Trypsin-EDTA zu den Zellen gegeben und diese nach, dem Abrunden, durch leichtes Klopfen vom Flaschenboden gelöst. Die Trypsinreaktion wurde durch die Zugabe von 8 ml DMEM Komplettmedium gestoppt

und die Zellen durch wiederholtes Resuspendieren vereinzelt. Anschließend wurde die Zellzahl bestimmt und eine definierte Zellmenge mit einer entsprechenden Menge DMEM Komplettmedium in eine neue Zellkulturflasche oder in Zellkulturschalen überführt. HEK 293FT wurden maximal bis zur Passage 35 subkultiviert.

2.5.4. Kultivierung von primären, humanen, venösen Endothelzellen (HUVEC)

Bei HUVEC handelt es sich um adhärenente, primäre Zellen, die aus der Nabelschnur gewonnen werden. Die Zellen wurden nach dem Auftauen in Passage 1 (P1) mit EBM Komplettmedium bei 37 °C und 5 % CO₂ (Standardbedingungen) in T-75 Kulturflaschen kultiviert. Das Medium wurde alle zwei Tage durch frisches Medium ersetzt. Bei einer Konfluenz von 90-95 %, wurden die Zellen einmal subkultiviert und schließlich im Experiment in der dritten Passage (P3) eingesetzt. Zur Subkultivierung oder für den Einsatz im Experiment wurden die Zellen mit 6 ml PBS gewaschen und anschließend mit 2 ml einer Trypsin-EDTA-Lösung (1x) inkubiert, um sie vom Flaschenboden zu lösen. Das Abrunden der adhärenenten Zellen wurde optisch mit Hilfe eines Lichtmikroskops kontrolliert. Um ein Abschwimmen vom Boden der Zellkulturflasche zu vermeiden wurde die Trypsin-Reaktion rechtzeitig durch die Zugabe von 8 ml EBM Komplettmedium gestoppt. Die Zellen wurden mit Hilfe eines Zellschabers vom Flaschenboden gelöst und durch wiederholtes Resuspendieren vereinzelt. Anschließend wurden sie gezählt und in einer definierten Zahl in neue Kulturflaschen oder in Zellkulturschalen mit einer entsprechenden Menge EBM Komplettmedium überführt.

2.5.5. Bestimmung der Zellzahl

Zur Bestimmung der Zellzahl wurde eine Neubauer Zählkammer verwendet. Diese wurde mit 10 µl der Zellsuspension gefüllt. Mit Hilfe eines Lichtmikroskops wurden die vier großen Eckquadrate ausgezählt. Diese besitzen ein definiertes Volumen von 10⁻⁴ ml. Die Gesamtzellzahl pro ml konnte somit anhand folgender Formel berechnet werden:

$$\text{Zellzahl pro ml} = \frac{\text{gezählte Zellzahl}}{4} * 10^4$$

2.5.6. Transiente Transfektion

Die Transfektion von HEK 293FT Zellen erfolgte mit dem „Lipofectamine® Transfection Reagent with Plus™ Reagent“ von Thermo Fisher Scientific. Am Vortag der Transfektion wurden Zellen in 100 mm Zellkulturschalen mit einer Zellzahl von je $1,5 \times 10^6$ ausgebracht. Zur Transfektion wurden pro Ansatz 3,2 µg Plasmid-DNA mit 750 µl DMEM (ohne Zusätze) und 20 µl Plus™ Reagent gemischt und für 15 min inkubiert. Parallel wurde ein weiterer Ansatz mit 750 µl DMEM (ohne Zusätze) und 28 µl Lipofectamin® ebenfalls für 15 min inkubiert. In dieser Zeit wurden die Zellen 2x mit DMEM (ohne Zusätze) gewaschen und anschließend 5 ml DMEM (ohne Zusätze) in jeder Zellkulturschale vorgelegt. Die beiden Reaktionsansätze wurden anschließend vereint und für weitere 15 min inkubiert. Von diesem Transfektionsansatz wurde 1,5 ml auf jede Zellkulturschale gegeben und diese für 3 h unter Standardbedingungen inkubiert. Es folgte die Zugabe von 7 ml DMEM-Komplettmedium. Nach weiteren 18 h wurde das Medium durch frisches DMEM-Komplettmedium ersetzt. 24 h nach diesem Mediumwechsel wurden die Zellen wie in Abschnitt 2.5.7 beschrieben geerntet.

Für die Transfektion von HUVECs wurde das SuperFect®-*Transfection*-Reagenz der Firma QIAGEN verwendet. Am Vortag der Transfektion wurden Zellen wie in Abschnitt 2.5.4 beschrieben mit einer Zellzahl von 3×10^5 in 60 mm Zellkulturschalen überführt. Für die Transfektion wurde je 3 µg Plasmid-DNA mit 150 µl EBM (ohne Zusätze) und 25 µl SuperFect® versehen und für 10 min bei Raumtemperatur inkubiert. Während dieser Inkubationszeit wurden die Zellen 2x mit EBM (ohne Zusätze) gewaschen. Anschließend wurde dem DNA-SuperFect®-Gemisch 1 ml EBM-Komplettmedium zugegeben. Von diesem Transfektionsansatz wurde je 1,1 ml pro Zellkulturschale verwendet und unter Standardbedingungen mit den Zellen inkubiert. Nach 3 h wurde der Transfektionsansatz von den Zellen entfernt und diese mit 3 ml frischem EBM-Komplettmedium für weitere 18 h unter Standardbedingungen inkubiert. Anschließend erfolgte die Zellernte wie in Abschnitt 2.5.7 beschrieben.

2.5.7. Zellernte

Die Zellernte erfolgte 18 h nach der letzten Behandlung. Die Zellschalen wurden dazu auf Eis gestellt und die Zellen im Medium mit einem geeigneten Zellschaber vom Boden der Schalen gelöst. Die Zellsuspension wurde in ein gekühltes 50 ml Reaktionsgefäß überführt und die Kulturschale nochmal mit kaltem PBS gewaschen. Diese Restsuspension wurde ebenfalls in das 50 ml

Reaktionsgefäß überführt. Um die Zellen zu pelletieren wurden sie bei 800 xg und 4 °C für 10 min zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen, das Zellpellet in kaltem PBS resuspendiert, in ein gekühltes 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt und erneut bei 800 xg und 4 °C für 10 min zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das erhaltene Zellpellet entweder direkt für die Zellyse (siehe Abschnitt 2.6.1) verwendet oder für die spätere Fortsetzung des Experiments für kurze Zeit (1-2 Wochen) bei -20 °C oder über einen längeren Zeitraum (ab 3 Wochen) bei -80 °C gelagert.

2.6. Proteinbiochemische Methoden

2.6.1. Zellyse

Tabelle 14: Zur Zellyse verwendete Puffer

Puffer/Lösung	Zusammensetzung
Lysepuffer A (Verwendet zur IP)	20 mM Tris pH 7,4 150 mM NaCl 1 mM EDTA 1 mM EGTA 1 % (v/v) Triton-X-100
RIPA (<i>Radioimmunoprecipitation</i> -assay)-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

Zur Lyse mit Lysepuffer A wurden die Zellpellets in Lysepuffer A resuspendiert, welchem Proteaseinhibitoren und Phosphataseinhibitoren, nach Herstellerangaben verdünnt, zugesetzt waren. Die Lyse erfolgte für 20 min auf Eis. Anschließend wurde das Lysat bei 14000 xg und 4 °C für 15 min zentrifugiert. Der Überstand wurde in ein neues 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt und das Pellet verworfen.

Für die Lyse mit RIPA-Puffer wurden die Zellen in RIPA-Puffer resuspendiert, welchem Proteaseinhibitoren, nach Herstellerangaben entsprechend verdünnt, zugesetzt waren. Die Lyse erfolgte für 30 min auf Eis. Anschließend wurde das Lysat bei 16000 xg und 4 °C für 15 min zentrifugiert. Der Überstand wurde in ein neues 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt und das Pellet verworfen.

2.6.2. Proteinbestimmung nach Bradford

Für die Proteinbestimmung wurden 1 µl des Proteinlysates, mit 799 µl H₂O und 200 µl Bradfordreagenz in einer Plastikkuvette gemischt und anschließend für 5 min bei Raumtemperatur inkubiert. Die photometrische Messung erfolgte bei 595 nm. Anhand der gemessenen Extinktion und einer zuvor mit BSA erstellten Kalibrierungsgeraden wurde dann der Proteingehalt bestimmt.

2.6.3. Immunpräzipitation

Tabelle 15: Verwendete Antikörper

Antigen	Spezies	Hersteller
GRHL3	Kaninchen	Merck Millipore, Darmstadt
myc-Tag (9B11)	Maus	Cell Signalling Technology, Frankfurt am Main
c-myc (sc-40)	Maus	Santa Cruz Biotechnology, Heidelberg
Xpress	Maus	Invitrogen/Life Technologies, Darmstadt

Von der in Ethanol gelagerten Protein A-gekoppelten Sepharose (Sepharose A) und der Protein G-gekoppelten Sepharose (Sepharose G) wurde zunächst eine entsprechend benötigte Menge 3x mit PBS gewaschen, um das Ethanol vollständig zu entfernen. Dazu wurde die Suspension bei 3200 xg und 4 °C für 3 min zentrifugiert und der Überstand verworfen. Das erhaltene Pellet wurde in Abhängigkeit von der Pelletgröße schließlich in einem bestimmten Volumen PBS aufgenommen. Die dazu benötigte Menge PBS entsprach einem Volumenverhältnis von 1:1 (Sepharose:PBS).

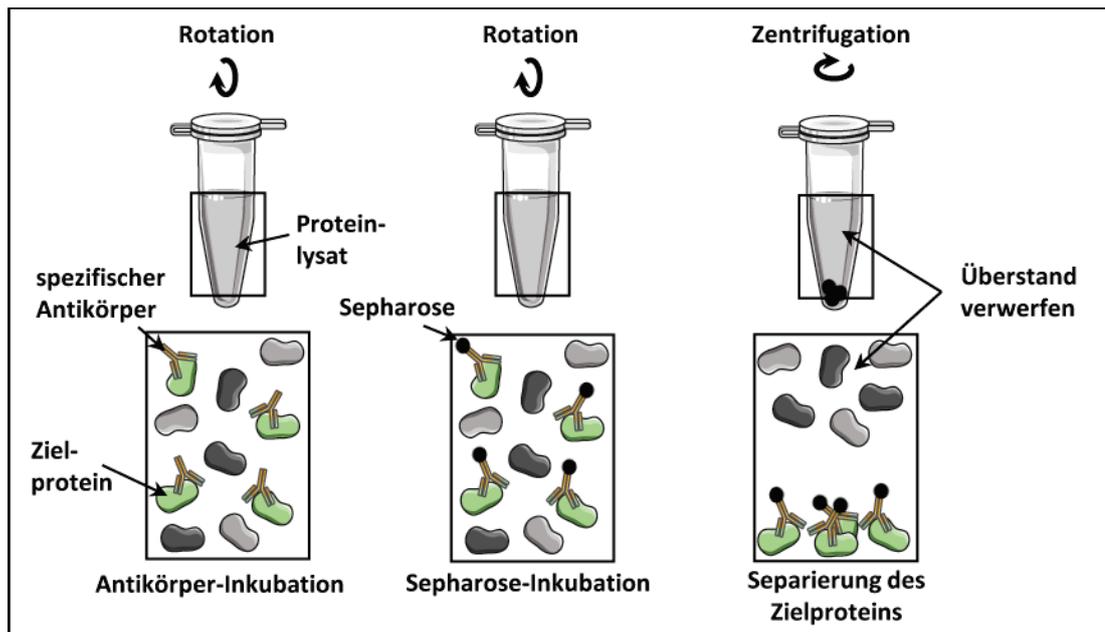


Abbildung 8: Ein Proteingemisch wird mit einem spezifischen, gegen das Zielprotein gerichteten Antikörper inkubiert. Anschließend werden Protein A und Protein G gekoppelte Sepharosekügelchen hinzugegeben, um den Antigen-Antikörper-Komplex zu binden. Mittels Zentrifugation kann dieser Komplex pelletiert und von den übrigen Proteinen isoliert werden.

Der Ablauf der Immunpräzipitation ist in Abbildung 8 schematisch dargestellt. Eine, auf dem jeweiligen Hintergrund des Experimentes basierende Proteinmenge (0,5-2 mg), wurde in einer Konzentration von 1 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ eingesetzt. Die entsprechende Menge Proteinlysat wurde dazu mit Lysepuffer in einem 1,5 ml Reaktionsgefäß auf die benötigte Konzentration eingestellt. Um unspezifische Bindungen zu minimieren wurde das Lysat 1 h mit je 30 μl pro mg Protein, der Sepharose A und der Sepharose G unter kontinuierlichem invertieren mit Hilfe eines Überkoprotators bei 4 °C inkubiert. Anschließend wurde die Sepharose durch eine Zentrifugation bei 3200 xg und 4 °C für 5 min pelletiert. Der Überstand wurde in ein neues 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt und mit 2 μg Antikörper pro mg Protein versetzt. Die Antikörperinkubation erfolgte über Nacht bei 4 °C im Überkoprotator. Nach dieser Inkubation wurde den Proben jeweils 40 μl pro mg Protein, Sepharose A und Sepharose G zugegeben und die Versuchsansätze für 2 h bei 4 °C im Überkoprotator. Im Anschluss wurde die Sepharose mittels Zentrifugation bei 3200 xg und 4 °C für 5 min pelletiert und der Überstand verworfen. Der an die Sepharose gebundene Antigen-Antikörper-Komplex wurde 4x mit jeweils 500 μl dem zu Beginn eingesetzten Lysepuffer gewaschen und anschließend bei 3200 xg und 4 °C für 3 min zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen. Das Sepharosepellet wurde in 40 μl Proteinprobenpuffer (2x) aufgenommen.

2.6.4. Natriumdodecylsulfat (*sodium dodecyl sulfate*) - Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE)

Tabelle 16: Puffer für die SDS-PAGE

Puffer/Lösung	Zusammensetzung
Proteinprobenpuffer (5x)	312,5 mM Tris-HCl pH 6,8 10 % (w/v) SDS 50 % (v/v) Glycerin 250 mM DTT 0,05 % Bromphenolblau
SDS-Laufpuffer	25 mM Tris 0,1 % (w/v) SDS 192 mM Glycin

Bei der SDS-PAGE erfolgt die Auftrennung von Proteinen nach ihrem Molekulargewicht in einer vertikalen Elektrophoresekammer. Die Auftrennung erfolgt in einem Polyacrylamidgel, welches, abhängig von der eingesetzten Polyacrylamid-Bisacrylamidmenge, eine Gitternetzstruktur mit einer definierten Porengröße aufweist. Durch das Anlegen eines elektrischen Feldes werden die durch SDS negativ geladenen Proteine entsprechend ihrer Größe im Gel aufgetrennt. Eine definierte, mit Proteinprobenpuffer (5x) versetzte Proteinmenge oder die aus der Immunpräzipitation gewonnenen Eluate (siehe Abschnitt 2.6.3), wurden im Vorfeld der SDS-Page bei 95 °C für 5 min erhitzt. Diese Ansätze wurden anschließend in die Geltaschen gefüllt und eine konstante Feldstärke von 1-2 V/cm² angelegt. Zunächst wurden die Proben in einem 5 %-igen Sammelgel aufkonzentriert und anschließend im Trenngel bis zum Erreichen der gewünschten Auftrennung elektrophoretisch separiert. Je nach Größe der zu detektierenden Proteine wurde ein 10 %-iges oder ein 13 %-iges Trenngel verwendet (siehe Tabelle 17). Zur Abschätzung der Proteingröße wurde parallel ein Proteingrößenstandard aufgetrennt. Nach der Elektrophorese wurde das Gel entweder mit Coomassie-Brillant-Blau gefärbt (siehe Abschnitt 2.6.6) oder für einen Western-Blot mit anschließender Immundetektion verwendet (siehe Abschnitt 2.6.5).

Tabelle 17: Übersicht über die Zusammensetzung der verwendeten Trenn- und Sammelgele

Komponente	Trenngel (10 %)	Trenngel (13 %)	Sammelgel (5 %)
Acrylamid-Mix (30 %)	10 % (v/v)	13 % (v/v)	5 % (v/v)
Tris-HCl (pH 8,8)	390 mM	390 mM	-
Tris-HCl (pH 6,8)	-	-	126 mM
SDS	0,1 % (v/v)	0,1 % (v/v)	0,1 % (v/v)
APS	0,1 % (v/v)	0,1 % (v/v)	0,1 % (v/v)
TEMED	0,04 % (v/v)	0,04 % (v/v)	0,1 % (v/v)

2.6.5. Western-Blot mit anschließender Immundetektion

Tabelle 18: Puffer für den Western-Blot

Puffer/Lösung	Zusammensetzung
Blockierungslösung	5 % (w/v) Milchpulver oder BSA in TBS-T
Transferpuffer mit SDS	48 mM Tris-Base 386 mM Glycin 0,05 % (w/v) SDS 20 % (v/v) Methanol
Transferpuffer ohne SDS	24 mM Tris-Base 193 mM Glycin 20 % (v/v) Methanol
Tris-gepufferte Salzlösung + Tween®-20 (<i>tris buffered saline</i> + Tween®-20, TBS-T)	50 mM Tris-Base 150 mM NaCl 5 mM KCl 0,01 % (v/v) Tween®-20

Tabelle 19: Verwendete Primär- und Sekundärantikörper

Antigen	Spezies	Verdünnung	Hersteller
GRHL3	Kaninchen	1:1000 in 1 % MP/TBS-T	Merck Millipore, Darmstadt
P-Tyrosin	Maus	1:1000 in 1 % BSA/TBS-T	Merck millipore, Darmstadt
c-myc (sc-40)	Maus	1:500 in 1 % MP/TBS-T	Santa Cruz Biotechnology, Heidelberg
myc-Tag (9B11)	Maus	1:500 in 1 % MP/TBS-T	Cell Signalling Technology, Frankfurt am Main
γ -Actin	Maus	1:2000 in 1 % MP/TBS-T	Santa Cruz Biotechnology, Heidelberg
ERK	Kaninchen	1:1000 in 1 % MP/TBS-T	Cell Signalling Technology, Frankfurt am Main
eNOS	Kaninchen	1:500 in 1 % MP/TBS-T	Abcam, Cambridge, UK
Anti-Maus IgG (HRP-gekoppelt)	Schaf	1:5000	GE Healthcare Life Sciences, Freiburg
Anti-Kaninchen IgG (HRP-gekoppelt)	Esel	1:5000	GE Healthcare Life Sciences, Freiburg

Mit Hilfe eines Western-Blot werden die in der SDS-PAGE aufgetrennten Proteine (siehe Abschnitt 2.6.4) auf eine Membran übertragen. Dafür wurde eine Polyvinylidenfluorid-(PVDF)-membran verwendet. Der Transfer der Proteine erfolgte durch das Anlegen eines elektrischen Feldes aus dem Trenngel auf die Membran. Dabei bleibt das Trennungsmuster der Proteine erhalten. Die PVDF-Membran wurde für eine Minute in Methanol aktiviert, kurz mit dH₂O gewaschen und anschließend zusammen mit Whatman-Filterpapieren, Blot-Schwämmen und dem Gel in Transferpuffer equilibriert. Der Aufbau des Blots ist in Abbildung 9 schematisch dargestellt. Der Transfer aus einem 13 %-igen Gel auf die Membran erfolgte für 1 h bei 100 V, die Übertragung aus einem 10 %-igen Gel für 1,5 h. Wenn Proteine mit einem Molekulargewicht von mehr

als 70 kDa detektiert werden sollten erfolgte der Transfer bei 80 V für 2 h. Bei der verwendeten Blot-Methode handelte es sich um einen Tank-Blot. Abhängig von dem Molekulargewicht der zu detektierenden Proteine wurden unterschiedliche Transferpuffer verwendet. Für den Transfer bei 100 V wurde ein Transferpuffer ohne SDS verwendet, bei dem Transfer bei 80 V ein Transferpuffer mit SDS (siehe Tabelle 18). Um eine Überhitzung zu verhindern wurde der Transfer entweder bei 4 °C oder mit Hilfe eines Eiswasserbades durchgeführt.

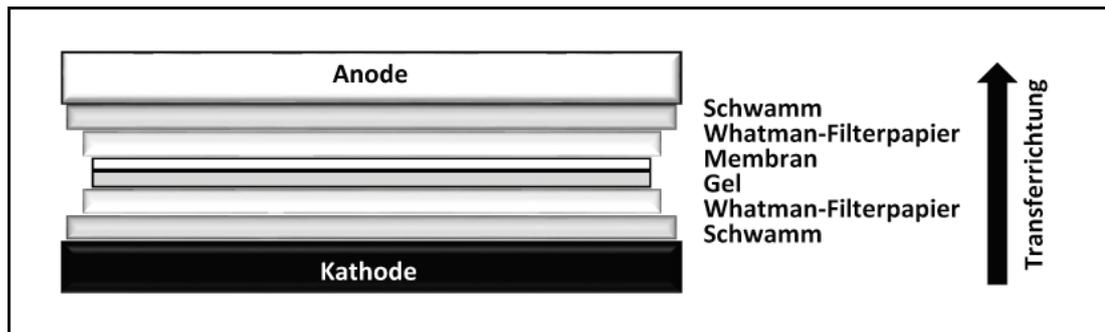


Abbildung 9: In einer Blotapparatur wird zwischen zwei Blot-Schwämmen und Whatman-Filter-Papieren die Membran auf das Gel gelegt. Dabei befindet sich das Gel auf der zur Kathode und die Membran auf der zur Anode gewandten Seite. Durch das Anlegen eines elektrischen Feldes bewegen sich die negativ maskierten Proteine in horizontaler Laufrichtung zur Anode und werden so aus dem Gel auf die Membran transferiert.

Im Anschluss an den Transfer erfolgte die Detektion der nachzuweisenden Proteine mit Hilfe von Antikörpern. Um eine unspezifische Bindung der Antikörper an die Membran zu verhindern, wurde die Membran, in Abhängigkeit von dem eingesetzten Primärantikörper, zunächst mit 5 % (w/v) Magermilchpulver oder 5 % (w/v) BSA in TBS-T bei Raumtemperatur und 80 rpm auf einem Orbitalschüttler für 1 h blockiert. Anschließend erfolgte die Inkubation mit dem jeweiligen Primärantikörper (siehe Tabelle 19). Dieser wurde entsprechend in 1 % (w/v) der jeweils zum Blockieren verwendeten Lösung verdünnt, auf die Membran gegeben und bei 4 °C über Nacht inkubiert. Nach dieser Inkubation wurde die Membran 3x mit TBS-T bei Raumtemperatur und 80 rpm auf einem Orbitalschüttler gewaschen, um ungebundene Reste des Primärantikörpers zu entfernen und so eine unspezifische Bindung des Sekundärantikörpers zu minimieren. Der Meerrettischperoxidase (*horseradish peroxidase*, HRP)-gekoppelte Sekundärantikörper (siehe Tabelle 19) war jeweils gegen die Spezies gerichtet, in welcher der Primärantikörper generiert wurde und wurde, in 1 % (w/v) der entsprechend zum Blockieren verwendeten Lösung verdünnt (siehe Tabelle 18), für 1 h bei Raumtemperatur und 80 rpm auf einem Orbitalschüttler mit der Membran inkubiert. Anschließend wurde die Membran wie zuvor beschrieben

3x gewaschen. Der Nachweis der Antikörperbindung erfolgte mit Hilfe eines Chemilumineszenz-(*enhanced chemiluminescence*, ECL)-substrates, welches nach Angaben des Herstellers verwendet wurde. Dieses Substrat wurde durch die an den Sekundärantikörper gekoppelte Meerrettischperoxidase umgesetzt, wobei es zu der Entstehung von Licht kommt. Dieses Lichtsignal wurde in einer Autoradiographie Kasette auf einem Röntgenfilm detektiert. Die Detektion unterschiedlicher Expositionszeiten und die Entwicklung des Röntgenfilms wurden in einer Dunkelkammer durchgeführt. Zur semiquantitativen Analyse der detektierten Proteinsignale wurde das Program ImageJ 1.46r verwendet. Zur statistischen Auswertung wurde ein zweiseitiger, gepaarter *Student's* T-Test durchgeführt

2.6.6. Coomassie-Brilliant-Blau Färbung

Tabelle 20: Lösungen für die Coomassie-Brilliant-Blau Färbung

Lösung	Zusammensetzung
Coomassie-Brilliant-Blau-Färbelösung	0,02 % (w/v) „Coomassie Brilliant Blue G-250“ 5 % (w/v) Aluminiumsulfat-18-Hydrat 10 % (v/v) Ethanol (96 %) 2 % (v/v) ortho-Phosphorsäure (85 %)
Coomassie-Entfärbelösung	10 % (v/v) Ethanol (96 %) 2 % (v/v) ortho-Phosphorsäure (85 %)

Coomassie-Brilliant-Blau lagert sich an basische Seitenketten von Aminosäuren und ermöglicht so die Detektion der im Gel enthaltenen Proteine. Zur Visualisierung der Proteine wurde das Gel aus der SDS-PAGE (siehe Abschnitt 2.6.4) kurz mit dH₂O gewaschen und über Nacht bei Raumtemperatur und 80 rpm auf einem Orbitalschüttler in einer Coomassie-Brilliant-Blau-Färbelösung inkubiert. Nach der Inkubation mit der Färbelösung wurde das Gel für 10 min bei Raumtemperatur und 80 rpm auf einem Orbitalschüttler mit einer Coomassie-Entfärbelösung inkubiert und anschließend mehrmals mit dH₂O gewaschen. Das Gel wurde anschließend bei 4 °C in dH₂O gelagert oder direkt für den tryptischen In-Gel-Verdau verwendet.

2.6.7. Tryptischer In-Gel-Verdau

Tabelle 21: Puffer und Lösungen für den Tryptischen In-Gel-Verdau

Puffer/Lösung	Zusammensetzung
Coomassie-Entfärbelösung	40 % (v/v) Ethanol (96 %) 2 % (v/v) ortho-Phosphorsäure (85 %)
Waschlösung 1	25 mM NH ₄ HCO ₃ 50 % (v/v) Acetonitril
Waschlösung 2	100 % (v/v) Acetonitril
Trypsinpuffer B	25 mM NH ₄ HCO ₃
Trypsinlösung (0,033 µg/µl)	600 µl Trypsinpuffer 20 µg Trypsin
Elutionspuffer	50 % (v/v) Acetonitril 5 % (v/v) Ameisensäure

Für den tryptischen Verdau der Proteine wurden einzelne, mit Coomassie-Brilliant-Blau angefärbte Proteinbanden (siehe Abschnitt 2.6.6) aus dem Gel ausgeschnitten, in kleinere Stücke zerkleinert und in ein 0,5 ml ProteinLoBind Reaktionsgefäß überführt. Zur kompletten Entfärbung der Gelstücke wurden 200 µl einer Coomassie-Entfärbelösung (siehe Tabelle 21) zugegeben und diese für 10 min auf einem Vortex-Mixer bei geringer Stufe geschüttelt. Je nach Farbintensität wurde dieser Schritt 2x bis 3x wiederholt. Die entfärbten Gelstücke wurden 1x für 10 min und 3x für 20 min mit Waschlösung 1 gewaschen (siehe Tabelle 21). Dazu wurden diese erneut bei geringer Stufe geschüttelt. Anschließend erfolgte ein letzter Waschschrift mit 100 µl Waschlösung 2 (siehe Tabelle 21). Die Gelstücke wurden daraufhin für 30 min in einer Vakuumzentrifuge getrocknet und anschließend mit Trypsinlösung (siehe Tabelle 21) versetzt. Nach einer Rehydrierungszeit von 1-2 min auf Eis hatten die Gelstücke ihr Ursprungsvolumen erreicht. Überschüssige Trypsinlösung wurde abgenommen und die Gelstücke für 30 min auf Eis inkubiert. Danach wurden sie mit 30 µl Trypsinpuffer B (siehe Tabelle 21) überschichtet und für 16 h bei 37 °C inkubiert. Nach Beendigung des Verdaustrittes erfolgte die Elution der entstandenden Peptide aus den Gelstücken. Die im Überstand befindlichen Peptide wurden zunächst in ein 0,5 ml ProteinLoBind Reaktionsgefäß überführt. Die noch im Gel befindlichen Peptide wurden anschließend sequentiell extrahiert. Hierzu wurden

die Gelstücke mit 60 µl dH₂O versehen, 15 min geschüttelt und für 15 min im Ultraschallbad beschallt. Danach wurde der Überstand abgenommen und mit dem zuvor gesammelten Überstand vereint. Im darauf folgenden Schritt wurde den Gelstücken 3x 30 µl Elutionspuffer (siehe Tabelle 21) zugegeben, 15 min geschüttelt, 15 min beschallt und der Überstand mit dem vorherigen vereint. Zuletzt wurden 30 µl 100 % Acetonitril zu den Gelstücken gegeben, diese für 15 min geschüttelt und für 15 min beschallt. Nachdem auch dieser Überstand abgenommen und mit dem Rest vereint wurde, wurden sie in einer Vakuumzentrifuge bis zur Trocknung eingeengt. Die Proben wurden im Anschluss bei -20 °C bis zur massenspektrometrischen Analyse (siehe Abschnitt 2.6.8) gelagert.

2.6.8. Massenspektrometrische Analyse (MS)

Tabelle 22: Lösungsmittel für für die massenspektrometrische Analyse

Lösungsmittel	Zusammensetzung
Lösungsmittel 1	4 % (v/v) Methanol 5 % (v/v) Ameisensäure
Lösungsmittel 2	60 % (v/v) Methanol 5 % (v/v) Ameisensäure
Lösungsmittel 3	80 % (v/v) Acetonitril 5 % (v/v) Ameisensäure

Für die massenspektrometrische Analyse ist die Entfernung störender Salzkomponenten erforderlich. Dazu wurden die Peptide in 10 µl Lösungsmittel 1 (siehe Tabelle 22) aufgenommen. Eine C₁₈-*StageTip*-Säule wurde 2x mit 10 µl Lösungsmittel 3 (siehe Tabelle 22) aktiviert und 3x mit 10 µl Lösungsmittel 1 äquilibriert. Die Säule wurde mit der Probe beladen und anschließend 3x mit Lösungsmittel 1 gewaschen. Die Elution der, an die stationäre Phase der Säule gebundenen, Peptide erfolgte mit 10 µl Lösungsmittel 2 (siehe Tabelle 22). Das Eluat wurde, um die Ausbeute zu erhöhen, erneut an der stationären Phase der Säule vorbeigeführt und anschließend direkt für die Messung verwendet.

Die massenspektrometrische Analyse erfolgte an einem Elektrospray-Ionisations (ESI)-Massenspektrometer (ESI-QqTOF). Hierbei handelt es sich um ein Hybrid-Massenspektrometer mit Quadrupol (Qq) und Flugzeit- (*time of flight*, TOF)-Analysator. Als Ionenquelle diente dabei ein Nanospray™. Der Aufbau dieses Gerätes ist in Abbildung 10 schematisch dargestellt.

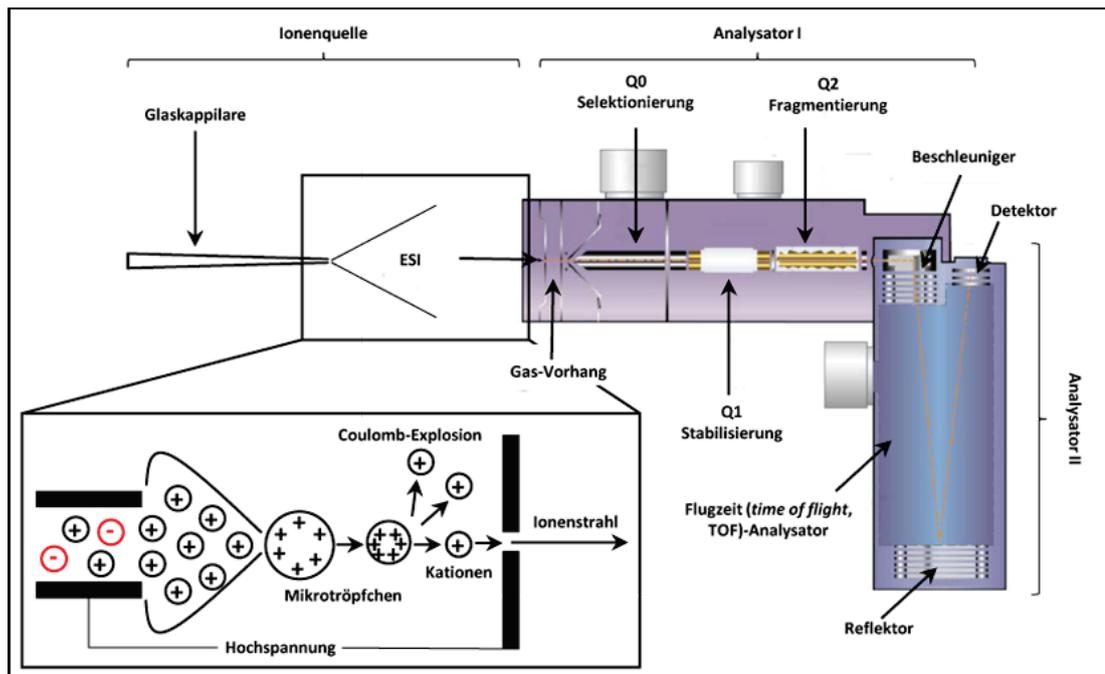


Abbildung 10: Aufbau des verwendeten Massenspektrometers QSTAR XL. Als Ionenquelle dient eine Elektrospray-Ionisierung (ESI). Die gelösten Peptide (Analytmoleküle) werden dazu kontinuierlich über eine Glaskapillare geleitet. Durch die angelegte Hochspannung werden die positiv geladenen Peptide (Kationen) von den negativ geladenen Peptiden getrennt und an die Flüssigkeitsoberfläche gezogen, wobei sich ein Flüssigkeitskonus (Taylor-Konus) bildet. Dieser wird in einiger Entfernung instabil und zerfällt in kleine geladene Tröpfchen. Durch die Verdampfung des Lösungsmittels verkleinert sich der Radius dieser Tröpfchen und die Ladungsdichte nimmt zu. Aufgrund der Abstoßungskräfte gleicher Ladungen kommt es schließlich zu einem spontanen Zerfall der Tröpfchen (Coulomb-Explosion), wodurch Tröpfchen entstehen, welche nur noch ein einziges Analytmolekül enthalten (Mikrotröpfchen). Diese werden dann als Ionenstrahl in das Massenspektrometer geleitet. Als erster Analysator (Analysator I) dienen drei aufeinanderfolgende Quadropole (Q0-Q2). Q0 dient der Stabilisierung des divergierenden Ionenstrahls und dem Transfer zu Q1, welcher zur Selektion bestimmter Peptidmassen verwendet wird. Q2 fungiert als Kollisionszelle bei der Fragmentierung einzelner selektionierter Peptide. Bei dem Zweiten Analysator (Analysator II) handelt es sich um einen Flugzeit (*time of flight*, TOF)-Analysator. Die selektionierten Peptide/Fragmente werden dazu beschleunigt, mit Hilfe eines Reflektors umgelenkt und schließlich detektiert, was zu Generierung spezifischer Peptid-/Fragmentmuster führt (Modifiziert nach AB Sciex).

Die zu analysierende Probe wurde in eine Metall-bedampfte Glaskapillare überführt, an die eine Spannung von 1,2 kV angelegt wurde. Die Messung der Peptide erfolgte im Positivmodus mit Hilfe des Messprogramms Analyst QS Version 1.1 (AB Sciex, Darmstadt) jeweils über 5 min. Zur Kalibrierung des Gerätes wurde die Masse eines synthetischen Peptides (ALILTLVS) in Gegenwart von Cäsiumchlorid gemessen. Die theoretischen Massen, auf welche kalibriert wurde, waren 828,5559 Da (Peptid) und 132,9049 Da (Cäsiumchlorid). Für die Kalibrierung wurde in einem Massenbereich von 100 m/z bis 1000 m/z gemessen. Zur Generierung eines Übersichtsspektrums der zu analysierenden Proben wurden Massen im Bereich von 350 m/z bis 1300 m/z gemessen.

Einzelne Peptide wurden anschließend für eine weitere MS/MS-Analyse ausgewählt. Die Aufnahme des Fragmentspektrums erfolgte in einem Massenbereich von 50 m/z bis $[M+H]^+$ (errechnete Masse des gewählten Peptides) und mit einer Kollisionsenergie von 25-40 %. Die Fragmentspektren wurden mit Hilfe der Software BioAnalyst Version 3.0 unter Verwendung der Mascot Suchmaschine (Version 2.5.1, Matrix Science, London, United Kingdom) ausgewertet. Folgende Suchparameter wurden zur Datenbankanalyse festgelegt:

- Datenbank: UniProtKB/SwissProt (Stand: 2016-04 mit 550960 Sequenzen und 196692942 Aminosäureresten)
- Protease: Trypsin (+1 übergangene Spaltung (*missed cleavage*))
- Variable Modifikation: Oxidation (M)
- Peptidtoleranz: $\pm 1,2$ Da
- MS/MS Toleranz: $\pm 0,6$ Da

Ein Protein wurde als identifiziert betrachtet, wenn ihm mindestens 5 Peptide zugeordnet werden konnten oder eine Sequenzabdeckung von ≥ 12 % vorlag.

2.6.9. Immunfluoreszenzfärbung

Tabelle 23: Puffer und Lösungen für die Immunfluoreszenzfärbung

Puffer/Lösung	Zusammensetzung
Fixierlösung	4 % (w/v) Paraformaldehyd
Triton-Puffer	3 % (w/v) Rinderalbumin (<i>bovine serum albumin</i> , BSA) 0,3 % (v/v) Triton-X-100BB
FSG-Puffer	10 % (v/v) Pferdeserum + 0,6 % (w/v) Fischhautgelatine (<i>fish skin gelatin</i> , FSG)

Tabelle 24: Übersicht über die für die Immunfluoreszenzfärbungen verwendeten Antikörper

Antigen	Spezies	Verdünnung	Hersteller
GRHL3	Kaninchen	1:1000 in FSG-Puffer oder PBS	Merck Millipore, Darmstadt
CD31	Ratte	1:25 in FSG-Puffer	Dianova, Hamburg
<i>smooth-muscle-Actine</i> 1A4 (FITC gekoppelt)	Maus	1:250 in FSG-Puffer	Sigma-Aldrich, München
Anti-Kaninchen IgG (Alexa Fluor® 555 gekoppelt)	Esel	1:250 in FSG-Puffer	Thermo Fisher Scientific, Schwerte
Anti-Ratte IgG (Alexa Fluor® 488 gekoppelt)	Esel	1:250 in FSG-Puffer	Thermo Fisher Scientific, Schwerte
Anti-Kaninchen IgG ((Alexa Fluor® 594 gekoppelt)	Ziege	1:500 in PBS	Thermo Fisher Scientific, Schwerte

Im Vorfeld der Immunfluoreszenzfärbung einzelner Zellen wurden zunächst Deckgläschen für mind. 3 h mit 7 % Essigsäure überschichtet und in einer Glasschale bei 20 rpm geschwenkt. Anschließend wurden sie 1x mit PBS und anschließend mehrfach mit autoklaviertem H₂O gewaschen, bis kein Essigeruch mehr wahrgenommen wurde. Die Deckgläschen wurden mit 100 % Ethanol überschichtet und unter einer Sterilwerkbank getrocknet. Anschließend wurden sie als 6-12er Pack autoklaviert.

Auf die so vorbereiteten Deckgläbchen wurden Zellen mit einer Zellzahl von 7×10^4 ausgebracht und für 21 h unter Standardbedingungen kultiviert. Anschließend wurde das Kulturmedium abgenommen, die Zellen 1x mit PBS gewaschen und mit Fixierlösung für 15 min inkubiert. Nachdem die Zellen 3x mit PBS gewaschen wurden, wurden sie mit Triton-Puffer für 15 min permeabilisiert und gleichzeitig unspezifische Bindestellen blockiert. Anschließend wurden sie 3x mit PBS gewaschen und der Primärantikörper, in PBS verdünnt, über Nacht auf den Zellen inkubiert. Die Verwendung Fluorophor-gekoppelter Sekundärantikörper erforderte, dass die weiteren Arbeiten unter Lichtausschluss durchgeführt wurden. Vor Zugabe des Sekundärantikörpers wurden die Zellen 3x mit PBS ge-

waschen. Der Sekundärantikörper wurde in PBS verdünnt für 1 h mit den Zellen inkubiert. Anschließend wurden diese 3x PBS gewaschen. Zur Visualisierung der Zellkerne wurde 0,1 µg/ml DAPI in PBS für 5 min auf die Zellen gegeben. Nachdem die Zellen 3x mit PBS gewaschen wurden, wurden die Deckgläschen mit „ProLong® Gold Antifade Mountant“ auf Objektträgern platziert, für 24 h getrocknet und anschließend mit Nagellack versiegelt. Die Fluoreszenzmikroskopische Analyse erfolgte an einem Fluoreszenzmikroskop (Axiovert 200M) unter Verwendung eines Objektivs mit einer 40-fachen Vergrößerung. Die fotografische Dokumentation erfolgte mit Hilfe der Software AxioVision 4.8 von Carl Zeiss.

Für die Immunfluoreszenzfärbung von Gewebeschnitten wurden 5 µm dicke Querschnitte von Maus-Aorten verwendet. Die dazu verwendeten Aorten wurden nach der Isolierung, mit Fixierlösung für 2 h bei Raumtemperatur fixiert und anschließend in 70 % Ethanol überführt. Zur Einbettung in Paraffin und der Anfertigung der Schnitte wurden die Aorten an die *Histological Core Facility* des *Cardiovascular Research Centers* an der Universität von Virginia übergeben. Jeweils 3 Schnitte wurden auf einen Objektträger platziert. Für die verschiedenen Färbungen wurden immer 10 Objektträger, im Abstand von jeweils 150 µm bis zum nächsten Schnitt verwendet. Zur Deparaffinierung und Rehydrierung der Schnitte wurden diese jeweils für 2x 5 min zunächst in Xylol inkubiert. Anschließend folgten je zwei Inkubationen für jeweils 5 min in einer absteigenden Ethanolreihe (100 %, 95 %, 70 %). Schließlich wurden die Objektträger 2x 5 min mit H₂O gewaschen. Es folgte eine Hitze-induzierte Demaskierung der Antigene. Dazu wurden die Objektträger in einem Natrium-Citrat Puffer für insgesamt 20 min in einer handelsüblichen Mikrowelle erhitzt. Dabei wurde der Anteil des durch die Hitze verdunsteten Wassers im Puffer regelmäßig durch die Zugabe von dH₂O ersetzt. Im Anschluss wurden die Objektträger für 1 h bei Raumtemperatur abgekühlt. Danach konnte mit Hilfe eines „PAP-Pen“ eine hydrophobe Barriere um die Schnitte gezogen werden. Dadurch war es möglich den FSG-Puffer (siehe Tabelle 23), sowie die entsprechenden Antikörperlösungen in einem möglichst geringen Volumen auf den Schnitten zu inkubieren. Die Blockierung der unspezifischen Bindestellen in den Schnitten wurde, mit dem in Tabelle 23 aufgeführten FSG-Puffer, für 1 h bei Raumtemperatur durchgeführt. Anschließend wurde der Puffer abgenommen und der Primärantikörper, in frischem FSG-Puffer verdünnt, für 1 h auf den Schnitten inkubiert. Vor Zugabe des Sekundärantikörpers wurden die Schnitte 1x 5 min mit PBS + 0,6 % Fischhautgelatine und 0,1 % Tween®20 und 1x 5 min mit

PBS gewaschen. Die Verwendung Fluorophor-gekoppelter Sekundärantikörper erforderte, dass die weiteren Arbeiten unter Lichtausschluss durchgeführt wurden. Der Sekundärantikörper wurde ebenfalls in FSG-Puffer verdünnt und für 1 h bei Raumtemperatur inkubiert. Im Anschluss wurden die Schnitte erneut wie zuvor beschrieben gewaschen. Zum Anfärben der Zellkerne wurden die Schnitte für 15 min mit DAPI (4',6-Diamidin-2-phenylindol) inkubiert, welches mit einer Konzentration von 0,1 µg/ml in PBS verdünnt wurde. Nachdem die Objektträger 3x 5 min mit PBS gewaschen wurden, konnten die Schnitte mit dem „ProLong® Gold Antifade Mountant“ und einem Deckgläschen versehen werden. Nach 24 h wurden die Deckgläschen mit Nagellack versiegelt. Die fluoreszenzmikroskopische Analyse der gefärbten Schnitte erfolgte an einem konfokalen Lasermikroskop (LSM 880) unter Verwendung eines Objektivs mit einer 20-fachen Vergrößerung. Die fotografische Dokumentation erfolgte mit Hilfe der Software ZEN 2.1 von Carl Zeiss unter Verwendung des Kachel (*Tiling*)-Modus.

3. Ergebnisse

Im Gegensatz zur Maus besitzen Menschen drei Isoformen von GRHL3. Dabei ist die Isoform 2 die einzige Isoform, die auch in der Maus vorkommt. Die unterschiedlichen Isoformen entstehen durch die Verwendung eines alternativen, human-spezifischen ersten Exons (Isoform 1) sowie durch alternatives Spleißen des von diesem Exon ausgehenden Primärtranskriptes (Isoform 3). Alle drei Isoformen werden in humanen Endothelzellen ko-exprimiert. Die Isoform 3 zeigt im Vergleich zu den anderen beiden Isoformen gegenläufige funktionelle Eigenschaften. Die Isoformen 1 und 2 wirken pro-migratorisch und anti-apoptotisch, während die Isoform 3 eine anti-migratorische und pro-apoptotische Wirkung zeigt [44]. Eine solch unterschiedlichen Funktion kann u. a. durch eine differentielle Regulation der Isoformen erklärt werden. Zu der Regulation von GRHL3 im Endothel ist bisher jedoch nur sehr wenig bekannt. Es wurde bereits gezeigt, dass durch NO die Expression der Isoformen unterschiedlich beeinflusst wird [44]. Im Rahmen dieser Arbeit sollten daher die Regulationsmechanismen von GRHL3 in Endothelzellen genauer untersucht werden. Dazu wurden Versuche auf Expressionsebene im Tiermodell und *ex vivo*, sowie auf Ebene des funktionellen Proteins durchgeführt. Diese Untersuchungen wurden dabei an Isoform 2 vorgenommen, bei der es sich um die im Endothel am stärksten exprimierte Isoform handelt. Zudem sollten im Rahmen dieser Arbeit auch *in vivo* Versuche in der Maus durchgeführt werden, welche als einzige Isoform von GRHL3 die Isoform 2 exprimiert.

Für die Analyse der Regulationsmechanismen wurde ein besonderer Fokus auf die Phosphorylierung gelegt, da es sich bei dieser post-translationalen Modifikation um einen häufigen, sehr gut charakterisierten Mechanismus zur Regulation von Transkriptionsfaktoren handelt. Des Weiteren wurde untersucht, welchen Einfluss verschiedene Stimuli auf die Phosphorylierung von GRHL3 haben und ob Mitglieder der Src-Kinase-Familie an dieser Phosphorylierung beteiligt sind. Die Interaktion mit anderen Proteinen stellt eine weitere Möglichkeit der Regulation von Transkriptionsfaktoren, aber auch der Expression ihrer Zielgene, dar. Deshalb wurden in der vorliegenden Arbeit Untersuchungen zur Identifizierung neuer Interaktionspartner von GRHL3 durchgeführt.

Da bereits frühere Versuche zeigten, dass NO die Expression von GRHL3 reguliert, wurde zusätzlich in einem Zellkulturmodell untersucht, welchen Einfluss LDL, als NO-beeinflussender Stimulus, auf die Expression von GRHL3 hat. Die gewonnenen Ergebnisse wurden, anschließend in einem Tiermodell verifiziert.

3.1. Etablierung eines Antikörpers zur Untersuchung des endogenen GRHL3

Alle bisherige Versuche zu GRHL3 waren entweder auf RNA-Ebene, mit einem Epitop-*Tag* markierten, überexprimierten Protein oder mittels *knock down* durch RNA-Interferenz durchgeführt worden, da kein geeigneter Antikörper gegen GRHL3 kommerziell erhältlich war. Um im Rahmen dieser Arbeit das endogene GRHL3-Protein untersuchen zu können, wurde in Zusammenarbeit mit der Firma Merck Millipore (Darmstadt) ein neuer GRHL3-Antikörper etabliert. Mehrere Kaninchen (19186-19189) wurden dazu von Merck Millipore mit einem synthetisch hergestellten Peptid immunisiert. Das 20 Aminosäuren lange Peptid entsprach den Aminosäuren 403 bis 422 der GRHL3 Isoform 2 mit der Sequenz GAERKMRDDERKQFRRKVKC. Für die Etablierung dieses Antikörpers wurden zunächst die Seren der Kaninchen auf ihre Reaktivität und Spezifität gegenüber GRHL3 vor und nach der Immunisierung untersucht, um entsprechend ein Serum oder mehrere Seren für eine weitere Aufreinigung zu identifizieren. Der aufgereinigte Antikörper wurde anschließend auf die Verwendbarkeit in verschiedenen biochemischen Anwendungen hin geprüft.

3.1.1. Analyse nativer Kaninchen-Seren

Vor und nach der Immunisierung wurden den Kaninchen jeweils Serumproben entnommen und diese im Rahmen der vorliegenden Arbeit auf die Anwesenheit GRHL3-spezifischer Antikörper hin untersucht. Dazu wurden HEK 293FT Zellen mit einem Expressionsvektor für, mit einem C-terminalen myc-*Tag* versehenes, GRHL3 oder mit pcDNA3.1/myc-His(-) B als Leervektorkontrolle transfiziert. Nach der Lyse der Zellen wurden die Proteinlysate gelelektrophoretisch aufgetrennt und mittels Western-Blot auf eine Membran transferiert. Die Proteindetektion erfolgte mit den Seren der verschiedenen Kaninchen. Jene Seren, die vor der Immunisierung entnommen worden waren (Prä-Immun-Seren) dienten dabei als Kontrolle. In Abbildung 11 sind die Autoradiogramme der Immunoblots im Bereich von 50 kDa bis 100 kDa dargestellt.

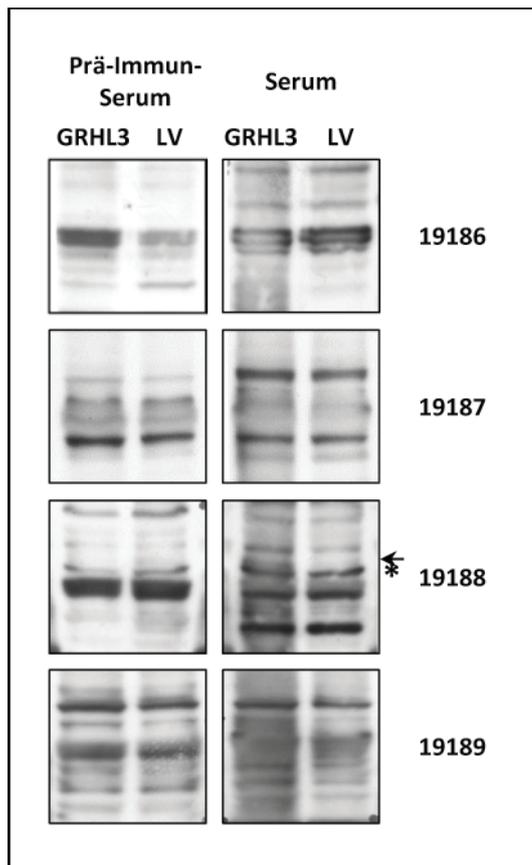


Abbildung 11: Western-Blot Analyse der nativen Kaninchenserum.

HEK 293FT Zellen wurden mit einem Expressionsvektor für GRHL3 (GRHL3) oder pcDNA3.1/myc-His(-) B als Leervektorkontrolle (LV) transfiziert. Nach der Lyse wurden jeweils 50 µg der Proteinlysate in einem 10 % SDS-Polyacrylamidgel elektrophoretisch aufgetrennt und mittels Western-Blot auf eine Membran transferiert. Zur Proteindetektion wurden die Seren der verschiedenen Kaninchen (19186-19189) in einer Verdünnung von 1:100, sowie das unverdünnte Prä-Immune-Serum des jeweils gleichen Tieres eingesetzt. Dargestellt ist der jeweilige Bereich zwischen 50 kDa und 100 kDa.

(*) zeigt das anhand des Molekulargewichts vorhergesagte, potentielle Signal für das endogene GRHL3; (→) markiert das potentielle Signal für das durch den myc-Tag um ca. 3 kDa größere überexprimierte GRHL3-Protein.

Bei den Kaninchen 19186, 19187 und 19189 konnten nach der Inkubation der Blots mit den Seren sowie den zugehörigen Prä-Immune-Seren mehrere Banden detektiert werden. Dabei konnte bei keinem der erhaltenen Proteinbandenmuster ein deutliches Signal bei dem erwarteten Molekulargewicht von 68 kDa identifiziert werden. Aus diesem Grund wurden diese Kaninchen nicht für weitere experimentelle Analysen berücksichtigt. Bei Kaninchen 19188 wurden ebenfalls mehrere Proteinsignale identifiziert, welche sowohl mit dem Prä-Immune-Serum als auch mit dem Serum detektiert werden konnten und daher nicht von weiterem Interesse waren. Bei der Verwendung des Serums wurde zusätzlich eine im Vergleich zum Prä-Immune-Serum stärkere Proteinbande identifiziert werden. In dem Lysat aus Zellen, die mit dem GRHL3-Expressionsvektor transfiziert worden waren, wurde mit dem Serum zudem eine weitere Proteinbande, mit etwas geringerer Mobilität, detektiert. Diese war in den Lysaten aus den mit dem Leervektor transfizierten Zellen nicht nachzuweisen. Es ist davon auszugehen, dass es sich dabei um das zusätzlich exprimierte und mit einem myc-Tag versehene GRHL3-Protein handelt, welches ca. 3 kDa größer ist als das endogene Protein.

Aufgrund dieser Ergebnisse wurde das Serum von Kaninchen 19188 weiter analysiert. Um die Spezifität der Reaktivität des Serums gegenüber GRHL3 zu

Zellen mit einem Expressionsvektor für das C-terminal mit einem *myc-Tag* versehene GRHL3 oder mit pcDNA3.1/*myc-His(-)* B als Leervektorkontrolle transfiziert. Die aus diesen Zellen gewonnenen Proteinlysate wurden gelelektrophoretisch aufgetrennt und die Proteine anschließend auf eine Membran transferiert. Für den Nachweis der Proteine wurde der Antikörper in einer Verdünnung von 1:1000 eingesetzt. Zum Nachweis der Antikörperspezifität wurde die Detektion der Proteine zudem mit dem Prä-Immun-Serum durchgeführt. Dieses wurde mit einer Verdünnung von 1:100 und damit 10x höher konzentriert eingesetzt. In Abbildung 13 sind die Autoradiogramme der Immunoblots im Bereich zwischen 50 kDa und 100 kDa dargestellt.

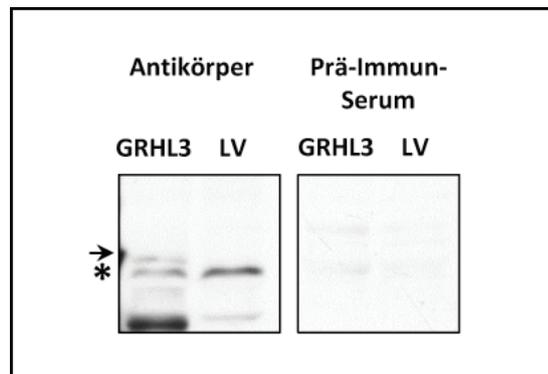


Abbildung 13: Analyse des GRHL3-Antikörpers im Western-Blot. HEK 293FT Zellen wurden mit einem Expressionsvektor für GRHL3 (GRHL3) oder pcDNA3.1/*myc-His(-)* B als Leervektorkontrolle (LV) transfiziert. Nach der Lyse wurden jeweils 50 µg der Proteinlysate in einem 10 % SDS-Polyacrylamidgel elektrophoretisch aufgetrennt und mittels Western-Blot auf eine Membran transferiert. Zur Detektion wurde der GRHL3 Antikörper in einer Verdünnung von 1:1000 sowie ein Prä-Immun-Serum in einer Verdünnung von 1:100 eingesetzt.

(*) zeigt das anhand des Molekulargewichts vorhergesagte, potentielle Signal für das endogene GRHL3; (→) markiert das potentielle Signal für das durch den *myc-Tag* um ca. 3 kDa größere überexprimierte GRHL3-Protein.

Im Vergleich zu den nicht aufgereinigten Seren (siehe Abbildung 11) wurden mit dem gereinigten GRHL3-Antikörper weniger unspezifische Hintergrundsignale erfasst. Eines der nachgewiesenen Signale wurde sowohl in den Lysaten aus Zellen, welche mit dem Expressionsvektor für GRHL3 transfiziert worden waren, detektiert, als auch in den mit der Leervektorkontrolle transfizierten. Dieses wurde bei dem erwarteten Molekulargewicht von GRHL3 (68 kDa) detektiert und entsprach daher dem endogen exprimierten Protein. In den Proben aus Zellen, welche mit dem Expressionsvektor für GRHL3 transfiziert worden waren, wurde zudem ein weiteres Proteinsignal, mit einer geringeren Mobilität, detektiert. Dieses wurde dem überexprimierten und mit einem *myc-Tag* versehenen GRHL3-Protein zugeordnet, welches ca. 3 kDa größer ist als das endogene Protein. Somit wurde bestätigt, dass der GRHL3-Antikörper für die Immunde-

tektion nach einem Western-Blot geeignet ist und sowohl das endogene als auch das überexprimierte GRHL3-Protein erkennt.

3.1.3. Anwendung des GRHL3-Antikörpers in einer Immunpräzipitation

Nachdem die Tauglichkeit des gereinigten Antikörpers im Western-Blot verifiziert wurde, erfolgte die Untersuchung der Anwendungsmöglichkeit des GRHL3-Antikörpers in einer Immunpräzipitation. Dazu wurden HEK 293FT Zellen, wie schon in den vorherigen Experimenten, mit einem Expressionsvektor für ein, mit einem *myc-Tag* versehenen GRHL3-Protein oder mit pcDNA3.1-myc/His(-) B, als Leervektorkontrolle, transfiziert. Als Ausgangsmaterial für die Immunpräzipitation wurden jeweils 2 mg Proteinlysate verwendet. Es wurden zwei unterschiedliche Mengen an GRHL3-Antikörper (1 μg und 5 μg) eingesetzt. Um die Effizienz der Immunpräzipitation zu bestimmen, wurde in diesem Fall der Überstand nicht verworfen. Im Anschluss wurden die Präzipitate zusammen mit Proben der Überständen und des Ausgangslysates elektrophoretisch aufgetrennt und mittels Western-Blot auf eine Membran transferiert. Die Proteindetektion erfolgte mit Hilfe des GRHL3-Antikörpers, welcher auch für die Immunpräzipitation verwendet worden war. In Abbildung 14 ist das Autoradiogramm des Immunoblots im Bereich zwischen 50 kDa bis 100 kDa dargestellt.

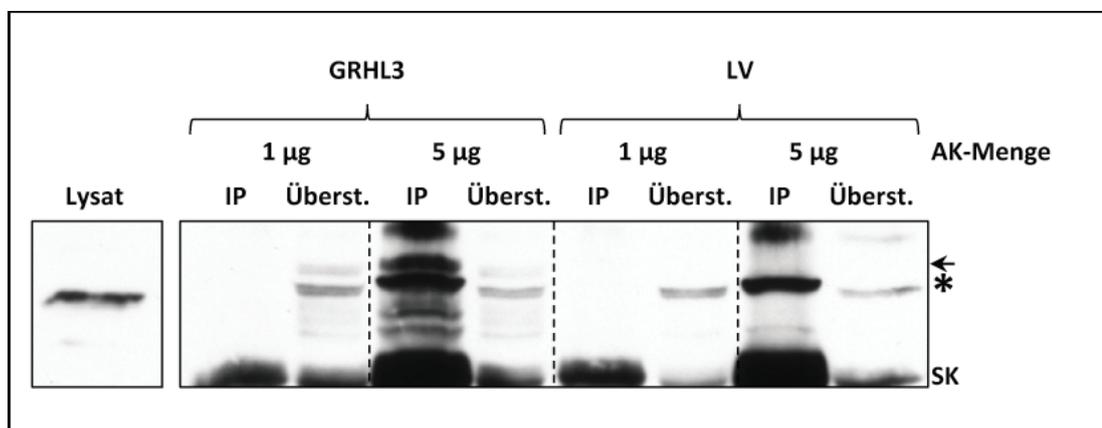


Abbildung 14: Immunpräzipitation von GRHL3 mit Hilfe des GRHL3-Antikörpers. HEK 293FT Zellen wurden mit einem Expressionsvektor für GRHL3 (GRHL3) oder mit pcDNA3.1/myc-His(-) B als Leervektorkontrolle (LV) transfiziert. Nach der Lyse wurden jeweils 2 mg der Proteinlysate für die Immunpräzipitation in parallelen Ansätzen mit 1 μg oder 5 μg GRHL3-Antikörper (AK-Menge) eingesetzt. Die elektrophoretische Auftrennung der Präzipitate (IP), sowie 50 μg des Ausgangslysates (Lysat) und 1/10 der Überstände (Überst.) erfolgte in einem 10 % SDS-Polyacrylamidgel. Nach dem Transfer auf eine Membran wurde der GRHL3-Antikörper für die Immundetektion verwendet. (*) markiert das Signal für das endogene GRHL3 bei einem Molekulargewicht von ca. 68 kDa; (→) markiert das potentielle Signal für das durch den *myc-Tag* um 3 kDa größere überexprimierte GRHL3-Protein.

Neben dem GRHL3-Protein erschien in den Präzipitaten ein Signal bei einem Molekulargewicht von etwa 50 kDa, welches der schweren Kette des Antikörpers entspricht. Durch den Einsatz von 1 µg Antikörper war es nicht möglich, endogenes oder überexprimiertes GRHL3 zu präzipitieren. Wie in Abbildung 14 zu sehen, wurde lediglich im Überstand, nicht aber im Präzipitat ein entsprechendes Proteinsignal detektiert. Im Gegensatz dazu wurde bei der Verwendung von 5 µg Antikörper die Mehrheit des Proteins präzipitiert. Hier war das detektierte Signal in den Überständen deutlich schwächer als in den Präzipitaten. Bei den Proben, welche mit dem GRHL3-Expressionsvektor transfiziert worden waren, wurde neben dem überexprimierten auch das endogene Protein nachgewiesen.

3.1.4. Fluoreszenzmikroskopische Visualisierung des endogenen GRHL3-Proteins mit Hilfe des gereinigten GRHL3-Antikörpers

Nachdem nachgewiesen wurde, dass der GRHL3-Antikörper sowohl im Western-Blot, als auch in einer Immunpräzipitation verwendet werden kann, wurde die Einsatzmöglichkeit in der Immunfluoreszenzmikroskopie untersucht. Dazu wurden primäre humane Endothelzellen ausgesät, kultiviert und schließlich fixiert. Zur Proteindetektion wurde neben dem GRHL3-Antikörper als Primärantikörper ein Fluorophor-gekoppelter Sekundärantikörper verwendet. Als Negativkontrolle diente BSA gelöst in PBS anstelle des Primärantikörpers.

Im Vergleich zu der Negativkontrolle wurde mit dem GRHL3-Antikörper ein deutliches Fluoreszenzsignal detektiert (siehe Abbildung 15). Es wurde sowohl ein zytoplasmatisches, als auch nukleäres Signal detektiert, wobei letzteres im Vergleich eine stärkere Intensität aufwies.

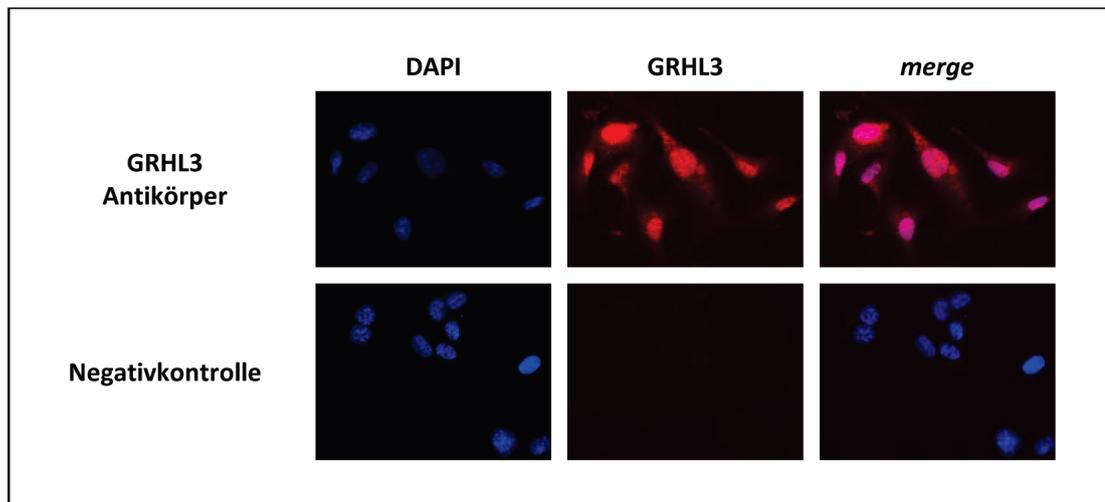


Abbildung 15: Immunfluoreszenzmikroskopische Detektion des endogenen GRHL3-Proteins mit Hilfe des GRHL3-Antikörpers. Primäre humane Endothelzellen wurden auf Deckgläschen ausgesät und fixiert. Die Immundetektion erfolgte mit Hilfe des GRHL3-Antikörpers (rot). Als Negativkontrolle wurde 1 % (w/v) BSA, gelöst in PBS, anstelle des Primärantikörpers verwendet. Zusätzlich wurden die Zellkerne mit DAPI (blau) visualisiert. Dargestellt sind die Bilder der Einzelkanäle, sowie der Überlagerung beider Farbkanäle (*merge*) bei einer 40-fachen Vergrößerung.

Die Antikörper-Analyse zeigte, dass der gemeinsam mit Merck Millipore etablierte GRHL3-Antikörper für die Immundetektion des endogenen und überexprimierten GRHL3-Proteins nach einem Western-Blot, sowie für die Immunpräzipitation und den Immunfluoreszenznachweis geeignet war.

3.2. Analyse der GRHL3-Phosphorylierung

Der in Abschnitt 3.1 etablierte Antikörper wurde in den folgenden Experimenten verwendet um GRHL3 zu präzipitieren, um anschließend die Phosphorylierung des endogenen GRHL3-Proteins zu untersuchen. Über diese war in Säugern bisher nichts bekannt.

3.2.1. Untersuchung der Tyrosin- und Threoninphosphorylierung von GRHL3

Um nachzuweisen ob GRHL3 phosphoryliert wird, wurde ein Proteinlysate aus HEK 293FT Zellen in mehreren parallelen Ansätzen für eine Immunpräzipitation verwendet. Neben den Präzipitaten wurde auch eine Probe des Ausgangslysaates gelelektrophoretisch aufgetrennt und mittels Western-Blot auf eine Membran transferiert. Nach dem Transfer wurde zum einen der GRHL3-Antikörper, zum

anderen Antikörper gegen phosphorylierte Threonine oder Tyrosine für die Detektion eingesetzt.

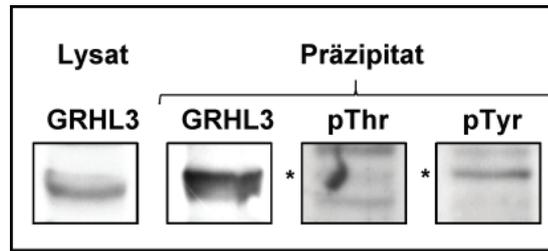


Abbildung 16: Nachweis der Threonin- und Tyrosinphosphorylierung von GRHL3. Jeweils 2 mg eines Proteinlysates aus HEK 293FT Zellen wurde zusammen mit 5 µg GRHL3-Antikörper in mehreren parallelen Ansätzen für die Immunpräzipitation eingesetzt. Die Präzipitate wurden zusammen mit 50 µg des Ausgangslysates (Lysat) in einem 10 % SDS-Polyacrylamidgel elektrophoretisch aufgetrennt und anschließend mittels Western-Blot auf eine Membran transferiert. Der Proteinnachweis erfolgte mit dem GRHL3-Antikörper (GRHL3), sowie Antikörpern gegen phosphorylierte Threonin- (pThr) oder Tyrosinreste (pTyr). (*) markiert die Proteinbande bei dem für das GRHL3-Protein vorhergesagten Molekulargewicht.

Wie in Abbildung 16 zu sehen konnte GRHL3 erfolgreich präzipitiert werden. Des Weiteren wurde sowohl eine Threoninphosphorylierung, als auch eine Tyrosinphosphorylierung von GRHL3 nachgewiesen. Dabei zeigte die Tyrosinphosphorylierung ein intensiveres Signal als die Threoninphosphorylierung, weshalb für die weiteren Untersuchungen ein Fokus auf die Tyrosinphosphorylierung gesetzt wurde.

3.2.2. Regulation der Tyrosinphosphorylierung von GRHL3 durch externe Stimuli

Nachdem in einer humanen Zelllinie der Nachweis einer GRHL3-Phosphorylierung erbracht wurde, erfolgte die Untersuchung dieser Phosphorylierung, sowie des Einflusses externer Stimuli, in humanen Endothelzellen. Dazu wurden primäre humane Endothelzellen ausgesät und am folgenden Tag mit H₂O₂ oder dem NO-Donor Natrium-Nitroprussid inkubiert, wobei unbehandelte Zellen als Kontrolle dienten. Bei den verwendeten Konzentrationen und der gewählten Inkubationszeit handelte es sich um bereits etablierte Parameter, bei denen H₂O₂ die Endothelzellapoptose induziert, wohingegen der NO-Donor eine Erhöhung der Endothelzellmigration bewirkt [47, 68]. Lysate der so behandelten Zellen wurden in parallelen Ansätzen für eine Immunpräzipitation mit dem GRHL3-Antikörper verwendet. Im Anschluss erfolgte die gelelektrophoretische Auftrennung, der Transfer mittels Western-Blot sowie die Detektion mit Hilfe des GRHL3- oder eines phospho-Tyrosin-Antikörpers.

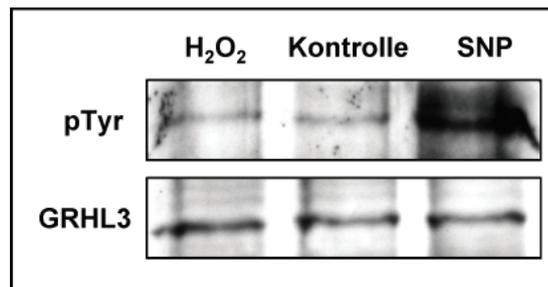


Abbildung 17: Einfluss von H_2O_2 und eines NO-Donors auf die Tyrosinphosphorylierung von GRHL3. Jeweils 500 μ g Proteinlysate aus unbehandelten, primären humanen Endothelzellen (Kontrolle) oder Zellen welche für 18 h mit 200 μ M H_2O_2 (H_2O_2) bzw. 10 μ M des NO-Donors Natrium-Nitroprussid (SNP) stimuliert worden waren, wurden für eine Immunpräzipitation eingesetzt. Diese erfolgte mit 5 μ g GRHL3-Antikörper in mehreren parallelen Ansätzen. Die Präzipitate wurden anschließend in einem 10 % SDS-Polyacrylamidgel elektrophoretisch aufgetrennt und mittels Western-Blot auf eine Membran transferiert. Der Nachweis der Präzipitation erfolgte durch einen GRHL3-Antikörper (GRHL3), die Analyse der Phosphorylierung mit Hilfe eines phospho-Tyrosin-Antikörpers (pTyr).

In Abbildung 17 ist zu sehen, dass in allen Proben GRHL3 präzipitiert wurde (unterer Blot). Durch die Verwendung des phospho-Tyrosin-Antikörpers erfolgte zudem der Nachweis einer Tyrosinphosphorylierung (oberer Blot). Während durch die Behandlung mit H_2O_2 im Vergleich zur Kontrolle keine Veränderung der Phosphorylierung erreicht wurde, konnte durch den NO-Donor eine deutliche Verstärkung der Phosphorylierung erzielt werden. In weiteren Experimenten wurde daher die NO-induzierte Tyrosinphosphorylierung von GRHL3 weiter analysiert. Dazu gehörte, durch den Einsatz eines spezifischen Kinaseinhibitors, die Identifizierung der für die Phosphorylierung verantwortlichen Kinase. Da bereits eine wichtige Rolle der Src-Kinase-Familie in Endothelzellen beschrieben worden war [42], wurde untersucht, ob die Src-Kinase-Familie an der nachgewiesenen Tyrosinphosphorylierung von GRHL3 beteiligt ist.

3.2.3. Verifizierung der NO-induzierten Tyrosinphosphorylierung von GRHL3 und Identifizierung der beteiligten Kinase

Um nachzuweisen, dass Mitglieder der Src-Kinase-Familie an der Tyrosinphosphorylierung von GRHL3 beteiligt sind wurden primäre humane Endothelzellen mit einem NO-Donor, einem Inhibitor der Src-Kinase-Familie oder einer Kombination beider Substanzen behandelt. Der Inhibitor wurde 30 min vor der Zugabe des NO-Donors zu den Zellen gegeben und nach dessen Zugabe mit diesem zusammen für weitere 18 h inkubiert. Als Kontrolle dienten unbehandelte Zellen. Die aus diesen Zellen gewonnenen Proteinlysate wurden in parallelen Ansätzen für die Immunpräzipitation mit dem GRHL3-Antikörper verwendet

und der präzipitierte Transkriptionsfaktor wie vorher beschrieben auf seine Tyrosinphosphorylierung hin untersucht.

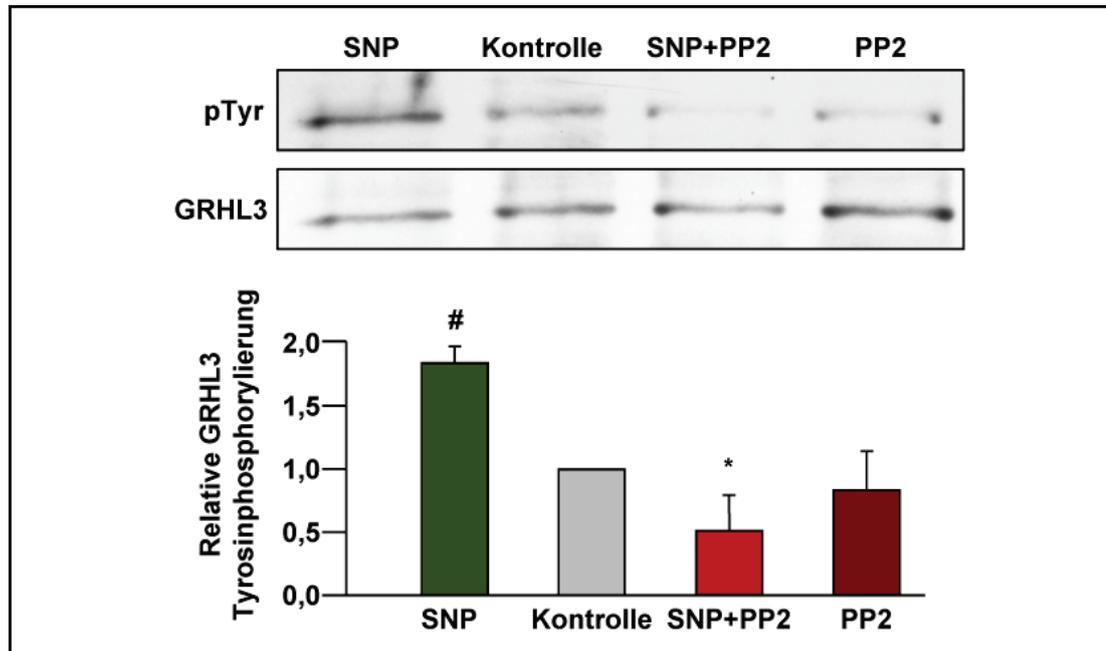


Abbildung 18: Abhängigkeit der Tyrosinphosphorylierung von GRHL3 von Kinasen der Src-Familie. Primäre humane Endothelzellen wurden für 18 h mit 10 μ M des NO-Donors Natrium-Nitroprussid (SNP), für 18,5 h mit 10 μ M des Src-Kinase-Inhibitor 4-amino-5-(4-chlorophenyl)-7-(dimethylethyl)pyrazolo[3,4-d]pyrimidine (PP2) oder beiden Substanzen (SNP+PP2) inkubiert. Als Kontrolle dienten unbehandelte Zellen (Kontrolle). 500 μ g der Proteinlysate wurde in parallelen Ansätzen mit 5 μ g GRHL3-Antikörper immunpräzipitiert. Die elektrophoretische Auftrennung der Präzipitate erfolgte in einem 10 % SDS-Polyacrylamidgel. Zum Nachweis der Präzipitation wurde der GRHL3-Antikörper (GRHL3) und für die Analyse der Phosphorylierung ein Antikörper gegen phosphorylierte Tyrosine (pTyr) durchgeführt. Es wurden 3 unabhängige experimentelle Replikate angefertigt. Beispielhaft sind die Autoradiogramme eines dieser Replikate dargestellt. Das Balkendiagramm zeigt das Ergebnis der semiquantitativen, densitometrischen Auswertung aller drei Replikate. Die relative GRHL3 Tyrosinphosphorylierung gibt das Verhältnis zwischen dem phosphorylierten Protein zum Gesamtprotein wieder. Der Wert der Kontrolle wurde auf 1 gesetzt und die Werte der behandelten Proben zu diesem ins Verhältnis gesetzt. Die statistische Auswertung erfolgte über einen *Student's T-Test* (zweiseitig, gepaart). # $p < 0,05$ vs. Kontrolle ; * $p < 0,05$ vs. SNP; $n=3$ Mittelwert \pm SEM

Wie in Abbildung 18 zu sehen, wurde in allen Proben GRHL3 präzipitiert. Des Weiteren konnte nachgewiesen werden, dass die NO-induzierte Tyrosinphosphorylierung von GRHL3 durch den Einsatz des Src-Kinase-Familien-Inhibitors PP2 reduziert wurde. Da im Rahmen dieser Experimente in Medium gearbeitet wurde, welchem sowohl fötales Kälberserum sowie Wachstumsfaktoren zugesetzt worden war, waren die physiologisch stattfindenden, basalen Signaltransduktionswege der Zellen im Vorfeld der Inkubation nicht beeinflusst worden. Die semiquantitative Auswertung der drei unabhängigen Experimenten zeigte zudem, dass die Phosphorylierung von GRHL3 durch NO signifikant auf fast das

doppelte erhöht wurde. Nachdem hiermit gezeigt wurde, dass die NO-induzierte Phosphorylierung von GRHL3 auf ein Mitglied der Src-Kinase-Familie zurückzuführen war, sollten nachfolgend die Tyrosinreste identifiziert werden, welche in GRHL3 phosphoryliert werden.

3.2.4. Untersuchungen dreier GRHL3-Phosphomutanten

Zur Identifizierung der phosphorylierten Tyrosine wurden in einem ersten Versuchsansatz mit Hilfe eines Computer basierten Vorhersage-Programms (GPS 3.0, <http://gps.biocuckoo.org/>), mehrere potentielle Phosphorylierungsstellen für Mitglieder der Src-Kinase-Familie vorhergesagt (siehe Abbildung 19). Dabei wurde der Grenzwert für die Vorhersage auf „Hoch“ festgelegt, sowie ausschließlich die Kinasen Src, Fyn und Yes berücksichtigt. Diese gehören zur gleichen Unterfamilie der Src-Kinasen und werden im Vergleich zu Fgr, welche ebenfalls zu dieser Unterfamilie gehört, jedoch hauptsächlich in myeloiden Zellen exprimiert wird, ubiquitär exprimiert [84, 110].

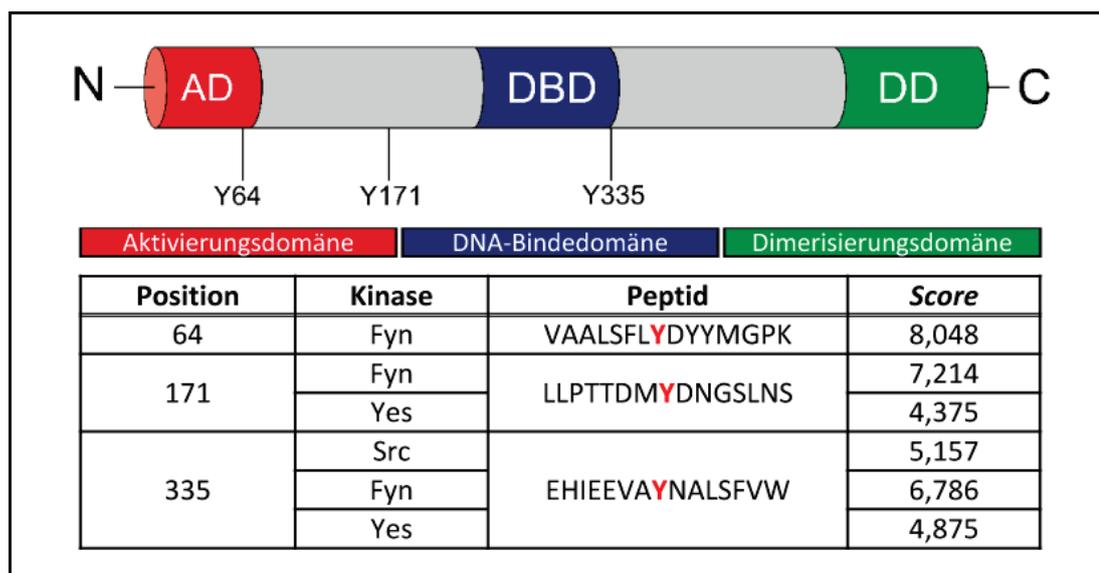


Abbildung 19: Vorhersage Src-Kinase-spezifischer Phosphorylierungsstellen im GRHL3-Protein. Dargestellt ist die Domänenstruktur von GRHL3 in welcher die Lokalisation einzelner potentieller Tyrosin-Phosphorylierungsstellen (Y) innerhalb des Proteins markiert wurde. Die Aktivierungsdomäne, die DNA-Bindedomäne und die Dimerisierungsdomäne [113] sind farblich hervorgehoben. Die Vorhersage erfolgte mit dem *Group-based-prediction*-Programm (GPS 3.0). Der ermittelte *Score* beschreibt die Wahrscheinlichkeit, mit der die jeweilige Phosphorylierung stattfindet.

Verwendete Sequenz: GRHL3 Isoform 2 (uniprot: Q8TE85-2)

Festgelegter Grenzwert: Hoch

Berücksichtigte Kinasen: Src, Fyn, Yes

Die Aminosäuren mit der höchsten Wahrscheinlichkeit für eine Phosphory-

lierung, bzw. mit einer möglichen Phosphorylierung durch mehrere Src-Kinasen, waren die Tyrosine an Position 64, 171 und 335. Um herauszufinden, ob diese Aminosäuren von Mitgliedern der Src-Kinase-Familie phosphoryliert werden können, wurden Expressionsvektoren für Punktmutanten von GRHL3 erstellt, bei denen das jeweilige Tyrosin (Y) durch ein Phenylalanin (F) ersetzt wurde. Bei Phenylalanin handelt es sich um eine Aminosäure, die strukturell nahezu identisch mit Tyrosin ist, jedoch aufgrund einer fehlenden Hydroxylgruppe in der Seitenkette nicht phosphoryliert werden kann. Des Weiteren wurden diese Expressionsvektoren so erstellt, dass sie für Fusionsproteine der jeweiligen Phosphomutante mit einem C-terminalen *myc-Tag* codieren. Zur Generierung der Expressionsvektoren wurden die in Tabelle 12 aufgeführten Primer in einer gerichteten Mutagenese verwendet. Nach der Mutagenese wurde die Plasmid-DNA über eine Minipräparation für jede Phosphomutante aus 4 verschiedenen Bakterienkolonien isoliert. Der Erfolg dieser Mutagenese wurde durch die Sequenzierung der gesamten, für die jeweilige Phosphomutante codierenden Sequenz, überprüft. Zudem wurde kontrolliert, ob weitere ungewollte Mutationen im Zuge der Amplifikation aufgetreten waren. Die Sequenzierung der Mutanten erfolgte mit den in Tabelle 13 angegebenen Primern. Lediglich eine Phosphomutante zeigte in der Sequenzierung einen Nukleotidaustausch, wodurch ein Stopcodon anstelle eines Codons für die Aminosäure Glutamin generiert wurde. Von den korrekten Phosphomutanten wurde jeweils eine ausgewählt und aus diesen mit Hilfe einer Maxipräparation eine größere Menge Plasmid-DNA isoliert, welche in den nachfolgenden Experimenten verwendet werden konnte.

In einem ersten Experiment wurde die Expression der Mutanten in humanen Endothelzellen überprüft. Dazu wurden primäre humane Endothelzellen jeweils mit einem Expressionsvektoren für ein mit einem C-terminalen *myc-Tag* versehenes GRHL3-Protein, einem Expressionsvektor für je eine der drei Phosphomutanten oder pcDNA3.1/*myc-His(-)* B als Leervektorkontrolle transfiziert. Die aus diesen Zellen gewonnenen Proteinlysate wurde gelelektrophoretisch aufgetrennt und auf eine Membran transferiert. Zur Immundetektion wurde ein gegen den *myc-Tag* gerichteter Antikörper verwendet.

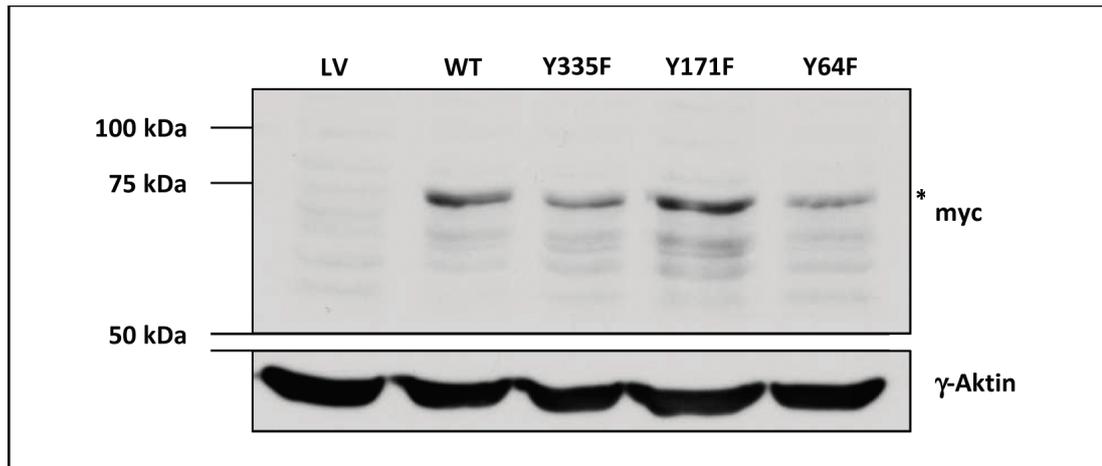


Abbildung 20: Nachweis der Expression von GRHL3-Phosphomutanten in primären humanen Endothelzellen. Primäre humane Endothelzellen wurden jeweils mit einem Expressionsvektor für GRHL3 (WT), für eine der drei Phosphomutanten (Y335F, Y171F, Y64F) oder mit pcDNA3.1/myc-His(-) B als Leervektorkontrolle (LV) transfiziert. Nach der Lyse wurden jeweils 50 µg Proteinlysate in einem 10 % SDS-Polyacrylamidgel elektrophoretisch getrennt und mittels Western-Blot auf eine Membran transferiert. Der Nachweis der Proteine wurde mit einem Antikörper gegen den myc-Tag durchgeführt (myc). Als Ladungskontrolle erfolgte der Nachweis von γ -Aktin (γ -Aktin). (*) markiert das Signal bei dem theoretischen Molekulargewicht des überexprimierten GRHL3-Proteins.

Wie in Abbildung 20 zu sehen, wurden neben dem wildtypischen GRHL3-Protein auch die drei mutierten Formen detektiert, womit bestätigt wurde, dass alle drei Phosphomutanten in humanen Endothelzellen exprimiert werden können. Im Anschluss wurde untersucht, ob die Mutanten noch phosphoryliert werden, bzw. ob die jeweiligen Phosphorylierungsstellen für die NO-induzierte Phosphorylierung von GRHL3 relevant sind. Dazu wurden wie in dem vorherigen Experiment primäre humane Endothelzellen mit einem jeweiligen Expressionsvektor für GRHL3 oder den Phosphomutanten, bzw. pcDNA3.1/myc-His(-) B als Leervektorkontrolle transfiziert. Zusätzlich wurden die Zellen 5 h nach der Transfektion mit dem NO-Donor Natrium-Nitroprussid behandelt. Nach der Lyse wurden die Zelllysate in einer Immunopräzipitation mit zwei verschiedenen myc-Antikörpern eingesetzt. Die Präzipitate wurden anschließend zusammen mit Proben des Ausgangslyses elektrophoretisch getrennt und auf eine Membran transferiert. Der Nachweis der Überexpression, bzw. der Immunpräzipitation erfolgte mit einem myc-Antikörper und die Analyse der Tyrosinphosphorylierung mit einem phospho-Tyrosin-Antikörper.

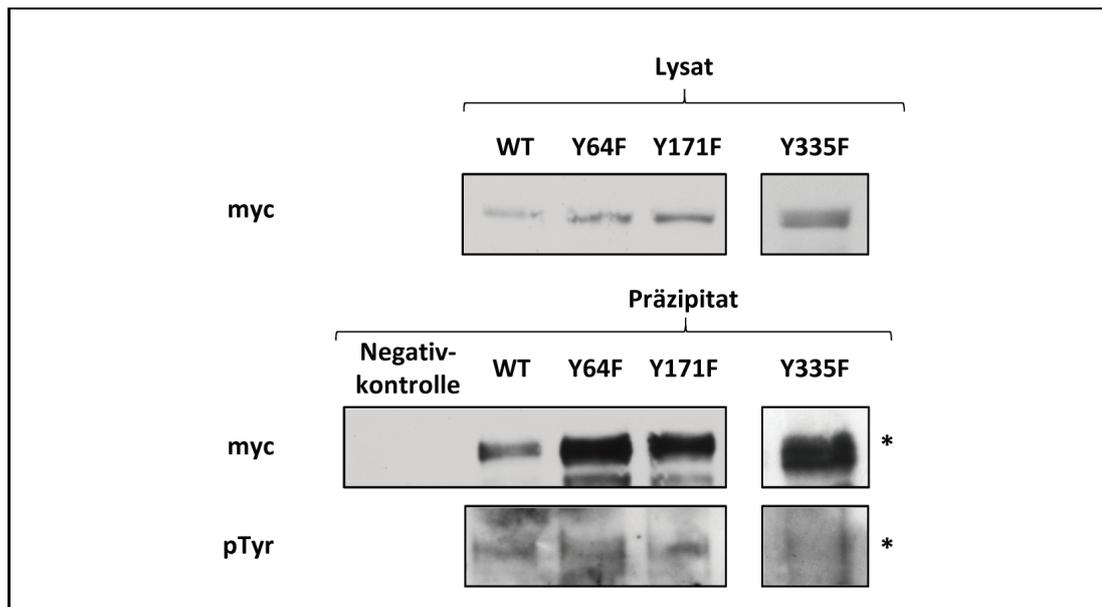


Abbildung 21: Nachweis der Phosphorylierung der GRHL3-Phosphomutanten in primären humanen Endothelzellen. Primäre humane Endothelzellen wurden jeweils mit einem Expressionsvektor für GRHL3 (WT) oder eine der drei Phosphomutanten (Y335F, Y171F, Y64F) transfiziert. 5 h nach der Transfektion wurde den Zellen der NO-Donor Natrium-Nitroprussid zugegeben und dieser für 18 h mit den Zellen inkubiert. Jeweils 500 µg Proteinlysate wurde anschließend in parallelen Ansätzen für eine Immunpräzipitation mit je 5 µl zweier verschiedener myc-Antikörper verwendet. Es folgte die gelelektrophoretische Trennung der präzipitierten Proteine in einem 10 % SDS-Polyacrylamidgel und der Transfer auf eine Membran mittels Western-Blot. Der Nachweis der Immunpräzipitation wurde mit einem Antikörper gegen den myc-Tag durchgeführt (myc), die Analyse der Tyrosinphosphorylierung mit einem Antikörper gegen phosphorylierte Tyrosine (pTyr). (*) markiert die Proteinbande auf Höhe des für das GRHL3-Protein vorhergesagten Molekulargewichts.

Wie in Abbildung 21 zu sehen wurde GRHL3, sowie die drei Phosphomutanten exprimiert und immunpräzipitiert. Ein Unterschied in der Phosphorylierung, im Vergleich zum wildtypischen GRHL3, konnte jedoch für keine der drei Mutanten detektiert werden.

3.3. Einfluss einer fettreichen Ernährung auf die Expression von GRHL3

3.3.1. Untersuchung der GRHL3-Expression *in vitro*

Mit den bisherigen Experimenten konnte gezeigt werden, dass NO einen Einfluss auf die Phosphorylierung von GRHL3 hat und damit eine entscheidende Rolle in dessen Regulation spielt (siehe Abschnitt 3.2.3). Bereits im Vorfeld dieser Arbeit war gezeigt worden, dass durch NO auch die Expression oder RNA-Stabilität von GRHL3 reguliert wird [44, 68]. Daher wurden nachfolgend

Untersuchungen auf Proteinebene durchgeführt, in denen die Expression des GRHL3-Proteins in Abhängigkeit eines NO beeinflussenden Stimulus analysiert wurde. Es handelt sich dabei um das Lipoprotein niedriger Dichte (*low density lipoprotein*, LDL) in Kombination mit einer erhöhten Fruktosekonzentration. Beide stellen Risikofaktoren für die Entwicklung kardiovaskulärer Erkrankungen dar und sind bekannt dafür, dass sie die Expression der eNOS in Endothelzellen inhibieren [17]. Für diesen experimentellen Ansatz wurde eine fettreiche Ernährung in primären humanen Endothelzellen simuliert [17]. Die Zellen wurden dazu mit LDL, sowie einer zusätzlichen Menge Fruktose inkubiert, bei der die Endkonzentration des Zuckers jedoch unterhalb des diabetischen Wertes von 5 mg/ml lag. Als Kontrolle dienten Zellen, welche nur mit dem Zucker inkubiert wurden. Das LDL und der jeweilige Zucker wurden dem EBM-Komplettmedium zugegeben, in welchem die Zellen kultiviert wurden. Die aus den Zellen gewonnenen Proteinlysate wurden anschließend gelelektrophoretisch aufgetrennt und mittels Western-Blot auf eine Membran transferiert. Für die Detektion der Proteine wurden Antikörper gegen GRHL3, die endotheliale NO-Synthase, sowie die *extracellular signal regulated kinase* (ERK), als Nachweis der gleichmäßigen Gelbelastung, verwendet.

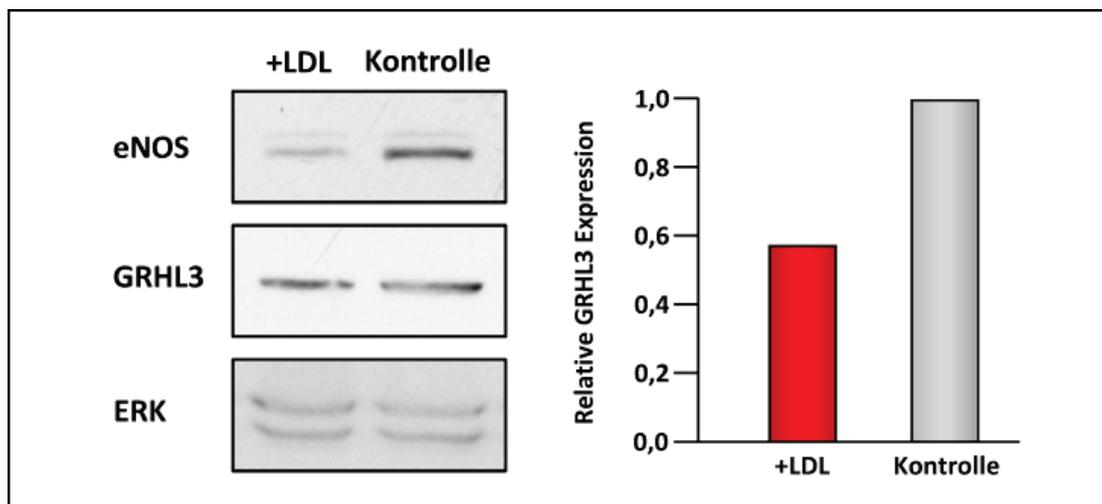


Abbildung 22: GRHL3-Expression nach LDL-Behandlung. Primäre humane Endothelzellen wurde für eine Woche mit 2,2 mg/ml Fruktose (Kontrolle) oder 2,2 mg/ml Fruktose und 0,55 mg/ml LDL (LDL) inkubiert. Anschließend wurden je 50 µg der Proteinlysate in einem 10 % SDS-Polyacrylamidgel elektrophoretisch getrennt und mittels Western-Blot auf eine Membran transferiert. Die Proteindetektion erfolgte mit Antikörpern gegen die endotheliale NO-Synthase (eNOS), gegen GRHL3 (GRHL3) und gegen die *extracellular signal regulated kinase* (ERK) als Ladekontrolle.

Wie in Abbildung 22 zu sehen, wurde durch die Inkubation der Zellen mit LDL eine Reduktion der eNOS-, sowie der GRHL3-Expression hervorgerufen.

3.3.2. Analyse der GRHL3-Expression *in vivo*

Im Rahmen eines Aufenthalts in dem Labor von Prof. Coleen McNamara an dem Cardiovascular Research Center der University of Virginia in Charlottesville, USA, während der Austauschphase des Internationalen Graduiertenkollegs 1902 wurden diese Ergebnisse in einem *in vivo* Modell validiert. Dazu wurde eine immunhistochemische Proteindetektion in Gewebeschnitten von Aorten durchgeführt. Die dazu verwendeten Aorten wurden aus Apolipoprotein E-defizienten (ApoE^{-/-}) Mäusen isoliert, welchen eine hoch fettreiche Ernährung gefüttert wurde. Unter diesen Bedingungen entwickeln die Mäuse arteriosklerotische Läsionen [78]. Eine Kontrollgruppe wurde über diesen Zeitraum normal gefüttert. Für die Detektion der Proteine wurden Antikörper gegen GRHL3, sowie für die Zellmarker CD31 für Endothelzellen und α -*smooth muscle actin* für glatte Muskelzellen verwendet, um die Zelltypen, in denen GRHL3 in der Gefäßwand exprimiert ist, bestimmen zu können.

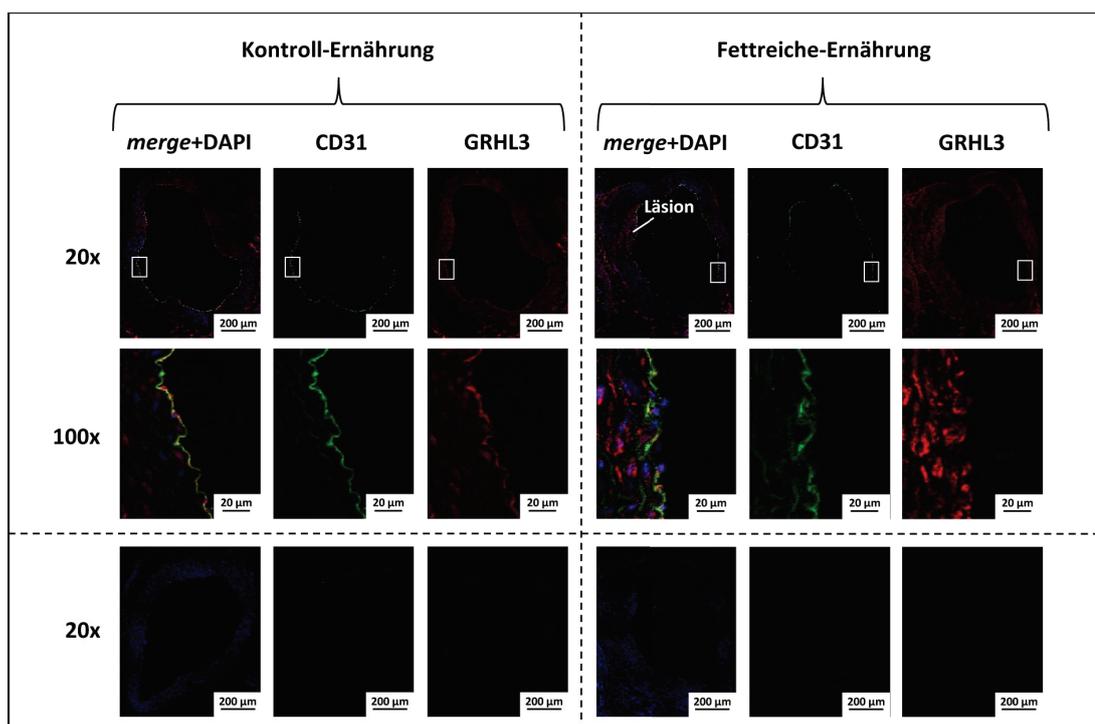


Abbildung 23: Fluoreszenzmikroskopische Analyse der GRHL3 Expression in der Aorta (CD31 Ko-Detektion). ApoE-defiziente Mäuse wurden 18 Wochen mit einer fettreichen Nahrung gefüttert (Fetteiche-Ernährung). Parallel wurde eine zweite Mausgruppe normal gefüttert (Kontroll-Ernährung). 5 µm dicke Aortenschnitte wurden mit Antikörpern gegen GRHL3 (rot), sowie gegen CD31 (grün) inkubiert. Zur Visualisierung der Zellkerne wurde DAPI verwendet (blau). Als Negativkontrolle für die Detektion von GRHL3 (untere Bildreihe) wurde 10 % (v/v) Pferdeserum anstelle des GRHL3-Antikörpers eingesetzt. Dargestellt sind die Bilder der Einzelkanäle, sowie deren Überlagerung (merge) von jeweils einem Aortenring bei 20-facher (20x) Vergrößerung und die in diesen Bildern markierten Ausschnitte der Aortenwände bei einer 100-fachen (100x) Vergrößerung. Zudem ist in den Bildern der fettreichen-Ernährung ein arteriosklerotischer Plaque markiert (Läsion).

3.4. Nachweis der GRHL3 Expression in glatten Muskelzellen

3.4.1. Nachweis der GRHL3-RNA

Da in der immunhistochemischen Analyse GRHL3 in glatten Muskelzellen nachgewiesen wurde, erfolgte eine weitere Untersuchung der Expression von GRHL3 in diesem Zelltyp der Gefäßwand. Dazu wurde von RNA-Proben aus isolierten humanen vaskulären glatten Muskelzellen der Halsschlagader dreier verschiedener Spender eine cDNA generiert. Diese wurde anschließend als *Template* in einer PCR für GRHL3 sowie dem *Housekeeping*-Gen *ribosomal protein L32* (*rpl32*) eingesetzt. Als Positivkontrolle für den Nachweis der GRHL3-Expression wurde eine cDNA aus primären humanen Endothelzellen verwendet. Wie in Abbildung 25 gezeigt, konnte die Expression des GRHL3-Gens in glatten Muskelzellen bestätigt werden.

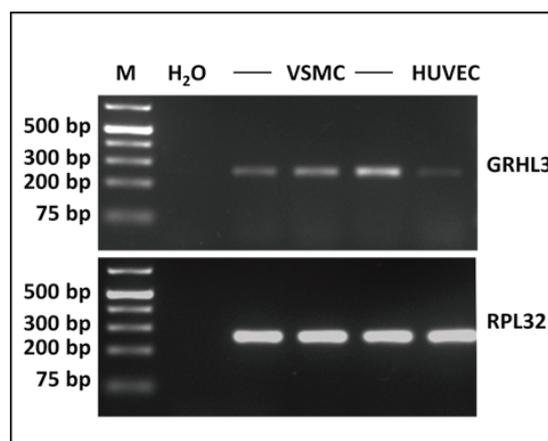


Abbildung 25: Nachweis der GRHL3-RNA Expression in glatten Muskelzellen. Von RNA-Proben aus glatten Muskelzellen (VSMC) dreier verschiedener Spender sowie primären humanen Endothelzellen (HUVEC) wurde wie im Teil „Material und Methoden“ beschrieben eine cDNA generiert und jeweils 2 µl dieser cDNA in eine PCR für *grhl3* (GRHL3) eingesetzt. Für eine Amplifikation des *Housekeeping*-Gens *rpl32* (RPL32) wurde die cDNA zunächst 1:100 verdünnt. Die Amplifikation erfolgte in 30 Zyklen für *rpl32* und 35 Zyklen für *grhl3*. Es folgte der Nachweis der Amplifikationsprodukte nach der elektrophoretischen Auftrennung in einem 1,5 % (w/v) Agarosegel. Während der PCR wurde eine Negativkontrolle ohne cDNA mitgeführt (H₂O). Zum Abgleich der Fragmentgrößen wurde ein 1 kb Größenstandard verwendet (M). Es wurden DNA-Fragmente von 254 bp (GRHL3) und 257 bp (RPL32) erwartet.

3.4.2. Nachweis des GRHL3-Proteins

Nachdem der Nachweis auf RNA-Ebene erbracht wurde, erfolgte eine weitere Analyse der GRHL3 Expression auf Protein-Ebene. Dazu wurden Proteinlysate aus isolierten humanen vaskulären glatten Muskelzellen aus der Halsschlag-

ader verwendet. Die Lysate wurden zusammen mit einem Proteinlysate aus humanen primären Endothelzellen gelelektrophoretisch aufgetrennt und mittels Western-Blot auf eine Membran transferiert. Der Proteinnachweis erfolgte mit dem GRHL3 Antikörper, sowie einem γ -Aktin Antikörper als Nachweis der gleichmäßigen Gelbeladung. Wie in Abbildung 26 zu sehen, wurde das GRHL3-Protein ebenfalls in glatten Muskelzellen detektiert.

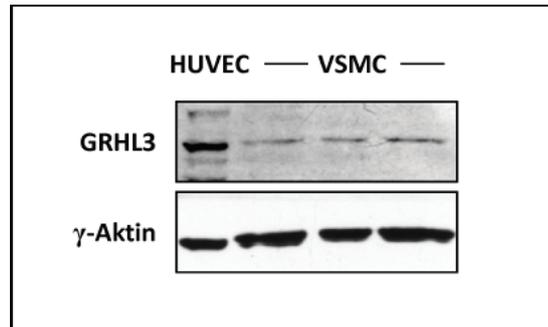


Abbildung 26: Analyse der Proteinexpression von GRHL3 in glatten Muskelzellen. Jeweils 30 μ g von Proteinlysaten aus glatten Muskelzellen (VSMC) dreier verschiedener Spender, sowie primären humanen Endothelzellen (HUVEC) wurde in einem 10 % SDS-Polyacrylamidgel elektrophoretisch aufgetrennt und anschließend auf eine Membran transferiert. Der Proteinnachweis wurde mit einem Antikörper gegen GRHL3 (GRHL3) und einem Antikörper gegen γ -Aktin (γ -Aktin) als Ladungskontrolle durchgeführt.

3.5. Identifizierung neuer GRHL3 Interaktionspartner

Neben post-translationalen Modifikationen spielen die Interaktionen von Transkriptionsfaktoren mit anderen Proteinen eine wichtige Rolle in der Regulation der Transkriptionsfaktoraktivität, sowie des Spektrums an Zielgenen. Bisher waren in Endothelzellen keine Interaktionspartner von GRHL3 bekannt, weshalb im Rahmen dieser Arbeit bisher unbekannte Interaktionspartner von GRHL3 in Endothelzellen identifiziert werden sollten.

Dazu wurde eine Ko-Immünpräzipitation mit Proteinlysaten aus humanen primären Endothelzellen mit einem GRHL3-Antikörper durchgeführt. Die dafür verwendeten Zellen waren entweder unbehandelt oder mit dem NO-Donor Natrium-Nitroprussid inkubiert worden. Das Präzipitat wurde anschließend elektrophoretisch aufgetrennt und das SDS-Polyacrylamidgel nach der Elektrophorese mit Coomassie-Brilliant-Blau gefärbt, um alle ko-präzipitierten Proteine anzufärben [30].

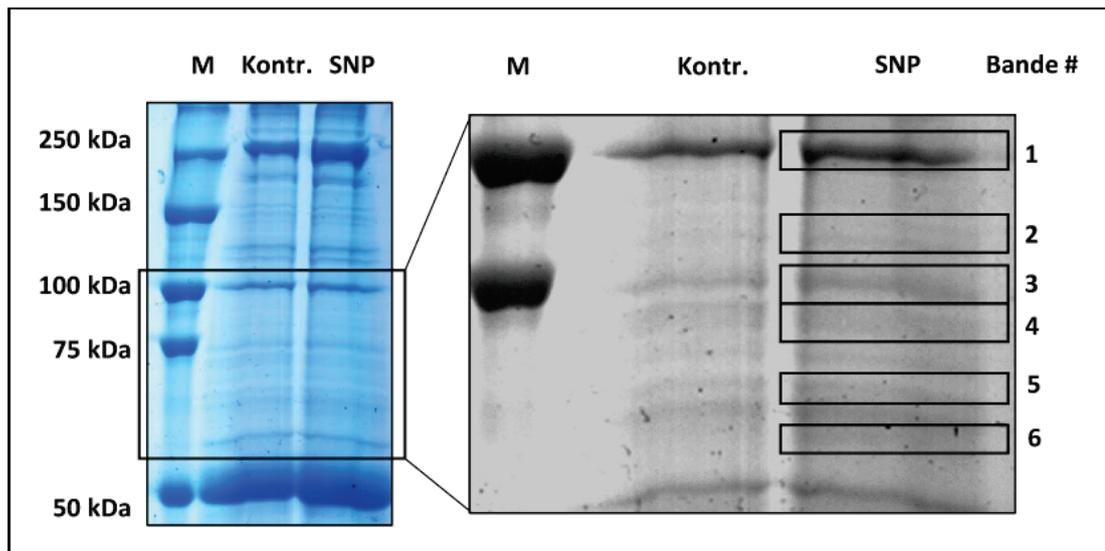


Abbildung 27: Proteinnachweis mit Coomassie-Brilliant-Blau nach einer gelelektrophoretischen Auftrennung der mit GRHL3 ko-immunpräzipitierten Proteine. Humane primäre Endothelzellen wurden für 18 h mit dem NO-Donor Natrium-Nitroprussid (SNP) behandelt. Als Kontrolle (Kontr.) dienten unbehandelte Zellen. Nach der Lyse wurden jeweils 2 mg Proteinlysat in einer Immunpräzipitation mit 5 µg eines GRHL3-Antikörper eingesetzt. Die Präzipitate wurden anschließend in einem 10 % SDS-Polyacrylamidgel, neben einen Größenmarker (M), elektrophoretisch aufgetrennt. Die Visualisierung der Proteine im Gel erfolgte mit Coomassie-Brilliant-Blau (linkes Bild). Anhand des vergrößerten Ausschnitts des Bereiches zwischen 55 kDa und 100 kDa (rechtes Bild) ist gezeigt, welche Proteinbanden (Bande #) für einen tryptischen Verdau ausgewählt wurden.

Abbildung 27 zeigt, dass mehrere Proteine ko-präzipitiert wurden. Für die weiteren Versuche wurden zunächst nur Proteine in einem Bereich zwischen 55 kDa und 100 kDa aus der SNP-behandelten Probe selektiert und tryptisch verdaut. Die erhaltenen Peptide wurden anschließend massenspektrometrisch analysiert. Von jeder Probe wurde zunächst ein Übersichtsspektrum erstellt, wie es beispielhaft in Abbildung 28 zu sehen ist. Dieses beinhaltet alle zum gegebenen Zeitpunkt ankommenden Peptide und deren molare Masse, welche in einem MS-Spektrum als Masse- zu Ladungsverhältnis (m/z) angegeben wird. In der Regel besitzt ein tryptisches Peptid eine Mehrfachladung. Die genaue Ladung eines Peptids wurde mit Hilfe des Übersichtsspektrums anhand des jeweiligen Isotopenverteilungsmusters bestimmt (siehe Ausschnitt in Abbildung 28).

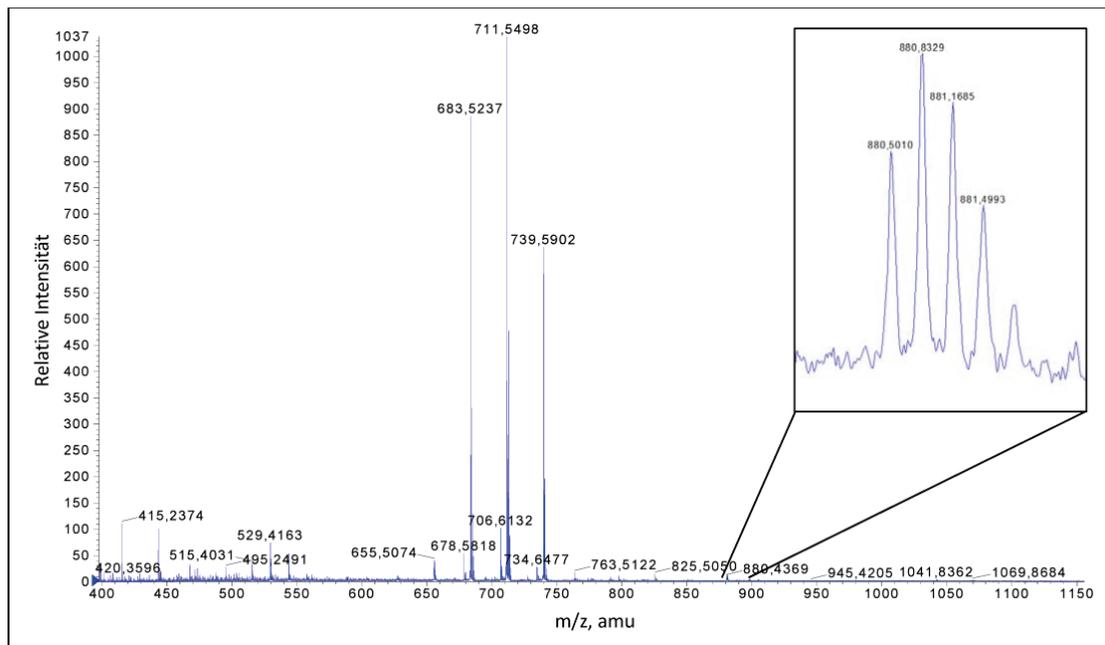


Abbildung 28: Übersichtsspektrum zu der Proteinbande # 1 aus Abbildung 27. Das Übersichtsspektrum wurde in einem Massenbereich von 350 m/z bis 1300 m/z aufgenommen. Die Ordinate zeigt die relative Intensität, die Abszisse das Masse- zu Ladungsverhältnis (m/z) in *atomic mass units* (amu). Die einzelnen Signale bestehen aus mehreren Spitzen mit einer charakteristischen Isotopenverteilung. Die vier Spitzen in dem vergrößerten Bereich repräsentieren z. B. ein Peptid, welches 0, 1, 2, bzw. 3 C^{13} -Atome beinhaltet. Aus dem Massenschift zwischen zwei Spitzen lässt sich die Ladung des jeweiligen Peptides bestimmen. Hier z.B. beträgt die Differenz 0,33 und entspricht daher einer dreifachen Ladung.

Die Masse sagt jedoch nur indirekt etwas über die strukturelle Zusammensetzung der Peptide und somit des Proteins aus. Aus diesem Grund wurde zur eindeutigen Identifizierung des Proteins eine Sequenzanalyse mittels MS/MS nachgeschaltet. Signale von einfach geladenen Peptiden wurden dabei nicht berücksichtigt, da sie für eine weitere Sequenz-Analyse nicht zu verwenden sind. Zur Sequenzierung wurden ausgewählte Peptide mit entsprechendem m/z selektiert und unter Verwendung des Kollisionsgases N_2 fragmentiert. Ein dabei generiertes Fragmentspektrum ist beispielhaft in Abbildung 29 gezeigt. Die Abstände zwischen den einzelnen Signalen entsprechen hierbei der Masse einer bestimmten Aminosäure. Aus diesen Informationen lässt sich ein Peptid-Tag, bzw. bestenfalls sogar die gesamte Aminosäuresequenz des fragmentierten Peptides ermitteln.

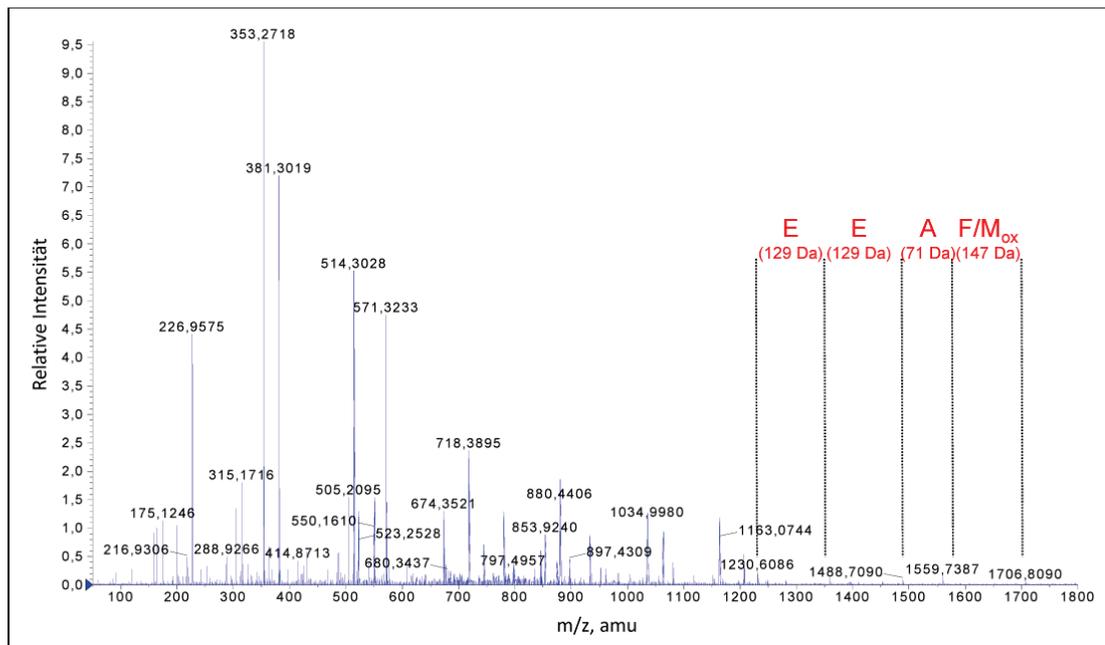


Abbildung 29: Fragmentspektrum zu dem dreifach-geladenen Peptid aus Abbildung 28 mit einer Masse von 880,50 m/z. Die errechnete Masse des einfach geladenen Peptids ist $[M+H]^+ = 2639,5$. Zur Generierung des Fragmentspektrums wurde das gewünschte Peptid über sein m/z selektiert und durch Zugabe des Kollisionsgases N_2 fragmentiert. Die Detektion der einzelnen Fragmente erfolgte in einem Massenbereich von 50 m/z bis dem m/z entsprechend der errechneten Masse $[M+H]^+$. Die Ordinate zeigt die relative Intensität, die Abszisse das Masse- zu Ladungsverhältnis (m/z) in *atomic mass units* (amu). Anhand der Differenz zwischen den einzelnen Fragmentensignalen konnte manuell ein Peptid-Tag mit folgender Aminosäuresequenz bestimmt werden: F/M_{ox} -A-E-E.

Zur Identifizierung des Proteins wurde von allen erzeugten Fragmentspektren mit Hilfe der Mascot-Suchmaschine ein Datenbankabgleich zur UniProtKB/-SwissProt-Datenbank durchgeführt.

MSRDRFRSRG	GGGGGFHRRG	GGGGRGGLHD	FRSPPPGMGL	NQNRGPMGPG
PGQSGPKPPI	PPPPHQQQQ	QPPQOPPPQ	QPPHQPPPH	PQPHQQQPP
PPPQDSSKPV	VAQGGPAPG	VGSAPPASS	APPATPPTSG	APPGSGPGPT
PTPPPAVTS	PPGAPPTTP	SSGVPTTPQ	AGGPPPPAA	VPGPGGPKQ
GPGGGPKGG	KMPGGPKPG	GPGLSTPGH	PKPPHRGGG	PRGGRQHHP
YHQHHQGGP	PGGPGGRSE	KISDSEGFKA	NLSLLRRPGE	KTYTQRCRLF
VGNLPADITE	DEFKRLFAKY	GEPGEVFINK	GKGFGEFKLE	SRALAEIATA
ELDDTPMRGR	QLRVRFATHA	AALSVR NLSP	YVSNELLEEA	FSQFGPIERA
VVIVDDRGRS	TGKGIVEFAS	KPAARKAFER	CSEGVFLTT	TPRPVIVEPL
EQLDDEDGLP	EKLAQKNPMY	QKERETPPRF	AQHGTFEY EY	SQRWKS LDEM
EKQREQVEK	NMKDAKDKE	SEMEDAYHEH	QANLLRQDLM	RRQEELRRME
ELHNQEMQKR	KEMQLRQEE	RRRREEMMI	RQREMEEQMR	RQREESYSRM
GYMDPRERDM	RMGGGGAMNM	GDPYSGGQK	FPPLGGGGI	GYEANPGVPP
ATMSGSMGMS	DMRTERFGQG	GAGPVGGQGP	RGMGPGTPAG	YGRGREEYEG
PNKKPRF				

Abbildung 30: Aminosäuresequenz des Proteins *Splicing factor, proline- and glutamine rich* (SFPQ). Die Proteinbande #1 aus Abbildung 27 wurde mit 4 MS/MS-Analysen und einer Sequenzabdeckung von 9,2 % als *Splicing factor, proline- and glutamine rich* (SFPQ) bestätigt. Die gemessenen Peptide sind fett dargestellt und das in Abbildung 29 als Beispiel verwendete Peptid in gelb markiert. Unterstrichen ist der zuvor bestimmte Tag.

Die auf diese Weise identifizierten potentiellen Interaktionspartner von GRHL3 sind in Tabelle 25 aufgeführt. Die Sequenzen der jeweils identifizierten Peptide befinden sich im Anhang.

Tabelle 25: Potentielle GRHL3-Interaktionspartner

Bande #	Protein (Kurzbezeichnung)/uniprot	Sequenz- abdeckung	Anzahl Peptide
1	<i>Splicing factor, proline- and glutamine-rich</i> (SFPQ) / P23246	9,2 %	4
2	<i>Heat shock protein family A 5 (HSPA5)/glucose regulated protein 78 (GRP78)</i> / P11021	14,5 %	6
3	<i>Stress-70 protein, mitochondrial (GRP-75)</i> / P38646	12,5 %	6
4	<i>Leucine-rich repeat-containing protein 47 (LRRC47)</i> / Q8N1G4	13,2 %	4
5	<i>Eukaryotic translation initiation factor 3 subunit L (EIF3L)</i> / Q9Y262	12,9 %	6
6	<i>Non-POU domain-containing octamer-binding protein (NONO)</i> / Q15233	23,4 %	6

Die Proteine wurden mit einer Sequenzabdeckung zwischen 9 und 23 %, bzw. 4 bis 6 gemessenen Peptiden identifiziert. In keiner der Proben wurden Peptide gemessen, welche einem anderen Protein hätten zugeordnet werden können, weshalb davon ausgegangen werden kann, dass es sich bei den bisher analysierten, ko-präzipitierten potentiellen Interaktionspartner von GRHL3 tatsächlich um die in Tabelle 25 aufgeführten Proteine handelt.

4. Diskussion

Im Endothel werden alle Isoformen des Transkriptionsfaktors GRHL3 exprimiert. Diese Isoformen haben dabei nicht nur teilweise entgegengesetzte Funktionen, sondern aktivieren auch die Transkription unterschiedlicher Zielgene [44]. Eine Erklärung für diese Unterschiede zwischen den Isoformen kann eine differentielle Regulation der Transkriptionsfaktoren, sowohl hinsichtlich post-transkriptioneller Modifikationen, als auch der Interaktion mit anderen Proteinen sein. Da jedoch nichts über die Modifikation und nur wenig über die Protein-Protein-Interaktion von GRHL3 bekannt war, wurden diese Aspekte im Rahmen der vorliegenden Arbeit untersucht. Dazu gehörte die Identifizierung und Charakterisierung der Phosphorylierung des Transkriptionsfaktors und die Identifizierung bisher unbekannter Interaktionspartner. Zudem wurde die Regulation seiner Expression in einem Krankheitsmodell analysiert.

4.1. Etablierung eines neuen GRHL3-Antikörpers

Da kein ausreichend spezifischer Antikörper gegen GRHL3 kommerziell erhältlich war, wurden Untersuchungen zu GRHL3, welche im Vorfeld dieser Arbeit angefertigt wurden, zumeist mit den überexprimierten, Epitop-*tag* versehenen Proteinen, auf RNA-Ebene oder mit Hilfe eines *knock downs* durchgeführt. So wurde zum Beispiel eine Rolle von GRHL3 bei der Migration von Keratinozyten mit Hilfe eines *knock downs* gezeigt [19] und die Regulation der Endothelzellmigration, sowie -apoptose mit Hilfe des überexprimierten Proteins [68]. Eine Überexpression ist jedoch unphysiologisch und mit einem *knock down* kann lediglich der Verlust des jeweiligen Proteins untersucht werden. Um ein Protein und dessen Regulationsnetzwerk untersuchen zu können ist es essentiell, dass endogene Proteine detektieren zu können. Daher wurde zunächst im Rahmen der vorliegenden Arbeit in Zusammenarbeit mit Merck Millipore ein neuer Antikörper etabliert, welcher für den Einsatz im Western-Blot, der Immunpräzipitation und der Fluoreszenzmikroskopie geeignet ist (siehe Abschnitt 3.1). Es konnte gezeigt werden, dass der Antikörper sowohl im humanen System, sowie in der Maus verwendet werden kann. Dieser Antikörper bildet somit eine wichtige Grundlage um verschiedene Aspekte der Regulation von GRHL3, welche mit seiner Funktion bei der Wundheilung, der Embryonalentwicklung, der Endothelzellfunktion und bisher eventuell noch unbekanntem Prozessen verknüpft sind, zu analysieren.

4.2. Analyse der Phosphorylierung von GRHL3

Im Rahmen dieser Arbeit wurde erstmals die Phosphorylierung eines humanen Grainyhead-Homologs gezeigt. Wie in Abbildung 16 zu sehen konnte sowohl eine Threonin- als auch eine Tyrosinphosphorylierung des präzipitierten GRHL3-Proteins nachgewiesen werden. Letztere ist aufgrund des Phenolrings im Tyrosin, welcher sterisch relativ weit aus der Aminosäurekette herausragt, die am einfachsten zu detektierende Phosphorylierung. Zudem spielen Tyrosinphosphorylierungen bei Signalkaskaden, welche unter anderem das Zellwachstum, den Zell-Zyklus sowie die Zellmigration regulieren, eine große Rolle [53]. Die Tyrosinphosphorylierung von GRHL3 wurde daher im weiteren Verlauf der vorliegenden Arbeit genauer charakterisiert.

Nachdem eine Tyrosinphosphorylierung von GRHL3 in der embryonalen Nierenzelllinie HEK 293FT nachgewiesen worden war, wurde untersucht, ob diese Phosphorylierung ebenfalls in primären humanen Endothelzellen auftritt und ob sie durch externe Stimuli beeinflusst werden kann. Dazu wurden primäre humane Endothelzellen entweder mit einem NO-Donor oder einer erhöhten Menge H_2O_2 inkubiert. Es wurde bereits früher beschrieben, dass eine Erhöhung der exogenen Menge an reaktiven Sauerstoffspezies, durch eine Inkubation der Zellen mit H_2O_2 , die Apoptose der Zellen induziert [47]. NO dagegen ist einer der wichtigsten anti-apoptotischen und pro-migratorischen Stimuli für Endothelzellen (siehe Abschnitt 1.2). Zudem wurde bereits auf RNA-Ebene gezeigt, dass physiologische Konzentrationen an NO die Expression der Isoform 2 von GRHL3 erhöhen [68] und zudem das Gleichgewicht zwischen den Isoformen 1 und 3 in Richtung von Isoform 1 verschieben [44]. Wie in Abbildung 17 zu sehen wurde die Phosphorylierung von GRHL3 durch den pro-apoptotischen Einfluss von H_2O_2 nicht verändert. Die Inkubation der Zellen mit dem NO-Donor führte jedoch zu einer deutlich verstärkten Phosphorylierung von GRHL3 (siehe Abbildung 17 und 18).

Um die für die Tyrosinphosphorylierung von GRHL3 verantwortliche Kinase zu identifizieren wurde der Src-Kinase-Familien-Inhibitor PP2 verwendet. Die Src-Kinase-Familie wurde für diese Experimente ausgewählt, da bereits mehrfach eine Rolle dieser Kinasen in anti-apoptotischen und pro-migratorischen Signalwegen gezeigt werden konnte [58, 110, 127, 133]. Durch eine kurzzeitige Aktivierung der Src-Kinase erfolgt z. B. eine Freisetzung von VEGF, was zu einer Aktivierung der eNOS und damit zu einer erhöhten NO-Produktion führt [29]. Dies hat einen pro-migratorischen Effekt zur Folge.

Wie in Abbildung 18 zu sehen, führte eine Inhibition der Src-Kinase zu einer signifikanten Reduktion der NO-induzierten Phosphorylierung, weshalb davon auszugehen ist, dass diese Phosphorylierung durch ein Mitglied dieser Kinase-Familie erfolgt. Da PP2 keine Spezifität für eine bestimmte Src-Kinase aufweist ist eine weitere Eingrenzung mit diesem experimentellen Ansatz nicht möglich. Bereits früher wurde gezeigt, dass GRHL3 keinerlei Einfluss auf die zelluläre VEGF-Menge hat [68]. Deshalb ist es möglich, dass eine kurzzeitige Aktivierung der Src-Kinase zwei unabhängige Signalwege aktiviert, welche beide zum gleichen Ziel, nämlich der erhöhten Migration von Endothelzellen, führen. Dabei handelt es sich zum einen um die Erhöhung der NO-Synthese über die Src-abhängige Rekrutierung von eNOS durch Hsp90, zum anderen um die Aktivierung von eNOS über GRHL3. Im letzten Fall müsste angenommen werden, dass die Src-abhängige Phosphorylierung von GRHL3 zur Aktivierung dieses Transkriptionsfaktors führt. Ein solch synergistischer Effekt ist vor allem bei Prozessen wie dem schnellen Schließen von Wunden im Endothel nach einer Verletzung des Blutgefäßes denkbar, da dadurch ein erhöhter Blutverlust, oder das Eindringen von pathogenen Organismen und Substanzen verhindert wird.

Eine Transkriptionsfaktorfamilie für die bereits eine Src-Kinase abhängige Funktion in der Zellmigration gezeigt wurde, ist die Familie der *signal transducer and activator of transcription* (STAT)-Proteine. Diese sind normalerweise als inaktive Faktoren im Zytoplasma der Zelle lokalisiert und werden erst in Folge einer Aktivierung in den Zellkern importiert [52, 86]. Es wurde gezeigt, dass z. B. STAT3 durch fünf Mitglieder der Src-Kinase-Familie, zu welchen auch Src selbst gehört, phosphoryliert und somit aktiviert werden kann [103]. STAT3 ist zudem dafür bekannt, dass er die Migration von Fibroblasten reguliert und eine anti-apoptotische Rolle in vielen anderen Zelltypen hat [1, 36, 109]. Mechanistisch wird die anti-apoptotische Funktion von STAT3 unter anderem durch die Aktivierung verschiedener *Survival*-Gene, wie *B-cell lymphoma 2 (Bcl-2)* und *Myeloid Cell Leukemia 1 (Mcl-1)*, ausgeübt [6]. Auch für GRHL3 war gezeigt worden, dass eine Überexpression der Isoform 1 zu einer signifikanten Erhöhung der BCL-X_L-Level führt, bei dem es sich um ein Mitglied der BCL-2 Familie handelt [44].

Um die Src-Kinase-Familien-abhängige Tyrosinphosphorylierung von GRHL3 weiter zu untersuchen wurde eine computer-basierte Vorhersage potentieller Phosphorylierungsstellen für drei Mitglieder der Src-Kinase-Familien Src, Fyn und Yes durchgeführt (siehe Abbildung 19). Diese wurden ausgewählt, da sie

alle drei zur gleichen Unterfamilie der Src-Kinasen gehören [84]. Zu dieser Familie gehört auch die Kinase Fgr. Im Vergleich zu den anderen drei Kinasen wird diese jedoch nicht ubiquitär, sondern nur in myeloiden Zellen und B-Zellen exprimiert [110], weswegen sie für diese Vorhersage nicht berücksichtigt wurde. Für weitere Untersuchungen wurden Phosphorylierungsstellen ausgewählt, für die entweder eine potentielle Phosphorylierung durch mehrere Src-Kinasen vorhergesagt (Y171 und Y335) oder eine hohe Wahrscheinlichkeit für eine Phosphorylierung berechnet wurde (Y64).

Die Phosphorylierungsstellen an den Tyrosinen 64 und 335 zeigten zudem eine interessante Lokalisation innerhalb des Proteins (siehe Abbildung 19). Der Tyrosinrest an Position 64 befindet sich innerhalb der Aktivierungsdomäne von GRHL3. Eine Phosphorylierung an dieser Stelle könnte daher zu einer veränderten transkriptionellen Aktivität führen, indem zum Beispiel andere Ko-Aktivatoren oder Ko-Repressoren rekrutiert werden. Durch die Rekrutierung von Ko-Repressoren könnte diese Phosphorylierung auch zur Unterbrechung eines *feed forward loops* zwischen NO und GRHL3 beitragen. Im Vorfeld dieser Arbeit war von der AG Haendeler gezeigt worden, dass die Isoformen 1 und 2 von GRHL3 über die Aktivierung von Akt1 und eNOS die NO-Synthese steigern [44, 68]. Eine erhöhte Menge an NO wiederum führt zu einer erhöhten Expression von GRHL3 [68]. Da sich derartige *Loops* immer weiter amplifizieren muss es Mechanismen geben, die zu einer Unterbrechung führen. Man könnte spekulieren, dass dies über die Phosphorylierung von GRHL3 erfolgt, falls diese die Transkriptions-aktivierende Kapazität von GRHL3 verringert. Ein solch reprimierender Mechanismus wurde z. B. für den Faktor *ETS domain-containing protein Elk-1* beschrieben, bei dem eine Phosphorylierung zu einer Rekrutierung des Ko-Repressorkomplexes mSin3A-HDAC führt [135].

Wie sich die Phosphorylierung von GRHL3 auf seine Transkriptions-aktivierende Funktion auswirkt, das heißt aktivierend oder reprimierend, könnte in einem experimentellen Ansatz unter Verwendung eines Luziferase-Reportergens, wie es bereits für die verschiedenen Isoformen von GRHL3 durchgeführt wurde, nachgewiesen werden. Dazu müssten Expressionsvektoren für verschiedene Phosphomutanten, wie sie z. B. auch in Abschnitt 3.2.4 verwendet werden, zusammen mit einem Luziferase-Reporterkonstrukt in dem die Transkription der Luziferase-cDNA unter der Kontrolle von GRHL3 steht, ko-transfiziert werden. Ein weiteres Beispiel dafür, dass eine Phosphorylierung in der Aktivierungsdomäne zu einer Veränderung der Aktivität eines Transkriptionsfaktors führen kann, ist das Protein c-Jun, welches durch die *c-Jun N-terminal kinase 1* (JNK1) in der Aktivierungsdomäne phosphoryliert wird [26]. Diese Phosphorylierung

führt zu einer erhöhten transkriptionalen Aktivität [7], welche durch eine Dephosphorylierung des C-terminalen Teils von c-Jun erst vollständig ausgeschöpft wird [7]. Die entsprechende C-terminale Phosphorylierungsstelle befindet sich nahe der DNA-Bindedomäne und wird durch Proteinkinase-C aktivierte Phosphatasen dephosphoryliert, was eine erhöhte DNA-Bindeaktivität zur Folge hat [12]. Auch für GRHL3 wurde eine potentielle Phosphorylierungsstelle nahe der DNA-Bindestelle an Tyrosin 335 vorhergesagt. Eine Phosphorylierung dieser Aminosäure könnte demnach ähnlich wie bei c-Jun die DNA-Bindung inhibieren oder aber auch verstärken. In wie weit eine Phosphorylierung dieser Aminosäure die DNA-Bindung beeinflusst könnte zum Beispiel durch einen *electrophoretic mobility shift assay* (EMSA) unter Verwendung der *in vitro* translatierten, bereits vorher erwähnten, Phosphomutanten nachgewiesen werden, bei der die Bindung der entsprechend mutierten Proteine an die DNA analysiert wird.

Für weitere Untersuchungen wurden die vorhergesagten Phosphorylierungsstellen durch Nukleotidaustausche in den entsprechenden Expressionsvektoren so mutiert, dass während der Translation anstelle eines Tyrosins ein Phenylalanin in das Protein eingebaut wird. Diese Aminosäure ist dem Tyrosin zwar sehr ähnlich, kann jedoch durch das Fehlen der Hydroxylgruppe in der Seitenkette nicht mehr phosphoryliert werden. Es konnte bereits gezeigt werden, dass die mutierten Proteine in Endothelzellen überexprimiert werden kann (siehe Abbildung 20). Ein Unterschied in der NO-induzierten Phosphorylierung konnte jedoch nicht nachgewiesen werden (siehe Abbildung 21). Demnach handelt es sich bei den mutierten Phosphorylierungsstellen wahrscheinlich nicht um Aminosäuren, welche durch die Src-Kinase-Familie phosphoryliert werden. Eine weitere Erklärungsmöglichkeit wäre, dass mehrere dieser Tyrosine gleichzeitig Src-Kinase-abhängig phosphoryliert werden, so dass die Mutation einzelner Reste nicht zu einer starken Veränderung der Gesamtphosphorylierung führt und daher mit dem gewählten Ansatz nicht detektiert werden kann. Es ist jedoch auch möglich dass diese Phosphorylierungsstellen NO-unabhängig durch andere Kinasen phosphoryliert werden.

Dass GRHL3 zusätzlich unabhängig von Mitgliedern der Src-Kinase-Familie phosphoryliert wird ist in Abbildung 18 gezeigt. Durch die Inkubation der primären humanen Endothelzellen mit PP2 wird zwar die NO-induzierte Phosphorylierung von GRHL3 stark reduziert, jedoch nicht vollständig geblockt. Dass Transkriptionsfaktoren durch mehrere Tyrosinkinasen phosphoryliert werden können sieht man erneut an dem Beispiel der STATs, welche nicht nur durch

die Src-Kinase phosphoryliert werden, sondern auch durch die Janus Kinase (JAK) [52, 86, 107].

In der vorliegenden Arbeit wurde zunächst die Tyrosinphosphorylierung von GRHL3 genauer analysiert. Wie in Abbildung 16 zu sehen wurde neben der Tyrosinphosphorylierung auch eine Threoninphosphorylierung detektiert, die bisher experimentell jedoch noch nicht weiter untersucht wurde.

Dass Transkriptionsfaktoren zusätzlich zur Phosphorylierung von Tyrosinen gleichzeitig auch durch die gleiche Modifikation an anderen Aminosäuren reguliert werden können, wurde bereits an den STAT-Proteinen STAT1 und STAT3 gezeigt, welche zum Erreichen ihrer maximalen Transkriptionsaktivität sowohl eine Tyrosin-, als auch eine Serinphosphorylierung benötigen [126].

Für das *Drosophila*-Homolog GRH wurde eine Phosphorylierung durch die *extracellular-signal regulated kinase* (ERK) an den Serinresten 88 und 91, welche sich N-terminal der Aktivierungsdomäne befinden, gezeigt [56, 66]. Diese Phosphorylierung ist unter anderem für die Wundheilung in *Drosophila* wichtig. Der N-terminale Teil, in dem sich diese Phosphorylierungstellen befinden ist im Säuger-Protein jedoch nicht vorhanden. Allerdings phosphorylieren viele der Kinasen, welche für eine Serinphosphorylierung verantwortlich sind auch Threonine, weshalb, nach der Identifizierung einer Threoninphosphorylierung in GRHL3, der für das *Drosophila*-GRH beschriebene Mechanismus auch für das Säuger-Protein relevant sein könnte. Für eine funktionelle Analyse der Phosphorylierung von GRH wurden Mutanten generiert, bei denen die Serine einzeln, oder zusammen durch ein Alanin ersetzt wurden, wodurch sie nicht mehr phosphoryliert werden konnten. Es zeigte sich, dass die GRH-Phosphorylierung weder die DNA-Bindung beeinflusst, noch für die Entwicklung einer intakten Cuticula verantwortlich ist. Wie bereits vorher beschrieben, wurde jedoch beobachtet, dass in Folge einer artifiziellen Verletzung, die Phosphorylierung von GRH durch ERK essentiell für die Wundheilung ist [56]. Interessant ist, dass für GRH ein ähnlicher *feed forward loop* beschrieben wurde, wie er für GRHL3 vermutet wird [56, 124]. Es wurde gezeigt, dass Die Tyrosinkinase *Sticher* zu einer Aktivierung von ERK führt. ERK wiederum ist für die Phosphorylierung von GRH an Serin 88 und Serin 91 verantwortlich und GRH schließlich reguliert die Transkription von *Sticher* [56, 124].

Mit den bisherigen Versuchen war es nicht möglich die Phosphorylierungsstellen in GRHL3 genau zu definieren. Um die phosphorylierten Aminosäurereste zu identifizieren müssten daher andere experimentelle Ansätze gewählt werden.

4.3. Untersuchung der GRHL3 Expression *ex vivo* und *in vivo*

Wie bereits beschrieben, wird durch NO die RNA-Menge der verschiedenen GRHL3 Isoformen beeinflusst. Dabei wird die Transkriptmenge der Isoformen mit einem positiven Einfluss auf Endothelzellen erhöht. Im Rahmen dieser Arbeit wurden, nachdem ein Antikörper zum Nachweis des GRHL3-Proteins etabliert worden war, die Veränderung in der GRHL3-Proteinmenge in Endothelzellen in Abhängigkeit von einem NO-beeinflussenden Stimulus untersucht. Nach einer Inkubation von primären humanen Endothelzellen mit LDL und Fruktose wurde eine Reduktion der GRHL3-Expression beobachtet (siehe Abbildung 22). Um zu untersuchen ob diese Beobachtungen auf ein *in vivo* Modell übertragbar sind, wurden immunfluoreszenzmikroskopische Untersuchungen mit Aorten von ApoE-defizienten Mäusen durchgeführt. Diese Mäuse entwickeln durch eine ungesunde, fettreiche Ernährung (*western-diet*) sehr schnell Arteriosklerose [78]. Wie in Abbildung 23 und 24 zu sehen, wurde auch mit diesem experimentellen Ansatz gezeigt, dass die Expression von GRHL3 in Folge einer fettreichen Ernährung reduziert wird.

In früheren Publikationen wurde bereits beschrieben, dass eine ungesunde Ernährung zu einer verringerten Expression der eNOS führt [17]. Im Rahmen der dazu durchgeführten Experimente wurden Endothelzellen mit LDL inkubiert, um eine ungesunde Ernährung zu simulieren. Es gibt mehrere Publikationen, die Mechanismen beschreiben, durch welche erhöhte LDL-Werte die Gefäßfunktion beeinflussen und zur Bildung arteriosklerotischer Plaques führen [16, 108]. Unter anderem wurde gezeigt, dass die oxidierte Form von LDL die Expression von proinflammatorischen Genen erhöht, sowie zu einer verstärkten Bildung von reaktiven Sauerstoffspezies führt. Des Weiteren wurde nachgewiesen, dass oxidiertes LDL die Apoptose von Endothelzellen induziert und die VEGF induzierte Migration inhibiert [21, 102]. Diese Effekte resultieren unter anderem aus einer verminderten Expression und Aktivität der eNOS und damit einer verminderten NO-Synthese [65, 72].

Da gezeigt wurde, dass NO die RNA-Menge der Isoformen 1 und 2 von GRHL3 in Endothelzellen erhöht [44], kann vermutet werden, dass LDL, bzw. eine fettreiche Ernährung die Expression von GRHL3 über eine Herabregulation von eNOS und damit eine verringerte NO-Verfügbarkeit reduziert. Da durch NO auch die RNA-Menge der Isoform 3 reduziert wird, kann vermutet werden, dass

eine Reduktion der NO Menge das Gleichgewicht zwischen den Isoformen in Richtung der Isoform 3 verschiebt, was eine endotheliale Dysfunktion begünstigen könnte und damit zur Entstehung von Arteriosklerose beiträgt.

Im Zuge der fluoreszenzmikroskopischen Untersuchung wurde zum ersten Mal eine Expression von GRHL3 in glatten Muskelzellen beobachtet, welche anschließend sowohl auf RNA-, als auch auf Protein-Ebene bestätigt werden konnte (siehe Abbildung 25 und 26). Der Nachweis dieser Expression führt zu der Annahme, dass GRHL3 auch in diesem Zelltyp eine funktionelle Rolle spielen könnte.

4.4. Identifizierung potentieller Interaktionspartner von GRHL3

Für die Analyse weiterer post-translationaler Regulationsmechanismen wurde nach bisher unbekanntem Interaktionspartnern von GRHL3 gesucht. Bisher war lediglich bekannt, dass innerhalb der GRHL-Familie eine Homo- und Heterodimerisierung, sowie die DNA-Bindung als Dimer stattfindet [113]. Auch das Homolog in *Drosophila* ist in der Lage mit Mitgliedern der GRH-Unterfamilie zu dimerisieren [117]. Eine Dimerisierung mit der nah verwandten CP2-Unterfamilie findet jedoch nicht statt [113]. Über einen massenspektrometrischen Versuchsansatz wurden neue potentielle Interaktionspartner identifiziert. Die Proteine welche anhand der gemessenen Peptide bestimmt werden konnten sind in Tabelle 25 aufgeführt. Anhand der Literatur konnte für einige dieser Proteine, wie NONO (*Non-POU domain-containing octamer binding protein*), SFPQ (*splicing factor, prolin- and glutamine-rich*) und GRP78 (*glucose regulated protein 78*) ein Zusammenhang zu Funktionen von GRHL3 hergestellt werden. Für andere Proteine, wie GRP75/*stress-70-protein*, EIF3L oder LRC47 wurden dagegen lediglich einige wenige Hinweise auf eine Rolle im kardiovaskulären System gefunden.

Die Proteine NONO (*Non-POU domain-containing octamer binding protein*) und SFPQ (*splicing factor, prolin- and glutamine-rich*) gehören zu einer Gruppe von Proteinen, die als *Drosophila behavior/human splicing* (DBHS) Protein-Familie bezeichnet wird [59]. Es wurde gezeigt, dass die Proteine NONO und SFPQ in vielen Fällen eine gemeinsame Funktion haben und als Homo- oder Heterodimer die DNA binden [33, 59, 88]. Beide Proteine sind in viele unterschiedliche Prozesse involviert, die an der Regulation der Genexpression beteiligt sind, dar-

unter Transkription und das Spleißen von prä-mRNA, da sie sowohl an DNA, als auch an RNA binden können [59]. Interessanterweise scheint der Einfluss von SFPQ und NONO auf Transkription abhängig vom jeweiligen Kontext zu sein. So wurde gezeigt, dass NONO direkt an eine *Enhancer*-Region im Rhodopsin-Gen bindet und dessen Transkription aktiviert [134]. Zudem kann NONO die Expression des *POU class 5 Homeobox 1 (POU5F1)/octamer binding protein 4 (Oct-4)*-Gens über eine spezifische Bindung an den Promotor dieses Gens regulieren [85].

Eine DNA-Bindung von SFPQ wurde unter anderem für das das *insulin-like growth factor response*-Element im Gen des steroidogenens Enzyms P450scc gezeigt. Diese Bindung führt zur Inhibition einer durch den *insulin-like growth factor 1* induzierten Transkription [115].

Neben der direkten DNA-Bindung wurde sowohl für NONO, als auch für SFPQ gezeigt, dass sie mit anderen Transkriptionsfaktoren interagieren können und dadurch die transkriptionsregulatorische Aktivität dieser Proteine regulieren. Beide Proteine interagieren z. B. mit den DNA-Bindedomänen des Thyroidhormonrezeptors und des Retinoid-X-Rezeptors. Diese Interaktion hat die Rekrutierung von Histondeacetylasen und somit eine Inhibition der Transkription zur Folge, wodurch NONO und SFPQ wie Ko-Repressoren wirken [71]. Umgekehrt können die DBHS-Proteine auch als Ko-Aktivatoren für den Androgenrezeptor fungieren [62]. SFPQ kann zudem mit der Transkriptionsfaktoraktivität des Progesteronrezeptors interferieren, indem es dessen DNA-Bindung verhindert [28]. Die Interaktionen mit anderen Transkriptionsfaktoren illustrieren, dass eine Interaktion der, in der vorliegenden Arbeit identifizierten, DBHS-Proteine mit GRHL3 durchaus möglich wäre. Interessanterweise zeigt die NONO-Bindestelle im *oct-4*-Promotor (5'-CCGGTGAC-3') [85] eine Überlappung mit der GRHL3-Konsensus-Bindesequenz (5'-AACCGGTT-3') [111], so dass die beiden Proteine möglicherweise in einem Komplex an ähnliche Sequenzen binden könnten. Da die DBHS-Proteine sowohl eine Transkriptionsaktivierende, als auch –inhibierende Funktion haben können, wäre darüber zudem auch zu erklären, dass in *Microarray*-Analysen nach einer Überexpression von GRHL3 nicht nur induzierte, sondern auch reprimierte Gene gefunden wurden [44]. Je nach Kontext wäre dabei die Rekrutierung von Ko-Aktivatoren oder –Repressoren möglich. NONO und SFPQ sind allerdings nicht nur im Hinblick auf die Regulation GRHL3-abhängiger Gene als Interaktionspartner von Interesse, sondern auch hinsichtlich ihrer Funktion beim Spleißen. Sowohl NONO, als auch SFPQ wurden als Komponente des für das Spleißen von prä-mRNA verantwortlichen Spleißosoms gefunden [39, 45]. Beide Faktoren sind jedoch keine essentiellen

Komponenten dieses Komplexes, weshalb vermutet wird, dass sie vor allem an der Regulation des alternativen Spleißens von prä-mRNA beteiligt sind [48, 55, 67]. Da eines der GRHL3-Primärtranskripte alternativ gespleißt werden kann, könnte man vermuten, dass GRHL3 durch eine Interaktion mit SFPQ und NONO möglicherweise an der Regulation seines eigenen Spleißens beteiligt ist.

Heat shock protein family A 5 (HSPA5)/glucose regulated protein 78 (GRP78) gehört zu einer Familie von Stress-induzierten Chaperonen, der heat shock protein 70 (HSP70)-Familie [63]. GRP78 ist vor allem für seine Rolle als Chaperon im endoplasmatischen Retikulum (ER) bekannt, in dem es unter anderem an der Stress-induzierte Aktivierung von Transmembranproteinen, wie dem *activating transcription factor 6 (ATF6)* beteiligt ist [64]. Es wurde gezeigt, dass GRP78 direkt an ATF6 bindet. In Folge von ER-Stress kommt es zur Abspaltung von GRP78, wodurch zwei Golgi-Lokalisationssignale in ATF6 frei werden und dessen Translokation ermöglicht wird [106].

In der Literatur wurde für GRP78 bereits mehrfach eine anti-apoptotische Funktion beschrieben. In Tumorzellen wurde z. B. eine erhöhte Expression von GRP78 gezeigt, welche unter anderem, über einen auf Akt und ERK basierenden Signalweg, zu einer Reduktion der Apoptose führt [73, 137]. Interessanterweise wurde gezeigt, dass GRP78 nicht nur im ER lokalisiert ist, sondern als Antwort auf ER-stress, auch im Zytoplasma und den Mitochondrien und dort anti-apoptotische Funktionen hat [79].

Wie für GRP78 wurde auch für GRHL3 gezeigt, dass es zum Schutz vor Apoptose beiträgt. Eine Überexpression von GRHL3 in Endothelzellen führte zu einer signifikanten Reduktion der Apoptose [44, 68].

Zusätzlich zu seiner Rolle bei der Apoptose wurde für GRP78 eine Beteiligung in der Angiogenese gezeigt. GRP78 kann an der Zellmembran von Endothelzellen durch ein Peptid aus der *a disintegrin and metalloproteinase domain 15 (ADAM15)*, einem Transmembran-Glycoprotein, aktiviert werden, was zu einer erhöhten Phosphorylierung von Akt und einer Aktivierung von ERK führt [92]. Interessanterweise ist dieser Prozess unabhängig von VEGF [92].

Auch für GRHL3 wird aufgrund seiner pro-migratorischen Eigenschaften eine Rolle in der Angiogenese vermutet. So konnte unter anderem gezeigt werden, dass bei einem *knock down* von GRHL3 die Migration von Endothelzellen inhibiert wird [68]. Zudem führt eine Überexpression der pro-migratorischen GRHL3 Isoformen 1 und 2 zu einer erhöhten Phosphorylierung an Akt 1. Da auch die GRHL3-induzierte Endothelzellmigration scheinbar nicht über eine Erhöhung der VEGF-Level verläuft [68], ist eine funktionelle Kooperation von GRHL3 und

GRP78 in einem VEGF-abhängigen Signalweg vorstellbar.

Neben einer Rolle bei der Angiogenese wurde weiterhin gezeigt, dass GRP78 in seine Funktion als Rezeptor unter anderem über eine Aktivierung von Src-Kinasen die Integrität der Gefäßwand aufrechterhält [8]. Ähnlich wurden für GRHL3 Mechanismen beschrieben, die zu einer Aufrechterhaltung der epidermalen Hautbarriere führen [111]. Es ist daher möglich, dass GRHL3 ebenso die Barrierefunktion des Endothels positiv beeinflussen kann.

In der vorliegenden Arbeit konnte anhand der fluoreszenzmikroskopischen Analysen auch eine Lokalisation von GRHL3 außerhalb des Zellkerns nachgewiesen werden (siehe Abbildung 15, 23 und 24). Zudem wurde in der Literatur gezeigt, dass in Folge einer Induktion durch ER Stress oder nach einer artifiziellen Überexpression GRP78 im Zellkern nachgewiesen werden kann [93, 94]. Aufgrund ihrer Lokalisation und der Beteiligung an ähnlichen physiologischen Prozessen ist eine Interaktion von GRP78 mit GRHL3 durchaus denkbar.

Neben GRP78 wurde ein weiteres Mitglied der HSP70-Familie als potentieller Interaktionspartner von GRHL3 identifiziert. Dabei handelt es sich um *heat shock protein family A 9 (HSPA9)/glucose regulated protein 75 (GRP75)*. Es wurde ursprünglich als mitochondriales Chaperon beschrieben, findet sich aber auch in anderen Zellkompartimenten [120]. Dieses Protein ist in vielen Tumoren überexprimiert [121], wo es die Funktionen des Tumorsuppressors p53 inhibiert. Mechanistisch geschieht dies über Bindung an p53 und dessen Sequestrierung im Cytosol, was die Aktivierung von p53-Zielgenen und Induktion von Apoptose oder Seneszenz verhindert [122, 123]. Später wurde gezeigt, dass die Blockade dieser Komplexbildung die nukleäre Translokation von p53 erlaubt und damit zur funktionellen Reaktivierung von p53 führt [40, 80]. Aufgrund der vorwiegend zytosolischen Lokalisation von GRP75 in nicht-transformierten Zellen [119] und der Beobachtung, dass sich GRHL3 auch im Zytoplasma von Endothelzellen findet, ist es denkbar, dass dieses Protein wie im Fall von p53 auch an der Verteilung von GRHL3 zwischen den verschiedenen Zellkompartimenten beteiligt ist.

Das *leucin-rich repeat protein 47 (LRRC47)* wurde in einem Ansatz zur Klonierung möglichst aller humaner cDNAs identifiziert [83]. Es ist innerhalb der Vertebraten konserviert [82] und gehört zu der Familie der *leucin-rich repeat proteins*, welche sich durch eine sich wiederholende Leucin-reiche Domäne auszeichnen. Dabei handelt es sich um ein 20-30 Aminosäuren langes Strukturmotiv, das in sehr vielen Proteinen vorkommt und strukturelle Variabilität

aufweist [4]. Mehrere dieser Wiederholungen formen eine gebogene dreidimensionale Struktur, die als Protein-Interaktionsdomäne genutzt zu werden scheint [60]. Über Funktionen von LRRC47 ist allerdings nichts bekannt.

Der Translationsinitiationsfaktor EIF3L (*eukaryotic translation initiation factor 3 subunit L*) ist eine Untereinheit des EIF3 Komplexes. Die Initiation der Translation in Säugern erfordert mindestens 11 verschiedene Initiationsfaktorkomplexe, von denen EIF3 der grösste ist und aus 13 Untereinheiten besteht [23]. Zusammen mit der ribosomalen 40S Untereinheit, der Initiator tRNA und anderen Initiationsfaktoren ist er an der Erkennung des Translationsinitiationscodons beteiligt [49]. Bisher wurden für EIF3 keine Interaktionen mit Transkriptionsfaktoren beschrieben. Es wird allerdings kontrovers diskutiert, ob ein Teil der Säuger-Translationsmaschinerie im Zellkern lokalisiert ist und damit möglicherweise mit dem Transkriptionsapparat interagieren könnte. Während bei Bakterien Transkription und Translation gekoppelt sind, wurde für Eukaryonten generell angenommen, dass diese beiden Prozesse räumlich getrennt sind. Inzwischen gibt es einige Befunde, dass einzelne Komponenten des Translationsapparats auch im Zellkern sind und auch räumlich mit aktiv transkribierten Regionen kolokalisieren [3, 15]. Bisher ist jedoch unklar, ob diese Befunde tatsächlich Translationsprozesse im Kern widerspiegeln, welche Funktion diese haben und ob es Rückkopplung mit generellen oder Sequenz-spezifischen Transkriptionsfaktoren gibt [22, 95].

Anhand der in der Literatur beschriebenen Funktionen und Interaktionen der identifizierten Proteine kann eine Priorisierung für eine Validierung bezüglich der Wechselwirkung mit GRHL3 vorgenommen werden. Die Proteine SFPQ, NONO und GRP78 sind dabei von größerem Interesse und sollen als erstes untersucht werden. Dies schließt jedoch eine spätere Validierung der anderen Proteine nicht aus.

4.5. Ausblick

Mit der gewählten Vorgehensweise konnte zwar gezeigt werden, dass GRHL3 in Endothelzellen an Tyrosin- und Threoninresten phosphoryliert wird, es war aber nicht möglich die Position der modifizierten Aminosäurereste zu identifizieren. Daher soll als nächstes ein massenspektrometrischer Ansatz verfolgt werden, bei dem nach der Immunpräzipitation von GRHL3 und dem tryptischen Verdau Phosphopeptide angereichert und massenspektrometrisch, im Vergleich zu vorher enzymatisch dephosphorylierten Proben, gemessen werden. Über diesen Ansatz sollte es möglich sein nicht nur phosphorylierte Tyrosinreste, sondern auch gleichartig modifizierte Serin- und Threoninreste zu ermitteln. Für letztere sollen wiederum die an der Phosphorylierung beteiligten Kinasen ermittelt werden.

Die funktionelle Relevanz der verschiedenen Phosphorylierungen wird dann durch die Expression nicht-phosphorylierbarer und phospho-mimetischer Mutanten untersucht, die analog zu den in dieser Arbeit bereits beschriebenen erzeugt werden. Nach Überexpression dieser Mutanten wird deren Einfluss auf subzelluläre Lokalisation, DNA-Bindung, Transkriptionsaktivierung, Endothelzellmigration und –apoptose sowie auf eNOS-Aktivierung und NO-Bioverfügbarkeit untersucht.

Mit der schon erfolgreich durchgeführten massenspektrometrischen Analyse sollen weitere potentielle Interaktionspartner von GRHL3 in Endothelzellen identifiziert werden. Zudem werden die bisher identifizierten Interaktionspartner über eine reziproke Ko-Immunopräzipitationen verifiziert. Die Funktionen von validierten Interaktionspartnern in Endothelzellen können durch deren Überexpression oder siRNA-vermittelte Herabregulation und Analyse der oben beschriebenen funktionellen, zellulären Parameter untersucht werden. Ein Einfluss auf GRHL3-abhängige zelluläre Prozesse kann dabei durch gleichzeitige Überexpression von GRHL3 ermittelt werden. Ob Phosphorylierungen von GRHL3 an den Protein-Protein-Interaktionen beteiligt sind, lässt sich mit den nicht-phosphorylierbaren und phospho-mimetischen Mutanten von GRHL3 ermitteln.

Nachdem ein Einfluss einer ungesunden Ernährung auf die Expression von GRHL3 detektiert wurde, soll untersucht werden, ob eine differentielle Regulation der Isoformen, wie sie für NO gezeigt wurde, stattfindet. Da der Antikörper gegen ein Epitop in GRHL3 gerichtet ist, welches in allen drei Isoformen vorkommt, muss dies zunächst auf RNA-Ebene erfolgen, indem Isoform-spezifische Primer

in einer Polymerasekettenreaktion eingesetzt werden. Da im Rahmen dieser Arbeit zum ersten Mal eine Expression von GRHL3 in glatten Muskelzellen gezeigt wurde, soll nachfolgend die Funktion in diesem Zelltyp analysiert werden. Dies geschieht wiederum durch Überexpression oder Herabregulation von GRHL3, ein Parameter, der vordringlich untersucht werden sollte, ist die Proliferation dieser Zellen, da diese bei der Entwicklung arteriosklerotischer Plaques gesteigert ist. Diese über Untersuchungen sollten weitere Aufschlüsse über GRHL3-Funktionen in der Gefäßwand und seine mögliche Rolle in der Aufrechterhaltung der Gefäßfunktion oder aber auch bei pathophysiologischen Veränderungen geben.

5. Zusammenfassung

Der Transkriptionsfaktor Grainyhead-like 3 (GRHL3) spielt eine essentielle Rolle im humanen Endothel indem er Migration, Apoptose von Endothelzellen sowie die Aktivität der endothelialen NO-Synthase reguliert. Allerdings sind die Mechanismen, die an der Regulation der Aktivität dieses Proteins beteiligt sind, weitgehend unbekannt. Transkriptionsfaktoren können durch post-translationale Modifikationen wie z. B. Phosphorylierung, aber auch durch die Interaktionen mit anderen Proteinen reguliert werden. Daher war ein Ziel dieser Arbeit die Phosphorylierung von GRHL3 zu untersuchen, über die in Säugern bisher nichts bekannt war. Um das endogene Protein analysieren zu können, wurde zunächst ein neuer Antikörper gegen GRHL3 etabliert. Nachfolgend konnte zum ersten Mal nachgewiesen werden, dass GRHL3 sowohl an Threonin-, als auch an Tyrosinresten phosphoryliert wird. Eine weitere Charakterisierung der Tyrosinphosphorylierung zeigte, dass es sich um eine NO-induzierte Src-Kinase-abhängige Phosphorylierung handelt. Detailliertere Untersuchungen zeigten, dass die Tyrosinreste an den Positionen 64, 171 und 335 entweder für diese Phosphorylierung nicht relevant sind oder möglicherweise mehrere dieser Reste gleichzeitig Src-abhängig oder durch andere Tyrosinkinasen phosphoryliert werden.

Aus der NO-Abhängigkeit der GRHL3-Phosphorylierung ergab sich als ein weiteres Ziel dieser Arbeit die GRHL3-Expression in Abhängigkeit eines NO-regulierenden Stimulus mit pathophysiologischer Bedeutung zu untersuchen. Es konnte gezeigt werden, dass die Behandlung von primären humanen Endothelzellen mit LDL und Fruktose die Protein-Menge von GRHL3 reduziert. Dieses Ergebnis wurde in einem Mausmodell validiert, in dem gezeigt wurde, dass eine Hochfett-Diät die Expression von GRHL3 im Aorten-Endothel verringert. Im Rahmen dieser *in vivo* Versuche wurde zudem erstmals eine Expression von GRHL3 in glatten Muskelzellen der Gefäßwand nachgewiesen, die *ex vivo* sowohl auf RNA-, als auch auf Protein-Ebene validiert wurde.

In der vorliegenden Arbeit wurden zudem bisher unbekannte, potentielle Interaktionspartner von GRHL3 über eine Ko-Immunitätspräzipitation und eine nachfolgende massenspektrometrische Analyse identifiziert.

In Zukunft sollen die Relevanz der Phosphorylierungen von GRHL3, seiner Wechselwirkungen mit den verschiedenen Interaktionspartnern für die Endothelfunktion sowie seine Rolle in glatten Muskelzellen untersucht werden um damit ein umfangreicheres Bild der Rolle dieses Transkriptionsfaktors in der Physiologie und Pathophysiologie der Gefäßwand zu erhalten.

6. Summary

The transcription factor grainyhead-like 3 (GRHL3) plays an essential role in the human endothelium by regulating migration and apoptosis of endothelial cells as well as the activity of the endothelial NO-synthase. However, the mechanisms involved in the regulation of the activity of this protein, are largely unknown. Transcription factors are known to be regulated by post-translational modifications, e.g. phosphorylation, but also by interactions with other proteins. Therefore, one of the aims of this work was to analyze the phosphorylation of GRHL3 as nothing was known about this modification in mammals. Initially, a new GRHL3 antibody was established, to be able to analyze the endogenous protein. Subsequently, it was demonstrated for the first time that GRHL3 is phosphorylated on threonine as well as on tyrosine residues. Further characterization showed that the tyrosine phosphorylation is NO-inducible and Src-kinase dependent. Detailed studies revealed that the tyrosines in position 64, 171 and 335 are not relevant for this phosphorylation. Alternatively, several of them could be simultaneously phosphorylated by Src-kinases or they could target for other tyrosine kinases.

Based on the NO-inducible phosphorylation of GRHL3, a second aim was the analysis of GRHL3 expression in dependence on an NO-regulating stimulus with pathophysiological relevance. It could be shown that treatment with LDL and fructose reduces GRHL3 protein levels in endothelial cells. This was corroborated in a mouse model, in which a high fat diet reduced the expression of GRHL3 in the aortic endothelium. Within the context of these experiments it was demonstrated for the first time that GRHL3 is also expressed in vascular smooth muscle cells, which was validated *ex vivo* on the RNA and protein level. Furthermore, in the present work so far unknown, potential interaction partners of GRHL3 were identified by co-immunoprecipitation and subsequent mass spectrometric analysis. In the future, the impact of GRHL3 phosphorylation and of its interactions with the different proteins on endothelial function as well as its role in smooth muscle cells will be examined to get a more comprehensive picture of the functions of this transcription factor in the physiology and pathophysiology of the vascular wall.

7. Publikationen mit Bezug zur Dissertation

Zurek M, Altschmied J, **Kohlgrüber S**, Ale-Agha N, Haendeler J, *Role of Telomerase in the Cardiovascular Systems*, Genes 2016

Kohlgrüber S, Upadhye A, Dyballa-Rukes N, McNamara C, Altschmied J, *Regulation of transcription factors by reactive oxygen species and nitric oxide in vascular physiology and pathology*, Antioxid Redox Signal (in Revision)

8. Literaturverzeichnis

- [1] K. Al Zaid Siddiquee and J. Turkson. Stat3 as a target for inducing apoptosis in solid and hematological tumors. *Cell Res*, 18(2):254–267, 2008.
- [2] L. D. Attardi and R. Tjian. Drosophila tissue-specific transcription factor ntf-1 contains a novel isoleucine-rich activation motif. *Genes Dev*, 7(7B):1341–53, 1993.
- [3] S. Baboo, B. Bhushan, H. Jiang, C. R. M. Grovenor, P. Pierre, B. G. Davis, and P. R. Cook. Most human proteins made in both nucleus and cytoplasm turn over within minutes. *PLoS One*, 9(6):e99346, 2014.
- [4] J. Bella, K. Hindle, P. McEwan, and S. Lovell. The leucine-rich repeat structure. *Cell Mol Life Sci*, 65(15):2307–2333, 2008.
- [5] B. A. Benayoun and R. A. Veitia. A post-translational modification code for transcription factors: sorting through a sea of signals. *Trends Cell Biol*, 19(5):189–197, 2009.
- [6] S. Bhattacharya, R. M. Ray, and L. R. Johnson. Stat3-mediated transcription of bcl-2, mcl-1 and c-iap2 prevents apoptosis in polyamine-depleted cells. *Biochem J*, 392(Pt 2):335–344, 2005.
- [7] B. Binetruy, T. Smeal, and M. Karin. Ha-ras augments c-jun activity and stimulates phosphorylation of its activation domain. *Nature*, 351(6322):122–127, 1991.
- [8] A. A. Birukova, P. A. Singleton, G. Gawlak, X. Tian, T. Mirzapioazova, B. Mambetsariev, O. Dubrovskiy, O. V. Oskolkova, V. N. Bochkov, and K. G. Birukov. Grp78 is a novel receptor initiating a vascular barrier protective response to oxidized phospholipids. *Mol Biol Cell*, 25(13):2006–2016, 2014.
- [9] Y. Boglev, T. Wilanowski, J. Caddy, V. Parekh, A. Auden, C. Darido, N. R. Hislop, M. Cangkrama, S. B. Ting, and S. M. Jane. The unique and cooperative roles of the grainy head-like transcription factors in epidermal development reflect unexpected target gene specificity. *Dev Biol*, 349(2):512–22, 2011.
- [10] P. Bork, L. Holm, and C. Sander. The immunoglobulin fold. structural classification, sequence patterns and common core. *J Mol Biol*, 242(4):309–320, 1994.
- [11] W. Bourguet, P. Germain, and H. Gronemeyer. Nuclear receptor ligand-binding domains: three-dimensional structures, molecular interactions and pharmacological implications. *Trends Pharmacol Sci*, 21(10):381–388, 2000.

- [12] W. Boyle, T. Smeal, L. Defize, P. Angel, J. Woodgett, M. Karin, and T. Hunter. Activation of protein kinase c decreases phosphorylation of c-jun at sites that negatively regulate its dna-binding activity. Cell, 64(3):573–584, 1991.
- [13] S. J. Bray and F. C. Kafatos. Developmental function of elf-1: an essential transcription factor during embryogenesis in drosophila. Genes Dev, 5(9):1672–83, 1991.
- [14] D. P. Brazil, J. Park, and B. A. Hemmings. Pkb binding proteins. getting in on the akt. Cell, 111(3):293–303, 2002.
- [15] S. Brogna, T.-A. Sato, and M. Rosbash. Ribosome components are associated with sites of transcription. Mol Cell, 10(4):93–104, 2002.
- [16] M. S. Brown and J. L. Goldstein. A receptor-mediated pathway for cholesterol homeostasis. Science, 232(4746):34–47, 1986.
- [17] N. Büchner, N. Ale-Agha, S. Jakob, U. Sydlik, K. Kunze, K. Unfried, J. Altschmied, and J. Haendeler. Unhealthy diet and ultrafine carbon black particles induce senescence and disease associated phenotypic changes. Exp Gerontol, 48(1):8–16, 2013.
- [18] A. E. Caballero. Endothelial dysfunction in obesity and insulin resistance: a road to diabetes and heart disease. Obes Res, 11(11):1278–1289, 2003.
- [19] J. Caddy, T. Wilanowski, C. Darido, S. Dworkin, S. B. Ting, Q. Zhao, G. Rank, A. Auden, S. Srivastava, T. A. Papenfuss, J. N. Murdoch, P. O. Humbert, V. Parekh, N. Boulos, T. Weber, J. Zuo, J. M. Cunningham, and S. M. Jane. Epidermal wound repair is regulated by the planar cell polarity signaling pathway. Dev Cell, 19(1):138–47, 2010.
- [20] S. M. Carr, A. Poppy Roworth, C. Chan, and N. B. La Thangue. Post-translational control of transcription factors: methylation ranks highly. FEBS J, 282(23):4450–4465, 2015.
- [21] E. Chavakis, E. Dernbach, C. Hermann, U. F. Mondorf, A. M. Zeiher, and S. Dimmeler. Oxidized ldl inhibits vascular endothelial growth factor-induced endothelial cell migration by an inhibitory effect on the akt/endothelial nitric oxide synthase pathway. Circulation, 103(16):2102–2107, 2001.
- [22] J. E. Dahlberg, E. Lund, and E. B. Goodwin. Nuclear translation: what is the evidence? RNA, 9(1):1–8, 2003.
- [23] E. Damoc, C. S. Fraser, M. Zhou, H. Videler, G. L. Mayeur, J. W. B. Hershey, J. A. Doudna, C. V. Robinson, and J. A. Leary. Structural characterization of the human eukaryotic initiation factor 3 protein complex by mass spectrometry. Mol Cell Proteomics, 6(7):1135–1146, 2007.

- [24] C. Das and T. K. Kundu. Transcriptional regulation by the acetylation of nonhistone proteins in humans – a new target for therapeutics. IUBMB Life, 57(3):137–149, 2005.
- [25] A. Dereeper, V. Guignon, G. Blanc, S. Audic, S. Buffet, F. Chevenet, J.-F. Dufayard, S. Guindon, V. Lefort, M. Lescot, J.-M. Claverie, and O. Gascuel. Phylogeny.fr: robust phylogenetic analysis for the non-specialist. Nucleic Acids Res, 36(Web Server issue):W465–W469, 2008.
- [26] B. Derijard, M. Hibi, I. Wu, T. Barrett, B. Su, T. Deng, M. Karin, and R. Davis. Jnk1: a protein kinase stimulated by uv light and ha-ras that binds and phosphorylates the c-jun activation domain. Cell, 76(6):1025–1037, 1994.
- [27] S. Dimmeler, I. Fleming, B. Fisslthaler, C. Hermann, R. Busse, and A. Zeiher. Activation of nitric oxide synthase in endothelial cells by akt-dependent phosphorylation. Nature, 399(6736):601–605, 1999.
- [28] X. Dong, O. Shylnova, J. R. G. Challis, and S. J. Lye. Identification and characterization of the protein-associated splicing factor as a negative co-regulator of the progesterone receptor. J Biol Chem, 280(14):13329–13340, 2005.
- [29] M. Duval, F. Le Boeuf, J. Huot, and J.-P. Gratton. Src-mediated phosphorylation of hsp90 in response to vascular endothelial growth factor (vegf) is required for vegf receptor-2 signaling to endothelial no synthase. Mol Biol Cell, 18(11):4659–4668, 2007.
- [30] N. Dyballa and S. Metzger. Fast and sensitive coomassie staining in quantitative proteomics. Methods Mol Biol, 893:47–59, 2012.
- [31] P. C. Echeverria, G. Mazaira, A. Erlejman, C. Gomez-Sanchez, G. Piwien Pilipuk, and M. D. Galigniana. Nuclear import of the glucocorticoid receptor-hsp90 complex through the nuclear pore complex is mediated by its interaction with nup62 and importin beta. Mol Cell Biol, 29(17):4788–4797, 2009.
- [32] T. M. Filtz, W. K. Vogel, and M. Leid. Regulation of transcription factor activity by interconnected post-translational modifications. Trends Pharmacol Sci, 35(2):76–85, 2014.
- [33] A. H. Fox, C. S. Bond, and A. I. Lamond. P54nrb forms a heterodimer with psp1 that localizes to paraspeckles in an rna-dependent manner. Mol Biol Cell, 16(11):5304–5315, 2005.
- [34] A. Frankel and P. Kim. Modular structure of transcription factors: implications for gene regulation. Cell, 65(5):717–719, 1991.
- [35] R. Furchgott and J. Zawadzki. The obligatory role of endothelial cells in the relaxation of arterial smooth muscle by acetylcholine. Nature, 288(5789):373–376, 1980.

- [36] L.-f. Gao, D.-q. Xu, L.-j. Wen, X.-y. Zhang, Y.-t. Shao, and X.-j. Zhao. Inhibition of stat3 expression by sirna suppresses growth and induces apoptosis in laryngeal cancer cells. Acta Pharmacol Sin, 26(3):377–383, 2005.
- [37] F. Geng, S. Wenzel, and W. P. Tansey. Ubiquitin and proteasomes in transcription. Annu Rev Biochem, 81:177–201, 2012.
- [38] T. Gilmore. Introduction to nf-kappab: players, pathways, perspectives. Oncogene, 25(51):6680–6684, 2006.
- [39] O. Gozani, J. Patton, and R. Reed. A novel set of spliceosome-associated proteins and the essential splicing factor psf bind stably to pre-mrna prior to catalytic step ii of the splicing reaction. EMBO J, 13(14):3356–3367, 1994.
- [40] A. Grover, D. Priyandoko, R. Gao, A. Shandilya, N. Widodo, V. S. Bisaria, S. C. Kaul, R. Wadhwa, and D. Sundar. Withanone binds to mortalin and abrogates mortalin-p53 complex: computational and experimental evidence. Int J Biochem Cell Biol, 44(3):496–504, 2012.
- [41] F. Guardiola-Serrano, J. Haendeler, M. Lukosz, K. Sturm, H. Melchner, and J. Altschmied. Gene trapping identifies a putative tumor suppressor and a new inducer of cell migration. Biochem Biophys Res Commun, 376(4):748–52, 2008.
- [42] J. Haendeler, J. Hoffmann, J. F. Diehl, M. Vasa, I. Spyridopoulos, A. M. Zeiher, and S. Dimmeler. Antioxidants inhibit nuclear export of telomerase reverse transcriptase and delay replicative senescence of endothelial cells. Circ Res, 94(6):768–775, 2004.
- [43] J. Haendeler, J. Hoffmann, V. Tischler, B. C. Berk, A. M. Zeiher, and S. Dimmeler. Redox regulatory and anti-apoptotic functions of thioredoxin depend on s-nitrosylation at cysteine 69. Nat Cell Biol, 4(10):743–749, 2002.
- [44] J. Haendeler, A. Mlynek, N. Buchner, M. Lukosz, M. Graf, C. Guettler, S. Jakob, S. Farrokh, K. Kunze, C. Goy, F. Guardiola-Serrano, H. Schaal, M. Cortese-Krott, R. Deenen, K. Kohrer, C. Winkler, and J. Altschmied. Two isoforms of sister-of-mammalian grainyhead have opposing functions in endothelial cells and in vivo. Arterioscler Thromb Vasc Biol, 33(7):1639–46, 2013.
- [45] M. Hallier, A. Tavitian, and F. Moreau-Gachelin. The transcription factor spi-1/pu.1 binds rna and interferes with the rna-binding protein p54nrb. J Biol Chem, 271(19):11177–11181, 1996.
- [46] K. Haze, H. Yoshida, H. Yanagi, T. Yura, and K. Mori. Mammalian transcription factor atf6 is synthesized as a transmembrane protein and activated by proteolysis in response to endoplasmic reticulum stress. Mol Biol Cell, 10(11):3787–3799, 1999.

-
- [47] C. Hermann, A. Zeiher, and S. Dimmeler. Shear stress inhibits h₂O₂-induced apoptosis of human endothelial cells by modulation of the glutathione redox cycle and nitric oxide synthase. Arterioscler Thromb Vasc Biol, 17(12):3588–3592, 1997.
- [48] F. Heyd and K. W. Lynch. Phosphorylation-dependent regulation of psf by gsk3 controls cd45 alternative splicing. Mol Cell, 40(1):126–137, 2010.
- [49] A. G. Hinnebusch. eif3: a versatile scaffold for translation initiation complexes. Trends Biochem Sci, 31(10):553–562, 2006.
- [50] N. R. Hislop, J. Caddy, S. B. Ting, A. Auden, S. Vasudevan, S. L. King, G. J. Lindeman, J. E. Visvader, J. M. Cunningham, and S. M. Jane. Grhl3 and lmo4 play coordinate roles in epidermal migration. Dev Biol, 321(1):263–272, 2008.
- [51] J. Hoffmann, J. Haendeler, A. Aicher, L. Rössig, M. Vasa, A. Zeiher, and S. Dimmeler. Aging enhances the sensitivity of endothelial cells toward apoptotic stimuli: important role of nitric oxide. Circ Res, 89(8):709–715, 2001.
- [52] C. Horvath. Stat proteins and transcriptional responses to extracellular signals. Trends Biochem Sci, 25(10):496–502, 2000.
- [53] T. Hunter. The croonian lecture 1997. the phosphorylation of proteins on tyrosine: Its role in cell growth and disease. Philosophical Transactions: Biological Sciences, 353(1368):583–605, 1998.
- [54] S. Impey, S. R. McCorkle, H. Cha-Molstad, J. M. Dwyer, G. S. Yochum, J. M. Boss, S. McWeeney, J. J. Dunn, G. Mandel, and R. H. Goodman. Defining the creb regulon: a genome-wide analysis of transcription factor regulatory regions. Cell, 119(7):1041–1054, 2004.
- [55] K. K. Kim, Y. C. Kim, R. S. Adelstein, and S. Kawamoto. Fox-3 and psf interact to activate neural cell-specific alternative splicing. Nucleic Acids Res, 39(8):3064–3078, 2011.
- [56] M. Kim and W. McGinnis. Phosphorylation of grainy head by erk is essential for wound-dependent regeneration but not for development of an epidermal barrier. Proc Natl Acad Sci U S A, 108(2):650–5, 2011.
- [57] M. Klagsbrun and P. D’Amore. Vascular endothelial growth factor and its receptors. Cytokine Growth Factor Rev, 7(3):259–270, 1996.
- [58] P. Klint, S. Kanda, Y. Kloog, and L. Claesson-Welsh. Contribution of src and ras pathways in fgf-2 induced endothelial cell differentiation. Oncogene, 18(22):3354–3364, 1999.
- [59] G. J. Knott, C. S. Bond, and A. H. Fox. The dbhs proteins sfpq, nono and pspc1: a multipurpose molecular scaffold. Nucleic Acids Res, 44(9):3989–4004, 2016.
-

- [60] B. Kobe and A. Kajava. The leucine-rich repeat as a protein recognition motif. Curr Opin Struct Biol, 11(6):725–732, 2001.
- [61] E. I. Kudryavtseva, T. M. Sugihara, N. Wang, R. J. Lasso, J. F. Gudnason, S. M. Lipkin, and B. Andersen. Identification and characterization of grainyhead-like epithelial transactivator (get-1), a novel mammalian grainyhead-like factor. Dev Dyn, 226(4):604–617, 2003.
- [62] S. Kuwahara, A. Ikei, Y. Taguchi, Y. Tabuchi, N. Fujimoto, M. Obinata, S. Uesugi, and Y. Kurihara. Pspc1, nono, and sfpq are expressed in mouse sertoli cells and may function as coregulators of androgen receptor-mediated transcription. Biol Reprod, 75(3):352–359, 2006.
- [63] A. Lee. The glucose-regulated proteins: stress induction and clinical applications. Trends Biochem Sci, 26(8):504–510, 2001.
- [64] A. S. Lee. The er chaperone and signaling regulator grp78/bip as a monitor of endoplasmic reticulum stress. Methods, 35(4):373–381, 2005.
- [65] D. Li and J. L. Mehta. Oxidized ldl, a critical factor in atherogenesis. Cardiovasc Res, 68(3):353–354, 2005.
- [66] G. J. Liaw, K. M. Rudolph, J. D. Huang, T. Dubnicoff, A. J. Courey, and J. A. Lengyel. The torso response element binds gaga and ntf-1/elf-1, and regulates tailless by relief of repression. Genes Dev, 9(24):3163–76, 1995.
- [67] J. Y. Lu and M. B. Sewer. p54nrb/nono regulates cyclic amp-dependent glucocorticoid production by modulating phosphodiesterase mrna splicing and degradation. Mol Cell Biol, 35(7):1223–1237, 2015.
- [68] M. Lukosz, A. Mlynek, P. Czypiorski, J. Altschmied, and J. Haendeler. The transcription factor grainyhead like 3 (grhl3) affects endothelial cell apoptosis and migration in a no-dependent manner. Biochem Biophys Res Commun, 412(4):648–53, 2011.
- [69] N. Luscombe, S. Austin, H. Berman, and J. Thornton. An overview of the structures of protein-dna complexes. Genome Biol, 1(1):REVIEWS001, 2000.
- [70] Y. Maejima, S. Adachi, K. Morikawa, H. Ito, and M. Isobe. Nitric oxide inhibits myocardial apoptosis by preventing caspase-3 activity via s-nitrosylation. J Mol Cell Cardiol, 38(1):163–174, 2005.
- [71] M. Mathur, P. Tucker, and H. Samuels. Psf is a novel corepressor that mediates its effect through sin3a and the dna binding domain of nuclear hormone receptors. Mol Cell Biol, 21(7):2298–2311, 2001.
- [72] J. L. Mehta, D. Y. Li, H. J. Chen, J. Joseph, and F. Romeo. Inhibition of lox-1 by statins may relate to upregulation of enos. Biochem Biophys Res Commun, 289(4):857–861, 2001.

- [73] U. K. Misra, R. Deedwania, and S. V. Pizzo. Activation and cross-talk between akt, nf-kappab, and unfolded protein response signaling in 1-In prostate cancer cells consequent to ligation of cell surface-associated grp78. *J Biol Chem*, 281(19):13694–13707, 2006.
- [74] D. A. Mitchell, S. U. Morton, N. B. Fernhoff, and M. A. Marletta. Thioredoxin is required for s-nitrosation of procaspase-3 and the inhibition of apoptosis in jurkat cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 104(28):11609–11614, 2007.
- [75] P. Mitchell and R. Tjian. Transcriptional regulation in mammalian cells by sequence-specific dna binding proteins. *Science*, 245(4916):371–378, 1989.
- [76] D. Moras and H. Gronemeyer. The nuclear receptor ligand-binding domain: structure and function. *Curr Opin Cell Biol*, 10(3):384–391, 1998.
- [77] S. Nadanaka, T. Okada, H. Yoshida, and K. Mori. Role of disulfide bridges formed in the luminal domain of atf6 in sensing endoplasmic reticulum stress. *Mol Cell Biol*, 27(3):1027–1043, 2007.
- [78] Y. Nakashima, A. S. Plump, E. W. Raines, J. L. Breslow, and R. Ross. Apoe-deficient mice develop lesions of all phases of atherosclerosis throughout the arterial tree. *Arterioscler Thromb*, 14(1):133–140, 1994.
- [79] M. Ni, Y. Zhang, and A. S. Lee. Beyond the endoplasmic reticulum: atypical grp78 in cell viability, signalling and therapeutic targeting. *Biochem J*, 434(2):181–188, 2011.
- [80] N. Nigam, A. Grover, S. Goyal, S. P. Katiyar, P. Bhargava, P.-C. Wang, D. Sundar, S. C. Kaul, and R. Wadhwa. Targeting mortalin by embelin causes activation of tumor suppressor p53 and deactivation of metastatic signaling in human breast cancer cells. *PLoS One*, 10(9):e0138192, 2015.
- [81] A. Näär, B. Lemon, and R. Tjian. Transcriptional coactivator complexes. *Annu Rev Biochem*, 70:475–501, 2001.
- [82] N. Okazaki, R. Kikuno, R. Ohara, S. Inamoto, H. Koseki, S. Hiraoka, Y. Saga, T. Nagase, O. Ohara, and H. Koga. Prediction of the coding sequences of mouse homologues of kiaa gene: lii. the complete nucleotide sequences of 500 mouse kiaa-homologous cdnas identified by screening of terminal sequences of cdna clones randomly sampled from size-fractionated libraries. *DNA Res*, 10(4):167–180, 2003.
- [83] T. Ota, Y. Suzuki, T. Nishikawa, T. Otsuki, T. Sugiyama, R. Irie, A. Wakamatsu, K. Hayashi, H. Sato, K. Nagai, K. Kimura, H. Makita, M. Sekine, M. Obayashi, T. Nishi, T. Shibahara, T. Tanaka, S. Ishii, J.-i. Yamamoto, K. Saito, Y. Kawai, Y. Isono, Y. Nakamura, K. Nagahari, K. Murakami, T. Yasuda, T. Iwayanagi, M. Wagatsuma, A. Shiratori, H. Sudo, T. Hosoiri,

- Y. Kaku, H. Kodaira, H. Kondo, M. Sugawara, M. Takahashi, K. Kanda, T. Yokoi, T. Furuya, E. Kikkawa, Y. Omura, K. Abe, K. Kamihara, N. Katsuta, K. Sato, M. Tanikawa, M. Yamazaki, K. Ninomiya, T. Ishibashi, H. Yamashita, K. Murakawa, K. Fujimori, H. Tanai, M. Kimata, M. Watanabe, S. Hiraoka, Y. Chiba, S. Ishida, Y. Ono, S. Takiguchi, S. Watanabe, M. Yosida, T. Hotuta, J. Kusano, K. Kanehori, A. Takahashi-Fujii, H. Hara, T.-o. Tanase, Y. Nomura, S. Togiya, F. Komai, R. Hara, K. Takeuchi, M. Arita, N. Imose, K. Musashino, H. Yuuki, A. Oshima, N. Sasaki, S. Aotsuka, Y. Yoshikawa, H. Matsunawa, T. Ichihara, N. Shiohata, S. Sano, S. Moriya, H. Momiyama, N. Satoh, S. Takami, Y. Terashima, O. Suzuki, S. Nakagawa, A. Senoh, H. Mizoguchi, Y. Goto, F. Shimizu, H. Wakebe, H. Hishigaki, T. Watanabe, A. Sugiyama, M. Takemoto, B. Kawakami, M. Yamazaki, K. Watanabe, A. Kumagai, S. Itakura, Y. Fukuzumi, Y. Fujimori, M. Komiyama, H. Tashiro, A. Tanigami, T. Fujiwara, T. Ono, K. Yamada, Y. Fujii, K. Ozaki, M. Hirao, Y. Ohmori, A. Kawabata, T. Hikiji, N. Kobatake, H. Inagaki, Y. Ikema, S. Okamoto, R. Okitani, T. Kawakami, S. Noguchi, T. Itoh, K. Shigeta, T. Senba, K. Matsumura, Y. Nakajima, T. Mizuno, M. Morinaga, M. Sasaki, T. Togashi, M. Oyama, H. Hata, M. Watanabe, T. Komatsu, J. Mizushima-Sugano, T. Satoh, Y. Shirai, Y. Takahashi, K. Nakagawa, K. Okumura, T. Nagase, N. Nomura, H. Kikuchi, Y. Masuho, R. Yamashita, K. Nakai, T. Yada, Y. Nakamura, O. Ohara, T. Isogai, and S. Sugano. Complete sequencing and characterization of 21,243 full-length human cdnas. *Nat Genet*, 36(1):40–45, 2004.
- [84] A. Pandey, S. Peri, C. Thacker, C. A. Whipple, J. J. Collins, and M. Mann. Computational and experimental analysis reveals a novel src family kinase in the *c. elegans* genome. *Bioinformatics*, 19(2):169–172, 2003.
- [85] Y. Park, J.-M. Lee, M.-Y. Hwang, G.-h. Son, and D. Geum. Nono binds to the cpg island of oct4 promoter and functions as a transcriptional activator of oct4 gene expression. *Mol Cells*, 35(1):61–69, 2013.
- [86] S. J. Parsons and J. T. Parsons. Src family kinases, key regulators of signal transduction. *Oncogene*, 23(48):7906–7909, 2004.
- [87] M. Pawlak, P. Lefebvre, and B. Staels. General molecular biology and architecture of nuclear receptors. *Curr Top Med Chem*, 12(6):486–504, 2012.
- [88] R. Peng, B. T. Dye, I. Perez, D. C. Barnard, A. B. Thompson, and J. G. Patton. Psf and p54nrb bind a conserved stem in u5 snrna. *RNA*, 8(10):1334–1347, 2002.
- [89] P. V. Peplow and M. P. Chatterjee. A review of the influence of growth factors and cytokines in in vitro human keratinocyte migration. *Cytokine*, 62(1):1–21, 2013.
- [90] V. Perissi, K. Jepsen, C. K. Glass, and M. G. Rosenfeld. Deconstructing repression: evolving models of co-repressor action. *Nat Rev Genet*, 11(2):109–123, 2010.

- [91] C. Polytarchou, D. Iliopoulos, M. Hatziapostolou, F. Kottakis, I. Maroulakou, K. Struhl, and P. N. Tsiichlis. Akt2 regulates all akt isoforms and promotes resistance to hypoxia through induction of mir-21 upon oxygen deprivation. *Cancer Res*, 71(13):4720–4731, 2011.
- [92] A. Raiter, C. Weiss, Z. Bechor, I. Ben-Dor, A. Battler, B. Kaplan, and B. Hardy. Activation of grp78 on endothelial cell membranes by an adam15-derived peptide induces angiogenesis. *J Vasc Res*, 47(5):399–411, 2010.
- [93] R. V. Rao, A. Peel, A. Logvinova, G. del Rio, E. Hermel, T. Yokota, P. C. Goldsmith, L. M. Ellerby, H. M. Ellerby, and D. E. Bredesen. Coupling endoplasmic reticulum stress to the cell death program: role of the er chaperone grp78. *FEBS Lett*, 514(2-3):122–128, 2002.
- [94] R. K. Reddy, C. Mao, P. Baumeister, R. C. Austin, R. J. Kaufman, and A. S. Lee. Endoplasmic reticulum chaperone protein grp78 protects cells from apoptosis induced by topoisomerase inhibitors: role of atp binding site in suppression of caspase-7 activation. *J Biol Chem*, 278(23):20915–20924, 2003.
- [95] D. W. Reid and C. V. Nicchitta. The enduring enigma of nuclear translation. *J Cell Biol*, 197(1):7–9, 2012.
- [96] A. Remenyi, H. R. Schöler, and M. Wilmanns. Combinatorial control of gene expression. *Nat Struct Mol Biol*, 11(9):812–815, 2004.
- [97] D. Ribatti and E. Crivellato. "βsprouting angiogenesis", a reappraisal. *Dev Biol*, 372(2):157–165, 2012.
- [98] G. Robertson, M. Hirst, M. Bainbridge, M. Bilenky, Y. Zhao, T. Zeng, G. Euskirchen, B. Bernier, R. Varhol, A. Delaney, N. Thiessen, O. L. Griffith, A. He, M. Marra, M. Snyder, and S. Jones. Genome-wide profiles of stat1 dna association using chromatin immunoprecipitation and massively parallel sequencing. *Nat Methods*, 4(8):651–657, 2007.
- [99] R. Roeder. The role of general initiation factors in transcription by rna polymerase ii. *Trends Biochem Sci*, 21(9):327–335, 1996.
- [100] M. G. Rosenfeld, V. V. Lunyak, and C. K. Glass. Sensors and signals: a coactivator/corepressor/epigenetic code for integrating signal-dependent programs of transcriptional response. *Genes Dev*, 20(11):1405–1428, 2006.
- [101] R. Saiki, S. Scharf, F. Faloona, K. Mullis, G. Horn, H. Erlich, and N. Arnheim. Enzymatic amplification of beta-globin genomic sequences and restriction site analysis for diagnosis of sickle cell anemia. *Science*, 230(4732):1350–1354, 1985.
- [102] M. Sata and K. Walsh. Oxidized ldl activates fas-mediated endothelial cell apoptosis. *J Clin Invest*, 102(9):1682–1689, 1998.

- [103] S. J. Schreiner, A. P. Schiavone, and T. E. Smithgall. Activation of stat3 by the src family kinase hck requires a functional sh3 domain. J Biol Chem, 277(47):45680–45687, 2002.
- [104] E. Schulz, T. Jansen, P. Wenzel, A. Daiber, and T. Münzel. Nitric oxide, tetrahydrobiopterin, oxidative stress, and endothelial dysfunction in hypertension. Antioxid Redox Signal, 10(6):1115–1126, 2008.
- [105] B. T. Seet, I. Dikic, M.-M. Zhou, and T. Pawson. Reading protein modifications with interaction domains. Nat Rev Mol Cell Biol, 7(7):473–483, 2006.
- [106] J. Shen, X. Chen, L. Hendershot, and R. Prywes. Er stress regulation of atf6 localization by dissociation of bip/grp78 binding and unmasking of golgi localization signals. Dev Cell, 3(1):99–111, 2002.
- [107] K. Shuai and B. Liu. Regulation of jak-stat signalling in the immune system. Nat Rev Immunol, 3(11):900–911, 2003.
- [108] D. Steinberg. Low density lipoprotein oxidation and its pathobiological significance. J Biol Chem, 272(34):20963–20966, 1997.
- [109] T. S. Teng, B. Lin, E. Manser, D. C. H. Ng, and X. Cao. Stat3 promotes directional cell migration by regulating rac1 activity via its activator betapix. J Cell Sci, 122(Pt 22):4150–4159, 2009.
- [110] S. Thomas and J. Brugge. Cellular functions regulated by src family kinases. Annu Rev Cell Dev Biol, 13:513–609, 1997.
- [111] S. B. Ting, J. Caddy, N. Hislop, T. Wilanowski, A. Auden, L. L. Zhao, S. Ellis, P. Kaur, Y. Uchida, W. M. Holleran, P. M. Elias, J. M. Cunningham, and S. M. Jane. A homolog of drosophila grainy head is essential for epidermal integrity in mice. Science, 308(5720):411–413, 2005.
- [112] S. B. Ting, T. Wilanowski, A. Auden, M. Hall, A. K. Voss, T. Thomas, V. Parekh, J. M. Cunningham, and S. M. Jane. Inositol- and folate-resistant neural tube defects in mice lacking the epithelial-specific factor grhl-3. Nat Med, 9(12):1513–1519, 2003.
- [113] S. B. Ting, T. Wilanowski, L. Cerruti, L. L. Zhao, J. M. Cunningham, and S. M. Jane. The identification and characterization of human sister-of-mammalian grainyhead (som) expands the grainyhead-like family of developmental transcription factors. Biochem J, 370(Pt 3):953–962, 2003.
- [114] G. Tzivion, M. Dobson, and G. Ramakrishnan. Foxo transcription factors; regulation by akt and 14-3-3 proteins. Biochim Biophys Acta, 1813(11):1938–1945, 2011.
- [115] R. Urban, Y. Bodenburg, A. Kurosky, T. Wood, and S. Gasic. Polypyrimidine tract-binding protein-associated splicing factor is a negative regulator of transcriptional activity of the porcine p450scc insulin-like growth factor response element. Mol Endocrinol, 14(6):774–782, 2000.

- [116] C. Urbich, A. Reissner, E. Chavakis, E. Dernbach, J. Haendeler, I. Fleming, A. M. Zeiher, M. Kaszkin, and S. Dimmeler. Dephosphorylation of endothelial nitric oxide synthase contributes to the anti-angiogenic effects of endostatin. *FASEB J*, 16(7):706–708, 2002.
- [117] A. E. Uv, C. R. Thompson, and S. J. Bray. 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(6):4020–31, 1994.
- [118] J. Vieira and J. Messing. The puc plasmids, an m13mp7-derived system for insertion mutagenesis and sequencing with synthetic universal primers. *Gene*, 19(3):259–268, 1982.
- [119] R. Wadhwa, S. C. Kaul, Y. Mitsui, and Y. Sugimoto. Differential subcellular distribution of mortalin in mortal and immortal mouse and human fibroblasts. *Exp Cell Res*, 207(2):442–448, 1993.
- [120] R. Wadhwa, K. Taira, and S. C. Kaul. An hsp70 family chaperone, mortalin/mthsp70/pbp74/grp75: what, when, and where? *Cell Stress Chaperones*, 7(3):309–316, 2002.
- [121] R. Wadhwa, S. Takano, K. Kaur, C. C. Deocaris, O. M. Pereira-Smith, R. R. Reddel, and S. C. Kaul. Upregulation of mortalin/mthsp70/grp75 contributes to human carcinogenesis. *Int J Cancer*, 118(12):2973–2980, 2006.
- [122] R. Wadhwa, S. Takano, M. Robert, A. Yoshida, H. Nomura, R. R. Reddel, Y. Mitsui, and S. C. Kaul. Inactivation of tumor suppressor p53 by mot-2, a hsp70 family member. *J Biol Chem*, 273(45):29586–29591, 1998.
- [123] R. Wadhwa, T. Yaguchi, M. K. Hasan, Y. Mitsui, R. R. Reddel, and S. C. Kaul. Hsp70 family member, mot-2/mthsp70/grp75, binds to the cytoplasmic sequestration domain of the p53 protein. *Exp Cell Res*, 274(2):246–253, 2002.
- [124] S. Wang, V. Tsarouhas, N. Xylourgidis, N. Sabri, K. Tiklova, N. Nautiyal, M. Gallio, and C. Samakovlis. The tyrosine kinase stitcher activates grainy head and epidermal wound healing in drosophila. *Nat Cell Biol*, 11(7):890–5, 2009.
- [125] C.-L. Wei, Q. Wu, V. B. Vega, K. P. Chiu, P. Ng, T. Zhang, A. Shahab, H. C. Yong, Y. Fu, Z. Weng, J. Liu, X. D. Zhao, J.-L. Chew, Y. L. Lee, V. A. Kuznetsov, W.-K. Sung, L. D. Miller, B. Lim, E. T. Liu, Q. Yu, H.-H. Ng, and Y. Ruan. A global map of p53 transcription-factor binding sites in the human genome. *Cell*, 124(1):207–219, 2006.
- [126] Z. Wen, Z. Zhong, and J. Darnell, Jr. Maximal activation of transcription by stat1 and stat3 requires both tyrosine and serine phosphorylation. *Cell*, 82(2):241–250, 1995.

- [127] X. Q. Werdich and J. S. Penn. Src, fyn and yes play differential roles in vegf-mediated endothelial cell events. *Angiogenesis*, 8(4):315–326, 2005.
- [128] A. Whitmarsh and R. Davis. Regulation of transcription factor function by phosphorylation. *Cell Mol Life Sci*, 57(8-9):1172–1183, 2000.
- [129] T. Wilanowski, A. Tuckfield, L. Cerruti, S. O’Connell, R. Saint, V. Parekh, J. Tao, J. M. Cunningham, and S. M. Jane. A highly conserved novel family of mammalian developmental transcription factors related to drosophila grainyhead. *Mech Dev*, 114(1-2):37–50, 2002.
- [130] A. Williams and A. Barclay. The immunoglobulin superfamily—domains for cell surface recognition. *Annu Rev Immunol*, 6:381–405, 1988.
- [131] E. Wingender, T. Schoeps, and J. Dönitz. Tfclass: an expandable hierarchical classification of human transcription factors. *Nucleic Acids Res*, 41(Database issue):D165–D170, 2013.
- [132] E. Wingender, T. Schoeps, M. Haubrock, and J. Dönitz. Tfclass: a classification of human transcription factors and their rodent orthologs. *Nucleic Acids Res*, 43(Database issue):D97–102, 2015.
- [133] B. Wong, D. Besser, N. Kim, J. Arron, M. Vologodskaia, H. Hanafusa, and Y. Choi. Trance, a tnfr family member, activates akt/pkb through a signaling complex involving traf6 and c-src. *Mol Cell*, 4(6):1041–1049, 1999.
- [134] S. P. Yadav, H. Hao, H.-J. Yang, M.-A. I. Kautzmann, M. Brooks, J. Nellissery, B. Klocke, M. Seifert, and A. Swaroop. The transcription-splicing protein nono/p54nrb and three nono-interacting proteins bind to distal enhancer region and augment rhodopsin expression. *Hum Mol Genet*, 23(8):2132–2144, 2014.
- [135] S. Yang, E. Vickers, A. Brehm, T. Kouzarides, and A. Sharrocks. Temporal recruitment of the msin3a-histone deacetylase corepressor complex to the ets domain transcription factor elk-1. *Mol Cell Biol*, 21(8):2802–2814, 2001.
- [136] K. I. Zeller, X. Zhao, C. W. H. Lee, K. P. Chiu, F. Yao, J. T. Yustein, H. S. Ooi, Y. L. Orlov, A. Shahab, H. C. Yong, Y. Fu, Z. Weng, V. A. Kuznetsov, W.-K. Sung, Y. Ruan, C. V. Dang, and C.-L. Wei. Global mapping of c-myc binding sites and target gene networks in human b cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 103(47):17834–17839, 2006.
- [137] X. Zhou, X. Xing, S. Zhang, L. Liu, C. Wang, L. Li, Q. Ji, and H. Liu. Glucose-regulated protein 78 contributes to the proliferation and tumorigenesis of human colorectal carcinoma via akt and erk pathways. *Oncol Rep*, 2016.

II. Danksagung

An dieser Stelle würde ich mich gerne bei allen Personen bedanken, die mir während meiner Doktorarbeit unterstützend zur Seite gestanden haben.

Ein besonderer Dank geht dabei an Yogi Altschmied und Jojo Haendeler, die mir die Möglichkeit eröffnet haben an einem spannenden Forschungsprojekt mitzuarbeiten und meine Ergebnisse national und international zu präsentieren. Dabei standen sie mir immer mit Rat und Tat zur Seite.

Des Weiteren möchte ich mich bei Herrn Prof. Dr. William Martin für die Übernahme des Zweitgutachtens bedanken.

Ich bedanke mich zudem bei allen Mitgliedern des Internationalen Graduiertenkollegs IRTG1902 für die Unterstützung während der Promotion. In diesem Zusammenhang bedanke ich mich auch bei dem Leiter des Robert M. Berne Cardiovascular Research Center an der University of Virginia in Charlottesville, USA, Prof. Dr. Gary Owens, für die Möglichkeit an seinem Institut arbeiten zu können.

Der DFG danke ich für die finanzielle Förderung im Rahmen des IRTG1902 und für die Möglichkeit über einen Zeitraum von sechs Monaten Erfahrungen im Ausland machen zu dürfen.

Weiterhin bedanke ich mich bei allen aktuellen und ehemaligen Arbeitskollegen. Danke dass ihr zu einer angenehmen Arbeitsatmosphäre beigetragen und mir mit klaren Worten konstruktiv zur Seite gestanden habt. Besonders möchte ich mich hier bei Sabrina Farrokh bedanken, die mich in die Ursprünge von GRHL3 eingeführt hat. Außerdem ein dickes Dankeschön an Philipp, Anna, Nadine, Nilo, Fee, Flo und Olaf für ihre Hilfe bei der Durchführung einzelner experimenteller Arbeiten vor allem in der letzten Phase meiner Doktorarbeit. Zusätzlich bedanke ich mich bei Dr. Sabine Metzger und Nadine für ihre Hilfe bei den massenspektrometrischen Analysen.

Special thanks go to Prof. Dr. Coleen McNamara and all members of her team at the Robert M. Berne Cardiovascular Research Center at the University of Virginia, Charlottesville, USA. They integrated me as a team member and showed me new perspectives of research. Furthermore, they helped me to develop a lot of independence and self-confidence. I want to express specific gratitude to Jim Garmey, for his support in the lab as well as Aditi Upadhye, Tori Osinski and Chantel McSkimming for a fun time inside and outside of the lab.

Der wohl größte Dank gilt meinen Eltern Uschi und Frank Kohlgrüber, sowie meiner Schwester Lisa die mich bisher in allen Lebenslagen unterstützt haben und mir auch während meiner Promotion immer zur Seite standen. Dieser besondere Dank gilt auch meinem Lebensgefährten Dominik Gonnissen, sowie dessen Familie und allen sehr guten Freunden die mir oft mit gutem Rat und aufmunternden Worten weitergeholfen haben.

III. Anhang

III.1. Auflistung der in Abschnitt 3.5 identifizierten Peptide

Splicing factor, proline- and glutamine rich (SFPQ):

299-315	LFVGNLPADITEDEFKR
320-330	YGEPGEVFINK
377-390	NLSPYVSNELLEEAQFGPIER
480-493	FAQHGTFEYEYSQR

Heat shock protein family A 5(HSPA5)/glucose regulated protein 78 (GRP78):

61-74	ITPSYVAFTPEGER
82-96	NQLTSNPENTVFDVA
139-152	TFAPEEISAMVLTK
165-181	VTHAVVTVPAYFNDAQR
198-214	IINEPTAAAIAYGLDKR
474-491	DNHLLGTFDLTGIPPAPR

heat shock protein family A 9 (HSPA9)/glucose regulated protein 75 (GRP75):

86-99	TTPSVVAFTADGER
207-218	DAGQISGLNVLR
349-360	AQFEGIVTDLIR
395-405	VQQTVQDLFGR
499-513	LLGQFTLIGIPPAPR
514-535	GVPQIEVTFDIDANGIVHWSAK

Leucine-rich repeat-containing protein 47(LRRC42):

23-34	ELLLTGPGLEER
103-140	VLDLSGNALEALPPGQGLGPAEPPGLPQLQSLNLSGMR
193-205	ELSPDIAHLASLK
311-324	VLHVSENPVPLTVR

Eukaryotic translation initiation factor 3 subunit L (EIF3L):

39-53	QYEQQTYQVIPEVIK
62-70	TVSDLIDQK
109-133	NTPWPEAEAIAPQVGNDVFLILYK
382-391	IDESIHLQLR
446-461	VFSDEVQQQAQLSTIR
475-487	LAGFLDLTEQEFR

Non-POU domain-containing octamer-binding protein (NONO)

76-91	LFVGNLPPDITEEEMR
127-135	VELDNMPLR
177-184	AVVIVDDR
221-239	PVTVEPMDQLDDEEGLPEK
399-434	GAMPPAPVPAGTPAPPGPATMMPDGTGLTPPTTER
435-456	FGQAATMEGIGAIGGTPPAFNR