

**Charakterisierung des
(Pro-)Reninrezeptorsignalweges hinsichtlich
Transkriptom und genomweiten
Protein-DNA-Interaktionen**

Dissertation

zur Erlangung des akademischen Grades des
Doktors der Naturwissenschaften (Dr. rer. nat.)

eingereicht im Fachbereich Biologie, Chemie, Pharmazie
der Freien Universität Berlin

vorgelegt von

Daniela Zaade

aus Celle

Berlin, 2013

Die Untersuchungen zur vorliegenden Arbeit wurden von Oktober 2008 bis Juni 2012 am Institut für Pharmakologie der Charité – Universitätsmedizin Berlin in der Arbeitsgruppe von Herrn Prof. Dr. Thomas Unger unter der Leitung von PD Dr. Heiko Funke-Kaiser angefertigt.

1. Gutachter: PD Dr. Heiko Funke-Kaiser
2. Gutachter: Prof. Dr. Thomas Schmülling

Tag der Disputation: 23.05.2013

Inhaltsverzeichnis

Danksagung	VII
Abkürzungsverzeichnis	VIII
1. Einleitung	1
1.1. Der (Pro-)Reninrezeptor	1
1.1.1. Renin und Prorenin und die Bedeutung des Renin-Angiotensin- Systems	2
1.1.2. Liganden-vermittelte Effekte des (P)RR	4
1.1.3. (P)RR im Zusammenhang mit V-ATPasen	6
1.1.4. Pathophysiologische Funktion des (P)RR	8
1.1.5. (P)RR-Inhibition	10
1.2. Das <i>promyelocytic leukemia zinc finger</i> -Protein (PLZF)	11
1.2.1. Expression und Funktion von PLZF	12
1.2.2. Posttranslationale Modifikationen von PLZF	13
1.2.3. PLZF im onkologischen Kontext	14
1.2.4. PLZF und der Angiotensin-AT2-Rezeptor	15
1.3. Genomweite Analysen des Transkriptoms	15
1.4. Ziel und Hintergrund der Arbeit	18
2. Material und Methoden	20
2.1. Material	20
2.1.1. Chemikalien	20
2.1.2. Puffer, Medien, Lösungen	20
2.1.2.1. Verwendete Antikörper	23
2.1.3. Zelllinien und Zellkulturmedien	24
2.1.4. Vektoren	24

2.1.5. Enzyme und Größenstandards	25
2.1.6. <i>Kits</i>	25
2.1.7. Oligonukleotide	26
2.2. Methoden	28
2.2.1. Arbeiten mit Bakterien	28
2.2.1.1. Herstellung chemisch-kompetenter Bakterienzellen . . .	28
2.2.1.2. Klonierungen	28
2.2.2. Zellbiologische Methoden	31
2.2.2.1. Subkultivierung und Zellernte	31
2.2.2.2. Statistische Auswertung	32
2.2.3. Molekularbiologische Methoden	32
2.2.3.1. RNA-Isolierung	32
2.2.3.2. Reverse Transkription der RNA	33
2.2.3.3. Polymerasekettenreaktion	33
2.2.3.4. Elektrophoretische Auftrennung von DNA-Fragmenten	35
2.2.3.5. Mikroarray-Experimente	35
2.2.3.6. Netzwerkanalysen der durchgeführten Mikroarrays . .	38
2.2.3.7. Chromatin-Immunopräzipitation	39
2.2.3.8. ChIP- <i>chip</i> -Experimente und Analyse	42
2.2.4. Proteinbiochemische Methoden	43
2.2.4.1. Gesamtproteinisolierung aus humanen Zelllinien	43
2.2.4.2. Fraktionierte Proteinisolierung aus humanen Zelllinien	43
2.2.4.3. <i>Tandem affinity purification</i> (TAP)	44
2.2.4.4. Proteinkonzentrationsbestimmung	46
2.2.4.5. SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE) . .	47
2.2.4.6. Western Blotting	49
3. Ergebnisse	51
3.1. Genomweite Transkriptomanalysen zur Charakterisierung des (Pro-)Renin- rezeptors	51

3.1.1.	Transkriptomanalyse von KELLY-Zellen nach Suppression des (P)RR mittels siRNA	51
3.1.2.	Transkriptomanalyse von KELLY-Zellen unter Bafilomycinbehandlung	55
3.1.3.	Transkriptomvergleich von KELLY-Zellen nach Suppression des (P)RR und bafilomycinbehandelten KELLY-Zellen	58
3.2.	Genomweite Transkriptomanalyse zur Charakterisierung von PLZF . .	61
3.2.1.	Transkriptomanalyse von PLZF-überexprimierenden HEK293T-Zellen	61
3.2.2.	Transkriptomanalyse von PLZF-HA-exprimierenden KELLY-Zellen	65
3.2.3.	Vergleich der Transkriptome von PLZF-überexprimierenden KELLY- und HEK293T-Zellen	68
3.2.4.	Transkriptionsprofil von KELLY-Zellen unter Genisteinbehandlung	70
3.2.5.	Vergleich der Transkriptionsprofile von PLZF-überexprimierenden Zelllinien und genisteinbehandelten KELLY-Zellen	72
3.2.6.	Genomweiter Transkriptomvergleich aller durchgeführten Mikroarrays	74
3.3.	Untersuchung von PLZF- und Polymerase II-vermittelter Regulation der Genexpression mittels ChIP- <i>chip</i>	76
3.3.1.	Etablierung der Chromatin-Immunopräzipitation (ChIP)	76
3.3.2.	Rekrutierung der RNA-Polymerase II in PLZF-überexprimierenden KELLY-Zellen	79
3.3.3.	Rekrutierung von PLZF in PLZF-überexprimierenden KELLY-Zellen	80
3.3.4.	Validierung der Mikroarray- und ChIP- <i>chip</i> -Ergebnisse mittels <i>real time</i> -PCR	83
3.3.5.	Validierung der ChIP- <i>chip</i> -Ergebnisse mittels konventioneller ChIP	85
3.4.	Identifizierung von Protein-Interaktionspartnern von PLZF	86

4. Diskussion	89
4.1. Transkriptionelle Effekte des <i>full length</i> (P)RR	89
4.1.1. Transkriptionelle Effekte der V-ATPase-assoziierten Isoform des (P)RR	91
4.2. PLZF und sein Einfluss auf das Transkriptionsprofil in neuronalen und epithelialen Zellen	94
4.3. Einflüsse auf entwicklungsbiologische Prozesse	98
4.4. Effekte von Genistein	98
4.5. Zielgene von PLZF	100
4.6. Limitationen der Genexpressionsanalysen	100
4.7. Protein-Interaktionspartner von PLZF	101
4.8. Zellspezifische Genregulationsmechanismen	103
4.9. Direkte versus indirekte Rekrutierung von PLZF	103
4.10. Bedeutung der Mikroarrays in Bezug auf die Entwicklung von (P)RR- Antagonisten	104
Zusammenfassung	107
Summary	108
Literaturverzeichnis	127
A. Anhang	128
A.1. Chemikalienliste	128
Publikation	131

Danksagung

PD Dr. Heiko Funke-Kaiser danke ich sehr für die Überlassung des interessanten Themas dieser Doktorarbeit, die wissenschaftliche Betreuung, die informativen und fachlichen Diskussionen und die produktive wissenschaftliche Zusammenarbeit.

Prof. Dr. Thomas Schmülling und Prof. Dr. Wolfgang Schuster danke ich sehr für die Betreuung dieser Arbeit seitens des Biologischen Fachbereichs der Freien Universität Berlin.

Prof. Dr. Thomas Unger danke ich für die Bereitstellung der Infrastruktur am Institut für Pharmakologie.

Dr. Jennifer Schmitz danke ich herzlich für die wertvollen methodischen Anregungen und die motivierenden Ratschläge.

Der gesamten Arbeitsgruppe danke ich für die Unterstützung und Hilfsbereitschaft im Labor, allen voran Sabrina Klare, Eileen Benke, Dr. Petra Goldin-Lang, Eva Schrezenmeyer, Sebastian Kirsch, Sarah Bernhard, Dr. Kerstin Seidel, Yaosi Li sowie Janine Krüger, Daniel Hackbusch, Manuela Trappiel, Dr. Lena Herbst und Maibritt Mardahl.

Dr. Nancy Brettschneider danke ich für die Einführung in die Genomatix-Software und die Unterstützung bei der Datenanalyse.

Dr. Ute Ungethüm und Dr. Ralf Kuban danke ich für die Mikroarray-Hybridisierungen und -Analyse und Oliver Klein für die kompetente Durchführung der massenspektrometrischen Messungen.

Weiterhin gilt mein herzlicher Dank Christina Zaade und Tobias Zaade sowie Marion Hekmann für die kritische und konstruktive Durchsicht dieses Manuskripts.

Abkürzungsverzeichnis

A	Ampère
as	Aminosäure(n)
AT1R	Angiotensin-AT1-Rezeptor
AT2R	Angiotensin-AT2-Rezeptor
ATP	Adenosintriphosphat
AmpR	Ampicillinresistenz
bp	Basenpaar(e)
BSA	Rinderserumalbumin
CDS	<i>coding sequence</i>
ChIP	Chromatin-Immunopräzipitation
CMV	cytomegalovirus
ddH ₂ O	bidestilliertes Wasser
DNase	Desoxyribonuklease
dNTP	Desoxynucleosidtriphosphat
DTT	Dithiothreitol
EBNA-1	Epstein-Barr Virus nukleäres Antigen 1
EBV	Epstein-Barr-Virus
FPR	Falsch-Positiv-Rate
<i>g</i>	-fache Erdbeschleunigung (9,81 m/s ²)
IPTG	Isopropyl-thio- β -D-galactopyranosid
kb	Kilobasenpaar(e)
kDa	Kilodalton
LB	Luria Bertani
Lsg.	Lösung
orf	<i>open reading frame</i>
PAGE	polyacrylamidgelelektrophorese
PCR	<i>Polymerase chain reaction</i> (Polymerasekettenreaktion)

(P)RR	(Pro-)Reninrezeptor
pH	negativer dekadischer Logarithmus der Protonenaktivität
PLZF	<i>promyelocytic leukemia zinc finger</i> Protein
RAS	Renin-Angiotensin-System
RBS	Ribosomenbindungsstelle
RIPA	<i>radio immuno precipitation assay</i>
RNase	Ribonuklease
RT	Raumtemperatur
SDS	Sodiumdodecylsulfat
siRNA	<i>small interfering RNA</i>
TAE	Tris base - Essigsäure - EDTA
TAP	<i>tandem affinity purification</i>
TBE	Tris base - Borsäure - EDTA
TBS	Tris-gepufferte Saline
TF	Transkriptionsfaktor
TSS	Transkriptionsstartpunkt
U	Unit (1 Unit = 1 μ mol/min)
ü. N.	über Nacht
v/v	Volumen pro Volumen
Wt	Wildtyp
w/v	Gewicht pro Volumen

1. Einleitung

1.1. Der (Pro-)Reninrezeptor

Während der Untersuchung von Protonen-transportierenden ATPasen des Typs V in bovinen chromaffinen Granula-Membranen der Nebenniere, identifizierten Ludwig *et al.* ein acht bis neun kDa großes, bis dahin unbekanntes Protein (M8-9), welches mit der integralen Domäne (V0) der V-ATPase assoziiert ist [1]. Im Jahr 2002 wurden von Nguyen *et al.* in humanen mesangialen Zellen ein neuartiger Rezeptor identifiziert, welcher aufgrund seiner spezifischen Bindung zu Prorenin und Renin (Pro-)Reninrezeptor ((P)RR) genannt wurde [2]. Es stellte sich heraus, dass das Gen ATP6AP2 (*vacuolar ATP synthase membrane sector-associated protein*) des zuvor von Ludwig *et al.* identifizierten Proteins M8-9 identisch mit einem Teil des (P)RR ist [2, 3] (siehe Abbildung 1.1). Das Gen des (P)RR befindet sich auf Chromosom X und kodiert für ein 350 as langes Protein, welches ein N-terminales Signalpeptid, eine 28 kDa große extrazelluläre Domäne, einen transmembranären Teil und eine kurze C-terminale cytoplasmatische Domäne ohne intrinsische Kinaseaktivität aufweist [4] (siehe Abbildung 1.1).

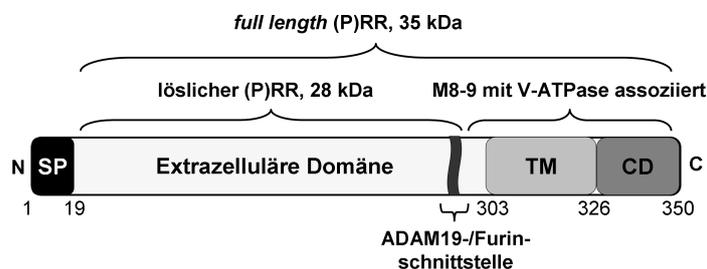


Abb. 1.1.: Grafische Darstellung des (Pro-)Reninrezeptors mit seinen funktionellen Domänen und seinen proteolytischen Fragmenten. Die N-terminale, extrazelluläre Domäne bindet Renin und/oder Prorenin, während der transmembranäre (TM) und cytoplasmatische Teil (CD) mit der V-ATPase assoziiert ist und durch Furin bzw. ADAM19 proteolytisch generiert werden kann. Zusätzlich besitzt der Rezeptor ein Signalpeptid (SP) am N-Terminus.

Der (P)RR selbst weist keine Ähnlichkeit zu anderen bekannten Rezeptoren auf, die Gensequenz jedoch stimmt in Mensch, Ratte und Maus zu 95% überein und die Identität der jeweiligen Proteine beträgt 80% [4]. Konsistent mit den *housekeeping*-Charakteristika seines Promotors, weist der (P)RR ein ubiquitäres Expressionsmuster auf [3]. Vor allem aber wird der (P)RR im Gehirn, im Herzen und in der Plazenta exprimiert und weniger stark in der Niere, der Leber und im Pankreas [2].

1.1.1. Renin und Prorenin und die Bedeutung des Renin-Angiotensin-Systems

Renin ist eine Endopeptidase und spielt im klassischen Renin-Angiotensin-System (RAS) eine entscheidende Rolle (siehe Abbildung 1.2). Die Synthese als Prorenin, die proteolytische Aktivierung und die Speicherung erfolgt in den juxtaglomerulären Zellen der Niere. Durch Exozytose wird Renin bei niedrigem Blutdruck oder niedrigem Natriumgehalt in den Blutkreislauf sekretiert [5]. Dort wandelt es Angiotensinogen (AOG), als das einzige bekannte Substrat des Renins, in das Decapeptid Angiotensin I (Ang I) um [6]. Das in Gefäßendothelzellen membrangebundene Angiotensin-Konversionsenzym (ACE) setzt Ang I in das Oktapeptid Angiotensin II (Ang II) um. Ang II wiederum ist der Ligand des Angiotensin-AT1-Rezeptors (AT1R) und des Angiotensin-AT2-Rezeptors (AT2R). Darüber hinaus gibt es noch weitere Rezeptoren des RAS, wie den Mas-Rezeptor und den AT4R, die mit anderen proteolytischen Produkten von Ang I oder Ang II interagieren (siehe Abbildung 1.2). Die Bindung von Ang II an den AT1R löst Signaltransduktionskaskaden aus, die u. a. Vasokonstriktion, Blutdruckerhöhung und Natrium- und Wasserretention vermitteln [7], während die Aktivierung des AT2R antagonistische Wirkung zeigt, die sich in vasodilatativen, anti-proliferativen und proapoptischen Effekten äußert [7, 8, 9]. Erhöhte Angiotensin II-Konzentrationen über einen längeren Zeitraum führen zu fibrotischen und inflammatorischen Effekten [10, 8] und spielen somit eine wichtige Rolle bei kardiovaskulären Erkrankungen wie z. B. der Atherosklerose [11], dem Schlaganfall [12], der kardialen Hypertrophie und renalen Endorganschäden [13].

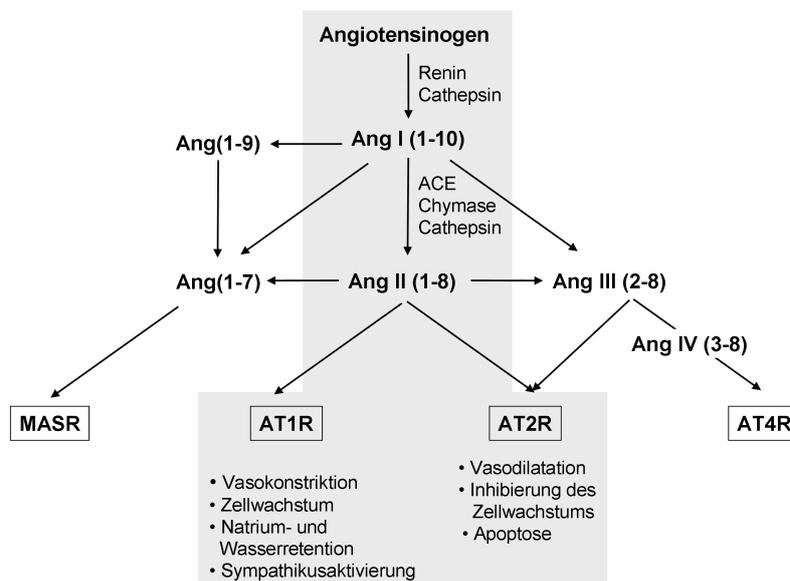


Abb. 1.2.: Schematische Darstellung des klassischen Renin-Angiotensin-Systems (RAS). Angiotensinogen wird u. a. durch Renin ins Dekapeptid Angiotensin I (Ang I (1-10)) umgewandelt, welches wiederum zu Angiotensin II (Ang II(1-8)) konvertiert wird. Letzteres interagiert mit den beiden Rezeptoren Angiotensin-AT1-Rezeptor (AT1R) und Angiotensin-AT2-Rezeptor (AT2R). Zusätzlich werden noch weitere Rezeptoren aktiviert. Nähere Erläuterungen dazu siehe Text (Abbildung modifiziert nach Zhu und Liao, 2012 [14]).

Neben Renin bindet der (P)RR auch das inaktive Proenzym des Renins, das sogenannte Prorenin. Prorenin besitzt zusätzlich ein N-terminales, 43 as großes Prosegment, welches den Zugang zur Substratbindungsstelle verdeckt (siehe Abbildung 1.3). Die proteolytische Aktivierung von Prorenin erfolgt in sekretorischen Granula der juxtaglomerulären Zellen in der Niere durch Abspaltung des Prosegments. Die Sekretion in den Blutkreislauf erfolgt im Gegensatz zum Renin konstitutiv [5]. Die Interaktion von (P)RR und Renin bzw. Prorenin wurde durch verschiedene Studien nachgewiesen [2, 15, 16], u. a. mit *in vitro* translatierten Proteinen oder in HMC-Zellen mit stabil transfiziertem (P)RR. Die kalkulierten Dissoziationskonstanten liegen im nanomolaren Bereich (5 - 20 nM), wobei höhere Werte für die Bindung von (P)RR mit Renin im Vergleich zu Prorenin ermittelt werden konnten [16, 2, 15]. Weiterhin wurde beobachtet, dass die Interaktion von Renin und dem (P)RR zu einem Anstieg seiner katalytischen Effizienz um das vier- bis fünffache führt [2]. Prorenin zeigt außerdem durch die Bindung an den (P)RR auch ohne die Abspaltung des Prosegments eine enzymatische

Aktivität [2] (siehe Abbildung 1.3). Somit könnte der (P)RR eine neue bedeutende Komponente im Renin-Angiotensin-System (RAS) darstellen [2], da es sich bei dem RAS nicht nur um ein endokrines System handelt, sondern auch um ein physiologisch aktives parakrines System, wobei die Schlüsselkomponenten auch lokal in u. a. Niere, Nebenniere, Herz und Gehirn detektiert werden können [17].

Die physiologische Rolle von Prorenin ist noch nicht vollständig geklärt. Die Konzentration von Prorenin im Blut ist bis zu 100 mal höher als diejenige des Renins und stark erhöhte Proreninkonzentrationen konnten u. a. im Blut von Schwangeren und von Patienten mit Diabetes mellitus nachgewiesen werden [18, 19].

Neben dem (P)RR wurden noch weitere (pro-)reninbindende Proteine identifiziert, wie das intrazelluläre renin-bindende Protein RnBP [20] und der Mannose-6-Phosphat/*insulin-like growth factor II* Rezeptor (M6P/IGF2R) [21, 22, 23]. RnBP inhibiert wahrscheinlich Renin ohne Einfluss auf den Blutdruck oder die Plasmareninaktivität zu vermitteln [24]. Bezüglich des M6P/IGF2R erfolgt nach Bindung eine Internalisierung von (Pro-)Renin, jedoch konnten keine Auswirkungen auf die Katalyse von Angiotensin festgestellt werden. Somit wird angenommen, dass es sich bei dem M6P/IGF2R um einen *clearance*-Rezeptor für (Pro-)Renin handelt [25].

1.1.2. Liganden-vermittelte Effekte des (P)RR

Die Bindung von Renin oder Prorenin an den (Pro-)Reninrezeptor induziert Signaltransduktionskaskaden auch unabhängig von der Bildung von Angiotensin II [2] (siehe Abbildung 1.4). Die Interaktion der Liganden führt zunächst zu einer Phosphorylierung der Serin- und Tyrosin-Reste des Rezeptors [2], gefolgt von einer Aktivierung der MAP (*mitogen-activated protein*) Kinasen ERK1 und 2 (*extracellular signal-regulated kinase 1* und 2). Daraus resultierten u. a. erhöhte Expressionen von profibrotischen Genen wie Kollagen, Fibronectin, *transforming growth factor β 1* (TGF β 1) und *plasminogen activator inhibitor-1* (PAI1) sowie eine verstärkte Expression von Cyclooxygenase-2 (Cox2) [2, 26, 27]. Darüber hinaus konnte die Aktivierung des MAP-Kinase p38-Signalweges

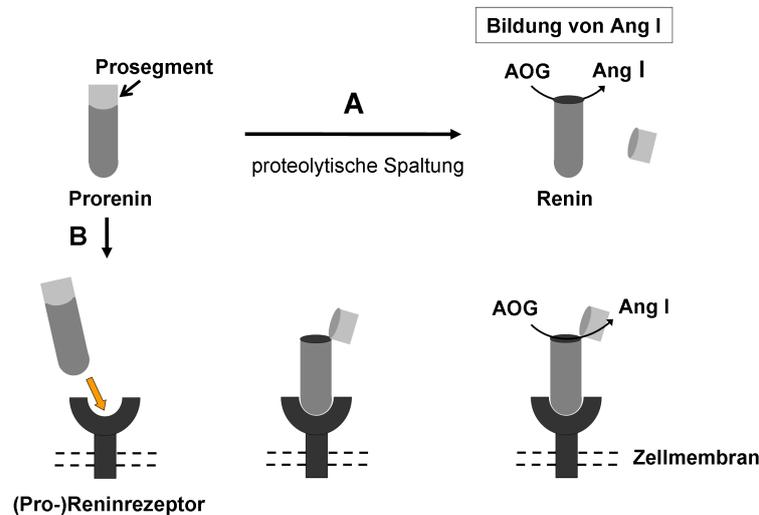


Abb. 1.3.: Die Aktivierung von Prorenin. Prorenin wird proteolytisch zum enzymatisch aktiven Renin umgewandelt (A) oder durch Interaktion mit dem (Pro-)Reninrezeptor ohne proteolytische Abspaltung des Prosegments (B). Beides führt zu einer Umwandlung von Angiotensinogen (AOG) zu Angiotensin I (ANG I). Abbildung modifiziert nach Danser, 2009 [10].

und die Phosphorylierung des Hitzeschockproteins 27 (HSP27) nachgewiesen werden, welche u. a. in die Aktinfilamentdynamik, die Erhaltung der Zellstruktur und das Zellwachstum involviert sind [28], (siehe Abbildung 1.4).

Scheffé *et al.* konnten zeigen, dass der Transkriptionsfaktor *promyelocytic leukemia zinc finger* (PLZF) ein Adapterprotein des (P)RR ist [3, 29]. Die Aktivierung des Rezeptors führt zu einer Translokation von PLZF in den Zellkern, wobei dieser Transkriptionsfaktor die Expression des (P)RR reprimiert und die der $p85\alpha$ -Untereinheit der Phosphatidylinositol-3-Kinase (PI3K- $p85\alpha$) stimuliert. Weiterhin konnten zelluläre Effekte wie Anstieg der Proliferation bzw. Zellzahl beobachtet werden sowie eine Abnahme der Apoptose in Kardiomyoblasten (H9c2) und HEK293-Zellen [3, 30]. Moilanen *et al.* zeigten, dass die spezifische adenovirale Überexpression von (P)RR im linken Ventrikel adulter Rattenherzen zu einer vermehrten Expression von PLZF und zu einer verstärkten Interaktion von PLZF mit (P)RR führte [29]. Thomas *et al.* konnten in isolierten Kardiomyocyten aus hyperglykämischen Mäusen neben erhöhten Expressionen des (P)RR und von PLZF, eine verstärkte Translokation von PLZF in den Zellkern zeigen [31].

Zusätzlich konnte mittels *yeast two-hybrid screening* und Koimmunopräzipitation (CoIP) eine Protein-Protein-Interaktion von (P)RR mit PRL-1 (*phosphatase of regeneration liver-1*) detektiert werden [32]. PRL-1 ist u. a. involviert in die Regulation der zellulären Proliferation und Transformation [33] und spielt eine Rolle in Tumorgenese und Metastasierung [34].

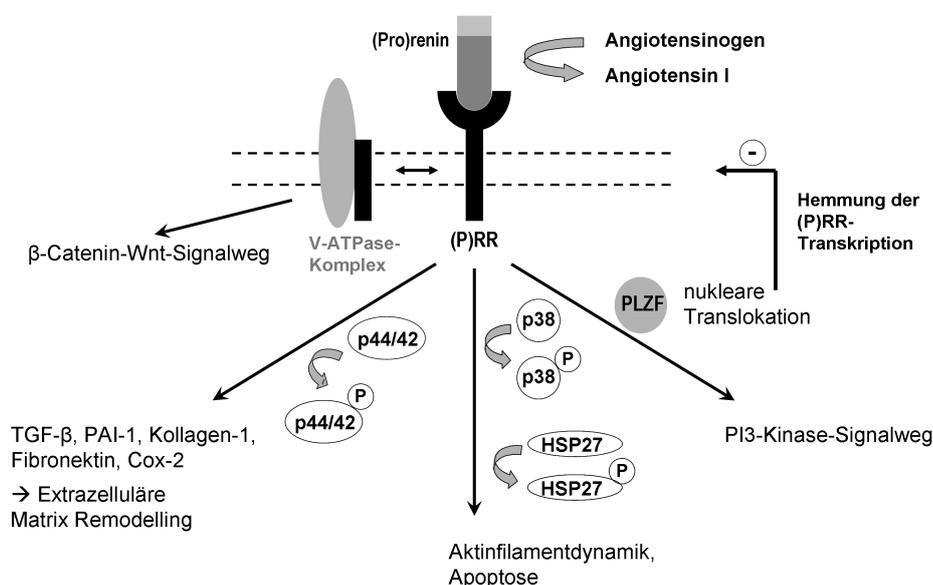


Abb. 1.4.: Grafische Darstellung von bekannten Interaktionspartnern bzw. Signaltransduktionswegen des (Pro-)Reninrezeptors. Weitere Details sind im Text beschrieben.

1.1.3. (P)RR im Zusammenhang mit V-ATPasen

Cousin *et al.* beschrieben eine lösliche Isoform des (P)RR, welche dem extrazellulären bzw. intravesikulären Teil des Rezeptors entspricht und durch Abspaltung mittels Furin- und/oder ADAM19-Protease-Aktivität gebildet wird [35, 36], (siehe Abbildung 1). Diese lösliche Form konnte im Plasma und im Urin nachgewiesen werden [35, 37] sowie verstärkt in Zellen der renalen Medulla und im Urin von hypertensiven Ratten [38]. Das verbleibende Fragment (M8-9), also der transmembranäre und cytoplasmatische Teil des Rezeptors, entspricht einer bereits oben erwähnten akzessorischen Untereinheit

der vakuolären Protonen transportierenden ATPase vom V-Typ (V-ATPase) (vergleiche Abbildung 1.1). Diese Domänen sind sowohl in Vertebraten als auch Invertebraten hoch konserviert, während der (pro-)reninbindende extrazelluläre Part lediglich innerhalb der Vertebraten konserviert ist, weshalb angenommen wird, dass ATP6AP2 im Laufe der Evolution durch Genfusion entstanden ist [39, 40]. V-ATPasen spielen u. a. eine wichtige Rolle bei der pH-Regulation und der Ansäuerung intrazellulärer Kompartimente wie Endosomen, Lysosomen und sekretorischer Vesikel sowie bei der Aufnahme und Speicherung von Neurotransmittern, der Endozytose und beim Recycling von Rezeptoren [41, 42, 43, 44]. Es gibt verschiedene Möglichkeiten bezüglich des Aufbaus des V-ATPase-Komplexes im Zusammenhang mit dem (P)RR: entweder nicht in Assoziation mit dem (P)RR, in Assoziation mit dem *full length* (P)RR, der M8-9-Domäne oder beides [45]. In den letzten Jahren konnten verschiedenste Funktionen der M8-9-Domäne des (P)RR zugeordnet werden. Zum Beispiel spielt der *full-length*-Rezeptor unabhängig von Renin eine entscheidende Rolle im Hinblick auf den Wnt-Signalweg, indem er als Adaptorprotein zwischen Wnt-Rezeptor-Komplex und der V-ATPase fungiert [46]. Auf der Suche nach Proteinen, die essenziell bei der Regulation des kanonischen Wnt/ β -Catenin-Signalweges involviert sind, konnten Cruciat *et al.* die Interaktion von (P)RR mit LRP6 und dem 7-Transmembranrezeptor Frizzled 8 aufdecken. Eine Hemmung der V-ATPase durch den Einsatz von pharmakologischen V-ATPase Inhibitoren, wie Bafilomycin A1 oder Apicularen A, verhinderte die Wnt-Signaltransduktion [46].

Der Wnt-Signalweg ist in viele Aspekte der Embryonalentwicklung involviert und spielt u. a. in der Tumorgenese eine Rolle [47]. Ausgehend von der Wnt-Rezeptor-Aktivierung in Abhängigkeit der Liganden und Rezeptorsubtypen erfolgt die kanonische Wnt/ β -Catenin Signalkaskade, der nicht-kanonische *planar cell polarity* (PCP)-Signalweg oder der Wnt/ Ca^{2+} -Signalweg. Eine Aktivierung bzw. Dysregulation des Wnt-Signaltransduktionsweges wurde in diversen Karzinomen wie beispielsweise Mammakarzinomen [48], Magenkarzinomen [49] und Kolonkarzinomen [50] beobachtet. Neben seiner Bedeutung in der Onkologie spielt der Wnt/ β -Catenin-Signalweg eine Rolle bei kardiovaskulären Erkrankungen, z. B. zeigten Dvl- und β -Catenin-*knockout*-Modelle eine re-

duzierte kardiale Hypertrophie und eine bessere ventrikuläre Funktion post Infarkt [51]. Podozyten-spezifische β -Catenin-*knockouts* zeigten protektive Effekte bezüglich der Entwicklung einer Albuminurie [52]. Da die Wnt-Signalweitergabe durch (P)RR Supprimierung oder *knockdown* von Untereinheiten der V-ATPase (ATP6V1C2 und ATP6V0C) oder pharmakologischen Inhibitoren der V-ATPase gestört werden kann, ist davon auszugehen, dass der (P)RR direkt in dieses System involviert ist [46].

1.1.4. Pathophysiologische Funktion des (P)RR

Der (P)RR übernimmt entscheidende Funktionen in der kardioresalen Pathophysiologie [32]. Eine erhöhte Expression des Rezeptors im Herzen konnte unter pathophysiologischen Bedingungen wie der Kardiomyopathie, post Myokardinfarkt in Mäusen [53], in diabetischen Ratten [54] und in *stroke-prone spontaneously hypertensive rats* (spSHR) [55] nachgewiesen werden. Bei der diabetischen Nephropathie, in 5/6 nephrektomierten Ratten [56] und in Streptozotozin-induzierten diabetischen Ratten [57, 58] wurden in Nierenzellen eine verstärkte (P)RR-Expression festgestellt.

Monogene Gendefekte im humanen (P)RR führen zu einer *X-linked mental retardation* (XLMR) verbunden mit Epilepsie (XMRE) [59]. Ferner wurden SNPs (*single nucleotide polymorphisms*) im Gen des (P)RRs identifiziert, welche mit arterieller Hypertonie assoziiert sind [56]. Um die pathophysiologische Rolle des (P)RRs näher zu untersuchen, wurden verschiedene Experimente mit transgenen Tiermodellen durchgeführt. Die ubiquitäre Überexpression von (P)RR in Ratten führte zu einer Glomerulosklerose und einer Proteinurie verbunden mit einer verstärkten ERK1/2 Phosphorylierung [60] und einer erhöhten Expression von Cyclooxygenase-2 und TGF β 1 (*transforming growth factor- β 1*). Die auf vaskuläre glatte Muskelzellen beschränkte Überexpression des Rezeptors führte zu einem erhöhten Blutdruck und einem erhöhten Plasma-Aldosteron-Spiegel mit normaler Nierenfunktion und Plasma-Renin-Spiegel [39].

Eine Generierung von (P)RR-*knockout*-Mäusen oder Mäusen mit Mutationen im (P)RR-Gen waren nicht möglich. Nach Injektion der embryonalen Stammzellen in Blastozy-

ten wurden keine Chimäre gebildet, was auf die essenzielle Bedeutung des Rezeptors bei der frühen Embryonalentwicklung hindeutet [61]. Auch Mausmodelle mit gewebe-spezifischen (P)RR-*knockout* in Kardiomyozyten oder Podozyten hatten eine Lebens-erwartung von lediglich drei bzw. zwei bis vier Wochen [62, 63]. Beide wiesen eine Akkumulation von Vakuolen in den entsprechenden Zellen auf und zeigten eine Beein-trächtigung der Autophagozytose. Dieser Defekt ist zurückzuführen auf die mangelnde Ansäuerung der intrazellulären Vesikel aufgrund der verminderten Expression von V0-Untereinheiten [63], was wiederum auf die Bedeutung der Funktion als akzessorische Untereinheit des (P)RR hindeutet. Weiterhin konnte gezeigt werden, dass renale Wild-typpodocyten, welche mit dem spezifischen V-ATPase-Inhibitor Bafilomycin A1 behan-delt wurden, sowohl ähnliche morphologische Veränderungen als auch pH-Änderungen wie Podocyten mit (P)RR-*knockout* aufwiesen [62]. Darüber hinaus zeigten *zebrafish*-Modelle mit Mutationen in Genen, die für die V-ATPase Untereinheit kodieren, einen ähnlichen Phänotyp wie Mutationen im (P)RR-Gen [64]. (Pro-)Renin-unabhängige, al-so konstitutive Effekte des (P)RR bezüglich zellulärem Überleben und Proliferation, konnten ebenfalls gezeigt werden [46, 65, 64].

1.1.5. (P)RR-Inhibition

Aufgrund von Untersuchungen zur nicht-proteolytischen Aktivierung des Prorenins wurde ein *decoy*-Peptid, auch als *handle region peptide* (HRP) bezeichnet, entwickelt, welches sich vom Prosegment des Prorenins ableitet und die Interaktion mit dem (P)RR kompetitiv inhibiert [66, 67]. Die parenterale Applikation des HRPs verhindert die Entwicklung einer diabetischen Nephropathie und kann eine kardiale Fibrose reduzieren [67, 55, 60]. Diese Inhibierung ist auch in *AT1R-knockout*-Mäusen wirksam [55] und kann durch Diabetes verursachte Nierenschäden verhindern oder revertieren [68]. Darüber hinaus zeigten Ichihara *et al.*, dass die Entwicklung einer diabetischen Nephropathie auch über einen (P)RR-vermittelten angiotensin-unabhängigen Mechanismus erfolgt [55].

Jedoch konnten einige Arbeitsgruppen diese Effekte nicht beobachten [69, 70]. Ein Grund für diese widersprüchlichen Ergebnisse könnten das Prorenin-Renin-Verhältnis sein [4, 32] oder die Länge der Behandlungszeit [71, 72]. Auch gibt es keine Nachweise bezüglich Bioverfügbarkeit und Degradation des *decoy*-Peptides [32].

1.2. Das *promyelocytic leukemia zinc finger*-Protein (PLZF)

1993 wurde in Patienten, die an einer seltenen Form der akuten promyelozytischen Leukämie (APL) leiden, eine Fusion des Zinkfingerproteins ZBTB16 mit dem Retinsäure-Rezeptor α (RAR α) durch reziproke chromosomale Translokation entdeckt. Aufgrund seiner pathologischen Effekte bei dieser Promyelozytenleukämie wurde das Protein ZBTB16 *promyelocytic leukemia zinc finger* Protein (PLZF) benannt [73].

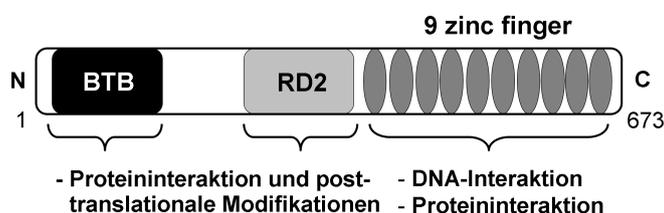


Abb. 1.5.: Aufbau und Struktur des Transkriptionsfaktors PLZF. PLZF besitzt N-terminal zwei Proteininteraktionsdomänen (BTB und RD2, nähere Erläuterungen siehe Text) und C-terminal neun Zinkfinger motive, welche hauptsächlich zur Interaktion mit der DNA dienen.

PLZF ist ein Transkriptionsfaktor, der im C-terminalen Bereich neun Zinkfinger des C2H2-Typs aus der *Krüppel-like*-Familie aufweist, welche die sequenzspezifische DNA-Bindung zu den Zielgenen erlaubt. Der N-Terminus des Proteins PLZF besteht aus einer *bric à brac*, *tramtrack*, und *broad-complex domain* kurz BTB-Domäne [74] (siehe Abbildung 1.5). Diese Domäne ist auch bekannt als die Poxvirus- und Zinkfinger (POZ-Domäne) und ist stark konserviert in Säugetieren. Sie spielt eine große Rolle bei DNA-*looping* sowie Protein-Dimerisierung und ist involviert in die Bildung von Multiproteinkomplexen [75]. In der Mitte des Proteins befindet sich eine zweite *repressor domain* (RD2). Mutationen innerhalb dieses Bereiches führen zu einer veränderten transkriptionellen Aktivität von PLZF [76]. Es gibt drei Transkripte von PLZF: zwei, mit einer Länge von 2477 bp und 2249 bp, kodieren jeweils für das 673 as große Protein und die dritte Variante mit 1728 bp, kodiert für ein 550 as großes Protein. Koken *et al.* konnten PLZF im Zellkern in speziellen Kernkompartimenten, in den sogenann-

ten *nuclear speckles* lokalisieren. *Nuclear speckles* oder *interchromatin granule clusters* sind spezialisierte Organellen, die viele Transkriptionsfaktoren enthalten, die in die prä-mRNA Prozessierung involviert sind [77].

1.2.1. Expression und Funktion von PLZF

Die Expression von PLZF wurde u. a. in Zellen des ZNS, in den hämatopoetischen Zellen des Knochenmarks, in kardialen Myocyten und Muskelzellen, in renalen Glomeruli und Tubuli, in der Prostata sowie in endokrinen Drüsen nachgewiesen [78]. Hohe Expressionen konnten in adulten, hämatopoetischen Vorläuferstammzellen gezeigt werden [79]. PLZF kann über direkte DNA-Bindung sowohl als transkriptioneller Repressor [80] als auch Aktivator [81, 82] fungieren, abhängig vom Zellsystem und physiologischen bzw. pathophysiologischen Bedingungen. Dabei interagiert PLZF mit unterschiedlichen funktionalen Interaktionspartnern bei der Bildung großer regulativer Multiproteinkomplexe. So konnte gezeigt werden, dass die RD2 den nicht-DNA-bindenden transkriptionellen Repressor *eight-twenty-one* (ETO) bindet [83]. Zusammen mit den Korepressoren *silencing mediator for retinoid and thyroid-hormone receptor* (SMRT), *nuclear receptor co-repressor* (N-CoR), *SIN3 transcription regulator homolog A* (Sin3A) und *histone deacetylase 1* (HDAC1) bilden sie einen Repressor-Komplex [83, 84, 85, 86, 87, 88, 89].

PLZF ist bei der transkriptionellen Regulierung unterschiedlicher Gene beteiligt, die u. a. bei Entwicklungsprozessen wie der Spermatogenese, der Formation der hinteren Gliedmaßen, der Hämatopoese und der Immunregulation eine Rolle spielen. Eine Übersicht der Prozesse, in denen PLZF involviert ist, stellt Abbildung 1.6 dar. PLZF-*knockout*-Mäuse [90] zeigten u. a. schwerwiegende muskuloskeletale Defekte der Extremitäten mit homöotischen Transformationen der Wirbelkörper, deformierte Knorpel- und Knochenoberflächen und Anomalien in der Finger- und Zehenanordnung. Diese lassen sich auf eine mögliche Dysregulation der Hox-Gene durch PLZF zurückführen, sowie einer verringerten PLZF-vermittelten Expression von *bone morphogenetic protein 7* (Bmp7) [90]. Außerdem zeigten männliche *knockout*-Mäuse eine partielle Sterilität

aufgrund einer verstärkten Apoptose in spermatogonialen Zellen [91]. Durch die Interaktion von PLZF mit dem *c-kit*-Promotor wird die Aufrechterhaltung und Proliferation von postnatalen Keimzellen beeinflusst [92, 93]. Die erhöhte Anfälligkeit der PLZF-*knockout*-Mäuse für virale Infektionen wie *Semliki Forest virus* (SFV) und *encephalomyocarditis virus* (EMCV) im Vergleich zu Wildtypmäusen zeigt die Bedeutung von PLZF in einer Interferon-vermittelten antiviralen Immunregulation [94]. Weiterhin ist PLZF in der Zellzyklusregulation durch Reprimierung des Cyclin A2-Promotors beteiligt, was eine Akkumulation der Zellen in G1-Phase bewirkt und letztendlich zur Apoptose führt [80, 95]. Bernardo *et al.* konnten PLZF-induzierte, apoptose-relevante Gene identifizieren, u. a. eine erhöhte Expression der pro-apoptotischen Gene TP53INP1, ID1 und ID3 sowie die Inhibierung des anti-apoptotischen Gens TERT [96].

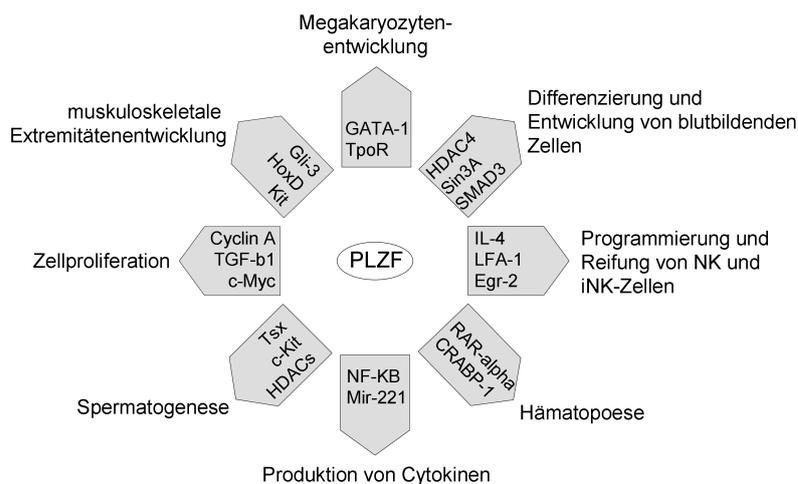


Abb. 1.6.: Einfluss von PLZF in diversen biologischen Prozessen. Grafische Darstellung modifiziert nach Suliman, 2012 [79].

1.2.2. Posttranslationale Modifikationen von PLZF

Die posttranslationale Modifikation von PLZF beeinflusst seine regulatorischen Eigenschaften. Guidez *et al.* wiesen eine Acetylierung im Zinkfinger 9 von PLZF durch p300 sowohl *in vitro* als auch *in vivo* mit inhibierenden Konsequenzen für die DNA-Interaktion [86] auf. Weiterhin konnte gezeigt werden, dass PLZF durch *cdc2*/Cyclin-B

in vitro phosphoryliert wird [97]. Ebenso wurden die Cyclin-abhängige Kinase (CDK)-2 und Interferon als Ursachen für eine Phosphorylierung von PLZF am Threonin-Rest 282 und Serin-Rest 197 *in vitro* [91] bzw. am Serine-Rest 76 *in vitro* erkannt [94]. *Small ubiquitin-like modifier* (SUMO-1) bindet an Lysin 242 in der RD2-Domäne von PLZF *in vivo* und verhindert damit die transkriptionelle Repression des Zellzyklus durch Reaktivierung von Cyclin A2 [76]. Weiterhin konnte gezeigt werden, dass die BTB/POZ-Domäne von PLZF ein Ubiquitin-Ligase-Adapterprotein (BTBD6) für den CUL3-Ubiquitin E3 Ligase-Komplex bindet, was zu seinem Export aus dem Zellkern mit anschließender Ubiquitinierung und Degradation führt. Der Abbau von PLZF zeigte sich als essenziell für die Differenzierung von neuronalen Vorläuferzellen [98].

1.2.3. PLZF im onkologischen Kontext

Aufgrund seiner wachstumshemmenden und pro-apoptischen Eigenschaften wird PLZF zunehmend als Tumorsuppressor betrachtet. So wurde keine bzw. eine reduzierte PLZF-Expression in verschiedenen malignen Krebszellen gefunden, wie z.B. in aggressiven Mesotheliomzellen. Eine ektopische PLZF-Expression in diesen Zellen führte zu einer erhöhten Apoptoserate und einer reduzierten Zellviabilität [99]. Rho *et al.* beschrieben eine PLZF-vermittelte Tumorsuppressoraktivität durch die Interaktion mit dem *cervical cancer suppressor-3* (CCS3) in zervikalen Krebszellen. Eine erhöhte Expression von CCS-3 in diesen Zellen wiederum bewirkte eine Inhibition des Zellwachstums, eine verstärkte Apoptoserate und eine Suppression der Cyclin A2-Promotoraktivität [100]. In primären humanen malignen Melanomen wird die mRNA-Konzentration von PLZF als prognostischer Index genutzt. Ist diese niedrig, so wird eine geringere 5-Jahres-Überlebensrate dieser Patienten prognostiziert [101]. Weiterhin wurde ein Verlust von endogener PLZF-Expression in der Prostatakrebszelllinie DU145 gefunden [102].

1.2.4. PLZF und der Angiotensin-AT2-Rezeptor

Neben seiner bereits oben erwähnten Funktion als Adapterprotein im (Pro-)Renin-Rezeptor-Signaltransduktionsweg konnte PLZF im kardialen Kontext als direkter Interaktionspartner des AT2R beschrieben werden [81]. Im Gegensatz zum AT1R ist der AT2R überwiegend im fötalen Stadium exprimiert und deutlich geringer im adulten Stadium [103]. Unter bestimmten pathologischen Bedingungen, wie der kardialen Hypertrophie, konnte wiederum eine erhöhte Expression des AT2R nachgewiesen werden. [104]. Senbonmatsu *et al.* zeigten, dass die Stimulation von CHO-K1-Zellen durch AngII eine Phosphorylierung der Aminosäure Tyr669 von PLZF auslöst und die Kollokalisation von cytosolischem PLZF mit dem AT2R induziert, woraufhin PLZF in den Zellkern transloziert. Dies bewirkt eine PLZF-vermittelte erhöhte Expression der PI3-Kinase-p85 α -Untereinheit und eine Aktivierung der *downstream* liegenden Kinasen Akt/PKB und p70S6K [81], was zu einer kardialen Hypertrophie führen könnte. Der Einsatz von Genistein, einem Isoflavon und Tyrosinkinaseinhibitor, verhinderte die Translokation von PLZF in den Zellkern und die konsekutiven Effekte. In PLZF-*knockout*-Mäusen konnten Wang *et al.* nachweisen, dass PLZF ein in Ang II-induzierten kardiovaskulären *remodeling* involvierter Transkriptionsfaktor ist. Die Aktivierung von PLZF führte zu einer verstärkten Expression von GATA4, einem Zielgen von PLZF, welches ein Schlüsselprotein in kardialer Hypertrophie ist [105, 106]. Die Wildtypmäuse dagegen zeigten eine kardiale Hypertrophie oder Fibrose sowie eine Aktivierung der GATA4-Expression [105].

1.3. Genomweite Analysen des Transkriptom

Das Genexpressionsprofil oder Transkriptom, d.h. die Gesamtheit der Gene, die zu einem bestimmten Zeitpunkt ausgehend von der genomischen DNA transkribiert werden, ist ein Hauptfaktor, welcher den zellulären Phänotyp und die Funktion bestimmt. Die Transkription von genomischer DNA zu mRNA ist der erste Schritt zur Protein-

synthese, und Variationen in der Genexpression sind verantwortlich für morphologische und phänotypische Veränderungen als Antwort auf z. B. bestimmte Stimuli oder sich ändernde Umweltbedingungen. Das Transkriptom ist hoch dynamisch und gibt nicht nur Aufschluss über physiologische, sondern auch über pathophysiologische Prozesse. Die Analyse des Zeitpunktes und des Ausmaßes der Genexpression ist ein zentraler Aspekt, um die Aktivitäten und biologischen Rollen der kodierten Proteine einordnen zu können und die Vernetzung bzw. das Zusammenspiel der multiplen Zellkomponenten zu erschließen [107]. Die Mikroarray-Technologie ermöglicht die parallele genomweite Erfassung der Expressionslevel mehrerer tausend Gene, welche Hinweise auf regulatorische Mechanismen, zelluläre Funktionen und biochemische Signalwege geben [108]. Im Kontext von Gesundheit und Therapie können die Informationen, die aus Genexpressionsanalysen gewonnen werden, die Ursachen und Konsequenzen von Krankheiten, die Wirkung von Medikamenten in Zellen und Organismen und die Detektion von potenziellen *targets* und Biomarker für therapeutische Interventionen aufdecken [107]. Es gibt zwei Arten von DNA-Mikroarrays, die auf verschiedenen Herstellungsmethoden basieren: cDNA-Arrays, auf welchen vorsynthetisierte cDNA oder Oligonukleotide auf die Array-Oberfläche mittels Roboter „gespottet“ werden und Oligonukleotid-Arrays, die direkt durch *in situ*-Synthese auf die Chipoberfläche hergestellt werden [109, 110]. Jeder Spot repräsentiert ein Gen und die entsprechenden Informationen zu den Sequenzen sind in Datenbanken hinterlegt. Die Zielmoleküle sind in der Regel in cDNA oder cRNA transkribierte und mit Fluoreszenzmarkern versehene mRNA aus den zu untersuchenden Zellproben. Bei der sogenannten *two-colour*-Hybridisierung (siehe Abbildung 1.7) werden die Proben aus zwei Experimenten (z. B. Intervention versus Kontrolle) mit zwei verschiedenen Fluorophoren, üblicherweise mit den Cyaninen Cy3 und Cy5, markiert und dann gemeinsam auf einen Mikroarray hybridisiert (siehe Abbildung 1.7). Eine andere Möglichkeit ist die Markierung der Nukleotide mit nichtfluoreszierendem Biotin, welche dann auf dem Array hybridisiert werden und anschließend mit fluoreszierenden Streptavidin-Konjugaten inkubiert werden. Die Fluoreszenzsignale werden mit einem Scanner ausgelesen und die Daten werden normalisiert und statistisch ausgewertet. ChIP-*chip*- auch genannt *ChIP-on-chip*-Experimente stellen eine Kombinati-

on aus Chromatin-Immunpräzipitationen und anschließender Mikroarrayanalyse dar. Das Ziel der ChIP ist die Analyse von Protein-DNA-Interaktionen bezüglich Transkriptionsfaktoren, Kofaktoren oder histonmodifizierenden Enzymen [111, 112]. Um die Bindungsstellen des Proteins im Gesamtgenom zu detektieren, werden die aus der ChIP isolierten DNA-Fragmente, d. h. die Abschnitte der DNA, an denen der Zieltranskriptionsfaktor gebunden hat, auf Promotorchips hybridisiert, deren Oligonukleotide die Bereiche um die Transkriptionsstartpunkte und der *upstream* liegenden Regionen abdecken [113].

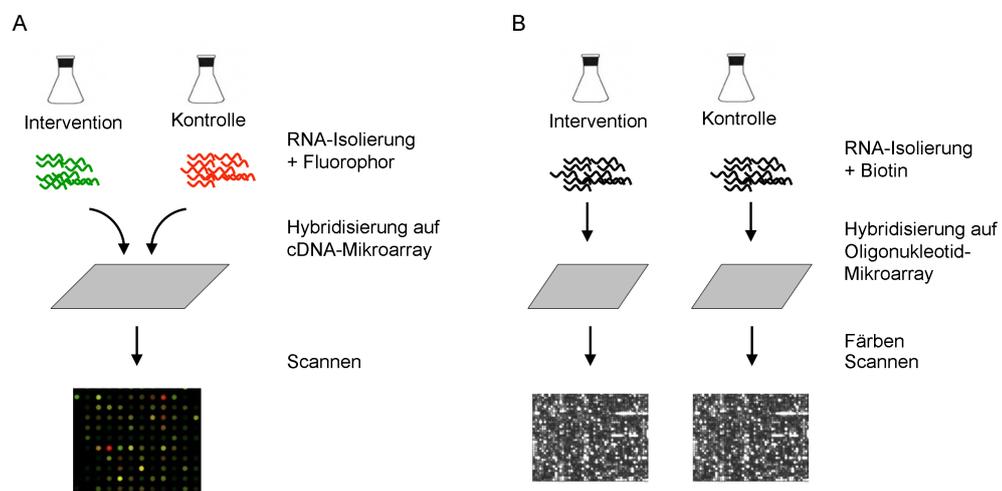


Abb. 1.7.: Schematische Darstellung eines *two-colour*-Genexpressions-Mikroarray-Experimentes (A) und eines Oligonukleotid-Mikroarrays (B). Die RNA zweier experimenteller Bedingungen (Intervention und Kontrolle) wird isoliert, umgeschrieben und mit je einem Fluoreszenzmarker (A) bzw. Biotin (B) versehen. Anschließend werden die Proben auf den jeweiligen Arrays hybridisiert, ggf. gefärbt (B) und die Signalintensitäten gemessen. (Abbildung nach Harrington *et al.* [108])

1.4. Ziel und Hintergrund der Arbeit

Aufgrund der pathophysiologischen Bedeutung des (P)RR-PLZF-ATPase/ Wnt-Signalweges, der weiterhin das Ziel einer neuen *first-in-class*-Medikamentenklasse darstellt, die derzeit in unserer Arbeitsgruppe entwickelt wird [32, 114], ist es Ziel dieser Promotionsarbeit, die Schlüsselkomponenten der (P)RR-PLZF-Signaltransduktionskaskade, (P)RR und PLZF, auf transkriptioneller Ebene mittels Mikroarray-Analysen zu charakterisieren (siehe Abbildung 1.8). Hierzu soll zunächst das genomweite Transkriptionsprofil des (P)RRs mittels siRNA-Experimenten einer neuronalen Zelllinie (KELLY) untersucht werden und spezifische Genexpressionsmuster identifiziert und funktionell annotiert werden. Zur weiteren Charakterisierung des (P)RR soll die V-ATPase durch Bafilomycin A1 funktional gehemmt werden, gefolgt von einer Analyse der konsekutiven genregulatorischen Signaturen. Anschließend vergleichende Transkriptomanalysen durch die Bildung von Schnittmengen der signifikant differenziell exprimierten Gene, sollen Aufschluss über modulare Funktionen *downstream* des (P)RRs geben. Zur Untersuchung der zweiten Schlüsselkomponente, dem Transkriptionsfaktor PLZF, sollen Transkriptionsprofile von PLZF-überexprimierenden Zelllinien (KELLY und HEK) untersucht und mit den anderen Signaturen verglichen werden. Zusätzlich soll das Expressionsprofil durch Einsatz von Genistein, einem Phytoöstrogen, welches die Translokalisierung von PLZF in den Zellkern inhibiert [81], untersucht werden (siehe Abbildung 1.8). Chromatin-Immunopräzipitationen-(ChIP-)chip-Experimente bezüglich RNA-Polymerase II und PLZF sollen der Validierung der durch die Mikroarrayanalyse identifizierten Transkripte dienen und neue Zielpromotoren von PLZF aufdecken.

Die Analyse und der Vergleich der diversen Transkriptionsprofile *downstream* des (P)RR sollen einen Einblick in die Funktionen des (P)RR-Signalweges ermöglichen (siehe Abbildung 1.8). Ferner sollen die identifizierten genregulatorischen Signaturen als zukünftige Grundlage zur Evaluation der zu entwickelnden chemischen Substanzen des Projektes der Medikamentenentwicklung dienen, im Sinne einer *target deconvolution* der *hits* und (*pre*)*leads* [32, 114]. Beispielsweise kann untersucht werden, ob diese Substanzen

mit möglichen (P)RR-inhibitorischen Eigenschaften die gleichen bzw. ähnliche Effekte aufweisen wie z. B. siRNA gegen (P)RR, um die pharmakodynamische Spezifität der Substanzen weiter zu validieren bzw. um sogenannte *off-target*-Effekte identifizieren zu können.

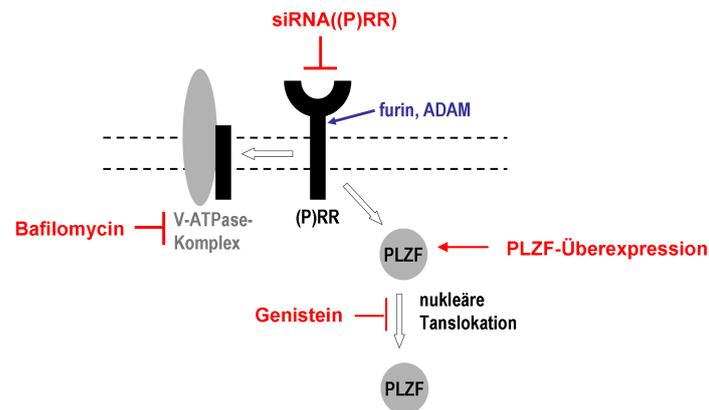


Abb. 1.8.: Schematische Übersicht der (P)RR-PLZF-Signaltransduktionskaskade mit den in dieser Arbeit verwendeten Interventionen zur Analyse der putativen *sub-pathways*.

2. Material und Methoden

2.1. Material

2.1.1. Chemikalien

Die in dieser Arbeit verwendeten Chemikalien und Lösungsmittel sind im Anhang in der Tabelle A.1 aufgelistet und wurden „reinst“ oder in analytischer Qualität bezogen.

2.1.2. Puffer, Medien, Lösungen

Soweit nicht anders vermerkt, wurden alle Puffer und Medien mit ddH₂O (bidestilliertem Wasser) angesetzt. Dieses wurde mittels einer Reinstwasseranlage der Firma Millipore (Milli Q) aufbereitet. Ultra-Pure Wasser (steriles bidestilliertes Wasser) wurde von der Firma Biochrom bezogen (Biochrom AG, Berlin, D).

- **LB-Medium:**

1% (w/v) Bacto-Trypton; 0,5% (w/v) Hefeextrakt; 1% (w/v) NaCl (pH 7,2); autoklaviert (121 °C, 20 min)

- **SOC-Medium:**

2% (w/v) Trypton; 0,5% (w/v) Hefeextrakt; 8,5 mM NaCl; 2,5 mM KCl; 10 mM MgCl₂ (pH 7,0); autoklaviert (12 °C, 20 min), 2% (v/v) 1 M Glucoselösung

- **LB-Agar:**

LB-Flüssigmedium; 20 g/l Agar; autoklaviert (121 °C, 20 min)

Antibiotika

- Stammlösung: 1,5 g Ampicillin, ad 10 ml ddH₂O, Lagerung bei 4 °C, Arbeitskonzentration: 150 µg/ml
- Stammlösung: 50 mg/ml Hygromycin B, Lagerung bei 4 °C, Arbeitskonzentration: 100 µg/ml

Puffer

- 6× Probenpuffer (DNA-Agarosegelelektrophorese): 40% (w/v) Saccharose, 0,25% (w/v) Bromphenolblau
- 50× TAE-Puffer (DNA-Agarosegelelektrophorese): 2 M Tris, 1 M Eisessig, 0,5 M EDTA, pH 8,0.
- 10× Tris-Puffer: 50 mM Tris, 1 mM EDTA, pH 7,5
- 5× KCM-Puffer (Transformation): 0,5 M KCl, 0,15 M CaCl₂, 0,25 M MgCl₂
- TSS-Lösung (Transformation): 10% Polyethylenglycol, 5% DMSO, 20 mM MgCl₂, ad 4,5 ml mit sterilem LB-Medium

Puffer für die Gesamtproteinisolierung und fraktionierte Proteinisolierung von eukaryontischen Zellen

- *radio immuno precipitation assay* (RIPA)-Lyse-Puffer: 10 mM Tris-HCl (pH 8,0), 140 mM NaCl, 1% Triton X-100, 0,1% Natriumdeoxycholat, 0,1% SDS, 1 mM EDTA (pH 7,4), 0,5 mM EGTA (pH 8,0), direkt vor Gebrauch: 140 mM NaCl, 1% Triton X-100, 0,1% Natriumdeoxycholat, 0,1% SDS, 1 mM EDTA (pH 7,4), 0,5 mM EGTA (pH 8,0), direkt vor Gebrauch: 1 mM NaF, 1 mM Na₃VO₄, 1× *complete protease inhibitor cocktail* (Roche) für 10 ml 1× RIPA-Lyse-Puffer
- Puffer P1 (hypotonischer Puffer): 10 mM HEPES-KOH, 10 mM KCl, 0,1 mM EGTA, 1 mM DTT, pH 7,9, 1× *complete protease inhibitor cocktail* (Roche) auf 10 ml Puffer

- Puffer P2 (hypertonischer Puffer): 20 mM HEPES-KOH, 10% Glycerin, 400 mM NaCl, 1 mM EGTA, 1 mM DTT, pH 7,9, 1× *complete protease inhibitor cocktail* (Roche) auf 10 ml Puffer

Puffer für SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese

- 10× Elektrophoresepuffer: 0,25 M Tris-Base, pH 8,3, 1,92 M Glycin, 10% SDS, ad 1 l ddH₂O
- 6× SDS-Ladepuffer: 350 mM Tris-HCl pH 6,8, 50% Glycerol, 10% SDS, 10% β-Mercaptoethanol, 0,02% (w/v) Bromphenolblau

Puffer für Proteingel-Färbung

- Gel-Färbelösung: 40% Methanol, 10% Essigsäure, 0,5 g Coomassie Blue R250
- Entfärbelösung: 40% Methanol, 10% Essigsäure

Puffer für Immunoblotting und Detektion

- Transferpuffer (Towbin-Puffer): 25 mM Tris-Base, 192 mM Glycin, 20 % Methanol, 0,05 % SDS (Stocklsg.: 10 %), ad 1 l ddH₂O
- 10× TBS: 60,5 g Tris-Base, 87,6 g NaCl, pH 7,6, ad 1 l ddH₂O
- TBST-Lösung: 1× TBS, 0,1 % Tween 20 (v/v)
- Blockierungslösung: 1× TBS, 7% Milchpulver (w/v), Lagerung bei 4 °C

ECL Western-Blotting-Detektionsreagenz

- Lösung A: 100 mM Tris, pH 8,5, 2,5 mM Luminol, 0,4 mM p-Cumarsäure
- Lösung B: 100 mM Tris, pH 8,5, 0,02% H₂O₂, Lagerung jeweils bei 4 °C unter Ausschluss von Licht

Puffer für *tandem affinity purification*

- TBS-Puffer: 30 mM Tris-HCl, pH 7,4, 150 mM NaCl
- Lyse-Puffer: TBS-Puffer, 0.5% Nonidet-P40, 1× *complete protease inhibitor cocktail*, *phosphatase inhibitor cocktail 2* (Sigma)
- Waschpuffer: TBS-Puffer, 0.1% Nonidet-P40, *protease* und *phosphatase inhibitor cocktails*
- Desthiobiotin-Elutionspuffer: TBS-Puffer, 2 mM Desthiobiotin (IBA)
- FLAG-Elutionspuffer: TBS-puffer, 200 mg/ml FLAG-Peptid (Sigma)

Puffer für Chromatin-Immunopräzipitation

- Lysepuffer (pH 8,1): 1% SDS, 4 mM EDTA, 50 mM Tris-HCl, 1× *complete protease inhibitor cocktail* (Roche),
- TE-Puffer (pH 8,0): 10 mM Tris-HCl, 1 mM EDTA
- 1 M Tris-HCl-Puffer (pH 7,5): 1 M Tris-HCl
- TSE-150 Puffer (pH 8,1): 1% Triton-X-100, 0,1% SDS, 2 mM EDTA, 20 mM Tris-HCl, 150 mM NaCl
- LiCl-Puffer (pH 8,1): 0,25 M LiCl, 1% NP40, 1% Natriumdeoxycholate, 1 mM EDTA, 10 mM Tris-HCl
- Elutionspuffer: 1% SDS, 0,1 M NaHCO₃

2.1.2.1. Verwendete Antikörper

- anti-PLZF (ab111951), Abcam, Cambridge, UK; Einsatz: Immunodetektion
- anti-GAPDH (MAB374), EMD Millipore, Einsatz: Immunodetektion
- anti-(P)RR (HPA003156), Sigma-Aldrich, Einsatz: Immunodetektion
- anti-PLZF (2A9), Calbiochem (EMD Millipore), Darmstadt, D, Einsatz: ChIP
- anti-RNA-Polymerase II (sc-899 X, Santa Cruz Biotechnology), Einsatz: ChIP
- anti-IgG, polyklonal, (2729S, Danvers, USA), Einsatz: ChIP

2.1.3. Zelllinien und Zellkulturmedien

- **KELLY-Zellen**

Bei KELLY-Zellen handelt es sich um humane Neuroblastomzellen, die vom Institut für Physiologie (Charité, Berlin, D.) zur Verfügung gestellt wurden. Die Zellen wurden in RPMI 1640-Medium kultiviert, das mit 10% FCS, 100 U/ml Penicillin sowie 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ Streptomycin angereichert war.

- **HEK293T-Zellen**

HEK293 sind humane embryonale Nierenzellen und sind der ursächliche Stamm von HEK293T (American Type Culture Collection (ATCC), Manassas, VA, USA). Das „T“ bedeutet, dass diese Zellen das große T-Antigen exprimieren, welches für die verstärkte Replikation von SV40-enthaltenden Plasmiden in transfizierten Zellen wichtig ist. Die Kultivierung erfolgte in 4,3 g/l D-glukosehaltigem DMEM-Medium mit 10% FCS, 100 U/ml Penicillin sowie 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ Streptomycin.

Die Zelllinien wurden in einem CO₂-Begasungsbrutschrank im offenen System bei 37 °C mit 5% CO₂ und einer relativen Luftfeuchtigkeit von 93% kultiviert.

2.1.4. Vektoren

- **C-SF-Tap-pcDNA3.0**: pcDNA3.0-Derivat, mobilisierbarer episomaler Expressionsvektor mit einem CMV-, Sp6- und T7-Promotor, einem SV40-Replikationsursprung sowie einem Ampicillin- und Neomycin-Resistenzgen. Zusätzlich enthält dieser Vektor die kodierende Sequenz von zwei *strep-tags* II und einem *FLAG-tag*. Das Molekulargewicht der *tags* beträgt 4,6 kDa [115].
- **pCEP4**: mobilisierbarer *episomal mammalian expression*-Vektor mit einem CMV-Promotor, einem EBV-Replikationsursprung (*oriP*) und einem EBNA-1-Antigen für die extrachromosale Replikation in humanen Zelllinien sowie einem Ampicillin- und einem Hygromycin B-Resistenzgen.

2.1.5. Enzyme und Größenstandards

Polymerasen und andere DNA-modifizierende Enzyme wurden von Amersham Biosciences (Freiburg, D.), New England Biolabs (Frankfurt, D.) und Roche (Mannheim, D.) bezogen.

- Restriktionsendonukleasen (Fermentas, St. Leon-Rot, D.)
- T4-DNA-Ligase (Promega, Mannheim, D.)
- M-MLV-reverse-Transkriptase (Promega)
- *RQ1-RNase-Free DNase* (Promega)
- *GeneRuler 100 bp DNA ladder* (Fermentas)
- *GeneRuler 1 kb DNA ladder* (Fermentas)
- *PageRuler Prestained Protein ladder* (Fermentas)

2.1.6. Kits

Medien für die Bakterienkultur

- *NucleoSpin Extract II* (Macherey-Nagel, Düren, D.)
- *NucleoSpin RNA II* (Macherey-Nagel)
- *NucleoSpin Plasmid QuickPure* (Macherey-Nagel)
- *Plasmid-DNA Purification NucleoBond Xtra-Mini* (Macherey-Nagel)
- *Plasmid-DNA Purification NucleoBond Xtra-Midi* (Macherey-Nagel)
- *QIAquick PCR Purification Kit* (Qiagen, Hilden, D.)
- *Genomeplex Complete WGA Kit (WGA2)* (Sigma-Aldrich, St. Louis, USA)

2.1.7. Oligonukleotide

Die in dieser Arbeit verwendeten Oligonukleotide wurden von der Firma Sigma, Eurogentec und Invitrogen bezogen. Die Oligonukleotide fanden ihren Einsatz in der PCR-Mutagenese bei der Generierung von PLZF-Varianten (Tabelle 2.1), (P)RR-*knockdown*-Experimenten (siRNA) (siehe Tabelle 2.2), in der quantitativen *real time*-PCR und in den ChIP-Experimenten (Tabelle 2.3).

Tab. 2.1.: In dieser Arbeit im Rahmen von Klonierungen verwendete synthetische Oligonukleotide. Die Erkennungssequenzen der Restriktionsendonukleasen sind unterstrichen und die Start- bzw. Stopkodons sind fettgedruckt.

Primerbezeichnung	Oligonukleotidsequenz (5' - 3')	Restriktionsenzym
PLZF-N-term-fw-His	GAGGAC <u>ATAT</u> G GATCTGACAAAAATGG GCATGATCCAGC	<i>NdeI</i>
PLZF-N-term-rv-His	CCTGG <u>ATCCT</u> CA CACATAGCACAGGTAG AGGTACG	<i>BamHI</i>
PLZF-pCEP-His-fw	GCTAGG <u>CTAG</u> CAT G GATCTGACAAAAAT GGGCATGATCCAGC	<i>NheI</i>
C-SF-TAP-pcDNA3.0	TCCTCGCGG <u>CCG</u> CC CACATAGCACAGGTA GAGGTACGTC	<i>NotI</i>

Tab. 2.2.: In dieser Arbeit verwendete siRNA-Sequenz.

Primerbezeichnung	Oligonukleotidsequenz (5' - 3')
siRNA((P)RR)	GCUCCGUAUCCGCCUGUUU
Kontroll-siRNA	UUUACCGUCGCCUUGAGCU

Tab. 2.3.: In dieser Arbeit verwendete Primer zur quantitativen Expressionsanalyse und zur Analyse der DNA-Anreicherung in ChIP-Experimenten mittels *real time*-PCR.

Primer- bezeichnung	<i>forward</i> (5' - 3')	<i>reverse</i> (5' - 3')
Primer zur Expressionsanalyse		
qPLZF	GGATAGTTTGCGGCTGAGAA	CCCACACAGCAGACAGAAGA
qADORA2	TCTTCAGTCTCCTGGCCATC	AGTGGTTCTTGCCCTCCTTT
qATF7IP	TGGACTAACCTGGGATCAA	TGCCATTTTGA CTCTGAACG
qCRH	ACCGCCAACTTTTCCGCGTG	TCGGCCCTGGCCATTTCCAAGA
qCTSB	AATGCGCACGTCAGCGTGGA	AGCCGTTGACGTGGTGCTCA
qEHMT1	ATCCACTGTGGGTCCAAG	TGGAAGTCCTGCTGTCTCTCT
qFAM11 A2	ATTGGGGGAGCTGGGGCAAGT	TGGGACCAGGGATTCCAAGGGA
qFN1	CATGAAGGGGGTCAGTCCTA	CCTTCTCCCAGGCAAGTACA
qID1	AGGTGGTGCGCTGTCTGTCTGA	CCACCTTGCTCACCTTGCGGTT
qID2	TCTTGACCTGCAGATCGCCCT	GCCACACAGTGCTTTGCTGTCA
qID3	CGCTGAGCTTGCTGGACGACAT	AGCTCGGCTGTCTGGATGGGAA
qIGF2	CAAGCCGTGTGAGCCGTGCGC	TGTCCGGAAGCACGGTCGGA
qNOX4	TTGGCTTTGGATTTCTGGAC	CATTGTGAGGGTAAATGGATGA
qPGK1	GACGCTGGACAAGCTGGACGTT	TTGTCAGGCATGGGCACACCA
qPOPDC	TGGCGAATTTCTGCATTACA	AAAAAGGCGGGAGATGTAGC
qSEC1A	TCAGCAATTGGATGCAACAT	CACCTGCAATCAGA ACTCCA
qTSTD2	GACCAAGGAGATGACCTGG	GATGCTGGTTTGGTCTGTGA
qTUBE1	GGATCTGGACTTGGCACATT	ACCATGAGGTCGATTTTGCT
Primer zur Analyse der ChIP-Experimente		
β -actin	AATGCTGCACTGTGCGGCGA	GGCGGATCGGCAAAGGCGA
GAPDH	TACTAGCGGTTTTACGGGCG	TCGCTCTCTGCTCCTCCTGTTCGA
ATP6V0D2	GAGTGTGCTGTGTTGAAAGCC	ATCAGGCAGCACAAGCAATC
TUBE1	TGATTCCTGGAGAAGACTGCC	GTGGCTGAGGCAGTAAAGGT

2.2. Methoden

2.2.1. Arbeiten mit Bakterien

2.2.1.1. Herstellung chemisch-kompetenter Bakterienzellen

Für die Herstellung kompetenter Bakterienzellen wurde LB-Medium mit Top 10 F'-chemisch-kompetenten *Escherichia coli*-Bakterien angeimpft und über Nacht bei 37 °C und 200 rpm inkubiert. Von dieser Vorkultur wurde eine Probe im Verhältnis von 1:200 in frisches LB-Medium überführt und bei 37 °C sowie 200 rpm kultiviert bis die Bakteriensuspension eine optische Dichte von 0,5 bis 0,6 bei 600 nm aufwies. Anschließend wurde die Bakterienkultur für 30 min auf Eis inkubiert und danach für 20 min bei 3220 g sowie 4 °C zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das Pellet in 5 ml TSS-Lösung resuspendiert. Die Bakterienlösung wurde aliquotiert, in Flüssigstickstoff schockgefroren und anschließend bei -80 °C gelagert.

2.2.1.2. Klonierungen

Konstruierte Plasmide

- pCEP4-*zbtb16* (ohne *tag*): AmpR, HygrBR, pCEP-Derivat, enthält ein 2022 bp-*NheI/BamHI*-Fragment (CDS von *zbtb16*) aus *H. sapiens*. Die Expression erfolgte in HEK293T-Zellen.
- C-SF-TAP-pcDNA3.0-*zbtb16*: AmpR, C-SF-TAP-pcDNA3.0-Derivat, enthält ein 2022 bp-*XhoI/XbaI*-Fragment (CDS von *zbtb16*) aus *H. sapiens*. Die Expression erfolgte transient in HEK293T-Zellen als Fusionsprotein mit einem C-terminalen zweifachen *Strep-tag* II (Peptid mit acht Aminosäuren) und einem FLAG-*tag*. Das Molekulargewicht aller drei *tags* betrug 4,6 kDa. Die konstruierten Plasmide wurden in der Tandem-Affinitäts-Aufreinigung eingesetzt (siehe Kapitel 2.2.4.3).

Die Sequenzen der Primer sind in Tabelle 2.1 aufgelistet. In den folgenden Abschnitten sind die allgemeinen Arbeitsschritte der Klonierung dargestellt.

Polymerasekettenreaktion

Für die initiale Klonierung der PLZF-Varianten wurde cDNA aus humanem Herzen als *template* für die PCR verwendet. Für die nachfolgenden Klonierungen dienten die generierten Plasmide mit der entsprechend kodierenden Sequenz als *template*. Die PCR-Methode selbst wird im Kapitel 2.2.3.3 erläutert. Die verwendeten Primer sind in der Tabelle 2.1 dargestellt. Sie enthielten u. a. Erkennungssequenzen für jeweils unterschiedliche Restriktionsenzyme zur Ligation mit den entsprechenden Vektoren. Die PCR-Produkte wurden mittels Gelelektrophorese (siehe Kapitel 2.2.4.5) validiert. Bei korrekter Fragmentgröße wurden die Amplifikate mit Hilfe des *NucleoSpin Plasmid QuickPure Kits* gereinigt.

Restriktion

500 ng des gereinigten PCR-Produkts wurden mit den jeweiligen 1× Restriktionspuffern (Puffer R, O oder Tango-Puffer von Fermentas), je 1 U der entsprechenden Restriktionsenzyme zugefügt und in einem Gesamtvolumen von 10 μ l 1 h bei 37 °C oder über Nacht bei 16 °C restringiert. In einem parallelen Ansatz wurden 100 ng des jeweiligen Vektors mit 1× Restriktionspuffer (Puffer R, O oder Tango-Puffer von Fermentas) und jeweils 1 U der gleichen Restriktionsenzyme in einem Gesamtvolumen von 10 μ l 1 h bei 37 °C oder über Nacht bei 16 °C restringiert. Die Produkte wurden anschließend mit dem *NucleoSpin Plasmid QuickPure Kit* gereinigt.

Ligation

Die *insert*-DNA wurde mit der Vektor-DNA (in einem Verhältnis von 3:1) 1 U T4-DNA-Ligase (Fermentas) und 1× Ligasepuffer (Fermentas) in einem Gesamtvolumen von 10 μl über Nacht bei 4 °C oder für 10 min bei 22 °C ligiert. Anschließend wurde die Ligase für 15 min bei 70 °C inaktiviert.

Transformation

50 ng der Plasmid-DNA oder der Ligationsansatz wurden mit 20 μl 5× KCM-Puffer, 78 μl H₂O und 50 μl Top 10 F[']-*E. coli*-Bakterien für 20 min auf Eis inkubiert. Danach erfolgte ein sogenannter Hitzeschock für 2 min bei 42 °C, gefolgt von einer Inkubation von 2 min auf Eis. Nach Zugabe von 0,7 ml SOC-Medium wurde die Bakteriensuspension für 1 h bei 37 °C sowie 200 rpm kultiviert. Der Transformationsansatz wurde 30 s zentrifugiert, der Überstand bis auf 50 μl abgenommen und der Rest resuspendiert und auf einer LB-Agarplatte ausplattiert, die 150 $\mu\text{g}/\text{ml}$ Ampicillin bzw. 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ Kanamycin enthielt. Die Platte wurde über Nacht bei 37 °C im Brutschrank inkubiert.

Plasmidisolierung

Die Isolierung und Reinigung von Plasmid-DNA wurde mit Hilfe des *Plasmid-DNA Purification NucleoBond Xtra Mini-Kits* beziehungsweise des entsprechenden *Midi-Kits* gemäß der Angaben des Herstellers durchgeführt. Alle Plasmide wurden mit Wasser eluiert und die Konzentration photometrisch ermittelt. Die generierten Plasmide wurden abschließend mit Hilfe der DNA-Sequenzierung (GATC, Biotech AG, Konstanz, D.) validiert.

2.2.2. Zellbiologische Methoden

2.2.2.1. Subkultivierung und Zellernte

Die Zellen wurden jeweils mit vorgewärmtem PBS-Puffer gewaschen und für 2 min mit 2 ml $1 \times$ Trypsin/EDTA pro 75 cm^2 Fläche bei 37°C inkubiert. Die trypsinierten Zellen wurden in Medium mit 10% FCS aufgenommen, in ein 15 ml Falcon Reaktionsgefäß überführt und 1 min bei Raumtemperatur und 160 g zentrifugiert. Das Medium wurde verworfen und das Zellpellet in frischem Medium resuspendiert. Anschließend wurden die Zellen in einem Verhältnis von jeweils 1:10 in neues Kulturmedium überführt. Für die Zellernte wurden die Zellen, wie zuvor beschrieben, behandelt. Nach der Zentrifugation wurde das Medium entfernt und das Zellpellet bis zur weiteren Aufarbeitung bei 4°C belassen oder sofort bei -80°C gelagert.

Stimulation mit Genistein und Bafilomycin

KELLY-Zellen wurden in RPMI1640-Medium mit einer Endkonzentration von $10 \mu\text{M}$ Genistein oder 1 nM Bafilomycin A1 für jeweils 48 h inkubiert. Genistein und Bafilomycin A1 wurden in 100% DMSO gelöst, sodass die Endkonzentration bezüglich DMSO im Medium 1% betrug. Als Negativkontrolle wurden KELLY-Zellen für 48 h in Kulturmedium mit 1% DMSO inkubiert.

Stabile und transiente Transfektion

Zur stabilen Transfektion der HEK293T-Zellen wurde das Transfektionsreagenz *GeneJuice* verwendet. Die Transfektion erfolgte nach Angaben des Herstellers. Zur Selektion transfizierter Zellen wurden Hygromycin B mit einer Endkonzentration von $250 \mu\text{g/ml}$ zum Kulturmedium zugefügt. Die verwendete Hygromycin-Konzentration wurde in Vorversuchen ermittelt. Für transiente Transfektionen wurden die Zellen nach 48 h geerntet.

Transfektion der KELLY-Zellen mit siRNA gegen (P)RR-mRNA

Die neuronalen KELLY-Zellen wurden mit einer Endkonzentration von 25 nM siRNA gegen (P)RR oder einer Kontroll-siRNA unter Verwendung des Transfektionsreagenzes *Hiperfect* (Qiagen) transfiziert. Die siRNA wurde zweimal, 48 h und 24 h vor der Zellernnte zugefügt. Die Durchführung erfolgte nach Angaben des Herstellers.

Proliferation und Zellzahlanalysen

Die Messung der Zellproliferation erfolgte mit *Cell Proliferation ELISA* (BrdU, Roche). Die mitochondriale Dehydrogenaseaktivität wurde mittels *Cell Proliferation Assay XTT* (Appllichem, Darmstadt, D.) bestimmt und die zelluläre ATP-Konzentration wurde mit dem *Celltiter-Glo Luminescent Cell Viability Assay* (Promega) analysiert. Die Durchführung erfolgte jeweils nach Herstellerangaben.

2.2.2.2. Statistische Auswertung

In dieser Arbeit wurde jeweils der zweiseitige, ungepaarte t-Test verwendet. Statistische Signifikanz wurde bei einem p-Wert von $p < 0,05$ angenommen. In den Histogrammen kennzeichnen die vertikalen Linien jeweils die Standardabweichung.

2.2.3. Molekularbiologische Methoden

2.2.3.1. RNA-Isolierung

Die Isolierung der Gesamt-RNA aus humanen Zellen erfolgte mit Hilfe des *NucleoSpin RNA II-Kits* nach Angaben des Herstellers. Die Elution der isolierten RNA erfolgte in H_2O und die Lagerung bei $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$.

2.2.3.2. Reverse Transkription der RNA

Die reverse Transkription der RNA wurde mit dem Enzym M-MLV-Reverse-Transkriptase und unter der Verwendung von *random*-Hexamer-Primern (Promega, Mannheim) durchgeführt. Die Arbeitsschritte fanden jeweils nach Herstellerangaben statt. Vor der reversen Transkription von RNA aus KELLY-Zellen erfolgte eine zusätzliche Spaltung der doppelsträngigen DNA mit der RQ1-*RNase Free DNase I* von Promega, Mannheim.

2.2.3.3. Polymerasekettenreaktion

Qualitative Polymerasekettenreaktion (PCR)

Die PCR wurde jeweils in einem Gesamtvolumen von 25 μ l mit dem jeweiligen 1 \times PCR-Puffer, 0,2 mM dNTPs, 0,5 μ M je Primer, 2,5 U *Taq*-Polymerase, 20-100 ng genomischer DNA beziehungsweise 50-100 ng cDNA, ggf. 5% DMSO und ggf. 25 mM MgCl₂, ad 25 μ l H₂O angesetzt. Für die PCR wurde sowohl das PCR-System *pure-pfu*-DNA-Polymerase der Firma PeqLab Biotechnology GmbH (Erlangen, D.), als auch das Platinum *pfx*-System von Invitrogen, Karlsruhe, D., verwendet. Die Tabelle 2.4 zeigt das jeweilige Temperatur-Zeit-Profil für beide PCR-Systeme:

Tab. 2.4.: Temperatur-Zeit-Profil für die Standard-PCR mit der *pure-pfu*-DNA-Polymerase (*pfu*). Abweichende Temperaturen bzw. Zeiten des PCR-Verlaufs mit der *pfx*-Polymerase sind in Klammern dargestellt. Die *extension*-Zeit (*) wird abhängig von der Fragmentgröße gewählt, wobei beide Polymerasen 1 kb in einer Minute transkribierten.

Schritt	Temperatur	Zeit
Initiale Denaturierung	95 °C (94 °C)	5 min, (2 min)
Denaturierung	95 °C (94 °C)	30 s
Primer- <i>annealing</i>	55 °C bis 65 °C	30 s
Primer- <i>extension</i>	72 °C* (68 °C*)	1 min pro kb
○ 40 Zyklen		
abschließende <i>extension</i>	72 °C (68 °C)	10 min

Quantitative Polymerasekettenreaktion (*real time*-PCR)

Die *real time*-PCR wurde mit dem Mx3000P-Gerät (Stratagene, La Jolla, USA) unter Verwendung des GoTaq-Mix (Promega, Mannheim, D.) durchgeführt. Zu einem Gesamtreaktionsansatz von 25 μl wurden 10 ng cDNA und 0,24 μM je Primer zugegeben. Für die *real time*-PCR wurde der folgende PCR-Verlauf verwendet:

Tab. 2.5.: Temperatur-Zeit-Profil für die *real time*-PCR mit dem GoTaq-Mix von Promega.

Schritt	Temperatur	Zeit
Initiale Denaturierung	95 °C	2 min
Denaturierung	95 °C	30 s
Primer- <i>annealing</i>	60 °C	30 s
Primer- <i>extension</i>	72 °C	30 s
○ 40 Zyklen		
Schmelzkurve	65-99 °C	1 min

Die Produktspezifität wurde durch die Analyse der Schmelzkurve überprüft. Zusätzlich wurde bei jeder *real time*-PCR eine sogenannte nicht-*template*-Kontrolle (NTC) mitgeführt, bei der das *template* durch Wasser ersetzt wurde. Die Auswertung erfolgte nach Normalisierung auf das entsprechende *housekeeping*-Gen nach der ΔC_T -Methode (2.1) und wurde mit der entsprechenden Kontrolle verglichen ($\Delta\Delta C_T$ -Methode, siehe (2.2)) [116]. Der C_T -Wert (*cycle threshold*) gibt die Nummer des Zyklus an, bei dem ein Fluoreszenzsignal über dem Schwellenwert detektiert wird. Die Ratio (2.3) gibt den relativen Expressionsunterschied einer Probe zwischen der Behandlung und der Kontrolle an, der auf ein *housekeeping*-Gen normalisiert und auf eine Standardprobe bezogen wurde.

$$\Delta C_T = C_{T(\text{Zielgen})} - C_{T(\text{housekeeping-Gen})} \quad (2.1)$$

$$\Delta\Delta C_T = \Delta C_{T(\text{Probe})} - \Delta C_{T(\text{Kontrolle})} \quad (2.2)$$

$$\text{Ratio} = 2^{(-\Delta\Delta C_T)} \quad (2.3)$$

2.2.3.4. Elektrophoretische Auftrennung von DNA-Fragmenten

Gelelektrophoretische Auftrennungen von DNA für analytische und präparative Zwecke erfolgten in horizontalen Elektrophoresekammern. Für die Gele wurde 1-2%-ige (w/v) Agarose in 1× TAE-Puffer verwendet, der gleichzeitig auch als Elektrophorese-Puffer diente. Die Auftrennung erfolgte mit einer Spannung zwischen 120 und 160 V. Abschließend wurden die Gele dokumentiert (Chemidoc, Biorad).

2.2.3.5. Mikroarray-Experimente

Verwendete Mikroarrays:

- *GeneChip Human Gene 1.0 ST (sense target) Array* (Affymetrix, Santa Clara, USA): enthält 764.885 distinkte Oligonukleotide je mit einer Länge von 25 bp, die 28.869 annotierte Gene abdecken.
- *GeneChip Human Exon 1.0 ST (sense target) Array* (Affymetrix): enthält 1,4 Millionen Sondengruppen mit durchschnittlich 4 Sonden (= Oligonukleotide) pro Exon und 40 Sonden pro Gen.

Aufbereitung der Proben und Hybridisierung

Die Hybridisierung und primäre Datenauswertung erfolgte durch Dr. Ute Ungethüm und Dr. Jürgen Kuban im Labor für funktionelle Genomforschung, Charité, Berlin.

Die Integrität der isolierten mRNA wurde mit Hilfe des Agilent RNA 6000 Nano Kits und dem Bioanalyzer 2100 (Agilent, Santa Clara, USA) überprüft. Anschließend wurde die RNA mit dem *Genechip Whole Transcript (WT) Sense Target Labeling Assay* (Affymetrix) entsprechend der Herstellerangaben aufbereitet. Ausgehend von 1 µg Gesamt-RNA wurde zunächst die ribosomale RNA (rRNA) mit Hilfe des *Ribominus Transcriptome Isolation Kit* (Human/ Mouse; Life Technologies) eliminiert, um den Hintergrund zu minimieren und die Array-Sensitivität und -Spezifität zu erhöhen.

Anschließend wurden von dieser reduzierten RNA doppelsträngige cDNA mit *random*-Hexamer-Primern, gekoppelt mit einer T7-Promotorsequenz, Superscript II und DNA-Polymerase I, synthetisiert. Die generierte cDNA diente als Vorlage für die folgende *in vitro*-Transkription mit einer T7 RNA-Polymerase, wobei eine zur Original-mRNA revers-komplementäre cRNA erhalten wurde. Diese cRNA wurde durch reverse Transkription mit *random*-Hexamer-Primern und RNA-Polymerase II in einzelsträngige cDNA konvertiert, die nun die gleiche Strangorientierung aufweist wie die Ausgangs-RNA. Zusätzlich wurden während dieser Reaktion dUTPs in die cDNA inkorporiert. Anschließend wurde die cDNA mit einer Kombination aus Uracil-DNA - Glycosylase (UDG) und apurinische/ apyrimidinische Endonuklease I (APE 1) fragmentiert und mit einem Reagenz, welches kovalent an Biotin gekoppelt ist, in einer terminalen Deoxynucleotidyl-Transferase (TdT)-Reaktion gelabelt. Die Hybridisierung und das Waschen wurden mit den *Hybridization* und *Wash and Stain Kits* von Affymetrix durchgeführt und anschließend wurden die Arrays gescannt.

Die Mikroarray-Daten stehen in der GEO-Datenbank (www.ncbi.nlm.nih.gov/geo/) unter den Zugangsnummern GSE39961 bis GSE39965 zur Verfügung.

Analyse der Mikroarray-Experimente

Die Mikroarray-Experimente Ma(PLZF; H), Ma(si(P)RR), Ma(Bafi) wurden in Triplika durchgeführt; Ma(PLZF; K) und Ma(Geni) jeweils in Duplika. Die Proben der Bafilomycin- und Genistein-Experimente bestanden aus jeweils drei Ansätzen, die nach erfolgter RNA-Isolierung fusioniert wurden (siehe Tabelle 2.6). Die Qualitätskontrolle und die primäre Datenanalyse wurden mit der *Expression Console software* (Affymetrix) zur Generierung von CEL-Dateien durchgeführt. Die *ChipInspector Software* (release 2.1; Genomatix, München, D.) und der Genombrowser Eldorado (08-2011; Genomatix) dienten der weiteren Datenanalyse, wobei die Normalisierung, die *fold change*-Berechnung und die statistische Analyse der Mikroarray-Experimente von Genomatix (München) durchgeführt wurden. Unter Verwendung des *ChipInspector*-Programmes wurden, basierend auf der Eldorado-Datenbank, alle einzelnen Oligonukleotidsequen-

Tab. 2.6.: Darstellung der durchgeführten Mikroarrays.

Abkürzung	Zelltyp	Experiment- versus Kontrollbedingung	Anzahl	Chiptyp
Ma(si(P)RR)	KELLY	siRNA gegen (P)RR versus Kontroll-siRNA	3	Human Exon
Ma(Bafi)	KELLY	1 μ M Bafilomycin A1 versus 1% DMSO	3	Human Gene
Ma(PLZF; H)	HEK293T	stabile Überexpression von unmarkierten PLZF versus stabile Überexpression des insertlosen Vektors	3	Human Exon
Ma(PLZF; K)	KELLY	stabile Überexpression von PLZF-HA versus stabile Überexpression des insertlosen Vektors	2	Human Gene
Ma(Geni)	KELLY	10 μ M Genistein versus 1% DMSO	2	Human Gene

zen den derzeit aktuellen Genom- und Transkriptomdaten zugeordnet. Anschließend wurden die Rohdaten der einzelnen Signale der Mikroarrays normalisiert, um eine Vergleichbarkeit der Arrays untereinander zu gewährleisten. Aus den Werten der einzelnen Sondensignalen wurde der Quotient gebildet (siehe 2.4) und anschließend logarithmiert:

$$\text{Signal Log Ratio (SLR)} = \log_2 \left(\frac{\text{Signal aus Experimentbedingung}}{\text{Signal aus Kontrollbedingung}} \right) \quad (2.4)$$

Die in den Tabellen der Mikroarray-Ergebnisse dargestellten *fold-change*-Werte sind nicht logarithmiert. Der angewandte statistische Algorithmus des verwendeten Programmes *ChipInspector* beruht auf einem t-Test mit einem permutierten, artifiziellen Hintergrund. Er basiert auf einem erweiterten SAM (*significance analysis of microarrays*)-Algorithmus [117]. Der Algorithmus erstellt einen zufälligen Hintergrund durch Permutation der Ergebnisse. Jede Sonde hat eine Kenngröße aufgrund ihres Verhältnisses relativ zur Standardabweichung beruhend auf Messwiederholungen der Probe (relative Differenz) im Vergleich zu einer frei permutierten Zuordnung (erwartete Differenz). Proben mit Kenngrößen größer als ein bestimmter Grenzwert (Delta) gelten als signifikant. Die freien Permutationen aller Daten werden dann genutzt, um den Anteil der Sonden zu schätzen, die für jeden frei gewählten Delta-Grenzwert zufällig

identifiziert werden. Daraus lässt sich die Falsch-Positiv Rate (FPR) bei gegebenen Delta-Wert ermitteln und damit die Signifikanz der Regulation, die mit steigendem Delta abnimmt.

Linearer Korrelationskoeffizient (nach Pearson)

Der Korrelationskoeffizient R ist ein Maß für die Stärke eines linearen Zusammenhangs. Zur Berechnung der Korrelation zwischen der relativen mRNA-Expression aus den Mikroarray-Experimenten und der entsprechenden quantitativen *real time*-PCR-Analysen wurden logarithmierte Werte verwendet. Ein Zusammenhang besteht ab einem R von 0,3. Die Berechnung erfolgte mit dem *IBM SPSS Statistics*-Programm, Version 20.

2.2.3.6. Netzwerkanalysen der durchgeführten Mikroarrays

Zur funktionellen Annotation, Genfunktion-Klassifikation und für Netzwerkanalysen der signifikant differenziell exprimierten Gene aus den Mikroarray-Experimenten wurde die internetbasierte *database for annotation, visualization and integrated discovery* (DAVID, *National Institute of Allergy and Infectious Disease*, v6.7) verwendet (<http://www.david.abcc.ncifcrf.gov>). Dieses Programm gestattet es unter anderem, einen Satz von Genen nach *gene ontology* (GO, www.geneontology.org) zu kategorisieren und anschließend in Hinblick auf das gesamte Genom eine Überrepräsentation einzelner GO-Kategorien zu bestimmen. Das *Gene Ontology Consortium* entwickelte Termini, um Eigenschaften und Funktionen von Genen standardisiert und strukturiert zu beschreiben. In dieser Arbeit wurden die Gene bezüglich der Kategorie „Biologischer Prozess“ analysiert [118, 119]. Innerhalb der Kategorie kann aus einer sich baumartig strukturierenden Annotation aus fünf Ebenen die Auflösung festgelegt werden. Die erhaltene Anzahl an Genen für die GO-Kategorie im Vergleich zur Größe des Eingangsdatensatzes wurde mit der entsprechenden Anzahl an Genen in der GO-Kategorie des gesamten Genoms im Vergleich zur Gesamtanzahl des Genoms verglichen und mit

einem modifizierten, exakten Fischer-Test (*EASE score*) die statistische Signifikanz berechnet. Termini mit einem p-Wert von $\geq 0,05$, einer Molekülanzahl von ≥ 10 und einer *fold enrichment* von $\geq 1,5$ wurden als statistisch signifikant betrachtet [120].

Die KEGG (*Kyoto encyclopedia of genes and genomes*) *pathway*-Analyse erlaubt Aussagen darüber, ob in den Datenlisten überproportional oft Gene enthalten waren, die einem KEGG *pathway* angehörten (<http://www.genome.jp/kegg>). Die statistische Signifikanz wurde ebenfalls mit dem exakten Test von Fischer berechnet.

Ingenuity pathway-Analyse

Weitere funktionelle Analysen wurden mit Hilfe des Programmes *ingenuity pathway analysis* (IPA, Ingenuity Systems, www.ingenuity.com) durchgeführt. Differenziell exprimierte Gene wurden molekularen, klinischen und toxikologischen Funktionen zugeordnet unter Verwendung von IPA-*Tox*-Analysen und *Core Analyses*. Alle Zuordnungen mit einem p-Wert $\leq 0,01$ und einer involvierten Molekülzahl von ≥ 10 wurden als signifikant betrachtet.

2.2.3.7. Chromatin-Immunopräzipitation

Die Durchführung der Chromatin-Immunopräzipitation (ChIP)-Experimente erfolgte nach den Protokollen von Bryant und Ptashne, 2003 [121]. Die verwendeten Primer zur Quantifizierung mittels *real time*-PCR sind in Tabelle 2.3 und die verwendeten Antikörper in Kapitel 2.1.2.1 aufgelistet. Im Folgenden wird die Versuchsdurchführung der Experimente kurz erläutert (vergleiche Abbildung 2.1).

KELLY- und HEK293T Zellen wurden in einer 75 cm² Zellkulturflasche bis zum Erreichen einer Konfluenz von 90% (ca. $6,6 \cdot 10^6$ Zellen) mit einer 1%-igen Formaldehydlösung in PBS für 2 min, 4 min, 6 min, 7 min, 8 min 10 min oder 13 min bei 37 °C fixiert. Anschließend wurden die Zellen zweimal mit eiskaltem 1× PBS gewaschen, von der Zellkulturflasche gelöst und 5 min bei 660 g zentrifugiert. Das Pellet wurde in 0,6 ml

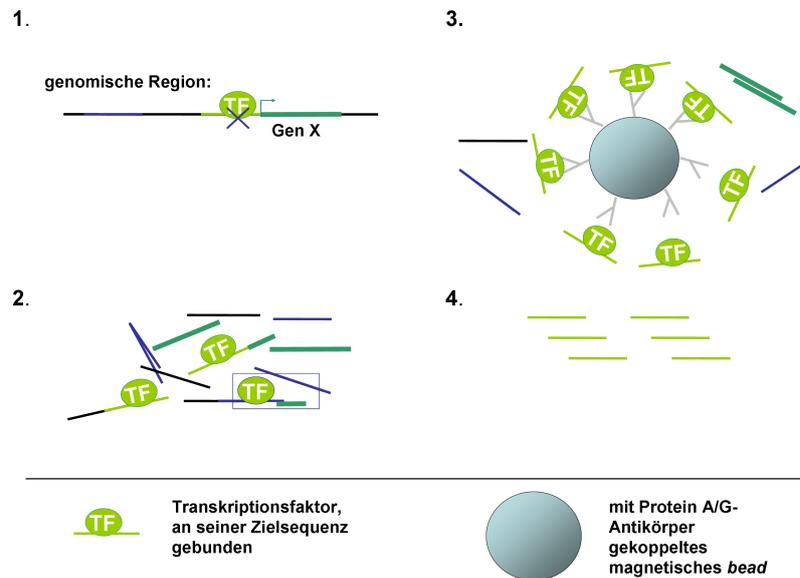


Abb. 2.1.: Prinzip der Chromatin-Immunopräzipitation. Die auf der DNA gebundenen Proteine werden fixiert (1.) und nach Zelllyse wird die DNA fragmentiert (2.). Durch spezifische Antikörper gegen den Ziel-Transkriptionsfaktor, die an einem magnetischen *bead* gekoppelt sind, wird die Ziel-DNA isoliert (3.). Im letzten Schritt wird der Transkriptionsfaktor enzymatisch abgebaut und die verbleibenden DNA-Fragmente werden gereinigt (4.). Zur weiteren Analyse wird die DNA mittels *real time*-PCR quantifiziert oder auf Promotorarrays hybridisiert.

(KELLY-Zellen) oder 1 ml (HEK293T-Zellen) Lyse-Puffer (siehe Kapitel 2.1.2) resuspendiert und bei -80°C weggefroren. Zur weiteren Aufarbeitung wurde das Lysat aufgetaut und für 20 min auf Eis belassen. Die DNA der aufgeschlossenen Zellen wurde durch Sonifikation fragmentiert. Für KELLY-Zellen wurde der Sonoplus HD 2070/ UW 2070 Sonifizierer mit einer MS 72 Sonotrode (Bandelin Electronic, Berlin, D.) verwendet. Die Sonifikation erfolgte unter folgenden Parametern: 1×10 s, *output control* = 100%; *cycle* = 0; 3×20 s, *output control* = 30%; *cycle* = 0, 1×10 s, *output control* 100%; *cycle* = 5. Für HEK293- und HEK293T-Zellen wurde der Sonifikator der Firma Labsonic U, Braun (Dissel, Melsungen, D.) mit folgenden Einstellungen verwendet: 5×20 s, *output control* = 160%; *cycle* = 0,9. Nach der Fragmentierung erfolgte eine 5-minütige Zentrifugation bei $3220 g$ und 4°C . Das Pellet wurde verworfen und der Überstand 1:1 mit Dilutionpuffer verdünnt. $25 \mu\text{l}$ wurden abgenommen und diente im weiteren als *input*, d. h. als Kontrolle ohne Antikörper-Einsatz. Zur Optimierung der Sonifikationsbedingungen wurde das Crosslinking der Proben direkt ohne Immunopräzipitation

revertiert und die DNA gereinigt (siehe unten). Für die Immunopräzipitation wurden magnetische *Dynabeads* der Firma Invitrogen verwendet. Die *beads* wurden mit Hilfe eines magnetischen *racks* der Firma Diagenode $2\times$ mit dem 3-fachen Volumen Dilutionpuffer gewaschen und in diesen mit dem Ausgangsvolumen an Dilutionpuffer wieder aufgenommen. Jeder Immunopräzipitationsansatz enthielt $10\ \mu\text{l}$ der gewaschenen *beads* mit $90\ \mu\text{l}$ Dilutionpuffer. Zugefügt wurden dann $3\ \mu\text{g}$ des jeweiligen Antikörpers (anti-PLZF; anti-RNA-Polymerase II und normal IgG, siehe Kapitel 2.1.2.1). Diese Ansätze wurden für mindestens 2 h in einem Überkopfschüttler bei $4\ ^\circ\text{C}$ inkubiert. Anschließend wurde der Überstand verworfen. Je Ansatz (*bead* mit gebundenem Antikörper) wurden $100\ \mu\text{l}$ der vorbereiteten fragmentierten DNA-Proben zugefügt. Die Immunopräzipitation erfolgte über Nacht in einem Überkopfschüttler bei $4\ ^\circ\text{C}$. Am folgenden Tag wurden die *beads* mit gebundenen Antikörpern und DNA in folgender Reihenfolge gewaschen: einmal mit $0,2\ \text{ml}$ TSE-150-Puffer, einmal mit $0,2\ \text{ml}$ TSE-500-Puffer, einmal mit $0,2\ \text{ml}$ LiCl-Puffer und zweimal mit $0,2\ \text{ml}$ TE-Puffer. Die Ansätze wurden je 5 min in einem Überkopfschüttler mit den einzelnen Puffern inkubiert. Die auf der DNA fixierten Proteine wurden je Ansatz mit $0,5\ \mu\text{l}$ Proteinase K (Stocklösung: $20\ \text{mg/ml}$) in $4\ \mu\text{l}$ NaCl (Stocklösung: $5\ \text{M}$) und $1\ \mu\text{l}$ Tris (Stocklösung: $1\ \text{M}$, $\text{pH}=7,5$) für 1 h bei $48\ ^\circ\text{C}$ abgebaut und anschließend bei $65\ ^\circ\text{C}$ über Nacht inkubiert. Anschließend erfolgte die Reinigung der DNA unter Verwendung des *QIAquick PCR Purification Kit*. Die Quantifizierung erfolgte mittels *real time*-PCR (siehe Kapitel 2.2.3.3). *Input* (= *total*)-DNA diente als Positivkontrolle.

Berechnung der relativen Rekrutierung von Proteinen an die Promotor-DNA

Die Berechnung der relativen Rekrutierung der Proteine an den jeweils untersuchten DNA-Bereich erfolgte über die Gleichung 2.5 [3]. Die Rekrutierung der Zielproteine wird gegen die Rekrutierung einer konstitutiven Komponente des Transkriptionsapparates wie beispielsweise der RNA-Polymerase II oder des TATA *box binding*-Proteins an den transkriptionellen Startpunkt des humanen β -Aktin-Promotors oder GAPDH-

Promotors standardisiert.

$$X = \frac{2^{-[C_T \text{ [IP(Zielprotein), PCR(Zielgen)]} - C_T \text{ [input, PCR(Zielgen)]}]}{2^{-[C_T \text{ (RNA-Pol II), PCR(\beta-Aktin)]} - C_T \text{ [input, PCR(\beta-Aktin)]}}} \quad (2.5)$$

In dieser Gleichung ist $C_T \text{ [IP(Zielprotein), PCR(Zielgen)]}$ der C_T -Wert des immuno-präzipitierten Transkriptionsfaktors, $C_T \text{ [input, PCR(Zielgen)]}$ und $C_T \text{ [input, PCR(\beta-Aktin)]}$ die C_T -Werte der *input*-Kontrollen des jeweiligen Zielgens sowie des β -Aktin-Gens und $C_T \text{ [(RNA-Pol II), PCR(\beta-Aktin)]}$ der C_T -Wert des Ansatzes der immunopräzipitierten RNA-Polymerase II am β -Aktin-Promotor.

2.2.3.8. ChIP-*chip*-Experimente und Analyse

Verwendete Promotorarrays :

- *HD2 Promoter Tiling Array (human, C7291-00-02, HG18 Deluxe Promoter HX1)*: Promotor oder sogenannte *tiling*-Arrays. Mit 2.100.000 Sonden pro Array und einer Sondenlänge von 50-75 Oligonukleotiden werden die humanen Promotor-Regionen von 7250 bp stromaufwärts und 3250 bp stromabwärts der TSS abgedeckt.

Die Promotorarrays waren cDNA-Arrays, d.h. die zu untersuchende Probe und die Kontrollprobe, je mit unterschiedlichen fluoreszierenden Molekülen versehen, wurden auf einem Chip hybridisiert (Roche Nimblegen, Madison, USA).

Die angereicherten und gereinigten DNA-Fragmente nach der Chromatin-Immuno-präzipitation wurden mittels *Genomeplex Complete WGA Kit (WGA2)* nach dem Protokoll von O'Geen *et al.* amplifiziert [122] und anschließend erneut mit dem *Qiaquick PCR Purification Kit* gereinigt. Die Markierung der DNA mit Cy3 und Cy5 und die Hybridisierung auf HD2 Promoter *tiling arrays* (Roche Nimblegen) erfolgte durch ImaGenes GmbH, Berlin. Die Analyse und *peak*-Identifikation wurde ebenfalls von Nimblegen durchgeführt unter Verwendung des Nimblescan-Programmes (Roche Nimblegen). Die Sondensequenzen wurden anschließend mittels der *Genomatix Mining*

Station, dem derzeit aktuellen Human Genom (HG19), positioniert. 98,14% der genomischen Positionen dieser Sondensequenzen (2.086.011) konnten durch das *mapping* eindeutig (und teilweise neu) bestimmt und in 34.162 Regionen oder sogenannten Clustern eingruppiert werden. Unter Verwendung des NGS-Analyzer-Programmes (Genomatix) wurden Sondensequenzen, die in einem *peak* lagen, mittels eines *sliding window approach* mit mindestens drei Sonden pro 500 bp neu eingruppiert. Die resultierenden *cluster* wurden entsprechend der nächstliegenden Gene (bis zu 10 kb stromaufwärts und stromabwärts der angereicherten Regionen) annotiert. Überrepräsentationen von Transkriptionsfaktorbindungsstellen (konkrete *cis*-Elemente) wurden ebenfalls mit dem *RegionMiner*-Programm berechnet. Die ChIP-*chip*-Daten sind in der GEO-Datenbank (www.ncbi.nlm.nih.gov/geo/) unter der Zugangsnummer GSE39960 einsehbar.

2.2.4. Proteinbiochemische Methoden

2.2.4.1. Gesamtproteinisolierung aus humanen Zelllinien

Für die Gesamtproteinisolierung wurde nach Zellernte von HEK29T oder KELLY-Zellen das entsprechende Zellpellet in einem modifizierten RIPA-Puffer (siehe Kapitel 2.1.2) aufgenommen. Nach Inkubation für 30 min, wobei nach jeweils 10 min die Proben gemixt wurden, erfolgte eine Zentrifugation für 30 min bei 15700 *g* und 4 °C. Der Überstand wurde bei -20 °C gelagert und die Proteinkonzentration mittels Bradford-Reagenz (siehe Kapitel 2.2.4.4) gemessen.

2.2.4.2. Fraktionierte Proteinisolierung aus humanen Zelllinien

Die Methode der fraktionierten Proteinisolierung wurde zur Trennung von zytoplasmatischen und nuklearen Proteinen verwendet. Pro Isolierung wurden etwa 10^9 HEK293T- oder KELLY-Zellen (entspricht einer 175 cm² Zellkulturflasche) benötigt (siehe Abschnitt 2.2.2.1). Die Zusammensetzung der Puffer P1 und Puffer P2 ist in Abschnitt 2.1.2 beschrieben.

- Das Zellpellet wurde in 1,5 ml kaltem Puffer P1 resuspendiert und für 15 min auf Eis inkubiert.
- Anschließend wurde 56 μ l 10% NP-40 zu jeder Probe zugegeben, kurz gemischt und für 10 min bei 5000 g und 4 °C zentrifugiert.
- Der Überstand, der die zytosolischen Proteine enthielt, wurde abgenommen und bis zur Proteinbestimmung mittels Lowry-Assay (siehe Kapitel 2.2.4.4) bei -20 °C gelagert, während das Pellet nochmal mit 1 ml Puffer P1 gewaschen wurde.
- Der Überstand wurde entfernt und das Pellet mit 200 μ l Puffer P2 für 90 min im Überkopfschüttler bei 4 °C inkubiert.
- Im Anschluss wurden die Proben für 10 min bei 13000 g und 4 °C zentrifugiert, der Überstand abgenommen und erneut für 10 min bei 15700 g und 4 °C zentrifugiert.
- Der Überstand enthielt die nuklearen, löslichen Proteine und wurde bis zur Proteinbestimmung mittels Lowry-Assay (siehe Kapitel 2.2.4.4) bei -20 °C gelagert.

2.2.4.3. *Tandem affinity purification (TAP)*

Die *tandem affinity purification* (TAP) erfolgte nach dem Protokoll von Glöckner *et al.* [115]. Die TAP-Methode beruht auf der Isolierung von Zielproteinen und deren Interaktionspartnern unter nativen Bedingungen. Die Reinigung erfolgt in zwei Schritten mittels zwei Strep-tags II (S) und einem FLAG-tag (F) (die jeweils für Oktapeptide kodieren), die in Fusion mit dem Zielprotein exprimiert werden. Im ersten Schritt bindet das SF-Fusionsprotein über die Strep-tags an einer sogenannten *Strep-Tactin*-Matrix. Als Kompetitor für die Elution dient Desthiobiotin. Anschließend erfolgt die Bindung an eine anti-FLAG-Matrix und die Elution erfolgt durch Zugabe des FLAG-Peptids. Das Ziel dieser „Tandem“-Reinigung ist, durch viele Waschschrte während der Versuchsdurchführung, die Anzahl der potenziellen falsch-positiven Interaktionspartner des Zielproteins zu reduzieren.

In dieser Arbeit wurde das Protein PLZF C-terminal mit den SF-tags fusioniert und in HEK293T-Zellen exprimiert. Die Expression von PLZF-SF erfolgte transient für 48 h

(siehe Kapitel 2.2.2.1). Die PLZF-SF-exprimierenden Zellen wurden in vier Zellkulturschalen von je 15 cm² (Falcon, Becton Dickinson GmbH, Heidelberg, D.) kultiviert und nach Erreichen einer Konfluenz von 90% bis 100% (das entsprach 10⁸ Zellen pro Schale) geerntet. Hierfür wurden die Zellen mit kaltem PBS-Puffer gewaschen und anschließend mit einem Zellschaber von der Plattenoberfläche gelöst. Die Zellen wurden in PBS-Puffer aufgenommen und für 1 min bei 4 °C sowie 440 g zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen, das Zellpellet in 1 ml Lyse-Puffer pro 15 cm² Schale aufgenommen und für 15 min bei 4 °C inkubiert. Anschließend erfolgte eine Zentrifugation von 10 min bei 10.000 g und 4 °C.

Erste Reinigung:

- Der Überstand wurde mit 50 µl *Strep-Tactin superflow resin* (IBA) pro 15 cm² Zellkulturschale in einem Rotator bei 4 °C für 1 h inkubiert. Die *Strep-Tactin superflow*-Matrix wurde zuvor zweimal mit 100 µl (4-faches Matrixvolumen) TBS und einmal mit Lyse-Puffer gewaschen.
- Die Protein-Matrix-Suspension wurde nach der Inkubation für 30 s bei 7000 g und 4 °C zentrifugiert und der Überstand bis auf 500 µl verworfen.
- Das Pellet mit den verbliebenen 500 µl wurde in eine *microspin*-Säule transferiert und dreimal mit 500 µl Waschlösung gewaschen (je 5 s bei 100 g zentrifugiert).
- Die an die Matrix gebundenen Proteine wurden durch Zugabe von 500 µl Desthio-biotin-Elutionspuffer für 10 min bei 4 °C unter vorsichtigem manuellem Schütteln inkubiert und anschließend durch Zentrifugation für 10 min bei 2000 g und 4 °C eluiert.

Zweite Reinigung:

- Das Eluat wurde mit 25 µl anti-FLAG M2-Agarose pro 15 cm² Schale, welche zuvor dreimal mit 50 µl (4-faches Bettvolumen) TBS gewaschen wurde, für 1 h bei 4 °C in einem Rotator inkubiert.
- Anschließend wurde das Gemisch einmal mit 500 µl Wasch-Puffer und zweimal mit 500 µl TBS gewaschen.

- Die Zentrifugationsschritte erfolgten 5 s bei 100 *g*. Die Zielproteine und die Interaktionspartner wurden durch Zugabe von 4 Bettvolumen FLAG-Elution-Puffer für 10 min bei gelegentlichem Schütteln eluiert und in einem Eppendorf-Gefäß nach Zentrifugation (10 s, 2000 *g*) aufgefangen.

Die präzipitierten Proteine wurden mittels Western-Blotting analysiert oder in Amicon Ultra, Centrifugal Filter Units konzentriert, anschließend gelelektrophoretisch getrennt und mittels Massenspektrometrie (*nano liquid chromatography* mittels EASY nLC und Elektrospray-Ionisation-Ionenfallen-Massenspektrometer (LCQ Deca XP, Thermofischer Scientific GmbH, Berlin)) identifiziert (Oliver Klein, AG Klose, Berlin-Brandenburger Zentrum für Regenerative Therapien (BCRT)).

2.2.4.4. Proteinkonzentrationsbestimmung

Zur Bestimmung des Gesamtproteingehaltes wurden verschiedene Methoden benutzt, da die unterschiedlichen Detergenzien, die während der Aufarbeitung der Zellen verwendet wurden, störende Einflüsse auf die Methoden zeigten. Die isolierten Proteine aus *E. coli* wurden mit Hilfe des BCA-Assays quantifiziert. Die Proteinfractionen aus der fraktionierten Proteinisolierung wurden mit Hilfe des Lowry-Assays, und die Proteinlösungen in RIPA-Puffer mit dem Bradford-Reagenz vermessen.

BCA-Assay

Der Gesamtproteingehalt wurde mittels BCA Protein Assay Reagenz Kit nach den Angaben des Herstellers quantifiziert. Alle Proben wurden doppelt vermessen und der Mittelwert als Gesamtproteinkonzentration der Untersuchung zugrunde gelegt. Zur Berechnung der Proteinkonzentrationen in den Proben wurde eine Standardreihe herangezogen. Vom Proteinstandard BSA wurden sieben Verdünnungen im Bereich von 0,125 - 2,0 mg/ml hergestellt.

Proteinbestimmung nach Lowry

Der *DC Protein Assay* nach der Methode von Lowry wurde nach Angaben des Herstellers durchgeführt. Die Proteinkonzentrationen der Proben wurden mit Hilfe einer BSA-Proteinstandardreihe bestimmt. Vom Proteinstandard BSA wurden für jeden Extraktionspuffer (P1 und P2, siehe fraktionierte Proteinisolierung) sieben Verdünnungen im Bereich von 0,125 - 2,0 mg/ml hergestellt.

Proteinbestimmung nach Bradford

Der Bradford-Test wurde nach Angaben des Herstellers durchgeführt. Zur Auswertung der Proteinkonzentration wurde die Absorption bei 590 nm und 450 nm gemessen und anschließend der Quotient gebildet (590 nm / 450 nm). Die Proteinkonzentration wurde auf der Basis einer ermittelten BSA-Eichgerade (siehe oben) berechnet.

2.2.4.5. SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE)

Herstellung von SDS-Gelen

Bei der SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese werden Proteine unter denaturierenden und reduzierenden Bedingungen entsprechend ihrem Molekulargewicht aufgetrennt. Es wurde mit diskontinuierlichen Glycin-SDS-Polyacrylamidgelen nach Laemmli gearbeitet [123]. Die verwendeten Acrylamidkonzentrationen lagen bei 12%, 10% bzw. 7,5%. Die Maße der Gele betragen $50 \times 80 \times 1,5$ mm (bzw. $0,75$ mm). Die Ansätze für jeweils zwei SDS-Trenngele und dem entsprechenden Sammelgel sind in Tabelle 2.7 aufgelistet.

Tab. 2.7.: Zusammensetzung der verwendeten SDS-Polyacrylamidgele. Aufgelistet sind die Substanzen für je zwei 12%-ige, 10%-ige oder 7,5%-ige Mini-Trenngele mit einem Gesamtvolumen von 15 ml sowie das kleinere, großporige Sammelgel mit 4% Acrylamid und einem Gesamtvolumen von 10 ml.

Substanz	7,5%	10%	12%	4% (Sammelgel)
ddH ₂ O	6,8 ml	6,1 ml	5 ml	6,1 ml
0,5 M Tris HCl, pH 6,8	-	-	-	2,5 ml
1,5 M Tris HCl, pH 8,8	3,75 ml	3,75 ml	3,75 ml	-
10% SDS Stammlsg.	150 μ l	150 μ l	150 μ l	100 μ l
Acrylamid (30%)	3,75 ml	5 ml	6 ml	1,3 ml
10% Ammoniumsulfat	75 μ l	75 μ l	75 μ l	100 μ l
TEMED	7,5 μ l	7,5 μ l	7,5 μ l	12 μ l

Nach dem Auspolymerisieren des Trenngels (ca. 30 min) wurde das Sammelgel gegossen und bis zum Auftragen der Proben kühl gelagert.

Vorbereitung der Proben und Elektrophorese

Die Proteinproben wurden mit 6 \times SDS-Ladepuffer versetzt und für 5 min bei 95 °C denaturiert. Als Größenstandard diente der *PageRuler Prestained*-Proteinmarker mit Molekülgrößen von ca. 10 bis ca. 250 kDa. Die Elektrophorese erfolgte bei einer angelegten Spannung von 100 V bis 180 V und maximaler Stromstärke (75 mA).

Coomassie-Blau-Färbung

Die Proteindetektion erfolgte durch Bindung des Coomassie-Farbstoffs im sauren Milieu an die basischen Gruppen der Aminosäuren Arginin, Histidin und Lysin. Dazu wurde das Gel direkt nach der Elektrophorese für 30 min in Färbelösung (siehe Kapitel 2.1.2) geschwenkt. Die Proteine wurden dabei gleichzeitig fixiert und angefärbt. Das Entfärben erfolgte anschließend mit Entfärbelösung.

2.2.4.6. Western Blotting

Der Transfer der Proteine auf eine Polyviniliden-Difluorid-Membran (PVDF) erfolgte mittels Tankblotting nach Bittner et al. [124] in einer Mini Trans-Blot-Apparatur (Biorad) und wurde wie folgt ausgeführt:

- Die PVDF-Membran (Hybond-P Blotting-Membran, (GE Healthcare)) wurde aufgrund ihrer Hydrophobizität für 10 - 15 s mit 100% Methanol benetzt und anschließend 10 min in Transferpuffer äquilibriert.
- Die Blotting-Apparatur wurde folgendermaßen aufgebaut (siehe Abbildung 2.2):

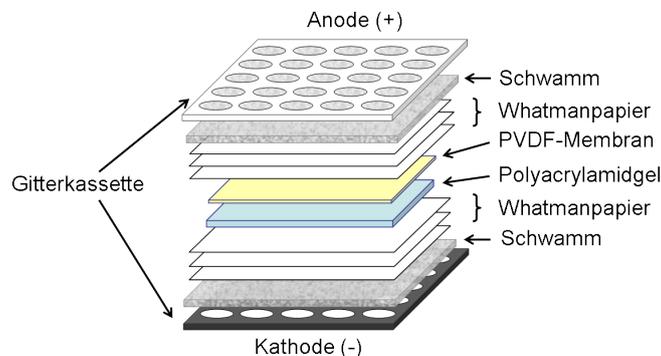


Abb. 2.2.: Schematische Darstellung des Aufbaus einer Gitterkassette für den elektrophoretischen Transfer aufgetrennter Proteine auf eine Trägermembran mittels Tankblotting.

- Die Proteine wurden unter Kühlung bei 250 mA/h auf die PVDF-Membran transferiert, und anschließend wurde die Membran für 5 min in TBS gewaschen.

Immunodetektion von Proteinen

Der immunologische Nachweis von speziellen Proteinen erfolgte durch einen Primärantikörper, der wiederum von einem an *horseradish* Peroxidase (HRP) konjugierten Sekundärantikörper erkannt wurde. Das Substrat für die an den Sekundärantikörper gekoppelten Peroxidase ist Luminol, welches durch Oxidation eine Chemielumineszenz auslöst und die über Auflegen und Entwickeln eines Films (Hyperfilm ECL, GE Healthcare) nachgewiesen werden kann.

Durchführung:

- Die PVDF-Membran wurde zur Absättigung unspezifischer Bindungsstellen für die Antikörper ü.N. bei 4 °C oder 1 h bei RT in Blockierlösung (7% Milchpulver in TBST) geschwenkt.
- Nach Entfernen der Blockierlösung wurden die Antikörper in 2% Milchpulver in TBST unter Schwenken ü.N. bei 4 °C auf der Membran belassen.
- Nach der Inkubation mit dem primären Antikörper wurde die Membran 3× 10 min mit TBST gewaschen; anschließend erfolgte ein erneutes Blockieren der Membran mit 5% Milchpulver in TBST.
- Nach Entfernen der Blockierlösung wurde die Membran, wie oben beschrieben, mit dem sekundären Antikörper inkubiert.
- Nach Ablauf der Inkubation wurden die Waschschrte wiederholt.

Immunodetektion mittels *enhanced chemiluminescence* (ECL):

- Die Membran wurde in TBST-Puffer aufbewahrt.
- Die Substratlösungen A und B (ECL Western-Blotting Detektion Reagenzien, siehe Kapitel 2.1.2) wurden im gleichen Verhältnis gemischt und auf der Membran verteilt.
- Nach einminütiger Inkubation wurde der Überschuss der Substratlösung entfernt und die Membran gegen einen Hyperfilm ECL Chemilumineszenz-Film (GE Healthcare, München, D) exponiert.

Zur Untersuchung von weiteren Proteinen wurden die auf der Membran vorhandenen Antikörper entfernt. Die Membran wurde dreimal für 5 min mit 1× TBS-T gewaschen. Anschließend wurden die Membranen in 15 ml *Restore Western Blot Stripping-Lösung* (Thermo Scientific) für 30 bis 60 min bei Raumtemperatur inkubiert und danach 3× 5 min in 1× TBS-T gewaschen. Nach den Waschschrten wurde die Membran für 1 h in 1× TBS-T mit 5% Milchpulver geblockt und, wie zuvor beschrieben, mit Primär- und Sekundärantikörpern inkubiert.

3. Ergebnisse

3.1. Genomweite Transkriptomanalysen zur Analyse des (Pro-)Reninrezeptors

3.1.1. Transkriptomanalyse von KELLY-Zellen nach Suppression des (P)RR mittels siRNA

Zur Charakterisierung des Transkriptionsprofils *downstream* des (Pro-)reninrezeptors wurde die Expression des Rezeptors durch *small interference* RNA (siRNA) in KELLY-Zellen supprimiert. Der *knockdown* des Rezeptors auf mRNA-Ebene erreichte ca. 10% bis 30% und auf Proteinebene ca. 40% (siehe Abbildung 3.1).

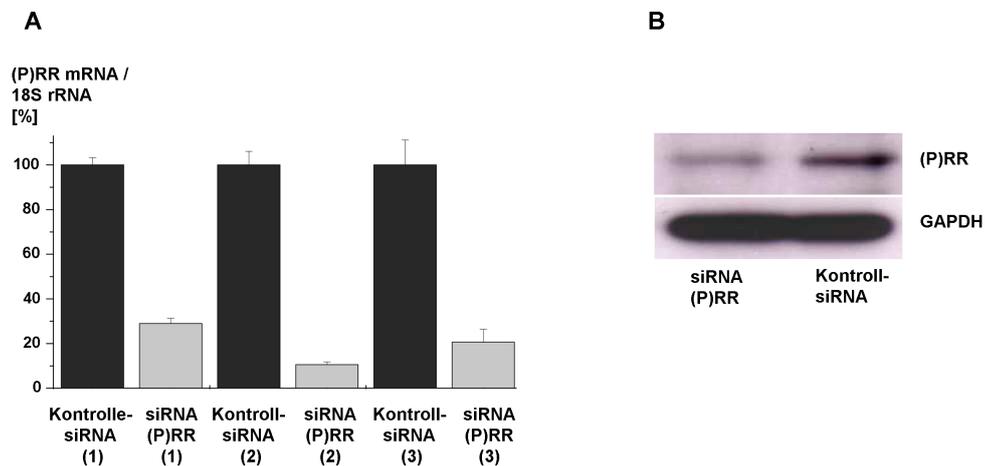


Abb. 3.1.: Bestätigung der siRNA-Effizienz zur Suppression des (P)RR in KELLY-Zellen. A. Expressionsanalyse der (P)RR-mRNA nach Einsatz von siRNA gegen den Rezeptor (graue Balken) beziehungsweise nach Einsatz von Kontroll-siRNA (schwarze Balken) von drei Ansätzen. Die Expression der mRNA wurde mit Hilfe der *real time*-PCR gegen das *housekeeping*-Gen 18S rRNA quantifiziert und auf die Kontrolle normalisiert. B. Analyse der (P)RR-Proteinexpression mittels Western-Blotting nach Inhibierung der (P)RR-Expression mittels siRNA (s. o.) unter Verwendung der anti-(P)RR- und anti-GAPDH-Antikörper. Abbildung aus Zaade *et al.* [125].

Die differenzielle Genexpression zwischen der experimentellen Bedingung, siRNA gegen (P)RR, und der Kontrollbedingung, Transfektion mit Kontroll-siRNA, wurde mittels *Human Exon 1.0 ST Arrays* bestimmt. Die Analyse der erhaltenen Datensätze dieses Mikroarrays (im Folgenden mit Ma(si(P)RR) abgekürzt (siehe Tabelle 2.6)) ergab 1652 Gene mit einem signifikant veränderten mRNA-Spiegel bei einer Falsch-Positiv-Rate (FPR) von 2%. Die zehn quantitativ am stärksten differenziell regulierten Transkripte sind in Tabelle 3.1 gezeigt. 1519 Gene zeigten einen $\geq 1,5$ -fach erhöhten und 133 einen $\leq 0,67$ -fach verringerten mRNA-Spiegel relativ zur Kontrollprobe. Unter letzterem befand sich der (P)RR (ATP6AP2) mit einer 0,33-fach veränderten mRNA-Konzentration. Niedrigere mRNA-Spiegel konnten für das *corticotropin releasing hormone* (CRH) und den Adenosin A2a-Rezeptor (ADORA2A) mit *fold change*-Werten von 0,30 und 0,31 detektiert werden. Einige Gene, die bereits in der Literatur im Zusammenhang mit der (P)RR-Expression beschrieben wurden, zeigten eine verstärkte Expression unter Suppression des (P)RR, wie z.B. die Matrix-Metalloproteinase 2 (MMP-2), Ceruloplasmin (CP), NADPH Oxidase 4 (NOX-4), Fibronectin (FN1) und verschiedene Collagen-Typen (siehe Tabelle 3.1).

Tab. 3.1.: Transkriptomanalyse von KELLY-Zellen nach Suppression des (P)RR mittels siRNA (Ma(si(P)RR)). Darstellung der zehn Gene mit den höchsten und niedrigsten *fold change*-Werten relativ zur Kontrolle. Hypothetische und funktionell uncharakterisierte Gene sind nicht aufgelistet. Das Gen, welches den (P)RR (ATP6AP2) kodiert, ist dunkelgrau hinterlegt, weitere Gene, die bereits in Zusammenhang mit dem (P)RR publiziert wurden, sind hellgrau hinterlegt.

Gen ID	Gen-symbol	Beschreibung	fold change MA(si(P)RR)
4199	ME1	<i>malic enzyme 1, NADP(+)-dependent, cytosolic</i>	3,63
10026	PIGK	<i>phosphatidylinositol glycan anchor biosynthesis, class K</i>	2,89
9818	NUPL1	<i>nucleoporin like 1</i>	2,71
116969	ART5	<i>ADP-ribosyltransferase 5</i>	2,57
81616	ACSBG2	<i>acyl-CoA synthetase bubblegum family member 2</i>	2,54
3400	ID4	<i>inhibitor of DNA binding 4, dominant negative helix-loop-helix protein</i>	2,46
57580	PREX1	<i>phosphatidylinositol-3,4,5-trisphosphate-dependent Rac exchange factor 1</i>	2,46
7409	VAV1	<i>vav 1 guanine nucleotide exchange factor</i>	2,45
79786	KLHL36	<i>kelch-like 36 (Drosophila)</i>	2,43
10140	TOB1	<i>transducer of ERBB2, 1</i>	2,43
6446	SGK1	<i>serum/glucocorticoid regulated kinase 1</i>	2,39 [126]
10769	PLK2	<i>polo-like kinase 2</i>	2,26 [126]
5168	ENPP2	<i>ectonucleotide pyrophosphatase/phosphodiesterase 2</i>	1,89 [25]
6659	SOX4	<i>SRY (sex determining region Y)-box 4</i>	1,89 [126]
6498	SKIL	<i>SKI-like oncogene</i>	1,87 [126]
9771	RAPGEF5	<i>Rap guanine nucleotide exchange factor (GEF) 5</i>	1,78 [126]
1285	COL4A3	<i>collagen, type IV, alpha 3 (Goodpasture antigen)</i>	1,77 [127]
4313	MMP2	<i>matrix metalloproteinase 2 (gelatinase A, 72kDa gelatinase, 72kDa type IV collagenase)</i>	1,77 [127]
50507	NOX4	<i>NADPH oxidase 4</i>	1,74 [128]
1356	CP	<i>ceruloplasmin (ferroxidase)</i>	1,74 [25]
4092	SMAD7	<i>SMAD family member 7</i>	1,71 [126]
2335	FN1	<i>fibronectin 1</i>	1,65 [25]
1286	COL4A4	<i>collagen, type IV, alpha 4</i>	1,64 [127]
1392	CRH	<i>corticotropin releasing hormone</i>	0,30
135	ADORA2A	<i>adenosine A2a receptor</i>	0,32
10159	ATP6AP2	<i>ATPase, H⁺ transporting, lysosomal accessory protein 2</i>	0,33
9791	PTDSS1	<i>phosphatidylserine synthase 1</i>	0,34
5230	PGK1	<i>phosphoglycerate kinase 1</i>	0,34
10007	GNPDA1	<i>glucosamine-6-phosphate deaminase 1</i>	0,35
9607	CARTPT	<i>CART prepropeptide</i>	0,36
729041	LOC729041	<i>fatty-acid amide hydrolase 1-like</i>	0,36
83643	CCDC3	<i>coiled-coil domain containing 3</i>	0,37
1389	CREBL2	<i>cAMP responsive element binding protein-like 2</i>	0,38

Alle Gene mit einem erhöhten mRNA-Spiegel und alle Gene mit einem verringerten mRNA-Spiegel wurden unter Verwendung des Programmes DAVID in *gene ontology*- (GO-)Kategorien eingeordnet. Diese funktionelle Analyse der differenziell exprimierten Gene ergab eine signifikante Überrepräsentation von Genen, die in die Signalweitergabe involviert sind (z.B. *enzyme linked receptor protein signaling pathway*) oder die bei der Entwicklung bzw. Morphogenese eine Rolle spielen (z.B. *cell morphogenesis* und *blood vessel development*, vergleiche Tabelle 3.2). Die Zuordnung der Gene zu bekannten molekularen Netzwerken der KEGG *pathway*-Datenbank zeigte, dass die meisten veränderten Gene im Bereich der Signaltransduktion angesiedelt waren, wie z.B. *ECM-receptor interaction*, oder *MAPK signaling pathway* (siehe Tabelle 3.3). Weitere Analysen bezüglich der Zuordnung zu molekularen, klinischen oder toxikologischen Funktionen unter Verwendung des IPA-Programmes zeigten, dass u. a. 25% der betreffenden Gene mit Tumorgenese, 23% mit Diabetes mellitus und 17% mit Gewebeentwicklung assoziiert waren. Die Resultate der Analyse sind in Abbildung 3.4 dargestellt, zusammengefasst mit den Ergebnissen der noch folgenden Mikroarray-Experimente.

Tab. 3.2.: Funktionelle Analyse der signifikant differenziell exprimierten Gene in WT-KELLY-Zellen nach Suppression von (P)RR (ATP6AP2) unter Verwendung des DAVID-Programmes. Dargestellt sind jeweils die zehn signifikanten Terme mit den höchsten p-Werten der GO-Kategorie Biologischer Prozess (Ebene 5) mit Angabe des Signifikanzniveaus und der Anzahl (n) der involvierten Gene.

ID	Biologischer Prozess	n	p-Wert
GO:0007167	<i>enzyme linked receptor protein signaling pathway</i>	65	1,00E-09
GO:0000902	<i>cell morphogenesis</i>	53	7,21E-05
GO:0051347	<i>positive regulation of transferase activity</i>	39	1,25E-04
GO:0031098	<i>stress-activated protein kinase signaling pathway</i>	16	1,93E-04
GO:0001568	<i>blood vessel development</i>	39	1,94E-04
GO:0007229	<i>integrin-mediated signaling pathway</i>	17	1,99E-04
GO:0001944	<i>vasculature development</i>	39	3,19E-04
GO:0007254	<i>JNK cascade</i>	15	3,25E-04
GO:0048858	<i>cell projection morphogenesis</i>	38	4,00E-04
GO:0030334	<i>regulation of cell migration</i>	29	4,45E-04

Tab. 3.3.: Zuordnung der differenziell exprimierten Gene aus Ma(si(P)RR) zu KEGG-Netzwerken unter Verwendung des DAVID-Programmes und der Angabe der Anzahl (n) der involvierten Gene.

ID	KEGG-pathway	n	p-Wert
hsa04510	<i>focal adhesion</i>	41	1,59E-08
hsa04512	<i>ECM-receptor interaction</i>	20	1,63E-05
hsa04070	<i>phosphatidylinositol signaling system</i>	16	4,59E-04
hsa04010	<i>MAPK signaling pathway</i>	37	6,81E-04
hsa02010	<i>ABC transporters</i>	11	1,64E-03
hsa05414	<i>dilated cardiomyopathy</i>	17	1,72E-03
hsa04020	<i>calcium signaling pathway</i>	26	2,18E-03
hsa04930	<i>type II diabetes mellitus</i>	11	2,77E-03
hsa04912	<i>GnRH signaling pathway</i>	17	3,37E-03
hsa04662	<i>B cell receptor signaling pathway</i>	14	4,69E-03
hsa05200	<i>pathways in cancer</i>	39	7,55E-03

3.1.2. Transkriptomanalyse von KELLY-Zellen unter Bafilomycinbehandlung

Zur Ermittlung der optimalen Konzentration von Bafilomycin zur Stimulierung der KELLY-Zellen für die folgenden Mikroarray-Analysen wurden in Vorversuchen die Messdaten der Zellproliferation sowie der Gesamtprotein- und ATP-Gehalt relativ zur DMSO-Kontrolle zugrunde gelegt. Experimente zur Bestimmung der Zellproliferation mittels BrdU oder XTT unter Bafilomycin für 48 h zeigten bis zu einer Konzentration von 1 nM keinen bzw. einen geringen Einfluss auf die Proliferation, während der ATP-Gehalt und die Gesamtproteinkonzentration bereits abnahmen. Bei höheren Bafilomycinkonzentrationen bis 1 μ M konnte keine Proliferation mehr festgestellt werden und der Gesamtprotein- und ATP-Gehalt hatte stark abgenommen. Für die folgenden Mikroarray-Experimente wurde somit eine Konzentration von 1 nM für 48 h gewählt, da ein bereits minimaler Einfluss von Bafilomycin auf die Zellen zu beobachten war und starke antiproliferative Effekte, die die Analyse des Transkriptionsprofils stören würden, noch nicht festgestellt werden konnten.

Tab. 3.4.: IPA-Analyse der Mikroarray-Daten der Experimente Ma(si(P)RR), Ma(Bafi), Ma(PLZF; H, K) und Ma(Geni). Aufgelistet sind die zugeordneten IPA-Kategorien mit den entsprechenden p-Werten, die Anzahl der involvierten Moleküle (n) sowie deren prozentualer Anteil relativ zum Eingangsdatensatz.

Funktion / Annotation	Ma(si(P)RR); Input: 1652			Ma(bafi); Input: 1788			Ma(PLZF; H, K); Input: 541			Ma(geni); Input: 636		
	p-Wert	n	[%]	p-Wert	n	[%]	p-Wert	n	[%]	p-Wert	n	[%]
Tumorgenese	7,81E-07	420	25	9,92E-03	397	22	6,66E-05	135	25	--	--	--
Gastrointestinale Karzinome	6,17E-05	122	7	1,73E-04	124	7	2,64E-04	44	8	--	--	--
kolorektaler Krebs	6,82E-05	110	7	3,36E-03	104	6	7,24E-05	42	8	--	--	--
Brustkrebs	8,95E-03	101	6	--	--	--	--	--	--	--	--	--
Karzinome im Kopf-/Halsbereich	3,34E-05	81	5	--	--	--	--	--	--	--	--	--
Prostatakarzinom	1,55E-03	72	4	--	--	--	2,21E-04	30	6	--	--	--
ZNS-Tumore	5,34E-06	46	3	--	--	--	--	--	--	--	--	--
Melanom	2,22E-03	42	3	--	--	--	5,52E-03	16	3	--	--	--
nicht kleinzelliges Lungenkarzinom	2,34E-03	40	2	--	--	--	--	--	--	--	--	--
Gliom	5,48E-05	31	2	--	--	--	--	--	--	--	--	--
Gallengangskarzinom	9,03E-03	16	1	--	--	--	--	--	--	--	--	--
Non-Hodgkin's Krankheit	--	--	--	6,30E-04	43	2	--	--	--	--	--	--
Lymphom	--	--	--	6,13E-03	53	3	--	--	--	--	--	--
chronische B-cell Leukämie	--	--	--	9,57E-03	19	1	--	--	--	--	--	--
diffuses kleinzelliges Lymphom	--	--	--	3,31E-03	10	1	--	--	--	--	--	--
Gebärmutterkarzinom	--	--	--	--	--	--	2,16E-04	14	3	--	--	--
Diabetes mellitus	2,72E-35	381	23	4,83E-04	264	15	5,50E-07	99	18	6,68E-03	93	15
Gewebeentwicklung	1,00E-07	275	17	4,72E-03	250	14	1,35E-14	120	22	1,24E-03	96	15
Entwicklung von Bindegewebe	3,77E-04	81	5	--	--	--	--	--	--	3,60E-03	32	5
Vaskulogenese	2,19E-06	77	5	--	--	--	1,33E-06	33	6	2,13E-03	28	4
Knochenentwicklung	1,71E-04	74	4	--	--	--	4,68E-03	25	5	--	--	--
Kardiogenese	1,85E-03	38	2	--	--	--	3,70E-03	15	3	--	--	--
Nierenentwicklung	1,30E-04	31	2	--	--	--	--	--	--	--	--	--
Hautentwicklung	--	--	--	--	--	--	4,15E-03	13	2	--	--	--
Hirnentwicklung	5,25E-04	49	3	--	--	--	1,01E-06	26	5	--	--	--
Entwicklung des Vorderhirns	--	--	--	--	--	--	3,88E-04	12	2	--	--	--
Atherosklerose	1,61E-30	238	14	2,70E-04	154	9	9,25E-08	65	12	5,61E-04	60	9
koronare Gefäßerkrankung	1,88E-26	212	13	1,10E-04	143	8	1,30E-07	60	11	1,78E-03	53	8
rheumatoide Arthritis	1,24E-13	222	13	--	--	--	4,16E-05	66	12	4,86E-06	79	12
chronisch-entzündliche Darmerkrankung	8,76E-23	205	12	9,21E-04	139	8	5,14E-06	56	10	4,06E-03	52	8
affektive Psychosen	3,04E-13	178	11	7,16E-04	141	8	3,23E-07	60	11	3,11E-03	53	8
bipolare Störung	1,09E-14	166	10	1,93E-03	123	7	2,73E-07	55	10	1,58E-03	49	8
Bluthochdruck	4,72E-15	165	10	7,00E-03	117	7	7,95E-05	47	9	--	--	--
Morbus Alzheimer	1,23E-06	122	7	--	--	--	1,92E-05	45	8	2,76E-03	43	7
HIV-Infektion	6,24E-04	115	7	--	--	--	--	--	--	--	--	--
Morbus Parkinson	4,39E-05	82	5	--	--	--	7,21E-03	26	5	--	--	--
amyotrophische laterale Sklerose	2,21E-05	79	5	--	--	--	1,02E-05	33	6	--	--	--
Schizophrenie	1,58E-03	69	4	--	--	--	1,04E-03	27	5	--	--	--
Endometriose	3,18E-04	58	4	--	--	--	2,75E-03	21	4	--	--	--
Aktivierung von MAP-Kinase-Kaskaden	8,68E-05	27	2	--	--	--	--	--	--	--	--	--
dilataive Kardiomyopathie	--	--	--	3,47E-04	18	1	--	--	--	--	--	--
Hämatopoese	--	--	--	--	--	--	--	--	--	3,11E-05	43	7
multiple Sklerose	--	--	--	--	--	--	3,16E-03	13	2	--	--	--
Psoriasis	--	--	--	--	--	--	5,81E-03	26	5	--	--	--

Tab. 3.5.: Transkriptomanalyse von KELLY-Zellen nach Inkubation mit Bafilomycin für 48 h (Ma(Bafi)). Dargestellt sind die zehn Gene mit den höchsten und niedrigsten *fold change*-Werten relativ zur DMSO-Kontrolle. Hypothetische und funktionell uncharakterisierte Gene sind nicht aufgelistet. Die Gene, die bereits im Zusammenhang mit Bafilomycin beschrieben wurden, sind hellgrau hinterlegt.

Gen ID	Gensymbol	Beschreibung	<i>fold change</i> Ma(Bafi)
85028	SNHG12	<i>small nucleolar RNA host gene 12 (non-protein coding)</i>	2,67
692073	SNORA16A	<i>small nucleolar RNA, H/ACA box 16A</i>	2,66
6284	S100A13	<i>S100 calcium binding protein A13</i>	2,41
9512	PMPCB	<i>peptidase (mitochondrial processing) beta</i>	2,31
134266	GRPEL2	<i>GrpE-like 2, mitochondrial (E. coli)</i>	2,24
26003	GORASP2	<i>golgi reassembly stacking protein 2, 55kDa</i>	2,21
55839	CENPN	<i>centromere protein N</i>	2,20
79714	CCDC51	<i>coiled-coil domain containing 51</i>	2,18
10009	ZBTB33	<i>zinc finger and BTB domain containing 33</i>	2,17
5716	PSMD10	<i>proteasome (prosome, macropain) 26S subunit, non-ATPase, 10</i>	2,16
3920	LAMP2	<i>lysosomal-associated membrane protein 2</i>	1,77 [62, 129]
677813	SNORA30	<i>small nucleolar RNA, H/ACA box 30</i>	0,38
1616	DAXX	<i>death-domain associated protein</i>	0,39
594839	SNORA33	<i>small nucleolar RNA, H/ACA box 33</i>	0,40
1303	COL12A1	<i>collagen, type XII, alpha 1</i>	0,41
677775	SCARNA5	<i>small Cajal body-specific RNA 5</i>	0,41
692225	SNORD94	<i>small nucleolar RNA, C/D box 94</i>	0,42
116969	ART5	<i>ADP-ribosyltransferase 5</i>	0,43
54487	DGCR8	<i>DiGeorge syndrome critical region gene 8</i>	0,44
7634	ZNF80	<i>zinc finger protein 80</i>	0,45
10652	YKT6	<i>YKT6 v-SNARE homolog (S. cerevisiae)</i>	0,45

Nach Behandlung der Zellen mit Bafilomycin bzw. DMSO als Kontrolle wurde die differenzielle Genexpression bestimmt. Im Folgenden werden die erhaltenen Datensätze aus diesem Mikroarray-Experiment mit Ma(Bafi) abgekürzt.

Bei einer FPR von 0,5% als Grenzwert für die Signifikanz zeigten insgesamt 1788 Gene einen $\geq 1,5$ -fach oder einen $\leq 0,67$ -fach veränderten mRNA-Gehalt, wobei 1364 Gene einen signifikant erhöhten und 424 Gene einen signifikant verringerten mRNA-Spiegel im Vergleich zur DMSO-Kontrolle aufwiesen. Tabelle 3.5 zeigt die zehn quantitativ am stärksten differenziell regulierten Transkripte.

Tab. 3.6.: Funktionelle Analyse der signifikant differenziell exprimierten Gene in WT-KELLY-Zellen nach Bafilomycin A1-Behandlung für 48 h. Dargestellt sind jeweils die zehn signifikanten Terme mit den höchsten p-Werten der GO-Kategorie Biologischer Prozess (Ebene 4) mit Angabe der Anzahl (n) der involvierten Gene.

ID	Biologischer Prozess	n	p-Wert
GO:0015031	<i>protein transport</i>	117	1,14E-08
GO:0045184	<i>establishment of protein localization</i>	117	1,92E-08
GO:0016192	<i>vesicle-mediated transport</i>	94	2,10E-08
GO:0006888	<i>ER to Golgi vesicle-mediated transport</i>	16	2,01E-06
GO:0046907	<i>intracellular transport</i>	96	2,69E-06
GO:0016197	<i>endosome transport</i>	16	1,51E-04
GO:0008344	<i>adult locomotory behavior</i>	15	2,42E-04
GO:0048193	<i>Golgi vesicle transport</i>	26	2,70E-04
GO:0051656	<i>establishment of organelle localization</i>	16	1,12E-03
GO:0007034	<i>vacuolar transport</i>	10	1,67E-03

Die funktionelle Analyse der Datensätze zeigte, dass durch die Inkubation mit Bafilomycin vor allem Gene beeinflusst wurden, die mit Transportprozessen assoziiert waren, z. B. Proteintransport oder vesikelvermittelter Transport (vgl. Tabelle 3.6). Als einziges Resultat für die Zuordnung zu KEGG-Signalwegen konnten 12 Gene mit einem p-Wert von 0,032 mit dem Term *long-term depression* in Zusammenhang gebracht werden. Die Netzwerk-Analyse bezüglich der Zuordnung zu Krankheitsbildern zeigte, dass 22% der betreffenden Gene mit Tumorgenese, 15% mit Diabetes mellitus und 14% mit Gewebeentwicklung assoziiert waren (siehe Tabelle 3.4).

3.1.3. Transkriptomvergleich von KELLY-Zellen nach Suppression des (P)RR und bafilomycinbehandelten KELLY-Zellen

Die M8-9-Domäne des (P)RR interagiert als akzessorische Untereinheit mit der V-ATPase [46]. Durch den Einsatz von siRNA gegen den (P)RR werden demzufolge auch die betreffenden V-ATPasen beeinflusst. Bafilomycin ist ein spezifischer Inhibitor von V-ATPasen. Um mögliche gemeinsam veränderte Gene unterhalb der V-ATPasen und dem (P)RR zu detektieren, wurden die Genlisten der durchgeführten Mikroar-

rays Ma(si(P)RR) und Ma(Bafi) miteinander verglichen. Insgesamt konnten 238 gemeinsame Gene identifiziert werden. Davon zeigten 124 Gene in beiden Mikroarray-Experimenten einen signifikant erhöhten mRNA-Spiegel und zwei einen signifikant verringerten mRNA-Spiegel. 112 Gene zeigten einen inversen mRNA-Spiegel, d. h., entweder hatten die Gene des einen Experiments einen erhöhten und die des anderen Experiments einen verringerten mRNA-Gehalt oder jeweils umgekehrt (vergleiche Abbildung 3.2). Da beide Interventionen zu einer Hemmung der V-ATPasen führten (entweder durch pharmakologische Inhibierung oder durch Hemmung der akzessorischen Untereinheit) wurden nur die Gene betrachtet, die gleichsinnige differenzielle mRNA-Expressionen aufwiesen. Die beiden Gene mit einer jeweils signifikant verringerten mRNA-Konzentration waren *INS-IGF2 readthrough* (INS-IGF2 723961) und der *insulin-like growth factor 2* (somatomedin A, IGF2 3481). Die funktionelle Analyse der 124 Gene mit erhöhten mRNA-Spiegel zeigte eine Überrepräsentation von Genen, die mit Zellmorphogenese und Transportprozessen assoziiert waren (siehe Tabelle 3.7).

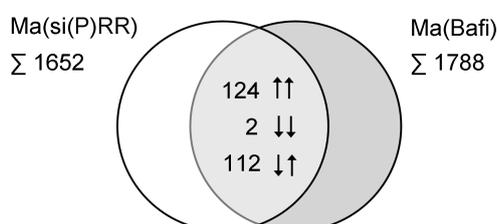


Abb. 3.2.: Grafische Darstellung der gemeinsamen und distinkten Gene mit signifikant veränderten mRNA-Spiegel in Ma(si(P)RR) und Ma(Bafi). Die in der Schnittmenge des Venn-Diagramms dargestellten Pfeile zeigen die Anzahl der gemeinsam induzierten Gene (↑↑), der gemeinsam reprimierten Gene (↓↓) und der invers regulierten Gene (↓↑).

Tab. 3.7.: Funktionelle Analyse der gleichsinnig differenziell exprimierten Gene aus $\text{Ma}(\text{si(P)RR}) \cap \text{Ma}(\text{Bafi})$ unter Verwendung des DAVID-Programmes. Dargestellt sind jeweils die zehn signifikanten Terme mit den höchsten p-Werten der GO-Kategorie Biologischer Prozess (Ebene 4) und der Angabe der Anzahl (n) der involvierten Gene.

ID	Biologischer Prozess	n	p-Wert
GO:0032989	<i>cellular component morphogenesis</i>	10	1,66E-03
GO:0016192	<i>vesicle-mediated transport</i>	11	6,29E-03
GO:0015031	<i>protein transport</i>	12	1,56E-02
GO:0045184	<i>establishment of protein localization</i>	12	1,66E-02
GO:0048468	<i>cell development</i>	10	3,35E-02
GO:0046907	<i>intracellular transport</i>	10	3,73E-02
GO:0007242	<i>intracellular signaling cascade</i>	15	4,89E-02

Tab. 3.8.: Darstellung von spezifischen Genen, welche den in Tabelle 3.7 genannten Transportprozessen zu Grunde liegen.

Gen ID	Gen-symbol	Beschreibung	fold change Ma(si(P)RR)	fold change Ma(Bafi)
10347	ABCA7	<i>ATP-binding cassette, sub-family A (ABC1), member 7</i>	0,79	0,68
10802	SEC24A	<i>SEC24 family, member A (S. cerevisiae)</i>	0,87	0,68
6653	SORL1	<i>sortilin-related receptor, L(DLR class) A repeats containing</i>	0,89	0,67
27445	PCLO	<i>piccolo (presynaptic cytomatrix protein)</i>	0,91	0,70
4065	LY75	<i>lymphocyte antigen 75</i>	0,79	0,81
134957	STXBP5	<i>syntaxin binding protein 5 (tomosyn)</i>	0,97	0,78
6814	STXBP3	<i>syntaxin binding protein 3</i>	0,93	0,66
4036	LRP2	<i>low density lipoprotein receptor-related protein 2</i>	0,81	0,59
1130	LYST	<i>lysosomal trafficking regulator</i>	0,87	0,80
81542	TMX1	<i>thioredoxin-related transmembrane protein 1</i>	1,06	1,05
10484	SEC23A	<i>Sec23 homolog A (S. cerevisiae)</i>	0,99	0,93
80144	FRAS1	<i>Fraser syndrome 1</i>	0,89	0,60
66008	TRAK2	<i>trafficking protein, kinesin binding 2</i>	1,01	0,66
84938	ATG4C	<i>ATG4 autophagy related 4 homolog C (S. cerevisiae)</i>	0,78	0,81
10651	MTX2	<i>metaxin 2</i>	0,98	0,63
4036	LRP2	<i>low density lipoprotein receptor-related protein 2</i>	0,81	0,59
80824	DUSP16	<i>dual specificity phosphatase 16</i>	0,88	0,71
7857	SCG2	<i>secretogranin II</i>	1,13	0,71
10651	MTX2	<i>metaxin 2</i>	0,98	0,63
4036	LRP2	<i>low density lipoprotein receptor-related protein 2</i>	0,81	0,59
596	BCL2	<i>B-cell CLL/lymphoma 2</i>	0,97	0,93

3.2. Genomweite Transkriptomanalyse zur Charakterisierung von PLZF

3.2.1. Transkriptomanalyse von PLZF-überexprimierenden HEK293T-Zellen

Zur Untersuchung des Einflusses von PLZF auf das Transkriptionsprofil wurde die DNA-Sequenz dieses Transkriptionsfaktors in den Expressionsvektor pCEP4 kloniert und in HEK293T-Zellen stabil-episomal transfiziert. Als Kontrolle dienten HEK293T-Zellen mit einem stabil transfizierten insertlosen Vektor. Die Messung der PLZF-mRNA-Expression zeigte eine 100 bis 1000-fache Überexpression von PLZF (siehe Abbildung 3.3). Eine verstärkte Proteinexpression von PLZF mittels Western Blotting konnte ebenfalls detektiert werden (siehe Abbildung 3.3). Mikroskopische Untersuchungen im Rahmen der Routine-Zellkultur zeigten keinen veränderten Phänotyp im Vergleich zur Kontrolle und auch keinen Unterschied im Wachstumsverhalten.

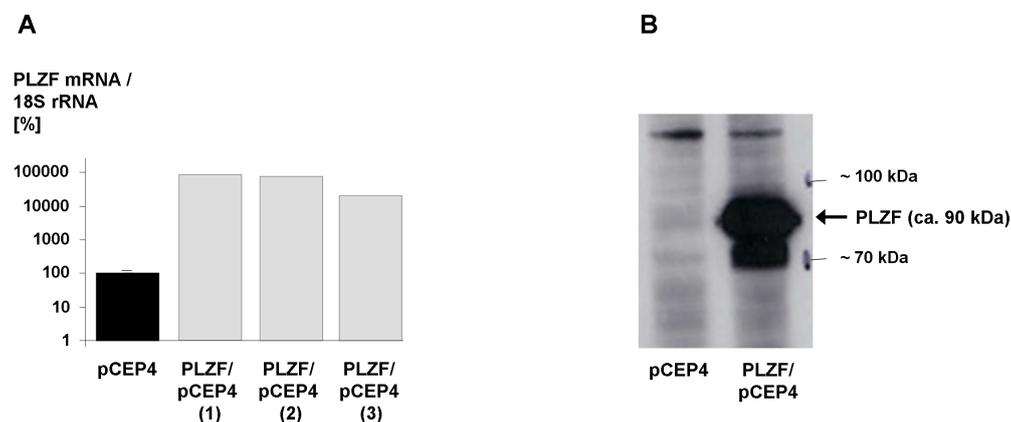


Abb. 3.3.: Expressionsanalyse von PLZF in HEK293T-Zellen. A. Die kodierende Sequenz von PLZF wurde in den Expressionsvektor pCEP4 kloniert und stabil in HEK293T-Zellen transfiziert (PLZF/pCEP4). Als Kontrolle diente der insertlose Vektor, der ebenfalls stabil-episomal transfiziert wurde (pCEP4). Die mRNA-Expression von PLZF wurde mit Hilfe der *real time*-PCR unter Standardisierung auf das *housekeeping*-Gen 18S rRNA quantifiziert und auf die Leervektor-Kontrolle normalisiert. Die relativen mRNA-Expressionen sind mit den jeweiligen Standardabweichungen dargestellt. B. Analyse der PLZF Proteinexpression mittels Western Blotting nach stabiler Transfektion (s. o.) unter Verwendung des anti-PLZF-Antikörpers. Abbildung aus Zaade *et al.* [125].

Zur Analyse des Transkriptionsprofils wurde die markierte cDNA auf *Human Gene 1.0 ST Arrays* hybridisiert. Die differenzielle Genexpression der PLZF-überexprimierenden Zellen und der entsprechenden Kontrolle, im Folgenden Ma(PLZF; H) abgekürzt (siehe 2.6), ergab 1632 Gene mit einem signifikant veränderten mRNA-Spiegel bei einer FPR von 1%. Davon zeigten 1278 einen erhöhten und 354 einen verringerten mRNA-Spiegel. Die zehn quantitativ am stärksten differenziell regulierten Transkripte sind in Tabelle 3.9 gezeigt. Neben PLZF (ZBTB16) mit einer 21-fach erhöhten mRNA-Expression wurden *GATA binding protein 4* (GATA4) und *inhibitor of DNA binding3* (ID3) mit einem erhöhten mRNA-Gehalt identifiziert, welche bereits im Zusammenhang mit PLZF beschrieben wurden [105, 96].

Tab. 3.9.: Transkriptomanalyse von PLZF-überexprimierenden HEK293T-Zellen (Ma(PLZF;H)). Darstellung der zehn Gene mit den höchsten und niedrigsten *fold change*-Werten relativ zur Kontrolle. Hypothetische und funktionell uncharakterisierte Gene sind nicht aufgelistet. Das Gen, welches PLZF kodiert (ZBTB16), ist dunkelgrau hinterlegt und Gene, die bereits in Zusammenhang mit PLZF publiziert wurden, sind hellgrau hinterlegt.

Gen ID	Gensymbol	Beschreibung	fold change MA(PLZF; H)
7704	ZBTB16	<i>zinc finger and BTB domain containing 16</i>	21,08
3037	HAS2	<i>hyaluronansynthase 2</i>	2,93
27134	TJP3	<i>tight junction protein 3 (zona occludens 3)</i>	2,79
55511	SAGE1	<i>sarcoma antigen 1</i>	2,63
1081	CGA	<i>glycoprotein hormones, alpha polypeptide</i>	2,54
387914	SHISA2	<i>shisa homolog 2 (Xenopus laevis)</i>	2,46
140731	ANKRD60	<i>ankyrin repeat domain 60</i>	2,46
26266	SLC13A4	<i>solute carrier family 13 (sodium/sulfate symporters), member 4</i>	2,45
441521	CT45A5	<i>cancer/testis antigen family 45, member A5</i>	2,39
10178	ODZ1	<i>odz, odd Oz/ten-m homolog 1(Drosophila)</i>	2,35
2626	GATA4	<i>GATA binding protein 4</i>	2,28 [105]
3399	ID3	<i>inhibitor of DNA binding 3, dominant negative helix-loop-helix protein</i>	1,80 [96]
1050	CEBPA	<i>CCAAT/enhancer binding protein (C/EBP), alpha</i>	1,58 [130]
84072	HORMAD1	<i>HORMA domain containing 1</i>	0,17
6678	SPARC	<i>secreted protein, acidic, cysteine-rich (osteonectin)</i>	0,31
245972	ATP6V0D2	<i>ATPase, H+ transporting, lysosomal 38kDa, V0 subunit d2</i>	0,34
51200	CPA4	<i>carboxypeptidase A4</i>	0,39
10512	SEMA3C	<i>sema domain, immunoglobulin domain (Ig), short basic domain, secreted, (semaphorin) 3C</i>	0,40
2556	GABRA3	<i>gamma-aminobutyric acid (GABA) A receptor, alpha 3</i>	0,41
9512	PMPCB	<i>peptidase (mitochondrial processing) beta</i>	0,41
170690	ADAMTS16	<i>ADAM metallopeptidase with thrombospondin type 1 motif, 16</i>	0,43
4325	MMP16	<i>matrix metallopeptidase 16 (membrane-inserted)</i>	0,43
3491	CYR61	<i>cysteine-rich, angiogenic inducer, 61</i>	0,44

Die funktionelle Analyse der Gene mit einer signifikant veränderten mRNA-Konzentration zeigte, dass vor allem Gene, die in Entwicklungsprozessen und Morphogenese eine Rolle spielen, durch die Überexpression von PLZF beeinflusst wurden (siehe Tabelle 3.10). Bezüglich der Zuordnung zu KEGG-Netzwerken wurden u. a. Kardiomyopathien und der Notch-Signalweg gefunden (siehe Tabelle 3.11).

Tab. 3.10.: Funktionelle Analyse der signifikant differenziell exprimierten Gene von PLZF-überexprimierenden HEK293T-Zellen versus HEK293T-Zellen mit insertlosem stabil-episomal transfizierten Vektor unter Verwendung des DAVID-Programmes. Aufgeführt sind jeweils die zehn signifikanten Terme mit den höchsten p-Werten der GO-Kategorie Biologischer Prozess (Ebene 4) mit der Angabe der Anzahl (n) der involvierten Gene.

ID	Biologischer Prozess	n	p-Wert
GO:0007399	<i>nervous system development</i>	155	5,93E-11
GO:0048468	<i>cell development</i>	96	5,45E-08
GO:0022008	<i>neurogenesis</i>	88	4,71E-07
GO:0007417	<i>central nervous system development</i>	68	4,85E-07
GO:0030182	<i>neuron differentiation</i>	69	7,08E-07
GO:0006812	<i>cation transport</i>	79	5,09E-06
GO:0000904	<i>cell morphogenesis involved in differentiation</i>	43	7,68E-06
GO:0048812	<i>neuron projection morphogenesis</i>	39	8,83E-06
GO:0000902	<i>cell morphogenesis</i>	55	1,96E-05
GO:0048858	<i>cell projection morphogenesis</i>	42	1,97E-05

Tab. 3.11.: Zuordnung der differenziell exprimierten Gene aus Ma(PLZF; H) zu KEGG-Netzwerken unter Verwendung des DAVID-Programmes mit der Angabe des Signifikanzniveaus sowie der Anzahl (n) der involvierten Gene.

ID	KEGG pathway	n	p-Wert
hsa04512	<i>ECM-receptor interaction</i>	21	1,81E-05
hsa04360	<i>axon guidance</i>	22	2,88E-03
hsa05414	<i>dilated cardiomyopathy</i>	16	1,08E-02
hsa05412	<i>arrhythmogenic right ventricular cardiomyopathy (ARVC)</i>	14	1,16E-02
hsa05410	<i>hypertrophic cardiomyopathy (HCM)</i>	15	1,24E-02
hsa04330	<i>notch signaling pathway</i>	10	1,66E-02

3.2.2. Transkriptomanalyse von PLZF-HA-exprimierenden KELLY-Zellen

Zusätzlich zu den PLZF-überexprimierenden HEK293T-Zellen wurde das Transkriptionsprofil von mit einem HA-*tag* fusionierten PLZF-exprimierenden neuronalen KELLY-Zellen analysiert [131]. Diese ebenfalls stabil transfizierten Zellen zeigten eine 1000-fache Überexpression von PLZF im Vergleich zur Kontrolle. Dieses Mikroarray-Experiment wird im Folgenden mit Ma(PLZF;K) abgekürzt (vergleiche Tabelle 2.6).

Insgesamt wurden 5073 Gene mit einem ≥ 2 -fach oder ≤ 2 -fach veränderten mRNA-Spiegel detektiert. Davon zeigten 260 Gene einen signifikant erhöhten und 4813 einen signifikant verringerten mRNA-Spiegel. PLZF zeigte einen 56-fach erhöhten mRNA-Spiegel. Unter den Genen mit einem signifikant erhöhten mRNA-Gehalt wurden u. a. die Gene *inhibitor of DNA binding 1, 2 und 3* (ID1, ID2 und ID3) und *GATA binding protein 4* (GATA4) gefunden, welche bereits im Zusammenhang mit PLZF beschrieben wurden [105, 96]. In Tabelle 3.12 sind die zehn quantitativ am stärksten differenziell regulierten Transkripte dargestellt.

Die Zuordnung zu biologischen Prozessen zeigte eine signifikante Assoziation der Gene mit Zellmorphogenese und Zelldifferenzierung (siehe Tabelle 3.13). Die KEGG-*pathway*-Analyse identifizierte u. a. eine überrepräsentative Anzahl von Genen im Bereich der Kardiomyopathien (siehe Tabelle 3.14).

Tab. 3.12.: Transkriptomanalyse von PLZF-HA-überexprimierenden KELLY-Zellen (Ma(PLZF; K)). Darstellung der zehn Gene mit den höchsten und niedrigsten *fold change*-Werten relativ zur Kontrolle. Hypothetische und funktionell uncharakterisierte Gene sind nicht aufgelistet. Das Gen, welches PLZF kodiert (ZBTB16), ist dunkelgrau hinterlegt und Gene, die bereits in Zusammenhang mit PLZF publiziert wurden, sind hellgrau hinterlegt.

Gen ID	Gensymbol	Beschreibung	<i>fold change</i> Ma(PLZF; K)
7704	ZBTB16	<i>zinc finger and BTB domain containing 16</i>	56,41
29944	PNMA3	<i>paraneoplastic antigen MA3</i>	4,79
653786	LOC653786	<i>otoancorin pseudogene</i>	4,72
2901	GRIK5	<i>glutamate receptor, ionotropic, kainate 5</i>	4,14
347732	CATSPER3	<i>cation channel, sperm associated 3</i>	4,03
9518	GDF15	<i>growth differentiation factor 15</i>	3,96
23	ABCF1	<i>ATP-binding cassette, sub-family F (GCN20), member 1</i>	3,92
196410	METTL7B	<i>methyltransferase like 7B</i>	3,89
730	C7	<i>complement component 7</i>	3,79
29934	SNX12	<i>sorting nexin 12</i>	3,76
2626	GATA4	<i>GATA binding protein 4</i>	2,39 [105]
6781	STC1	<i>stanniocalcin 1</i>	0,24
5272	SERPINB9	<i>serpin peptidase inhibitor, clade B (ovalbumin), member 9</i>	0,29
4782	NFIC	<i>nuclear factor I/C (CCAAT-binding transcription factor)</i>	0,30
8793	TNFRSF10D	<i>tumor necrosis factor receptor superfamily, member 10d, decoy with truncated death domain</i>	0,31
4281	MID1	<i>midline 1 (Opitz/BBB syndrome)</i>	0,32
23294	ANKS1a	<i>ankyrin repeat and sterile alpha motif domain containing 1A</i>	0,32
124274	GPR139	<i>G protein-coupled receptor 139</i>	0,33
91947	ARRDC4	<i>arrestin domain containing 4</i>	0,34
1392	CRH	<i>corticotropin releasing hormone</i>	0,35
80256	KIAA1539	<i>KIAA1539</i>	0,35
3397	ID1	<i>inhibitor of DNA binding 1, dominant negative helix-loop-helix protein</i>	0,40 [96]
3398	ID2	<i>inhibitor of DNA binding 2, dominant negative helix-loop-helix protein</i>	0,44 [130]
3399	ID3	<i>inhibitor of DNA binding 3, dominant negative helix-loop-helix protein</i>	0,50 [96]

Tab. 3.13.: Funktionelle Analyse der signifikant differenziell exprimierten Gene von PLZF-HA-überexprimierenden KELLY-Zellen versus KELLY-Zellen mit insertlosem stabiltransfizierten Vektor unter Verwendung des DAVID-Programmes. Dargestellt sind jeweils die ersten zehn signifikanten Terme mit den höchsten p-Werten der GO-Kategorie Biologischer Prozess (Ebene 4) mit Angabe der Anzahl (n) der involvierten Gene.

ID	Biologischer Prozess	n	p-Wert
GO:0048812	<i>neuron projection morphogenesis</i>	91	3,93E-09
GO:0000902	<i>cell morphogenesis</i>	135	7,15E-09
GO:0007160	<i>cell-matrix adhesion</i>	47	1,86E-08
GO:0048858	<i>cell projection morphogenesis</i>	99	2,43E-08
GO:0048666	<i>neuron development</i>	127	4,71E-08
GO:0007411	<i>axon guidance</i>	47	1,40E-05
GO:0006820	<i>anion transport</i>	58	2,22E-05
GO:0030155	<i>regulation of cell adhesion</i>	55	5,19E-05
GO:0045619	<i>regulation of lymphocyte differentiation</i>	28	8,45E-04
GO:0045785	<i>positive regulation of cell adhesion</i>	27	8,57E-04
GO:0007044	<i>cell-substrate junction assembly</i>	14	8,85E-04
GO:0010038	<i>response to metal ion</i>	48	1,21E-03
GO:0030199	<i>collagen fibril organization</i>	16	1,24E-03
GO:0007050	<i>cell cycle arrest</i>	40	1,34E-03

Tab. 3.14.: Zuordnung der differenziell exprimierten Gene aus Ma(PLZF; K) zu KEGG-Netzwerken unter Verwendung des DAVID-Programmes mit Angabe des Signifikanzniveaus und der Anzahl (n) der involvierten Gene.

ID	KEGG pathway	n	p-Wert
hsa04512	<i>ECM-receptor interaction</i>	51	1,08E-11
hsa04510	<i>focal adhesion</i>	89	1,76E-09
hsa04360	<i>axon guidance</i>	54	3,00E-05
hsa05412	<i>arrhythmogenic right ventricular cardiomyopathy (ARVC)</i>	35	1,12E-04
hsa04720	<i>long-term potentiation</i>	30	9,22E-04
hsa05414	<i>dilated cardiomyopathy</i>	37	1,60E-03
hsa05020	<i>prion diseases</i>	18	1,97E-03
hsa04210	<i>apoptosis</i>	35	2,19E-03
hsa04610	<i>complement and coagulation cascades</i>	29	2,75E-03
hsa05410	<i>hypertrophic cardiomyopathy (HCM)</i>	34	2,86E-03

3.2.3. Vergleich der Transkriptome von PLZF-überexprimierenden KELLY- und HEK293T-Zellen

Um die durch PLZF regulierten Gene unabhängig vom Zelltyp und des *tags* zu bestimmen, wurden die resultierenden Genlisten der signifikant differenziell exprimierten Gene aus Ma(PLZF; H) und Ma(PLZF; K) miteinander verglichen und die überlappenden Gene extrahiert. Insgesamt wurden 541 gemeinsame Gene mit einem signifikant veränderten mRNA-Spiegel identifiziert (siehe Abbildung 3.4).

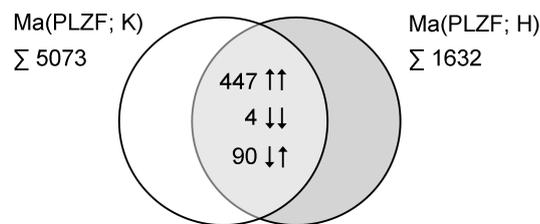


Abb. 3.4.: Grafische Darstellung der gemeinsamen und distinkten Gene mit signifikant veränderten mRNA-Spiegeln in PLZF-überexprimierenden HEK293T-Zellen und PLZF-HA-überexprimierenden KELLY-Zellen. Die in der Schnittmenge des Venn-Diagramms dargestellten Pfeile zeigen die Anzahl der gemeinsam induzierten Gene (↑↑), der gemeinsam reprimierten Gene (↓↓) und der invers regulierten Gene (↓↑).

Die funktionelle Analyse zeigte, dass vor allem Gene identifiziert wurden, die in Zusammenhang mit Entwicklungsprozessen gebracht wurden, wie u. a. Gehirnentwicklung (siehe Tabelle 3.15). Weitere Analysen unter Verwendung des IPA-Programmes (siehe Tabelle 3.4) zeigten, dass 25% der differenziell exprimierten Gene mit Tumorgenese, 22% mit Gewebeentwicklung und 18% mit Diabetes mellitus assoziiert waren.

Tab. 3.15.: Funktionelle Analyse der Schnittmenge der signifikant differenziell exprimierten Gene aus PLZF-HA-überexprimierenden KELLY-Zellen und PLZF-überexprimierenden HEK293T-Zellen versus der jeweiligen Zellen mit insertlosen stabil-transfizierten Vektoren. Dargestellt sind jeweils die ersten zehn signifikanten Terme mit den höchsten p-Werten der GO-Kategorie Biologischer Prozesse (Ebene 4) mit Angabe des Signifikanzniveaus und der Anzahl (n) der involvierten Gene.

ID	Biologischer Prozess	n	p-Wert
GO:0048812	<i>neuron projection morphogenesis</i>	22	8,45E-08
GO:0000904	<i>cell morphogenesis involved in differentiation</i>	23	2,02E-07
GO:0048513	<i>organ development</i>	77	4,78E-07
GO:0048468	<i>cell development</i>	39	7,18E-07
GO:0007399	<i>nervous system development</i>	55	7,51E-07
GO:0010646	<i>regulation of cell communication</i>	46	1,87E-04
GO:0048870	<i>cell motility</i>	20	2,63E-04
GO:0006812	<i>cation transport</i>	29	3,10E-04
GO:0007411	<i>axon guidance</i>	11	3,39E-04
GO:0007420	<i>brain development</i>	19	3,49E-04
GO:0009888	<i>tissue development</i>	32	6,14E-04
GO:0042127	<i>regulation of cell proliferation</i>	35	1,27E-03
GO:0001944	<i>vasculature development</i>	16	1,63E-03
GO:0007242	<i>intracellular signaling cascade</i>	48	3,15E-03

Tab. 3.16.: Zuordnung der differenziell exprimierten Gene aus Ma(PLZF;K) und Ma(PLZF;H) zu KEGG-Netzwerken unter Verwendung des DAVID-Programmes mit Angabe des Signifikanzniveaus und der Anzahl (n) der involvierten Gene.

ID	KEGG pathway	n	p-Wert
hsa04512	<i>ECM-receptor interaction</i>	18	3,10E-10
hsa04510	<i>focal adhesion</i>	19	3,23E-05
hsa04360	<i>axon guidance</i>	11	5,67E-03
hsa04144	<i>endocytosis</i>	13	9,93E-03
hsa04020	<i>calcium signaling pathway</i>	12	1,79E-02

3.2.4. Transkriptionsprofil von KELLY-Zellen unter Genisteinbehandlung

Zur Bestimmung der optimalen Konzentration von Genistein zur Stimulierung der KELLY-Zellen für die folgenden Mikroarray-Analysen, wurden in Vorversuchen die Messdaten der Zellproliferation, des Gesamtprotein- und des ATP-Gehalts relativ zur DMSO-Kontrolle zu Grunde gelegt. Die Zellproliferationsstudien mittels BrdU oder XTT unter Genistein zeigten keine Konzentrations-Wirkungs-Antwort bis zu einer Konzentration von $10\ \mu\text{M}$. Die Messung des Gesamtprotein- und des ATP-Gehalts zeigte bei einer Konzentration von $10\ \mu\text{M}$ Genistein eine leichte Verringerung im Vergleich zum Ausgangswert. Um in den folgenden Mikroarray-Experimenten die minimale Konzentration von Genistein, die einen Einfluss auf das Zellsystem zeigt, zu erzielen, wurde eine Genisteinkonzentration von $10\ \mu\text{M}$ bei einer Inkubationszeit von 48 Stunden gewählt.

Die differenzielle Genexpression der mit Genistein bzw. mit DMSO behandelten KELLY-Zellen wurde mittels *Human Gene 1.0 ST Arrays* bestimmt (Ma(Geni), vergleiche Tabelle 2.6). Bei einer FPR von 5% als Grenzwert für die Signifikanz wurden insgesamt 636 Gene mit einem $\geq 1,5$ -fach oder $\leq 0,67$ -fach veränderten mRNA-Spiegel identifiziert, wobei 607 Gene einen signifikant erhöhten und 27 Gene einen signifikant verringerten mRNA-Spiegel im Vergleich zur DMSO-Kontrolle aufwiesen.

Die funktionelle Analyse zeigte, dass vor allem Gene assoziiert mit Organentwicklung (siehe Tabelle 3.18) durch Genistein beeinflusst wurden, wie z. B. zur Entwicklung des Nervensystems und des Gehirns. Die Netzwerkanalyse ergab signifikant überrepräsentative Gene in *calcium signaling pathway* (hsa04020) mit einem p-Wert von 0,042 und zwölf involvierten Genen sowie *regulation of actin cytoskeleton* (hsa04810) mit 14 involvierten Genen und einem p-Wert von 0,043. Die Analyse der Daten mittels IPA zeigte, dass 15% der signifikant veränderten Gene mit Diabetes mellitus, 15% mit Gewebeentwicklung und 12% mit rheumatischer Arthritis in Zusammenhang gebracht wurden (vergleiche Tabelle 3.4).

Tab. 3.17.: Transkriptomanalyse von KELLY-Zellen nach Inkubation mit Genistein für 48 h (Ma(Geni)). Dargestellt sind die zehn Gene mit den höchsten und niedrigsten *fold change*-Werten relativ zur Kontrolle. Hypothetische und funktionell uncharakterisierte Gene sind nicht aufgelistet.

Gen ID	Gen-symbol	Beschreibung	<i>fold change</i> Ma(Geni)
677827	SNORA46	<i>small nucleolar RNA, H/ACA box 46</i>	6,28
1470	CST2	<i>cystatin SA</i>	4,76
677801	SNORA14A	<i>small nucleolar RNA, H/ACA box 14A</i>	3,36
677802	SNORA14B	<i>small nucleolar RNA, H/ACA box 14B</i>	3,36
4069	LYZ	<i>lysozyme</i>	3,18
6414	SEPP1	<i>selenoprotein P, plasma, 1</i>	2,69
677811	SNORA28	<i>small nucleolar RNA, H/ACA box 28</i>	2,58
7805	LAPTM5	<i>lysosomal protein transmembrane 5</i>	2,51
5341	PLEK	<i>pleckstrin</i>	2,49
654321	SNORA75	<i>small nucleolar RNA, H/ACA box 75</i>	2,41
4642	MYO1D	<i>myosin ID</i>	0,44
7813	EVI5	<i>ecotropic viral integration site 5</i>	0,46
3696	ITGB8	<i>integrin, beta 8</i>	0,53
114987	WDR31	<i>WD repeat domain 31</i>	0,53
54454	ATAD2B	<i>ATPase family, AAA domain containing 2B</i>	0,54
113802	HENMT1	<i>HEN1 methyltransferase homolog 1 (Arabidopsis)</i>	0,54
153733	CCDC112	<i>coiled-coil domain containing 112</i>	0,55
100526761	C13orf38-SOHLH2	<i>C13orf38-SOHLH2 readthrough</i>	0,55
79807	GSTCD	<i>glutathione S-transferase, C-terminal domain containing</i>	0,55
5203	PFDN4	<i>prefoldin subunit 4</i>	0,56

Tab. 3.18.: Funktionelle Analyse der signifikant differenziell exprimierten Gene aus genisteinbehandelten KELLY-Zellen versus der DMSO-Kontrolle. Dargestellt sind jeweils die zehn signifikanten Terme mit den höchsten p-Werten der GO-Kategorie Biologischer Prozess (Ebene 4) mit Angabe des Signifikanzniveaus und der Anzahl (n) der involvierten Gene.

ID	Biologischer Prozess	n	p-Wert
GO:0048513	<i>organ development</i>	77	1,82E-04
GO:0006954	<i>inflammatory response</i>	21	1,47E-03
GO:0007399	<i>nervous system development</i>	50	1,61E-03
GO:0007420	<i>brain development</i>	19	2,19E-03
GO:0032101	<i>regulation of response to external stimulus</i>	13	2,51E-03
GO:0006873	<i>cellular ion homeostasis</i>	22	3,40E-03
GO:0051093	<i>negative regulation of developmental process</i>	17	4,12E-03
GO:0006811	<i>ion transport</i>	36	6,23E-03
GO:0048878	<i>chemical homeostasis</i>	26	8,75E-03
GO:0045596	<i>negative regulation of cell differentiation</i>	14	1,12E-02
GO:0007417	<i>central nervous system development</i>	22	1,37E-02

3.2.5. Vergleich der Transkriptionsprofile von PLZF- überexprimierenden Zelllinien und genisteinbehandelten KELLY-Zellen

Neben seiner inhibitorischen Wirkung auf Phosphotyrosinkinasen wurde beobachtet, dass Genistein die Translokation von PLZF in den Zellkern hemmt und somit die Expression der Zielgene dieses Transkriptionsfaktors beeinflusst [81]. Der Vergleich des Transkriptionsprofils von KELLY-Zellen unter Genisteinbehandlung (Ma(Geni)) mit PLZF-überexprimierenden KELLY-Zellen (Ma(PLZF, K)) ergab 195 gemeinsame Gene mit einem veränderten mRNA-Spiegel. Davon zeigten 20 Gene einen inversen mRNA-Spiegel, d. h., entweder hatten die Gene des einen Experiments einen erhöhten und die des anderen Experiments einen verringerten mRNA-Spiegel oder umgekehrt. Die Schnittmenge von Ma(Geni) mit PLZF-überexprimierenden HEK293T-Zellen (Ma(PLZF; H)) betrug 72 Gene, wobei zwölf Gene einen inversen mRNA-Gehalt aufwiesen. Zwei Gene, *solute carrier family 4 sodium bicarbonate cotransporter, member 4* (SLC4A4) und *integrin, beta 8* (ITGB8), zeigten eine gleichsinnige Regulation in beiden PLZF-überexprimierenden Zellen (Ma(PLZF; H, K)) und gleichzeitig einen inversen mRNA-Spiegel in Ma(Geni). Da durch Genistein u. a. die nukleäre Translokation von PLZF verhindert und damit seine Funktion als Transkriptionsfaktor gehemmt wird, während durch die Überexpression die Funktion als transkriptioneller Regulator verstärkt wird, sind die Gene mit einem inversen mRNA-Spiegel von Bedeutung. Diese sind in Tabelle 3.19 dargestellt. Die Zuordnung zu GO-Kategorien ergab kein signifikantes Resultat.

Tab. 3.19.: Tabellarische Darstellung der Gene mit gegensätzlichen mRNA-Spiegeln und der entsprechenden *fold change*-Werten von Ma(Geni) (1) und Ma(PLZF;K) (2) bzw. Ma(PLZF;H) (3), vergleiche Venn-Diagramm 3.5.

Gen ID	Gensymbol	Beschreibung	1	2	3
8 ↓↑					
722	C4BPA	<i>complement component 4 binding protein, alpha</i>	-0,75	1,13	-
165631	PARP15	<i>poly (ADP-ribose) polymerase family, member 15</i>	-0,80	1,12	-
10578	GNLY	<i>granulysin</i>	-0,81	1,11	-
124989	C17orf57	<i>chromosome 17 open reading frame 57</i>	-0,84	1,17	-
50640	PNPLA8	<i>patatin-like phospholipase domain containing 8</i>	-0,86	1,17	-
100526761	C13orf38-SOHLH2	<i>C13orf38-SOHLH2 readthrough</i>	-0,86	1,23	-
113802	HENMT1	<i>HEN1 methyltransferase homolog 1</i>	-0,88	1,27	-
7813	EVI5	<i>ecotropic viral integration site 5</i>	-1,12	1,18	-
10 ↑↓					
100132346	LOC1001-32346	<i>10 kDa heat shock protein, mitochondrial-like</i>	0,78	-1,13	-
63967	CLSPN	<i>claspin</i>	0,76	-1,10	-
3013	HIST1-H2AD	<i>histone cluster 1, H2ad</i>	0,75	-1,15	-
3213	HOXB3	<i>homeobox B3</i>	0,64	-1,04	-
135293	PM20D2	<i>peptidase M20 domain containing 2</i>	0,64	-1,01	-
54752	FNDC8	<i>fibronectin type III domain containing 8</i>	0,64	-1,24	-
347541	MAGEB5	<i>melanoma antigen family B, 5</i>	0,62	-1,06	-
9532	BAG2	<i>BCL2-associated athanogene 2</i>	0,60	-1,02	-
3400	ID4	<i>inhibitor of DNA binding 4, dominant negative helix-loop-helix protein</i>	0,92	-1,07	0,84
57526	PCDH19	<i>protocadherin 19</i>	0,63	-1,08	0,79
2 ↑↑↓					
8671	SLC4A4	<i>solute carrier family 4, sodium bicarbonate cotransporter, member 4</i>	-0,80	1,05	0,76
3696	ITGB8	<i>integrin, beta 8</i>	-0,92	1,10	0,80
1 ↑↓					
9208	LRRFIP1	<i>leucine rich repeat (in FLII) interacting protein 1</i>	-0,77	-	0,83
11 ↓↑					
6139	RPL17	<i>ribosomal protein L17</i>	1,02	-	-0,95
654321	SNORA75	<i>small nucleolar RNA, H/ACA box 75</i>	1,27	-	-1,01
26791	SNORD58A	<i>small nucleolar RNA, C/D box 58A</i>	1,02	-	-0,82
259296	TAS2R50	<i>taste receptor, type 2, member 50</i>	0,98	-	-0,97
100124536	SNORA38B	<i>small nucleolar RNA, H/ACA box 38B (retrotransposed)</i>	0,98	-	-0,99
259292	TAS2R46	<i>taste receptor, type 2, member 46</i>	0,87	-	-0,85
23642	SNHG1	<i>small nucleolar RNA host gene 1 (non-protein coding)</i>	0,79	-	-0,84
64332	NFKBIZ	<i>nuclear factor of kappa light polypeptide gene enhancer in B-cells inhibitor, zeta</i>	0,68	-	-1,11
54894	RNF43	<i>ring finger protein 43</i>	0,64	-	-0,80
50832	TAS2R4	<i>taste receptor, type 2, member 4</i>	0,62	-	-0,89
3624	INHBA	<i>inhibin, beta A</i>	0,68	1,49	-1,13

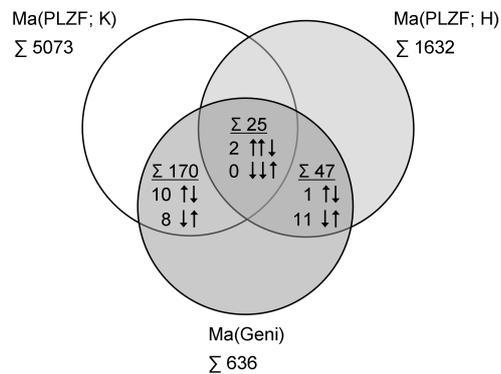


Abb. 3.5.: Darstellung der gemeinsamen signifikant regulierten Gene aus Ma(PLZF;K), Ma(PLZF;H) und Ma(Geni). Die in der Schnittmenge des Venn-Diagramms dargestellten Pfeile zeigen die Anzahl der induzierten Gene (↑) und der reprimierten Gene (↓) sowie die Gesamtzahl der gemeinsam regulierten Gene.

3.2.6. Genomweiter Transkriptomvergleich aller durchgeführten Mikroarrays

Die Resultate der durchgeführten Mikroarrays Ma(si(P)RR), Ma(Bafi), Ma(Geni) und Ma(PLZF; K, H) sind in Tabelle 3.20 zusammengefasst. Um weitere gemeinsame Gensignaturen der individuellen Transkriptionsprofile zu identifizieren, wurden Schnittmengen aller signifikant differenziell exprimierten Gene gebildet und miteinander verglichen (siehe Tabelle 3.20). Die meisten gemeinsam regulierten Gene - insgesamt 238 - wurden zwischen Ma(si(P)RR) und Ma(Bafi) gefunden.

Tab. 3.20.: Übersicht der differenziell exprimierten Gene der durchgeführten Mikroarrays Ma(si(P)RR), Ma(Bafi), Ma(PLZF; H, K) und Ma(Geni) sowie deren Schnittmengen. Dargestellt sind die Anzahl (n) der gemeinsamen Gene mit gleichsinniger und inverser Genregulation mit Angabe des jeweiligen prozentualen Anteils. Diff. expr. mRNA: differenziell exprimierte mRNA.

		Ma(si(P)RR)		Ma(Bafi)		Ma(PLZF; H) ∩ Ma(PLZF; K)		Ma(Geni)	
Gene mit mRNA-Spiegel ↑		1519		1364		447		609	
mRNA-Spiegel ↓		133		424		4		27	
∑ diff. expr. mRNA		1652		1788		451		636	
mRNA-Spiegel		n	%	n	%	n	%	n	%
Ma(siRNA (P)RR)	beide erhöht			124		38		61	
	beide verringert			2		0		0	
	erhöht / verringert			112		6		15	
	∑ diff. expr. mRNA			238	13	44	10	76	12
Ma(Bafi)	beide erhöht					36		48	
	beide verringert					0		6	
	erhöht / verringert					10		42	
	∑ diff. expr. mRNA					46	10	95	15
Ma(PLZF; H) ∩ Ma(PLZF; K)	beide erhöht							20	
	beide verringert							0	
	erhöht / verringert							2	
	∑ diff. expr. mRNA							22	5

f

3.3. Untersuchung von PLZF- und Polymerase II-vermittelter Regulation der Genexpression mittels ChIP-*chip*

3.3.1. Etablierung der Chromatin-Immunopräzipitation (ChIP)

Zur Validierung und besseren Einschätzung der durchgeführten Genexpressions-Mikroarray-Analysen und der Detektion neuer PLZF-Zielgene wurden Chromatin-Immunopräzipitation (ChIP)-Mikroarray-Experimente durchgeführt. Das Ziel der ChIP ist der Nachweis der Bindung eines Transkriptionsfaktors an bestimmte Bereiche der DNA. Dabei werden die auf der DNA gebundenen Proteine fixiert, anschließend wird die DNA geschert, und die resultierenden Fragmente werden mit spezifischen Antikörpern, die gegen das Zielprotein gerichtet sind, präzipitiert (vergleiche Abbildung 2.1). Die ChIP-Experimente in dieser Arbeit erfolgten in PLZF-HA-überexprimierenden KELLY-Zellen, PLZF-überexprimierenden HEK293T-Zellen und in Zellen, die die entsprechenden stabil transfizierten insertlosen Vektoren enthielten. Zur technischen Kontrolle der Fragmentierung wurde die DNA elektrophoretisch aufgetrennt analysiert (siehe Abbildung 3.6). Die Optimierung der Sonifizierungsbedingungen wurde zuvor mit unterschiedlichen Einstellungen bezüglich Energie, Zeitintervall und Zyklenanzahl getestet. Anschließend wurde das Crosslinking revertiert und die DNA gereinigt und analysiert. Die Zielgröße der Fragmente für ein ChIP-Experiment liegt bei ca. 250 bp bis 750 bp [132]. Die Anreicherung von DNA um den Transkriptionsstartpunkt durch die Rekrutierung von RNA-Polymerase II (Pol II) im GAPDH- oder β -Aktin-Promotor wurde durch *real time*-PCR quantifiziert (siehe Abbildung 3.7). Auf diese Weise konnte eine Anreicherung von DNA bezüglich des GAPDH-Promotors durch Pol II bei Fixierungszeiten von 2 min und 7 min festgestellt werden. Der Einsatz von unspezifischen

anti-IgG-Antikörpern sowie bei einer Fixierungszeit von 0 min zeigte keine bzw. eine sehr geringe Anreicherung von DNA um den Transkriptionsstartpunkt von GAPDH (siehe Abbildung 3.7). Die Positivkontrolle, d. h., ohne Einsatz von Antikörpern, zeigte geringere C_T -Werte unabhängig von der Crosslinking-Zeit. Die weitere Analyse der angereicherten DNA-Fragmente erfolgte mittels *tiling*-Arrays, deren Oligonukleotide die Promotor-Regionen des humanen Genoms abdecken.

Die in dieser Arbeit durchgeführten ChIP-*chip*-Experimente sind in Tabelle 3.21 aufgelistet. Um diese im Folgenden mit den Genexpressions-Mikroarrays kombinieren zu können, wurden alle Sequenzen der derzeit aktuellen *human genome*-Version (hg19) neu zugeordnet und annotiert (Genomatix).

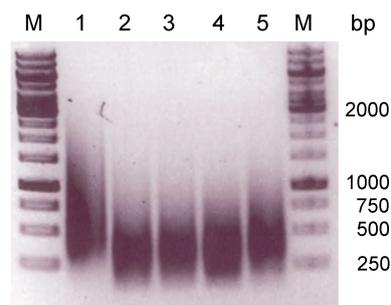


Abb. 3.6.: Untersuchung der Sonifizierungseffizienz der DNA von KELLY-Zellen. PLZF-HA-überexprimierende KELLY-Zellen und die entsprechende Kontrolle (stabil transfizierter insertloser Vektor) wurden mit Formaldehyd für 0 min bzw. 7 min inkubiert, anschließend wurden die Zellen aufgeschlossen und sonifiziert. Nach der Reversion des Crosslinking wurde die fragmentierte DNA gelelektrophoretisch aufgetrennt und analysiert. M: Marker, 1: Wt-Kontrolle ohne Crosslinking, 2 und 3: DNA aus PLZF-HA-überexprimierende KELLY-Zellen, nach 7 min bzw. 0 min Crosslinking, 4 und 5: DNA aus KELLY-Zellen mit stabil transfiziertem Leervektor nach 7 min bzw. 0 min Crosslinking.

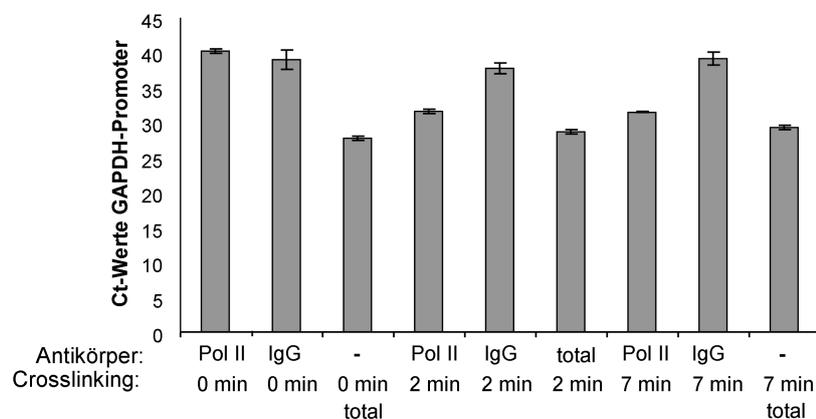


Abb. 3.7.: Beispiel einer Quantifizierung der Anreicherung von gereinigten DNA-Fragmenten nach Chromatin-Immunopräzipitation mittels *real time*-PCR auf dem GAPDH-Promotor. Die Immunopräzipitationen mit den RNA-Polymerase II (Pol II)-Antikörpern bzw. IgG-Antikörpern (IgG) als Negativkontrolle erfolgte in PLZF-überexprimierenden HEK293T-Zellen bzw. in den entsprechenden Zellen mit stabil transfiziertem insertlosen Vektor. Die Proteine wurden vor der Immunopräzipitation für 0 min, 2 min bzw. 7 min einer 1%-igen Formaldehydlösung fixiert. „Total“ entspricht 20% der Ausgangs-DNA-Menge; diese Proben wurden bis auf den Einsatz von Antikörpern entsprechend der anderen Proben behandelt.

Tab. 3.21.: Tabellarische Übersicht der durchgeführten ChIP-*chip* (Cc)-Experimente. Nach den Chromatin-Immunopräzipitationen in den dargestellten Zelllinien mit den jeweiligen Antikörpern wurden die gereinigten DNA-Proben mit unterschiedlichen Fluoreszenzfarbstoffen versehen und paarweise (Intervention 1 versus Intervention 2) auf Promotor-Mikroarrays hybridisiert.

Exp.-Nr.	Zelltyp, Intervention 1	Antikörper	Zelltyp, Intervention 2	Antikörper
Cc1	KELLY, stabile PLZF-HA-Überexpression	RNA-Pol II	KELLY, stabile PLZF-HA-Überexpression	IgG
Cc2	KELLY, stabile PLZF-HA-Überexpression	RNA-Pol II	KELLY, stabil transfizierter Leervektor	RNA-Pol II
Cc3	KELLY, stabil transfizierter Leervektor	RNA-Pol II	KELLY, stabil transfizierter Leervektor	IgG
Cc4	KELLY, stabile PLZF-HA-Überexpression	PLZF	KELLY, stabile PLZF-HA-Überexpression	IgG
Cc5	KELLY, stabil transfizierter Leervektor	PLZF	KELLY, stabil transfizierter Leervektor	IgG
Cc6	HEK293T, stabile PLZF-Überexpression	PLZF	HEK293T, stabil transfizierter Leervektor	PLZF

3.3.2. Rekrutierung der RNA-Polymerase II in PLZF-überexprimierenden KELLY-Zellen

Die Rekrutierung von RNA-Polymerase II (Pol II) ist eine Voraussetzung für die Transkription der DNA [112, 133]. Das ChIP-*chip*-Experiment 1 (Cc1, vergleiche Tabelle 3.21) wurde in PLZF-überexprimierenden KELLY Zellen durchgeführt. Cc1 identifiziert sowohl basale (d. h. ohne mögliche Effekte einer PLZF-Überexpression) als auch PLZF-induzierte Pol II-Rekrutierung. Cc3 identifiziert nur die basale Pol II-Rekrutierung und Cc2 die PLZF-induzierte Pol II-Rekrutierung. Das bedeutet, Gene auf denen Pol II durch die Induzierung von PLZF rekrutiert wird, sind in Experiment Cc2 dargestellt, werden aber auch durch die Subtraktion der resultierenden Genlisten Cc3 von Cc1 (d. h. $Cc1 - Cc3$, vergl. Abbildung 3.8) erhalten.

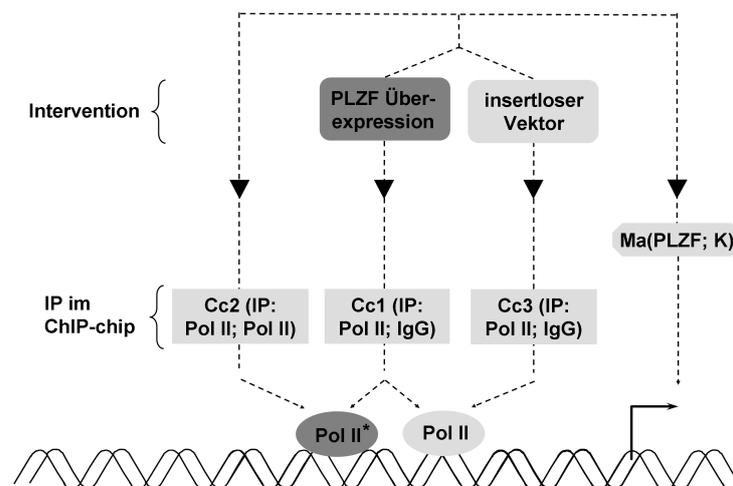


Abb. 3.8.: Schematische Darstellung der ChIP-*chip*-Experimente Cc1, Cc2 und Cc3 in Kombination mit Mikroarray-Experiment Ma(PLZF; K). Pol II: RNA-Polymerase II-Bindestellen in Zellen ohne Intervention; Pol II*: zusätzliche RNA-Polymerase-Bindestellen induziert durch PLZF-Überexpression. Abbildung aus Zaade *et al.* [125].

Die Analyse der amplifizierten Genregionen von Cc1 mittels *GenomeInspector* und *RegionMiner* ergaben 2791 Gene, die Pol II in ihrer *core promoter region* rekrutierten. Diese Regionen wurden durch die Software von Nukleotidposition -50 bis +10 relativ zum jeweiligen Transkriptionsstartpunkt (TSS) definiert. In den Experimenten Cc3 und Cc2 wurden 61 bzw. 1488 Gene identifiziert. Die Schnittmenge von Cc2 mit der Differenz von Cc3 und Cc1 ($Cc2 \cap (Cc1 - Cc3)$), resultierte in 222 Genen (siehe Abbildung

3.11). Der Vergleich der Genliste mit den Resultaten des entsprechenden Mikroarrays Ma(PLZF;K) ergab 67 gemeinsame Gene, wovon 66 einen erhöhten mRNA-Spiegel zeigten.

3.3.3. Rekrutierung von PLZF in PLZF-überexprimierenden KELLY-Zellen

Die ChIP-*chip*-Experimente Cc4 und Cc5 erfolgten ebenfalls in PLZF-überexprimierenden KELLY-Zellen. Zum Einsatz kam der anti-PLZF-Antikörper 2A9 von Calbiochem, der auch bei Felicetti *et al.* und McConnell *et al.* in ChIP-Experimenten verwendet wurde [134, 135]. Analog zu den vorhergegangenen ChIP-*chips* gegen Pol II, wurde mit Cc4 sowohl die basale als auch die durch PLZF-Überexpression induzierte PLZF Rekrutierung detektiert. Cc5 identifiziert die basale PLZF-Rekrutierung (siehe Tabelle 3.21). Gene, auf deren regulativen Regionen PLZF-Rekrutierung durch PLZF-Überexpression erfolgte, ergaben sich demzufolge aus der Subtraktion von Experiment Cc5 von Cc4 (Cc4 – Cc5) (vergleiche Abbildung 3.9).

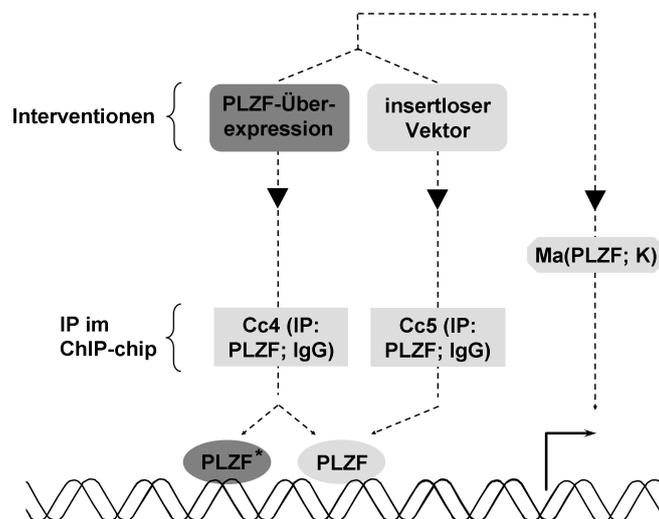


Abb. 3.9.: Schematische Darstellung der ChIP-*chip*-Experimente Cc4 und Cc5 in Kombination mit dem Mikroarray-Experiment Ma(PLZF; K). PLZF: PLZF-Bindungsstellen in Zellen ohne Intervention; PLZF*: zusätzliche PLZF-Bindestellen induziert durch PLZF-Überexpression. Abbildung nach Zaade *et al.* [125].

In Experiment Cc4 wurden insgesamt 5502 Regionen identifiziert. Die Untersuchung

der angereicherten Regionen nach PLZF-*cis*-Elementen mittels RegionMiner (Genomatix) zeigte, dass 1572 Regionen (29%) mindestens eine PLZF-Bindestelle aufwiesen. Davon befanden sich 282 Regionen (18%) in Promotorbereichen. In Experiment Cc5 enthielten 1472 (37%) von insgesamt 4004 detektierten Regionen mindestens ein PLZF-*cis*-Element, wobei 227 Regionen (16%) in Promotorbereichen lagen (siehe Abbildung 3.10).

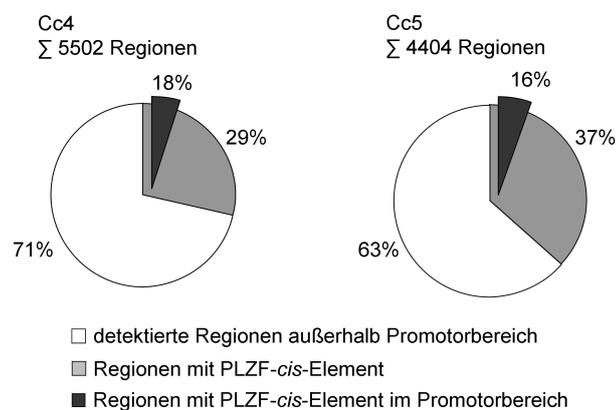


Abb. 3.10.: Analyse der detektierten Regionen aus den ChIP-*chip*-Experimenten Cc4 und Cc5. Dargestellt ist der prozentuale Anteil von PLZF-*cis*-Elementen innerhalb der detektierten Regionen sowie der Anteil von PLZF-*cis*-Elementen, die in Promotorbereichen liegen.

Die Differenz aus Experiment Cc5 und Cc4 ergab 5328 Regionen, wobei 273 Regionen mindestens eine PLZF-Bindungsstelle aufwiesen und im Promotorbereich lagen. Um die Gene zu identifizieren, die sowohl eine PLZF-Rekrutierung im Promotorbereich aufwiesen als auch eine veränderte Genexpression zeigten, wurden zunächst die den Promotoren zugeordneten Gene, die gleichzeitig ein PLZF-*cis*-Element enthielten, extrahiert. Diese Genliste wurde verglichen mit den 66 Genen, die eine erhöhte Pol II-Rekrutierung und zugleich einen erhöhten mRNA-Spiegel zeigten (siehe vorheriges Kapitel). Eine Übereinstimmung konnte bei neun Genen festgestellt werden (siehe Tabelle 3.22 und Abbildung 3.11). Zur weiteren Validierung wurde eine Schnittmenge dieser Genliste mit Cc6 gebildet. Experiment Cc6 basiert auf einer Immunopräzipitation gegen PLZF in HEK293T-Zellen (siehe Tabelle 3.21). Es wurden fünf gemeinsame Gene gefunden und in vier konnten PLZF-*cis*-Elemente identifiziert werden (siehe Tabelle 3.22).

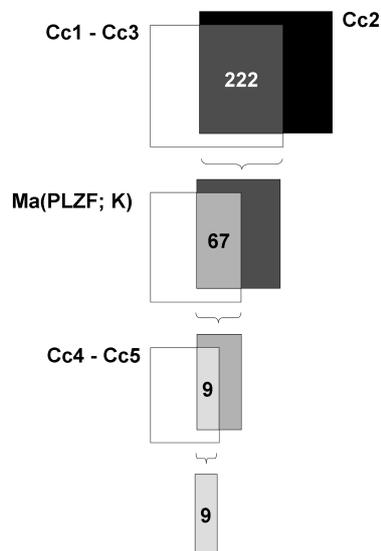


Abb. 3.11.: Sequenzieller Algorithmus zur Identifizierung von gemeinsamen Zielgenen in allen durchgeführten *ChIP-chip*-Experimenten. Mehrere Schnittmengenbildungen von *ChIP-chip*- und Mikroarray-Ergebnissen wurde durchgeführt, welche neun Gene ergab mit einer verstärkten Pol II- und PLZF-Rekrutierung sowie einem erhöhten mRNA-Spiegel. Diese neun Gene sind in Tabelle 3.22 dargestellt. Abbildung aus Zaade *et al.* [125].

Tab. 3.22.: Tabellarische Darstellung der Gene, die eine Pol II- und eine PLZF-Rekrutierung induziert durch PLZF-Überexpression aufwiesen und zusätzlich einen erhöhten mRNA-Spiegel in PLZF-HA-überexprimierenden KELLY-Zellen zeigten ($Cc1 \setminus Cc3 \cap Cc2 \cap Cc4 \setminus Cc5 \cap Ma(PLZF; K)$). Die Präsenz der Gene in Cc6 und die Existenz von mindestens einem PLZF-*cis*-Element innerhalb des Gesamtpromotors sind mit einem Häkchen versehen. Die angegebenen *fold change*-Werte beziehen sich auf Ma(PLZF; K).

Gen-ID	Gen-symbol	Beschreibung	<i>fold change</i>	Cc6	PLZF- <i>cis</i> -Element
6373	CXCL11	chemokine (C-X-C motif) ligand 11	3,58	✓	-
22872	SEC31A	SEC31 homolog A (<i>S. cerevisiae</i>)	2,62	-	-
10827	FAM114A2	family with sequence similarity 114, member A2	2,53	✓	✓
64208	POPDC3	popeye domain containing 3	2,22	-	-
158427	TSTD2	thiosulfate sulfurtransferase (rhodanese)-like domain containing 2	2,19	✓	✓
55729	ATF7IP	activating transcription factor 7 interacting protein	2,17	-	-
51175	TUBE1	tubulin, epsilon 1	2,17	✓	✓
261729	STEAP2	six transmembrane epithelial antigen of the prostate 2	2,17	✓	✓
79813	EHMT1	euchromatic histone-lysine N-methyltransferase 1	2,13	-	-

3.3.4. Validierung der Mikroarray- und ChIP-*chip*-Ergebnisse mittels *real time*-PCR

Zur Validierung der durchgeführten Mikroarray- und ChIP-*chip*-Resultate wurde die Expression einzelner Gene mit einem signifikant veränderten mRNA-Spiegel mittels quantitativer *real time*-PCR überprüft (siehe Tabelle 3.23).

Tab. 3.23.: Validierung der Mikroarray- und ChIP-*chip*-Ergebnisse mittels *real time*-PCR. Die für die Mikroarray-Analysen eingesetzte RNA wurde mittels *real time*-PCR quantifiziert unter Standardisierung auf das *housekeeping*-Gen 18S rRNA und unter Normalisierung auf die entsprechenden Kontrollen. Die p-Werte basieren auf einen zweiseitigen, ungepaarten t-Test. Die *fold change*-Werte aus den Mikroarray-Experimenten (Ma) sind relativ zur jeweiligen Kontrolle in Prozent angegeben. Gene, deren veränderter mRNA-Spiegel in den Ma-Experimenten mittels *real time*-PCR bestätigt werden konnte und die einen p-Wert $\leq 0,05$ aufwiesen, sind grau hinterlegt. SER: *standardised expression ratio*, SEM: mittlerer Standardfehler, n: Anzahl der durchgeführten Messungen.

Gensymbol	Gen ID	Ma(si(P)RR)					Ma(Bafi)				
		rel. <i>fold change</i>	SER	n	SEM	p-Wert	rel. <i>fold change</i>	SER	n	SEM	p-Wert
ADORA2A	135	31,53	16,97	3	1,71	0,012	184,68	624,55	3	44,74	$3,21 \cdot 10^{-4}$
CRH	1392	30,15	4,87	3	0,82	0,001	-	-	-	-	-
CTSB	1508	-	-	-	-	-	167,02	110,37	3	7,36	0,402
FN1	2335	164,72	100,38	6	15,14	0,982	171,71	165,38	3	25,64	0,072
ID1	3397	196,79	166,05	6	14,77	0,002	-	-	-	-	-
ID3	3399	-	-	-	-	-	62,94	157,32	3	6,55	$1,35 \cdot 10^{-4}$
IGF2	3481	41,68	42,75	6	4,03	$5,27 \cdot 10^{-6}$	64,06	131,35	3	13,45	0,113
NOX4	50507	174,11	128,81	6	35,11	0,103	-	-	-	-	-
PGK1	5230	33,80	36,50	3	1,35	0,001	-	-	-	-	-
POPDC3	64208	-	-	-	-	-	170,53	90,35	3	10,22	0,406
SEC31A	22872	-	-	-	-	-	164,55	222,04	3	27,83	0,013
TUBE1	51175	191,85	148,49	3	9,74	0,010	-	-	-	-	-
		Ma(PLZF; K)					Ma(PLZF; H)				
ADORA2A	135	40,33	29,25	3	1,91	0,009	-	-	-	-	-
ATF7IP	55729	212,87	95,77	6	2,03	0,561	-	-	-	-	-
CRH	1392	34,87	33,23	6	2,53	0,000	-	-	-	-	-
EHMT1a	79813	217,35	80,61	5	5,84	0,069	-	-	-	-	-
FAM113A2	10827	253,31	87,42	6	7,95	0,178	-	-	-	-	-
FN1	2335	-	-	-	-	-	179,99	64,29	9	6,87	0,005
ID1	3397	40,33	14,19	6	1,34	$3,73 \cdot 10^{-6}$	-	-	-	-	-
ID2	3398	43,53	32,67	3	4,65	0,006	-	-	-	-	-
ID3	3399	50,00	32,39	6	5,10	$2,30 \cdot 10^{-6}$	179,75	684,28	3	39,78	$2,19 \cdot 10^{-4}$
IGF2	3481	-	-	-	-	-	185,75	96,31	9	10,03	0,804
NOX4	50507	224,79	268,56	6	43,70	0,005	-	-	-	-	-
POPDC3	64208	221,91	106,41	6	8,23	0,522	-	-	-	-	-
SEC31A	22872	262,08	140,07	3	7,03	0,006	-	-	-	-	-
TSTD2	158427	218,86	59,17	6	14,50	0,034	-	-	-	-	-
TUBE1	51175	216,94	162,25	3	23,57	0,072	50,44	47,67	3	2,31	0,048

Die Korrelation zwischen den relativen mRNA-Spiegeln aus den Mikroarray-Analysen und den relativen Genexpressionsanalysen mittels quantitativer *real time*-PCR konnte mit einem Korrelationskoeffizienten (R) nach Pearson von 0,738 als signifikant ermittelt werden (siehe Abbildung 3.12).

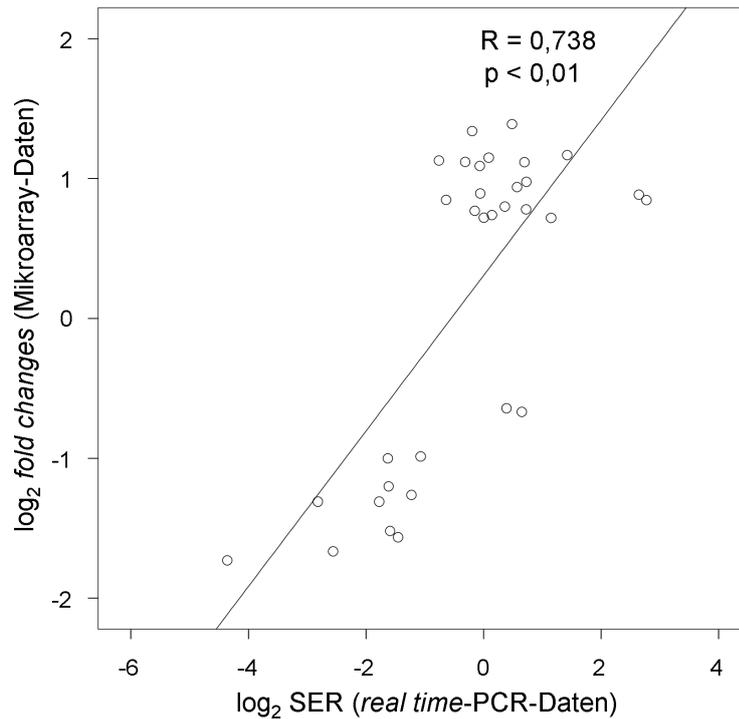


Abb. 3.12.: Korrelation der relativen *fold change*-Werte aus den Mikroarray-Experimenten und der SER (*standardised expression ratio*) aus den quantitativen *real time*-Experimenten (vergleiche Tabelle 3.23). Dargestellt sind die resultierenden Wertepaare mit der linearen Regressionsgeraden in einem Streudiagramm.

3.3.5. Validierung der ChIP-*chip*-Ergebnisse mittels konventioneller ChIP

Zur Verifizierung der aus den ChIP-*chip*-Experimenten gewonnenen Ergebnisse, wurde das Gen *tubulin, epsilon 1* (TUBE1), welches durch Filterung von Mikroarray- und ChIP-*chip*-Ergebnissen identifiziert (siehe Tabelle 3.22) und mittels *real time*-PCR validiert wurde (siehe Tabelle 3.23), mit konventionellem ChIP analysiert (siehe Abbildung 3.13). Die Berechnung der Rekrutierung von PLZF auf den TUBE1-Promotor erfolgte entsprechend der Gleichungen 2.5.

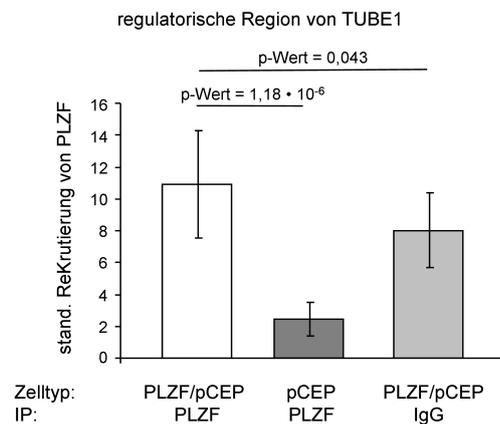


Abb. 3.13.: Analyse der Rekrutierung von PLZF auf der regulatorischen Region von TUBE1. Die fragmentierte und mittels ChIP angereicherte genomische DNA aus PLZF überexprimierenden HEK293T-Zellen (PLZF/pCEP) bzw. aus stabil-transfiziertem Leervektor (pCEP) wurde mit Hilfe von *real time*-PCR quantifiziert. Zur Standardisierung diente die Rekrutierung von Pol II auf den GAPDH-Promotor.

3.4. Identifizierung von Protein-Interaktionspartnern von PLZF

Um mögliche Interaktionspartner von PLZF zu identifizieren, wurde die *tandem affinity purification* (TAP)-Methode nach Glöckner *et al.* angewendet [115]. Dazu wurde PLZF mit zwei StrepII- und einem FLAG-tag (SF) in HEK293T-Zellen exprimiert. Das Ziel dieses Experimentes war die Reinigung von PLZF zusammen mit seinen Interaktionspartnern unter nativen Bedingungen und anschließender Identifikation der Proteine. Als Negativkontrolle diente die transiente Transfektion des Leervektors in HEK293T-Zellen. Eine detaillierte Beschreibung des Experimentes befindet sich in Kapitel 2.2.4.3.

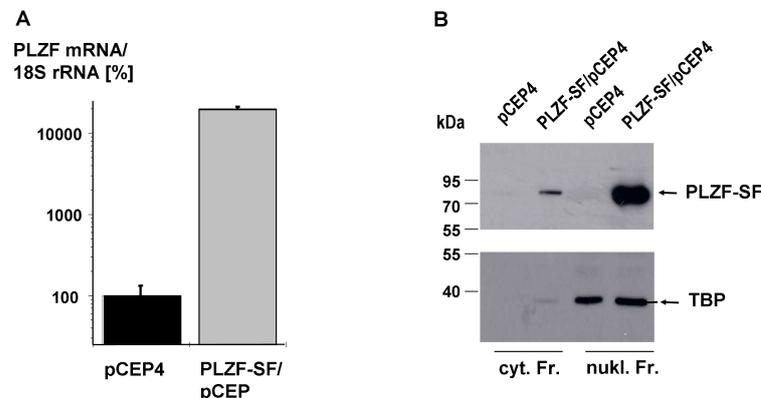


Abb. 3.14.: Expressionsanalyse von PLZF-SF in HEK293T-Zellen. Die RNA und die fraktionierten Proteine wurden aus PLZF-SF-überexprimierenden HEK293T-Zellen (PLZF-SF/pCEP) bzw. aus der Leervektorkontrolle isoliert (pCEP).

A. Die mRNA-Expression wurde mit Hilfe der *real-time* PCR gegen das *housekeeping*-Gen 18srRNA quantifiziert und auf die Kontrolle normalisiert.

B. Analyse der PLZF-SF Proteinexpression nach fraktionierter Proteinisolierung mittels Western-Blotting unter Verwendung der anti-PLZF und anti-TBP-Antikörper. cyt. Fr.: cytosolische Fraktion, nukl. Fr.: nukleäre Fraktion.

Die Analyse der PLZF-SF-exprimierenden HEK293T-Zellen auf mRNA- und auf Protein-Ebene bestätigte die Überexpression von PLZF (siehe Abbildung 3.14). Zusätzlich konnte gezeigt werden, dass PLZF hauptsächlich im Zellkern lokalisiert vorlag (siehe Abbildung 3.14B). Die elektrophoretische Untersuchung der Proteine nach der Isolierung und Reinigung der Proteine mit Hilfe der *tags* zeigte zehn distinkte Proteine (siehe Abbildung 3.15). Diese wurden mittels Massenspektrometrie identifiziert. Die Zuordnung der Peptidsequenzen ergab, dass in allen Proben Fragmente von PLZF enthalten waren, was auf eine mögliche Degradierung des Transkriptionsfaktors während des Experimentes zurückzuführen ist (vergleiche Tabelle 3.24). Weiterhin wurden einige Hitzeschockproteine detektiert (HSP7C, HSP71, GRP75, HS71L), zwei Untereinheiten von Tubulin (TBA1A und TBB5) und das *charged multivesicular body*-Protein (CHMP5).

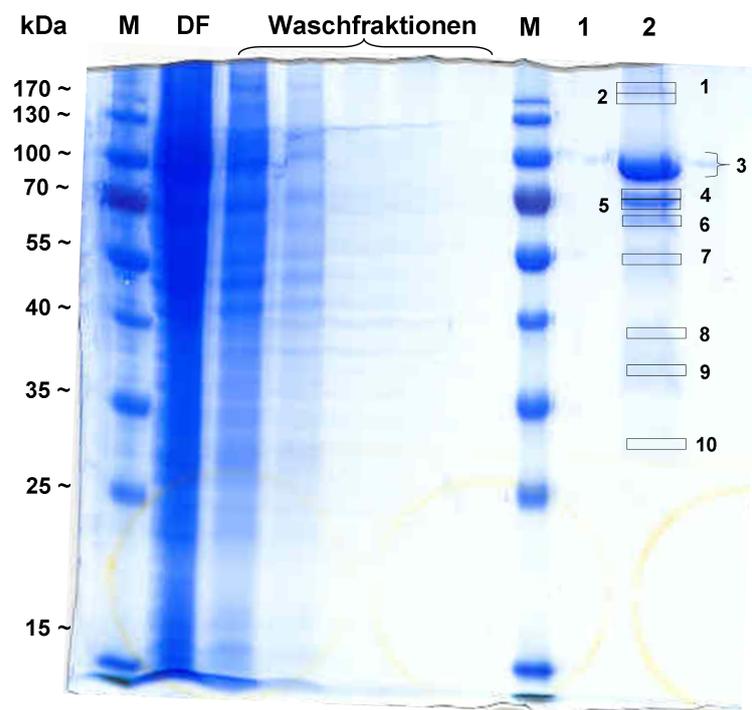


Abb. 3.15.: Elektrophoretische Analyse von PLZF-SF und seinen Interaktionspartnern nach zweifacher Affinitätsreinigung (TAP). Nach Zellyse wurde PLZF-SF unter nativen Bedingungen zunächst an eine anti-Strep-Matrix und dann an eine anti-FLAG-Matrix gebunden und gereinigt. Anschließend wurden PLZF und seine Interaktionspartner eluiert und mittels einer 7,5-%igen SDS-PAGE aufgetrennt. Erkennbare, distinkte Signale (1-10) wurden aus dem Coomassie-gefärbten Gel geschnitten und für eine massenspektrometrische Untersuchung vorbereitet. DF: Durchfluss, M: Marker, Spur 1: Kontrollprobe (insertloser Vektor), Spur 2: PLZF-SF-Probe.

Tab. 3.24.: Massenspektrometrische Analyse der Interaktionspartner von PLZF nach TAP. Die Proteine aus dem Polyacrylamidgel wurden extrahiert und mit Trypsin in kleine Peptide verdaut. Diese wurden mit einer nano-HPLC aufgetrennt und in einem ESI-Massenspektrometer vermessen. Die Zuordnung der kalkulierten Fragmentsequenzen erfolgte mittels Mascot anhand von Eintragungen in der SwissProt-Datenbank. Tabellarisch dargestellt sind die Probennummern (vergleiche Abbildung 3.15), die Masse der zugeordneten Proteine, die *accession*-Nummer und die Beschreibung der Proteine aus der Swissprot-Datenbank.

Probennr.	Masse (Da)	accession-Nr.	Beschreibung (Swissprot)
1	74226	ZBT16_HUMAN	<i>Zinc finger and BTB domain-containing protein 16, GN=ZBTB16</i>
2	74226	ZBT16_HUMAN	<i>Zinc finger and BTB domain-containing protein 16</i>
3	74226	ZBT16_HUMAN	<i>Zinc finger and BTB domain-containing protein 16</i>
4	70854	HSP7C_HUMAN	<i>Heat shock cognate 71 kDa protein</i>
	70009	HSP71_HUMAN	<i>Heat shock 70 kDa protein 1A/1B</i>
	74226	ZBT16_HUMAN	<i>Zinc finger and BTB domain-containing protein 16</i>
	73635	GRP75_HUMAN	<i>Stress-70 protein, mitochondrial</i>
5	70009	HSP71_HUMAN	<i>Heat shock 70 kDa protein 1A/1B</i>
	70331	HS71L_HUMAN	<i>Heat shock 70 kDa protein 1-like</i>
	74226	ZBT16_HUMAN	<i>Zinc finger and BTB domain-containing protein 16</i>
6	74226	ZBT16_HUMAN	<i>Zinc finger and BTB domain-containing protein 16</i>
	70854	HSP7C_HUMAN	<i>Heat shock cognate 71 kDa protein</i>
7	74226	ZBT16_HUMAN	<i>Zinc finger and BTB domain-containing protein 16</i>
	50104	TBA1A_HUMAN	<i>Tubulin alpha-1A chain OS=Homo sapiens GN=TUBA1A</i>
	49369	TBB5_HUMAN	<i>Tubulin beta chain OS=Homo sapiens GN=TUBB</i>
8	74226	ZBT16_HUMAN	<i>Zinc finger and BTB domain-containing protein 16</i>
9	74226	ZBT16_HUMAN	<i>Zinc finger and BTB domain-containing protein 16</i>
10	74226	ZBT16_HUMAN	<i>Zinc finger and BTB domain-containing protein 16</i>
	24555	CHMP5_HUMAN	<i>Charged multivesicular body protein 5 GN=CHMP5</i>

4. Diskussion

4.1. Transkriptionelle Effekte des *full length* (P)RR

Der (P)RR ist u. a. im Renin-Angiotensin-System (RAS) involviert und spielt eine entscheidende Rolle bei der Entstehung von renalen und kardialen Endorganschäden [32]. Die molekularen Mechanismen dieses Rezeptors sind noch nicht vollständig geklärt. Die Bindung der Liganden Renin bzw. Prorenin initiiert eine Signaltransduktionskaskade, in der neben der Aktivierung von MAPK auch der Interaktionspartner und Transkriptionsfaktor PLZF involviert ist. Zur Charakterisierung des (P)RR-PLZF-Signaltransduktionsweges hinsichtlich Transkriptom und genomweiten PLZF-DNA-Interaktionen wurden in dieser Arbeit verschiedene Interventionen angewendet, um distinkte Signaltransduktionswege *downstream* des (P)RR zu analysieren (siehe Abbildung 1.8).

Der Fokus lag zunächst auf der Analyse des Transkriptionsprofils von neuronalen KELLY-Zellen nach Suppression des (P)RR mittels siRNA (Ma(si(P)RR)). Die funktionelle Einordnung der signifikant differenziell regulierten Gene, zeigten eine Überrepräsentation von Genen in Signaltransduktionsprozessen wie z. B. MAPK-Kaskaden (siehe Tabellen 3.4 und 3.2). Neben den in Tabelle 3.2 genannten Signalwegen wurde eine signifikant veränderte mRNA-Expression von MAPKAP-2, MSK1 (RPS6KA5), CREB, MEF2 und STAT1 detektiert, welche *downstream* von der p38-MAPK lokalisiert sind bzw. ASK1 (MAP3K5) und MEKK1, die *upstream* der p38-MAPK liegen. Außerdem konnten Gene detektiert werden, die mit dem TGF β -Signalweg assoziiert sind, z. B. TGFB2, TAB2, ENG, GDF15, BAMBI, SMAD4, ACVR2A, ACVRL1, SMAD7 und CD109 (vergleiche Tabelle B1). Der Einfluss von (P)RR auf die Expression dieser MAPK wird wahrscheinlich ligandenunabhängig vermittelt, da kein Renin

oder Prorenin zusätzlich zum Zellkulturmedium zugefügt wurde und die physiologische (Pro-)Reninkonzentration im Serum zu gering ist, um eine biologische Wirkung zu erzielen. Die physiologische Plasmakonzentration von Prorenin liegt im pikomolaren Bereich und ist damit bis zu 100-mal höher als die des Renins [136]. Eine ligandenabhängige Aktivierung des (P)RR erfolgt bei deutlich höheren Konzentrationen [137], wobei die Dissoziationskonstanten des Rezeptors mit (Pro-)Renin im nanomolaren Bereich (5 - 20 nM) liegen [16, 2, 15].

Diverse Studien zeigten, dass durch Zugabe von Renin bzw. Prorenin verschiedene (P)RR-vermittelte intrazelluläre Signalwege beeinflusst werden, z. B. durch Phosphorylierung der p44/p42-MAPK [2] und durch Phosphorylierung der p38 MAPK und HSP27 [28]. Untersuchungen des Transkriptionsprofils von Zellen unter Stimulation mit (Pro-)Renin bzw. Angiotensin II wurden von Saris *et al.* und Melnyk *et al.* durchgeführt. Unter den am meisten differenziell exprimierten Genen des untersuchten Transkriptionsprofils von humanen mesangialen Zellen unter Renin- und Prorenin-Inkubation [126] befinden sich fünf Gene - GK1, PLK2, SOX4, RAPGEF5 und Smad7 – die auch in dem durchgeführten Mikroarray-Experiment Ma(si(P)RR) einen signifikant veränderten mRNA-Spiegel aufwiesen (siehe Tabelle B1). Ein Grund für diese Übereinstimmung könnte eine ligandenunabhängige Regulation dieser Gene sein, also eine Regulation, die nicht (Pro-)Renin-vermittelt erfolgt, sondern über die konstitutive Aktivität des Rezeptors.

In siRNA-Experimenten gegen den (P)RR unter Stimulation mit (Pro-)Renin konnte eine (P)RR-vermittelte erhöhte Fibronektinexpression nachgewiesen werden [128, 26]. Im Gegensatz dazu und entsprechend der Beobachtungen von Saris *et al.* konnte in dieser Arbeit in Ma((P)RR) ebenso wie in Ma(Bafi) ein signifikant erhöhter mRNA-Spiegel von Fibronektin (FN1) beobachtet werden. Fibronektin ist eine wichtige Komponente der extrazellulären Matrix und ist dysreguliert bei fibrotischen Erkrankungen und in der Tumorgenese [138]. Die Bedeutung und Expression von Fibronektin scheint zelltypspezifisch zu sein oder ist abhängig von einer konstitutiven bzw. ligandenvermittelten Aktivität des (P)RR, da die (P)RR-Aktivierung die Fibronektinexpression

sowohl positiv als auch negativ regulieren kann. Die Bedeutung der Zellspezifität von (P)RR-Effekten wird weiter unterstützt durch die Regulation von Nox4, einem Teil des NADPH-Oxidase-Komplexes. In HEK-Zellen ist dieses Transkript durch (P)RR-Aktivität hochreguliert [128], wobei in KELLY-Zellen eine (P)RR-vermittelte negative Regulation von Nox4 detektiert wurde. Eine positive Regulation von Nox4 wurde durch PLZF-Überexpression gefunden (siehe Tabelle 3.23). Hinsichtlich weiterer Gene, die relevant für die Pathogenese der Fibrose sind, konnte die Beobachtung von He *et al.* bestätigt werden, dass der (P)RR *per se* die Matrix-Metalloprotease MMP-2 reprimiert. In Mikroarray Ma(PLZF, H) konnte ein mRNA-Spiegel für MMP-2 von 1,94 detektiert werden, was eine Hochregulierung durch PLZF belegt. Im Gegensatz zu HEK-Zellen, in welchen die Suppression des (P)RR die Freisetzung und Synthese von Kollagen 4 reprimiert [127], konnten in Ma(si(P)RR) steigende mRNA-Spiegel für eine Gruppe von Kollagentypen (3, 4, 6, 7, 9, 11, 12, 14, 15, 24 und 27) in neuronalen Zellen beobachtet werden.

4.1.1. Transkriptionelle Effekte der V-ATPase-assoziierten Isoform des (P)RR

Wie bereits beschrieben, ist ein Teil des (P)RR mit der V₀-Domäne von protonenpumpenden V-ATPasen assoziiert [1]. Durch Supprimierung der Expression von (P)RR werden daher auch die Eigenschaften der V-ATPasen beeinflusst, bei denen die akzesorische Untereinheit involviert ist. Cruciat *et al.* zeigten, dass sowohl siRNA gegen den (P)RR als auch der Einsatz des V-ATPase-Inhibitors Bafilomycin, welcher ebenfalls am membrangebundenen V₀-Komplex bindet [139], die ligandenunabhängige Signaltransduktion im Wnt-Signalweg hemmen [46]. Zusätzlich wiesen Advani *et al.* nach, dass die ligandenvermittelte Signalweitergabe des (P)RR durch Bafilomycin gehemmt wird [43].

Um die V-ATPase-assoziierten Funktionen des (P)RR zu ermitteln, wurde zunächst das Transkriptionsprofil unter spezifischer Inhibierung der V-ATPasen durch Bafilo-

mycinbehandlung in KELLY-Zellen analysiert (Ma(Bafi)), und anschließend die gemeinsam regulierten Gene untersucht. Die Inhibierung von protonentransportierenden V-ATPasen führte zu einer erhöhten Expression von Genen, die mit Transportprozessen assoziiert sind, u. a. mit dem Endosomentransport, dem ER-Golgi-vesikelvermittelten und dem Golgi-vesikelvermittelten Transport (siehe Tabelle 3.6). Diesbezüglich wurde eine signifikante Anzahl an Genen, die der Funktion von Lysosomen zugeordnet werden, identifiziert. Abbildung 4.1 stellt lysosomenassoziierte Hydrolasen und Membranproteine dar, die in Ma(Bafi) signifikant hochreguliert waren. Unter anderem wurde das *lysosomal-associated membrane protein 2* (LAMP2) identifiziert. LAMP2 dient als später endosomaler/lysosomaler Marker und zeigte eine verstärkte Expression in (P)RR-defizienten Kardiomyocyten [63], Glomeruli [129] und Podozyten [62]. Ferner wird durch die Inhibierung der V-ATPase durch Bafilomycin die Expression von (P)RR 1,6-fach erhöht (Kirsch *et al.*, unveröffentlicht).

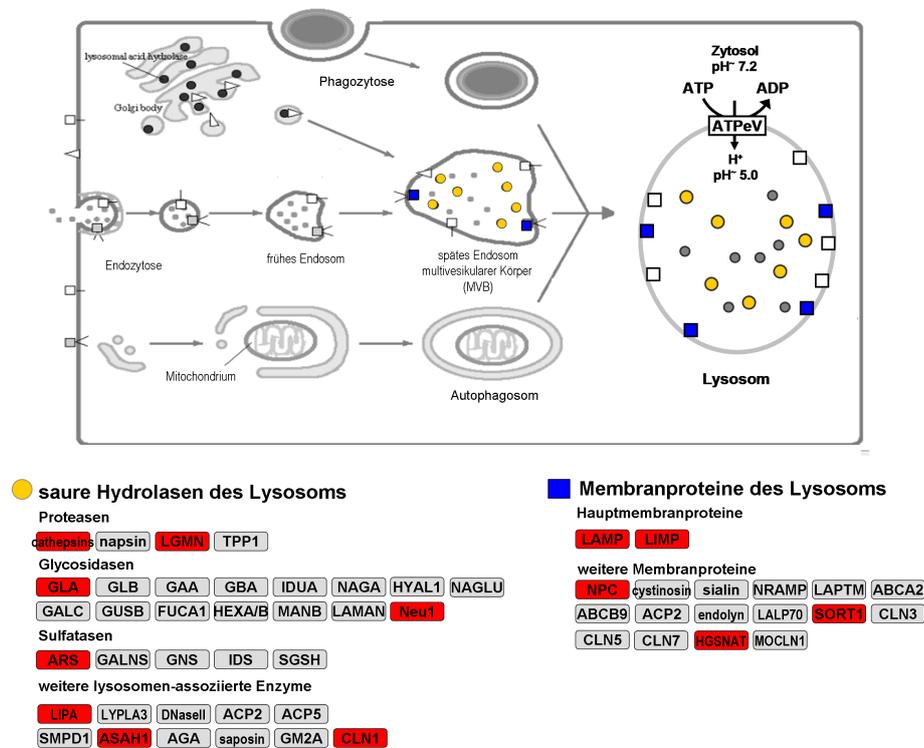


Abb. 4.1.: Funktionelle Zuordnung von assoziierten Molekülen in der KEGG-Kategorie „Lysosom“ (hsa04142). Moleküle, deren Genexpression differenziell reguliert waren, sind rot hinterlegt. AP3M2: *adaptor-related protein complex 3, mu 2 subunit*; ARSB: *arylsulfatase B*; ASAH1: *N-acylsphingosine amidohydrolase (acid ceramidase) 1*; CLN1: (PPT1) *palmitoyl-protein thioesterase 1*; CTSA: *cathepsin A*; CTSB: *cathepsin B*; GLA: *galactosidase, alpha*; HGSNAT: *heparan-alpha-glucosaminide N-acetyltransferase*; LAMP2: *lysosomal-associated membrane protein 2*; LGMN: *legumain*; LIMP: (SCARB2) *scavenger receptor class B, member 2*; LIPA: *lipase A, lysosomal acid, cholesterol esterase*; NPC1: *Niemann-Pick disease, type C1*; NEU1: *sialidase 1 (lysosomal sialidase)*; SORT1: *sortilin 1*.

Die Anzahl der Gene, die sowohl unter Suppression des (P)RR als auch nach Hemmung der V-ATPase-Aktivität durch Bafilomycin eine signifikant differenzielle mRNA-Expression aufwiesen, betrug 238 und entsprach 14,4% der gesamten differenziell exprimierten Gene von Ma(si(P)RR) und 13,3% der differenziell exprimierten Gene von Ma(Bafi) (siehe Tabelle 3.20). Die gleichsinnig regulierten Gene, also solche, die in beiden Interventionen entweder jeweils verringert oder verstärkt exprimiert wurden, konnten ebenfalls in erster Linie mit Proteintransportprozessen assoziiert werden (vergleiche Tabelle 3.8).

Die Tatsache, dass der jeweils größere Anteil der differenziell exprimierten Gene (85,6% bzgl. Ma(si(P)RR) und 86,7% bzgl. Ma(Bafi)) außerhalb der Schnittmenge lag, bedeutet, dass jede Intervention für sich darüber hinaus unabhängige, individuelle Eigenschaften oder Funktionen aufweist. Dies ließe sich damit erklären, dass der (P)RR nicht nur über seine akzessorische Untereinheit in Assoziation mit V-ATPasen Effekte ausübt bzw. dass sich die V-ATPasen auf unterschiedliche Weise zusammensetzen können: entweder nicht mit dem (P)RR, mit dem *full length* (P)RR, mit der M8-9-Domäne oder mit beiden [45].

Weiterhin ist die Inhibition der V-ATPasen durch Bafilomycin und seine Wirkung – diese reicht von protektiven Effekten bei geringeren Konzentrationen bis hin zur Akkumulation von Autophagosomen mangels vesikulärer Azidifikation und damit einhergehender Apoptose – abhängig von der eingesetzten Konzentration [140, 141].

4.2. PLZF und sein Einfluss auf das Transkriptionsprofil in neuronalen und epithelialen Zellen

PLZF spielt als Transkriptionsfaktor eine entscheidende Rolle in den unterschiedlichsten Prozessen, wie z. B. in der Hämatopoese, der Zellproliferation und der Apoptose [79]. In dieser Arbeit wurde das Transkriptionsprofil von PLZF-überexprimierenden HEK293T-Zellen und von den phänotypisch bereits vorcharakterisierten PLZF-HA-überexprimierenden neuronalen KELLY-Zellen untersucht [131].

Die relativ hohe Anzahl an differenziell exprimierten Genen von Ma(PLZF;K) ist darin begründet, dass die Werte der Signale unter Verwendung des SAM-Algorithmus auch bei einer relativ hohen FDR nicht vom Erwartungswert abweichen und somit die Signifikanzschwelle herabgesetzt wurde. Die Validität der Ergebnisse zeigt sich dennoch in einem ähnlichen Transkriptionsprofil im Sinne der funktionellen Analyse im Vergleich

zu PLZF-überexprimierenden HEK293T-Zellen und einer relativ großen Schnittmenge zwischen Ma(PLZF;H) und Ma(PLZF;K) mit 33% bezogen auf Ma(PLZF;H). Die Gensignaturen der einzelnen Transkriptionsprofile von Ma(PLZF;K) und Ma(PLZF;H) zeigten Gemeinsamkeiten bezüglich der Zuordnung der signifikant regulierten Gene zu Entwicklungsprozessen, insbesondere im Hinblick auf Gehirnentwicklung (siehe Tabellen 3.4 und 3.10). Durch die funktionelle Analyse des Transkriptionsprofils der neuronalen KELLY-Zellen (Ma(PLZF;K)) konnte darüber hinaus eine überrepräsentative Anzahl von Genen bezüglich Zellzyklusarrest detektiert werden, was mit den Beobachtungen von Seidel *et al.* unter Verwendung dieser Zelllinie konsistent ist. Innerhalb der Kategorie Zellzyklusarrest konnten Gene, wie z. B. Cyclin-abhängigen Kinase-Inhibitoren 2B (p15), 2D (p19) und 3 mit einer verstärkten mRNA-Expression nachgewiesen werden. Anti-proliferative Effekte, die durch PLZF-vermittelt werden und zu einem Zellzyklus-Arrest in der G1-Phase mit anschließender Apoptose führten, konnten auch in verschiedenen anderen Zelllinien nachgewiesen werden [95, 142, 80]. In diesem Zusammenhang sei darauf hingewiesen, dass PLZF auch pro-proliferative Effekte vermitteln kann [3]. Weiterhin konnte im Hinblick auf den (P)RR bezüglich Ma(PLZF;K) eine 0,63-fache verringerte mRNA-Expression festgestellt werden, womit die hemmende Wirkung von PLZF auf den (P)RR-Promotor bestätigt wird, welche Schefe *et al.* in nicht-neuronalen Zellen gezeigt haben [3, 30]. Daneben konnte ein reprimierender Einfluss auf weitere V-ATPase-Einheiten gefunden werden (siehe Tabelle B5), was auf eine Koregulation dieses molekularen Komplexes schließen lässt. Im Gegensatz dazu konnte in PLZF-überexprimierenden HEK293T-Zellen keine signifikant differenzielle Expression des (P)RR nachgewiesen werden.

Die funktionelle Analyse der differenziell exprimierten Gene aus Ma(PLZF;H) assoziierte eine Reihe von Genen, die im Notch-Signalweg involviert sind, wobei HES5, PTCRA, DLL3, NOTCH1, MAML3, NOTCH3, JAG1 und DLL1 eine erhöhte mRNA-Konzentration aufwiesen und CIR1 und SNW1 eine verringerte Konzentration im Vergleich zur Kontrolle (siehe Abbildung 4.2). Der Notch-Signalweg ist evolutionär und phylogenetisch hoch konserviert und reguliert eine Vielzahl von Entwicklungsprozessen

[143, 144]. Notch1 wird in hämatopoetischen Vorläuferzellen im Knochenmark exprimiert und spielt u. a. eine Rolle bei der Hämatopoese [143]. In undifferenzierten multipotenten hämatopoetischen Vorläuferzellen konnte eine hohe Expression von PLZF nachgewiesen werden, die mit dem Differenzierungsgrad der Zellen abnimmt [145]. Weiterhin sind sowohl PLZF als auch Notch in der Erhaltung von Stammzellen involviert [146, 91, 92]. Bei der Untersuchung des Fusionsproteins PLZF/RAR in U937 hämatopoetischen Vorläuferzellen konnte ein direkter Zusammenhang von PLZF und der Aktivierung des Notch-Signalwegs nachgewiesen werden [147].

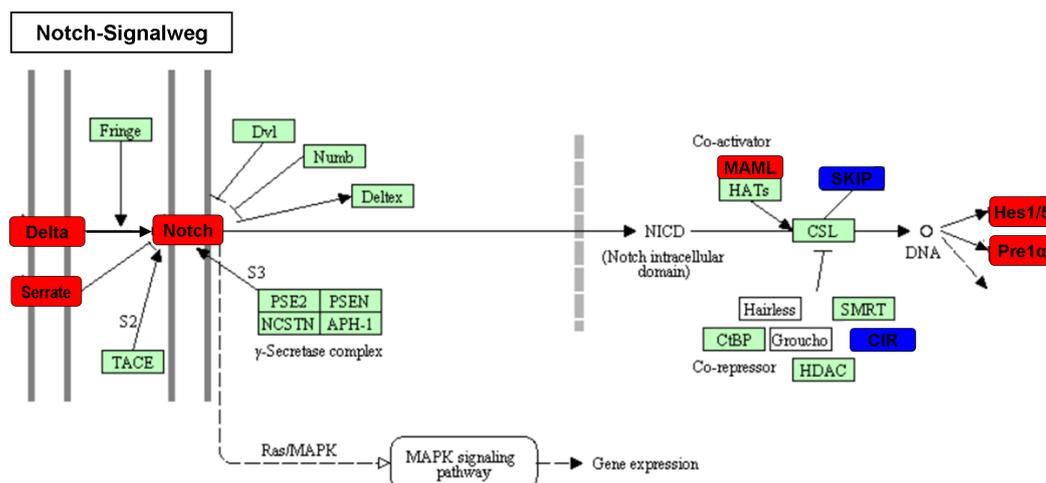


Abb. 4.2.: Funktionelle Interaktion von Molekülen im Notch-Signalweg (KEGG-Kategorie hsa 04330). Die Gene, die einen signifikant erhöhten mRNA-Spiegel in Ma(PLZF; H) aufwiesen, sind rot hinterlegt und diejenigen mit einem signifikant verringerten mRNA-Spiegel, sind blau markiert. CIR1: *corepressor interacting with RBPJ 1*; DLL1: *delta-like 1*; DLL3: *delta-like 3*; HES5: *hairy and enhancer of split 5*; MAML3: *mastermind-like 3*; NOTCH1: *notch 1*; NOTCH3: *notch3*; PTCRA: *pre T-cell antigen receptor alpha*; serrate (JAG1): *jagged 1*; SKIP (SNW1): *SNW domain containing 1*.

Im Kontext einer PLZF-vermittelten Genregulation könnte Zellspezifität von Relevanz sein. Die Anzahl der gemeinsam regulierten Gene von Ma(PLZF; K) und Ma(PLZF; H) betrug 541, was 33% aller differenziell regulierten Gene von PLZF-überexprimierenden HEK293T-Zellen entsprach. Innerhalb dieser Schnittmenge zeigten 90 Gene eine gegensätzliche Regulierung (vergleiche Abbildung 3.4). Darunter befand sich beispielsweise das *inhibitor of DNA binding 3* (ID3)-Gen. ID-Proteine können zelluläre Differenzie-

rung verhindern und pro-proliferative Effekte ausüben [148]. Sie tragen zur Entwicklung des Nervensystems bei [149] und sind in humanen Tumoren dysreguliert [148]. In dieser Promotionsarbeit konnte gezeigt werden, dass die PLZF-Überexpression in neuronalen Zellen mit erhöhten und in epithelialen Zellen mit verringerten ID3-Transkript-Spiegeln assoziiert war (Tabelle 3.9 und 3.12). Dies wurde mittels *real time*-PCR bestätigt (siehe Tabelle 3.23). Außerdem konnte eine verringerte mRNA-Expression von ID1 und ID2 in Ma(PLZF; H) gezeigt werden. In PLZF-überexprimierenden Jurkat-Zellen hingegen sind ID1 und ID3 hochreguliert [96]. Auch die Transduktion von PLZF in myeloiden Vorläuferzellen führte zu einem erhöhten ID2-mRNA-Spiegel [130]. Ein weiteres Beispiel für die zellspezifische Genregulation ist der Transkriptionsfaktor Myc. In myeloiden Vorläuferzellen wird die Myc-mRNA-Expression durch PLZF aktiviert [130], in embryonischen Fibroblasten hingegen wird die Myc-mRNA-Expression durch PLZF reprimiert [150]. In PLZF-überexprimierenden HEK-Zellen wies das Myc-verwandte Gen MYCN in dem Experiment Ma(PLZF; H) einen erhöhten mRNA-Spiegel auf.

Die Transkriptionsprofile beider PLZF-überexprimierenden Zelllinien zeigten eine signifikante Anzahl von Genen, die mit Kardiomyopathien assoziiert werden (siehe Tabelle 3.11 und 3.14). Ebenso beeinflusst der (P)RR solche Gene (siehe Tabelle 3.3). Interessanterweise konnten Mahmud *et al.* in Herzgewebe von Patienten mit dilatativer Kardiomyopathie eine stark erhöhte Expression des (P)RR sowohl auf mRNA- als auch auf Protein-Ebene nachweisen [53]. Eine (P)RR-Überexpression in Rattenherzen führte zu einer erhöhten Protein-Protein-Interaktion zwischen (P)RR und PLZF [29]. Zusätzlich zeigte die durch Diabetes verursachte erhöhte kardiale (P)RR-Expression in Mäusen eine verstärkte Translokalisierung von PLZF in den Zellkern [31]. Dies impliziert, dass die von Schefe *et al.* identifizierte Signaltransduktionskaskade ((P)RR – PLZF) bei kardialen Erkrankungen eventuell eine wichtige Bedeutung hat.

Darüber hinaus identifizierte die IPA-Analyse in allen drei Interventionen (Bafilomycinbehandlung, PLZF-Überexpression und (P)RR-Suppression) eine signifikante Anzahl von Genen in der Kategorie Bluthochdruck (siehe Tabelle 3.4).

Eine weitere mögliche Rolle von PLZF bezüglich kardialer Hypertrophie ist darin be-

gründet, dass die PLZF-Überexpression sowohl in epithelialen Zellen als auch in neuronalen Zellen eine erhöhte Expression des Transkriptionsfaktors GATA-4 zur Folge hat (siehe Tabellen 3.9 und 3.12). In Zusammenhang mit diesem Krankheitsbild konnten Wang *et al.* eine erhöhte Expression von GATA-4 *downstream* von Angiotensin II nachweisen [105]. GATA-4 ist in der Entwicklung und Funktion des Herzens involviert und stellt ein Schlüsselprotein bei kardialen Hypertrophien dar [106].

4.3. Einflüsse auf entwicklungsbiologische Prozesse

Wie mittels Netzwerkanalysen bestätigt werden konnte, sind sowohl PLZF als auch der (P)RR in Entwicklungsprozessen involviert. Unterschiedliche konditionelle *knockout*-Modelle wiesen eine entscheidende Rolle des (P)RR-Gens hinsichtlich Herz- [63] und Nierenentwicklung auf [129, 151]. Bezüglich des Nervensystems wird PLZF in zeitlich und räumlich begrenzten Mustern während der Gehirnentwicklung exprimiert [152]. Die Bedeutung des (P)RR diesbezüglich zeigt sich durch eine Mutation im (P)RR-Gen, welche eine X-chromosomal vererbte mentale Retardation verbunden mit Epilepsie in Menschen verursacht [59]. Ein (P)RR-mutiertes Zebrafisch-Modell zeigte eine reduzierte Kopfgröße und eine ZNS-Nekrose [64]. Des Weiteren sind V-ATPasen essenziell für die Knochenresorption durch Osteoklasten mit der daran gekoppelten Knochenmatrixbildung durch Osteoblasten [153]. Verschiedene Bafilomycinderivate wurden in Osteoporose-Tiermodellen erfolgreich getestet [154]. PLZF wiederum scheint in der frühen Osteoblastendifferenzierung involviert zu sein [155]. Alle diese Beobachtungen sind konsistent mit der IPA-Analyse der Transkriptionsprofile, die die Bedeutung der (P)RR-PLZF Kaskade in verschiedenen Entwicklungsprozessen herausstellt.

4.4. Effekte von Genistein

Genistein ist ein sekundärer Pflanzenmetabolit, welcher als *natural selective estrogen receptor modulator* (SERM) klassifiziert wird und verschiedenste pharmakodynami-

sche Effekte bewirkt. Dieses Isoflavon interagiert mit den Östrogen-Rezeptoren alpha (ESR1) und beta (ESR2) [156, 157] und vermittelt Effekte über Histon-Modifikationen und DNA-Methylierungen [158] sowie über NF- κ B- [159] und Smad-Signaltransduktion [151]. Weiterhin inhibiert Genistein Tyrosinkinasen [160] und den Wnt-Signalweg [161]. Senbonmatsu *et al.* setzte Genistein als Inhibitor der nuklearen Translokation von PLZF ein [81]. Konsistent mit diesen pleiotropen Effekten von Genistein konnten die signifikant differenziell regulierten Gene von neuronalen KELLY-Zellen nach Inkubation mit diesem Isoflavon diversen biologischen Prozessen zugeordnet werden, wie z. B. der Ionenhomöostase, Entwicklungsprozessen und der Immunantwort. Die IPA-Analyse zeigte neben Atherosklerose einen Einfluss in hämatopoetischen Prozessen. Auch PLZF spielt eine Rolle in der Hämatopoese [79]. Der Vergleich der Transkriptionsprofile von genisteinbehandelten Zellen mit einer stabilen PLZF-HA-Überexpression ergab eine Schnittmenge von 31%, relativ zur Gesamtanzahl der differenziell regulierten Gene bezogen auf Ma(Geni). Die Schnittmenge von PLZF-überexprimierenden HEK293T-Zellen im Vergleich zu genisteinbehandelten Zellen betrug 11%. Eine Erklärung für diese Unterschiede könnten zellspezifischen Regulationen sein. Die Wirkung von Genistein ist abhängig von der eingesetzten Konzentration, der Behandlungszeit und vom Zelltyp [162].

Einen Einfluss auf die Regulation von (P)RR im Mikroarray-Experiment Ma(Geni) konnte nicht nachgewiesen werden. Kirsch *et al.* (unveröffentlicht) konnten zeigen, dass durch Genistein sowohl die Promotoraktivität als auch die mRNA-Expression von (P)RR in HeLa-Zellen verstärkt werden. Ebenso konnte eine erhöhte Promotoraktivität nach Einsatz von siRNA gegen PLZF nachgewiesen werden. Durchgeführte siRNA-Experimente gegen PLZF im Rahmen dieser Promotionsarbeit führten zu keiner ausreichenden Supprimierung von PLZF auf mRNA-Ebene, sodass eine Aussage bezüglich einer PLZF-vermittelten verringerte Expression von (P)RR in diesem Kontext nicht möglich war.

4.5. Zielgene von PLZF

Zur weiteren Validierung der Mikroarray-Daten wurden neben *real time*-PCR-Experimenten, außerdem ChIP-*chip*-Analysen durchgeführt und die Rekrutierung von Pol II bzw. PLZF auf Promotorregionen analysiert. Promotorregionen umfassen in der Regel die DNA-Sequenz, die sich *upstream* der transkribierten Sequenz befindet; häufig überlappen sie auch mit dem ersten Exon eines Gens [163]. Die Gene, auf deren Promotor die Pol II-Rekrutierung durch die Überexpression von PLZF induziert war, wurden mittels anti-Pol II-Immunopräzipitationen identifiziert. Von den resultierenden 222 Genen, wiesen 67 Gene eine signifikant differenziell regulierte Expression auf. Die funktionelle Untersuchung dieser Gene zeigte ähnliche Assoziationen zu pathophysiologischen Netzwerken wie die der Mikroarrayanalyse (Diabetes mellitus, Atherosklerose und affektive Psychosen). Die anschließende Analyse bezüglich einer PLZF-Rekrutierung durch anti-PLZF-Immunopräzipitation resultierte in neun Gene, die alle einen mehr als zweifach veränderten mRNA-Expressionsspiegel aufwiesen. Fünf davon (CXCL11, FAM114A2, TSTD2, TUBE1 und STEAP2) wurden auch im ChIP-*chip*-Experiment Cc6 identifiziert, basierend auf einer PLZF-Überexpression ohne *tag* in HEK293T-Zellen (siehe Tabelle 3.22). Dies deutet darauf hin, dass die beobachteten Regulationen zelltypunabhängig sind und der *tag* selbst keinen Einfluss hat. Vier der oben genannten neun Gene enthielten mindestens ein PLZF *cis*-Element, was auf eine direkte Regulation durch den Transkriptionsfaktor hindeutet. Ein Gen, TUBE1, konnte auch im Mikroarray-Experiment Ma(siP)RR als signifikant verstärkt exprimiert identifiziert werden. TUBE1 gehört zur Gruppe der ϵ -Tubuline und ist in der Verdopplung von Zentriolen und in der Bildung von Mitosespindeln involviert [164].

4.6. Limitationen der Genexpressionsanalysen

Die Heterogenität der Effekte der verschiedenen Interventionen - die Behandlung von Zellen mit den Substanzen Bafilomycin und Genistein sowie der Einsatz von siRNA ge-

gen (P)RR und die Überexpression von PLZF - zeigte sich darin, dass sich die meisten regulierten Gene außerhalb der Schnittmengen befanden. Generell besteht bei *large-scale* Untersuchungen, zu denen Mikroarray-Analysen gehören, inklusive der anschließenden Auswertungen der resultierenden Datensätze, die Möglichkeit, dass signifikant regulierte Gene oder kleine Cluster von Genen aus dem Fokus rücken, da diese keinem Signalweg bzw. Netzwerk zugeordnet werden können [109]. Hinzu kommt, dass jede im Rahmen dieser Arbeit angewendete Intervention auch mit weiteren Auswirkungen verbunden ist, die unter Umständen die Schlüsselgene überlagern. SiRNA-vermittelte *off-target*-Effekte können zu veränderten basalen Expressionen vieler Gene führen, die beispielsweise durch unspezifische Stressreaktionen in der Zelle oder durch Aktivierung von Zytokinen über *toll-like*-Rezeptoren ausgelöst werden können [165, 166, 167]. Weiterhin fungiert Bafilomycin A1, unabhängig von seiner inhibierenden Wirkung bezüglich V-ATPasen, als Ionophor und induziert die Aufnahme von Kaliumionen in Mitochondrien [168]. Dies hat zur Folge, dass zusätzlich noch weitere Gene in ihrer Expression beeinflusst werden. Hinsichtlich der Untersuchung von PLZF-vermittelten Effekte wurden die phänotypisch vorcharakterisierten PLZF-HA-überexprimierenden KELLY-Zellen verwendet. Eine *tag*-lose PLZF-Überexpression konnte lediglich in HEK293T-Zellen erfolgreich durchgeführt werden jedoch nicht in KELLY-Zellen. Wie oben erwähnt, führten siRNA-Experimente gegen PLZF zu keiner ausreichenden Supprimierung von PLZF auf mRNA- und Proteinebene, sodass ein Vergleich mit dem Transkriptionsprofil von genisteinbehandelten Zellen nicht erfolgen konnte. Auch ist zu bedenken, dass die Ergebnisse dieser Arbeit auf Zellkulturexperimenten basierten und eine entsprechende Umsetzung in *in vivo*-Bedingungen spekulativ bleibt und noch betrachtet werden muss.

4.7. Protein-Interaktionspartner von PLZF

Einige der Interaktionspartner von PLZF wie der (P)RR [3], der AT2R [81] oder HDAC1 [84] sind bereits bekannt. Zur Identifikation von weiteren Interaktionspart-

nen wurde im Rahmen dieser Arbeit erstmals die TAP-Methode unter Verwendung von PLZF-SF-überexprimierenden HEK293T-Zellen durchgeführt.

Mittels massenspektrometrischer Analyse wurden eine Reihe von Hitzeschockproteinen detektiert. Diese Hitzeschockproteine sind in die korrekte Faltung von Proteinen sowie in die Translokation von Polypeptiden durch Membranen involviert. Eine verstärkte Expression dieser Proteine konnte bei erhöhten Temperaturen oder Stressbedingungen wie Infektionen, Inflammationen, Einfluss von Sauerstoffradikalen, Schwermetallen, Ethanol etc. festgestellt werden [169, 170]. Eine Überexpression von Proteinen, wie in diesem Fall PLZF, könnte ebenfalls ein stressauslösender Faktor für die Zelle sein, da das *proofreading* der korrekten Faltung von Proteinen im endoplasmatischen Reticulum ein limitierender Faktor darstellen kann [171]. Die Hitzeschockproteine könnten mit PLZF interagieren, um sie bei der Ausbildung der tertiären Struktur zu unterstützen.

Ein weiteres detektiertes Protein, CHMP5, gehört zur *chromatin-modifying protein/charged multivesicular body protein* (CHMP)-Familie und ist im Abbau von Rezeptorproteinen und in der Bildung von multivesikulären Körpern beteiligt [172]. Letztere werden z. B. in späten Endosomen gebildet, die sich von frühen durch einen geringeren pH-Wert durch V-ATPase-Aktivität unterscheiden [173].

Die anderen als putative PLZF-Interaktionspartner identifizierten Proteine, Tubulin alpha-1A (TBA1A) und Tubulin beta *chain* (TBB5), sind zwei zur Familie der Tubuline gehörende Einheiten. Es sind über 100 Isoformen von Tubulinen bekannt, die in sechs Hauptgruppen, α , β , γ , δ , ϵ und ζ unterteilt werden. Die α - und β -Gruppe machen den Hauptbestandteil der Mikrotubuli aus. Durch Polymerisation und gleichzeitige Depolymerisation wird für eine dynamische Instabilität in der Zelle gesorgt [174]. Ein Zusammenhang mit dem (P)RR konnte nicht gefunden werden.

Inwieweit PLZF ein tatsächlicher Interaktionspartner dieser Proteine ist und ob diese Interaktionen, obgleich einer verwendeten Kontrolle, lediglich falsch-positive Befunde darstellen, wäre in weiteren *in vitro*- und *in vivo*-Experimenten zu untersuchen.

4.8. Zellspezifische Genregulationsmechanismen

Die bereits erwähnte zellabhängige Regulation der Expression eines Gens wird bei dem durch ChIP-*chip* validierten Gen TUBE1 deutlich. Abhängig von der Zelllinie KELLY oder HEK293T wurde TUBE1 durch PLZF verstärkt oder verringert exprimiert.

Transkriptionsfaktoren (TF) erkennen kurze DNA-Sequenzmotive, die aus einigen wenigen konservierten Nukleotiden bestehen. In der Regel sind mehrere regulatorische Elemente hintereinandergeschaltet, wobei viele Sequenzmotive überlappen, d. h. verschiedene Klassen von Transkriptionsfaktoren können in der gleichen Region binden. Zwei oder mehrere definierte, benachbarte regulatorische Elemente, die von direkt oder indirekt interagierenden TF angesprochen werden, sind sogenannte Module [175]. Die Funktionalität der Module sowie der einzelnen Elemente ist zelltypspezifisch und/oder abhängig vom Signalweg. Ein Beispiel für die Komplexität und Flexibilität eines Promotors stellt der gut untersuchte RANTES/CCL-Promotor dar [163]. Das Protein wird in unterschiedlichen Geweben als Antwort auf verschiedene Stimuli exprimiert. Die transkriptionelle Kontrolle erfolgt über sechs funktionell charakterisierte, kurze, regulatorische Elemente. Überlappende Bindungsstellen erlauben die Bindung und Kompetition unterschiedlicher TFs in der gleichen Region, die zellspezifisch differenziell genutzt werden. Ähnliche Mechanismen könnten auch im TUBE- sowie ID3-Promotor (s. o.) vorliegen.

4.9. Direkte versus indirekte Rekrutierung von PLZF

In den ChIP-*chip*-Experimenten unter Verwendung des anti-PLZF-Antikörpers (Cc4 und Cc5) konnten in 29% bzw. 37% der detektierten Regionen die bekannte PLZF-Matrix (siehe Abbildung 4.3) identifiziert werden. Neben dieser direkten Rekrutierung von PLZF konnten in dieser Arbeit Hinweise auf indirekte Rekrutierungen gezeigt werden. Die indirekte Rekrutierung von TF durch Interaktion mit anderen DNA-bindenden



Abb. 4.3.: Darstellung der Konsensussequenz von PLZF.

TF, auch *tethering* genannt, ist ein bekanntes Phänomen [176, 177, 178]. In den im Zusammenhang mit in dieser Arbeit durchgeführten ChIP-*chip*-Experimente wurden Anreicherungen von verschiedenen anderen *cis*-Elementen jenseits des PLZF-Motivs identifiziert. Beispielsweise wurden E2F und GATA-Motive in anti-PLZF-ChIP-*chip*-Experimenten (Cc4 und Cc5) unter Verwendung der *cis-regulatory element annotation system* (CEAS) [179] und der ChipInspector Software (Daten nicht gezeigt) nachgewiesen. PLZF, das *retinoblastoma protein* (pRb) und der *E2-promoter-binding factor-1* (E2F-1) sind bekannt dafür, einen regulatorischen Komplex zu bilden [180]. Überdies kann PLZF direkt mit dem Transkriptionsfaktor GATA-2 interagieren, woraus eine verringerte funktionale Aktivität von GATA-2 resultiert [181]. Weiterhin können unspezifische Effekte des Antikörpers nicht ausgeschlossen werden.

4.10. Bedeutung der Mikroarrays in Bezug auf die Entwicklung von (P)RR-Antagonisten

Neben traditionellen Hochdurchsatz-Screening-Methoden zur Identifizierung von Leitstrukturen zur Medikamentenentwicklung gewinnen Genexpressions- oder andere Genomikanalysen zunehmend an Bedeutung. In Abbildung 4.4 ist dargestellt, in welchen Phasen der Medikamentenentwicklung Mikroarrays zum Einsatz kommen [182]. Der (P)RR ist ein neuartiges pharmakologisches Ziel [32, 46]. Die funktionelle Analyse der in dieser Arbeit durchgeführten Experimente bestätigt die Rolle der (P)RR-Signaltransduktionskaskade in Bezug auf kardiovaskuläre Erkrankungen und der Tumorgenese und

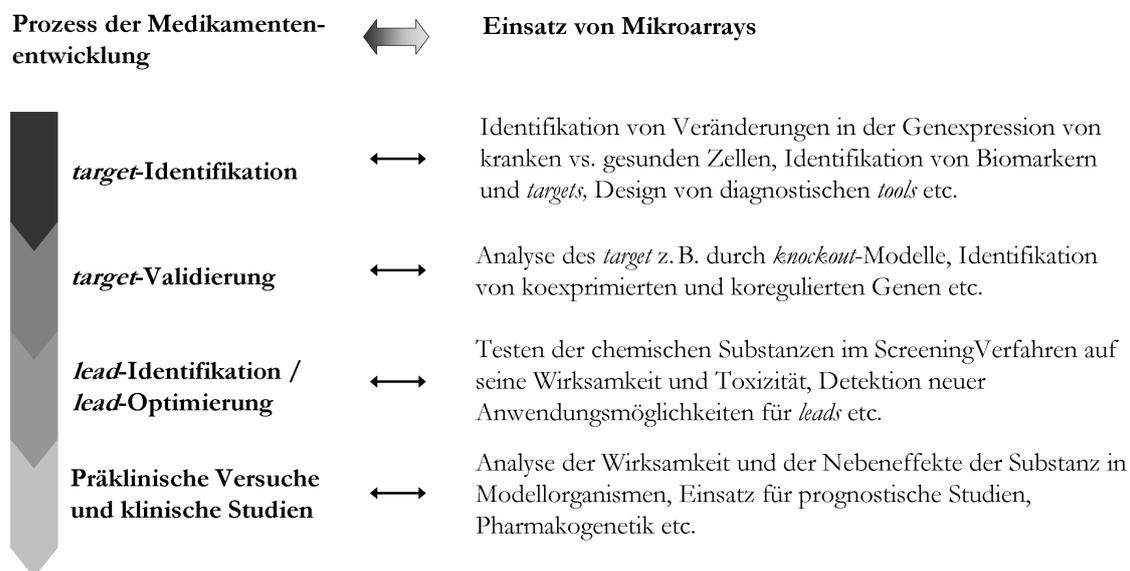


Abb. 4.4.: Einsatzmöglichkeiten von Mikroarrays während der verschiedenen Phasen des Medikamentenentwicklungsprozesses. Abbildung modifiziert nach Waring *et al.* [182].

damit seine Bedeutung als pharmakologisches Ziel. Die identifizierten transkriptionellen Signaturen *downstream* von Komponenten der (P)RR-Signaltransduktionskaskade sind relevant in Bezug auf eine Medikamentenentwicklung, um die Spezifität oder Pleiotropie von zu entwickelnden Substanzen einschätzen zu können. Der Vergleich von Genexpressionsdaten von Medikamentenkandidaten (z. B. *hits* oder *leads*) mit den hier durchgeführten Mikroarrays erlaubt die Selektion von Substanzen, die z. B. ein ähnliches Transkriptionsprofil aufweisen wie das durch die Inhibition des (P)RR-Signaltransduktionsweges ohne Effekt auf die V-ATPase-assoziierten Funktionen des Rezeptors (oder umgekehrt). Dieser sogenannte *magic shotgun approach* dient dazu, die Effektivität zu erhöhen und mögliche Nebeneffekte zukünftiger Medikamente im Allgemeinen zu limitieren [183]. Ferner wurden bestimmte Transkripte wie Adenosin A2a Rezeptor (ADORA2A) und *corticotropin releasing hormone* (CRH, 3.1) mit einem hohen mRNA-Spiegel identifiziert und validiert. Diese Transkripte könnten als mögliche pharmakodynamische Biomarker in *proof-of-mechanism* (*in vivo*)-Studien von Medikamentenkandidaten nach RNA-Isolierung aus Gewebe und/oder Blutzellen dienen [184]. Eine zusammenfassende Übersicht der Ergebnisse dieser Arbeit ist in Abbildung 4.5

dargestellt.

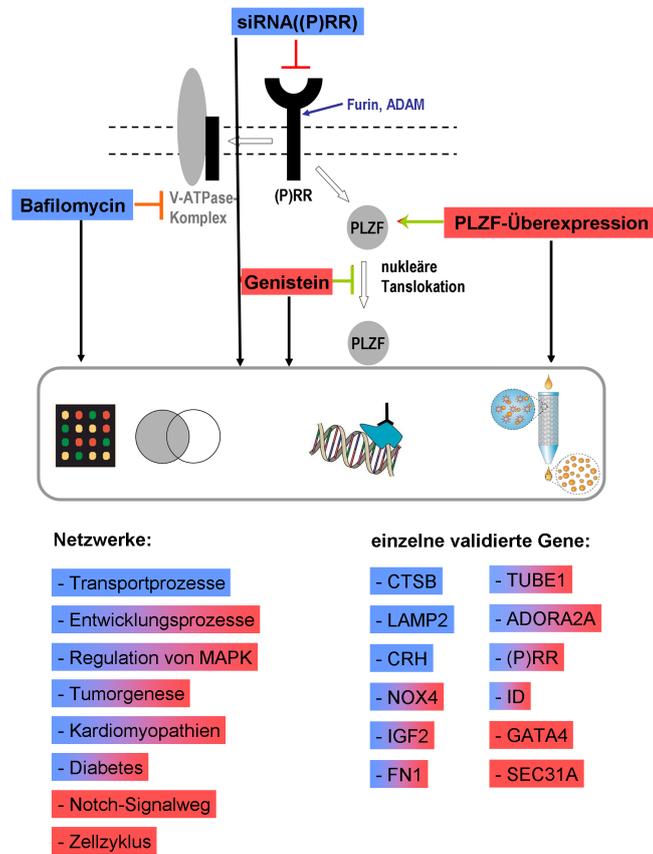


Abb. 4.5.: Zusammenfassende Darstellung der in dieser Arbeit durchgeführten Experimente und deren Resultate zur Untersuchung der *subpathways downstream* des (P)RR.

Zusammenfassung

Die (Pro-)Reninrezeptor ((P)RR)-Signaltransduktion ist in verschiedene pathophysiologische Prozesse involviert, von kardioresalen Endorganschäden und diabetischer Retinopathie bis hin zur Tumorgenese. Darüber hinaus konnte unsere Arbeitsgruppe in diesem Kontext den Transkriptionsfaktor PLZF als ein Adapterprotein des (P)RR identifizieren.

Mittels Mikroarray- und ChIP-*chip*-basierten Experimenten wurden in dieser Arbeit Transkriptionsprofile und Protein-DNA-Interaktionen zur Entschlüsselung von transkriptionellen Signalwegen *downstream* des (P)RR charakterisiert. Die Transkriptomanalysen erfolgten unter Verwendung von siRNA gegen den (P)RR, durch PLZF-Überexpression sowie durch Einsatz des Translokationsinhibitors Genistein und des spezifischen V-ATPase-Inhibitors Bafilomycin.

Dabei wurden sowohl distinkte als auch überlappende Gensignaturen sowie neue Zielgene *downstream* der unterschiedlichen molekularen Funktionen des (P)RR identifiziert. Die funktionellen Analysen zeigten einen (P)RR-abhängigen Einfluss auf Gene, die bei dem Transport von Proteinen und bei der Signalweitergabe eine Rolle spielen. Des Weiteren bewirkte die Überexpression von PLZF eine veränderte Expression von Genen bezüglich des Zellzyklusarrests. Die Analyse der Transkriptionsprofile aller durchgeführten Behandlungen konnte die Beteiligung in entwicklungsbiologischen Prozessen bestätigen, welche mit den drei bisher publizierten *knockout*-Modelle des (P)RR übereinstimmen.

Weiterhin wurde die Rolle der (P)RR-Signaltransduktionskaskade in Bezug auf kardiovaskuläre Erkrankungen und der Tumorgenese und damit seine Bedeutung als pharmakologisches Ziel bekräftigt. Mittels ChIP-*chip*-Analysen, basierend auf Polymerase II und PLZF-Antikörpern, konnten neue PLZF-Zielgene wie TUBE1 und SEC31a detektiert, und mittels quantitativer *real time*-PCR validiert werden. Darüber hinaus wiesen einige der hier identifizierten differenziell regulierten und validierten Transkripte wie TUBE1, FN1 und ID3, auf zellspezifische Genregulationsmechanismen hin.

Die Ergebnisse dieser Arbeit stellen eine wichtige Grundlage zur Selektion von pharmakologischen Substanzen bezüglich der Entwicklung von (P)RR-Antagonisten sowie der Identifizierung von Biomarkern dar.

Summary

(Pro)renin receptor ((P)RR) signalling is involved in a variety of pathophysiologic mechanisms spanning from cardiorenal end-organ damage to diabetic retinopathy and tumorigenesis. The (P)RR putatively mediates these biological effects dependently or independently of its ligands, renin and prorenin. In addition, our group has identified the transcription factor PLZF as an adaptor protein of (P)RR.

In this study, a set of microarray and ChIP-chip experiments were performed to dissect transcriptional pathways downstream of the (P)RR using siRNA against (P)RR, stable overexpression of PLZF, the PLZF translocation inhibitor genistein and the specific V-ATPase inhibitor bafilomycin.

Distinct and overlapping genetic signatures as well as novel target genes of the different molecular functions of the (P)RR were identified. Functional analysis revealed the relevance of the (P)RR in processes such as protein transport and the regulation of genes in signal transduction pathways. The PLZF overexpression influences genes involved in cell cycle arrest. Furthermore, all performed system manipulations were shown to be implicated in developmental processes, which is consistent with the three knockout models of the (P)RR. Additionally, the role of the (P)RR's signal transduction pathway in cardiovascular diseases and tumorigenesis confirmed its relevance as a drug target. The ChIP-chip-experiments based on polymerase II and PLZF-antibodies revealed new target genes of PLZF, e.g. TUBE1 and SEC31a which were validated by quantitative real time-PCR. Finally, selected identified differentially regulated and validated transcripts such as TUBE1, FN1 and ID3 suggest cell specific mechanisms of gene regulation.

The results of these studies provide an important insight for the selection of pharmacological compounds concerning the development of (P)RR antagonists.

Literaturverzeichnis

- [1] Ludwig, J. *et al.* Identification and characterization of a novel 9.2-kDa membrane sector-associated protein of vacuolar proton-ATPase from chromaffin granules. *J. Biol. Chem.* **273**, 10939–10947 (1998).
- [2] Nguyen, G. *et al.* Pivotal role of the renin/prorenin receptor in angiotensin II production and cellular responses to renin. *J. Clin. Invest.* **109**, 1417–1427 (2002).
- [3] Schefe, J. H. *et al.* A novel signal transduction cascade involving direct physical interaction of the renin/prorenin receptor with the transcription factor promyelocytic zinc finger protein. *Circ. Res.* **99**, 1355–1366 (2006).
- [4] Nguyen, G. & Muller, D. N. The biology of the (Pro)Renin receptor. *JASN* **21**, 18–23 (2010).
- [5] Schweda, F. *et al.* Renin release. *Physiology* **22**, 310–319 (2007).
- [6] Piepho, R. W. & Beal, J. An overview of antihypertensive therapy in the 20th century. *J Clin Pharmacol* **40**, 967–977 (2000).
- [7] de Gasparo, M. *et al.* International union of pharmacology. XXIII. the angiotensin II receptors. *Pharmacol. Rev.* **52**, 415–472 (2000).
- [8] Volpe, M. *et al.* Angiotensin II AT₂ receptor subtype: an uprising frontier in cardiovascular disease? *J. Hypertens.* **21**, 1429–1443 (2003).
- [9] Stoll, M. *et al.* The angiotensin AT₂-receptor mediates inhibition of cell proliferation in coronary endothelial cells. *J. Clin. Invest.* **95**, 651–657 (1995).

- [10] Danser, A. Prorenin, the (pro)renin receptor, and renin inhibition. In Hollenberg, N. K. (ed.) *Atlas of Hypertension*, (CMG (Current Medicine Group) LLC, Philadelphia, PA, USA, 2009), 6th edition, march 2009; edn.
- [11] Weiss, D., Sorescu, D. & Taylor, W. R. Angiotensin II and atherosclerosis. *Am. J. Cardiol.* **87**, 25C–32C (2001).
- [12] Unger, T. Blood pressure lowering and renin-angiotensin system blockade. *J. Hypertens. Suppl.* **21**, S3–7 (2003).
- [13] Mezzano, S. A., Ruiz-Ortega, M. & Egido, J. Angiotensin II and renal fibrosis. *Hypertension* **38**, 635–638 (2001).
- [14] Zhu, F. & Liao, Y.-H. Therapeutic renin-angiotensin vaccines for the treatment of hypertension. *Drugs of the Future* **33**, 1041 (2008).
- [15] Batenburg, W. W. *et al.* Prorenin is the endogenous agonist of the (pro)renin receptor. binding kinetics of renin and prorenin in rat vascular smooth muscle cells overexpressing the human (pro)renin receptor. *J. Hypertens.* **25**, 2441–2453 (2007).
- [16] Nabi, A. H. M. N. *et al.* Binding properties of rat prorenin and renin to the recombinant rat renin/prorenin receptor prepared by a baculovirus expression system. *Int. J. Mol. Med.* **18**, 483–488 (2006).
- [17] Lavoie, J. L. & Sigmund, C. D. Minireview: Overview of the renin-angiotensin System—An endocrine and paracrine system. *Endocrinology* **144**, 2179–2183 (2003).
- [18] Derkx, F. H. & Schalekamp, M. A. Human prorenin: pathophysiology and clinical implications. *Clin Exp Hypertens A* **10**, 1213–1225 (1988).
- [19] Danser, A. J. & Deinum, J. Renin, prorenin and the putative (pro)renin receptor. *Hypertension* **46**, 1069–1076 (2005).

- [20] Takahashi, S., Inoue, H. & Miyake, Y. The human gene for renin-binding protein. *J. Biol. Chem.* **267**, 13007–13013 (1992).
- [21] Kesteren, C. A. M. v. *et al.* Mannose 6-phosphate receptor-mediated internalization and activation of prorenin by cardiac cells. *Hypertension* **30**, 1389–1396 (1997).
- [22] Saris, J. J. *et al.* High-affinity prorenin binding to cardiac man-6-P/IGF-II receptors precedes proteolytic activation to renin. *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* **280**, H1706–1715 (2001).
- [23] van den Eijnden, M. M. *et al.* Prorenin accumulation and activation in human endothelial cells: importance of mannose 6-phosphate receptors. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* **21**, 911–916 (2001).
- [24] Schmitz, C. *et al.* Normal blood pressure and plasma renin activity in mice lacking the renin-binding protein, a cellular renin inhibitor. *J. Biol. Chem.* **275**, 15357–15362 (2000).
- [25] Saris, J. J. *et al.* Prorenin-induced myocyte proliferation: no role for intracellular angiotensin II. *Hypertension* **39**, 573–577 (2002).
- [26] Huang, Y. *et al.* Renin increases mesangial cell transforming growth factor- β 1 and matrix proteins through receptor-mediated, angiotensin II-independent mechanisms. *Kidney Int.* **69**, 105–113 (2006).
- [27] Sakoda, M. *et al.* (Pro)renin receptor-mediated activation of mitogen-activated protein kinases in human vascular smooth muscle cells. *Hypertension Research* **30**, 1139–1146 (2007).
- [28] Saris, J. J. *et al.* Prorenin induces intracellular signaling in cardiomyocytes independently of angiotensin II. *Hypertension* **48**, 564–571 (2006).
- [29] Moilanen, A.-M. *et al.* (Pro)renin receptor triggers distinct angiotensin II-Independent extracellular matrix remodeling and deterioration of cardiac function. *PLoS ONE* **7**, e41404 (2012).

- [30] Scheffe, J. H. *et al.* Prorenin engages the (pro)renin receptor like renin and both ligand activities are unopposed by aliskiren. *J. Hypertens.* **26**, 1787–1794 (2008).
- [31] Thomas, C. M. *et al.* Direct renin inhibition prevents cardiac dysfunction in a diabetic mouse model: comparison with an angiotensin receptor antagonist and angiotensin converting enzyme inhibitor. *Clin. Sci.* (2012).
- [32] Funke-Kaiser, H. *et al.* Signal transduction of the (pro)renin receptor as a novel therapeutic target for preventing end-organ damage. *Hypertens. Res.* **33**, 98–104 (2010).
- [33] Wang, J., Kirby, C. E. & Herbst, R. The tyrosine phosphatase PRL-1 localizes to the endoplasmic reticulum and the mitotic spindle and is required for normal mitosis. *J. Biol. Chem.* **277**, 46659–46668 (2002).
- [34] Sun, J.-P. *et al.* Phosphatase activity, trimerization, and the c-terminal polybasic region are all required for PRL1-mediated cell growth and migration. *J. Biol. Chem.* **282**, 29043–29051 (2007).
- [35] Cousin, C. *et al.* Soluble form of the (pro)renin receptor generated by intracellular cleavage by furin is secreted in plasma. *Hypertension* **53**, 1077–1082 (2009).
- [36] Yoshikawa, A. *et al.* The (pro)renin receptor is cleaved by ADAM19 in the golgi leading to its secretion into extracellular space. *Hypertens. Res.* **34**, 599–605 (2011).
- [37] Ichihara, A. *et al.* Possible roles of human (pro)renin receptor suggested by recent clinical and experimental findings. *Hypertens. Res.* **33**, 177–180 (2010).
- [38] Gonzalez, A. A. *et al.* Soluble form of the (pro)renin receptor is augmented in the collecting duct and urine of chronic angiotensin II-dependent hypertensive rats. *Hypertension* **57**, 859–864 (2011).
- [39] Burcklé, C. A. *et al.* Elevated blood pressure and heart rate in human renin receptor transgenic rats. *Hypertension* **47**, 552–556 (2006).

- [40] Nguyen, G. & Danser, A. H. J. Prorenin and (pro)renin receptor: a review of available data from in vitro studies and experimental models in rodents. *Exp Physiol* **93**, 557–563 (2008).
- [41] Nishi, T. & Forgac, M. The vacuolar (H⁺)-ATPases—nature’s most versatile proton pumps. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **3**, 94–103 (2002).
- [42] Hinton, A., Bond, S. & Forgac, M. V-ATPase functions in normal and disease processes. *Pflugers Arch.* **457**, 589–598 (2009).
- [43] Advani, A. *et al.* The (Pro)Renin Receptor Site-Specific and Functional Linkage to the Vacuolar (H⁺)-ATPase in the Kidney. *Hypertension* **54**, 261–269 (2009).
- [44] Campbell, D. J. Critical review of prorenin and (pro)renin receptor research. *Hypertension* **51**, 1259–1264 (2008).
- [45] Bernhard, S. M. *et al.* The (pro)renin receptor ((P)RR) can act as a repressor of Wnt signalling. *Biochem. Pharmacol.* **84**, 1643–1650 (2012).
- [46] Cruciat, C.-M. *et al.* Requirement of prorenin receptor and vacuolar H⁺-ATPase-mediated acidification for Wnt signaling. *Science* **327**, 459–463 (2010).
- [47] Clevers, H. Wnt/ β -catenin signaling in development and disease. *Cell* **127**, 469–480 (2006).
- [48] Howe, L. R. & Brown, A. M. C. Wnt signaling and breast cancer. *Cancer Biol. Ther.* **3**, 36–41 (2004).
- [49] Katoh, M. WNT2 and human gastrointestinal cancer (review). *Int. J. Mol. Med.* **12**, 811–816 (2003).
- [50] Reya, T. & Clevers, H. Wnt signalling in stem cells and cancer. *Nature* **434**, 843–850 (2005).
- [51] Balakumar, P. & Jagadeesh, G. Potential cross-talk between (pro)renin receptors and wnt/frizzled receptors in cardiovascular and renal disorders. *Hypertens. Res.* **34**, 1161–1170 (2011).

- [52] Dai, C. *et al.* Wnt/ β -catenin signaling promotes podocyte dysfunction and albuminuria. *J. Am. Soc. Nephrol.* **20**, 1997–2008 (2009).
- [53] Mahmud, H. *et al.* Regulation of the (pro)renin-renin receptor in cardiac remodelling. *J. Cell. Mol. Med.* **16**, 722–729 (2012).
- [54] Connelly, K. A. *et al.* The cardiac (pro)renin receptor is primarily expressed in myocyte transverse tubules and is increased in experimental diabetic cardiomyopathy. *J. Hypertens.* **29**, 1175–1184 (2011).
- [55] Ichihara, A. *et al.* Prorenin receptor blockade inhibits development of glomerulosclerosis in diabetic angiotensin II type 1a Receptor–Deficient mice. *JASN* **17**, 1950–1961 (2006).
- [56] Hirose, T. *et al.* Increased expression of (pro)renin receptor in the remnant kidneys of 5/6 nephrectomized rats. *Regulatory Peptides* **159**, 93–99 (2010).
- [57] Siragy, H. M. & Huang, J. Renal (pro)renin receptor upregulation in diabetic rats through enhanced angiotensin AT1 receptor and NADPH oxidase activity. *Exp Physiol* **93**, 709–714 (2008).
- [58] Matavelli, L. C., Huang, J. & Siragy, H. M. (Pro)renin receptor contributes to diabetic nephropathy through enhancing renal inflammation. *Clin Exp Pharmacol Physiol* **37**, 277–282 (2010).
- [59] Ramser, J. *et al.* A unique exonic splice enhancer mutation in a family with X-linked mental retardation and epilepsy points to a novel role of the renin receptor. *Hum. Mol. Genet.* **14**, 1019–1027 (2005).
- [60] Kaneshiro, Y. *et al.* Slowly progressive, angiotensin II–independent glomerulosclerosis in human (pro)renin receptor–transgenic rats. *JASN* **18**, 1789–1795 (2007).
- [61] Bader, M. Spotlight on renin the second life of the (pro)renin receptor. *Journal of Renin-Angiotensin-Aldosterone System* **8**, 205–208 (2007).

- [62] Riediger, F. *et al.* Prorenin receptor is essential for podocyte autophagy and survival. *JASN* **22**, 2193–2202 (2011).
- [63] Kinouchi, K. *et al.* The (pro)renin receptor/ATP6AP2 is essential for vacuolar H⁺-ATPase assembly in murine cardiomyocytes. *Circulation Research* **107**, 30–34 (2010).
- [64] Amsterdam, A. *et al.* Identification of 315 genes essential for early zebrafish development. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **101**, 12792–12797 (2004).
- [65] Nuckels, R. J. *et al.* The vacuolar-ATPase complex regulates retinoblast proliferation and survival, photoreceptor morphogenesis, and pigmentation in the zebrafish eye. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* **50**, 893–905 (2009).
- [66] Suzuki, F. *et al.* Human prorenin has "gate and handle" regions for its non-proteolytic activation. *J. Biol. Chem.* **278**, 22217–22222 (2003).
- [67] Ichihara, A. *et al.* Inhibition of diabetic nephropathy by a decoy peptide corresponding to the "handle" region for nonproteolytic activation of prorenin. *J Clin Invest* **114**, 1128–1135 (2004).
- [68] Takahashi, H. *et al.* Regression of nephropathy developed in diabetes by (pro)renin receptor blockade. *J. Am. Soc. Nephrol.* **18**, 2054–2061 (2007).
- [69] Muller, D. N. *et al.* (pro)renin receptor peptide inhibitor "handle-region" peptide does not affect hypertensive nephrosclerosis in goldblatt rats. *Hypertension* **51**, 676–681 (2008).
- [70] Feldt, S. *et al.* The putative (pro)renin receptor blocker HRP fails to prevent (pro)renin signaling. *J. Am. Soc. Nephrol.* **19**, 743–748 (2008).
- [71] Ryuzaki, M. *et al.* Involvement of activated prorenin in the pathogenesis of slowly progressive nephropathy in the non-clipped kidney of two kidney, one-clip hypertension. *Hypertens. Res.* **34**, 301–307 (2011).

- [72] Kiyomoto, H. & Moriwaki, K. Chronic blockade of the (pro)renin receptor ameliorates the kidney damage in the non-clipped kidney of goldblatt hypertension. *Hypertens. Res.* **34**, 289–291 (2011).
- [73] Chen, Z. *et al.* Fusion between a novel krüppel-like zinc finger gene and the retinoic acid receptor- α locus due to a variant t(11;17) translocation associated with acute promyelocytic leukaemia. *EMBO J.* **12**, 1161–1167 (1993).
- [74] Zollman, S. *et al.* The BTB domain, found primarily in zinc finger proteins, defines an evolutionarily conserved family that includes several developmentally regulated genes in drosophila. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **91**, 10717–10721 (1994).
- [75] Bardwell, V. J. & Treisman, R. The POZ domain: a conserved protein-protein interaction motif. *Genes Dev.* **8**, 1664–1677 (1994).
- [76] Kang, S. I. *et al.* Modification of promyelocytic leukemia zinc finger protein (PLZF) by SUMO-1 conjugation regulates its transcriptional repressor activity. *J. Biol. Chem.* **278**, 51479–51483 (2003).
- [77] Koken, M. H. *et al.* Leukemia-associated retinoic acid receptor α fusion partners, PML and PLZF, heterodimerize and colocalize to nuclear bodies. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **94**, 10255–10260 (1997).
- [78] Uhlén, M. *et al.* A human protein atlas for normal and cancer tissues based on antibody proteomics. *Mol Cell Proteomics* **4**, 1920–1932 (2005).
- [79] Suliman, B. A. & Williams, B. R. G. The promyelocytic leukemia zinc finger protein: two decades of molecular oncology. *Front. Oncol.* **2**, 74 (2012).
- [80] Yeyati, P. L. *et al.* Leukemia translocation protein PLZF inhibits cell growth and expression of cyclin A. *Oncogene* **18**, 925–934 (1999).
- [81] Senbonmatsu, T. *et al.* A novel angiotensin II type 2 receptor signaling pathway: possible role in cardiac hypertrophy. *EMBO J* **22**, 6471–6482 (2003).

- [82] Kolesnichenko, M. & Vogt, P. K. Understanding PLZF: two transcriptional targets, REDD1 and smooth muscle α -actin, define new questions in growth control, senescence, self-renewal and tumor suppression. *Cell Cycle* **10**, 771–775 (2011).
- [83] Melnick, A. *et al.* AML-1/ETO fusion protein is a dominant negative inhibitor of transcriptional repression by the promyelocytic leukemia zinc finger protein. *Blood* **96**, 3939–3947 (2000).
- [84] David, G. *et al.* Histone deacetylase associated with mSin3A mediates repression by the acute promyelocytic leukemia-associated PLZF protein. *Oncogene* **16**, 2549–2556 (1998).
- [85] Grignani, F. *et al.* Fusion proteins of the retinoic acid receptor- α recruit histone deacetylase in promyelocytic leukaemia. *Nature* **391**, 815–818 (1998).
- [86] Guidez, F. *et al.* Reduced retinoic acid-sensitivities of nuclear receptor corepressor binding to PML- and PLZF-RAR α underlie molecular pathogenesis and treatment of acute promyelocytic leukemia. *Blood* **91**, 2634–2642 (1998).
- [87] Hong, S. H. *et al.* SMRT corepressor interacts with PLZF and with the PML-retinoic acid receptor α (RAR α) and PLZF-RAR α oncoproteins associated with acute promyelocytic leukemia. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **94**, 9028–9033 (1997).
- [88] Lin, R. J. *et al.* Role of the histone deacetylase complex in acute promyelocytic leukaemia. *Nature* **391**, 811–814 (1998).
- [89] Wong, C. W. & Privalsky, M. L. Components of the SMRT corepressor complex exhibit distinctive interactions with the POZ domain oncoproteins PLZF, PLZF-RAR α , and BCL-6. *J. Biol. Chem.* **273**, 27695–27702 (1998).
- [90] Barna, M. *et al.* Plzf regulates limb and axial skeletal patterning. *Nat. Genet.* **25**, 166–172 (2000).
- [91] Costoya, J. A. *et al.* Essential role of PLZF in maintenance of spermatogonial stem cells. *Nat. Genet.* **36**, 653–659 (2004).

- [92] Buaas, F. W. *et al.* Plzf is required in adult male germ cells for stem cell self-renewal. *Nat. Genet.* **36**, 647–652 (2004).
- [93] Filipponi, D. *et al.* Repression of kit expression by Plzf in germ cells. *Mol. Cell. Biol.* **27**, 6770–6781 (2007).
- [94] Xu, D. *et al.* Promyelocytic leukemia zinc finger protein regulates interferon-mediated innate immunity. *Immunity* **30**, 802–816 (2009).
- [95] Shaknovich, R. *et al.* The promyelocytic leukemia zinc finger protein affects myeloid cell growth, differentiation, and apoptosis. *Mol. Cell. Biol.* **18**, 5533–5545 (1998).
- [96] Bernardo, M. V. *et al.* Identification of apoptosis-related PLZF target genes. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **359**, 317–322 (2007).
- [97] Ball, H. J. *et al.* The promyelocytic leukemia zinc finger (PLZF) protein binds DNA in a high molecular weight complex associated with cdc2 kinase. *Nucleic Acids Res.* **27**, 4106–4113 (1999).
- [98] Sobieszczuk, D. F. *et al.* A feedback loop mediated by degradation of an inhibitor is required to initiate neuronal differentiation. *Genes Dev* **24**, 206–218 (2010).
- [99] Cheung, M. *et al.* The promyelocytic leukemia zinc-finger gene, PLZF, is frequently downregulated in malignant mesothelioma cells and contributes to cell survival. *Oncogene* **29**, 1633–1640 (2010).
- [100] Rho, S. B. *et al.* A novel cervical cancer suppressor 3 (CCS-3) interacts with the BTB domain of PLZF and inhibits the cell growth by inducing apoptosis. *FEBS Lett.* **580**, 4073–4080 (2006).
- [101] Brunner, G. *et al.* Increased expression of the tumor suppressor PLZF is a continuous predictor of long-term survival in malignant melanoma patients. *Cancer Biother. Radiopharm.* **23**, 451–459 (2008).

- [102] Kikugawa, T. *et al.* PLZF regulates pbx1 transcription and pbx1-HoxC8 complex leads to androgen-independent prostate cancer proliferation. *Prostate* **66**, 1092–1099 (2006).
- [103] Wagenaar, L. J. *et al.* Angiotensin receptors in the cardiovascular system. *Can. J. Cardiol.* **18**, 1331–1339 (2002).
- [104] Mehta, P. K. & Griendling, K. K. Angiotensin II cell signaling: physiological and pathological effects in the cardiovascular system. *Am. J. Physiol., Cell Physiol.* **292**, C82–97 (2007).
- [105] Wang, N. *et al.* Promyelocytic leukemia zinc finger protein activates GATA4 transcription and mediates cardiac hypertrophic signaling from angiotensin II receptor 2. *PLoS One* **7** (2012).
- [106] Liang, Q. & Molkenin, J. D. Divergent signaling pathways converge on GATA4 to regulate cardiac hypertrophic gene expression. *J. Mol. Cell. Cardiol.* **34**, 611–616 (2002).
- [107] Lockhart, D. J. & Winzeler, E. A. Genomics, gene expression and DNA arrays. *Nature* **405**, 827–836 (2000).
- [108] Harrington, C. A., Rosenow, C. & Retief, J. Monitoring gene expression using DNA microarrays. *Current Opinion in Microbiology* **3**, 285–291 (2000).
- [109] Poulin, N. M. & Nielsen, T. O. Expression Arrays: Discovery and Validation. In Goldblum, J. R. (ed.) *Cell and Tissue Based Molecular Pathology*, 70–83 (Churchill Livingstone, Philadelphia, USA, 2009).
- [110] Yee, A. J. & Ramaswamy, S. *DNA Microarrays in Biological Discovery and Patient Care*. Genomic and Personalized Medicine, Vol. 1 (Eds.: H.F. Willard, G.S. Ginsburg (Academic Press, New York, 2009).
- [111] Roeder, R. G. Lasker basic medical research award. the eukaryotic transcriptional machinery: complexities and mechanisms unforeseen. *Nat. Med.* **9**, 1239–1244 (2003).

- [112] Métivier, R. *et al.* Estrogen receptor- α directs ordered, cyclical, and combinatorial recruitment of cofactors on a natural target promoter. *Cell* **115**, 751–763 (2003).
- [113] Weinmann, A. S. Novel ChIP-based strategies to uncover transcription factor target genes in the immune system. *Nat Rev Immunol* **4**, 381–386 (2004).
- [114] Schrezenmeier, E. *et al.* Moderate correlations of *in vitro* versus *in vivo* pharmacokinetics questioning the need of early microsomal stability testing. *Pharmacology* **90**, 307–315 (2012).
- [115] Gloeckner, C. J. *et al.* A novel tandem affinity purification strategy for the efficient isolation and characterisation of native protein complexes. *Proteomics* **7**, 4228–4234 (2007).
- [116] Livak, K. J. & Schmittgen, T. D. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-delta delta C(T)) method. *Methods* **25**, 402–408 (2001).
- [117] Tusher, V. G., Tibshirani, R. & Chu, G. Significance analysis of microarrays applied to the ionizing radiation response. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **98**, 5116–5121 (2001).
- [118] Ashburner, M. *et al.* Gene ontology: tool for the unification of biology. *Nat Genet* **25**, 25–29 (2000).
- [119] Consortium, T. G. O. The gene ontology in 2010: extensions and refinements. *Nucl. Acids Res.* **38**, D331–D335 (2010).
- [120] Huang, D. W., Sherman, B. T. & Lempicki, R. A. Systematic and integrative analysis of large gene lists using DAVID bioinformatics resources. *Nat Protoc* **4**, 44–57 (2009).
- [121] Bryant, G. O. & Ptashne, M. Independent recruitment *in vivo* by gal4 of two complexes required for transcription. *Mol. Cell* **11**, 1301–1309 (2003).

- [122] O'Geen, H. *et al.* Comparison of sample preparation methods for ChIP-chip assays. *BioTechniques* **41**, 577–580 (2006).
- [123] Laemmli, U. K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* **227**, 680–685 (1970).
- [124] Bittner, M., Kupferer, P. & Morris, C. F. Electrophoretic transfer of proteins and nucleic acids from slab gels to diazobenzyloxymethyl cellulose or nitrocellulose sheets. *Anal. Biochem.* **102**, 459–471 (1980).
- [125] Zaade, D. *et al.* Distinct signal transduction pathways downstream of the (P)RR revealed by microarray and ChIP-chip analyses. *PLoS ONE* **8**, e57674 (2013).
- [126] Melnyk, R. A. *et al.* Renin and prorenin activate pathways implicated in organ damage in human mesangial cells independent of angiotensin II production. *American Journal of Nephrology* **30**, 232–243 (2009).
- [127] He, M. *et al.* Inhibition of renin/prorenin receptor attenuated mesangial cell proliferation and reduced associated fibrotic factor release. *Eur. J. Pharmacol.* **606**, 155–161 (2009).
- [128] Clavreul, N. *et al.* (Pro)renin promotes fibrosis gene expression in HEK cells through a Nox4-dependent mechanism. *Am J Physiol Renal Physiol* **300**, F1310–F1318 (2011).
- [129] Oshima, Y. *et al.* Prorenin receptor is essential for normal podocyte structure and function. *JASN* **22**, 2203–2212 (2011).
- [130] Doulatov, S. *et al.* PLZF is a regulator of homeostatic and cytokine-induced myeloid development. *Genes Dev* **23**, 2076–2087 (2009).
- [131] Seidel, K. *et al.* The promyelocytic leukemia zinc finger (PLZF) protein exerts neuroprotective effects in neuronal cells and is dysregulated in experimental stroke. *Brain Pathol.* **21**, 31–43 (2011).

- [132] Haring, M. *et al.* Chromatin immunoprecipitation: optimization, quantitative analysis and data normalization. *Plant Methods* **3**, 11 (2007).
- [133] Sultan, M. *et al.* A global view of gene activity and alternative splicing by deep sequencing of the human transcriptome. *Science* **321**, 956–960 (2008).
- [134] McConnell, M. J. *et al.* Growth suppression by acute promyelocytic leukemia-associated protein PLZF is mediated by repression of c-myc expression. *Mol. Cell. Biol.* **23**, 9375–9388 (2003).
- [135] Felicetti, F. *et al.* The promyelocytic leukemia zinc FingerMicroRNA-221/222 pathway controls melanoma progression through multiple oncogenic mechanisms. *Cancer Res* **68**, 2745–2754 (2008).
- [136] Danser, A. H. *et al.* Determinants of interindividual variation of renin and prorenin concentrations: evidence for a sexual dimorphism of (pro)renin levels in humans. *J. Hypertens.* **16**, 853–862 (1998).
- [137] Reudelhuber, T. L. The interaction between prorenin, renin and the (pro)renin receptor: time to rethink the role in hypertension. *Curr. Opin. Nephrol. Hypertens.* **21**, 137–141 (2012).
- [138] McDonald, G. A. *et al.* Relaxin increases ubiquitin-dependent degradation of fibronectin in vitro and ameliorates renal fibrosis in vivo. *Am. J. Physiol. Renal Physiol.* **285**, F59–67 (2003).
- [139] Huss, M. & Wiczorek, H. Inhibitors of V-ATPases: old and new players. *J Exp Biol* **212**, 341–346 (2009).
- [140] Yamamoto, A. *et al.* Bafilomycin A1 prevents maturation of autophagic vacuoles by inhibiting fusion between autophagosomes and lysosomes in rat hepatoma cell line, H-4-II-E cells. *Cell Structure and Function* **23**, 33–42 (1998).
- [141] Shacka, J. J., Klocke, B. J. & Roth, K. A. Autophagy, bafilomycin and cell death: the “a-B-Cs“ of plecomacrolide-induced neuroprotection. *Autophagy* **2**, 228–230 (2006).

- [142] Ward, J. O. *et al.* The acute promyelocytic leukemia-associated protein, promyelocytic leukemia zinc finger, regulates 1,25-dihydroxyvitamin d(3)-induced monocytic differentiation of u937 cells through a physical interaction with vitamin d(3) receptor. *Blood* **98**, 3290–3300 (2001).
- [143] Milner, L. A. & Bigas, A. Notch as a mediator of cell fate determination in hematopoiesis: Evidence and speculation. *Blood* **93**, 2431–2448 (1999).
- [144] Kopan, R. Notch: a membrane-bound transcription factor. *J Cell Sci* **115**, 1095–1097 (2002).
- [145] Reid, A. *et al.* Leukemia translocation gene, PLZF, is expressed with a speckled nuclear pattern in early hematopoietic progenitors. *Blood* **86**, 4544–4552 (1995).
- [146] Hayashi, T. *et al.* Requirement of notch 1 and its ligand jagged 2 expressions for spermatogenesis in rat and human testes. *J. Androl.* **22**, 999–1011 (2001).
- [147] Alcalay, M. *et al.* Acute myeloid leukemia fusion proteins deregulate genes involved in stem cell maintenance and DNA repair. *J Clin Invest* **112**, 1751–1761 (2003).
- [148] Lasorella, A., Uo, T. & Iavarone, A. Id proteins at the cross-road of development and cancer. *Oncogene* **20**, 8326–8333 (2001).
- [149] Andres-Barquin, P. J., Hernandez, M. C. & Israel, M. A. Id genes in nervous system development. *Histol. Histopathol.* **15**, 603–618 (2000).
- [150] Shi, J. & Vogt, P. K. Posttranslational regulation of myc by promyelocytic leukemia zinc finger protein. *Int. J. Cancer* **125**, 1558–1565 (2009).
- [151] Pavese, J. M., Farmer, R. L. & Bergan, R. C. Inhibition of cancer cell invasion and metastasis by genistein. *Cancer Metastasis Rev.* **29**, 465–482 (2010).
- [152] Cook, M. *et al.* Expression of the zinc-finger gene PLZF at rhombomere boundaries in the vertebrate hindbrain. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **92**, 2249–2253 (1995).

- [153] Nelson, N. & Harvey, W. R. Vacuolar and plasma membrane proton-adenosinetriphosphatases. *Physiol. Rev.* **79**, 361–385 (1999).
- [154] Bowman, E. J. *et al.* Identification of a new chondropsin class of antitumor compound that selectively inhibits v-ATPases. *J. Biol. Chem.* **278**, 44147–44152 (2003).
- [155] Ikeda, R. *et al.* The promyelotic leukemia zinc finger promotes osteoblastic differentiation of human mesenchymal stem cells as an upstream regulator of CBFA1. *J. Biol. Chem.* **280**, 8523–8530 (2005).
- [156] Rusin, A. *et al.* Synthetic derivatives of genistein, their properties and possible applications. *Acta Biochim. Pol.* **57**, 23–34 (2010).
- [157] Soucy, N. V. *et al.* Kinetics of genistein and its conjugated metabolites in pregnant sprague-dawley rats following single and repeated genistein administration. *Toxicol. Sci.* **90**, 230–240 (2006).
- [158] Zhang, Y. & Chen, H. Genistein, an epigenome modifier during cancer prevention. *Epigenetics* **6**, 888–891 (2011).
- [159] Gullett, N. P. *et al.* Cancer prevention with natural compounds. *Semin. Oncol.* **37**, 258–281 (2010).
- [160] Spinozzi, F. *et al.* The natural tyrosine kinase inhibitor genistein produces cell cycle arrest and apoptosis in Jurkat T-leukemia cells. *Leuk. Res.* **18**, 431–439 (1994).
- [161] Su, Y. *et al.* Expression profiling of rat mammary epithelial cells reveals candidate signaling pathways in dietary protection from mammary tumors. *Physiol. Genomics* **30**, 8–16 (2007).
- [162] Dang, Z. C. & Lowik, C. Dose-dependent effects of phytoestrogens on bone. *Trends Endocrin Met* **16**, 207–213 (2005).

- [163] Werner, T. *et al.* Computer modeling of promoter organization as a tool to study transcriptional coregulation. *FASEB J* **17**, 1228–1237 (2003).
- [164] Chang, P. *et al.* Epsilon-tubulin is required for centriole duplication and microtubule organization. *Nat. Cell Biol.* **5**, 71–76 (2003).
- [165] Jackson, A. L. & Linsley, P. S. Recognizing and avoiding siRNA off-target effects for target identification and therapeutic application. *Nat Rev Drug Discov.* **9**, 57–67 (2010).
- [166] Whitehead, K. A. *et al.* Silencing or stimulation? siRNA delivery and the immune system. *Annu Rev Chem Biomol Eng* **2**, 77–96 (2011).
- [167] Robbins, M., Judge, A. & MacLachlan, I. siRNA and innate immunity. *Oligonucleotides* **19**, 89–102 (2009).
- [168] Teplova, V. V. *et al.* Bafilomycin a1 is a potassium ionophore that impairs mitochondrial functions. *J Bioenerg Biomembr* **39**, 321–329 (2007).
- [169] De Maio, A. Heat shock proteins: facts, thoughts, and dreams. *Shock* **11**, 1–12 (1999).
- [170] Santoro, M. G. Heat shock factors and the control of the stress response. *Biochem. Pharmacol.* **59**, 55–63 (2000).
- [171] Raden, D. *et al.* Analysis of cellular response to protein overexpression. *Syst Biol (Stevenage)* **152**, 285–289 (2005).
- [172] Tsang, H. T. H. *et al.* A systematic analysis of human CHMP protein interactions: additional MIT domain-containing proteins bind to multiple components of the human ESCRT III complex. *Genomics* **88**, 333–346 (2006).
- [173] Piper, R. C. & Luzio, J. P. Late endosomes: sorting and partitioning in multivesicular bodies. *Traffic* **2**, 612–621 (2001).
- [174] Cleveland, D. W. & Sullivan, K. F. Molecular biology and genetics of tubulin. *Annu. Rev. Biochem.* **54**, 331–366 (1985).

- [175] Klingenhoff, A., Frech, K. & Werner, T. Regulatory modules shared within gene classes as well as across gene classes can be detected by the same in silico approach. *In Silico Biol.* **2**, S17–26 (2002).
- [176] Gorski, J. J. *et al.* Profiling of the BRCA1 transcriptome through microarray and ChIP-chip analysis. *Nucleic Acids Res* **39**, 9536–9548 (2011).
- [177] DeNardo, D. G. *et al.* Global gene expression analysis of estrogen receptor transcription factor cross talk in breast cancer: identification of estrogen-induced/activator protein-1-dependent genes. *Mol. Endocrinol.* **19**, 362–378 (2005).
- [178] Heldring, N. *et al.* Multiple sequence-specific DNA-binding proteins mediate estrogen receptor signaling through a tethering pathway. *Mol. Endocrinol.* **25**, 564–574 (2011).
- [179] Ji, X. *et al.* CEAS: cis-regulatory element annotation system. *Nucleic Acids Res.* **34**, W551–554 (2006).
- [180] Petrie, K. *et al.* Retinoblastoma protein and the leukemia-associated PLZF transcription factor interact to repress target gene promoters. *Oncogene* **27**, 5260–5266 (2008).
- [181] Tsuzuki, S. & Enver, T. Interactions of GATA-2 with the promyelocytic leukemia zinc finger (PLZF) protein, its homologue FAZF, and the t(11;17)-generated PLZF-retinoic acid receptor alpha oncoprotein. *Blood* **99**, 3404–3410 (2002).
- [182] Waring, J. F. Overview of microarrays in drug discovery and development. In Enna, S. *et al.* (eds.) *Current Protocols in Pharmacology* (John Wiley & Sons, Inc., Hoboken, NJ, USA, 2003).
- [183] Roth, B. L., Sheffler, D. J. & Kroeze, W. K. Magic shotguns versus magic bullets: selectively non-selective drugs for mood disorders and schizophrenia. *Nat Rev Drug Discov* **3**, 353–359 (2004).

- [184] de Bono, J. S. & Ashworth, A. Translating cancer research into targeted therapeutics. *Nature* **467**, 543–549 (2010).

A. Anhang

A.1. Chemikalienliste

Tab. A.1.: In der Arbeit verwendete Chemikalien und Lieferanten

Bezeichnung	Lieferant
ABI-Power-Mix	Applied Biosystems, Foster City, USA
Acrylamid	Serva, Heidelberg, D
Agar	Merck, Darmstadt, D
Agarose	Eurogentec, Köln, D
Albumin Fraktion V rein (BSA)	Sigma, Taufkirchen, D
Albuminstandard	Pierce, Bonn, D
Ammoniumpersulfat	Sigma, Taufkirchen, D
Ampicillin	Roth, Karlsruhe, D
Bafilomycin A1	Enzo Life Science, Lörrach, D
BCA Protein Assay Reagenz A und B	Pierce, Bonn, D
Calciumchlorid (wasserfrei)	Merck, Darmstadt, D
<i>Complete</i> Proteaseinhibitor	Roche, Mannheim, D
DC Protein Assay Kit	Bio Rad, USA
Deoxycholic acid (Sodium salt)	Sigma, Taufkirchen, D
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Sigma, Taufkirchen, D
Dithiothreitol (DTT)	Sigma, Taufkirchen, D
DMEM (4,5 g/l Glukose)	Invitrogen, Karlsruhe, D
dNTPs	Bioline, Luckenwalde, D.
ECL <i>Western blotting detection reagent</i>	Amersham, Freiburg, D
Ethanol 96 % und 100 %	Merck, Darmstadt, D
Ethidiumbromid	Roth, Karlsruhe, D
Ethylendiamintetraessigsäuredinatrium-Dihydrat (EDTA)	Sigma, Taufkirchen, D
Ethylenglykol-bis-(2-aminomethyl)-Tetraessigsäure (EGTA)	Sigma, Taufkirchen, D
Fetales Kälberserum	Invitrogen, Karlsruhe, D
Formaldehyd	Roth, Karlsruhe, D
Gene Juice Transfektions-Reagenz	Novagen, Darmstadt, D
Genistein	Roth, Karlsruhe, D
Glycerin	Roth, Karlsruhe, D

Fortsetzung - Chemikalienliste

Bezeichnung	Lieferant
Glycin	Roth, Karlsruhe, D
L-Glutathion, reduziert	Roth, Karlsruhe, D
Glutathione Sepharose 4B	GE Healthcare, D
Guanidinehydrochlorid	Sigma, Taufkirchen, D
HiPerfect Transfection Reagent	Qiagen, Hilden, D
2-(4-(2-Hydroxyethyl)1-piperazin)ethansulfons (HE-PES)	Merck, Darmstadt, D
Hygromycin	PAA, Pasching, Österreich
Isopropanol	Roth, Karlsruhe, D
Isopropyl- β ,D-thiogalactoside (IPTG)	Roth, Karlsruhe, D
Kaliumchlorid	Roth, Karlsruhe, D
Kaliumdihydrogenphosphat	Merck, Darmstadt, D
Kaliumhydrogencarbonat	Merck, Darmstadt, D
Kaliumhydroxid	Merck, Darmstadt, D
Kanamycin	Sigma, Taufkirchen, D
LB Medium (SOB)	Roth, Karlsruhe, D
LB Medium Lennox	Roth, Karlsruhe, D
Lipofektamin 2000	Invitrogen, Karlsruhe, D
Magermilchpulver	AppliChem, Darmstadt, D.
Magnesiumchlorid-6-hydrat	Sigma, Taufkirchen, D
2-Mercaptoethanol	Sigma, Taufkirchen, D
Milchpulver	Roth, Karlsruhe, D
Natriumaurylsulfat (SDS)	Roth, Karlsruhe, D
Natriumazetat-Trihydrat	Merck, Darmstadt, D
Natriumborhydrid	Merck, Darmstadt, D
Natriumchlorid	Merck, Darmstadt, D
Natriumcarbonat	Sigma, Taufkirchen, D
Natriumdeoxycholsäure	Serva, Heidelberg, D
Natriumdihydrogenphosphat-Monohydrat	Merck, Darmstadt, D
Natriumdodecylsulfat	Serva, Heidelberg, D
Natriumfluorid	Sigma, Taufkirchen, D
Natriumhydrogencarbonat	Merck, Darmstadt, D
Natriumhydrogenphosphat-Dihydrat	Merck, Darmstadt, D
Natriumhydroxid	Merck, Darmstadt, D
Natriumorthovanadat	Sigma, Taufkirchen, D
Natriumpyrophosphat	Sigma, Taufkirchen, D
Nonidet P 40	Fluka, Taufkirchen, D
Optimem	Invitrogen, Karlsruhe, D
Orange G	Merck, Darmstadt, D
Paraformaldehyd	Sigma, Taufkirchen, D
PBS-Puffer	Invitrogen, Karlsruhe, D

Fortsetzung - Chemikalienliste

Bezeichnung	Lieferant
Penicillin / Streptomycin	PAA, Marburg, D
Ponceau S Lsg.	Fluka, Taufkirchen, D
Restore Western Blot Stripping Lsg.	Pierce, Bonn, D
RPMI 1640-Medium	Invitrogen, Karlsruhe, D
Roti-Blue (Coomassie-Färbelsg., gebrauchsfertig)	Roth, Karlsruhe, D
Roti - Nanoquant	Roth, Karlsruhe, D
Streptomycin Sulfat	Serva, Heidelberg, D
N,N,N,N-Tetramethylethylenediamin (TEMED)	Sigma, Taufkirchen, D
Tris(hydroxymethyl)-aminomethan-Hydrochlorid (Tris-HCl)	Roth, Karlsruhe, D
Tris(hydroxymethyl)-aminomethan (Trizma base)	Sigma, Taufkirchen, D
Triton X-100	Sigma, Taufkirchen, D
Trypanblau Lsg. 0,4 Trypsin/ EDTA	Gibco, Karlsruhe, D
Tween 20 (Polyoxyethylene sorbitan monolaurat)	Sigma, Taufkirchen, D
X-Gal	Roth, Karlsruhe, D

Publikation

Teile der vorgelegten Arbeit wurden in folgender Publikation veröffentlicht:

Zaade D, Schmitz J, Benke E, Klare S, Seidel K, Kirsch S, Goldin-Lang P, Zollmann F S, Unger T, Funke-Kaiser H (2013): Distinct signal transduction pathways downstream of the (P)RR revealed by microarray and ChIP-chip analyses.
PLoS ONE 8(3): e57674

Der Lebenslauf ist in der Online-Version aus Gründen des Datenschutzes nicht
enthalten