

Posttranslationale Kontrolle des zellulären Transkriptionsfaktors PBF/ZNF395

Inaugural-Dissertation

zur

Erlangung des Doktorgrades der
Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät
der Universität zu Köln

vorgelegt von

Darko Jordanovski

aus Skopje

Köln 2012

Berichtersteller: Prof. Dr. Thorsten Hoppe
Prof. Dr. Dr. h.c. Herbert Pfister

Tag der mündlichen Prüfung: 30.01.2012

Inhaltsverzeichnis

1 Einleitung

1.1 Der Hypoxie-induzierbare Faktor (HIF) 1	2
1.2 Der IKK-Komplex	3
1.3 Das Ubiquitin-Proteasom-System	6
1.4 Aktivierung von Interferon-stimulierten Genen	7
1.5 Der SIN3-HDAC-Komplex und die Regulation der Stabilität von Transkriptionsfaktoren	10
1.6 Das zelluläre Protein PBF	11
1.7 Zielsetzung der Arbeit	14

2 Material

2.1 Bakterienstämme	15
2.2 Eukaryote Zellen	15
2.3 Nukleinsäuren	15
2.3.1 Synthetisch hergestellte Oligonukleotide	15
2.3.2 Prokaryote Expressionsvektoren	17
2.3.3 Eukaryote Expressionsvektoren	17
2.3.4 Reporterplasmide	18
2.3.5 Rekombinante Plasmide	19
2.3.6 DNA-Längenstandards	22
2.3.7 Sonstige Nukleinsäuren	22
2.4 Radioisotope	22
2.5 Proteine	22
2.5.1 Enzyme	22
2.5.2 Größenstandards	23
2.5.3 Antiseren	23
2.5.4 Präzipitationsreagenzien	24
2.6 Protease- und Phosphatase-Inhibitoren	24
2.7 Medien	24
2.7.1 Medien und Antibiotika für die Kultivierung von Bakterien	24
2.7.2 Medien und Zusätze für die Kultivierung eukaryoter Zellen	25
2.8 Reagenzien	27
2.8.1 Puffer und Lösungen	27
2.8.2 Sonstige Chemikalien und Materialien	30
2.8.3 Reagenziensysteme (Kits)	30
2.9 In dieser Arbeit verwendete Geräte	31

3 Methoden

3.1 Bakterienkultur	32
3.1.1 Herstellung transformationskompetenter Bakterien	32
3.1.2 Transformation kompetenter Bakterien	32
3.1.3 Kurzzeitlagerung von Bakterien	33
3.1.4 Langzeitlagerung von Bakterien	33
3.2 Zellkulturmethoden	33
3.2.1 Kultivierung eukaryoter Zellen	33
3.2.2 Einfrieren und Lagerung von Zellen	34
3.2.3 Zellzahlbestimmung	34
3.2.4 Transfektion eukaryoter Zellen mit Plasmid-DNA	34
3.2.4.1 Transiente Transfektion mittels Calciumphosphat-Präzipitation	35
3.2.4.2 Transiente Transfektion mittels „FuGENE“	35
3.2.5 Generierung einer stabilen Zelllinie	35
3.2.6 Ernte der transfizierten Zellen	36

Inhaltsverzeichnis

6 Literaturverzeichnis	95
7 Abkürzungsverzeichnis	113
8 Zusammenfassung	116
9 Abstract	117
10 Danksagung	118
11 Erklärung	119

1 Einleitung

Krebs ist verantwortlich für jeden 8. Todesfall mit wahrscheinlich stark zunehmender Tendenz in den nächsten Jahren (Garcia et al, 2007). Krebsentstehung ist ein multifaktorieller Prozess, der durch eine Folge von genetischen und Umweltbedingten Faktoren voran getrieben wird. Kontinuierliche proliferative Signale, Resistenz gegenüber Wachstums-inhibitorischen Signalen, und gegen Zelltod, die Fähigkeit zu replikativer Immortalität, die Induktion von Angiogenese und Aktivierung der Invasion und Metastasierung sind die 6 Merkmale von Krebs (Hanahan and Weinberg, 2011). Diese Prozesse sind begleitet von Genom-Instabilität und Entzündung.

Entzündungsreaktionen sind nicht nur Kofaktoren bei der Pathogenese von chronischen Erkrankungen sondern auch bei der Karzinogenese (Balkwill und Mantovani, 2010; Grivennikov et al, 2010; Qian und Pollard, 2010; Erez und Coussens; 2011). Frühere Schätzungen besagen, dass 20 Prozent aller Krebsarten an Entzündungsprozesse gekoppelt sind (Coussens und Werb, 2002), wobei der tatsächliche Prozentsatz wahrscheinlich noch höher liegt (Karin und Greten, 2005). Mittlerweile gilt die Tumor-promovierende Entzündung als weiteres Merkmal von Krebs (Hanahan und Weinberg, 2011).

Genom-weite Expressionsanalysen haben in den letzten Jahren zur Identifizierung von Krebs-assoziierten Stoffwechselwegen und Faktoren geführt. In diesem Rahmen wurde wiederholt gefunden, dass die Expression des bisher kaum charakterisierten Transkriptionsfaktors PBF (*Papillomavirus Binding Factor*, offizieller Gencode ZNF395) in Karzinomen erhöht war, und zwar als ein Hypoxie-induziertes Protein und als Zielgen des Hypoxie-induzierbaren Faktors HIF-1. So war die Expression von PBF in Glioblastomen und Neuroblastomen als Teil der hypoxischen Reaktion erhöht (Murat et al, 2009; Fardin et al, 2010). In Neuroblastomen korrelierte die Expression einer Gruppe Hypoxie-induzierter Gene, zu denen auch PBF gehört, mit einer schlechten Prognose (Fardin et al, 2010). In Glioblastom- sowie Brust-, Nasopharyngeal-, Nierenzell- oder Kolonkarzinom- Zelllinien wurde PBF nach Kultivierung unter hypoxischen Bedingungen und/oder Überexpression von HIF-1 α induziert (Lal et al, 2001; Jiang et al, 2003; Elvidge et al, 2006; Sung et al, 2007). PBF war außerdem überexprimiert in Nierenzellkarzinomen und in Osteosarkomen

(Tsukahara et al, 2004; Skubitz et al, 2006; Dalgin et al, 2007). Zudem korrelierte die Expression von PBF in Ewing Sarkomen mit einer schlechten Prognose (Yabe et al, 2008). Dies indiziert, dass PBF eine funktionelle Rolle spielt in Signaltransduktionswegen der zellulären Hypoxie-Antwort und in Karzinomen. PBF wurde ursprünglich in unserer Arbeitsgruppe identifiziert aufgrund seiner Fähigkeit, an die regulatorische Region des humanen Papillomvirus (HPV) Typ 8 zu binden (Boeckle et al, 2002). PBF ist in der Lage, die Transkription von HPV8 zu reprimieren, was auf eine mögliche antivirale Aktivität im Rahmen der angeborenen Immunität hinweist (Sichtig et al, 2007b). Die genaue zelluläre Funktion ist allerdings unbekannt.

1.1 Der Hypoxie-induzierbare Faktor (HIF) 1

Als Hypoxie wird der Sauerstoffmangel in Geweben bezeichnet. Sie ist ein Merkmal von entzündlichen Reaktionen und von schnell proliferierenden Geweben wie soliden aber auch hämatologischen Tumoren (Moehler et al, 2003; Brahimi-Horn et al, 2007; Nizet und Johnson, 2009). Im Falle von soliden Tumoren ist Hypoxie ein Resultat des gestörten Gleichgewichts zwischen Proliferation und Vaskularisation. Aufgrund der schlechten Versorgung mit Medikamenten und der geringeren Verfügbarkeit an sauerstofffreien Radikalen sind maligne Zellen in solchen Regionen auch resistenter gegenüber Strahlen- oder Chemotherapie (Moeller et al, 2007). Die Zellen begehen verschiedene Adaptationen, die es ihnen ermöglichen unter diesen Bedingungen zu überleben und zu proliferieren. Als Hauptregulator der Sauerstoff-Homöostase fungiert der heterodimere Transkriptionsfaktor HIF. Er gehört zur Familie der basischen Helix-Loop-Helix Proteine und besteht aus einer konstitutiv exprimierten HIF-1 β -Untereinheit und einer durch Sauerstoff regulierten HIF- α Untereinheit (HIF-1 α , HIF-2 α und HIF-3 α), wovon HIF-1 α am besten charakterisiert ist (Kaelin und Ratcliffe, 2008). In Anwesenheit von Sauerstoff wird HIF-1 α kontinuierlich über das Proteasom abgebaut, was sich in der geringen Halbwertszeit (<5 min) des Proteins widerspiegelt (Berra et al, 2001). Sauerstoff-, 2-oxoglutarat- und Eisen-abhängige Prolylhydroxylasen (PHD) hydroxylieren humanes HIF-1 α an Prolin 402 und 564 (Ivan et al, 2001; Jaakkola et al, 2001; Bruick und McKnight, 2001; Epstein et al, 2001). Diese Modifikation führt zu einer Interaktion mit dem Tumorsuppressorprotein von Hippel-Lindau (VHL), Komponente eines E3-Ligase Komplexes, wodurch HIF-1 α polyubiquitiniert und der Proteasom-abhängigen Degradation zugeführt wird (Maxwell

et al, 1999; Kallio et al, 1999). Zusätzlich hydroxyliert FIH (*factor inhibiting HIF*) einen Asparaginrest (N803) in der carboxyterminalen Aktivierungsdomäne von humanem HIF-1 α . Dadurch wird die Interaktion mit transkriptionellen Koaktivatoren, wie p300 oder CBP verhindert (Mahon et al, 2001; Webb et al, 2009). Unter hypoxischen Bedingungen können PHDs und FIH wegen des Sauerstoffmangels nicht mehr hydroxylieren, was zu einer Erhöhung der HIF-1 α Stabilität führt. HIF-1 α kann mit HIF-1 β dimerisieren und im Nukleus an sogenannte Hypoxie-responsive Elemente (HRE) binden und dadurch die Expression von mehr als 100 Genen induzieren (Majmundar et al, 2010). HIF-1 α regulierte Gene sind involviert bei der Regulation des Glucose Metabolismus, der Zellzykluskontrolle, der Apoptose, der Angiogenese und der Immuntoleranz (Denko, 2008; Nizet und Johnson, 2009; Majmundar et al, 2010). Die Expression von HIF-1 α kann auch unabhängig von Hypoxie, z.B. durch Onkogene induziert werden (Majmundar et al, 2010). Untersuchungen verschiedener Krebsarten zeigten, dass eine Überexpression von HIF-1 α oft mit schlechter Prognose korreliert (Semenza, 2007).

1.2 Der IKK-Komplex

An der hypoxischen Antwort der Zellen sind neben HIF-1 weitere Transkriptionsfaktoren beteiligt, unter anderem NF- κ B (Cummins und Taylor, 2005; Kenneth und Rocha, 2008). NF- κ B regulierte Gene sind wichtig für die angeborene Immunität, für Zellproliferation, -differenzierung und -überleben (Pasparakis et al, 2006; Hayden und Ghosh, 2011). Der NF- κ B-Signaltransduktionsweg ist in vielen malignen und nicht-malignen Erkrankungen dereguliert (Kumar et al, 2004; Courtois und Gilmore, 2006; Karin, 2008; Baker et al, 2011; Ben-Neriah und Karin, 2011). Die fünf Mitglieder der NF- κ B Familie bestehend aus NF- κ B1 (p50 bzw. das Vorläuferprotein p105), NF- κ B2 (p52 bzw. das Vorläuferprotein p100), RelA (p65), RelB und c-Rel, formen Homo- und Heterodimere. Alle besitzen eine Rel Homologie-Domäne, die wichtig für DNA-Bindung und Dimerisierung ist (Hayden und Ghosh, 2008). In „ruhenden“ Zellen binden Mitglieder der I κ B Proteinfamilie (hauptsächlich I κ B α , I κ B β und I κ B ϵ) an die NF- κ B Dimere, wodurch die Bindung an DNA verhindert wird und die Komplexe überwiegend im Cytoplasma zurückgehalten werden (Nolan et al, 1991; Tergaonkar et al, 2005; Basak et al, 2007). Die Freisetzung und damit die Aktivierung der NF- κ B Dimere erfolgt durch Degradation des Inhibitors. Die Phosphorylierung der I κ B Proteine durch den IKK (I κ B Kinase) Komplex erlaubt die

Bindung der SCF ^{β -TrCP} E3-Ligasen, die I κ B K48-polyubiquitinieren gefolgt von dem Abbau durch das 26S Proteasom (Yaron et al, 1998; Tan et al, 1999, Fuchs et al, 2004). Der IKK-Komplex besteht aus den Kinasen IKK α (I κ B Kinase α , IKBKA, IKK1) und IKK β (I κ B Kinase β , IKBKB, IKK2) und der regulatorischen Untereinheit IKK γ (NEMO) (DiDonato et al, 1997; Mercurio et al, 1997; Woronicz et al, 1997; Zandi et al, 1997; Rothwarf et al, 1998; Yamaoka et al, 1998). Obwohl beide Kinasen eine ähnliche Struktur (50% Sequenzübereinstimmung) haben, sind ihre Substrate verschieden (Chariot, 2009; Israël, 2010). Die Aktivierung von NF- κ B erfolgt hauptsächlich durch zwei Signalkaskaden. Der klassische oder kanonische Weg wird durch die meisten physiologischen Stimuli ausgelöst. Dazu gehören Signale von Zytokinrezeptoren, wie dem Tumor Nekrose Faktor (TNF) Rezeptor 1, Antigenrezeptoren und Rezeptoren, die Pathogen-assoziierte molekulare Muster (PAMP) erkennen, wie TLR (*toll-like receptor*) 3 (Oeckinghaus et al, 2011). Dieser Weg ist IKK β und NEMO abhängig und resultiert meist in der Phosphorylierung von I κ B α und der transkriptionellen Aktivität von überwiegend p65-enthaltenden NF- κ B Heterodimeren (siehe Abbildung 1). Der nicht-kanonische Weg wird von spezifischen Mitgliedern der TNF-Zytokinfamilie induziert und führt zur IKK α -abhängigen Phosphorylierung von p100 und dessen Prozessierung zu p52, wodurch RelB/p52 Dimere aktiviert werden (Sun, 2011).

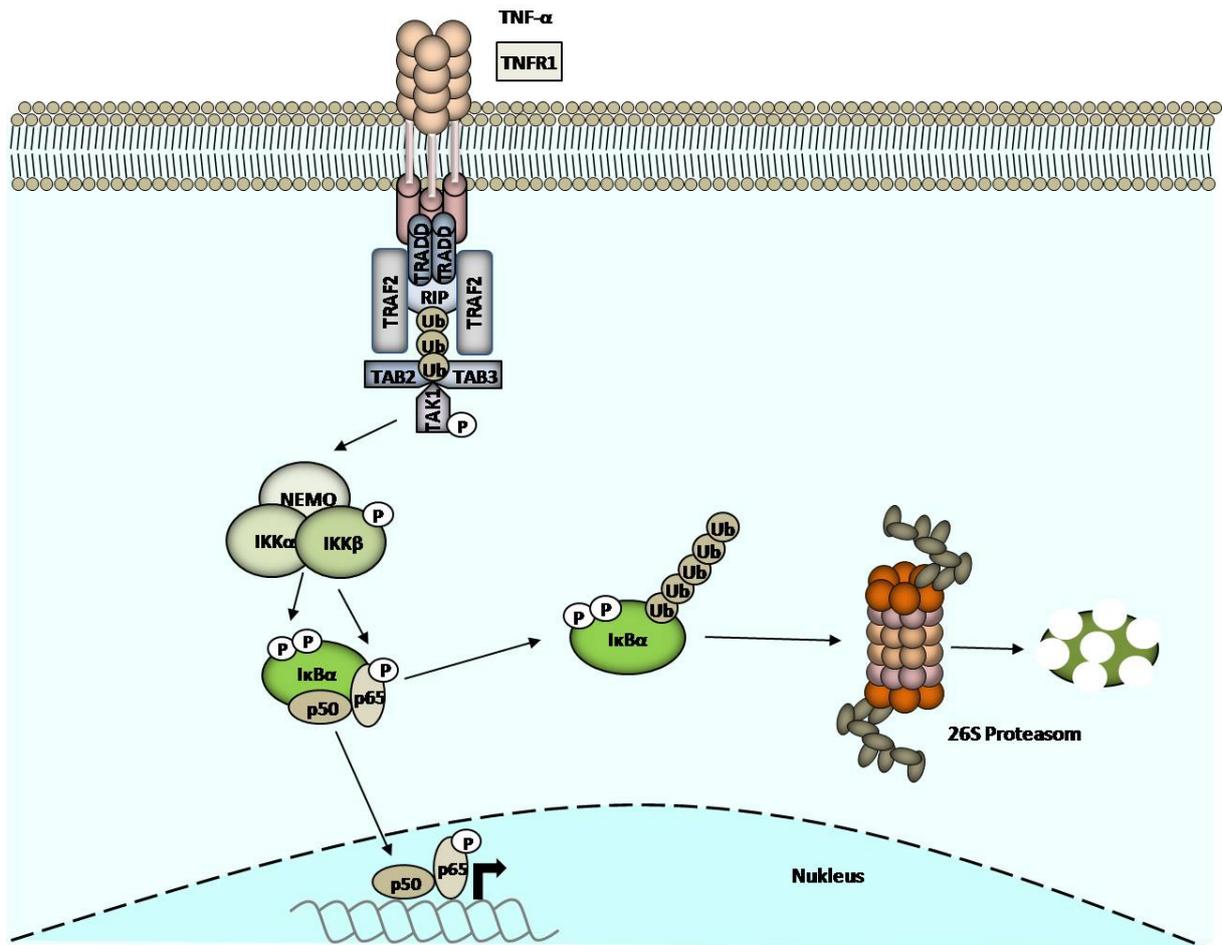


Abbildung 1: Der kanonische Weg der NF-κB-Aktivierung

Schematische Darstellung. Die Bindung von TNF-α an den TNFR1-Rezeptor führt zur Assoziation von Adaptorproteinen wie TRADD, welches eine Plattform für weitere Proteine wie TRAF (TNFR-assoziierte Faktoren) 2 (oder TRAF5) bietet. Diese Proteine besitzen ein RING-Finger Domäne, die ihnen potentiell ermöglicht als E3-Ligasen zu funktionieren (Bradley und Pober, 2001; Chen, 2005). TRAF2 assoziiert mit den Ubiquitinligasen cIAP1 und cIAP2 (nicht gezeigt) und der Kinase RIP1 (Mahoney et al, 2008). RIP1 wird polyubiquitiniert (linear oder K63-verknüpft), wodurch die Bindung und Aktivierung von TAK1 vermittelt durch TAB2/3 induziert wird (Kanayama et al, 2004; Ea et al, 2006; Gerlach et al, 2011). Anschließend wird IKKβ an den Serinen 177 und 181 phosphoryliert und aktiviert. Der aktive IKK-Komplex phosphoryliert IκBα, welches K48-polyubiquitiniert und über das Proteasom abgebaut wird. Das aktivierte p50/p65 Heterodimer bindet an entsprechenden NF-κB Bindestellen im Genom und aktiviert die Expression einer Vielzahl an Genen. Zusätzliche Proteine können Teil des Signalkomplexes sein, sind aber nicht dargestellt (Chen et al, 2002; Ducut Sigala et al, 2004;). Ub: Ubiquitin; P: Phosphorylierung (modifiziert nach Chariot, 2009).

Die IKK- Untereinheiten haben auch NF-κB- unabhängige Funktionen, die wichtig für die Immunität sind aber auch Karzinogenese fördern (Chariot, 2009). IKKβ kann eine Tumorprogression durch direktes Phosphorylieren von Tumorsuppressorproteinen beeinflussen. So wurde gezeigt, dass die Phosphorylierung von Foxo3a zu dessen Export aus dem Nukleus mit anschließender Proteasom-vermittelter Degradation führt (Hu et al, 2004). In Übereinstimmung damit korreliert die Menge an nukleärem Foxo3a negativ mit der Expression von IKKβ in Mammakarzinomen, und positiv mit

der Überlebensrate der betroffenen Patienten (Hu et al, 2004). IKK β kann ebenfalls das Tumorsuppressorprotein p53 phosphorylieren, wodurch der SCF $^{\beta-TrCP}$ E3-Ligase Komplex rekrutiert und das polyubiquitinierte Protein proteasomal degradiert wird (Xia et al, 2009). Bekannte IKK β -Substrate sind in Abbildung 2 zusammengefasst.

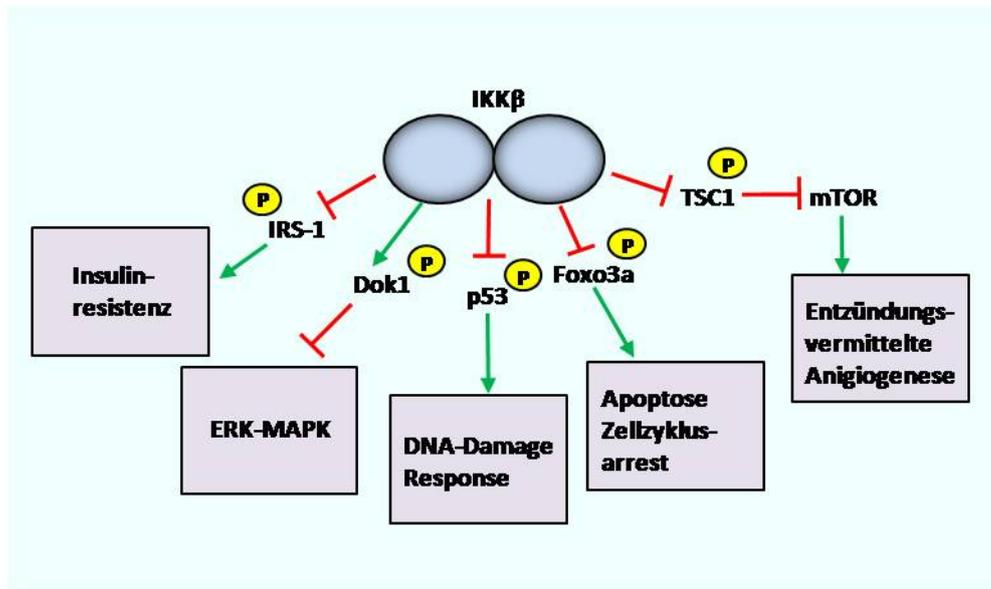


Abbildung 2: Substrate und Funktionen von IKK β unabhängig von NF- κ B

Schematische Darstellung. IKK β phosphoryliert, neben den I κ B Proteinen, viele Substrate, die häufig antiapoptotische und proinflammatorische Prozesse fördern. Hier sind einige dieser Substrate mit den entsprechenden Auswirkungen dargestellt. Die Phosphorylierung von IRS-1 inhibiert die Signaltransduktion von Insulin und trägt damit zur Entwicklung einer Insulinresistenz bei (Tilg und Moschen, 2008). Phosphoryliertes Dok1 inhibiert effizient die Aktivierung der Kinasen ERK (*extracellular signal-regulated kinase*) 1 und 2 und fördert die Zellmotilität (Lee et al, 2004). Die Phosphorylierung der Tumorsuppressorproteine p53 und Foxo3a resultiert in deren proteasomalen Degradation (Xia et al, 2009; Hu et al, 2004). Tuberous sclerosis (TSC) 1 und TSC2 reprimieren zusammen die mTOR-Signalkaskade. Phosphorylierung von TSC1 durch IKK β interferiert mit dessen Funktion und führt damit zur Aktivierung von mTOR, wodurch die Angiogenese in Tumoren gesteigert wird (Lee et al, 2007). P: Phosphorylierung (modifiziert nach Oeckinghaus et al, 2011).

Die Expression und Aktivität von IKK β wird durch Hypoxie erhöht. Daran sollen sowohl Prolylhydroxylasen als auch aktivierte Kinasen, wie CaMK2, beteiligt sein (Cummins et al, 2006; Culver et al, 2010; Melvin et al, 2011).

1.3 Das Ubiquitin-Proteasom-System

Wie oben beschrieben, hat die Ubiquitin-abhängige Degradation von Onkoproteinen und Tumorsuppressorproteinen eine besondere Bedeutung für die Entstehung von manchen Krebsarten (Mani und Gelmann, 2005). Daneben spielt die Ubiquitinierung- die kovalente Bindung von Ubiquitin an Proteine- eine Rolle bei der Regulation von verschiedenen anderen zellulären Prozessen wie Zellzykluskontrolle, Induktion der

Immunantwort, Proteinqualitätskontrolle oder Signaltransduktion (Kerscher et al, 2006) (siehe auch Kapitel 1.1 und 1.2). Ubiquitinierung ist hierarchisch geordnet und erfolgt unter ATP-Verbrauch. In einer enzymatischen Kaskade wird im ersten Schritt Ubiquitin, ein 76 Aminosäuren großes Protein, das von der Hefe bis zum Menschen konserviert ist, an ein Ubiquitin-aktivierendes Enzym (E1) konjugiert. Im zweiten Schritt wird das aktivierte Ubiquitin auf ein Ubiquitin-konjugierendes Enzym (E2) transferiert. Im dritten Schritt erfolgt die Übertragung auf das Substrat mit Hilfe einer Ubiquitin-Protein Ligase (E3). Das Resultat ist meistens eine Isopeptid-Bindung zwischen dem carboxyterminalen Glycin von Ubiquitin und der ϵ -Aminogruppe eines internen Lysin-Restes. Nach der Monoubiquitinierung kann die Ubiquitinkette durch weitere Ubiquitin-Ubiquitin Isopeptid Bindungen elongiert werden (Hoppe, 2005). Ubiquitin besitzt sieben Lysine (K6, K11, K27, K29, K33, K48 und K63) und alle können für eine Kettenverlängerung benutzt werden (Peng et al, 2003). K48-Ubiquitinketten, mit einer Mindestlänge von 4 Ubiquitinen, führen zu einer Degradation des Substrats durch das 26S Proteasom, einem großen, multimeren Protease-Komplex (Thrower et al, 2000). K63-Ubiquitinketten regulieren hauptsächlich Protein-Protein Interaktionen. Mehrere Komponenten der IKK-Signalkaskade, u. a. RIP1 und NEMO, werden K63-polyubiquitiniert und diese Modifikation ist wichtig für die Aktivierung des IKK-Komplexes (Chen, 2005; Wu et al, 2006; Israel, 2010).

1.4 Aktivierung von Interferon-stimulierten Genen

Wie bereits im Kapitel 1.2 erwähnt, wird IKK im Rahmen der angeborenen Immunität durch Rezeptoren die Pathogen-assoziierte molekulare Muster erkennen, aktiviert. Toll-like Rezeptoren binden ein breites Spektrum an PAMPs, wobei jeder Rezeptortyp ein ganz bestimmtes PAMP z.B. Lipopolysaccharide (TLR4) oder Flagellin (TLR5) detektiert (Akira et al, 2006). TLRs fungieren somit als Sensoren für bakterielle und virale Infektionen und leiten eine Immunantwort ein. Abbildung 3 zeigt die Aktivierung von TLR3.

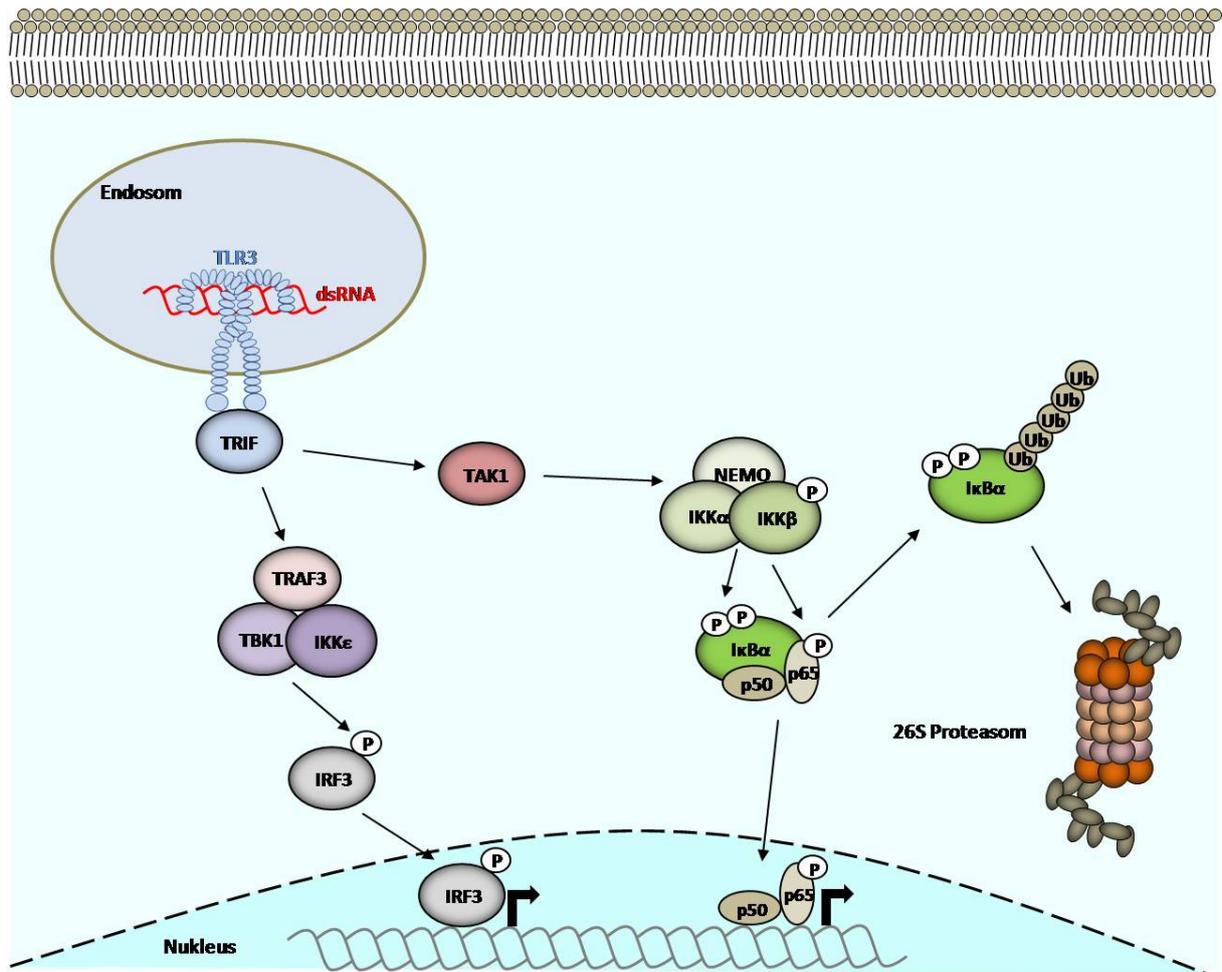


Abbildung 3: Aktivierung der TLR3-Signalkaskade resultiert in Expression von Interferon, Interferon-stimulierten Genen und pro-inflammatorischen Zytokinen.

TLR3 gehört zu einer Gruppe von zellulären Rezeptoren, die Pathogen-assoziierte molekulare Muster erkennen und essentiell für die angeborene Immunantwort sind. TLR3 ist, unter anderem, in Endosomen lokalisiert und erkennt dsRNA, sowie synthetische dsRNA-Analoga wie z.B. Poly I:C (Blasius und Beutler, 2010). Die Bindung der Liganden führt zur Rekrutierung des Adaptors TRIF (TIR-domain-containing adaptor protein-inducing IFN β) (Hoebe et al, 2003). TRIF assoziiert mit weiteren Proteinen wie TRAF3, TRAF6, RIP1 und 3 (nicht alle dargestellt). TRAF6, RIP1, TRADD und TAK1 aktivieren den IKK-Komplex und damit NF- κ B (siehe auch Abbildung 2) (Ermolaeva et al, 2008; Pobezinskaya et al, 2008). Über TRAF3 phosphorylieren TBK1 und IKK ϵ IRF3 und aktivieren diesen Transkriptionsfaktor (Fitzgerald et al, 2003; Häcker et al, 2006). IRF3 bildet Homodimere, transloziert in den Nukleus und induziert die Expression von IFN β und von Interferon-stimulierten Genen (Honda et al, 2006). Die Darstellung ist stark vereinfacht. Die Aktivierung von AP-1 ist nicht gezeigt. P:Phosphorylierung. Ub:Ubiquitinierung.

TLR3 erkennt doppelsträngige RNA, ein häufiges Zwischenprodukt viraler Replikation. Stimulierung der TLR3-Signalkaskade resultiert in Aktivierung von NF- κ B, durch den IKK-Komplex, und IRF3, mittels Phosphorylierung durch die Kinasen TBK (*tank-binding kinase*) 1 und IKK ϵ (Kawai und Akira, 2010). IRF3 ist ein sog. *IFN regulatory factor*. Diese Proteine können die Expression von einigen Interferon-stimulierten Genen (ISG) direkt, ohne die Notwendigkeit zuerst Interferon zu induzieren, stimulieren (Tamura et al, 2008). IRF3 induziert die Expression der ISG56

Genfamilie, zu der die 4 Mitglieder ISG54, ISG56, ISG58 und ISG60 gehören und trägt so direkt zur Etablierung eines antiviralen Status in der infizierten Zelle bei. Diese 4 Gene wurden auch als *viral stress-inducible genes* (VSIG) bezeichnet. ISG56, der Namensgeber dieser Familie, ist das am stärksten in Interferon (IFN)-behandelten Zellen induzierte Gen. Die ISG56 Proteine agieren als Inhibitoren verschiedener viraler und zellulärer Prozesse. Sie hemmen u. a. Translation, Zellmigration, Proliferation, Signalwege und virale Replikation. IRF3 ist auch an der Aktivierung der Expression von Typ I Interferonen beteiligt. Interferone sind eine Familie von Zytokinen, die eine essentielle Rolle bei der Bekämpfung solider und hämatologischer Tumoren sowie viraler und bakterieller Infektionen spielen (Vilcek, 2006). IFN werden in drei Gruppen (Typ I, II und III) mit zum Teil unterschiedlichen Funktionen unterteilt. Zu der Gruppe der Typ I Interferone gehören unter anderem IFN α und β . IFN γ ist ein Typ II Interferon, während IFN λ die dritte Gruppe bildet. Typ I und III IFN- Rezeptoren assoziieren mit der Janus Kinase JAK1 und der Tyrosin Kinase TYK2, während Typ II Rezeptoren mit JAK1 und 2 interagieren (Honda et al, 2006). Die Bindung von Typ I IFN an den entsprechenden Rezeptor initialisiert eine Signalkaskade in deren Verlauf STAT (*signal transducers and activators of transcription*) 1 und 2 phosphoryliert werden (Platanias, 2005). Die Proteine bilden ein Heterodimer durch die Interaktion der phosphorylierten Tyrosin-Reste und der SH2-Domäne des Dimerpartners. Das Heterodimer assoziiert mit IRF9 (*IFN regulatory factor 9*), wodurch der Transkriptionskomplex ISGF3 entsteht (Horvath et al, 1996; Martinez-Moczygemba et al, 1997). Dieser bindet an sogenannte ISREs (*interferon stimulated response element*), mit der Konsensussequenz AGTTCNNTTCC, die sich in den Promotorbereichen von Interferon-stimulierten Genen befinden (Darnell et al, 1994). Promotoren können eine oder multiple ISREs enthalten, die deren Induktion durch IFN vermitteln (Pellegrini und Schindler, 1993). IRFs erkennen ebenfalls ISREs aber nur von einigen ISGs (Tamura et al, 2008). Die konzertierte Aktion verschiedener Faktoren u.a. Interferone, IRFs, NF- κ B, führt zur Etablierung der antiviralen Antwort.

1.5 Der SIN3-HDAC-Komplex und die Regulation der Stabilität von Transkriptionsfaktoren

Interessanterweise benötigen sowohl ISGF3 als auch IRF3 die Aktivität von Histondeacetylasen (HDAC), um ISGs zu aktivieren (Chang et al, 2004; Nusinzon und Horvath, 2005). HDACs können sowohl als positive als auch als negative Regulatoren während der TLR-Signaltransduktion agieren (Aung et al, 2006; Halili et al, 2010). Im IFN-Signalweg ist beispielsweise die Acetylierung wichtig für die Bildung des ISGF3 Transkriptionskomplexes. HDACs sind notwendig, um STAT1 zu deacetylieren, damit es für die Reinitiation als Reaktion auf IFN zur Verfügung steht (Krämer et al., 2009). Die Inhibition von HDACs wird zunehmend als neue Therapiemöglichkeit bei malignen Erkrankungen eingesetzt (Leggatt und Gabrielli, 2011), was auf eine Aktivität von HDACs in Karzinomen hinweist. Verschiedene HDAC-Inhibitoren werden zurzeit in klinischen Studien getestet (Ma et al, 2009).

Der Kern des SIN3/HDAC-Komplexes besteht aus SIN3, HDAC1/2, SAP30, SAP18, SDS3 und RBBP4/7 (Zhang et al, 1997; Hassig et al, 1997; Laherty et al, 1998, Zhang et al, 1998). SIN3 dient als Hauptgerüstprotein (Grzenda et al, 2009). HDAC1 und 2 gehören zur Klasse I von Histondeacetylasen (De Ruijter et al, 2003). SAP30, ein evolutionär konserviertes Protein, bindet direkt an SIN3 und an anderen Mitgliedern des Komplexes, und scheint diesen zu stabilisieren (Zhang et al, 1998).

Lysin Acetylierung ist eine posttranslationale Modifikation, bei der eine Acetylgruppe von Coenzym A mit der ϵ -Gruppe eines Lysins verknüpft wird, was zur Neutralisierung der positiven Ladung führt. Durch Deacetylierung von Lysin-Resten in Histonenden vermittelt der SIN3/HDAC-Komplex in den meisten Fällen transkriptionelle Repression auf Ebene des Chromatins (Hassig et al, 1997). Acetylierung und Deacetylierung spielen auch eine Rolle bei der Kontrolle von Transkriptionsfaktoren selbst, unter anderem durch Regulation ihrer Stabilität (Sadoul et al, 2008; Yang und Seto, 2008). Da Lysine auch bei der Ubiquitinierung Ziel der posttranslationalen Veränderungen sind, besteht eine Wechselwirkung zwischen diesen beiden posttranslationalen Modifikationssystemen. Unterschiedliche Mechanismen der Regulation der intrazellulären Proteinmenge von Faktoren mittels Ubiquitinierung und Acetylierung/Deacetylierung wurden beschrieben. Die Lysin-Acetylierung/Deacetylierung kann direkt oder indirekt mit der Ubiquitinierung des

Proteins wechselwirken. Im Fall von RelA verhindert die Acetylierung bestimmter Lysine deren Ubiquitinierung durch eine direkte Konkurrenz um die Lysin Akzeptorstellen, wodurch das Protein stabilisiert wird. Diese Acetylierung ist verantwortlich für Repression und Aktivierung spezifischer NF- κ B-responsiver Gene (Li et al., 2011). Ein alternativer Mechanismus der posttranslationalen Kontrolle wurde für Cyclin A beschrieben. Hier dient die Acetylierung von Lysinen als Signal für die Ubiquitinierung anderer Lysine und destabilisiert somit das Protein während eine Deacetylierung die Stabilität erhöht (Mateo et al, 2010).

Bei der Kontrolle von RUNX1, einem Schlüsselregulator der Hämatopoese, wurde eine Abhängigkeit zwischen Phosphorylierung und Ubiquitinierung gezeigt. RUNX1 ist eines der am häufigsten mutierten Gene in menschlichen Leukämien (Look, 1997; Speck und Gilliland, 2002). Die ERK1-abhängige Phosphorylierung von RUNX1 stimuliert die Transkriptionsaktivität des Proteins und führt gleichzeitig zum proteasomalen Abbau, indem die Bindung an den SIN3-HDAC-Komplex verhindert wird. Die Bindung des SIN3-HDAC-Komplexes an nicht ERK-phosphoryliertes RUNX1 stabilisiert es (Imai et al, 2004). Auf diese Weise ist sicher gestellt, dass die transkriptionelle Aktivität von RUNX1 gering und nur vorübergehend ist (Bae und Lee, 2006). Eine Beteiligung der Deacetylase-Aktivität wurde für die oben beschriebene Regulation der RUNX1 Proteinmenge allerdings nicht untersucht.

1.6 Das zelluläre Protein PBF

PBF wurde ursprünglich über seine Fähigkeit, an regulatorische Sequenzen innerhalb der Kontrollregion einiger Papillomvirus (PV)-Typen zu binden, identifiziert (Boeckle et al, 2002). Es wurde gezeigt, dass PBF auch an regulatorische Elemente innerhalb des humanen Huntingtin Promotors binden kann, weshalb das Protein auch HDBP2 (*Huntington Disease Binding Protein 2*) genannt wurde (Tanaka et al, 2004). Das Protein weist Homologien zu GEF (*GLUT4 Enhancer Factor*) und dem murinen Protein GIG1 (*Glucocorticoid Induced Gene 1* oder Zfp 704, human ZNF704) auf. Alle drei Proteine haben das Potential einen Zinkfinger auszubilden und besitzen hochkonservierte Regionen (CR1, 2 und 3) mit bis zu 86% Sequenzübereinstimmung, weshalb vorgeschlagen wurde, dass sie eine neue Familie von Transkriptionsfaktoren bilden (Tanaka et al, 2004). Wie in Abbildung 4 dargestellt, ist das humane PBF Protein 513 Aminosäuren (AS) groß und besitzt eine

funktionelle nukleäre Exportsequenz (NES) und zwei potentielle nukleäre Lokalisationssequenzen (NLS), welche PBF als nukleo-cytoplasmatisches „shuttle“-Protein charakterisieren (Tanaka et al, 2004).

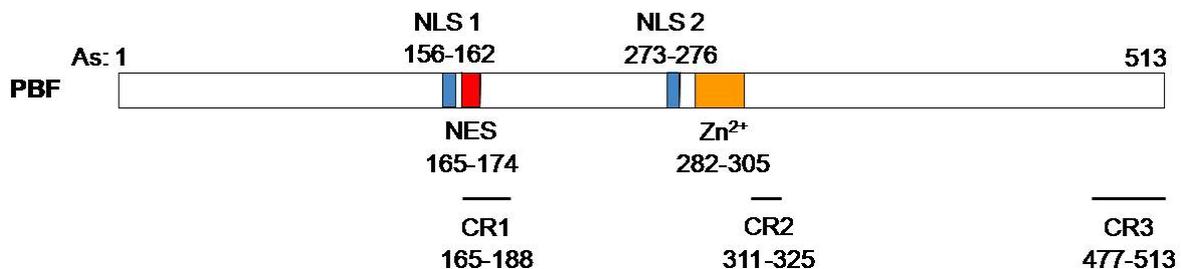


Abbildung 4: Schematische Darstellung von PBF

Eingezeichnet sind die Position der funktionellen nukleären Exportsequenz (NES), die Positionen der zwei potentiellen nukleären Lokalisationssequenzen (NLS) und des Zinkfingers. CR1, 2 und 3 sind konservierte Regionen in PBF, GEF und GIG1. As: Aminosäure.

Die subzelluläre Lokalisation von PBF wird durch Wachstumsfaktoren kontrolliert. In deren Anwesenheit wird das Protein durch die AKT Kinase und eine weitere Phosphatidylinositol 3- Kinase (PI3K)- abhängige Kinase phosphoryliert, wodurch eine Bindestelle für 14-3-3, ein zelluläres Chaperon, geschaffen wird. Die Interaktion mit 14-3-3 trägt zur Sequestrierung von PBF im Cytoplasma bei. Nach Entzug von Wachstumsfaktoren transloziert das Protein in den Zellkern. Die Überexpression von PBF resultierte in einer Inhibition der Zellproliferation, die zum Teil durch die Interaktion mit 14-3-3 reduziert wurde (Sichtig et al, 2007a). Der Mechanismus der PBF-vermittelten Wachstumsinhibition ist bisher nicht näher untersucht.

PBF besitzt innerhalb der CR3 zwei Regionen, die zu dem sogenannten E-Tail bestimmter Isoformen der T-Zell-Faktoren TCF-1, -3 und -4 hochkonserviert sind. In PBF ist die CR3 wichtig für die Sequenz-spezifische DNA-Bindung (Sichtig et al, 2007b). Mutationsanalysen grenzten die Sequenz, die notwendig ist für die Bindung von PBF an die regulatorische Region von HPV8 und BPV1, auf CCGG (Boeckle et al, 2002) und an den Huntingtin-Promotor auf GCCGGCG ein (Tanaka et al, 2004). Mutationen der jeweiligen DNA-Erkennungssequenzen führten zur Reduktion der basalen Promotoraktivitäten, woraus geschlossen wurde, dass PBF ein transkriptioneller Aktivator der PV- und Huntingtin Promotoren ist (Boeckle et al, 2002; Tanaka et al, 2004). Im Fall von HPV8 konnte gezeigt werden, dass PBF mit

RUNX1, das an eine zum PBF Motiv direkt benachbarte Bindestelle bindet, bei der Aktivierung kooperiert (Schmidt et al., 1997). Darauf aufbauende Versuche offenbarten, dass PBF direkt mit RUNX1 interagiert und beide bei der DNA-Bindung an HPV8 kooperieren (Steger, persönliche Mitteilung). Allerdings führte die Überexpression von PBF zu einer Repression der Promotoren von PV und Huntingtin, die jeweils die DNA-Bindedomäne CR3 von PBF benötigte (Sichtig et al, 2007b; Jordanovski et al, 2011). Im Fall von HPV8 war diese Repression durch Trichostatin A (TSA), einen Inhibitor von HDAC, aufgehoben, was impliziert, dass Histondeacetylasen beteiligt sind (Sichtig et al, 2007b). Die PBF-vermittelte Repression ist ebenfalls abhängig von der Interaktion mit Komponenten des SIN3/HDAC-Komplexes, vermittelt über eine direkte Interaktion von PBF mit SAP30. Dies impliziert, dass PBF als Aktivator und Repressor fungieren kann. Koexpression von PBF mit SAP30 (oder HDAC1) verstärkte nicht nur die transkriptionelle Repression durch PBF, sondern erhöhte auch die Menge an rekombinantem PBF, was auf eine mögliche Regulation der Proteinstabilität von PBF durch SAP30 bzw. den mSIN3A/HDAC1 Komplex schließen lässt (Sichtig et al, 2007b). Abbildung 5 fasst die bisherigen Ergebnisse zusammen.

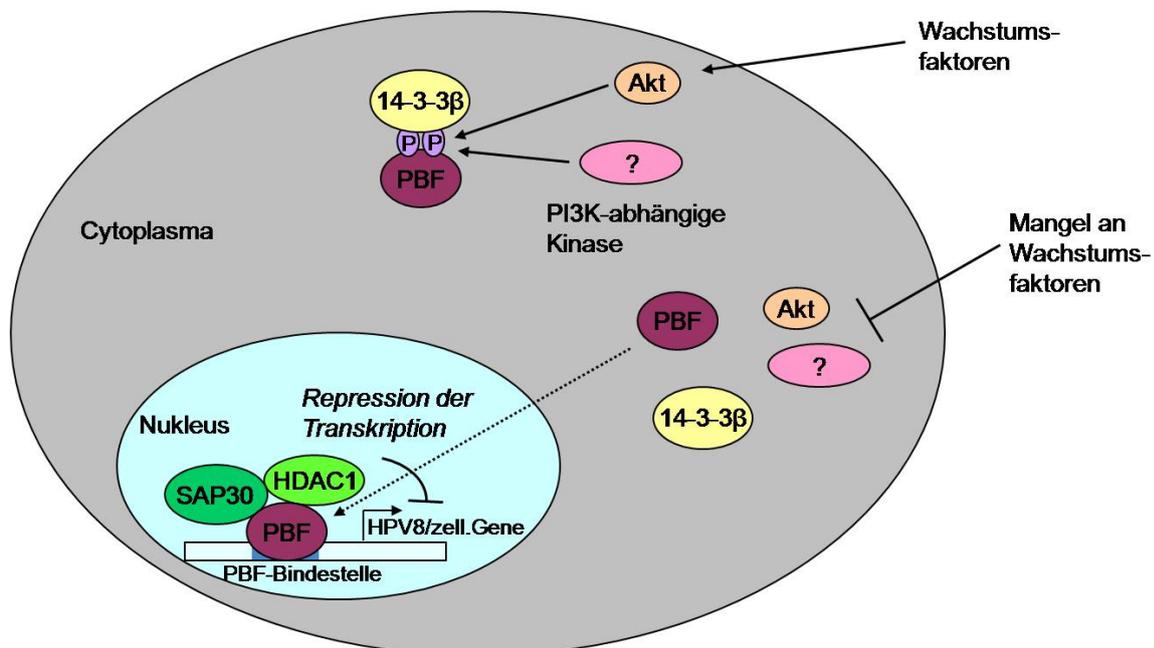


Abbildung 5: Model der bekannten Regulationen und Funktionen von PBF

In Anwesenheit von Wachstumsfaktoren phosphoryliert AKT und eine weitere Phosphatidylinositol 3-Kinase (PI3K)-abhängige Kinase PBF, wodurch eine Bindestelle für 14-3-3, ein zelluläres Chaperon, geschaffen wird. Die Bindung an 14-3-3 trägt zur Sequestrierung von PBF im Cytoplasma bei. Nach Entzug von Wachstumsfaktoren transloziert das Protein in den Zellkern, wo es an spezifischen DNA-Sequenzen bindet und mit Komponenten des SIN3-HDAC-Komplexes die Transkription der Zielgene reprimiert.

1.7 Zielsetzung der Arbeit

Genom-weite Expressionsstudien indizieren eine funktionelle Beteiligung von PBF an Signalwegen, die unter hypoxischen Bedingungen und in Karzinomen aktiv sind. Die biologische Aktivität des Proteins ist allerdings überwiegend unbekannt. Da gezeigt wurde, dass PBF ein Transkriptionsfaktor ist, könnte die Identifizierung seiner zellulären Zielgene zum Verständnis der Funktion von PBF in der Zelle beitragen. Daher sollten im Rahmen der vorliegenden Arbeit die Zielgene von PBF bestimmt werden. Transkriptionsfaktoren werden durch posttranslationale Modifikationen und Protein-Protein-Interaktionen reguliert. Die Bindung an SAP30 führte zur Stabilisierung von PBF. Diese Interaktion sollte näher charakterisiert und die Regulation der Stabilität und Aktivität des Proteins durch Phosphorylierung untersucht werden.

2 MATERIAL

2.1 Bakterienstämme

- ***Epicurian coli*[®] XL1-Blue** (Stratagene, La Jolla, USA)
Genotyp: recA1, endA1, gyrA96, thi-1, hsdR17, supE44, relA1, lac[F'proAB lac^qZΔM15 Tn10 (Tet^r)]

2.2 Eukaryote Zellen

- **RTS3b:**
Plattenepithelkarzinom-Zelllinie aus einer Epidermodysplasia verucciformis-ähnlichen Läsion eines Nieren-Transplantat-Empfängers; ursprünglich HPV5 und HPV8 positiv, nach mehreren Passagen HPV-negativ (Purdie *et al.*, 1993).
- **C33A** (ATCC: HTB-31):
Spontan immortalisierte humane Zervixkarzinom-Zelllinie ohne HPV-Genom und mit epithelialer Morphologie (Auersperg, 1969; Del Vecchio, 1992).
- **U937** (ATCC: CRL-1593.2):
Maligne monozytische Zelllinie isoliert aus dem Pleuraerguss eines Patienten mit histiozytären Lymphom (Sundstrom und Nilsson, 1976).
- **U-87 MG** (ATCC: CRL-1616):
Humane Glioblastom (Astrozytom)- Zelllinie (Ponten und Macintyre, 1968).

2.3 Nukleinsäuren

2.3.1 Synthetisch hergestellte Oligonukleotide

Die HPLC- gereinigten Oligonukleotide wurden von den Firmen Operon (Köln) und Biologio (Nimwegen, Niederlande) bezogen. Die Zahlenangaben beziehen sich

jeweils auf die Positionen der Aminosäuren im Protein. Gegenüber der Wildtyp-Sequenz veränderte Nukleotide sind schwarz hervorgehoben.

- Oligonukleotide für *in vitro* Mutagenesen:

Name	Sequenz in 5'→3'
PBF-T229A	CAGTGGTGTCTCC G CCCCCTCGCCCCCCCAC
PBF-T229A-r	GTGGGGGGGGCGAGGGGG C GGAGACACCACTG
PBF-T229E	CAGTGGTGTCTCC GA ACCCTCGCCCCCCCAC
PBF-T229E-r	GTGGGGGGGGCGAGGG TT C GGAGACACCACTG
PBF-T348A	GGCACCCCAGTCCCTGGGG G CCCCACCTCCGAGCCAG
PBF-T348A-r	CTGGCTCGGAGGTGGGG G CCCCAGGGACTGGGGTGCC
PBF-T348E	GGCACCCCAGTCCCTGGGG GA ACCACCTCCGAGCCAG
PBF-T348E-r	CTGGCTCGGAGGTGGG TT CCCCAGGGACTGGGGTGCC
PBF-S365A	GCATGACTGGCCTGCCTCTGG G CTGCTCTTCCACCACCTCTG
PBF-S365A	CAGAGGTGGTGAAGAGCAG C CAGAGGCAGGCCAGTCATGC
PBF-S365E	GCATGACTGGCCTGCCTCTGG GA AGCTCTTCCACCACCTCTG
PBF-S365E-r	CAGAGGTGGTGAAGAG CTT CAGAGGCAGGCCAGTCATGC
PBF-K281R	CTGTGAAGGTGATGTACAG G TGCCTGTGGCC
PBF-K281R-r	GGCCACAGGCAC C TGTACATCACCTTACAG
PBF-K289R	GGCCAAACTGTGGCAG A GTCTGCGCTCCATTG
PBF-K289R-r	CAATGGAGCGCAGAACT C TGCCACAGTTTGGCC
PBF-K298R/K302R	GCGCTCCATTGTGGGCATCAG A CACACGTCAGAGCCCTCCAT CTGGGGG
PBF-K298R/K302R-r	CCCCAGATGGAGGG C TGACGTGTCGT C TGATGCCACAAT GGAGCGC
PBF-S212A/T216A	GGTGACATCTCGGAC G CCGGCAGCAG C GCTACCAGCGGTCAC TGG
PBF-S212A/T216A-r	CCAGTGACCGCTGGTAG C GCTGCTGCC G CGTCCGAGATGTC ACC
PBF-S214A/S215A	GACATCTCGGACAGCGGC G CC G CCACTACCAGCGGTCACTGG
PBF-S214A/S215A-r	CCAGTGACCGCTGGTAG G CG G CGCCGCTGTCCGAGATGTC
PBF-S212/214/215/216A	GACATCTCGGAC G CCGGC G CC G CCGCTACCAGCGGTCACTGG
PBF-S212/214/215/216A-r	CCAGTGACCGCTGGTAG C GG C GG C CGCC G CGTCCGAGATGTC

ISG56-Promotor- mutISREI	GCTTTAGTTTCACTTTCCAGTTTCACTTTCCCTAGGTTTCCA ACTTG
ISG56-Promotor- mutISREI-r	CAAGTTGGAAACCTAGGGAAAGTGAAACTGGAAAGTGAAACTA AAGC
ISG56-Promotor- mutISREII	CAGGAATTCCGCTAGCTTTCTTTTCGGTTTCCCCTTTTCGGTTTC CC
ISG56-Promotor- mutISREII-r	GGGAAACCGAAAGGGGAAACCGAAAGGAAAGCTAGCGGAATT CCTG

- Oligonukleotide für die quantitative PCR:

Gen	Forward-Primer Sequenz in 5'→3'	Reverse-Primer Sequenz in 5'→3'
ZNF395/PBF	CGAAAAAGAAAGAACTCTGTG	CTGTGTCCCCCAGATGGAG
IFIT1/ISG56	TCATCAGGTCAAGGATAGTCTG	GGTGTTCACATAGGCTAGTAG
IFIT2/ISG54	ACTGCAACCATGAGTGAGAAC	GCCTCGTTTTGCCCTTTGAG
IFI44	TGGCAGTGACAACTCGTTTGA	CCGCTTCCCTCCAAAA
IFI16	CTGCACCCTCCACAAG	CCATGGCTGTGGACATG
MEF2C	GCCCTGAGTCTGAGGACAAG	AGTGAGCTGACAGGGTTGCT
PEG10	AACAACAACAACAACTCCAAGC	TCTGCACCTGGCTCTGCAG
HPRT1	TGACACTGGCAAAACAATGCA	GGTCCTTTTCACCAGCAAGCT

Falls nicht anders angegeben enthalten die im Folgenden aufgeführten Plasmide das β -Laktamasegen zur Selektion in Bakterien mittels Ampicillin.

2.3.2 Prokaryote Expressionsvektoren

- **pGEX5x2** (4,9 kb) erlaubt die Expression von Proteinen, die N-terminal mit der Glutathion-S-Transferase (~28 kDa) fusioniert sind, unter der Kontrolle eines Lac-Promotors (IPTG induzierbar) (Amersham Biosciences, Freiburg).

2.3.3 Eukaryote Expressionsvektoren

- **pcDNA3.1+FLAG** (5,4 kb) exprimiert Proteine, die N-terminal mit einem FLAG-Epitop fusioniert sind unter dem T7- und dem CMV Promotor. Hierfür wurden die komplementären Oligonukleotide FLAG-HindIII/EcoRI-5' und FLAG-HindIII/EcoRI-3' über HindIII und EcoRI in pcDNA3.1+ kloniert (Steger, persönliche Mitteilung).
- **pCMV-HA** (3,8 kb) erlaubt die Expression von Proteinen, die N-terminal mit einem Hämagglutinin-Epitop fusioniert sind, unter der Kontrolle eines CMV Promotors (BD Biosciences, Heidelberg).
- **pCMV-Myc** (3,8 kb) ermöglicht unter Kontrolle eines CMV Promotors die Expression von N-terminal fusionierten Proteinen mit einem Myc-Epitop (Clontech, Heidelberg).
- **pcDNA4/TO** (5.1 kb) ermöglicht in Anwesenheit des Tetracyclin Repressors eine Tetracyclin-induzierbare Expression von Proteinen. Der Vektor beinhaltet 2 Tetoperator 2 Sequenzen platziert stromaufwärts des humanen Cytomegalovirus *immediate-early* Promotors und kodiert für eine Zeocin-Resistenz (Invitrogen, Karlsruhe).
- **pCMV-BL** enthält einen CMV Promotor vor der MCS (*Multiple cloning side*) vom Bluescript BL Vektor (Lin et al, 1994).

2.3.4 Reporterplasmide

- **ISG56-Prom-Luc** beinhaltet die Nukleotide -3 bis -654 des ISG56 Promotors. Diese wurden über SacI/HindIII in pGL3-Basic kloniert (Grandvaux et al, 2002).
- **ISG56-Prom-2x ISREI** beinhaltet zwei Kopien des ISREI. Über *in vitro* Mutagenese mit den Oligonukleotiden ISG56-Promotor-mutISREII und ISG56-Promotor-mutISREII-r wurde im ISG56-Prom-Luc das ISREII durch das ISREI ersetzt (vorliegende Arbeit).
- **ISG56-Prom-2x ISREII** beinhaltet zwei Kopien des ISREII. Über *in vitro* Mutagenese mit den Oligonukleotiden ISG56-Promotor-mutISREI und ISG56-Promotor-mutISREI-r wurde im ISG56-Prom-Luc das ISREI durch das ISREII ersetzt (vorliegende Arbeit).

- **pISRE** beinhaltet vier direkt auf einander folgende Kopien des ISREII aus dem ISG56 Promotor, platziert stromaufwärts eines synthetischen Promotors und des Luciferase Gens (Panomics, Mailand, Italien).
- **BPV1-3xBS1-wt-Luc** kodiert vor dem Luciferase Gen 3x die BS-1 von BPV1 vor dem MLP (*major late promoter*) (Boeckle et al, 2002).
- **HPV8-NCR-Luc** Die NCR von HPV8 mit Teilen der flankierenden L1- und E6-Leserahmen (Position 7077-558) wurde als HindIII/BglIII-Fragment aus NCR8-CAT (Stubenrauch et al., 1992) in die HindIII/BamHI-Schnittstellen von pALuc kloniert (Steger, persönliche Mitteilung).

2.3.5 Rekombinante Plasmide

PBF-Konstrukte:

- **pcDNA3.1-FLAG-PBF** kodiert für den ORF von PBF. PBF wurde aus pET14b isoliert und in pcDNA3.1-FLAG über XhoI kloniert (Sichtig, 2006).
- **pcDNA3.1-FLAG-PBF Δ N** kodiert für eine Deletionsmutante von PBF (AS 114-513), die aus pET14b isoliert und über XhoI in pcDNA3.1-FLAG kloniert wurde (Sichtig, 2006).
- **pcDNA3.1-FLAG-PBF Δ 3** kodiert für eine Deletionsmutante von PBF (AS 189-378), die aus pET14b isoliert und über XhoI in pcDNA3.1-FLAG kloniert wurde (Steger, persönliche Mitteilung).
- **pcDNA3.1-FLAG-PBF Δ 4** kodiert für eine Deletionsmutante von PBF (AS 223-378), die aus pET14b isoliert und über XhoI in pcDNA3.1-FLAG kloniert wurde (Sichtig, 2006).
- **pcDNA3.1-FLAG-PBF Δ 5** kodiert für eine Deletionsmutante von PBF (AS 114-378), die aus pET14b isoliert und über XhoI in pcDNA3.1-FLAG kloniert wurde (Sichtig, 2006).
- **pcDNA3.1-FLAG-PBF Δ 9** kodiert für eine Deletionsmutante von PBF (AS 263-513), die aus pET14b isoliert und über XhoI in pcDNA3.1-FLAG kloniert wurde (Sichtig, 2006).
- **pcDNA3.1-FLAG-PBF Δ 10** kodiert für eine Deletionsmutante von PBF (AS 379-513), die aus pET14b isoliert und über XhoI in pcDNA3.1-FLAG kloniert wurde (Sichtig, 2006).

- **pcDNA3.1-FLAG-PBFmtCR3** kodiert für den ORF von PBF mit AS-Austauschen (AS 484-488 und AS 502-506), der aus pET14b isoliert und über XhoI in pcDNA3.1-FLAG kloniert wurde (Sichtig, 2006).
- **pcDNA3.1-FLAG-PBF-3xT/S-A (T229/348/S365A)** kodiert für den ORF von PBF mit AS-Austauschen. Die Threonine an den Positionen 229 und 348 bzw. das Serin an Position 365 wurden über mehrere *in vitro* Mutagenesen mit den Oligonukleotiden PBF-T229A bzw. PBF-T229A-r, PBF-T348A bzw. PBF-T348A-r und PBF-S365A bzw. PBF-S365A-r in Alanine mutiert (vorliegende Arbeit).
- **pcDNA3.1-FLAG-PBF Δ 4-3xT/S-A (T229/348/S365A)** kodiert für den ORF von PBF Δ 4 mit AS-Austauschen. Die Threonine an den Positionen 229 und 348 bzw. das Serin an Position 365 wurden über mehrere *in vitro* Mutagenesen mit den Oligonukleotiden PBF-T229A bzw. PBF-T229A-r, PBF-T348A bzw. PBF-T348A-r und PBF-S365A bzw. PBF-S365A-r in Alanine mutiert (vorliegende Arbeit).
- **pcDNA3.1-FLAG-PBF-3xT/S-E (T229/348/S365E)** kodiert für den ORF von PBF mit AS-Austauschen. Die Threonine an den Positionen 229 und 348 bzw. das Serin an Position 365 wurden über mehrere *in vitro* Mutagenesen mit den Oligonukleotiden PBF-T229E bzw. PBF-T229E-r, PBF-T348E bzw. PBF-T348E-r und PBF-S365E bzw. PBF-S365E-r in Glutaminsäure mutiert (vorliegende Arbeit).
- **pcDNA3.1-FLAG-PBF-4xK/R (K281/289/298/302R)** kodiert für den ORF von PBF mit AS-Austauschen. Die Lysine an den Positionen 281, 289, 298 und 302 wurden über mehrere *in vitro* Mutagenesen mit den Oligonukleotiden PBF-K281R bzw. PBF-K281R-r, PBF-K289R bzw. PBF-K289R-r und PBF-K298R/K302R bzw. PBF-K298R/K302R-r in Arginine mutiert (vorliegende Arbeit).
- **pcDNA3.1-FLAG-PBF-S212/214/215/T216A** kodiert für den ORF von PBF mit AS-Austauschen. Die Serine an den Positionen 212, 214, 215 bzw. das Threonin an Position 216 wurden über *in vitro* Mutagenese mit den Oligonukleotiden PBF-S212/215/215/T216A und PBF-S212/214/215/T216A-r in Alanine mutiert (vorliegende Arbeit).
- **pcDNA3.1-FLAG-PBF Δ 3-S212/214/215/T216A** kodiert für den ORF von PBF Δ 3 mit AS-Austauschen. Die Serine an den Positionen 212, 214, 215 bzw.

das Threonin an Position 216 wurden über *in vitro* Mutagenese mit den Oligonukleotiden PBF-S212/215/215/T216A und PBF-S212/214/215/T216A-r in Alanine mutiert (vorliegende Arbeit).

- **pcDNA3.1-FLAG-PBF Δ 280-312** kodiert für eine Deletionsmutante von PBF. Über *in vitro* Mutagenese wurden die AS 280-312 deletiert (Steger, persönliche Mitteilung).
- **pcDNA4/TO-FLAG-PBF** ermöglicht die Expression von FLAG-PBF unter der Kontrolle eines Tetracyclin responsiven Promotors. Der ORF, welcher für PBF fusioniert mit einem N-terminalen FLAG-Epitop kodiert, wurde aus pcDNA3.1-FLAG-PBF isoliert und in pcDNA4/TO über PmeI ligiert (vorliegende Arbeit).

SAP30-Konstrukt:

- **pCMV-HA-SAP30** kodiert den ORF von SAP30 der aus pACT2 isoliert und über EcoRI und XhoI in pCMV-HA kloniert wurde (Steger, persönliche Mitteilung).

HDAC1-Konstrukte:

- **pCMV-Myc-HDAC1** kodiert den ORF für HDAC1. Das über PCR mit dem Template pOTB7-HDAC1 (RZPD) und den Oligonukleotiden HDAC1-EcoRI-5' und HDAC1-XhoI-3' amplifizierte Fragment wurde über EcoRI und XhoI in pCMV-Myc kloniert wurde (Sichtig, 2006).
- **pGEX-5x2-HDAC1** kodiert den ORF für HDAC1. Das über PCR mit dem Template pOTB7-HDAC1 (RZPD) und den Oligonukleotiden HDAC1-EcoRI-5' und HDAC1-XhoI-3' amplifizierte Fragment wurde über EcoRI und XhoI in pGEX-5x2 kloniert wurde (Sichtig, 2006).

Sonstige Konstrukte:

- **CMVBL-IRF3-5D** kodiert für eine konstitutiv aktive Form des IRF3 Transkriptionsfaktors (Lin et al, 1998).
- **pcDNA6/TR** kodiert für den Tetracyclin Repressor und für ein Blasticidin-Resistenzgen (Invitrogen, Karlsruhe).

2.3.6 DNA-Längenstandards

- 1 kb DNA-Leiter (Invitrogen, Karlsruhe)
- O' Range Ruler™ 100 bp+500 bp DNA-Leiter (MBI Fermentas, St. Leon-Rot)
- Mass Ruler™ mix DNA-Leiter (MBI Fermentas, St. Leon-Rot)

2.3.7 Sonstige Nukleinsäuren

- Desoxynukleotide (dNTP's) (MBI Fermentas, St. Leon-Rot)

2.4 Radioisotope

- ³⁵S-Cystein (Amersham Biosciences, Freiburg)

2.5 Proteine

2.5.1 Enzyme

- Restriktionsendonukleasen wurden von folgenden Firmen bezogen:
 - MBI Fermentas, St.Leon-Rot
 - New England BioLabs, Schwalbach
- Alkalische Phosphatase aus Kälberdarm (MBI Fermentas, St. Leon-Rot)
- *Taq* DNA-Polymerase (Ampliqon, Kopenhagen, Dänemark)
- AccuPOL DNA-Polymerase (Ampliqon, Kopenhagen, Dänemark)
- T4 DNA-Ligase (MBI Fermentas, St. Leon-Rot)
- T4 Polynukleotidkinase (MBI Fermentas, St. Leon-Rot)
- λ-Phosphatase (Santa Cruz, Heidelberg)

2.5.2 Größenstandards

- SDS-PAGE Molekulargewichtsmarker, nieder- und hochmolekular, farblos und vorgefärbt (MBI Fermentas, St. Leon-Rot)

2.5.3 Antiseren

- **α -PBF** ein aus Kaninchen isoliertes, gereinigtes polyklonales Antiserum gegen bakteriell exprimiertes PBF (Boeckle et al, 2002).
- **α -Aktin (C-11)**: polyklonaler Antikörper gegen humanes β -Aktin aus der Ziege (Santa Cruz, Heidelberg).
- **α -FLAG (M2)**: monoklonaler Antikörper gegen das FLAG-Epitop aus der Maus (Sigma-Aldrich, Steinheim).
- **α -HA (3F10)**: monoklonaler Antikörper gegen das Hämagglutinin-Epitop des Influenza Virus aus der Ratte (Roche Applied Sciences, Mannheim).
- **α -c-Myc (9E10)**: monoklonaler Antikörper gegen das humane c-Myc-Epitop aus der Maus (Roche Applied Sciences, Mannheim).
- **α -pERK1/2 (E10)**: monoklonaler Antikörper gegen humane dualphosphorylierte (Thr202/Tyr204) ERK1/2 aus der Maus (Cell Signaling Technology, Danvers, Massachusetts, USA).
- **α -pThr/pSer-Pro (AB3192)**: polyklonaler Antikörper gegen phosphorylierte Threonine und Serine lokalisiert vor einem Prolin aus dem Kaninchen (Millipore, Schwalbach).
- **α -Ub POD (FK2)**: Peroxidase (POD)-gekoppelter Antikörper gegen mono- und polyubiquitinierte Proteine (Biomol, Hamburg).
- **α -Maus/Kaninchen POD**: POD-gekoppelter Antikörper gegen Maus- und Kaninchen-IgG (Roche Applied Sciences, Mannheim).
- **α -Maus POD**: POD-gekoppelter Antikörper gegen Maus-IgG (dianova, Hamburg).
- **α -Kaninchen POD**: POD-gekoppelter Antikörper gegen Kaninchen-IgG (Sigma-Aldrich, Steinheim).
- **α -Ratte POD**: POD-gekoppelter Antikörper gegen Ratten-IgG (Boehringer, Mannheim).

20 Minuten bei 121°C autoklaviert und anschließend bei 4°C gelagert. Zur Selektion wurde das Medium mit 100 µg/ml Ampicillin versetzt.

- **LB-Agar**

Fertigmedium von AppliChem (Darmstadt)

Trypton 10 g/l

Hefe-Extrakt 5 g/l

Agar 15 g/l

NaCl 10 g/l

(pH 7,2)

40 g/l H₂O

20 Minuten bei 121°C autoklaviert und nach Abkühlung auf ca. 50 °C, sowie Zugabe von 100 µg/ml Ampicillin, in Petrischalen gegossen; Lagerung bei 4 °C.

- **Ampicillin** (AppliChem, Darmstadt)

Stocklösung: 100 mg/ml in H₂O; steril filtriert

Endkonzentration: 100 µg/ml

2.7.2 Medien und Zusätze für die Kultivierung eukaryoter Zellen

- **Dulbecco's MEM** (*Modified Eagle Medium*) für C33A und U-87 MG Zellen (Invitrogen, Karlsruhe) mit Glutamax, 4500 mg/ml Glucose, Pyridoxin, ohne Natriumpyruvat

Zusätze:

FCS 10%

Streptomycinsulfat 100 mg/l

Penicillin 100 mu/l (alle Invitrogen, Karlsruhe)

- **RPMI (Roswell Park Memorial Institute) 1640** für U937 Zellen (Invitrogen, Karlsruhe) mit Glutamax

Zusätze:

FCS	10%	
Streptomycinsulfat	100 mg/l	
Penicillin	100 mu/l	(alle Invitrogen, Karlsruhe)

- **E-Medium** für RTS3b Zellen

Dulbecco's MEM	50%	
Dulbecco's Nut Mix F-12	50%	(beide Invitrogen, Karlsruhe)
Transferrin	5 µg/ml	
Triiodo-thyronin	2×10^{-11} M	
Adenin	$1,8 \times 10^{-4}$ M	
Insulin	5 µg/ml	
Hydrocortison	0,4 µg/ml	(alle Sigma-Aldrich, Steinheim)
Adrenalin	1 µg/ml	(Calbiochem, Schwalbach)
EGF	10 ng/ml	(Sigma-Aldrich, Steinheim)
FCS	10%	
Streptomycinsulfat	100 mg/l	
Penicillin	100 mu/l	(alle Invitrogen, Karlsruhe)

- PBS
- Trypsin/EDTA (beide Invitrogen, Karlsruhe)
- Für die Selektion stabiler Zelllinien:
 - Zeocin (Invitrogen, Karlsruhe)
 - Blasticidin (PAA, Pasching, Österreich)
 - G418 (PAA, Pasching, Österreich)

- **Einfriermedium:**

Dimethylsulfoxid (DMSO)	10%	(AppliChem, Darmstadt)
FCS	90%	(Invitrogen, Karlsruhe)

- **Sonstige Reagenzien:**

Name	Konzentration	Inkubationsdauer	Hersteller
TNF- α	1 ng/ml	24 h	Cell Signaling Technology, USA
BMS-345541	5 μ M	24 h	Sigma-Aldrich, Steinheim
Poly I:C	10 ng/ml	24 h	InvivoGen, Toulouse, Frankreich
MG132	25 μ M	16 h	Biomol, Hamburg
U0126	15 μ M	2 h	Biomol, Hamburg
IFN α	1000 U/ml	6 h	Biomol, Hamburg

2.8 Reagenzien

Sämtliche in dieser Arbeit verwendeten Laborchemikalien wurden mit dem Reinheitsgrad „reinst“ oder „zur Analyse“ von folgenden Firmen bezogen: Amersham Biosciences (Freiburg), AppliChem (Darmstadt), BioRad (München), Difco (Detroit, USA), ICN (Aurora, USA), Invitrogen (Karlsruhe), Merck AG (Darmstadt), Roth (Karlsruhe) und Sigma-Aldrich (Steinheim).

2.8.1 Puffer und Lösungen

Für Proteinaufreinigung:

LSDB (*Low Salt Dilution Buffer*)

0-1000 mM

Glycerin	20%
Tris/HCl pH 7,9	50 mM
NP40	0,1%
DTT	1 mM
PMSF	1 mM
KCl	0-1000 mM

Für Proteingele:

SDS-Polyacrylamidgele (PAG)

Trenngel 8-15%

Acrylamid/Bisacrylamid	0,2-0,4%
4x Tris/HCl/SDS, pH 8,8	25%
Ammoniumpersulfat	0,03%
TEMED	0,1%

Sammelgel 3,9%

Acrylamid/Bisacrylamid	0,1%
4x Tris/HCl/SDS, pH 6,8	25%
Ammoniumpersulfat	0,05%
TEMED	0,1%

4x Tris/HCl/SDS, pH 8,8

Tris-Base	1,5 M
SDS	0,4%

(mit HCl auf pH 8,8 eingestellt)

4x Tris/HCl/SDS, pH 6,8

Tris-Base	0,5 M
SDS	0,4%

(mit HCl auf pH 6,8 eingestellt)

2x SDS-Probenpuffer

Tris/HCl, pH 6,8	125 mM
Glycerin	20%
SDS	2%
β -Mercaptoethanol	2%
Bromphenol-Blau	15 μ M

(mit 1N HCl auf pH 6,8 eingestellt)

SDS-Elektrophorese-Puffer

Tris-Base	25 mM
Glycin	192 mM
SDS	0,1%

Coomassie Blau Färbelösung

Methanol	50%
Essigsäure	10%
<i>Coomassie brilliant blue</i>	0,05%

Entfärbelösung

Methanol	5%
Essigsäure	7%

Für Western Blots:

Transferpuffer

Tris-Base	25 mM
Glycin	192 mM
Methanol	20%

TBST

Tris/HCl, pH 7,9	10 mM
NaCl	150 mM
Tween 20	0,05%

Abblock-Lösung

Magermilchpulver	4%
(in TBST)	

Antikörper-Verdünnungslösung

Magermilchpulver	4%
(in TBST)	

Für Luciferase-Tests:**KPO₄-Puffer 1 M**

K ₂ HPO ₄	915 mM
KH ₂ PO ₄	85 mM

Reportersol-Puffer

KPO ₄ -Puffer, pH 7,8	100 mM
NP40	0,1%
DTT	1 mM

Luciferase-Reaktions-Puffer

KPO ₄ -Puffer, pH 7,8	100 mM
MgSO ₄	15 mM
ATP	5 mM

ATP-Stammlösung

ATP	100 mM
Tris/HCl, pH 7,9	200 mM

Luciferin-Stammlösung (100x)

D-Luciferin	100 mg
in 7140 µl Luciferase-Reaktions-Puffer	

Für Agarosegele:**TAE-Puffer (pH 8,0)**

Tris-Acetat	40 mM
EDTA	1 mM

Farbmarker (6x)

Glycerin	30%
Bromphenolblau-Lösung	0,25%
Xylen-Cyanol-Lösung	0,25%
Tris/HCl, pH 7,5	10 mM
EDTA	1 mM

Ethidiumbromidbad

Ethidiumbromid	1 µg/ml
in H ₂ O	

Sonstige Puffer:**PBS (Phosphate Buffer Saline)**

NaCl	137 mM
Na ₂ HPO ₄	4,3 mM
KCl	2,7 mM
KH ₂ PO ₄	1,4 mM

2x HBS

NaCl	280 mM
HEPES, pH 7,05	50 mM
KCl	10 mM
Na ₂ HPO ₄ x 12 H ₂ O	1,5 mM

TE-Puffer

Tris/Cl	10 mM
EDTA	1 mM

2.8.2 Sonstige Chemikalien und Materialien

- Agarose (AppliChem, Darmstadt)
- Albumin Fraktion V (AppliChem, Darmstadt)
- Amplifizierer (*Amplify Fluorographic Reagent*) (Amersham, Freiburg)
- β -Mercaptoethanol (AppliChem, Darmstadt)
- D-Luciferin, freie Säure (Synchem, Felsberg)
- DMSO (AppliChem, Darmstadt)
- FCS (Invitrogen, Karlsruhe)
- FuGENE6 (Roche, Mannheim)
- X-tremeGene9 (Roche, Mannheim)
- IPTG (Isopropyl- β -D-Thiogalactopyranosid) (AppliChem, Darmstadt)
- Ponceau-S-Rot (AppliChem, Darmstadt)
- *Protein Assay Reagents* (BioRad, München)
- RNase-Inhibitor (MBI Fermentas, St. Leon-Rot)
- TEMED (N,N,N',N'-Tetramethylethyldiamin) (AppliChem, Darmstadt)
- Western Blot Membranen aus Nitrocellulose 0,45 μ m (Schleicher&Schuell, Dassel)

Plastikwaren wurden von den Firmen Eppendorf (Hamburg), Greiner (Solingen), Sarstedt (Nürnbrecht) und TPP (Trasadingen, Schweiz) bezogen.

Der Chemilumineszenz-Nachweis sowie Autoradiographien erfolgten mit ECL-Hyperfilmen (Amersham, Freiburg) oder *Ultracruz Autoradiography blue* Filmen (Santa Cruz, Heidelberg).

2.8.3 Reagenziensysteme (Kits)

- Pure Link™ HiPure Plasmid Filter Midi- und Maxiprep Kit
(Invitrogen, Karlsruhe)

- QIAprep Spin/QIAprep 8 Miniprep Kit (Qiagen, Hilden)
- QIAquick *Gel Extraction* Kit (Qiagen, Hilden)
- QIAquick *PCR Purification* Kit (Qiagen, Hilden)
- QuickChange™ *Site-directed Mutagenesis* Kit (Stratagene, La Jolla, USA)
- *Rneasy Mini Kit* (Qiagen, Hilden)
- TNT *Coupled Reticulocyte Lysate System* (Promega, Madison, USA)
- BM *Chemiluminescence Western Blotting* Kit (Roche, Mannheim)
- *SuperScript VILO cDNA Synthesis* Kit (Invitrogen, Karlsruhe)
- *LightCycler FastStart SYBR Green I Kit* (Roche, Mannheim)

2.9 In dieser Arbeit verwendete Geräte

- Eppendorf Thermostat 5320 (Eppendorf, Hamburg)
- Eppendorf Centrifuge 5417 (Eppendorf, Hamburg)
- Heraeus Megafuge 1.0R (Heraeus Instruments, Hanau)
- Heraeus Multifuge L-R (Heraeus Instruments, Hanau)
- Hettich Universal 320 (Hettich, Tuttlingen)
- Stericult 200 Incubator (Labotect, Göttingen)
- Labovert FS (Leica, Wetzlar)
- Biorupter (Diagenode, Liege, Belgien)
- Reinstwasseranlage Milli-QPlusPF (Millipore, Eschborn)
- Light Cycler Systems (Roche Applied Sciences, Mannheim)

3 Methoden

3.1 Bakterienkultur

3.1.1 Herstellung transformationskompetenter Bakterien

Transformationskompetente *E.coli* XL1-Blue-Bakterien wurden nach der Methode von Chung und Miller (1988) hergestellt. 100 ml LB-Medium wurden in einem sterilen 1 Liter Erlenmeyerkolben mit 2,5 ml einer frischen Bakterienvorkultur inokuliert und bei 37°C unter Schütteln bis zu einer OD₆₀₀ von 0,5 inkubiert. 20 ml dieser Kultur wurden verwendet, um weitere 100 ml LB-Medium anzupfen, welche wiederum bis zu einer OD₆₀₀ von 0,5 inkubiert wurden. Die Bakterien wurden dann für 10 Minuten (min) auf Eis gestellt und anschließend 10 min bei 4°C und 3000 g pelletiert. Das Bakterienpellet wurde in 5 ml eiskaltem TSB resuspendiert und erneut 10 min auf Eis inkubiert. Anschließend wurden die Bakterien in vorgekühlte Eppendorfgefäße aliquotiert und in flüssigem Stickstoff schockgefroren. Die Lagerung erfolgte bei -80°C.

Um die Effizienz der neu hergestellten kompetenten Bakterien zu testen, wurden 100 µl der Bakterien mit 1 ng eines Testplasmids transformiert. Als Referenz diente dabei ein Aliquot der aktuell verwendeten Bakterien.

3.1.2 Transformation kompetenter Bakterien

Die Transformation kompetenter XL1-Blue-Bakterien erfolgte mittels Hitzeschock. Hierfür wurde die zu transformierende DNA (ca. 1 ng bzw. ein Ligationsansatz) mit 100 µl Bakteriensuspension 30 min auf Eis inkubiert. Anschließend wurden die Bakterien einem 45-sekündigem Hitzeschock bei 42°C ausgesetzt. Dabei entstehen kurzzeitig Poren in der Zellmembran, die eine Aufnahme der Plasmid-DNA ermöglichen. Nach einer weiteren Inkubation (ca. 3 min) auf Eis wurden die Bakterien zur Selektion auf eine Ampicillin-haltigen LB-Agar-Platte ausgestrichen und bei 37°C über Nacht inkubiert.

3.1.3 Kurzzeitlagerung von Bakterien

Mit Parafilm abgedichtete Plattenkulturen oder dicht verschlossene Flüssigkulturen wurden bis zu 2 Wochen bei 4°C aufbewahrt.

3.1.4 Langzeitlagerung von Bakterien

Für die Langzeitlagerung wurden 1000 µl einer dichten Bakterienvorkultur mit 500 µl 50% Glycerin vermischt und auf Trockeneis eingefroren. Die Lagerung erfolgte bei -80°C.

3.2 Zellkulturmethoden

Die hier verwendeten Zelllinien wurden bei 37°C, 6% CO₂ und 80-90% Luftfeuchtigkeit mit geeignetem Medium in Zellkulturflaschen kultiviert. Die gesamten Zellkulturarbeiten fanden unter einer Sterilwerkbank (CA/REV4; CleanAir, Minneapolis, USA) statt.

3.2.1 Kultivierung eukaryoter Zellen

Die C33A, RTS3b, und U-87 MG Zellen wurden bei einer Konfluenz von 80-90% subkultiviert. Hierfür wurden sie zweimal mit PBS gewaschen, mit einer entsprechenden Menge an Trypsin/EDTA versetzt, die den gesamten Monolayer bedeckte, und bei 37°C inkubiert. Je nach Zelllinie lösten sich die Zellen nach 2-7 min vom Flaschenboden ab. Die abgelösten Zellen wurden in frischem Medium resuspendiert und je nach Wachstumsgeschwindigkeit der Zelllinie, erwünschtem Dichtegrad und Bedarf in neue Zellkulturgefäße ausgesät.

U937 Zellen wurden bei einer Zellkonzentration von maximal 2×10^6 Zellen/ml subkultiviert. Hierfür wurde die Zellsuspension 5 min bei Raumtemperatur (RT) und 250 x g zentrifugiert. Die pelletierten Zellen wurden in PBS resuspendiert und erneut pelletiert (5 min, 250 x g, RT). Anschließend wurden die Zellen in frischem Medium aufgenommen und in gewünschtem Verhältnis in neue Zellkulturgefäße übertragen.

3.2.2 Einfrieren und Lagerung von Zellen

Für die Lagerung von Zellen wurden die in einer großen Zellkulturflasche (150 cm²) zu 80-90% konfluent gewachsenen Zellen zweimal mit PBS gewaschen, mit 4 ml Trypsin/EDTA vom Boden abgelöst und anschließend in 10 ml frischem Medium aufgenommen. Danach wurden sie 5 min bei 250 g zentrifugiert. Davon abweichend wurden U937 Zellen mit einer maximalen Dichte von 1×10^6 Zellen/ml pelletiert (5 min, 250 x g) mit PBS gewaschen und anschließend wieder pelletiert. Das Zellpellet wurde dann in 4,5 ml Einfriermedium resuspendiert und die Zellsuspension zu je 1,5 ml in Einfrierröhrchen aliquotiert. Die Lagerung erfolgte bei -80 oder -150°C.

3.2.3 Zellzahlbestimmung

Die Anzahl der Zellen in einer Suspension wurde mit Hilfe einer Neubauer-Zählkammer ermittelt. Diese hatte eine Tiefe von 0,1 mm und eine Fläche von 0,002 m². Mit einer Pasteur-Pipette wurde ein Aliquot von der zuvor gut gemischten Suspension in die Neubauer-Zählkammer transferiert. Unter dem Mikroskop wurden anschließend die Zellen in den vier Hauptquadraten gezählt und der Mittelwert gebildet, welcher multipliziert mit 10^4 der Anzahl der Zellen in einem ml der Suspension entsprach.

3.2.4 Transfektion eukaryoter Zellen mit Plasmid-DNA

C33A und RTS3b Zellen wurden für transiente Transfektionsanalysen verwendet. Da die Zellen reine DNA normalerweise nicht aufnehmen, wurden Transfektionsreagenzien eingesetzt, die mit der Plasmid-DNA einen Komplex bilden, welcher anschließend in den Zellen gelangen kann. Die transfizierten Zellen wurden etwa 48 Stunden (h) nach der Transfektion auf die Expression der Plasmide untersucht.

3.2.4.1 Transiente Transfektion mittels Calciumphosphat-Präzipitation

C33A Zellen wurden mittels Calciumphosphat-Präzipitation (nach Ausubel *et al.*, 1992) transfiziert. Die folgenden Angaben beziehen sich auf Transfektionen in Zellkulturschalen mit 10 cm Durchmesser. Dafür wurden $3,16 \times 10^6$ Zellen in Zellkulturschalen ausgesät. Am darauf folgenden Tag wurde unter der Sterilwerkbank die zu transfizierende DNA (bis zu 15 µg) mit H₂O auf ein Volumen von 429 µl aufgefüllt und mit 493 µl 2xHBS vermischt. Nach Zugabe von 63 µl 2M CaCl₂ wurden die Proben sofort 20 sec mit Hilfe eines Vortexers gemixt und 20 min bei Raumtemperatur (RT) inkubiert. Anschließend wurde das Präzipitat vorsichtig auf die Zellen pipettiert, die Schalen geschwenkt und in den Brutschrank gestellt. Nach ca. 24 h wurde ein Mediumwechsel durchgeführt. Die Ernte erfolgte ca. 48 h nach der Transfektion.

3.2.4.2 Transiente Transfektion mittels „FuGENE“

RTS3b Zellen wurden mit „FuGENE“ transfiziert. Die folgenden Angaben beziehen sich auf Transfektionen in 6-Loch-Platten. Bei größeren oder kleineren Gefäßen wurden die Mengen entsprechend angepasst. Für ein 6-Loch wurden 9×10^4 Zellen in zwei ml Medium eingesetzt. Am folgenden Tag wurden pro Ansatz 100 µl serumfreies Medium und bis zu 4 µl „FuGENE“-Transfektionsreagenz (entspricht einem Verhältnis von 1:2 DNA zu „FuGENE“) für 5 min bei RT inkubiert. Anschließend wurden jeweils 100 µl des Gemisches zu der zu transfizierenden DNA (bis zu 2 µg) gegeben und zur Komplexbildung 15 min bei RT inkubiert. Die Transfektionsansätze wurden schließlich vorsichtig auf die Zellen pipettiert, die Platten leicht geschwenkt und bis zur Ernte für ca. 48 h inkubiert.

3.2.5 Generierung einer stabilen Zelllinie

Für die Generierung einer Zelllinie, welche die induzierbare Expression von PBF ermöglicht, wurde ein sogenanntes Tet-on System benutzt. Hierfür wurden in 6-Loch-Platten RTS3b Zellen mit dem Vektor pcDNA6/TR, welcher den Tet-Repressor exprimiert und ein Blastocidin-Resistenzgen trägt, transfiziert. 48 h nach Transfektion wurden die Zellen trypsiniert, und in Blastocidin-haltiges Medium (10 µg/ml) in ein

neues 6-Loch ausgesät. Das Medium wurde alle zwei bis drei Tage durch frisches Blastocidin-haltiges Medium ersetzt. Nachdem die Kontrollzellen, die ohne DNA transfiziert wurden, abgestorben waren, wurde die Antibiotikumkonzentration erniedrigt (2 µg/ml). Die transfizierten Zellen wurden monoklonal expandiert und auf die Expression des Repressors getestet. Die Zelllinie mit der höchsten Menge wurde für eine zweite Transfektion mit 1 µg pcDNA4/TO bzw. pcDNA4/TO-FLAG-PBF in 6-Loch-Platten verwendet. Da der Vektor für ein Zeocin-Resistenzgen kodiert, erfolgte die Selektion der transfizierten Zellen mit Zeocin. Dazu wurden die Zellen 48 h nach Transfektion trypsinisiert, in Zeocin (400 µg/ml)- und Blastocidin (2 µg/ml)-haltiges Medium resuspendiert und in eine neue 6-Loch-Platte überführt. Alle zwei bis drei Tage wurde ein Mediumwechsel mit frischem Zeocin-Blastocidin-haltigem Medium durchgeführt. Nach Abschluss der Selektion wurde die Zeocin-Konzentration halbiert. Transfizierte Zellen waren gegenüber Zeocin und Blastocidin resistent und wurden gepoolt expandiert. Zur Induktion der Expression von FLAG-PBF wurden diese Zellen (RTS3b-TR-FLAG-PBF) in Gegenwart von 1 µg/ml Doxycyclin für 24 h inkubiert.

3.2.6 Ernte der transfizierten Zellen

3.2.6.1 Ernte durch physikalischen Zellaufschluss

Zellen einer 10 cm Zellkulturschale wurden zweimal mit 5 ml PBS gewaschen und in 200 µl 0,1 M LSDB-Puffer (bei größeren oder kleineren Ansätzen wurden die Mengen entsprechend angepasst) mit einem Gummischaber vom Boden abgekratzt. Anschließend wurden die Zellen 5x 30 sec in Eiswasser sonifiziert, um die Zellmembran zu zerstören und die DNA zu fragmentieren. Bei einer 10-minütigen Zentrifugation bei 4 °C und 21000 g wurden die Zelltrümmer pelletiert. Der Überstand wurde in neue vorgekühlte Eppendorfgefäße auf Eis überführt. Dieser Zellextrakt konnte direkt für Protein-Protein-Interaktionsstudien oder Expressionsanalysen eingesetzt werden. Die Lagerung erfolgte bei -80 °C.

3.2.6.2 Ernte durch chemischen Zellaufschluss

RTS3b Zellen haften sehr fest am Boden von Zellkulturgefäßen. Dadurch werden sie beim Abkratzen mit dem Gummischaber beschädigt und verlieren einen Großteil ihrer Luciferase-Aktivität. Dieser Effekt konnte durch einen chemischen Zellaufschluss mit NP40 verhindert werden. Hierfür wurden die Zellen zweimal mit 1 ml PBS gewaschen, mit 300 µl Reportersol überschichtet und 5 min bei RT inkubiert. Der Überstand wurde in vorgekühlte Eppendorfgefäße auf Eis überführt und konnte direkt, oder nach Abzentrifugation von Zellresten für die Luciferaseanalysen eingesetzt werden.

3.2.7 Bestimmung der Luciferase-Aktivität

Die Messung der Expression des Luciferase-Reportergens ist eine schnelle Methode zur Aktivitätsbestimmung von Promotorsequenzen (de Wet *et al.*, 1987), und erfolgte im Wallac Victor² 1420 Multilabel Counter (Perkin Elmer, Waltham, USA). Zunächst wurde eine adäquate Menge Luciferase-Reaktionspuffer hergestellt und mit D-Luciferin 1:100 versetzt. Je nach Aktivität des Reporterkonstruktes wurde ein Aliquot des Zellextraktes in eine 96-Loch Platte (Perkin Elmer, Waltham, USA) pipettiert, welche unmittelbar danach in den Victor² gestellt wurde. Nach Injektion von 150 µl Luciferase-Reaktions-Puffer wurde die Lichtemission über einen Zeitraum von 10 sec gemessen. Der ermittelte Wert (RLU) war proportional zur Aktivität der exprimierten Luciferase, die zur Anzahl der Zellen (Proteinkonzentrationsbestimmung) relativiert wurde (RLU/Proteinkonzentration).

3.2.8 Wachstumsassay

RTS3b Zellen wurden mit 200 ng der FLAG-Expressionsplasmide für PBF, bzw. PBFmtCR3 und dem entsprechenden Leervektor in 6-Loch-Platten mit FuGENE transfiziert. Der hierbei verwendete Grundvektor pcDNA3.1 kodiert für ein G418-Resistenzgen und ermöglicht daher eine Selektion der transfizierten Zellen. Zur Selektionskontrolle wurde ein Loch der Transfektion ohne DNA unterzogen. 48 h nach Transfektion wurden die Zellen trypsinisiert und in G418-haltiges Medium (800

µg/ml) überführt. Nachdem die Kontrollzellen abgestorben waren, wurde die Antibiotikum-Konzentration halbiert. Nach Inkubation in G418-haltigem Medium über einen Gesamtzeitraum von 11 Tagen wurden die Zellen trypsinisiert und anschließend via FACS (FACSCalibur; BD Biosciences, Heidelberg) quantifiziert.

3.3 DNA-Methoden

3.3.1 Kulturen zur Plasmidisolierung

Alle im Rahmen dieser Arbeit verwendeten Plasmide enthielten ein Ampicillin-Resistenzgen, so dass durch Zugabe von 100 µg/ml Ampicillin sowohl in LB-Medium als auch auf Agar-Platten eine Selektion auf plasmidtragende Bakterien durchgeführt werden konnte. Für die Plasmidisolierung wurden Bakterien aus Vorkulturen oder von einer LB-Agar-Platte in Ampicillin-haltigem LB-Medium angeimpft und bei 37°C und 200 rpm über Nacht wachsen gelassen. Für eine analytische Plasmidisolierung wurden 5 ml LB-Medium in einem 13 ml PE-Röhrchen (Sarstedt, Nürnberg) und für eine präparative Plasmidisolierung bis zu 200 ml in einem sterilen Erlenmeyer-Kolben inokuliert.

3.3.2 Plasmidpräparation

Präparative Plasmidisolierungen (Mini-, Midi-, Maxipräparationen) als auch DNA-Fragment-Aufreinigungen (PCR-Produktaufreinigungen, Gel-Extraktionen) wurden mit Reagenzsystemen der Firma Qiagen (QIAprep Spin/QIAprep 8 Miniprep Kit, QIAquick *PCR Purification* Kit, QIAquick *Gel Extraction* Kit) und der Firma Invitrogen (Pure Link™ HiPure Plasmid Filter Midi- und Maxiprep Kit) nach Protokoll des Herstellers durchgeführt. Diese Reagenzsysteme basieren auf der alkalischen Extraktionsmethode nach Birnboim und Doly (1979) und der Bindung der DNA an Anionen-Austauscher-Säulen (Quarzzgel). Der DNA-Gehalt wurde am NanoDrop ND-1000 Spektrophotometer (Peglab, Erlangen) bestimmt.

3.3.3 DNA-Sequenzierung

Für die DNA-Sequenzierung wurden jeweils 3-10 pmol Primer, 200- 500ng DNA-Plasmid und 2 µl T-Mix (BigDye Terminator Cycle Sequencing Kit v1.1) in einem Gesamtvolumen von 5 µl eingesetzt.

1 Temperaturzyklus:	94 °C	10 sec	
30 Temperaturzyklen:	94 °C	10 sec	(Denaturierung)
	variabel °C	10 sec	(Hybridisierung)
	60 °C	3 min	(Polymerisierung)
1 Temperaturzyklus:	4 °C	∞	

Die Analyse erfolgte an einem 16 Kapillar-Sequencer (ABI Prism 3100 Genetic Analyzer, Applied Biosystems Hitachi, Foster City, CA, USA).

3.3.4 Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

Die Methode der Polymerase-Kettenreaktion ermöglicht die selektive Amplifikation einer DNA-Sequenz. Dabei werden zwei Oligonukleotide (Primer) so gewählt, dass sie in 5'- und 3'-Richtung an einem der beiden DNA-Stränge hybridisieren und somit den zu amplifizierenden Bereich auf der DNA-Matrize einrahmen (Mullis und Faloona, 1987).

Amplifikationen für präparative Zwecke wurden in einem Reaktionsvolumen von 50 µl durchgeführt. 5-30 ng Plasmid-DNA wurden als Matrize eingesetzt und jeweils 10 pmol beider Primer sowie je 10 pmol der vier Desoxynukleotide. Unmittelbar nach Zugabe von 1,25 u AccuPol- bzw. 2,5 u Taq-DNA-Polymerase wurden die Ansätze in das auf 94 °C vorgeheizte PCR-Gerät (T3-Thermocycler, Biometra, Göttingen) gestellt und die Reaktion nach folgendem Basisschema gestartet:

1 Temperaturzyklus:	94 °C	2 min	
25 Temperaturzyklen:	94 °C	15 sec	(Denaturierung)
	52 °C	30 sec	(Hybridisierung)
	72 °C	1-3 min	(Polymerisierung)
1 Temperaturzyklus:	72 °C	10 min	

Die PCR-Bedingungen (Temperaturen und Zeiten der Hybridisierung und/oder der Extension) wurden je nach Schmelztemperatur der Oligonukleotide und der Größe des zu amplifizierenden DNA-Bereiches variiert. Die Größe und Menge des erhaltenen PCR-Produktes sind ein Indikator für die Spezifität der Oligonukleotide und der PCR-Bedingungen. Diese wurden mittels Gelelektrophorese überprüft.

3.3.5 Echtzeit-PCR

Das Verfahren der Echtzeit-PCR (quantitative Real-Time PCR; qPCR) basiert auf der herkömmlichen PCR, ermöglicht aber neben der Amplifikation der Zielsequenz, die Quantifizierung der Transkripte noch während der Reaktion. Eine Möglichkeit hierbei stellt der Gebrauch von interkalierenden Fluoreszenzfarbstoffen dar. In dieser Arbeit wurde SYBRGreen I verwendet, dessen emittierte Fluoreszenz nach Einlagerung in doppelsträngiger (ds) DNA ansteigt. Somit korreliert die emittierte Fluoreszenz mit der Menge an dsDNA. Um die Spezifität der Reaktion zu überprüfen, wurde im Anschluss an die qPCR eine Schmelzkurvenanalyse durchgeführt. Hierbei wurde die Temperatur langsam erhöht, wodurch eine Denaturierung der dsDNA und damit eine Freisetzung von SYBRGreen I erfolgt. Anhand der detektierten Fluoreszenzabnahme kann die Schmelztemperatur des Amplifikats bestimmt werden. Diese ist von der Fragmentlänge und von der DNA-Sequenz abhängig und somit spezifisch für das Amplifikat. Dadurch können auch unerwünschte Nebenprodukte detektiert werden.

Standardreihe: Für PBF und HPRT1 wurde je eine Standardreihe zur absoluten Quantifizierung erstellt. Hierzu wurden Plasmide, die das entsprechende Gen kodieren und deren Konzentration bekannt war, entsprechend verdünnt. Für IFIT1/ISG56, IFIT2/ISG54, IFI44, IFI16, MEF2C und PEG10 diente die serielle Verdünnung der Proben als relativer Standard. Die Expressionsrate der zellulären Gene wurde auf die absolute HPRT1 Expression normiert.

2 μ l cDNA
 1,6 μ l 25 mM CaCl₂
 12,4 μ l H₂O
 1 μ l Primer 1 (10 μ M)
 1 μ l Primer 2 (10 μ M)
 2 μ l 10x *LightCycler FastStart DNA Master SYBR Green I*

PCR-Bedingungen:

Vorinkubation:	95°C	10 min
Amplifikation:	95°C	10 sec
(40 Zyklen)	variabel	10 sec
	72°C	15 sec
Schmelzkurve:	95°C	10 sec
	65°C	20 sec
	90°C	1 sec
Kühlung:	40°C	30 sec

3.3.6 *In vitro* Mutagenese

Mit Hilfe des Reagenziensystems „*QuickChangeTM Site-directed Mutagenesis Kit*“ (Stratagene, La Jolla, USA) wurden Punktmutationen in DNA (und dadurch resultierenden Aminosäureaustausche in Proteinen) eingeführt. Hierfür wurde die zu mutierende Plasmid-DNA mit zwei zueinander komplementären Oligonukleotiden, die jeweils die gewünschte Mutation enthielten, in einer PCR-Reaktion nach folgendem Schema eingesetzt:

5 μ l Reaktionspuffer
 1 μ l Plasmid (50 ng/ μ l)
 1 μ l Oligonukleotid A (125 ng/ μ l)
 1 μ l Oligonukleotid B (125 ng/ μ l)
 1 μ l dNTP-Mix
 1 μ l *Pfu Turbo* DNA-Polymerase
 ad 50 μ l H₂O

PCR-Bedingungen:

1 Temperaturzyklus:	95 °C	30 sec
18 Temperaturzyklen:	95 °C	30 sec
	55 °C	1 min
	68 °C	12 min
1 Temperaturzyklus:	68 °C	10 min

Die PCR-Bedingungen wurden je nach Größe der Plasmid-DNA und Sequenz der Oligonukleotide angepasst. Nach Beendigung der PCR und Abkühlung des Mutagenese-Ansatzes wurde 1 µl des Restriktionsenzym DpnI hinzugegeben und eine Stunde bei 37 °C inkubiert. Dieses Enzym schneidet nicht die neu synthetisierte sondern nur die parentale methylierte Plasmid-DNA, welche nicht die gewünschte Mutation trägt. Für die Transformation in *E.coli* wurden jeweils 1 und 5 µl des Ansatzes und 100 µl XL1-Blue-Bakterien verwendet. Aus den gewachsenen Bakterienklonen wurde die Plasmid-DNA präpariert und durch Sequenzierung auf die Anwesenheit der Mutation überprüft.

3.3.7 DNA-Standardmethoden

Die hier aufgeführten Methoden wurden nach Protokollen von Maniatis *et al.*, (1989), Ausubel *et al.*, (1994) oder nach Protokoll des Herstellers durchgeführt.

- Ethanolfällung von DNA
- DNA-Konzentrationsbestimmung
- Spaltung von DNA durch Restriktionsendonukleasen
- Dephosphorylierung der 5'-Enden von DNA-Fragmenten mit alkalischer Phosphatase
- Ligation von DNA-Fragmenten mit T4-Ligase
- Gelelektrophoretische Auftrennung von Nukleinsäuren in Agarosegelen
- Reinigung von PCR-Produkten und DNA-Gelextraktion

3.4 RNA-Methoden

3.4.1 RNA-Isolierung aus eukaryoten Zellen

Die Isolierung von RNA aus eukaryoten Zellen wurde mit Hilfe von Reagenziensystemen (*RNeasy Mini Kit* und *QIAshredder*) der Firma Qiagen (Hilden) durchgeführt. Die RNA wurde säulenchromatographisch durch Adsorption an eine Silica-Gel-basierte Membran isoliert. Hierzu wurden in 6 cm Zellkulturschalen ausgesäte Zellen in Gegenwart eines Guanidin-Isothiocyanat-haltigem Puffers lysiert und mittels *QIAshredder* homogenisiert. Die Isolierung und Aufreinigung wurden nach Angaben des Herstellers durchgeführt. Der RNA-Gehalt wurde am NanoDrop ND-1000 Spektrophotometer (Peqlab, Erlangen) bestimmt.

3.4.2 RT-PCR

Für die RT-PCR (Reverse-Transcriptase PCR) wurde ein Reagenziensystem (*SuperScript VILO cDNA Synthesis Kit*) der Firma Invitrogen (Karlsruhe) nach Angaben des Herstellers verwendet. 1 µg RNA wurden in die RT-PCR-Reaktion eingesetzt.

3.4.3 Microarray Analysen

Acht unabhängige Kulturen der RTS3b-TR-FLAG-PBF Zelllinie (unter 3.5.2 beschrieben) wurden für 24 h in Ab- bzw. Anwesenheit von Dox inkubiert. Aus den daraus resultierenden vier Probensets wurde gesamtzelluläre RNA isoliert (unter 3.5.1 beschrieben) und deren Konzentration gemessen. cDNA Synthese, Hybridisierung auf eine Oligonukleotid Plattform (U133 Plus 2.0, Affymetrix) und Auswertung wurden im *Cologne Center for Genomics* (AG Prof. Dr. Nürnberg, Universität zu Köln) durchgeführt.

3.5 Proteinmethoden

3.5.1 Herstellung von Ganzellextrakten

Ganzzellextrakte wurden durch physikalischen Zellaufschluss (wie unter 3.2.5.1 beschrieben) hergestellt.

3.5.2 Quantitative Proteinbestimmung

Die Proteinkonzentration wurde nach Bradford (1976) bestimmt. 1 µl Ganzzellextrakt oder 2 µl Luciferaseprobe wurden als Doppelansatz in eine 96-Loch-Platte pipettiert. Als Eichkurve diente eine BSA-Verdünnungsreihe (0-10 µg). Die Proben wurden mit 150 µl einer 1:5 Verdünnung des BioRad Protein Assay Reagens (BioRad, München) versetzt. Anschließend wurde die OD₆₂₀ in einem Spektralphotometer (Spectra, Tecan, Crailsheim) gemessen und die Proteinkonzentration anhand der Eichkurve ermittelt.

3.5.3 Behandlung von Ganzzellextrakt mit λ-Phosphatase

20 bis 50 µg Ganzzellextrakt (siehe 3.2.5.1) wurden 30 min bei 30°C mit 600 Units λ-Phosphatase (Santa Cruz, Heidelberg) und entsprechendem Reaktionspuffer inkubiert. Nach Zugabe von 2x SDS-Probenpuffer wurden die Proben 5 min bei 95 °C inkubiert. Über ein SDS-PAG wurden die denaturierten Proteine aufgetrennt und anschließend in Western Blot Analysen mit dem entsprechenden Antikörper nachgewiesen.

3.5.4 Aufreinigung von GST-Fusionsproteinen

Für die Isolierung der GST-Fusionsproteine wurden 200 ml Ampicillin-haltiges LB-Medium 1:40 mit einer Vorkultur der Bakterien angeimpft und bei 37 °C und 200 rpm bis zu einer OD₆₀₀ von 0,6-0,9 inkubiert. Die Induktion der Proteinexpression erfolgte durch Zugabe von 0,5 mM IPTG. Anschließend wurden die Erlenmeyerkolben mit den Bakterienkulturen bei 37 °C und 200 rpm für 2 h ins Wasserbad gestellt. Durch 10-minütige Zentrifugation bei 4 °C und 4000 rpm wurden die Bakterien pelletiert und in 5 ml 0,5 M LSDB resuspendiert. Nach der Lyse der Bakterien durch viermaliges

Sonifizieren der Suspension für je 30 sec bei 100 Watt auf Eis wurden die unlöslichen Zelltrümmer 10 min bei 4 °C und 21000 g abzentrifugiert. Der im Überstand vorhandene Extrakt wurde in 2 ml Eppendorfgefäße aliquotiert und bei -80 °C gelagert.

Die Aufreinigung der im Zellextrakt enthaltenen GST-Fusionsproteine wurde mit Hilfe von Glutathion-Sepharose (Amersham Biosciences, Freiburg) durchgeführt. Der Vorteil hierbei ist, dass der GST-Fusionsanteil sehr effizient und spezifisch das an der Oberfläche der Sepharose exponierte Glutathion bindet. Pro Ansatz wurden 15 µl der Sepharose mit 1 ml H₂O gewaschen und anschließend mit 1 ml 0,5 M LSDB equilibriert. Bei jedem Schritt wurden die Sepharosekügelchen in den Eppendorfgefäßen 8- bis 10-mal invertiert und für 1 min bei 1000 x g pelletiert.

Auf die equilibrierte Sepharose-Matrix wurden für eine Testaufreinigung zwischen 150 und 200 µl Zellextrakt gegeben und 1 h bei 4 °C inkubiert. Um unspezifisch gebundene Proteine zu entfernen, wurde anschließend insgesamt viermal mit 1 M LSDB und zweimal mit 0,1 M LSDB gewaschen. Durch die Zugabe von 20 µl 2x SDS-Probenpuffer und 5-minütige Inkubation bei 95 °C wurden die aufgereinigten GST-Fusionsproteine von den Sepharosekügelchen gelöst und über ein SDS-PAG aufgetrennt. Zur Visualisierung erfolgte nach der Auftrennung der Proteine eine 20-minütige Inkubation des Gels in *Coomassie brilliant blue*. Der Hintergrund wurde in H₂O über Nacht entfärbt.

3.5.5 *In vitro* Translation

Für die *in vitro* Translation von Proteinen wurde das „TNT *Coupled Reticulocyte Lysate System*“ (Promega, Madison, USA) nach Angaben des Herstellers verwendet. Die Proteine wurden hierbei mit ³⁵S-Cystein radioaktiv markiert.

3.5.6 Protein-Protein Interaktionsanalysen

3.5.6.1 Interaktionen von GST-Fusionsproteinen mit *in vitro* translatierten Proteinen

Die für die Interaktionsanalysen benötigten GST-Fusionsproteine wurden (wie unter 3.6.4 beschrieben) aufgereinigt und in 100 µl 0,1 M LSDB vorgelegt. Der Zugabe von 10 µl des *in vitro* Translationsansatzes des jeweiligen ³⁵S-markierten Proteins folgte eine zweistündige Inkubation des Gemisches unter leichtem Schütteln auf Eis. Vier Waschschrte mit 0,1 M LSDB wurden durchgeführt, um unspezifische Interaktionen zu minimieren. Anschließend wurden die Sepharosekügelchen mit den gebundenen Proteinen in 20 µl 2x SDS-Probenpuffer aufgenommen und 5 min bei 95 °C inkubiert. Über ein SDS-PAG wurden die im Probenpuffer denaturierten Proteine aufgetrennt. Das Gel wurde 20 min in *Coomassie brilliant blue* gefärbt und 1 bis 2 h im Entfärberbad geschwenkt.

Für den Nachweis gebundener *in vitro* translatierter Proteine wurde das Gel zur Verstärkung des Signals 20 bis 30 min in Amplifizierer inkubiert und eine Stunde im Geltrockner (Gel Dryer Model 583, BioRad, München) getrocknet.

Ein bei -80 °C exponierter, radiosensitiver Film lieferte den Nachweis der radioaktiv markierten, gebundenen Proteine.

3.5.6.2 Ko- bzw. Immunpräzipitation

0,2 bis 1 mg der Ganzzellextrakten aus transient transfizierten C33A Zellen (beschrieben unter 3.2.4.1 und 3.2.5.1) wurden für 2 bis 4 Stunden mit 15 µl FLAG-Antikörper-gekoppelten Agarose-Kügelchen (ANTI-FLAG[®] M2 Agarose, Sigma-Aldrich, Steinheim) bei 4 °C im Rollinkubator inkubiert. Anschließend wurden die Ansätze 4- bis 5-mal mit 0,1 bis 0,3 M LSDB gewaschen, wobei der letzte Waschschrte immer mit 0,1 M LSDB durchgeführt wurde. Durch Zugabe von 20 µl 2x SDS-Probenpuffer und 5-minütige Inkubation bei 95 °C wurden die Proteine denaturiert. Der Auftrennung der Proteine im SDS-PAG folgte die Visualisierung im Western Blot mit Hilfe entsprechender Antikörper.

3.5.7 Western Blot

Für Western Blot Analysen wurden die über ein SDS-PAG aufgetrennten Proteine auf eine Nitrocellulose-Membran (Schleicher&Schuell, Dassel) mit Hilfe des Mini Trans-Blot Cell- Systems (BioRad, München) übertragen. Ein in Transfer-Puffer getränkter Schwamm, zwei Whatman-Papiere, das PAG, die Membran, zwei weitere

Whatman-Papiere und ein zweiter in Transfer-Puffer getränkter Schwamm wurden zwischen zwei Plastikplatten fixiert und in die Blot-Kammer eingesetzt. Dabei wurde besonders darauf geachtet, dass die Schichtung der einzelnen Lagen luftblasenfrei bleibt. Der Transfer der Proteine erfolgte über Nacht bei einer Spannung von 35 Volt. Am darauf folgenden Tag wurde die Membran wieder freigelegt und die auf der Membran transferierten Proteine mit Ponceau-S-Rot-Lösung angefärbt. Nach dem Entfernen der Hintergrundfärbung durch Waschen mit TBST wurden die Markerbanden mit einem Stift nachgezeichnet und die Membran mit einem Skalpell zurechtgeschnitten. Anschließend wurde die Membran in TBST wieder vollständig entfärbt. Die folgenden Angaben beziehen sich auf ein Standardprotokoll. Die Inkubationszeiten wurden abhängig vom verwendeten Antikörper variiert. Um eine unspezifische Bindung der Antikörper an die proteinfreien Stellen der Membran zu verhindern, wurde sie 1 h in 25 ml Abblocklösung auf dem Taumler inkubiert. Im Anschluss darauf wurde die Membran auf Parafilm gelegt und mit ein bis zwei ml in Antikörperverdünnungslösung verdünnten ersten Antikörper überschichtet. Den zwei Stunden Inkubation, wobei darauf zu achten war, dass die Membran nicht trocknete, folgten drei 10-minütige Waschschriffe mit TBST, um nicht gebundene Antikörper zu entfernen. Danach wurde die Membran wieder auf Parafilm mit ein bis zwei ml des zweiten verdünnten Peroxidase-gekoppelten Antikörpers überschichtet und für 1 h bei RT, ohne auszutrocknen, inkubiert. Nach weiteren vier 10-minütigen Waschschriffen mit TBST wurde die Membran erneut auf Parafilm gelegt und mit 1 bis 2 ml „*BM Chemiluminescent Blotting Substrate*“ (Roche, Mannheim), welches 20 min zuvor angesetzt wurde, für 1 min überschichtet. Das in der Lösung enthaltene Luminol wurde nun von der an dem zweiten Antikörper gekoppelten Peroxidase in einer Oxidationsreaktion unter Lichtemission umgesetzt. Die Substratlösung wurde vorsichtig abgetropft und die Membran zwischen zwei Klarsichtfolien gelegt. Danach konnten die Protein-Antikörper-Komplexe aufgrund von Chemilumineszenz als Banden detektiert werden. Dieses erfolgte bei einem starken Signal in einer Geldokumentationsanlage (BioRad, München). War das Signal schwach, wurde die Membran in einer Expositionskassette fixiert und ein ECL-Film aufgelegt. Der belichtete ECL-Film wurde nach verschiedenen langen Expositionszeiten entwickelt. Eine Quantifizierung der Proteinbanden erfolgte mit dem Programm Quantity One (BioRad, München).

3.5.8 Proteinstandardmethoden

Folgende Standardmethoden wurden wie in den Quellen angegeben, durchgeführt.

- Elektrophorese von Proteinen in SDS-Polyacrylamidgelen (Laemmli, 1970)
- Coomassie-Färbung von Polyacrylamidgelen (Bramhall *et al.*, 1969)

4 Ergebnisse

4.1 DNA-Bindung ist notwendig für die PBF-vermittelte Wachstumsinhibition

Da der zelluläre Transkriptionsfaktor PBF eine funktionelle Rolle bei Signaltransduktionswegen spielen könnte, die unter Hypoxie und in Karzinomen aktiviert sind, ist es wichtig die molekular-biologische Aktivität von PBF zu charakterisieren. Es liegt nahe, dass PBF über die Regulation seiner Zielgene agiert, die allerdings nicht bekannt sind (s. Einleitung). Vorarbeiten aus unserer Gruppe indizieren, dass die PBF-vermittelte Wachstumsinhibition von der nukleären Lokalisation abhängig ist (Sichtig et al, 2007a). Um die Bedeutung der Funktion von PBF als Transkriptionsfaktor für diese Inhibition näher zu bestimmen, sollte zunächst das inhibitorische Potential einer DNA-bindungsdefekten Mutante ermittelt werden. Dazu wurden RTS3b Zellen - humane Keratinozyten isoliert aus einem Plattenepithelkarzinom - mit den Expressionsplasmiden für PBF und PBFmtCR3 transfiziert. In PBFmtCR3 sind die beiden sogenannten CRARF-Domänen mutiert, was den Verlust der DNA-Bindung zur Folge hatte. Der entsprechende Leervektor diente als Negativkontrolle. Nach 48 h wurden die transfizierten Zellen mit G418-haltigem Medium für 11 Tage selektioniert, anschließend trypsiniert und via FACS gezählt. Wie in Abbildung 6 zu erkennen ist, führte die Überexpression von PBF zu einer fast 60prozentigen Reduktion der Anzahl resistenter Zellen. Die Transfektion mit dem Expressionsvektor für PBFmtCR3 hatte dagegen keinen Effekt und war mit dem Leervektor vergleichbar. Daraus resultiert, dass die DNA-Bindung für die wachstumsinhibierende Aktivität von PBF notwendig ist.

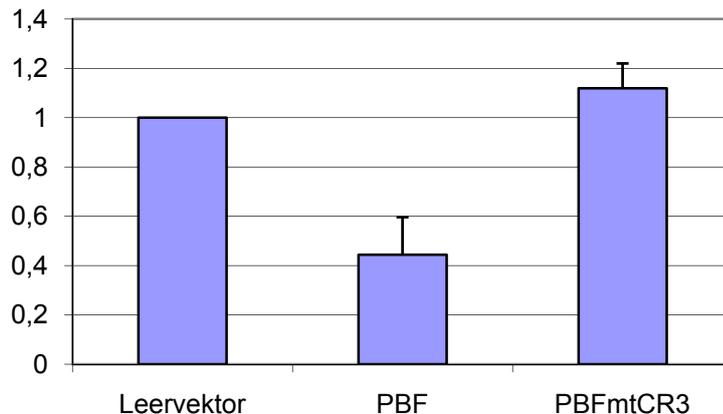


Abbildung 6: PBF-erzeugte Wachstumsinhibition ist abhängig von der DNA-Bindung

Wachstumsassay. RTS3b Zellen wurden mit 200 ng der FLAG-Expressionsplasmide für PBF, bzw. PBFmtCR3 und dem entsprechenden Leervektor transfiziert. 48 h nach Transfektion wurden die Zellen über einen Zeitraum von 11 Tagen in G418-haltigem Medium inkubiert und anschließend via FACS quantifiziert. Die Anzahl der mit dem Leervektor transfizierten Zellen wurden als eins definiert und die anderen dazu in Relation gesetzt. Die Balken repräsentieren die Mittelwerte aus zwei unabhängigen Experimenten. Die Standardabweichungen sind angegeben.

4.2 Generierung einer PBF-induzierbaren Zelllinie

Das beschriebene Experiment belegt, dass PBF bei der Kontrolle des Zellwachstums als Transkriptionsfaktor agiert. Um die Funktion diesbezüglich zu untersuchen, sollten die Zielgene von PBF durch Analyse der transkriptionellen Veränderungen nach Überexpression von PBF mit Hilfe eines Microarrays identifiziert werden. Frühere Versuche eine stabile Zelllinie zu etablieren, welche PBF überexprimiert, haben sich allerdings wegen der antiproliferativen Aktivität von PBF als äußerst schwierig erwiesen (Sichtig, 2006). Um diese Probleme zu umgehen, sollte eine Zelllinie generiert werden, die eine induzierbare Expression von PBF ermöglicht. Dabei wurde ein sogenanntes Tet-on System benutzt. Dieses erlaubt die Expression des gewünschten Gens nur in Anwesenheit von Tetracyclin/Doxycyclin (Tet/Dox) (siehe Abbildung 7A). Da eukaryote Zellen den Tetracyclin-Repressor (Tet-Repressor) nicht exprimieren, wurden im ersten Schritt RTS3b Zellen mit dem Vektor pcDNA6/TR transfiziert. Dieser Vektor exprimiert den Tet-Repressor und kodiert für ein Blastocidin-Resistenzgen. Nach Selektion mit Blastocidin wurden mehrere monoklonale Zelllinien isoliert und auf die Expression des Repressors getestet. Dazu wurden die Zellen mit einem Luciferase-Reporterkonstrukt, welches 7 Tetoperator 2

(TetO₂) Sequenzen vor dem Promotor beinhaltet, transfiziert. In Abwesenheit von Dox bindet der Tet-Repressor an die Operator-Sequenzen und verhindert die Transkription des Luciferase Gens. Die Zugabe von Dox hebt die Repression auf und ermöglicht die Expression der Luciferase. Der Vergleich der Luciferase Aktivität in An- bzw. Abwesenheit von Dox ist ein Maß für den Grad an Repression und korreliert mit der Menge an Tet-Repressor. Die Zelllinie mit der höchsten Menge wurde für eine zweite Transfektion mit einem Vektor, welcher die Expression von FLAG-PBF unter der Kontrolle eines Tet/Dox responsiven Promotors ermöglicht, bzw. dem dazugehörigen Leervektor, verwendet. Der Vektor pcDNA4/TO beinhaltet 2 TetO₂-Sequenzen platziert stromaufwärts des humanen Cytomegalovirus *immediate-early* Promotors und wurde hierfür benutzt. Der ORF, welcher für PBF fusioniert mit einem N-terminalen FLAG-Epitop kodiert, wurde aus pcDNA3.1-FLAG-PBF isoliert und in pcDNA4/TO ligiert. Da der Vektor für ein Zeocin-Resistenzgen kodiert, erfolgte die Selektion der transfizierten Zellen mit Zeocin. Zur Induktion der Expression von FLAG-PBF wurden diese Zellen (RTS3b-TR-FLAG-PBF) in Gegenwart von Dox für 24 h inkubiert. Die erfolgreiche Expression von FLAG-PBF wurde im Western Blot mit einem gegen das FLAG-Epitop gerichteten Antikörper überprüft. Wie in Abbildung 7B erkennbar, ist FLAG-PBF nur nach Inkubation der Zellen mit Dox (Spur 4) zu sehen. Die Spuren 1 und 2 dienten als Negativkontrolle.

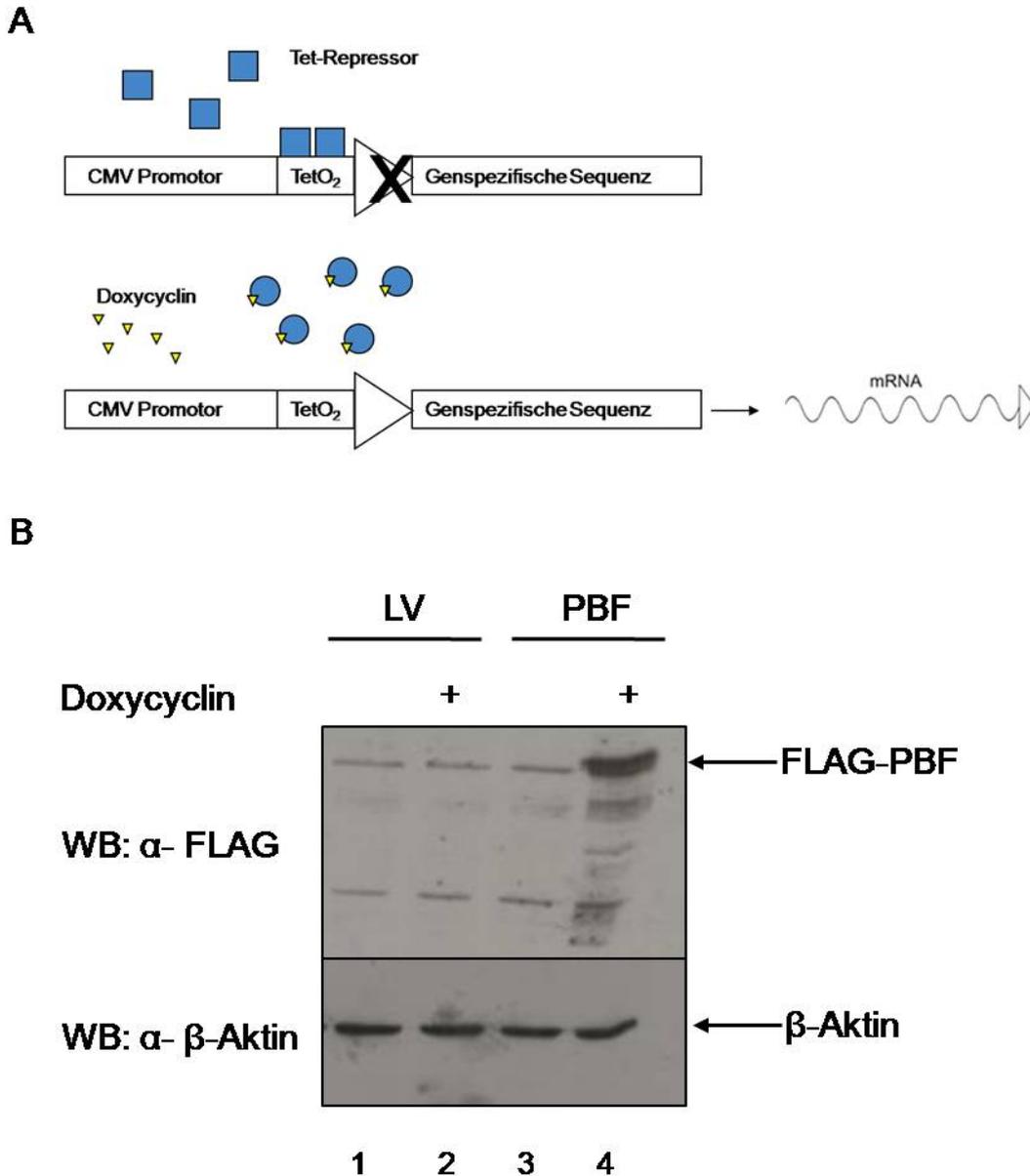


Abbildung 7: Generierung einer PBF-induzierbaren Zelllinie

(A) Schematische Darstellung der Regulation der Transkription von Genen durch den Tetracyclin-Repressor (Tet-Repressor) und Doxycyclin. In Zellen, die den Tet-Repressor exprimieren, wird die Transkription durch die Bindung eines Homodimers an der Tet Operator 2 (TetO₂)-Sequenz verhindert. Nach Zugabe von Doxycyclin diffundiert der Tet-Repressor von dem Promotor ab und macht den Weg für die Polymerase II frei. Damit wird die Produktion der mRNA induziert. (B) Stabil transfizierte RTS3b Zellen, die FLAG-PBF unter der Kontrolle des TET responsiven Promotors exprimieren (Spur 3 und 4) oder den Leervektor (Spur 1 und 2) enthalten, wurden für 24 h in Doxycyclin-haltigem (1 μ g/ml; Spur 2 und 4) oder Doxycyclin-freiem Medium (Spur 1 und 3) kultiviert. Jeweils 35 μ g Gesamtzelleextrakt wurde in einem 10%igen SDS-PAGE aufgetrennt. Die erfolgreiche Expression von FLAG-PBF wurde im Western Blot mit dem FLAG-Antikörper nachgewiesen. β -Aktin diente als Beladungskontrolle.

4.3 Identifizierung der zellulären Zielgene von PBF

Acht unabhängige Kulturen der oben beschriebenen Zelllinie wurden für 24 h in Ab- bzw. Anwesenheit von Dox inkubiert. Aus den daraus resultierenden vier Probensets wurde gesamtzelluläre RNA isoliert und cDNA synthetisiert, die dann jeweils auf eine Oligonukleotid Plattform (U133 Plus 2.0, Affymetrix) hybridisiert wurde, gefolgt von einer Auswertung. Die Unterschiede in der Genexpression wurden mittels t-Test bestimmt. Gene mit einem q-Wert der False Discovery Rate (Storey et al, 2003) unter 0,05 und einer mindestens 1,5 fachen Induktion oder Repression wurden berücksichtigt. Während kein Gen als signifikant reprimiert gefunden wurde, erfüllten lediglich 11 Gene diese Kriterien und wurden als aktiviert angesehen (Tabelle 1). Sechs der PBF-induzierten Gene, nämlich IFIT1 (ISG56), IFIT2 (ISG54), IFI16, IFI44, CARD6 und SAMD9, werden durch Interferon reguliert (Tabelle 1). Vier weitere (MACC1, PEG10, CALCOCO1 und MEF2C) wurden als Krebs assoziiert beschrieben. Die Funktion von ARMCX6 dagegen ist bisher unbekannt.

Genname; Zugangsnummer	Fache ind.	Vollständiger Name; Funktion
-Interferon-reguliert:		
IFIT1/ISG56; NM_018660	2,94	Interferon-induced protein with tetratricopeptide repeats 1, antivirale Aktivität (Fensterl und Sen, 2011)
IFI16; NM_005531	1,51	Interferon-induced protein 16, (Hin200), angeborener Sensor für DNA, induziert Seneszenz (Unterholzner et al, 2010)
IFI44; NM_006417	2,89	Interferon-induced protein 44, antiproliferative Aktivität (Hallen et al, 2007)
IFIT2/ISG54; NM_001547	1,6	Interferon-induced protein with tetratricopeptide repeats 2, induziert Apoptose, antivirale Aktivität (Stawowczyk et al, 2011)
CARD6; NM_032587	1,58	Caspase recruitment domain family, member 6, NF-κB Aktivator, assoziiert mit Karzinomen (Kim et al, 2010)
SAMD9; NM_017654	1,6	Sterile alpha motif domain containing 9; angeborener antiviraler Faktor, TNF- α responsiv (Chefetz et al, 2008)
-Krebsassoziiert:		
CALCOCO1; NM_020898	1,67	Calcium binding and coiled-coil domain 1, transkriptioneller Koaktivator für β-Catenin (Yang et al, 2006)
MEF2C; NM_002397	1,64	Myocyte enhancer factor 2C, Transkriptionsfaktor, potentielles Onkogen in T-akute lymphoblastische Leukämie (Homminga et al, 2011)
PEG10; NM_015068	1,57	Paternally expressed 10, mögliche Beteiligung in hepatozelluläres Karzinom (Tsuji et al, 2010)
MACC1; NM_182762	1,59	Metastasis associated in colon cancer 1, assoziiert mit Karzinomen (Stein et al, 2009)
-unbekannt		
ARMCX6; NM_019007	1,66	Armadillo repeat containing, X-linked 6; unbekannt

Tabelle1: Ergebnisse der Microarray Analyse. Identifizierung von 11 differenziell regulierten Genen nach Überexpression von PBF.

Die PBF-vermittelte Aktivierung ausgewählter Gene wurde durch eine qPCR verifiziert. Gesamtzelluläre RNA aus Doxycyclin-behandelten und unbehandelten RTS3b-TR-FLAG-PBF-Zellen wurde revers transkribiert und die Menge der

jeweiligen RNAs durch qPCR im Light Cycler gemessen. Als relativer Standard diente eine serielle Verdünnung der Proben. Die Ergebnisse der qPCR Analyse bestätigten im Wesentlichen die im Microarray detektierte Hochregulation der mRNA Expression für IFIT1, IFI44, IFIT2, IFI16, MEF2C und PEG10 nach Induktion von PBF (Abbildung 8). Die Induktion der Expression der übrigen Zielgene wurde nicht getestet. Auffällig ist, dass die Aktivierung der mRNA Mengen der Faktoren in Folge der PBF Expression nur relativ gering war. Die Zugabe von Dox bewirkte auch nur eine rund 5 fache Induktion der mRNA von PBF, obwohl die Zunahme der Proteinmenge unter identischen Bedingungen deutlich gesteigert war, wie der Western Blot in Abbildung 7B zeigt.

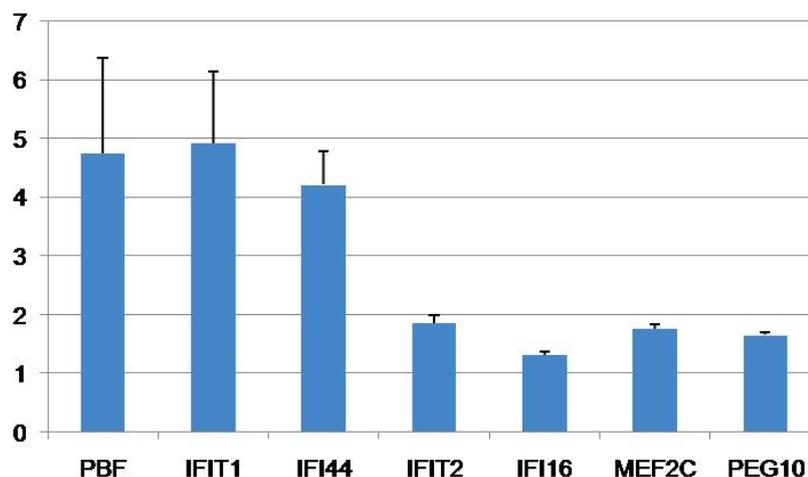


Abbildung 8: Verifizierung der Ergebnisse des Microarrays mittels qPCR

Gesamtzelluläre RNA aus Doxycyclin-behandelten und unbehandelten RTS3b-TR-FLAG-PBF-Zellen wurde revers transkribiert und die Expression der Gene mittels qPCR gemessen. Der Wert erhalten aus unbehandelten Zellen wurde jeweils als eins definiert. Als relativer Standard diente eine serielle Verdünnung der Proben. Die Quantifizierung der cDNA erfolgte im Doppellansatz. Die Expressionsrate der zellulären Gene wurde auf die absolute HPRT1 Expression normiert. Die Balken repräsentieren die Mittelwerte aus zwei unabhängigen Experimenten. Die Standardabweichungen sind angegeben.

4.4 PBF aktiviert den ISG56 Promotor über beide ISREs

Bisherige Überexpressionsstudien charakterisierten PBF als einen transkriptionellen Repressor (Sichtig et al, 2007a). Die Ergebnisse des Microarrays belegten dagegen eine Aktivierung der Zielgene und keine Repression. Unter den Zielgenen von PBF waren mehrere Interferon-regulierte Gene. Um mehr über die Rolle der ISREs bei der PBF-vermittelten Aktivierung zu erfahren, wurden transiente Transfektionsanalysen von RTS3b Zellen mit einem Reporterkonstrukt, welches die Nukleotide -3 bis -654

des ISG56 Promotors vor dem Luciferase Gen beinhaltet, durchgeführt. Der Promotor enthält zwischen den Nukleotiden -93 und -117 zwei ISRE-Sequenzen (ISREI und II) (Abbildung 9A), die die Aktivierung durch IRF3 und ISGF3 vermitteln. Um stets die gleiche Menge an Gesamt-DNA zu transfizieren, wurden die einzelnen Ansätze in allen transienten Transfektionen mit den entsprechenden Mengen an Leervektoren ausgeglichen. Als Positivkontrolle diente ein Expressionsvektor für IRF3-5D, eine konstitutiv-aktive Form des IRF3-Transkriptionsfaktors, die den Promotor ca. 8-fach stimulierte. Wie in Abbildung 9 dargestellt, aktivierte PBF den Promotor maximal ca. 4-fach, was mit den Ergebnissen des Microarrays übereinstimmt. Die Überexpression der DNA-bindungsdefekten Mutante PBFmtCR3 hatte dagegen keine Aktivierung zur Folge. Demnach erzielt PBF die Aktivierung abhängig von der DNA-Bindung.

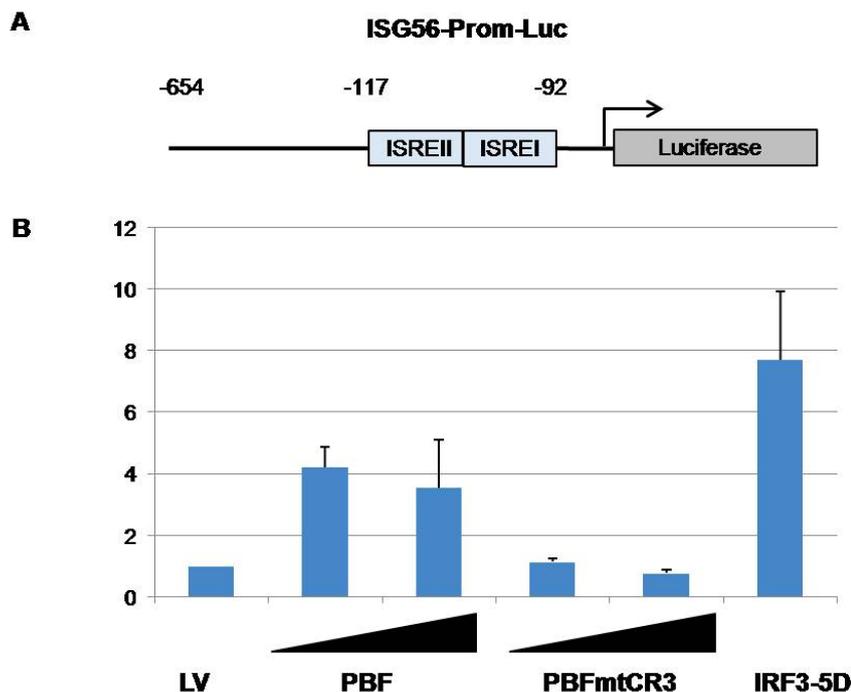


Abbildung 9: PBF aktiviert den ISG56 Promotor

(A) Schematische Darstellung des Reporterkonstrukts ISG56-Prom-Luc. Angegeben ist die Position der ISREI und II. (B) Transiente Transfektionsstudie. RTS3b Zellen wurden mit 500 ng des Reporterkonstrukts ISG56-Prom-Luc, 5 bzw. 10 ng pcDNA-FLAG-PBF oder 5 bzw. 10 ng pcDNA-FLAG-PBFmtCR3 oder 5 ng des Expressionsvektors für IRF3-5D kotransfiziert. Die verschiedenen DNA-Mengen wurden mit entsprechendem Leervektor ausgeglichen. Die basale Luciferase-Aktivität wurde als 1 definiert. Die Balken repräsentieren die Mittelwerte aus zwei unabhängigen Experimenten. Die Standardabweichungen sind angegeben.

Mutagenesestudien im Rahmen einer in der Arbeitsgruppe angefertigten Diplomarbeit zeigten, dass PBF über eines oder beide ISREs den ISG56 Promotor

stimuliert (Pawlowski 2011). Um zu bestimmen, welches ISRE dafür ausschlaggebend ist, wurden hier über *in vitro* Mutagenese Konstrukte hergestellt, die entweder zwei Kopien des ISREI (ISG56-Prom-2x ISREI) oder zwei Kopien des ISREII (ISG56-Prom-2x ISREII) enthalten (Abbildung 10A). Transiente Transfektionen belegten, dass PBF zwar in der Lage war, mit beiden Konstrukten zu aktivieren, die Höhe der Aktivierung war allerdings im Vergleich zum Wildtypkonstrukt um die Hälfte reduziert (Abbildung 10B). Im Gegensatz dazu, war die Aktivierung durch Überexpression von IRF3-5D kaum vermindert. Dies zeigt, dass es sich hierbei um einen PBF-spezifischen Effekt handelt. Die Sequenz-Zusammensetzung der beiden ISREs im wt-ISG56 Promotor ist also optimal für die Aktivierung durch PBF.

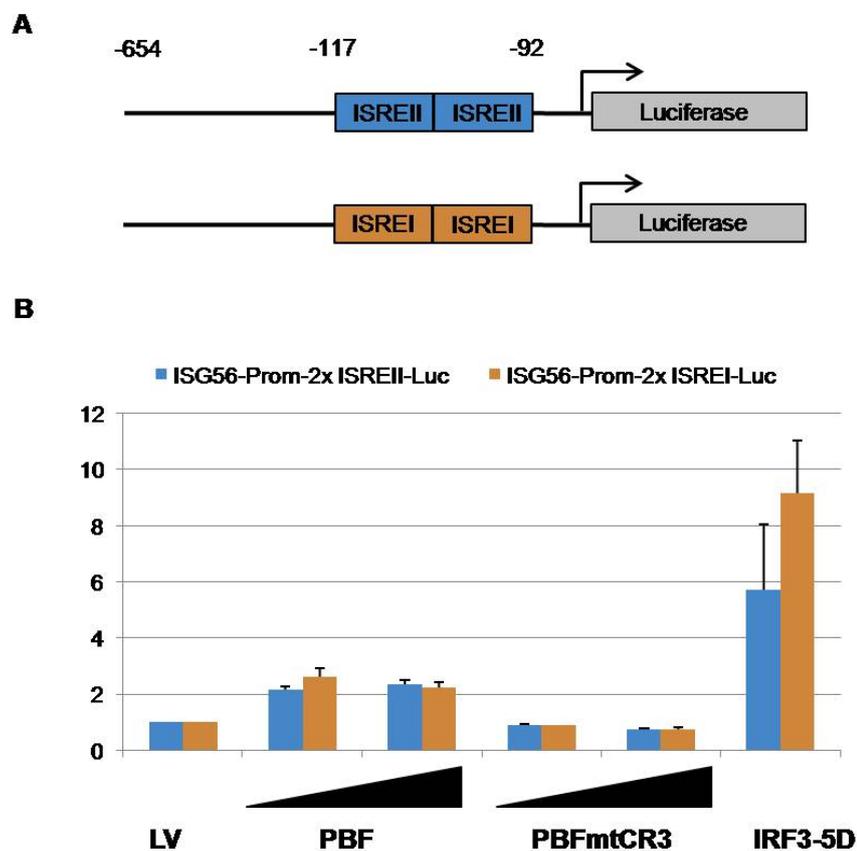


Abbildung 10: PBF aktiviert den ISG56 Promotor über beide ISREs

(A) Schematische Darstellung der Reporterkonstrukte ISG56-Prom-2x ISREII-Luc (enthält zwei Kopien der ISREII) und ISG56-Prom-2x ISREI-Luc (enthält zwei Kopien der ISREI). Angegeben ist die Position der ISREI bzw. II. (B) Transiente Transfektionsanalyse. RTS3b Zellen wurden mit 500 ng des Reporterkonstrukts ISG56-Prom-2x ISREII-Luc oder ISG56-Prom-2x ISREI-Luc, 5 bzw. 10 ng pcDNA-FLAG-PBF oder 5 bzw. 10 ng pcDNA-FLAG-PBFmtCR3 oder 5 ng des Expressionsvektors für IRF3-5D kotransfiziert. Die verschiedenen DNA-Mengen wurden mit entsprechendem Leervektor ausgeglichen. Die basale Luciferase-Aktivität wurde als 1 definiert. Die Balken repräsentieren die Mittelwerte aus zwei unabhängigen Experimenten. Die Standardabweichungen sind angegeben.

Um zu bestätigen, dass eine effiziente Aktivierung durch PBF auf die spezifische Sequenz der ISREs und ihrer Umgebung angewiesen ist, wurde ein synthetisches Reporterkonstrukt pISRE (Panomics, ISRE Luciferase Vector), das allgemein zur Untersuchung des Interferon-Signaling eingesetzt wird, verwendet. Dieses beinhaltet vier direkt aufeinander folgende Kopien des ISREII aus dem ISG56 Promotor, platziert stromaufwärts eines synthetischen Promotors und des Luciferase Gens. Während IRF3-5D, das als positive Kontrolle verwendet wurde, die Luciferase Aktivität um das 5 fache erhöhte, hatte die Überexpression von PBF keinen Effekt (Abbildung 11). Das heißt, dass selbst die 4-fache Kopie des ISREII nicht für eine Aktivierung ausreicht. Daraus folgt, dass die PBF-vermittelte Aktivierung des ISG56 Promotors nicht nur von der spezifischen Sequenz der ISREs abhängig ist, sondern auch von die ISREs flankierenden Sequenzen.

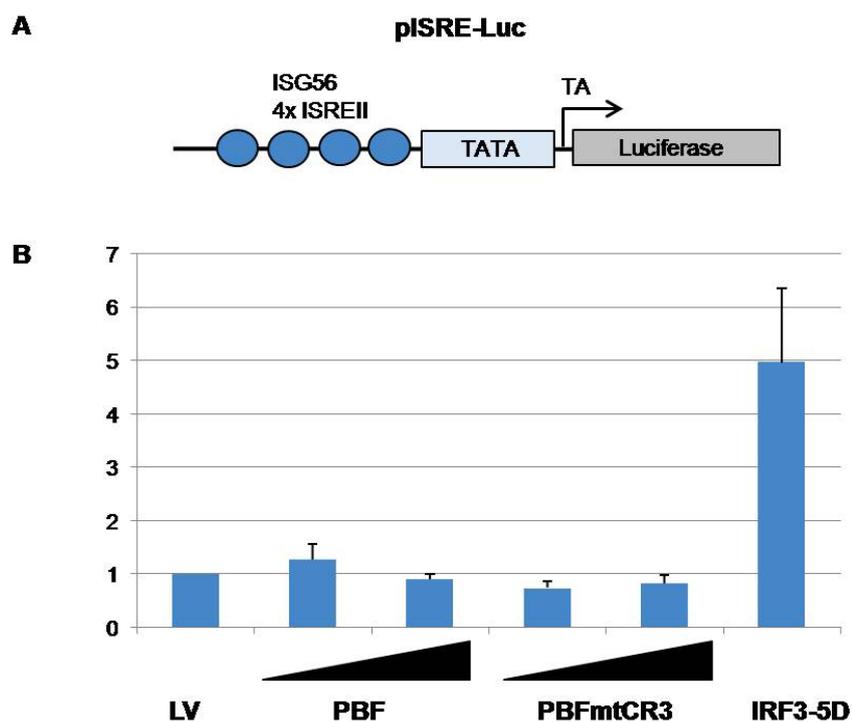


Abbildung 11: ISREs sind für die PBF-vermittelte Aktivierung nicht ausreichend

Schematische Darstellung des Reporterkonstrukts pISRE-Luc. Eingetragen sind 4 Kopien der ISREII mit der Sequenz, wie sie im ISG56 Promotor vorkommt. (B) Transiente Transfektionsstudie. In RTS3b Zellen wurden 500 ng des Reporterkonstrukts pISRE-Luc, 5 bzw. 10 ng pcDNA-FLAG-PBF oder 5 bzw. 10 ng pcDNA-FLAG-PBFmtCR3 oder 5 ng des Expressionsvektors für IRF3-5D kotransfiziert. Die verschiedenen DNA-Mengen wurden mit entsprechendem Leervektor ausgeglichen. Die basale Luciferase-Aktivität wurde als 1 definiert. Die Balken repräsentieren die Mittelwerte aus drei unabhängigen Experimenten. Die Standardabweichungen sind angegeben.

4.5 PBF wird nach Stimulation der Zellen mit Poly I:C degradiert

Die Ergebnisse des Microarrays weisen daraufhin, dass PBF eine Rolle bei der angeborenen Immunantwort spielen könnte. Wie in der Einleitung dargestellt, wird die Expression von ISG56 im Rahmen einer Immunantwort sowohl direkt durch aktiviertes IRF3, als auch über den Weg der IFN-Induktion aktiviert. Vorarbeiten aus unserer Gruppe konnten nur einen geringfügigen Einfluss des Typ1 Interferon α auf die PBF-vermittelte Stimulierung des ISG56 Promotors und keine Induktion des PBF Promotors durch IFN α nachweisen. Dies führte zum Schluss, dass PBF kein IFN-induziertes Gen ist und über einen IFN-unabhängigen Mechanismus agieren könnte. Die Rolle von PBF bei der Aktivierung des ISG56 Promotors im Rahmen einer Induktion der angeborenen Immunantwort sollte untersucht werden. DsRNA, die häufig als Zwischenprodukt bei der viralen Replikation auftritt, wird von dem Toll-like Rezeptor 3 erkannt, der von Immunzellen und von Zellen epithelialen Ursprungs exprimiert wird. Frühere Arbeiten zeigten, dass die Behandlung von transient transfizierten Zellen mit Polyinosinischen-polycytidylischen Säure (Poly I:C), einem synthetischen doppelsträngigen RNA-Analogen, eine signifikante Reduktion der PBF-vermittelten Aktivierung zur Folge hatte (Pawlowski, 2011). Um diesen Effekt zu verstehen, sollte untersucht werden, welche Auswirkungen die Aktivierung dieser Signalkaskaden auf die Proteinmenge von PBF hat. RTS3b Zellen wurden mit dem Expressionsvektor für FLAG-PBF bzw. dem entsprechenden Leervektor transfiziert. 24 h später wurden die Zellen mit IFN α , Poly I:C oder den entsprechenden Lösungsmitteln inkubiert. Die extrahierten Proteine wurden über ein SDS-PAG aufgetrennt und in Western Blot Analysen mit einem gegen das FLAG-Epitop gerichteten Antikörper detektiert. Als Beladungskontrolle diente β -Aktin (Abbildung 12). Während die Inkubation mit Poly I:C zu einer eindeutigen Abnahme der Menge an PBF führte (Spur 5), hatte die Behandlung mit Interferon keine Auswirkungen (Spur 6) auf dessen Proteinmenge. Dies deutet daraufhin, dass die Aktivierung des TLR3-Signaltransduktionswegs einen spezifischen Abbau von PBF induziert.

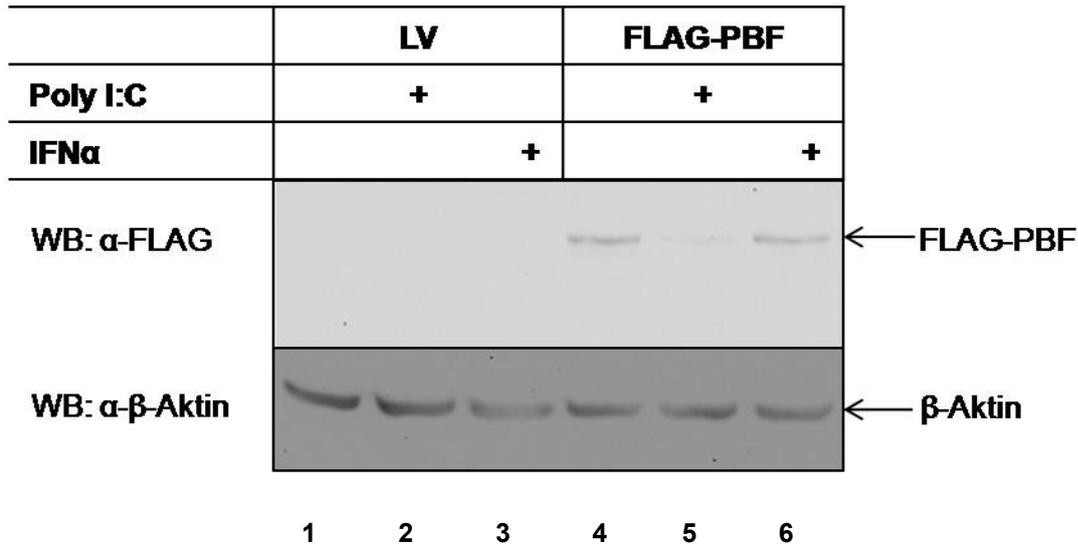


Abbildung 12: PBF wird nach Stimulation der Zellen mit Poly I:C degradiert aber nicht durch IFN α

Expressionsnachweis. RTS3b Zellen wurden mit dem Expressionsvektor für FLAG-PBF (Spur 4-6) oder dem Leervektor (Spur 1-3) transfiziert. Die Zellen wurden vor Ernte 6 h mit 1000 U/ml IFN α (Spur 3 und 6), oder 24 h mit 10 ng/ml Poly I:C (Spur 2 und 5) oder mit den entsprechenden Lösungsmitteln inkubiert. 25 μ g Gesamtprotein wurden in einem 10%igen SDS-PAG aufgetrennt. Im WB erfolgte die Detektion von PBF mit dem FLAG-Antikörper. Aktin wurde nach Reinkubation des WB mit dem Aktin-Antikörper nachgewiesen.

Um dies zu bestätigen und um auszuschließen, dass die Reduktion der Menge an PBF nicht durch den Tod der transfizierten Zellen bedingt ist, wurden RTS3b Zellen mit den Expressionsvektoren für FLAG-PBF und HA-hNAP1 bzw. den entsprechenden Leervektoren in verschiedenen Kombinationen kotransfiziert. hNAP1, ein Histon-Chaperon, ist kein bekanntes Ziel der TLR3-Signalkaskade und diente hierbei als interne Kontrolle. 24 h nach Transfektion wurden die Zellen für weitere 24 h mit oder ohne Poly I:C, inkubiert. Die rekombinanten Proteine wurden in Western Blot Analysen mit Antikörpern, welche PBF bzw. das HA-Epitop erkennen, detektiert. Bei dem PBF-Antikörper handelt es sich um ein aus Kaninchen isoliertes, gereinigtes polyklonales Antiserum gegen bakteriell exprimiertes PBF (Boeckle et al, 2002). Als Beladungskontrolle diente wieder β -Aktin (Abbildung 13). Die Zugabe von Poly I:C zum Kulturmedium (Spuren 4 und 6) führte zu einer drastischen Reduktion der PBF-Menge im Vergleich zu den unbehandelten Zellen (Spuren 3 und 5). Im Gegensatz dazu war die Menge an rekombinantem hNAP1 (Spuren 7 und 8) nicht verändert, unabhängig davon, ob der Expressionsvektor für PBF kotransfiziert wurde oder nicht (Spuren 5 und 6). Dies spricht für einen spezifischen Effekt von Poly I:C auf die PBF-Menge und schließt aus, dass die Reduktion der PBF-Menge durch den Tod der transient transfizierten Zellen bedingt ist.

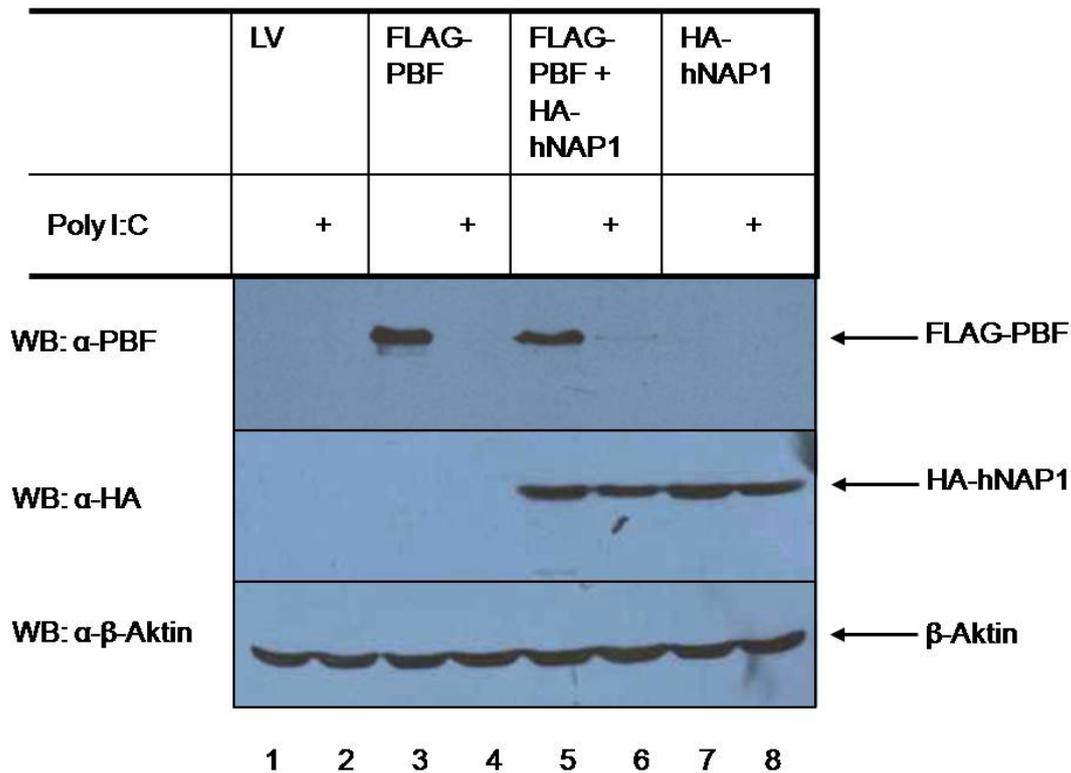


Abbildung 13: PBF wird nach Stimulation der Zellen mit Poly I:C degradiert

Expressionsnachweis. RTS3b Zellen wurden mit dem Expressionsvektor für FLAG-PBF (Spur 3-6), HA-hNAP1 (Spur 5-8) oder den entsprechenden Leervektoren (Spur 1-4, 7-8) kotransfiziert. 24 h vor Ernte wurden die Zellen mit 10 ng/ml Poly I:C (Spur 2, 4, 6 und 8) bzw. DMSO (Spur 1, 3, 5 und 7) behandelt. 25 µg Gesamtprotein wurden in einem 10%iges SDS-PAG aufgetrennt. Die rekombinanten Proteine wurden im oberen WB mit dem PBF- und im mittleren mit dem HA-Antikörper detektiert. Der untere WB (β-Aktin) diente als Beladungskontrolle.

4.6 PBF wird ubiquitiniert

Die Aktivierung der TLR3-Signalwege führt unter anderem zur Stimulation einer Signalkaskade, die mit der Ubiquitinierung und Degradation von IκBα und damit der Freisetzung von NF-κB endet. Vorarbeiten zeigten, dass die PBF-Konzentration durch Inhibition des Proteasoms erhöht wird (Sichtig, 2006). Dies lässt auf eine proteasomale Degradation von PBF schließen, die durch Poly I:C induziert ist. Um eine Ubiquitinierung von PBF nachzuweisen, wurden C33A Zellen, eine HPV negative Zervixkarzinom Zelllinie, mit dem Expressionsvektor für FLAG-PBF transfiziert und 16 h vor Ernte in An- bzw. Abwesenheit von MG132 kultiviert. Die Extrakte wurden über FLAG-AK gekoppelte Agarosekügelchen gereinigt und im SDS-Gel aufgetrennt. Western Blot Analysen mit einem Antikörper, welcher mono- und polyubiquitinierte Proteine detektiert, zeigten eine deutliche Zunahme an

Ubiquitinierung nach Inkubation mit MG132 (Abbildung 14). PBF wird in C33A Zellen also ubiquitiniert und über das Proteasom abgebaut.

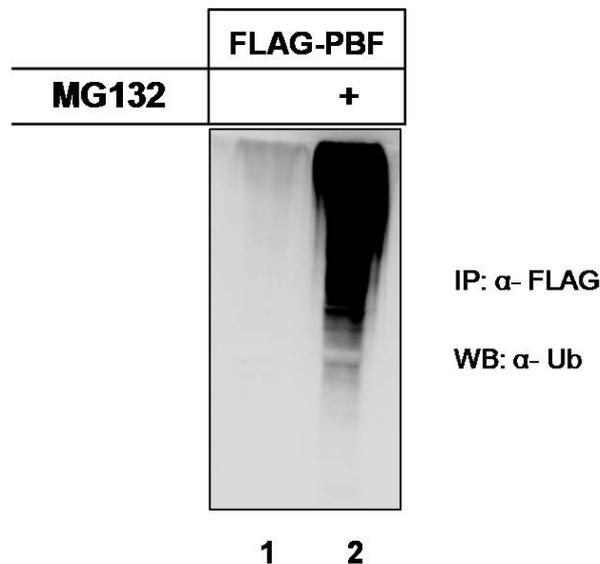


Abbildung 14: PBF wird ubiquitiniert

Immunpräzipitation. C33A Zellen wurden mit dem Expressionsvektor für PBF transfiziert und 16 h vor Ernte mit 25 μ M MG132 (Spur 2) bzw. Ethanol (Spur 1) inkubiert. 200 μ g Proteinextrakt wurden mit FLAG-Antikörper gekoppelten Agarosekügelchen inkubiert. Anschließend wurden unspezifisch gebundene Proteine durch Waschen mit 3 x 0,25 M LSDB entfernt. Die Detektion erfolgte mit einem Antikörper gerichtet gegen mono- und polyubiquitinierte Proteine.

4.7 PBF wird nach Behandlung der Zellen mit TNF- α degradiert

Die Stimulation der TLR3-Signalkaskade führt zur Aktivierung von IKK. IKK wird ebenfalls aktiviert, wenn TNF- α , ein wichtiges Zytokin des Immunsystems, an die entsprechenden Oberflächenrezeptoren von Zellen bindet. Falls aktive IKK an der Degradation von PBF beteiligt ist, sollte TNF- α den gleichen Effekt wie Poly I:C auf die Proteinkonzentration von PBF haben. Um dies zu untersuchen, wurden mit dem Expressionsvektor für FLAG-PBF bzw. dem Leervektor transfizierte RTS3b Zellen 24 h mit bzw. ohne TNF- α inkubiert. Wie in Abbildung 15 erkennbar, reduzierte die Behandlung der Zellen mit TNF- α die PBF-Menge deutlich (Spur 4). Unterschiedliche Transfektionseffizienzen können als Ursache für diesen Effekt ausgeschlossen werden, da Versuche mit der PBF-induzierbaren Zelllinie (beschrieben unter Kapitel 4.2) ein vergleichbares Resultat lieferten (Daten nicht gezeigt). Dieses untermauert eine Beteiligung von IKK an der Regulation der Proteinmenge von PBF.

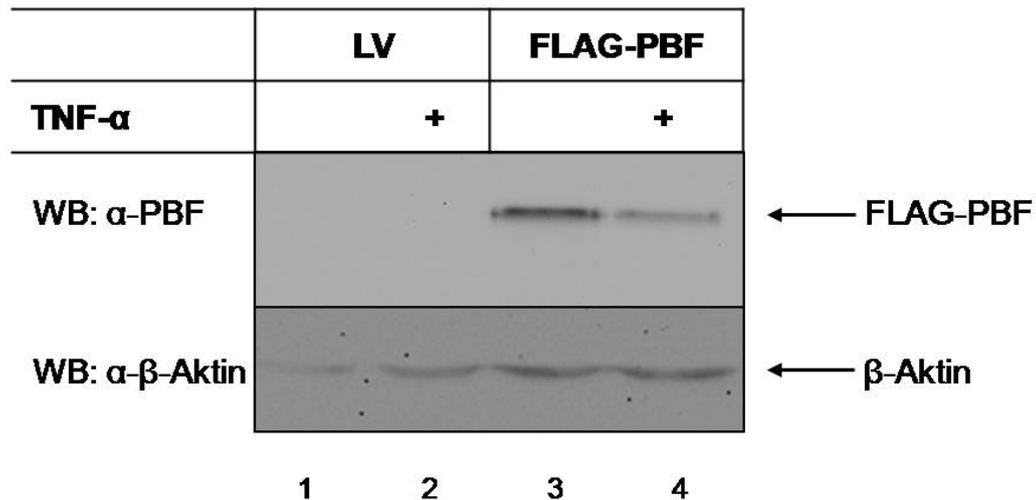


Abbildung 15: PBF wird nach Behandlung der Zellen mit TNF- α degradiert

Expressionsnachweis. RTS3b Zellen wurden mit dem Expressionsvektor für FLAG-PBF (Spur 3 und 4) bzw. dem Leervektor (Spur 1 und 2) transfiziert. 24 h nach Transfektion wurden die Zellen für 24 h mit 1 ng/ml TNF- α (Spur 2 und 4) behandelt. 25 μ g Gesamtprotein-Extrakt wurden in einem zehnpromzentigen SDS-PAG aufgetrennt und auf eine Nitrocellulosemembran transferiert, auf der FLAG-PBF detektiert wurde. Als Beladungskontrolle wurde β -Aktin nachgewiesen.

4.8 IKK ist an der Regulation der Stabilität von PBF beteiligt

Die mögliche Beteiligung von IKK bei der Regulation der Proteinmenge von PBF sollte durch eine spezifische Hemmung des Enzyms bestätigt werden. Dazu wurden wieder transient transfizierte RTS3b Zellen in Anwesenheit von Poly I:C, TNF- α oder den entsprechenden Solventia in Doppelansätzen kultiviert. Jeweils einer der Ansätze wurde zusätzlich mit BMS-345541, einem allosterischen, hoch-spezifischen Inhibitor für IKK β und α (Burke et al. 2003), inkubiert. Wie die Western Blot Analyse in Abbildung 16 zeigt, führte die Anwesenheit des IKK-Inhibitors zu einer Stabilisierung von rekombinantem PBF (Spur 3). Darüber hinaus konnte die Behandlung mit BMS-345541 die Poly I:C- und TNF- α -induzierte Degradation (Spur 4 und 6) von PBF verhindern (Spur 5 und 7). Daraus folgt, dass die Poly I:C- und TNF- α -abhängigen Effekte durch IKK vermittelt werden.

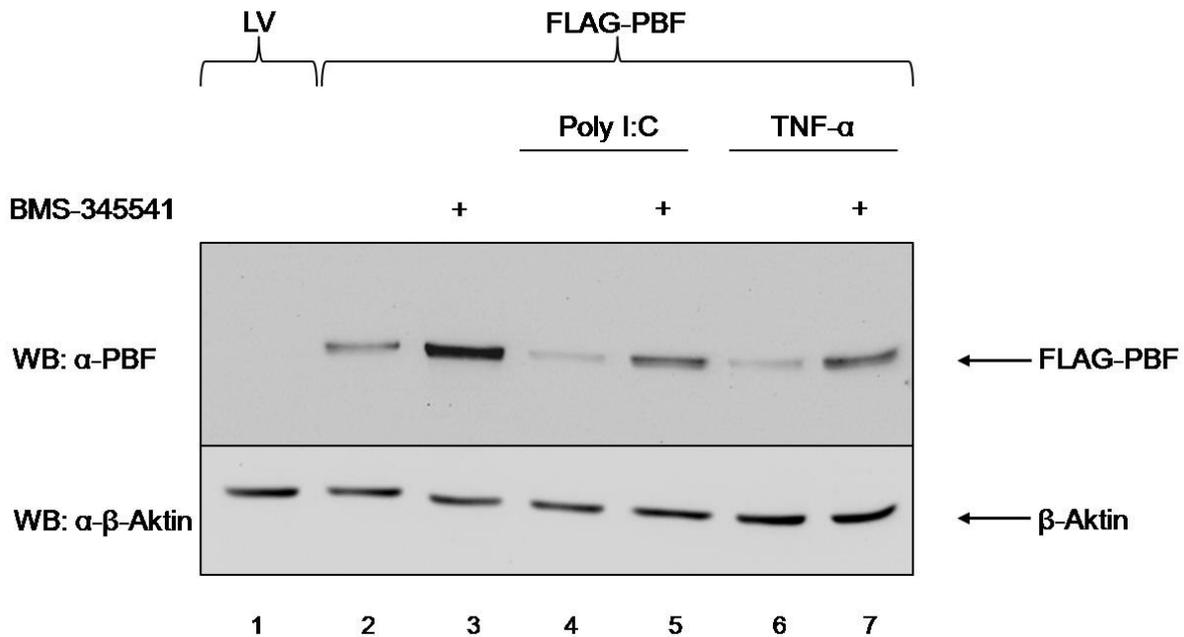


Abbildung 16: Inhibition von IKK verhindert die Poly I:C- und TNF- α - abhängigen Degradation von PBF.

Expressionsnachweis. RTS3b Zellen wurden mit dem Expressionsvektor für FLAG-PBF (Spur 2-7) bzw. dem Leervektor (Spur 1) transfiziert. 24 h vor Ernte wurden die Zellen mit 1 ng/ml TNF- α (Spur 6 und 7), 10 ng/ml Poly I:C (Spur 4 und 5), 5 μ M BMS-345541 (Spur 3, 5 und 7) oder den Solventia inkubiert. 25 μ g Extrakt wurden in einem 10%igen SDS-PAG aufgetrennt und die Expression der Proteine mit dem FLAG-Antikörper nachgewiesen. Als Kontrolle für eine gleichmäßige Auftragung wurde β -Aktin detektiert.

4.9 BMS-345541 stabilisiert endogenes PBF

Alle vorherigen Versuche in der Arbeitsgruppe, endogenes PBF in verschiedenen Zelllinien nachzuweisen, waren nicht erfolgreich. Da die Behandlung von Zellen mit BMS-345541 zur Stabilisierung von rekombinantem PBF führt, wurde getestet, ob die Inhibition von IKK auch eine Auswirkung auf die Menge an endogenem PBF hat. RTS3b, U937, eine maligne monozytische Zelllinie, und U-87 MG, eine Glioblastom-Astrozytom Zelllinie, wurden für 24h in Ab- bzw. Anwesenheit von BMS-345541 kultiviert. Aus den Zellen wurde Gesamtprotein isoliert und mittels Western Blot untersucht. Als Positivkontrolle dienten Extrakte aus der unter 4.2 beschriebenen, PBF-induzierbaren RTS3b Zelllinie. Wie in Abbildung 17 dargestellt, konnte in allen drei Zelllinien, nach BMS-345541-Behandlung (Spur 2, 4 und 6) eine spezifische Bande, welche sich auf gleicher Höhe wie die Positivkontrolle befindet, detektiert werden. Die konstitutive Aktivierung von IKK in den malignen Zelllinien könnte also zu einer kontinuierlichen Degradation von PBF führen.

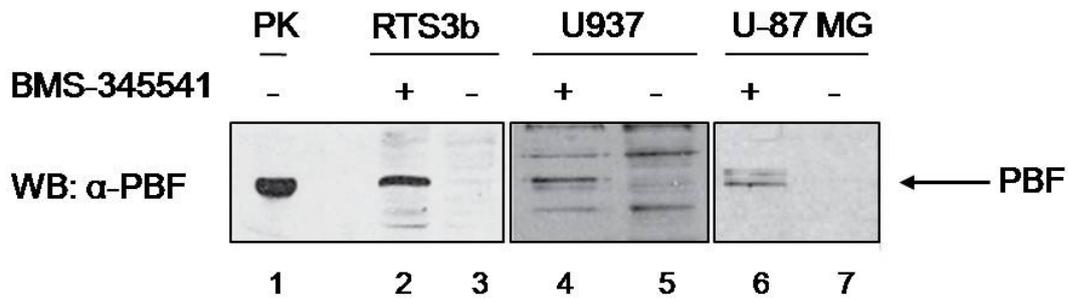


Abbildung 17: BMS-345541 stabilisiert PBF

Expressionsnachweis. RTS3b (Spur 2 und 3), U937 (Spur 4 und 5) und U-87 MG (Spur 6 und 7) Zellen wurden für 24 h in Ab (-) bzw. Anwesenheit (+) von BMS-345541 (5 μ M) kultiviert. 50 μ g Ganzzelextrakt wurden in einem 10%igen SDS-PAG aufgetrennt und die Expression der Proteine mit dem PBF-Antikörper nachgewiesen. In Spur 1 wurden Extrakte (10 μ g) von RTS3b-TR-FLAG-PBF Zellen 24 h in Anwesenheit von Doxycyclin (1 μ g/ml) kultiviert, verwendet. PK: Positivkontrolle.

4.10 Durch BMS-345541 stabilisiertes endogenes PBF ist nicht phosphoryliert

Die bisherigen Ergebnisse legen die Vermutung nah, dass PBF durch IKK phosphoryliert wird. Um diese Annahme zu überprüfen, wurden Proteinextrakte aus transient transfizierten RTS3b Zellen mit λ -Phosphatase, einem Enzym aktiv gegen phosphorylierte Serin-, Threonin- und Tyrosin-Reste, behandelt und anschließend über ein SDS-PAG aufgetrennt. Ein mit dem PBF-spezifischen Antikörper entwickelter WB (Abbildung 18) zeigte eine Veränderung des Laufverhaltens des rekombinanten PBF-Proteins nach Behandlung mit λ -Phosphatase. Die korrespondierende Bande (Spur 3) migrierte dabei schneller im SDS-PAG als bei unbehandelten Extrakten (Spur 2). Wurden dagegen Proteinextrakte aus untransfizierten RTS3b Zellen, die in Anwesenheit von BMS-345541 kultiviert wurden, verwendet, waren keine Unterschiede im Migrationsverhalten nach Inkubation mit λ -Phosphatase feststellbar (Spur 4 und 5). Das endogene PBF, welches durch BMS-345541 stabilisiert wird, scheint also nicht oder höchstens schwach phosphoryliert zu sein. Dieser Befund steht im Einklang mit den vorherigen Ergebnissen und unterstützt die Annahme, dass die Phosphorylierung durch IKK notwendig für die Degradation von PBF ist.

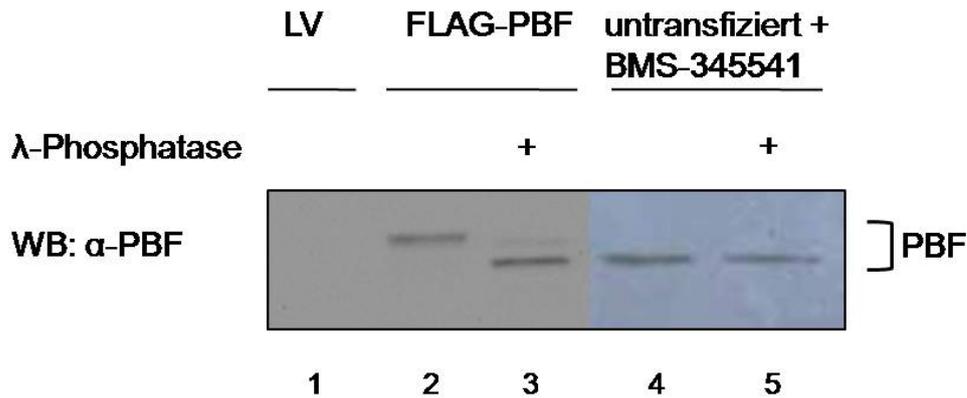


Abbildung 18: Durch BMS-345541 stabilisiertes endogenes PBF ist nicht phosphoryliert

Expressionsnachweis. 25 μ g Gesamtprotein-Extrakt aus transient transfizierten RTS3b Zellen (Spur 1-3) bzw. 50 μ g Gesamtprotein-Extrakt aus RTS3b Zellen kultiviert in Anwesenheit von BMS-345541 (Spur 4 und 5) wurden 30 min mit 600Units λ -Phosphatase inkubiert. Anschließend wurden die Proteine im 8%igen SDS-PAG aufgetrennt und mit dem PBF-Antikörper visualisiert.

4.11 Aktive IKK ist für die PBF-vermittelte Stimulierung des ISG56-Promotors notwendig

Es wurde bereits gezeigt, dass die Phosphorylierung durch IKK eine Auswirkung auf die transkriptionelle Aktivität der Zielsubstrate haben kann, wobei im Fall von Foxo3a IKK die Aktivierung der Zielgene hemmt (Hu et al, 2004). Um den Effekt von IKK auf die PBF-vermittelte Stimulierung des ISG56 Promotors zu untersuchen, wurden RTS3b Zellen mit Expressionsvektoren für PBF bzw. PBFmtCR3 und dem Reporterkonstrukt ISG56-Prom-Luc jeweils in Doppelansätzen kotransfiziert. Als Kontrolle diente der Expressionsvektor für IRF3-5D. Ein Ansatz der transient transfizierten Zellen wurde 24 h vor Ernte mit BMS-345541 behandelt. Wie in Abbildung 19A deutlich erkennbar, hatte die Inkubation mit BMS-345541 eine starke Reduktion der PBF-vermittelten Aktivierung zur Folge, obwohl die Menge an PBF unter diesen Bedingungen erhöht ist. Die Aktivierung durch IRF3-5D war in Anwesenheit von BMS-345541 sogar leicht verstärkt, was die Spezifität der beobachteten Reduktion unterstreicht. Da PBF in der Lage ist, die Transkription auch zu reprimieren (Sichtig et al, 2007b), wurde getestet, ob sich die Inhibition von IKK auch darauf auswirkt. Als Reporterkonstrukt wurde HPV8-NCR-Luc verwendet. Dieses beinhaltet die sogenannte *non coding region*, einschließlich des frühen und späten Promotors von HPV8, vor dem Luciferase Gen (siehe Abbildung 19B). Im Gegensatz zur PBF-vermittelten Aktivierung wurde die Repression durch BMS-345541 nur moderat beeinflusst (Abbildung 19B).

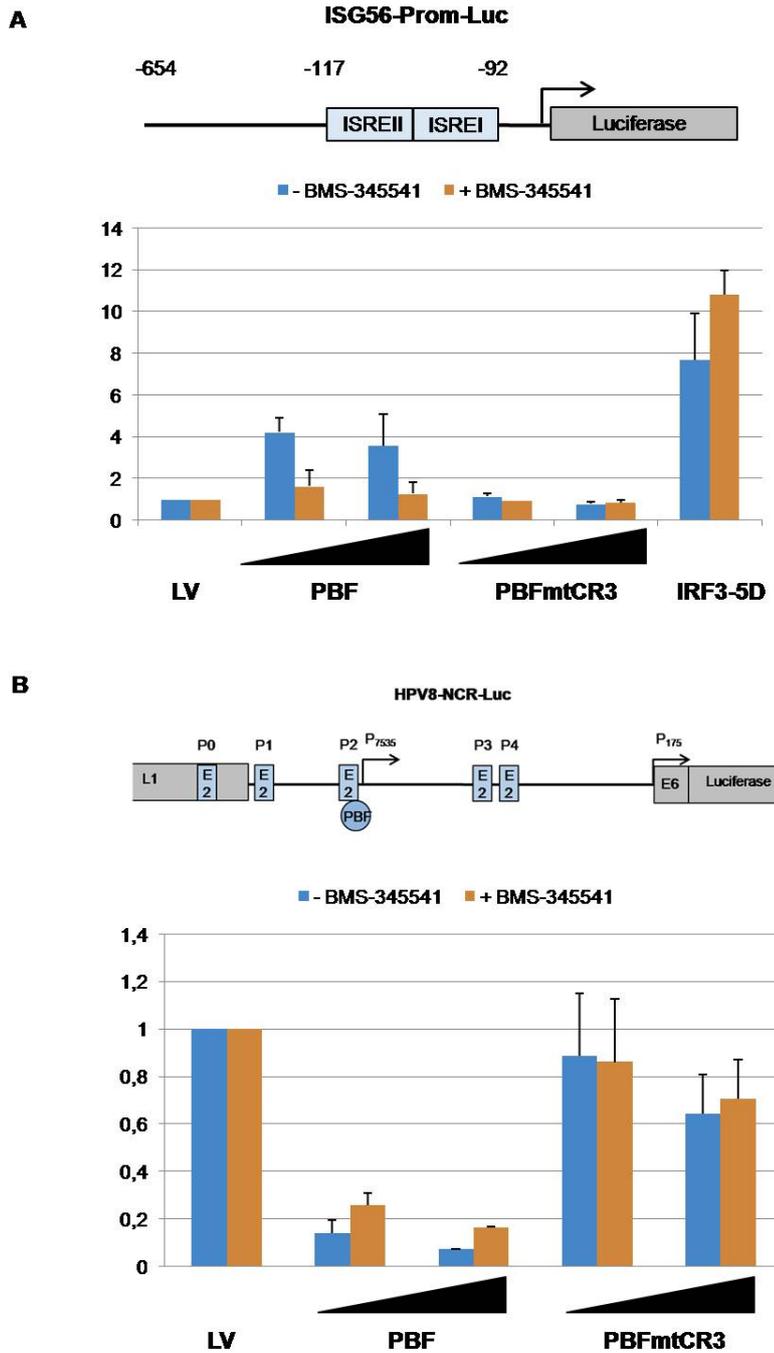


Abbildung 19: Aktive IKK beeinflusst die transkriptionelle Aktivität von PBF

(A) Oben: Schematische Darstellung des Reporterkonstrukts ISG56-Prom-Luc. Angegeben ist die Position der ISREI und II. Unten: Transiente Transfektionsstudie. RTS3b Zellen wurden mit 500 ng des Reporterkonstrukts ISG56-Prom-Luc und 5 bzw. 10 ng pcDNA-FLAG-PBF oder 5 bzw. 10 ng pcDNA-FLAG-PBFmtCR3 oder 5 ng des Expressionsvektors für IRF3-5D kotransfiziert. (B) Oben: Schematische Darstellung des Reporterkonstrukts HPV8-NCR-Luc. Angegeben sind die E2-Bindestellen P0-P4, inklusive der PBF-Bindestelle innerhalb P2, sowie der späte (P_{7535}) und der frühe (P_{175}) Promotor. Unten: Transiente Transfektionsstudie. RTS3b Zellen wurden mit 500 ng des Reporterkonstrukts 8NCR-Luc und 5 bzw. 10 ng des Expressionsvektors für FLAG-PBF oder PBFmtCR3 kotransfiziert. (A) und (B) Die verschiedenen DNA-Mengen wurden mit entsprechendem Leervektor ausgeglichen. 24 h vor Ernte wurde die Hälfte der Ansätze mit 5 μ M BMS-345541 inkubiert. Die basale Luciferase-Aktivität wurde als 1 definiert. Die Balken repräsentieren die Mittelwerte aus zwei unabhängigen Experimenten. Die Standardabweichungen sind angegeben.

Die Behandlung der Zellen mit BMS-345541 hatte keine Auswirkung auf die subzelluläre Lokalisation von PBF (Daten nicht gezeigt).

4.12 PBF enthält mindestens zwei IKK-abhängige Degradationsmotive

Um die Rolle der Phosphorylierung durch IKK bei der PBF-vermittelten Regulation der Transkription zu bestätigen, wäre eine PBF Mutante, die nicht mehr durch IKK phosphoryliert werden kann, notwendig. Dafür sollte zunächst die für die IKK-abhängige Degradation wichtige Region mit Hilfe von Deletionsmutanten von PBF eingegrenzt werden. Die N- und C-terminal verkürzten Mutanten decken dabei das gesamte Protein ab (Abbildung 20). Die IKK-abhängige Degradation wurde durch Kultivierung von transient transfizierten RTS3b Zellen in Ab- bzw. Anwesenheit von Poly I:C induziert. Der WB in Abbildung 20 zeigt, dass alle Deletionsmutanten, mit Ausnahme von PBF Δ 4 (Abbildung 20, Spur 12), in Folge von Poly I:C abgebaut wurden. PBF Δ 4 und Δ 3 unterscheiden sich um 34 Aminosäuren (Position 189-222), die im PBF Δ 4 fehlen und somit die Degradation von PBF Δ 3 induzieren. Darüber hinaus gibt es mindestens ein weiteres Motiv im C-Terminus, das in PBF Δ 9 und Δ 10 für den Abbau verantwortlich ist. Dies impliziert, dass mindestens zwei Regionen an der IKK-abhängigen Degradation beteiligt sind.

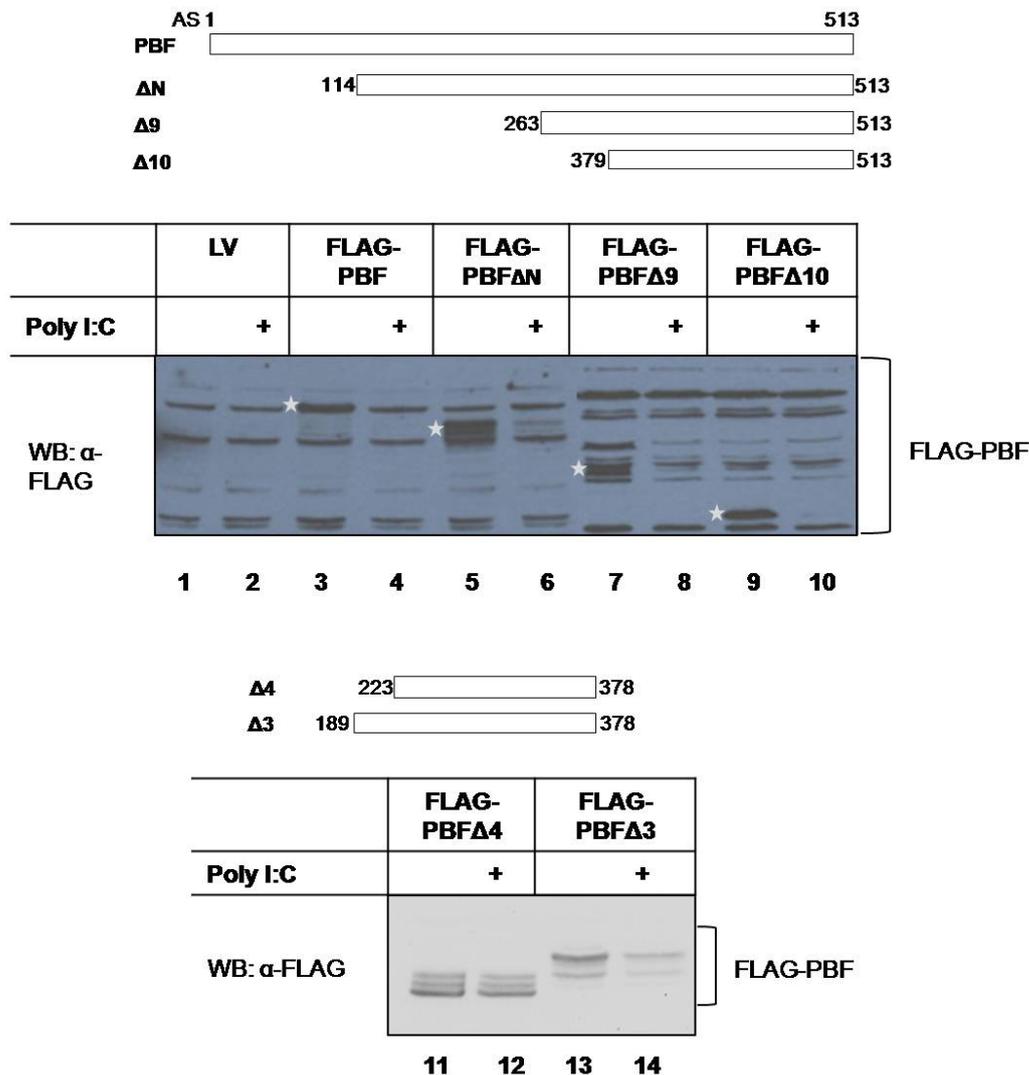


Abbildung 20: PBF enthält mindestens zwei IKK-abhängige Degradationsmotive

Expressionsnachweis. RTS3b Zellen wurden mit den Expressionsvektoren für FLAG-PBF (Spur 3 und 4), -PBF Δ N (Spur 5 und 6), -PBF Δ 9 (Spur 7 und 8), -PBF Δ 10 (Spur 9 und 10), -PBF Δ 4 (Spur 11 und 12) und -PBF Δ 3 (Spur 13 und 14) oder dem Leervektor (Spur 1 und 2) transfiziert. 24 h später wurde Poly I:C in einer Endkonzentration von 10 ng/ml für weitere 24 h ins Medium gegeben (Spur 2, 4, 6, 8, 10, 12, 14). 25 μ g Ganzzellextrakte wurden für Western Blot Analysen mit dem FLAG-Antikörper eingesetzt. Die Länge der einzelnen Fragmente ist schematisch dargestellt. Die Position der rekombinanten Proteine im Blot ist mit einem Sternchen markiert. Die Charge des FLAG-Antikörpers mit der der obere Blot entwickelt wurde, zeigte viele unspezifische Signale.

4.13 Die Aminosäuren 189-222 in PBF sind wichtig für die Degradation des Proteins

Die Sequenz „DpSG Ψ XpS/T“ (p=phospho, Ψ =hydrophober Rest, X=beliebiger Rest) fungiert als Phosphoakzeptorstelle in einigen IKK-Substraten (Chariot, 2009). Dieses Motiv dient ebenfalls meist als Erkennungssequenz für SCF $^{\beta}$ -TRCP, einen E3-Ligase Komplex. Dabei ist die Phosphorylierung innerhalb dieser Sequenz notwendig für

eine hochaffine Bindung von SCF^{β-TRCP} mit anschließender Ubiquitinierung des Substrats (Cardozo und Pagano, 2004; Ang und Wade Harper, 2005; Petroski und Deshaies, 2005). Die Aminosäuren an Position 211-216 (DSGSST) in PBF entsprechen dieser Konsensussequenz und stellen somit ein potentielles Phosphodegron dar. Wie bereits erwähnt und in Abbildung 21 dargestellt, fehlen PBFΔ4, das nicht durch Poly I:C abgebaut wird, die entsprechenden Aminosäuren. Folglich sollte diese Deletionsmutante, anders als PBFΔ3, auch nicht durch TNF-α degradiert und nicht durch BMS-345541 stabilisiert werden. Die Ergebnisse der Western Blot Analyse (Abbildung 21) bestätigen diese Hypothese und indizieren, dass die Aminosäuren 189-222 ein IKK-abhängiges Degradationsmotiv beherbergen.



Abbildung 21: Die Aminosäuren 189-222 in PBF enthalten ein Degradationsmotiv

Expressionsnachweis. Oben: schematische Darstellung von PBFΔ4 und Δ3, die sich durch 34 Aminosäuren wie angegeben, unterscheiden. Das potentielle Degradationsmotiv ist durch ein Rechteck hervorgehoben. Unten: RTS3b wurden mit Plasmiden, welche für FLAG-PBFΔ3 (Spur 2-5) bzw. FLAG-PBFΔ4 (Spur 6-9) kodieren, oder dem Leervektor (Spur 1) transfiziert. Die Zellen wurden 24 h in Anwesenheit von 1 ng/ml TNF-α (Spur 3, 4, 7 und 8), 5 μM BMS-345541 (Spur 4, 5, 8 und 9) oder den Lösungsmitteln kultiviert. 25 μg der daraus hergestellten Ganzzellextrakte wurden in einem 12%igen SDS-PAGE aufgetrennt. Im anschließenden WB wurden die Proteine mit einem gegen das FLAG-Epitop gerichteten Antikörper detektiert.

4.14 Die AS S212/214/215 und T216 sind wichtig für die Stabilität des Proteins

Falls die Aminosäuren 189- 223 ein IKK-Phosphorylierungsmotiv beherbergen, sollte PBF Δ 3 nach Expression in RTS3b Zellen phosphoryliert sein. Um dies zu überprüfen, wurden die Zelllysate mit überexprimiertem PBF Δ 4 bzw. Δ 3 mit λ -Phosphatase behandelt. Wie in Abbildung 22 zu erkennen, führte die Inkubation mit λ -Phosphatase zu einer schnelleren Migration beider Proteine (Spur 2 und 4). Dies belegt, dass beide Fragmente von PBF phosphoryliert sind und die höher laufenden Banden durch die Phosphorylierung bedingt sind. Neben der IKK-Konsensusstelle befinden sich viele weitere potentielle Erkennungssequenzen für andere Kinasen in PBF Δ 3 und PBF Δ 4, die für die Phosphorylierung in PBF Δ 4 verantwortlich sein könnten (siehe auch Kapitel 4.15).

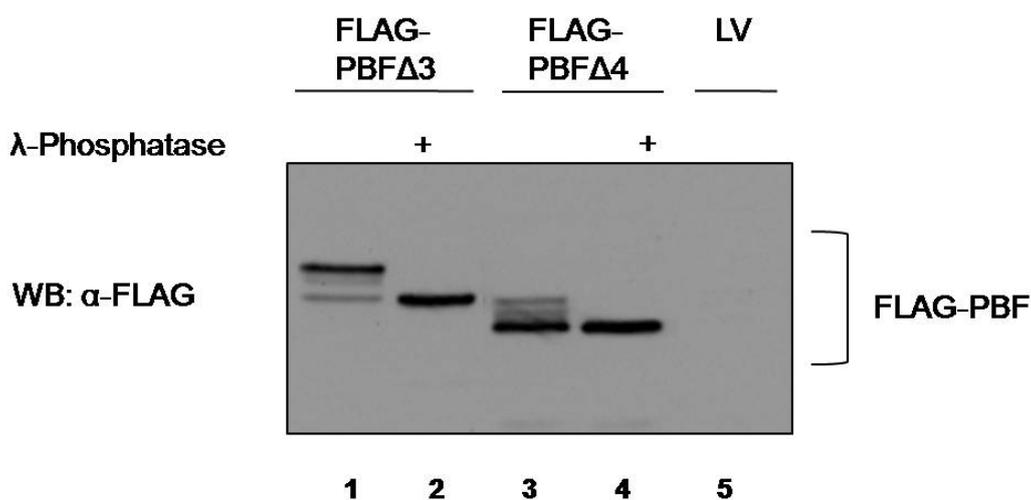
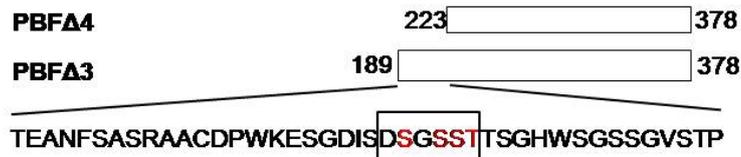


Abbildung 22: PBF Δ 3 und Δ 4 sind phosphoryliert.

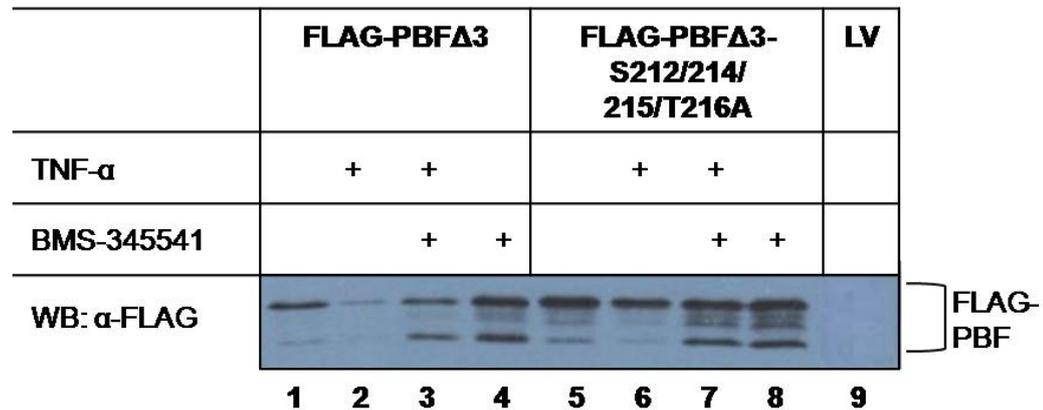
Expressionsnachweis. 25 μ g Ganzelleextrakt aus transient transfizierten RTS3b Zellen (FLAG-PBF Δ 3: Spur 1 und 2; FLAG-PBF Δ 4: Spur 3 und 4 und Leervektor: Spur5) wurden 30 min mit 600 Units λ -Phosphatase behandelt. Anschließend wurden die Proteine im 12%igen SDS-PAG aufgetrennt und mit dem FLAG-Antikörper nachgewiesen.

Um die Relevanz des potentiellen Phosphodegrons als IKK-Konsensusmotiv zu überprüfen, wurden in PBF Δ 3 die Aminosäuren S212/214/215 und T216 in Alanin, welches nicht phosphoryliert werden kann, mutiert. Die resultierende Vierfachmutante war nicht nur stabiler als das Wildtyp-Protein, auch die Effekte von TNF- α und BMS-345541 waren weitestgehend aufgehoben (Abbildung 23A). PBF Δ 3-

S212/214/215/T216A war erwartungsgemäß phosphoryliert, wie die Behandlung mit λ -Phosphatase zeigt (Abbildung 23B). S212/214/215 und T216 sind also für die Degradation verantwortlich. Im Gesamtprotein hatten die Mutationen jedoch nur einen geringen Einfluss auf dessen Stabilität. Die Menge des Proteins war zwar im Vergleich zum Wildtyp etwas erhöht, allerdings hatte die Behandlung mit BMS-345541 immer noch eine deutliche Stabilisierung zur Folge (Daten nicht gezeigt). Die Aminosäuren S212/214/215 und T216 scheinen somit an der Regulation der Stabilität von PBF beteiligt zu sein. Die eher geringen Effekte im Kontext des Gesamtproteins sind auf die Existenz mindestens eines weiteren Degradationsmotivs zurückzuführen, dessen Phosphorylierung durch IKK wohl ausreichend ist, um den Abbau zu induzieren. Wie in Kapitel 4.12 bereits gezeigt, liegt ein Degradationsmotiv in PBF Δ 10.



A



B

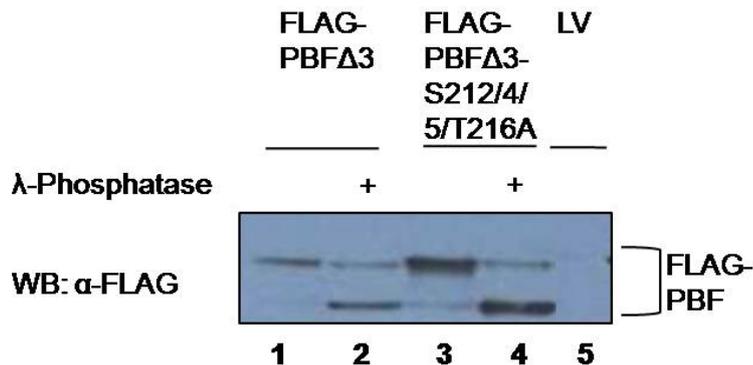


Abbildung 23: Stabilisation von PBFA3 durch Mutation der Aminosäuren S212/214/215 und T216

Expressionsnachweis. (A) RTS3b Zellen wurden mit den Expressionsvektoren für FLAG-PBFA3 (Spur 1-4) bzw. FLAG-PBFA3-S212/214/215/T216A (Spur 5-8) oder dem Leervektor (Spur 9) transfiziert. Anschließend wurden die Zellen für 24 h mit 10 ng/ml TNF- α (Spur 2, 3, 6 und 7), 5 μ M BMS-345541 (Spur 3, 4, 7 und 8) oder den Lösungsmitteln inkubiert. 25 μ g Gesamtproteinextrakte wurden in einem 12%igen SDS-PAG aufgetrennt. Der Nachweis der Proteine erfolgte mit dem FLAG-Antikörper. (B) 25 μ g der Extrakte (siehe A, Spur 1, 5 und 9) wurden 30 min mit 600 Units λ -Phosphatase behandelt. Der Nachweis erfolgte wieder mit dem FLAG-Antikörper.

4.15 PBF ist kein Substrat von ERK1/2

Wie in Abbildung 22 deutlich wird, ist PBFA4, das die Aminosäuren 223 - 378, kodiert ebenfalls phosphoryliert. Frühere Befunde aus der Arbeitsgruppe beweisen eine Rolle der Phosphorylierung bei der Regulation der subzellulären Lokalisation und des

Wachstums. Das PBF-Protein wird in Anwesenheit von Wachstumsfaktoren, durch AKT und eine weitere PI3K-abhängige Kinase an S394/396 und S447/449/451 phosphoryliert, welches die Interaktion von PBF mit 14-3-3 reguliert. Die Bindung an 14-3-3 trägt zur Kontrolle der subzellulären Lokalisation und der wachstumsinhibierenden Funktion von PBF bei (Sichtig et al, 2007a). Allerdings weist eine 14-3-3 interaktionsdefekte PBF-Mutante in Anwesenheit von Wachstumsfaktoren immer noch eine größtenteils cytoplasmatische Lokalisation auf, was indiziert, dass weitere posttranslationale Modifikationen als Reaktion auf die Gegenwart von Wachstumsfaktoren notwendig sind. Eine In silico Analyse von potentiellen Phosphorylierungsstellen ergab die Aminosäuren Threonin an Position 229, Threonin an Position 348 und Serin an Position 365 als potentielle Phosphoakzeptorstellen für ERK1/2. Diese befinden sich somit in PBF Δ 4. ERK Kinasen gehören zur MAP (*mitogen activated protein*) Kinase Familie und werden durch Wachstumsfaktoren, Differenzierungsstimuli und Zytokine aktiviert. Sie sind essentiell für die Transition von G1 zur S-Phase und inhibieren antiproliferative Gene (Meloche und Pouyssegur, 2007). Um zu überprüfen, ob diese Aminosäuren in PBF Phosphorylierungsstellen von ERK1/2 sind, wurden im ersten Schritt RTS3b Zellen mit dem Expressionsvektor für FLAG-PBF Δ 4 bzw. dem Leervektor transfiziert. Da EGF eine Komponente des E-Mediums ist, das zur Kultivierung von RTS3b Zellen verwendet wird, sollte ERK in diesen Zellen aktiv sein. Um die Aktivität von ERK1/2 zu verstärken, wurde 48 h später ein Ansatz transfizierter Zellen mit zusätzlichem EGF inkubiert. Die Proteinextrakte wurden mit FLAG-Antikörper gekoppelten Agarosekügelchen aufgereinigt. Der Nachweis der Phosphorylierung durch MAP-Kinasen erfolgte durch die Inkubation des FLAG-Präzipitats in einem WB mit einem Antikörper der phosphorylierte Threonine und Serine lokalisiert vor einem Prolin erkennt, was ein typisches Merkmal der Phosphoakzeptorstellen von MAP Kinasen ist. Wie in Abbildung 24 (oberes Bild) erkennbar, detektierte der Antikörper nur in der Probe mit FLAG-PBF Δ 4 (Spur 3 und 4) ein spezifisches Signal. Das präzipitierte FLAG-PBF Δ 4 wurde mit dem PBF-Antikörper detektiert (mittleres Bild, Spur 3 und 4). Als Kontrolle für die Aktivität von ERK1/2 diente der Nachweis des phosphorylierten Proteins in den Extrakten. Das Bild in Abb. 24 unten, zeigt, dass ERK unter normalen Zellkultur Bedingungen aktiv ist. Diese Ergebnisse belegen, dass PBF in der Region von PBF Δ 4 an Serin-Prolin oder Threonin-Prolin Motiven phosphoryliert wird.

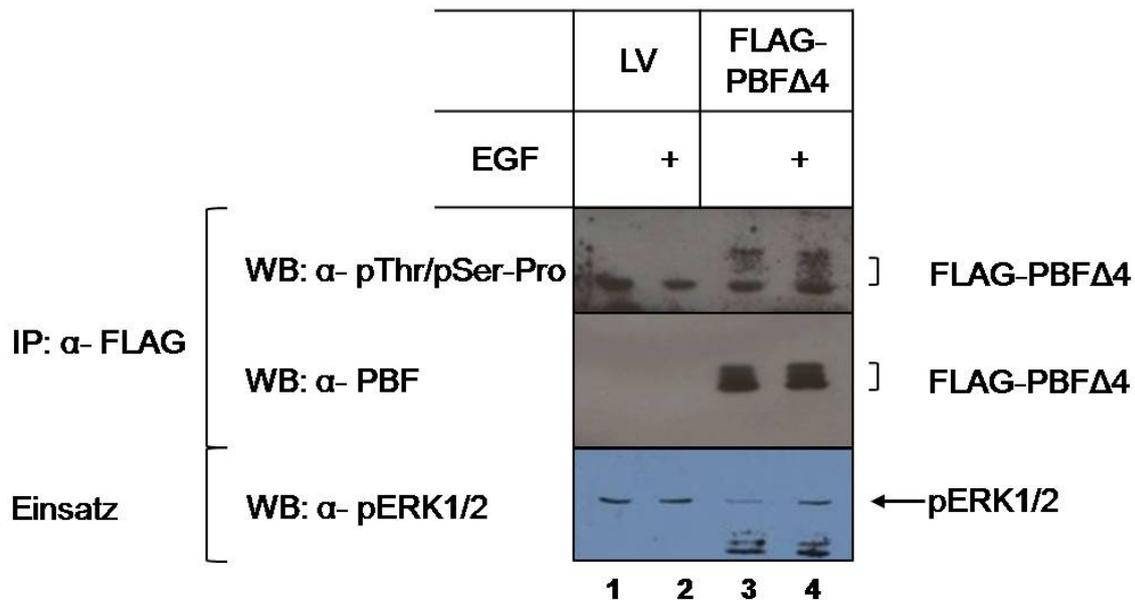


Abbildung 24: PBFΔ4 wird phosphoryliert

Immunpräzipitation. RTS3b Zellen wurden mit den Expressionsvektoren für FLAG-PBFΔ4 (Spur 3 und 4) bzw. dem Leervektor (Spur 1 und 2) transfiziert. 30 min vor Ernte wurde je ein Ansatz mit 5 ng/ml EGF (Spur 2 und 4) behandelt. Zum Aufreinigen von FLAG-PBFΔ4 wurden je 1 mg der Ganzzelextrakte mit FLAG-Antikörper gekoppelten Agarosekügelchen inkubiert und anschließend gewaschen (3x 0,3 M LSDB). Die gebundenen Proteine wurden in einem 12%igen SDS-PAG aufgetrennt und mit verschiedenen Antikörper (oberes Bild: phospho-Threonin/phospho-Serin-Prolin-Antikörper, mittleres Bild: PBF-Antikörper) detektiert. Spuren 1-4 (unteres Bild) zeigen im pERK1/2-WB 1/45 des Einsatzes für die Immunpräzipitation (IP).

Die Mutation der vorhergesagten Phosphoakzeptorstellen in ein Alanin, das nicht phosphoryliert werden kann, in PBFΔ4 sollte deren Rolle bei einer ERK1/2-vermittelten Modifikation aufzeigen. Da ERK unter normalen Zellkulturbedingungen aktiv ist, wurde zusätzlich U0126, ein nicht kompetitiver Inhibitor von MEK1/2, welche ERK1/2 aktivieren, verwendet. Die Ergebnisse der Western Blot Analyse (Abbildung 25) zeigen, dass die Mutationen der potentiellen ERK1/2 Phosphoakzeptoraminosäuren T229/T348/S365 zu einer leichten Veränderung des Bandenmusters führten (Vergleich Spur 4-6 mit Spur 7-9). Dies weist auf eine unterschiedliche Phosphorylierung von PBFΔ4 als Resultat der eingeführten Mutationen hin. Allerdings hatte die Hemmung von ERK1/2 (siehe unteres Bild, Spur 2, 4 und 8) durch U0126 keine Auswirkungen auf das Laufverhalten von PBFΔ4 (oberes Bild, vergleiche Spur 4 mit Spur 5, 6), was eine Phosphorylierung durch ERK1/2 unwahrscheinlich macht. Die Effizienz des Inhibitors wurde durch einen WB mit dem phospho-spezifischen ERK-AK bestätigt.

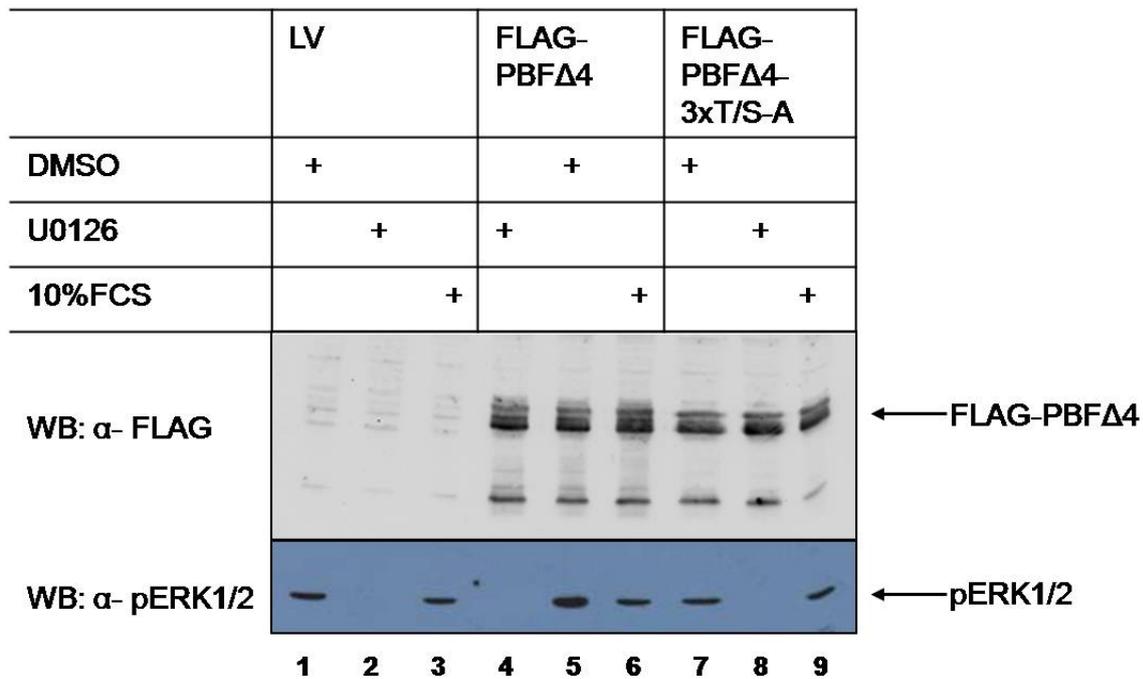


Abbildung 25: PBFΔ4 ist kein Substrat von ERK1/2

Expressionsnachweis. C33A Zellen wurden mit den Expressionsplasmiden für FLAG-PBFΔ4 (Spur 4-6), FLAG-PBFΔ4-3xT/S-A (Spur 7-9) oder dem Leervektor (Spur 1-3) transfiziert. 46 h später wurden die Zellen in serumfreiem Medium versetzt mit 15 μM U0126 (Spur 2, 4 und 8) bzw. DMSO (Spur 1, 5 und 7) oder serumhaltiges Medium (Spur 3, 6 und 9) für 2 h inkubiert. 15 μg Gesamtproteinextrakte wurden im 12%igen SDS-PAGE aufgetrennt. Der Western Blot wurde mit dem FLAG-Antikörper (oberes Bild) bzw. dem PhosphoERK1/2-Antikörper (unteres Bild) entwickelt.

Die oben beschriebenen Experimente zeigen, dass eine oder mehrere der eingeführten Mutationen das Laufverhalten von PBFΔ4 im SDS Gel verändern, was auf eine unterschiedliche Phosphorylierung schließen lässt. Allerdings werden die hier untersuchten Aminosäuren wohl nicht von ERK1/2 oder ERK5 phosphoryliert, die alle von U0126 indirekt gehemmt werden. Um eine Rolle dieser Phosphorylierung auf die transkriptionelle Fähigkeit von PBF zu untersuchen, wurden im Gesamtprotein die entsprechenden Aminosäuren in Alanin, welches nicht mehr phosphoryliert werden kann, oder Glutaminsäure, welches die negative Ladung durch die Phosphatgruppe simuliert, mutiert. In transienten Transfektionsanalysen wurde ein synthetisches Reporterkonstrukt verwendet, von dem bereits gezeigt wurde, dass eine Überexpression von PBF zu einer Reduktion der Promotoraktivität führt (Sichtig et al, 2007b). Wie in Abbildung 26B zu sehen, gab es keine Unterschiede zwischen dem Wildtyp Protein und den Mutanten in der Fähigkeit den Promotor zu reprimieren. Die Inkubation der transfizierten Zellen mit dem U0126-Inhibitor hatte auch keinen Effekt auf die transkriptionelle Repressionsfähigkeit,

weder auf die des wt-PBF noch auf die der beiden mutierten Proteine (Abbildung 26C). Die Mutationen hatten ebenfalls keine Auswirkungen auf die PBF-vermittelte Aktivierung des ISG56 Promotors (Daten nicht gezeigt) oder auf die Proteinstabilität von PBF nach Behandlung der Zellen mit Poly I:C (Daten nicht gezeigt). Obwohl PBF an einer dieser Stellen phosphoryliert sein könnte, bleibt sowohl die verantwortliche Kinase als auch die Funktion dieser posttranslationalen Modifikation unklar.

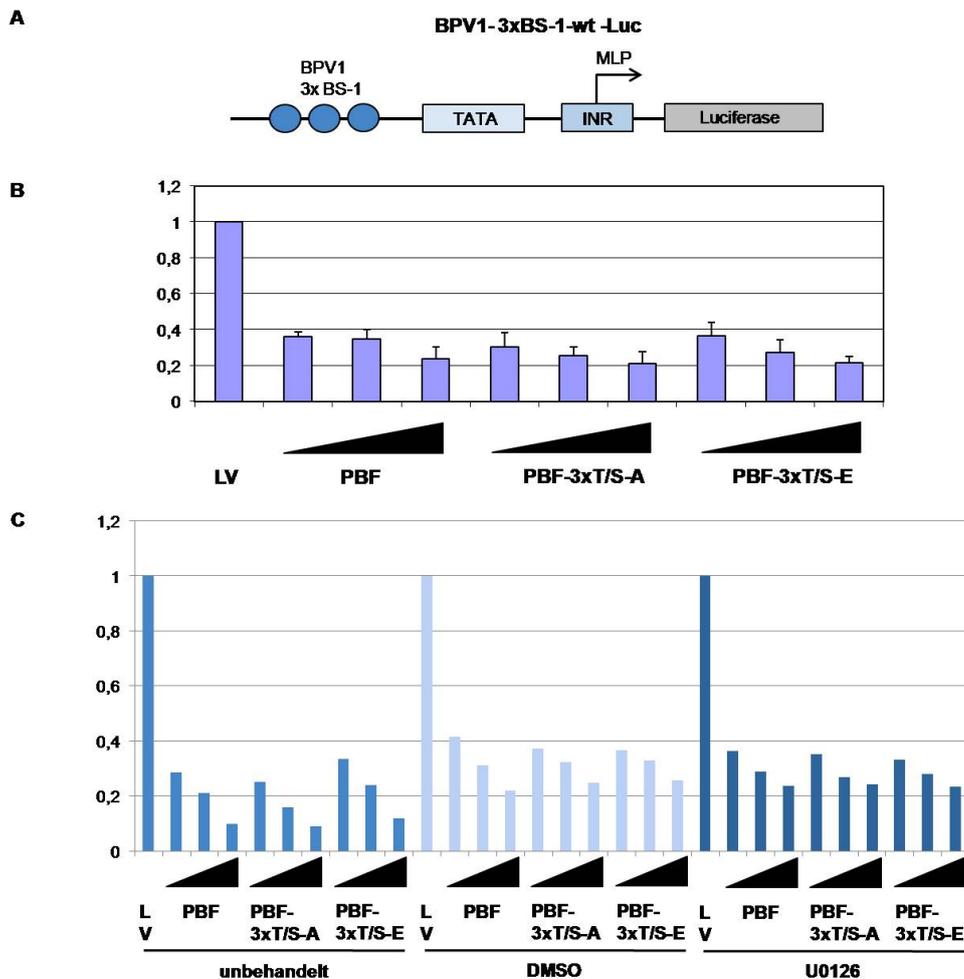


Abbildung 26: Hemmung der ERK1/2 Kinasen hat keinen Einfluss auf die PBF-vermittelte Repression.

Transiente Transfektionsanalyse. (A) Schematische Darstellung des Reporterkonstrukts BPV1-3xBS-1-wt-Luc. Angegeben sind die drei BS-1 von bovines Papillomavirus Typ (BPV)1 sowie der Promotor (MLP, *major late promoter*). (B) RTS3b Zellen wurden mit 500 ng des Reporterkonstrukts BPV1-3xBS-1-wt-Luc und 5, 10 bzw. 20 ng pcDNA-FLAG-PBF oder 5, 10 bzw. 20 ng pcDNA-FLAG-PBF-3xT/S-A oder 5, 10 bzw. 20 ng pcDNA-FLAG-PBF-3xT/S-E kotransfiziert. Die verschiedenen DNA-Mengen wurden mit entsprechendem Leervektor ausgeglichen. Die basale Luciferase-Aktivität wurde als 1 definiert. Die Balken repräsentieren die Mittelwerte aus vier unabhängigen Experimenten. Die Standardabweichungen sind angegeben. (C) RTS3b Zellen wurden mit 500 ng des Reporterkonstrukts BPV1-3xBS-1-wt-Luc und 5, 10 bzw. 20 ng pcDNA-FLAG-PBF oder 5, 10 bzw. 20 ng pcDNA-FLAG-PBF-3xT/S-A oder 5, 10 bzw. 20 ng pcDNA-FLAG-PBF-3xT/S-E kotransfiziert. Vor Ernte wurden die Zellen in serumfreiem Medium versetzt mit 15 μ M U0126, DMSO oder serumhaltiges Medium (unbehandelt) für 2 h inkubiert. Die verschiedenen DNA-Mengen wurden mit entsprechendem Leervektor ausgeglichen. Die basale Luciferase-Aktivität wurde als 1 definiert. Dargestellt ist ein repräsentatives Experiment.

4.16 Regulation der Proteinstabilität durch den SIN3-HDAC-Komplex

Die bisher präsentierten Daten indizieren, dass PBF von mehreren Kinasen phosphoryliert wird. Während die Rolle der Phosphorylierungen in PBF Δ 4 hier nicht definiert werden konnte, wurde gezeigt, dass die Phosphorylierung durch IKK die Stabilität von PBF reguliert. Frühere Beobachtungen weisen darauf hin, dass die Interaktion mit SAP30, einer Komponente des SIN3-HDAC-Komplexes, nicht nur für die Repression der Transkription durch PBF notwendig ist, sondern auch Auswirkungen auf dessen Proteinstabilität hat. So war die Proteinmenge von PBF nach Koexpression von SAP30 erhöht (Sichtig et al., 2007b). Eine Mutante mit Deletion der Aminosäuren 280-312 war stabiler im Vergleich zum Wildtyp Protein und mit Hilfe von GST Pulldown Experimenten konnte gezeigt werden, dass diese Aminosäuren die Interaktion mit SAP30 vermitteln (G. Steger, unveröffentlicht). Die Bindung an SAP30 könnte somit in PBF Aminosäuren maskieren, die normalerweise einer Ubiquitinierung unterliegen. Da sich in der SAP30-Binderegion von PBF zwischen den Aminosäuren 280 und 312 vier Lysine an den Positionen 281, 289, 298 und 302 befinden, wurden diese zunächst in Arginine, welche nicht mehr ubiquitiniert werden können, mutiert. Bei einer funktionellen Relevanz der vier Lysine, sollte die Vierfachmutante stabiler als das Wildtyp Protein sein. Ein Vergleich der Mengen an exogenem Protein zeigte allerdings, dass die Konzentration an PBF-4xK/R keineswegs erhöht ist im Vergleich zum wt-PBF (Abbildung 27B, Spur 2 und 4). Auch wurde die Menge beider Proteine durch Hemmung des Proteasoms gesteigert (Abbildung 27B, Spur 1 und 3). Daher ist eine potentielle Ubiquitinierung dieser Aminosäuren, die zum Abbau des Proteins führen würde, zu verneinen. In Übereinstimmung damit hatte auch die Deletion der ganzen SAP30 Binderegion von Aminosäure 280-312 keinen Effekt auf den Proteasom-vermittelten Abbau. So resultierte eine Inkubation von Zellen mit dem Proteasom-Inhibitor MG132 in einer weiteren Stabilisierung von PBF Δ 280-312. Wie bereits früher beobachtet, ist PBF Δ 280-312 (Spur 4) zwar stabiler als PBF (Abbildung 27C, Spur 2), die Hemmung des Proteasoms aber führte zu einer deutlichen Zunahme der Menge beider Proteine (Spur 1 und 3).

Dies zeigt, dass die Region von 280-312 zwar die Stabilität von PBF reduziert, da PBF Δ 280-312 in höheren Mengen vorliegt. Allerdings sind nicht die Lysine und deren Ubiquitinierung daran beteiligt. Deshalb ist es unwahrscheinlich, dass die Bindung von SAP30 an PBF zur Maskierung der Ubiquitinakzeptorstellen führt und dies der Mechanismus dieser Kontrolle der Stabilität ist.

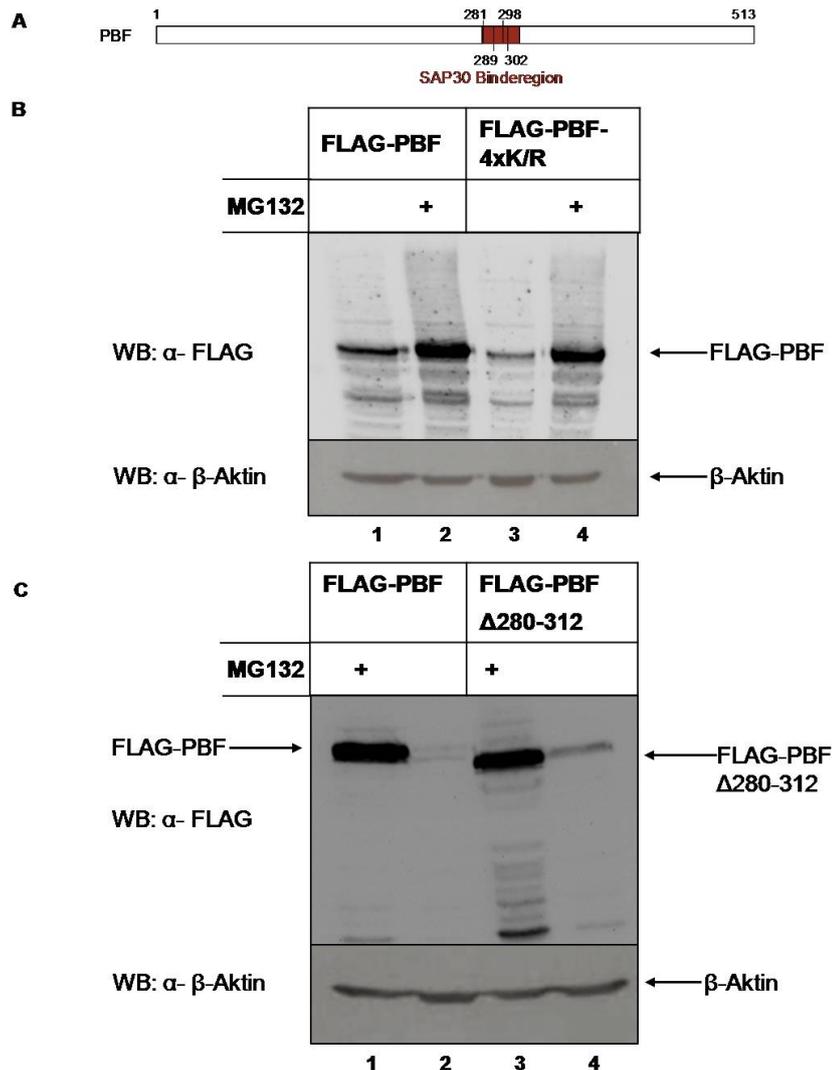


Abbildung 27: MG132 stabilisiert PBF-4xK/R und PBF Δ 280-312

(A) Schematische Darstellung von PBF. Eingezeichnet sind die SAP30-Binderegion und die Lysine, die sich darin befinden und in PBF-4xK/R mutiert sind. (B) Expressionsnachweis. C33A Zellen wurden mit den Expressionsvektoren für FLAG-PBF (Spur 1 und 2) bzw. FLAG-PBF-4xK/R (Spur 3 und 4) transient transfiziert. 32 h später wurden die Zellen mit 25 μ M MG132 (Spur 1 und 3) bzw. Ethanol (Spur 2 und 4) inkubiert und die Ganzzelextrakte (30 μ g) anschließend in einem 10%igen SDS-PAG aufgetrennt. (C) C33A Zellen wurden mit den Expressionsvektoren für FLAG-PBF (Spur 1 und 2) bzw. FLAG-PBF Δ 280-312 (Spur 3 und 4) transient transfiziert. 32 h später wurden die Zellen mit 25 μ M MG132 (Spur 1 und 3) bzw. Ethanol (Spur 2 und 4) inkubiert und die Ganzzelextrakte (30 μ g) anschließend in einem 10%igen SDS-PAG aufgetrennt. (B) und (C) Die rekombinanten Proteine wurden im Western Blot mit dem FLAG-Antikörper visualisiert. Als Kontrolle für eine gleichmäßige Auftragung wurde β -Aktin detektiert.

Um weitere Einsichten in den Mechanismus dieser Regulation zu erhalten, sollte die Interaktionsdefizienz der Deletionsmutante von PBF mit SAP30 in der Zelle überprüft werden. Dazu wurden C33A Zellen mit den Expressionsvektoren für FLAG-PBF bzw. FLAG-PBF Δ 280-312 und HA-SAP30 sowie mit entsprechenden Leervektoren allein und in Kombination transient transfiziert und die Extrakte über an Agarosekügelchen gebundene FLAG-Antikörper gereinigt. Gebundene Proteine wurden über ein 12%iges SDS-PAG aufgetrennt und in Western Blot Analysen mit Antikörpern, welche das HA- bzw. FLAG-Epitop erkennen, detektiert. Wie im oberen Western Blot erkennbar (Abbildung 28), war sowohl PBF (Spur 3) als auch PBF Δ 280-312 (Spur 5) in der Lage SAP30 zu präzipitieren. Extrakte aus Zellen, die mit den Expressionsvektoren für die Faktoren alleine (Spur 2, 4 und 6) bzw. den Leervektoren (Spur 1) transfiziert wurden, lieferten keine Signale. Die Expression von SAP30 ist im mittleren Blot, die der PBF Proteine im unteren Blot belegt. Obwohl die PBF-spezifischen Banden relativ schwach waren, wird deutlich, dass die Menge an PBF in Gegenwart von SAP30 erhöht war, und in ähnlichen Mengen wie PBF Δ 280-312 vorlag, das nicht durch SAP30 verändert wurde. Dieses Ergebnis steht im Widerspruch zu früheren GST Pulldown Experimenten, in denen in vitro translatiertes PBF Δ 280-312 nicht durch GST-SAP30 präzipitiert werden konnte.

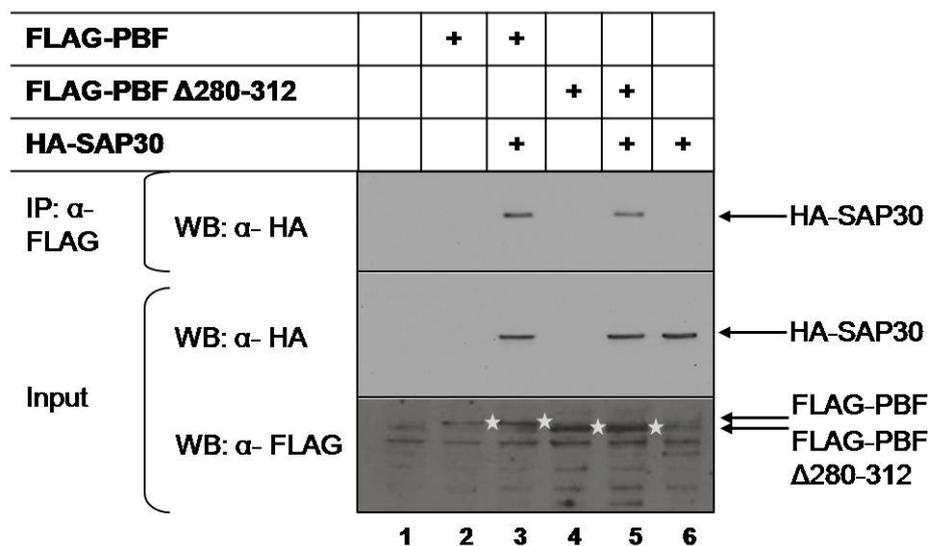


Abbildung 28: PBF Δ 280-312 präzipitiert SAP30

Koimmunpräzipitation. C33A Zellen wurden mit den Expressionsvektoren für FLAG-PBF bzw. FLAG-PBF Δ 280-312 und HA-SAP30 sowie mit entsprechenden Leervektoren allein und in Kombination transient transfiziert. 1 mg Extrakt wurden mit an Agarosekügelchen gebundenen FLAG-Antikörpern inkubiert. Unspezifisch gebundene Proteine wurden durch 3 Waschschriffe mit 0,2 M LSDB entfernt und die präzipitierten Proteine in einem 12%igen SDS-PAG aufgetrennt. Zusätzlich wurden 35 μ g Gesamtproteinextrakte aufgetrennt (Einsatz). Western Blot Analysen mit Antikörpern gerichtet gegen das HA- (oberes und mittleres Bild) bzw. FLAG-Epitop (unteres Bild) wurden durchgeführt um die rekombinanten Proteine zu detektieren. Die Position der rekombinanten PBF Proteine im Blot ist mit einem Sternchen markiert. IP: Immunpräzipitation.

Wie bereits erwähnt, ist SAP30 eine Komponente des SIN3-HDAC-Komplexes. HDAC1 bindet sowohl an SAP30 als auch an PBF (Sichtig et al, 2007b). Damit könnte endogenes HDAC1 im Fall von PBF Δ 280-312 als Brückenprotein fungieren und die oben beobachtete Interaktion vermitteln. Um diese Vermutung zu testen, wurde in einem GST Pulldown Experiment die Region in PBF näher bestimmt, die wichtig für die Interaktion mit HDAC1 ist. Hierfür wurden N- und/oder C-terminale Deletionsmutanten von PBF *in vitro* translatiert und mit aufgereinigtem GST bzw. GST-HDAC1 inkubiert (Abbildung 29).

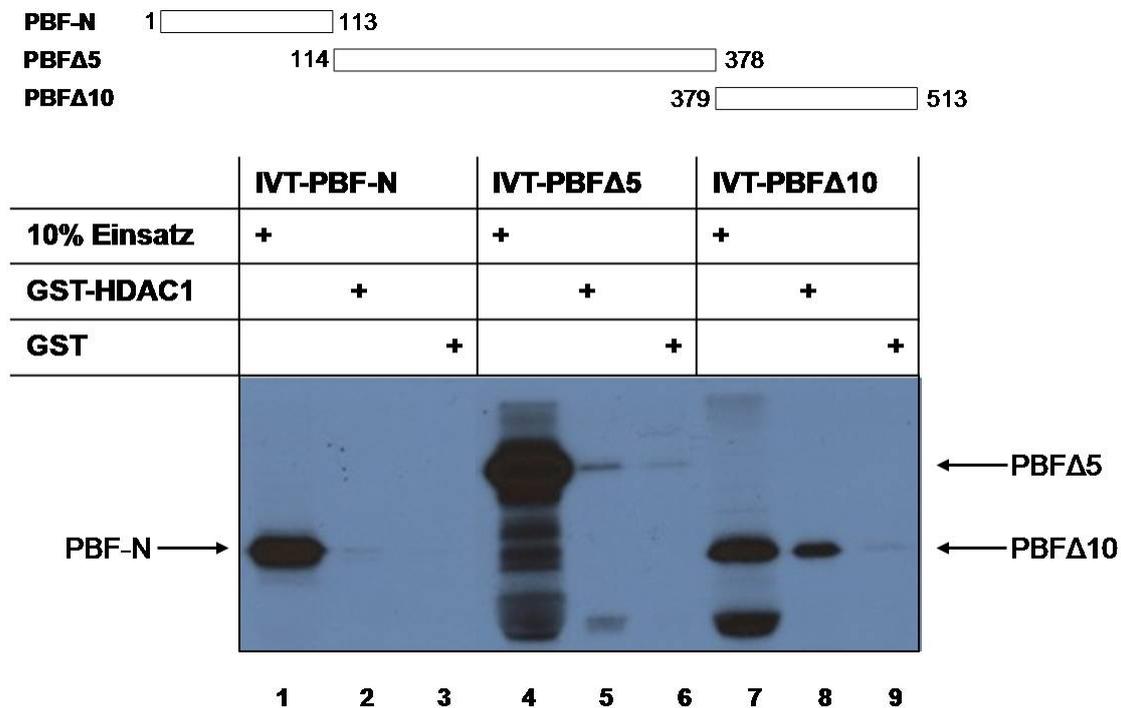


Abbildung 29: HDAC1 bindet hauptsächlich am C-Terminus von PBF

Oben: Schematische Darstellung der verwendeten PBF Mutanten. Unten: GST Pulldown Assay. GST-HDAC1 (Spur 2, 5 und 8) oder GST (Spur 3, 6 und 9) wurden über Glutathion-Sepharose gereinigt und mit 10 μ l *in vitro* translatiertem (IVT), ³⁵S-markiertem PBF-N (Spur 2 und 3), PBF Δ 5 (Spur 5 und 6) und PBF Δ 10 (Spur 8 und 9) inkubiert. Nach viermaligem Waschen mit 0,1 M LSDB Puffer wurden gebundene Proteine in einem 15%igen SDS-PAG aufgetrennt und mittels Autoradiographie visualisiert. Spuren 1, 4 und 7 zeigen 10% des eingesetzten *in vitro* Translationsproduktes.

Die Abbildung 29 zeigt, dass nur die Inkubation von HDAC1 mit PBF Δ 10 (Spur 8) ein deutliches Signal lieferte. Daraus resultiert, dass die Interaktion hauptsächlich im C-Terminus (AS 379-513) und damit außerhalb der AS 280-312 stattfindet. Um dies zu bestätigen, wurde die Bindung von HDAC1 an PBF Δ 280-312 in einer Koimmunpräzipitation überprüft. Dafür wurden C33A Zellen transient mit den Expressionsvektoren für FLAG-PBF bzw. FLAG-PBF Δ 280-312 und Myc-HDAC1 transfiziert. Im oberen Western Blot (Abbildung 30) ist erkennbar, dass PBF und

PBF Δ 280-312 HDAC1 präzipitiert hatten (Spur 3 und 5), während HDAC1 allein eine minimale Affinität zu der FLAG-AK gekoppelten Agarose-Matrix zeigte (Spur 6). Somit könnte die in Abbildung 28 erkennbare Präzipitation von SAP30 durch PBF Δ 280-312 eine indirekte Interaktion, als Resultat der Bindung dieser beiden Proteine an HDAC1, darstellen. Beide PBF Proteine wurden ganz deutlich durch die Koexpression von HDAC1 stabilisiert. In diesem Experiment war die Menge von PBF allein nicht nachweisbar (Spur 2), während PBF Δ 280-312 detektierbar war (Spur 4). Hier wird wieder deutlich, dass PBF Δ 280-312 stabiler ist.

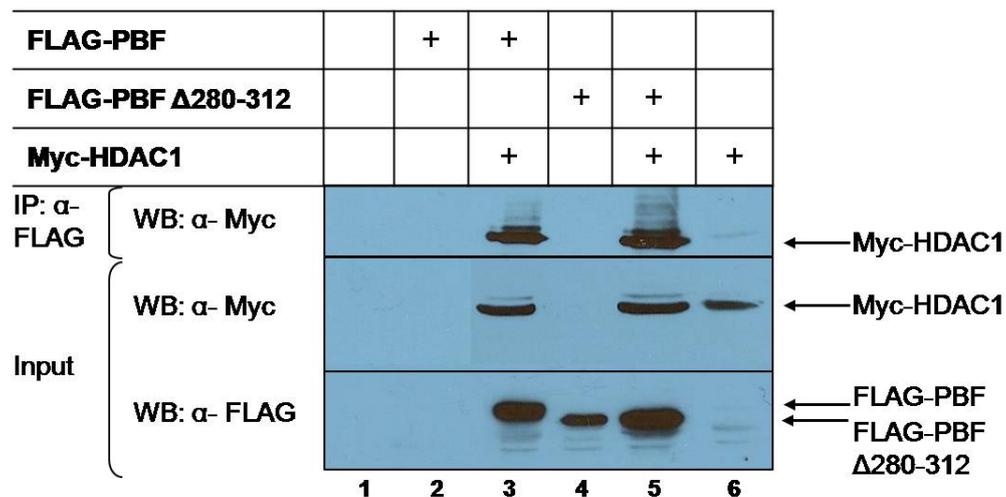


Abbildung 30: PBF Δ 280-312 präzipitiert HDAC1

Koimmunpräzipitation. C33A Zellen wurden transient mit den Expressionsvektoren für FLAG-PBF (Spur 2 und 3) bzw. FLAG-PBF Δ 280-312 (Spur 4 und 5) und Myc-HDAC1 (Spur 3, 5 und 6) sowie mit entsprechenden Leervektoren (Spur 1) allein und in Kombination transfiziert. 1 mg Extrakt wurden mit an Agarosekügelchen gebundenen FLAG-Antikörpern inkubiert. Nach 3 Waschstritten mit 0,2M LSDB wurden die gebundenen Proteine in einem 10%igen SDS-PAG aufgetrennt. Zusätzlich wurden 35 μ g Gesamtproteinextrakte aufgetrennt (Einsatz). Western Blot Analysen mit Antikörpern, die das Myc- (oberes und mittleres Bild) bzw. FLAG-Epitop (unteres Bild) detektieren, wurden durchgeführt um die Proteine zu visualisieren. IP: Immunpräzipitation.

Die gezeigten Ergebnisse indizieren, dass Regionen außerhalb des Bereichs von AS 280-312 wichtig für die HDAC1/SAP30-vermittelte Stabilität von PBF sind. Dieses Modell kann mit anderen Ergebnissen, die dieser Arbeit vorangegangen sind, in Einklang gebracht werden. Es wurde beobachtet, dass PBF Δ 8 (AS 189-312) durch die Koexpression von SAP30 deutlich stabilisiert wurde, während die Menge an PBF Δ 9 (AS 263-513) unbeeinflusst blieb, obwohl beide Proteine SAP30 binden können (Sichtig et al, 2007b). Lysin Acetylierung durch Acetyltransferasen und deren Deacetylierung durch HDAC ist eine posttranslationale Modifikation, involviert nicht

nur in der Modulation der Transkription, sondern auch in der Regulation der Stabilität von Proteinen (Sadoul et al, 2008; Yang und Seto, 2008). Diese Modifikation kann Proteine stabilisieren z.B. Smad7, p53, Runx3 und Myc (Simonsson et al, 2005; Kume et al, 2007; Ito et al, 2002; Jin et al, 2004; Vervoorts et al, 2006) oder destabilisieren z.B. E2F1, HIF-1 α , SV40 T-Antigen, pRB und Cyclin A (Galbiati et al, 2005; Jeong et al; 2002; Shimazu et al, 2006; Leduc et al, 2006; Mateo et al, 2010). Die Acetylierung kann eine Ubiquitinierung verhindern oder als Signal für eine Ubiquitinierung fungieren. Die beschriebenen Daten implizieren, dass im Fall von PBF, der HDAC1 Komplex, der über mehrere Motive an PBF gebunden wird, acetylierte Lysine deacetyliert, was eine Ubiquitinierung und anschließende Degradation verhindert. Aus diesem Modell folgt, dass hierbei unterschiedliche Lysine von Acetylierung und Ubiquitinierung betroffen sein müssen. Dementsprechend wurde untersucht, ob in Gegenwart von überexprimiertem SAP30, PBF weniger ubiquitiniert vorliegt. C33A Zellen wurden mit den Expressionsvektoren für FLAG-PBF und HA-SAP30 transient transfiziert und 16 h vor Ernte mit MG132 oder Ethanol inkubiert. Die Extrakte wurden mit FLAG-Antikörper gebundenen Agarosekügelchen aufgereinigt. Der obere Western Blot (Abbildung 31), entwickelt mit dem FLAG-Antikörper, zeigt 10% des Einsatzes für die Immunpräzipitation. Wie in den Spuren 1 und 3 erkennbar, führte die Koexpression von SAP30 zu einer Stabilisierung von PBF, die durch Zugabe von MG132 weiter erhöht wurde (Spur 4). Der untere Blot, der mit einem Antikörper gegen Ubiquitin entwickelt wurde, belegt, dass PBF in Gegenwart von SAP30 deutlich weniger ubiquitiniert war (vergleiche Spur 2 und 4), obwohl die Menge an PBF in beiden Ansätzen vergleichbar ist (oberer Blot, Spur 2 und 4). Die Stabilität von SAP30 scheint ebenfalls durch das Proteasom reguliert zu werden, wie die Inkubation mit MG132 indiziert.

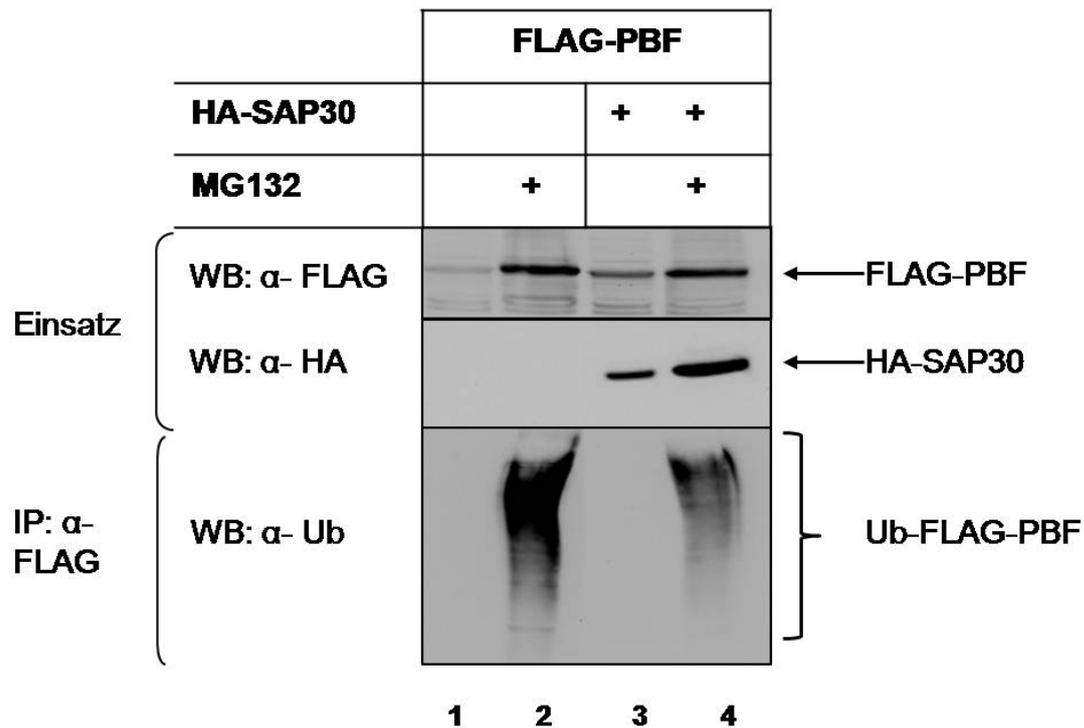


Abbildung 31: Verringerte Ubiquitinierung von PBF nach Koexpression von SAP30

Koimmunpräzipitation. C33A Zellen wurden mit den Expressionsvektoren für FLAG-PBF (Spur 1-4) und HA-SAP30 (Spur 3 und 4) transient transfiziert. 170 µg Ganzzellextrakt wurden mit an Agarosekügelchen gebundenen FLAG-Antikörpern inkubiert. Unspezifisch gebundene Proteine wurden durch 3 Waschschriffe mit 0,25 M LSDB entfernt und die präzipitierten Proteine in einem 12%igen SDS-PAG aufgetrennt. Zusätzlich wurden 30 µg Gesamtproteinextrakte aufgetrennt (Einsatz). Western Blot Analysen mit Antikörpern gerichtet gegen das HA- (mittlerer Blot) bzw. FLAG-Epitop (Einsatz: oberes Bild) oder gegen mono- und polyubiquitinierte Proteine (unterer Blot) wurden durchgeführt um die rekombinanten Proteine zu detektieren. IP:Immunpräzipitation.

5 Diskussion

In dieser Arbeit wurden Microarray Analysen durchgeführt, um zum ersten Mal potentielle zelluläre Zielgene von PBF zu bestimmen. Die hier identifizierten Gene sind einerseits Teil von Signalwegen bei der angeborenen Immunität und andererseits von Pathways, die an der Karzinomentstehung beteiligt sind. Sechs der PBF-induzierten Gene sind als Interferon-reguliert bekannt. Die Expression von ISG56, dem am stärksten durch PBF induzierten Gen, und seinem Familienmitglied ISG54 wird durch Interferon α und β , molekulare Pathogen-assoziierte Muster, sowie Infektion mit einer Vielzahl an RNA- oder DNA-Viren im Rahmen der angeborenen Immunantwort aktiviert (Der et al, 1998; Zhu et al, 1997; Nicholl et al, 2000; Dorn et al, 2005; Elco et al, 2005; Terenzi et al, 2005; Smith et al, 2005; Daffis et al, 2007; Janssen et al, 2007; Wachter et al, 2007; Fensterl und Sen, 2011). Die Proteine beeinflussen eine Vielzahl von zellulären und viralen Prozessen, unter anderem die Inhibition der Translationsinitiation, der Zellproliferation und -migration, sowie der viralen Replikation (Guo et al, 2000; Hui et al, 2003; Terenzi et al, 2006; Terenzi et al, 2008; Lai et al, 2008). Ihre Aktivität trägt zur antiviralen Antwort der Zelle bei. Für zwei weitere IFN-sensitive Zielgene von PBF, IFI44 und IFI16, wurden ebenfalls antiproliferative Aktivitäten berichtet. Überexpression von IFI44 induzierte einen antiproliferativen Zustand selbst in Zellen, die nicht auf IFN α ansprechen (Hallen et al, 2007). Die erhöhte Expression von IFI16 dagegen war assoziiert mit Seneszenz-induziertem Wachstumsarrest (Xin et al, 2003; Xin et al, 2004). Frühere Versuche zeigten, dass überexprimiertes PBF das Wachstum der Zellen inhibiert (Sichtig et al, 2007a). Mutationen der DNA-Bindedomäne von PBF hoben diesen Effekt vollständig auf. Daraus resultiert, dass die DNA-Bindung und damit wahrscheinlich auch die Funktion als Transkriptionsfaktor für die wachstumsinhibierende Aktivität von PBF notwendig ist. Möglicherweise beruht dieser PBF-vermittelte Effekt auf der Aktivierung von ISG56 und IFI44, den zwei Genen mit der höchsten Induktion im Microarray nach Überexpression von PBF. Dies könnte durch siRNA-induziertes Ausschalten von ISG56 und IFI44 untersucht werden. Die PBF-vermittelten Effekte auf das Wachstum sollten dann reduziert oder eliminiert sein.

Genom-weite Expressionsstudien unterstützen die Annahme, dass PBF an der antiviralen Immunantwort beteiligt ist. So war die Menge an PBF mRNA reduziert in CD8⁺ T-Zellen von virämischen HIV-Patienten verglichen mit CD8⁺ T-Zellen von

uninfizierten Personen oder HIV-infizierten, Therapie-naiven Langzeitüberlebenden, den sogenannten *long-term non-progressors* (Hyczka et al, 2007; Wu et al, 2008). Dies könnte bedeuten, dass PBF Expression niedrig sein muss, um eine effiziente HIV Replikation zu ermöglichen. PBF könnte auch eine antivirale Aktivität spezifisch gegen humane Papillomviren haben. ISG56 bindet direkt das E1-Protein verschiedener HPV-Typen (Terenzi et al, 2008). Bei dem E1-Protein handelt es sich um einen hochkonservierten Replikationsinitiator mit ATPase und Helikase-Aktivität, der essentiell für die Vermehrung des viralen Genoms ist (Hughes und Romanos, 1993; Seo et al, 1993; Yang et al, 1993; Chow und Broker, 1994). Die Interaktion von ISG56 mit E1 inhibiert die Helikase-Aktivität und verhindert die Replikation der viralen DNA (Terenzi et al, 2008). PBF könnte also einerseits direkt über seine transkriptionelle Repression die HPV Genexpression inhibieren (Sichtig et al, 2007b) und andererseits indirekt über die Induktion von ISG56 die HPV-Replikation verhindern.

Im Rahmen einer diese Doktorarbeit begleitenden Diplomarbeit konnte mit Hilfe von transienten Transfektionsanalysen die Aktivierung des ISG56 Promotors durch PBF gezeigt werden, welche hier bestätigt wurde (Pawlowski, 2011). PBF aktivierte den ISG56 Promotor ca. 4-fach, was mit den Ergebnissen des Microarrays übereinstimmt. Dafür brauchte PBF die beiden sogenannten CRARF-Domänen, welche zu Regionen in „E“-Varianten von T-Zell-Faktoren hochkonserviert sind. Im Fall der T-Zell-Faktoren sind diese Segmente notwendig für die DNA-Bindung und die Aktivierung von LEF-1 und Cdx Promotoren durch β -Catenin und CBP/p300 Komplexe (Atcha et al, 2003; Hecht et al, 2003; Atcha et al, 2007). Die Mutation einer der beiden CRARF-Sequenzen war bereits ausreichend, um die DNA-Bindung von PBF in einem Gelretardierungsexperiment an das CG reiche PBF-Bindeelement von HPV8 zu unterbinden (Sichtig et al, 2007b). Obwohl eine Beteiligung dieser Region an Interaktionen mit zellulären Faktoren im Fall von PBF nicht ausgeschlossen werden kann, ist es somit wahrscheinlich, dass die DNA-Bindung notwendig ist für die PBF-vermittelte Aktivierung. PBF scheint also den ISG56 Promotor als ein klassischer Transkriptionsfaktor zu aktivieren. Im Rahmen der früheren Diplomarbeit wurde gezeigt, dass PBF die ISREs dafür braucht. Eine Deletion beider ISREs des ISG56 Promotors, die für die Aktivierung durch IRF3 und ISGF3 notwendig sind, sowie Punktmutationen in beiden ISREs erniedrigten die basale Aktivität des Promotors und hoben die PBF-vermittelte Aktivierung auf, was zeigt, dass PBF über

eines oder beide Elemente agiert (Pawlowski, 2011). Die Tatsache, dass sechs Zielgene von PBF, welche in den Microarray Analysen identifiziert wurden, Interferon-stimulierte Gene sind und ISREs in ihren Promotorsequenzen haben, unterstreicht weiter die Rolle der ISREs in der PBF-vermittelten Aktivierung der Genexpression. Diese Ergebnisse sind allerdings konträr zu früheren Berichten, die CG reiche Sequenzen als Bindemotive für PBF und sein Familienmitglied GEF identifizierten. PBF band CCGG in der regulatorischen Region von HPV8 (Boeckle et al, 2002), sowie ein GCCGGCG Motiv in dem Huntingtin Promotor (Tanaka et al, 2004), während GEF die Nukleotide ACCGG im Enhancer des humanen GLUT4-Gens brauchte (Knight et al, 2003). Die Beteiligung eines CG-Motivs wird durch Genomweite Studien unterstützt, die eine stark erniedrigte Affinität von PBF zu DNA nach deren CpG-Methylierung offenbarten (Bartke et al, 2010). Die hier vorgestellten Daten indizieren, dass PBF für die Aktivierung des ISG56 Promotors nicht auf CG reiche Sequenzen angewiesen ist. So zeigte sich kein Unterschied bei der PBF-vermittelten Stimulation eines ISG56 Promotors, der entweder zwei ISRE I oder zwei ISRE II Sequenzen enthält, obwohl nur die ISRE I ein CGG Element beinhaltet. Der Grad der Aktivierung erreichte aber nur die Hälfte der Aktivierung im Vergleich zu dem Wildtyp Konstrukt. PBF braucht also eine spezifische Sequenzzusammensetzung, um optimal die ISG56 Genexpression und wahrscheinlich auch die anderen ISRE enthaltenden Gene zu aktivieren. Unterstützt wird diese Annahme durch die Beobachtung, dass PBF nicht in der Lage war, ein synthetisches Reporterkonstrukt, welches vier Kopien des ISRE II aus dem ISG56-Promotor beinhaltet, zu stimulieren. Sequenzbereiche, die sich außerhalb der ISREs befinden, beeinflussen die PBF-vermittelte Aktivierung. Aufgrund dieser Sequenz-Spezifität aktiviert PBF wahrscheinlich nur wenige IFN-sensitive Gene, was sich in den Ergebnissen des Microarrays widerspiegelt. Weitere detaillierte Analysen sind notwendig, um die DNA-Bindesequenz von PBF zu definieren. Es kann auch nicht ausgeschlossen werden, dass PBF durch Interaktion mit Kofaktoren an die ISREs rekrutiert wird. Frühere Versuche charakterisierten PBF als einen transkriptionellen Repressor (Sichtig et al, 2007b). Die Ergebnisse dieser Arbeit zeigen, dass PBF als transkriptioneller Repressor aber auch als Aktivator fungieren kann. Überexprimiertes PBF reprimierte den HPV8 Promotor, aktivierte aber den ISG56 Promotor. Da die entsprechenden Experimente parallel in den gleichen Zellen mit den gleichen Expressionsvektoren durchgeführt wurden, waren die zellulären Bedingungen, wie

die Expression von Kofaktoren oder die posttranslationale Modifikationen des Proteins, identisch. Die unterschiedlichen transkriptionellen Effekte von PBF müssen also durch die Sequenzzusammensetzung innerhalb bzw. auch außerhalb des PBF-Bindemotivs bestimmt sein.

Inkubation von Zellen mit Poly I:C und TNF- α resultierte in Degradation von überexprimiertem PBF. BMS-345541, ein spezifischer Inhibitor für IKK α und IKK β , konnte diesen Poly I:C- und TNF- α -vermittelten Abbau verhindern, was ein klarer Hinweis für die Beteiligung aktiver IKK an der Degradation von PBF ist. Die Stabilisierung von endogenem PBF Protein durch BMS-345541 in verschiedenen Zelllinien unterstreicht die Rolle von aktiver IKK bei der Regulation der Proteinmenge von PBF. Das stabilisierte Protein war nicht nachweisbar phosphoryliert, wie die Behandlung der Extrakte mit λ -Phosphatase verdeutlichte. Leider konnte in dieser Arbeit endogenes PBF in Abwesenheit von BMS-345541 nicht detektiert werden, aber Versuche mit rekombinantem Protein zeigten, dass PBF normalerweise phosphoryliert in der Zelle vorliegt. Diese Ergebnisse implizieren, dass IKK den Phosphorylierungsstatus von PBF kontrolliert, möglicherweise durch direkte Phosphorylierung. Dies kann in einem *in vitro* Kinase Assay mit gereinigten IKK α bzw. β Enzymen, GST-fusioniertem PBF und radioaktiv markiertem ATP bestätigt werden. Mindestens zwei Regionen in PBF sind an der IKK-vermittelten Degradation beteiligt, wovon eine sich in PBF Δ 10 (AS 379-513) befindet. Die Verwendung von Deletionsmutanten konnte eine weitere Region auf die Aminosäuren 189-222 eingrenzen. Dieser Bereich beinhaltet an Position 211-216 die Sequenz DSGSST, welche dem Konsensusmotiv „DpSG Ψ XpS/T“ (p=phospho, Ψ =hydrophober Rest, X=beliebiger Rest), das in einigen IKK-Substraten enthalten ist (Chariot, 2009), entspricht. Duale Phosphorylierung dieses Motivs dient ebenfalls meist als Erkennungssequenz für SCF $^{\beta}$ -TRCP, einen E3-Ligase Komplex (Cardozo und Pagano, 2004; Ang und Wade Harper, 2005; Petroski und Deshaies, 2005). Mutation der Aminosäuren S212/T216 sowie S214/215 in Alanin (im Kontext von PBF Δ 3), hatten eine jeweils moderate Auswirkung auf die Stabilität des Proteins (Daten nicht gezeigt). Wurden aber alle 4 Aminosäuren gleichzeitig mutiert, war das Protein stabiler als Wildtyp PBF, und die Effekte von TNF- α und BMS-345541 waren weitestgehend aufgehoben. Das Ergebnis impliziert, dass diese Aminosäuren an der Regulation der Stabilität des Proteins beteiligt sind und möglicherweise durch IKK phosphoryliert werden. Allerdings ist es wahrscheinlich, dass eine weitere Kinase in

der Regulation involviert ist. Die Aminosäuren ESGDISDSGSSTTSGHWS (Position 206-222) entsprechen der Konsensussequenz „D/ESGxxS/TxxxS/TxxxS/T“ bestehend aus dem β -TRCP Motiv, gefolgt von einem Tandem GSK (Glykogen Synthase Kinase) 3 Phosphorylierungsmotiv (Xu et al, 2009). Eine Computerbasierte systematische Analyse zur Identifizierung von potentiellen GSK3 Substraten fand PBF mit dieser Sequenz (Xu et al, 2009). Ursprünglich als Regulator des Glykogen-Metabolismus entdeckt, hat GSK3 auch wichtige Funktionen in verschiedenen zellulären Prozessen, wie Zellzykluskontrolle, Zelldifferenzierung, -proliferation, -motilität und Apoptose (Embi et al, 1980; Kockeritz et al, 2006). Sie ist an der Regulation der angeborenen und adaptiven Immunantwort beteiligt und spielt eine Rolle bei der Tumorgenese verschiedener Karzinomtypen (Luo, 2009; Beurel et al, 2010; Wang et al, 2011). Die Aktivität von GSK3 wird durch den PI3K/AKT bzw. den Wnt Signalweg negativ reguliert (Cross et al, 1995; Nusse, 2005). Das C-terminale Serin oder Threonin in dem GSK3-Konsensusmotiv S/TxxxS/T wird häufig von einer anderen Kinase phosphoryliert und dient als „Signal“ für die Phosphorylierung des N-terminalen S/T durch GSK3 (Xu et al, 2009). Im Fall von β -Catenin und Snail führt die Phosphorylierung durch GSK3 zur Ubiquitinierung und zum proteasomalen Abbau der Proteine (Hinck et al, 1994; Papkoff et al, 1996; Aberle et al, 1997; Kodama et al, 1999; Latres et al, 1999; Zhou et al, 2004; Yook et al, 2005; Yook et al, 2006; Doble et al, 2007). Weitere Versuche sind notwendig um die Beteiligung von GSK3 und die mögliche Wechselwirkung mit IKK bei der Regulation der Stabilität von PBF aufzudecken.

Während die Repression des HPV8 Promotors durch BMS-345541 kaum beeinflusst war, hatte die Inkubation mit BMS-345541 eine starke Reduktion der PBF-vermittelten Aktivierung zur Folge, obwohl die Menge an PBF unter diesen Bedingungen erhöht ist, was indiziert, dass die IKK-vermittelte Phosphorylierung nicht nur die Proteasom-abhängige Degradation von PBF induziert, sondern gleichzeitig für die transkriptionelle Aktivierung von PBF notwendig ist. Folglich wäre die Aktivierung des Proteins zugleich das Signal für dessen Degradation. Ein Auslösen der angeborenen Immunantwort würde somit PBF aktivieren, welches durch Induktion seiner Zielgene zur Etablierung der Immunreaktion beitragen würde. Zugleich wäre das Protein für den proteasomalen Abbau markiert. Es könnte sich

dabei um einen negativen Feedback-Mechanismus handeln, um sicherzustellen, dass die Aktivierung der Zielgene durch PBF gering und nur vorübergehend ist.

Die Beobachtung, dass endogenes PBF in verschiedenen Krebszelllinien in Gegenwart von BMS-345541 stabilisiert wird, impliziert zudem, dass PBF in diesen Zellen exprimiert wird, transkriptionell aktiv ist und auch seine Zielgene aktiviert. PBF wird aber kontinuierlich abgebaut, weshalb es in den Zellen nicht nachweisbar ist. Das Einbringen des zusätzlichen exogenen Proteins in diese Zellen könnte die Expression der Zielgene dann nur noch geringfügig steigern. Dies könnte die im Microarray detektierten relativ geringen, aber signifikanten Unterschiede der mRNA-Mengen der zellulären Zielgene in Folge der PBF-Expression erklären. Die höchste Aktivierung betrug 2,9-fach (für ISG56 und IFI44). Die Aktivierungen, die durch qRT-PCR gemessen wurden, waren zwar leicht höher, aber in einem ähnlichen Bereich (höchste durchschnittliche Induktion ca. 5-fach für ISG56), womit Ungenauigkeiten in der Quantifizierung, welche bei Microarray-Analysen möglich sind, als Ursache für die niedrigen Induktionen ausgeschlossen werden können. Eine ähnlich niedrige Aktivierung des ISG56-Promotors in transienten Transfektionsanalysen durch IRF3-5D und IFN α (Daten nicht gezeigt) unterstützt die Vermutung, dass die Expression von ISG56 in RTS3b-Zellen, einer Karzinomzelllinie, in der IKK aktiv ist, schon unter normalen Bedingungen stattfindet.

Darüber hinaus waren ISG56 und IFI44 sogar stärker oder gleich induziert wie das PBF-Transkript selbst (2,5-fach im Microarray (Daten nicht gezeigt) und gleich in der qRT-PCR), obwohl die Proteinmenge von PBF unter identischen Bedingungen um mehr als das 20-fache gesteigert war, wie eine Quantifizierung der PBF-spezifischen Bande im Western Blot ergab (Daten nicht gezeigt). Dies lässt auch auf eine posttranslationale Regulation des Proteins zusätzlich zu seiner Expression schließen. Möglicherweise ist nur eine geringe Menge dieses detektierbaren rekombinanten Proteins phosphoryliert und somit transkriptionell aktiv. Die unphysiologische Überexpression in den Zellen könnte das IKK-Ubiquitin-System überlasten.

Die Ergebnisse charakterisieren PBF als Teil der IKK-kontrollierten Signalwege und unterstützen eine Rolle von PBF bei der angeborenen Immunität, die schon durch die Identifizierung der IFN-regulierten Zielgene impliziert wurde. Eine konstitutive Aktivierung des IKK-Signalweges, wie sie oft in Karzinomen zu beobachten ist,

induziert somit auch die Aktivierung von PBF und könnte zur verstärkten Expression PBF-responsiver Gene, die mit Krebs assoziiert sind, führen. Die Beteiligung der PBF-Zielgene an Signalwegen, die in Tumoren aktiv sind, verstärkt diese Annahme. MEF2C ist ein Mitglied der Familie von MADS-Box Transkriptionsfaktoren und ein Regulator der lymphoiden Entwicklung (Stehling-Sun et al, 2009). Desweiteren ist MEF2C an der Regulation der Proliferation von B-Lymphozyten beteiligt (Wilker et al, 2008) und es konnte gezeigt werden, dass es in bestimmten akuten lymphoblastischen T-Zell Leukämie (T-ALL) Zelllinien dereguliert ist (Nagel et al, 2008; Nagel et al, 2011). Kürzlich wurde es sogar als potentielles Onkogen in T-ALL propagiert (Homminga et al, 2011). In Kooperation mit β -Catenin kann CALCOCO1 als transkriptioneller Aktivator von Androgen Rezeptor und TCF/LEF agieren (Yang et al, 2006). Überexpression oder reinduzierte Expression von PEG10, einem „geprägten“ Gen, wurde in verschiedenen malignen Erkrankungen, wie hepatozellulärem Karzinom, Pankreaskarzinom, Wilmstumor und akuter bzw. chronischer lymphozytärer B-Zell Leukämie festgestellt (Tsou et al, 2003; Okabe et al, 2003; Ip et al, 2007; Dekel et al, 2006; Hu et al, 2004; Kainz et al, 2007; Dong et al, 2011). PEG10 wurde außerdem als Biomarker in Adenokarzinomen der Gallenblase beschrieben (Liu et al, 2011). MACC1 ist ein Hauptregulator des HGF-MET Signalwegs und mit primärem und metastasiertem Kolonkarzinom assoziiert (Stein et al, 2009). Kürzlich wurde MACC1 als prognostischer Marker für hepatozelluläres Karzinom (Qiu et al, 2011) und für ein postoperatives Rezidiv von Lungenadenokarzinomen (Chundong et al, 2011) beschrieben. Weitere Untersuchungen sind notwendig, um die funktionelle Rolle von PBF bei der Kontrolle der Genexpression dieser Faktoren zu bestimmen und somit seine Bedeutung als Zielprotein von IKK bei dessen protumorigenen Aktivität zu ermitteln.

Daten im Vorfeld dieser Arbeit belegten eine Rolle von Wachstumsfaktoren bei der Kontrolle der subzellulären Lokalisation von PBF und somit seiner Funktion als Transkriptionsfaktor. Wachstumsfaktoren führen auch zur Aktivierung des MAP-ERK-Weges. Da PBF Δ 4 laut einer *in silico* Analyse drei potentielle Phosphorylierungsstellen für ERK1/2 hat, sollte eine mögliche Rolle von ERK in dieser Arbeit untersucht werden. In der Tat konnte gezeigt werden, dass PBF Δ 4 an einem oder mehreren Serin-Prolin oder Threonin-Prolin Motiven phosphoryliert war, was ein typisches Merkmal der Phosphoakzeptorstellen von MAP Kinasen ist, denn

die Mutation der potentiellen Phosphorylierungsstellen modifizierte das Laufverhalten des Proteins. Allerdings wurde hier gezeigt, dass ERK1/2 oder auch ERK5 PBF Δ 4 nicht phosphorylieren. Es bleibt zu prüfen, ob PBF ein Substrat anderer Mitglieder der MAPK Familie ist, deren Kinase Aktivität nicht durch U0126 gehemmt wird, wie z.B. p38 α , eine Kinase involviert u.a. in der Immunantwort (Zarubin und Han, 2005). Auswirkungen dieser Phosphorylierung auf die transkriptionelle Aktivität bzw. auf die Proteinstabilität von PBF konnten hier nicht gefunden werden. Schließlich kann nicht ausgeschlossen werden, dass diese posttranslationale Modifikation Funktionen von PBF oder Interaktionen mit zellulären Faktoren reguliert, die bisher unbekannt sind. Subtile Effekte dieser Mutationen auf die subzelluläre Lokalisation von PBF konnten hier nicht ermittelt werden, da die Überexpression des rekombinanten Proteins die transfizierten Zellen stark schädigte und kleinere Veränderungen nicht sichtbar wurden (Daten nicht gezeigt).

Diese Arbeit brachte neue Hinweise, dass die Stabilität von PBF neben Phosphorylierung auch durch Acetylierung und Deacetylierung kontrolliert sein könnte. Aus Vorarbeiten war bekannt, dass die Bindung von SAP30 an PBF dessen Stabilität erhöht. Allerdings waren die Vorbefunde widersprüchlich. Zum einen führte die Koexpression von SAP30 mit PBF Δ 8 (AS 189-312) zu einer drastischen Zunahme der PBF-Menge, während die Menge an PBF Δ 9 (AS 263-513) unbeeinflusst blieb (Sichtig et al, 2007b), obwohl beide Proteine SAP30 binden können (Sichtig et al, 2007b). Andererseits resultierte die Koexpression von SAP30, oder die Deletion der Aminosäuren 280-312 von PBF, involviert in der Bindung an SAP30, ebenfalls in einer Stabilisierung von PBF (Sichtig et al, 2007b). Im letzten Fall könnte somit die Interaktion mit SAP30 Aminosäuren in PBF maskieren, die normalerweise einer Ubiquitinierung unterliegen, was aber durch die hier präsentierten Daten unwahrscheinlich erscheint. Die Mutationen aller vier in diesem Bereich liegenden Lysin-Reste in Arginine hatten keine Stabilisierung des Proteins im Vergleich zum wt-PBF zur Folge. Allerdings wurde eine Ubiquitinierung von Cystein-, Serin- oder Threonin-Resten berichtet (Cadwell und Coscoy, 2005; Tait et al, 2007; Wang et al, 2007; Williams et al, 2007; Ishikura et al, 2010; Shimizu et al, 2010), so dass nicht ganz ausgeschlossen werden kann, dass über die Ubiquitinierung solcher Aminosäuren, die sich in dem Segment von Aminosäure 280-312 befinden, die PBF-Menge kontrolliert wird. Die Bindung von SAP30 an diese Region würde dann diese Aminosäuren maskieren und deren Ubiquitinierung verhindern. Möglicherweise ist

auch die erhöhte Menge an PBF Δ 280-312 durch die Zerstörung des Zinkfingers (AS 282-305) bedingt, die eine Veränderung der Konformation des Proteins zur Folge haben könnte.

PBF interagiert mit dem SIN3/HDAC-Komplex über mindestens zwei Motive. So band PBF nicht nur SAP30 über die AS 280-312, sondern auch HDAC1 über seinen C-Terminus (379-513). SAP30 und HDAC1 binden ebenfalls aneinander (Zhang et al, 1998; Sichtig, 2006). Überexpression von HDAC1 resultierte in Stabilisierung von PBF und PBF Δ 280-312, was zusätzlich unterstreicht, dass Regionen außerhalb des Bereichs von AS 280-312 wichtig für die SIN3/HDAC1-vermittelte Stabilität sind. PBF Δ 8 (AS 189-312), welches durch SAP30 stabilisiert wird, kann somit den SIN3/HDAC1 Komplex über SAP30 rekrutieren, während PBF Δ 9 (AS 263-513), dessen Menge durch SAP30 nicht beeinflusst wurde, dies über SAP30 und HDAC1 tun kann (Abbildung 32). Folglich sind die Aminosäuren 189-262 für die Effekte des SIN3/HDAC1-Komplexes, die zur Erhöhung der Stabilität von PBF führen, verantwortlich. Diese Erhöhung der Stabilität resultiert aus der verminderten Ubiquitinierung von PBF, wie Versuche mit koexprimiertem SAP30 offenbarten. Dies impliziert, dass PBF nach verstärkter Bindung des SIN3/HDAC1-Komplexes über dessen Deacetylase Aktivität an Lysinen in den Aminosäuren 189-262 deacetyliert wird und dies seine Ubiquitinierung verhindert. Dementsprechend wäre PBF ohne die Aktivität des SIN3/HDAC1-Komplexes an bestimmten Lysinen acetyliert und an anderen ubiquitiniert. Aufgrund dieses Modells sollte PBF in Gegenwart von HDAC1 Inhibitoren verstärkt abgebaut werden.



Abbildung 32: Schematische Darstellung der PBF-Deletionsmutanten

Eingezeichnet ist die Binderegion von SAP30 bzw. HDAC-1. Eine Stabilisierung nach Koexpression von SAP30 ist mit einem Plus gekennzeichnet. Die Zahlen beziehen sich auf die Position der Aminosäure im Wildtyp PBF.

Die hier diskutierte SAP30/HDAC1-vermittelte Regulation der Stabilität durch Acetylierung/Deacetylierung erinnert an die beschriebene für Cyclin A. PCAF acetyliert Cyclin A an vier Lysinen während der Mitose, was zur Ubiquitinierung anderer Lysine durch APC/C (*anaphase-promoting complex/cyclosome*) und zur Degradation des Proteins durch das Proteasom führt. Diese Acetylierung hat somit eine entscheidende Bedeutung für die biologische Funktion von Cyclin A (Mateo et al, 2010). Im Fall von PBF bleibt weiterhin zu untersuchen, ob die Kontrolle der Stabilität von PBF durch IKK im Rahmen einer Aktivierung der angeborenen Immunantwort oder bei der Karzinogenese und der durch HDAC miteinander in Wechselwirkung stehen und sich ergänzen oder komplett unabhängige Funktionen sind. HDAC Aktivität spielt eine wichtige Rolle bei der angeborenen Immunantwort. Sie ist notwendig für TLR- und IFN-Signalwege und ist auch essentiell bei der adaptiven Immunität (Shakespeare et al, 2011). Somit sind wohl beide Aktivitäten, IKK und HDAC in Rahmen einer angeborenen Immunantwort aktiv und können die Menge und Funktion von PBF posttranslational kontrollieren. Inhibitoren von HDAC sind eine neue Klasse von Anti-Krebs-Medikamenten, die selektiv Tumor-Cytotoxizität besitzen (Leggatt and Gabrielli, 2011). Diese Inhibitoren würden somit auch durch IKK-aktiviertes PBF in den Krebszellen modulieren und verstärkt abbauen. Allerdings bleibt zu untersuchen, ob und wie die potentielle Acetylierung von PBF die Funktion als Aktivator bzw. Repressor beeinflusst oder ob es nur auf Ebene der Regulation der Proteinmenge agiert.

Die in dieser Arbeit gezeigten Daten charakterisieren PBF als Transkriptionsfaktor, der bei der angeborenen Immunität eine Rolle spielt und über Aktivierung einiger spezifischer IFN-regulierter Gene zur Etablierung einer antiviralen zellulären Antwort beitragen könnte. Zum anderen könnte PBF über Aktivierung von Krebs-assoziierten Zielgenen auch protumorigen wirken. Die Signifikanz dieser Daten wird durch den wiederholten Nachweis einer Deregulation der PBF Expression in Geweben bzw. Zellen aus den assoziierten Krankheitsbildern durch Genom-weite Analysen untermauert. In Korrelation konnte hier gezeigt werden, dass Aktivität bzw. Menge von PBF posttranslational multipel kontrolliert wird, und zwar durch den IKK Signalweg und HDAC, die beide mit Immunzellen und Krebs assoziiert sind. Ein gezieltes Ausschalten von PBF in Immunzellen und anderen Geweben im Rahmen einer Knock-out Maus ist notwendig, um eine Beteiligung von PBF bei der Immunantwort und Krebs in vivo zu beweisen.

6 Literaturverzeichnis

Aberle, H., Bauer, A., Stappert, J., Kispert, A. and Kemler, R. (1997) beta-catenin is a target for the ubiquitin-proteasome pathway. *EMBO J*, **16**, 3797-3804.

Akira, S., Uematsu, S. and Takeuchi, O. (2006) Pathogen recognition and innate immunity. *Cell*, **124**, 783–801.

Ang, X.L. and Wade Harper, J. (2005) SCF-mediated protein degradation and cell cycle control. *Oncogene*, **24**, 2860-2870.

Atcha, F.A., Munguia, J.E., Li, T.W., Hovanes, K. and Waterman, M.L. (2003) A new beta-catenin-dependent activation domain in T cell factor. *J Biol Chem*, **278**, 16169-16175.

Atcha, F.A., Syed, A., Wu, B., Hoverter, N.P., Yokoyama, N.N., Ting, J.H., Munguia, J.E., Mangalam, H.J., Marsh, J.L. and Waterman, M.L. (2007) A unique DNA binding domain converts T-cell factors into strong Wnt effectors. *Mol Cell Biol*, **27**, 8352-8363.

Auersperg, N. (1969). Histogenetic behaviour of tumors. I. Morphologic variation *in vitro* and *in vivo* of two related human carcinoma cell lines. *J Natl Cancer Inst* (Bethesda), **43**, 151-173.

Aung, H.T., Schroder, K., Himes, S.R., Brion, K., van Zuylen, W., Trieu, A., Suzuki, H., Hayashizaki, Y., Hume, D.A., Sweet, M.J. and Ravasi, T. (2006) LPS regulates proinflammatory gene expression in macrophages by altering histone Deacetylase expression. *FASEB J*, **20**, 1315–1327.

Ausubel, F.M., Brent, R., Kingston, R.E., Moore, D.D., Seidman, J.G., Smith, J.A. and Struhl, K. (ed.) (1992) Short Protocols in Molecular Biology. Greene Publishing and Wiley Interscience, New York, N.Y.

Ausubel, F.M., Brent, R., Kingston, R.E., Moore, D.D., Seidman, J.G., Smith, J.A. and Struhl, K.A. (ed.) (1994). Current protocols in molecular biology. John Wiley & Sons, Inc., New York.

Bae, S.C. and Lee, Y.H. (2006) Phosphorylation, acetylation and ubiquitination: the molecular basis of RUNX regulation. *Gene*, **366**, 58-66.

Baker, R.G., Hayden, M.S. and Ghosh, S. (2011) NF- κ B, inflammation and metabolic disease. *Cell Metab*, **13**, 11–22.

Balkwill F and Mantovani A. (2010) Cancer and inflammation: implications for pharmacology and therapeutics. *Clin Pharmacol Ther*, **87**, 401-406.

Bartke, T., Vermeulen, M., Xhemalce, B., Robson, S.C., Mann, M. and Kouzarides, T. (2010) Nucleosome-interacting proteins regulated by DNA and histone methylation. *Cell*, **143**, 470-484.

- Basak, S., Kim, H., Kearns, J.D., Tergaonkar, V., O'Dea, E., Werner, S.L. et al,** (2007) A fourth I κ B protein within the NF- κ B signaling module. *Cell*, **128**, 369-381.
- Ben-Neriah, Y. and Karin, M.** (2011) Inflammation meets cancer, with NF- κ B as the matchmaker. *Nat Immunol*, **12**, 715-723.
- Berra, E., Roux, D., Richard, D.E. and Pouyssegur, J.** (2001) Hypoxia-inducible factor-1 α (HIF-1 α) escapes O₂-driven proteasomal degradation irrespective of its subcellular localization: nucleus or cytoplasm. *EMBO Rep*, **2**, 615-620.
- Beurel, E., Michalek, S.M. and Jope, R.S.** (2010) Innate and adaptive immune responses regulated by glycogen synthase kinase-3 (GSK3). *Trends Immunol*, **31**, 24-31.
- Birnboim, H.C. and Doly, J.** (1979). A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. *Nucleic Acid Res*, **6**, 1513-1523.
- Blasius, A.L. and Beutler, B.** (2010) Intracellular Toll-like receptors. *Immunity*, **32**, 305–315.
- Boeckle, S., Pfister, H. and Steger, G.** (2002) A new cellular factor recognizes E2 binding sites which mediate transcriptional repression by E2. *Virology*, **293**, 103-117.
- Bradford, M.M.** (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem*, **72**, 248-254.
- Bradley, J.R. and Pober, J.S. (2001)** Tumor necrosis factor receptor-associated factors (TRAFs). *Oncogene*, **20**, 6482–6491.
- Brahimi-Horn, M.C., Chiche, J. and Pouyssegur, J.** (2007) Hypoxia and cancer. *J Mol Med (Berl)*, **85**, 1301-1307.
- Bramhall, S., Noack, N., Wu, M. and Loewenberg, J.R.** (1969). A simple colorimetric method for determination of protein. *Anal Biochem*, **31**, 146-148.
- Bruick, R.K. and McKnight, S.L.** (2001) A conserved family of prolyl-4-hydroxylases that modify HIF. *Science*, **294**, 1337-1340.
- Burke, J.R., Pattoli, M.A., Gregor, K.R., Brassil, P.J., MacMaster, J.F., McIntyre, K.W., Yang, X., Iotzova, V.S., Clarke, W., Strnad, J., Qiu, Y. and Zusi, F.C.** (2003) BMS-345541 is a highly selective inhibitor of I κ B kinase that binds at an allosteric site of the enzyme and blocks NF- κ B-dependent transcription in mice. *J Biol Chem*, **278**, 1450-1456.
- Cadwell, K. and Coscoy, L.** (2005) Ubiquitination on nonlysine residues by a viral E3 ubiquitin ligase. *Science*, **309**, 127–130.
- Cardozo, T. and Pagano, M.** (2004) The SCF ubiquitin ligase: insights into a molecular machine. *Nat Rev Mol Cell Biol* **5**, 739-751.

Chang, H.M., Paulson, M., Holko, M., Rice, C.M., Williams, B.R., Marié, I. and Levy, D.E. (2004) Induction of interferon-stimulated gene expression and antiviral responses require protein deacetylase activity. *Proc Natl Acad Sci USA*, **101**, 9578-9583.

Chariot, A. (2009) The NF-kappaB-independent functions of IKK subunits in immunity and cancer. *Trends Cell Biol*, **19**, 404-413.

Chefetz, I., Ben Amitai, D., Browning, S., Skorecki, K., Adir, N., Thomas, M.G., Kogleck, L., Topaz, O., Indelman, M., Uitto, J., Richard, G., Bradman, N. and Sprecher, E. (2008) Normophosphatemic familial tumoral calcinosis is caused by deleterious mutations in SAMD9, encoding a TNF-alpha responsive protein. *J Invest Dermatol*, **128**, 1423-1429.

Chen, G., Cao, P. and Goeddel, D.V. (2002) TNF-induced recruitment and activation of the IKK complex require Cdc37 and Hsp90. *Mol Cell*, **9**, 401-410.

Chen, Z.J. (2005). Ubiquitin signalling in the NF-kappaB pathway. *Nat Cell Biol*, **7**, 758-765.

Chow, L. and Broker, T. (1994) Papillomavirus DNA replication. *Intervirolgy*. **37**, 150-158.

Chundong, G., Uramoto, H., Onitsuka, T., Shimokawa, H., Iwanami, T., Nakagawa, M., Oyama, T. and Tanaka, F. (2011) Molecular diagnosis of MACC1 status in lung adenocarcinoma by immunohistochemical analysis. *Anticancer Res* **31**, 1141-1145.

Chung, C.T. and Miller, R.H. (1988). A rapid and convenient method for the preparation and storage of competent bacterial cells. *Nucleic Acid Res*, **16**, 3580.

Courtois, G. and Gilmore, T.D. (2006) Mutations in the NF-kB signaling pathway: implications for human disease. *Oncogene*, **25**, 6831-6843.

Coussens, L.M. and Werb, Z. (2002) Inflammation and cancer. *Nature*, **420**, 860-867.

Cross, D.A., Alessi, D.R., Cohen, P., Andjelkovich, M. and Hemmings, B.A. (1995) Inhibition of glycogen synthase kinase-3 by insulin mediated by protein kinase B. *Nature*, **378**, 785-789.

Culver, C., Sundqvist, A., Mudie, S., Melvin, A., Xirodimas, D. and Rocha, S. (2010) Mechanism of hypoxia-induced NF-kappaB. *Mol Cell Biol*, **30**, 4901-4921.

Cummins, E.P. and Taylor, C.T. (2005) Hypoxia-responsive transcription factors. *Pflugers Arch*, **450**, 363-371.

Cummins, E.P., Berra, E., Comerford, K.M., Ginouves, A., Fitzgerald, K.T., Seeballuck, F., Godson, C., Nielsen, J.E., Moynagh, P., Pouyssegur, J. and Taylor, C.T. (2006) Prolyl hydroxylase-1 negatively regulates IkappaB kinase-beta,

giving insight into hypoxia-induced NFkappaB activity. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **103**, 18154-18159.

Daffis, S., Samuel, M.A., Keller, B.C., Gale, M. Jr. and Diamond, M.S. (2007) Cell-specific IRF-3 responses protect against West Nile virus infection by interferon-dependent and -independent mechanisms. *PLoS Pathog*, **3**, e106.

Dalgin, G.S., Holloway, D.T., Liou, L.S. and DeLisi, C. (2007) Identification and characterization of renal cell carcinoma gene markers. *Cancer Inform*, **3**, 65-92.

Darnell, J.E. Jr., Kerr, I.M., Stark, G.R. (1994) Jak-STAT pathways and transcriptional activation in response to IFNs and other extracellular signaling proteins. *Science*, **264**, 1415–1421.

Dekel, B., Metsuyanin, S., Schmidt-Ott, K.M., Fridman, E., Jacob-Hirsch, J., et al. (2006) Multiple imprinted and stemness genes provide a link between normal and tumor progenitor cells of the developing human kidney. *Cancer Res*, **66**, 6040–6049.

Del Vecchio, A.M., Romanczuk, H., Howley, P.M. and Baker, C.C. (1992). Transient replication of human papillomavirus DNAs. *J Virol*, **66**, 5949-5958.

Denko, N.C. (2008) Hypoxia, HIF1 and glucose metabolism in the solid tumour. *Nat Rev Cancer*, **8**, 705-713.

Der, S.D., Zhou, A., Williams, B.R. and Silverman, R.H. (1998) Identification of genes differentially regulated by interferon alpha, beta, or gamma using oligonucleotide arrays. *Proc Natl Acad Sci USA*, **95**, 15623–15628.

De Ruijter, A.J., van Gennip, A.H., Caron, H.N., Kemp, S. and van Kuilenburg, A.B. (2003) Histone deacetylases (HDACs) characterization of the classical HDAC family. *Biochem J*, **370**, 737-749.

De Wet, J.R., Wood, K.V., DeLuca, M., Helinski, D.R. and Subramani, S. (1987). Firefly luciferase gene: structure and expression in mammalian cells. *Mol Cell Biol*, **7**, 725-737.

DiDonato, J.A., Hayakawa, M., Rothwarf, D.M., Zandi, E. and Karin, M. (1997) A cytokine-responsive I kappa B kinase that activates the transcription factor NF-kappaB. *Nature*, **388**, 548-554.

Doble, B.W and Woodgett, J.R. (2007) Role of glycogen synthase kinase-3 in cell fate and epithelial-mesenchymal transitions. *Cells Tissues Organs*, **185**, 73-84.

Dong, H., Zhang, H., Liang, J., Yan, H., Chen, Y., Shen, Y., Kong, Y., Wang, S., Zhao, G. and Jin, W. (2011) Digital karyotyping reveals probable target genes at 7q21.3 locus in hepatocellular carcinoma. *BMC Med Genomics*, **4**, 60.

Dorn, A., Zhao, H., Granberg, F., Hosel, M., Webb, D., Svensson, C., Pettersson, U. and Doerfler W. (2005) Identification of specific cellular genes up-regulated late in adenovirus type 12 infection. *J Virol*, **79**, 2404–2412.

Ducut Sigala, J.L., Bottero, V., Young, D.B., Shevchenko, A., Mercurio, F. and Verma, I.M. (2004) Activation of transcription factor NF-kappaB requires ELKS, an IkappaB kinase regulatory subunit. *Science*, **304**, 1963-1967.

Ea, C.K., Deng, L., Xia, Z.P., Pineda, G. and Chen, Z.J. (2006) Activation of IKK by TNFalpha requires site-specific ubiquitination of RIP1 and polyubiquitin binding by NEMO. *Mol Cell*, **22**, 245-257.

Elco, C.P., Guenther, J.M., Williams, B.R. and Sen, G.C. (2005) Analysis of genes induced by Sendai virus infection of mutant cell lines reveals essential roles of interferon regulatory factor 3, NFkappaB, and interferon but not toll-like receptor 3. *J Virol*, **79**, 3920-3929.

Elvidge, G.P., Glenny, L., Appelhoff, R.J., Ratcliffe, P.J., Ragoussis, J. and Gleadle, J.M. (2006) Concordant regulation of gene expression by hypoxia and 2-oxoglutarate-dependent dioxygenase inhibition: the role of HIF-1alpha, HIF-2alpha, and other pathways. *J Biol Chem*, **281**, 15215-15226.

Embi, N., Rylatt, D.B. and Cohen, P. (1980) Glycogen synthase kinase-3 from rabbit skeletal muscle. Separation from cyclic-AMP-dependent protein kinase and phosphorylase kinase. *Eur J Biochem*, **107**, 519-527.

Epstein, A.C., Gleadle, J.M., McNeill, L.A., Hewitson, K.S., O'Rourke, J., Mole, D.R., Mukherji, M., Metzen, E., Wilson, M.I., Dhanda, A., Tian, Y.M., et al. (2001) *C. elegans* EGL-9 and mammalian homologs define a family of dioxygenases that regulate HIF by prolyl hydroxylation. *Cell*, **107**, 43-54.

Erez, N. and Coussens, L.M. (2011) Leukocytes as paracrine regulators of metastasis and determinants of organ-specific colonization. *Int J Cancer*, **128**, 2536-2544.

Ermolaeva, M.A., Michallet, M.C., Papadopoulou, N., Utermöhlen, O., Kranidioti, K., Kollias, G., Tschopp, J., Pasparakis, M. (2008) Function of TRADD in tumor necrosis factor receptor 1 signaling and in TRIF-dependent inflammatory responses. *Nature Immunol.* **9**, 1037-1046.

Fardin, P., Barla, A., Mosci, S., Rosasco, L., Verri, A., Versteeg, R., Caron, H.N., Molenaar, J.J., Ora, I., Eva, A., Puppo, M. and Varesio, L. (2010) A biology-driven approach identifies the hypoxia gene signature as a predictor of the outcome of neuroblastoma patients. *Mol Cancer*, **9**, 185.

Fensterl, V. and Sen, G.C. (2011) The ISG56/IFIT1 gene family. *J Interferon Cytokine Res*, **31**, 71-78.

Fitzgerald, K.A., Rowe, D.C., Barnes, B.J., Caffrey, D.R., Visintin, A., Latz, E., Monks, B., Pitha, P.M. and Golenbock, D.T. (2003) LPS-TLR4 signaling to IRF-3/7 and NF-kappaB involves the toll adapters TRAM and TRIF. *J Exp Med*, **198**, 1043-1055.

Fuchs, S.Y., Spiegelman, V.S. and Kumar, K.G. (2004) The many faces of beta-TrCP E3 ubiquitin ligases: reflections in the magic mirror of cancer. *Oncogene*, **23**, 2028-2036.

- Galbiati, L., Mendoza-Maldonado, R., Gutierrez, M.I. and Giacca, M.** (2005) Regulation of E2F-1 after DNA damage by p300-mediated acetylation and ubiquitination. *Cell Cycle*, **4**, 930-939.
- Garcia, M., Jemal, A., Ward, E.M., Center, M.M., Hao, Y., Siegel, R.L. et al.** (2007) **Global Cancer Facts & Figures 2007**. American Cancer Society 1–48 (<http://www.cancer.org>).
- Gerlach, B., Cordier, S.M., Schmukle, A.C., Emmerich, C.H., Rieser, E., Haas, T.L., Webb, A.I., Rickard, J.A., Anderton, H., Wong, W.W., Nachbur, U. et al.** (2011) Linear ubiquitination prevents inflammation and regulates immune signalling. *Nature*, **471**, 591–596.
- Grandvaux, N., Servant, M.J., tenOever, B., Sen, G.C., Balachandran, S., Barber, G.N., Lin, R. and Hiscott, J.** (2002) Transcriptional profiling of interferon regulatory factor 3 target genes: direct involvement in the regulation of interferon-stimulated genes. *J Virol*, **76**, 5532-5539.
- Grivennikov, S.I., Greten, F.R. and Karin, M.** (2010) Immunity, inflammation, and cancer. *Cell*, **140**, 883–899.
- Grzenda, A., Lomberk, G., Zhang, J.S. and Urrutia, R.** (2009) Sin3: master scaffold and transcriptional corepressor. *Biochim Biophys Acta*, **1789**, 443-450.
- Guo, J., Hui, D.J., Merrick, W.C. and Sen, G.C.** (2000) A new pathway of translational regulation mediated by eukaryotic initiation factor 3. *EMBO J*, **19**, 6891–6899.
- Häcker, H., Redecke, V., Blagoev, B., Kratchmarova, I., Hsu, L.C., Wang, G.G., Kamps, M.P., Raz, E., Wagner, H., Häcker, G., Mann, M., Karin, M.** (2006) Specificity in Toll-like receptor signalling through distinct effector functions of TRAF3 and TRAF6. *Nature*, **439**, 204–207.
- Hallen, L.C., Burki, Y., Ebeling, M., Broger, C., Siegrist, F., Oroszlan-Szovik, K., Bohrmann, B., Certa, U. and Foser, S.** (2007) Antiproliferative activity of the human IFN-alpha-inducible protein IFI44. *J Interferon Cytokine Res*, **27**, 675-680.
- Halili, M.A., Andrews, M.R., Labzin, L.I., Schroder, K., Matthias, G., Cao, C., Lovelace, E., Reid, R.C., et al.** (2010) Differential effects of selective HDAC inhibitors on macrophage inflammatory responses to the Toll-like receptor 4 agonist LPS. *J Leukoc Biol*, **87**, 1103–1114.
- Hanahan, D. and Weinberg, R.A.** (2011) Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell*, **144**, 646-674.
- Hassig, C.A., Fleischer, T.C., Billin, A.N., Schreiber, S.L., and Ayer, D.E.** (1997) Histone deacetylase activity is required for full transcriptional repression by mSin3A. *Cell*, **89**, 341-347.
- Hayden, M.S. and Ghosh, S.** (2008) Shared principles in NF- κ B signaling. *Cell*, **132**, 344–362.
- Hayden, M.S. and Ghosh, S.** (2011) NF- κ B in immunobiology. *Cell Res*, **21**, 223–244.

- Hecht, A. and Stemmler, M.P.** (2003) Identification of a promoter-specific transcriptional activation domain at the C terminus of the Wnt effector protein T-cell factor 4. *J Bio Chem*, **278**, 3776-3785.
- Hinck, L., Nelson, W.J. and Papkoff, J.** (1994) Wnt-1 modulates cell-cell adhesion in mammalian cells by stabilizing beta-catenin binding to the cell adhesion protein cadherin. *J Cell Biol*, **124**, 729-741.
- Hoebe, K., Janssen, E.M., Kim, S.O., Alexopoulou, L., Flavell, R.A., Han, J. and Beutler, B.** (2003) Upregulation of costimulatory molecules induced by lipopolysaccharide and double-stranded RNA occurs by Trif-dependent and Trif-independent pathways. *Nat Immunol*, **4**, 1223-1229.
- Homminga, I., Pieters, R., Langerak, A.W., de Rooij, J.J., Stubbs, A., Verstegen, M., Vuerhard, M., Buijs-Gladdines, J., Kooij, C., Klous, P., van Vlierberghe, P., Ferrando, A.A., Cayuela, J.M., Verhaaf, B., Beverloo, H.B., Horstmann, M., de Haas, V., Wiekmeijer, A.S., Pike-Overzet, K., Staal, F.J., de Laat, W., Soulier, J., Sigaux, F. and Meijerink, J.P.** (2011) Integrated transcript and genome analyses reveal NKX2-1 and MEF2C as potential oncogenes in T cell acute lymphoblastic leukemia. *Cancer Cell*, **19**, 484-497.
- Honda, K., Takaoka, A. and Taniguchi, T.** (2006) Type I interferon [corrected] gene induction by the interferon regulatory factor family of transcription factors. *Immunity*, **25**, 349-360. Erratum in: *Immunity*, **25**, 849.
- Hoppe, T.** (2005) Multiubiquitylation by E4 enzymes: 'one size' doesn't fit all. *Trends Biochem Sci*, **30**, 183-187.
- Horvath, C.M., Stark, G.R., Kerr, I.M. and Darnell, J.E. Jr.** (1996) Interactions between STAT and non-STAT proteins in the interferon-stimulated gene factor 3 transcription complex. *Mol Cell Biol*, **16**, 6957-6964.
- Hu, C.S., Xiong, J., Zhang, L.J., Huang, B.J., Zhang, Q.P., et al.** (2004) PEG10 Activation by Co-Stimulation of CXCR5 and CCR7 Essentially Contributes to Resistance to Apoptosis in CD19+CD34+B Cells from Patients with B Cell Lineage Acute and Chronic Lymphocytic Leukemia. *Cell Mol Immunol*, **1**, 280-294.
- Hu, M.C., Lee, D.F., Xia, W., Golfman, L.S., Ou-Yang, F., Yang, J.Y., Zou, Y., Bao, S., Hanada, N., Saso, H., Kobayashi, R. and Hung, M.C.** (2004) I kappa B kinase promotes tumorigenesis through inhibition of forkhead FOXO3a. *Cell*, **117**, 225-237.
- Hughes, F. J. and Romanos, M. A.** (1993) E1 protein of human papillomavirus is a DNA helicase/ATPase. *Nucleic Acids Res*, **21**, 5817-5823.
- Hui, D.J., Bhasker, C.R., Merrick, W.C. and Sen, G.C.** (2003) Viral stressinducible protein p56 inhibits translation by blocking the interaction of eIF3 with the ternary complex eIF2.GTP.MettRNAi. *J Biol Chem*, **278**, 39477-39482.
- Hycza, M.D., Kovacs, C., Loutfy, M., Halpenny, R., Heisler, L., Yang, S., Wilkins, O., Ostrowski, M. and Der, S.D.** (2007) Distinct transcriptional profiles in ex vivo CD4+ and CD8+ T cells are established early in human immunodeficiency virus type 1 infection and are characterized by a chronic interferon response as well as extensive transcriptional changes in CD8+ T cells. *J Virol*, **81**, 3477-3486.

- Imai, Y., Kurokawa, M., Yamaguchi, Y., Izutsu, K., Nitta, E., Mitani, K., Satake, M., Noda, T., Ito, Y. and Hirai, H.** (2004) The corepressor mSin3A regulates phosphorylation-induced activation, intranuclear location, and stability of AML1. *Mol Cell Biol*, **24**, 1033-1043.
- Ip, W.K., Lai, P.B., Wong, N.L., Sy, S.M., Beheshti, B., Squire, J.A. and Wong, N.** (2007) Identification of PEG10 as a progression related biomarker for hepatocellular carcinoma. *Cancer Lett*, **250**, 284-291.
- Ishikura, S., Weissman, A. M. and Bonifacino, J. S.** (2010) Serine residues in the cytosolic tail of the T-cell antigen receptor α -chain mediate ubiquitination and endoplasmic reticulum-associated degradation of the unassembled protein. *J Biol Chem*, **285**, 23916–23924.
- Israël, A.** (2010) The IKK complex, a central regulator of NF-kappaB activation. *Cold Spring Harb Perspect Biol*, **2**: a000158.
- Ito, A., Kawaguchi, Y., Lai, C.H., Kovacs, J.J., Higashimoto, Y., Appella, E. and Yao, T.P.** (2002) MDM2-HDAC1-mediated deacetylation of p53 is required for its degradation. *EMBO J*, **21**, 6236-6245.
- Ivan, M., Kondo, K., Yang, H., Kim, W., Valiando, J., Ohh, M., Salic, A., Asara, J.M., Lane, W.S. and Kaelin, W.G. Jr.** (2001) HIF α targeted for VHL-mediated destruction by proline hydroxylation: implications for O₂ sensing. *Science*, **292**, 464-468.
- Jaakkola, P., Mole, D.R., Tian, Y.M., Wilson, M.I., Gielbert, J., Gaskell, S.J., Kriegsheim, A.v., Hebestreit, H.F., Mukherji, M., Schofield, C.J., Maxwell P.H., Pugh C.W. and Ratcliffe, P.J.** (2001) Targeting of HIF- α to the von Hippel-Lindau ubiquitylation complex by O₂-regulated prolyl hydroxylation. *Science*, **292**, 468-472.
- Janssen, R., Pennings, J., Hodemaekers, H., Buisman, A., van Oosten, M., de Rond, L., Ozturk, K., Dormans, J., Kimman, T. and Hoebee, B.** (2007) Host transcription profiles upon primary respiratory syncytial virus infection. *J Virol*, **81**, 5958–5967.
- Jeong, J.W., Bae, M.K., Ahn, M.Y., Kim, S.H., Sohn, T.K., Bae, M.H., et al.,** (2002) Regulation and destabilization of HIF-1 α by ARD1-mediated acetylation. *Cell*, **111**, 709-720.
- Jiang, Y., Zhang, W., Kondo, K., Klco, J.M., St Martin, T.B., Dufault, M.R., Madden, S.L., Kaelin, W.G., Jr. and Nacht, M.** (2003) Gene expression profiling in a renal cell carcinoma cell line: dissecting VHL and hypoxia-dependent pathways. *Mol Cancer Res*, **1**, 453-462.
- Jin, Y.H., Jeon, E.J., Li, Q.L., Lee, Y.H., Choi, J.K., Kim, W.J., Lee, K.Y. and Bae, S.C.** (2004) Transforming growth factor- β stimulates p300-dependent RUNX3 acetylation, which inhibits ubiquitination-mediated degradation. *J Biol Chem*, **279**, 29409-29417.
- Jordanovski, D., Herwartz, C. and Steger, G.** (2011) ZNF395 (HDBP2/PBF) is a target gene of HIF-1 α . In: *Huntingtons Disease*, Ed. N. E. Tunali, Intech, Croatia.

- Kaelin, W.G. and Ratcliffe, P.J.** (2008) Oxygen sensing by metazoans: the central role of the HIF hydroxylase pathway. *Mol Cell*, **30**, 393–402.
- Kainz, B., Shehata, M., Bilban, M., Kienle, D., Heintel, D., Krömer-Holzinger, E., Le, T., et al.** (2007) Overexpression of the paternally expressed gene 10 (PEG10) from the imprinted locus on chromosome 7q21 in high-risk B-cell chronic lymphocytic leukemia. *Int J Cancer*, **121**, 1984-1993.
- Kallio, P.J., Wilson, W.J., O'Brien, S., Makino, Y. and Poellinger, L.** (1999) Regulation of the hypoxia-inducible transcription factor 1 α by the ubiquitin-proteasome pathway. *J Biol Chem*, **274**, 6519-6525.
- Kanayama, A., Seth, R.B., Sun, L., Ea, C.K., Hong, M., Shaito, A., Chiu, Y.H., Deng, L. and Chen, Z.J.** (2004) TAB2 and TAB3 activate the NF-kappaB pathway through binding to polyubiquitin chains. *Mol Cell*, **15**, 535-548.
- Karin, M.** (2008) The I κ B kinase - a bridge between inflammation and cancer. *Cell Res*, **18**, 334-342.
- Karin, M. and Greten, F.R.** (2005) NF- κ B: linking inflammation and immunity to cancer development and progression. *Nat Rev Immunol*, **5**, 749–759.
- Kawai, T. and Akira, S.** (2010) The role of pattern-recognition receptors in innate immunity: update on Toll-like receptors. *Nat Immunol*, **11**, 373-384.
- Kenneth, N.S. and Rocha, S.** (2008) Regulation of gene expression by hypoxia. *Biochem J*, **414**, 19-29.
- Kerscher, O., Felberbaum, R. and Hochstrasser, M.** (2006) Modification of proteins by ubiquitin and ubiquitin-like proteins. *Annu Rev Cell Dev Biol*, **22**, 159-180.
- Kim, S.S., Ahn, C.H., Kang, M.R., Kim, Y.R., Kim, H.S., Yoo, N.J. and Lee, S.H.** (2010) Expression of CARD6, an NF-kappaB activator, in gastric, colorectal and oesophageal cancers. *Pathology*, **42**, 50-53.
- Knight, J.B., Eyster, C.A., Griesel, B.A. and Olson, A.L.** (2003) Regulation of the human GLUT4 gene promoter: interaction between a transcriptional activator and myocyte enhancer factor 2A. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **100**, 14725-14730.
- Kockeritz, L., Doble, B., Patel, S. and Woodgett J.R.** (2006) Glycogen synthase kinase-3--an overview of an over-achieving protein kinase. *Curr Drug Targets*, **7**, 1377-1388.
- Kodama, S., Ikeda, S., Asahara, T., Kishida, M. and Kikuchi, A.** (1999) Axin directly interacts with plakoglobin and regulates its stability. *J Biol Chem*, **274**, 27682-27688.
- Krämer, O.H., Knauer, S.K., Greiner, G., Jandt, E., Reichardt, S., Gührs, K.H., Stauber, R.H., Böhmer, F.D. and Heinzl, T.** (2009) A phosphorylation-acetylation switch regulates STAT1 signaling. *Genes Dev*, **23**, 223–235.
- Kumar, A., Takada, Y., Boriek, A.M. and Aggarwal, B.B.** (2004) Nuclear factor- κ B: its role in health and disease. *J Mol Med*, **82**, 434–448.

- Kume, S., Haneda, M., Kanasaki, K., Sugimoto, T., Araki, S., Isshiki, K., et al** (2007) SIRT1 inhibits transforming growth factor beta-induced apoptosis in glomerular mesangial cells via Smad7 deacetylation. *J Biol Chem*, **282**, 151-158.
- Laemmli, U.K.** (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, **227**, 680-685.
- Laherty, C.D., Billin, A.N., Lavinsky, R.M., Yochum, G.S., Bush, A.C., Sun, J.M., Mullen, T.M., Davie, J.R., Rose, D.W., Glass, C.K., Rosenfeld, M.G., Ayer, D.E. and Eisenman, R.N.** (1998) SAP30, a component of the mSin3 corepressor complex involved in N-CoR-mediated repression by specific transcription factors. *Mol Cell*, **2**, 33-42.
- Lai, K.C., Chang, K.W., Liu, C.J., Kao, S.Y. and Lee, T.C.** (2008) IFN-induced protein with tetratricopeptide repeats 2 inhibits migration activity and increases survival of oral squamous cell carcinoma. *Mol Cancer Res*, **6**, 1431–1439.
- Lal, A., Peters, H., St Croix, B., Haroon, Z.A., Dewhirst, M.W., Strausberg, R.L., Kaanders, J.H., van der Kogel, A.J. and Riggins, G.J.** (2001) Transcriptional response to hypoxia in human tumors. *J Natl Cancer Inst*, **93**, 1337-1343.
- Latres, E., Chiaur, D.S. and Pagano, M.** (1999) The human F box protein beta-Trcp associates with the Cul1/Skp1 complex and regulates the stability of beta-catenin. *Oncogene*, **18**, 849-854.
- Leduc, C., Claverie, P., Eymin, B., Col, E., Khochbin, S., Brambilla, E. and Gazzeri S.** (2006) p14ARF promotes RB accumulation through inhibition of its Tip60-dependent acetylation. *Oncogene*, **25**, 4147-4154.
- Lee, S., Andrieu, C., Saltel, F., Destaing, O., Auclair, J., Pouchkine, V., Michelon, J., Salaun, B., et al.** (2004) I κ B kinase β phosphorylates Dok1 serines in response to TNF, IL-1, or gamma radiation. *Proc Natl Acad Sci USA*, **101**, 17416–17421.
- Lee, D.F., Kuo, H.P., Chen, C.T., Hsu, J.M., Chou, C.K., Wei, Y., Sun, H.L., Li, L.Y., Ping, B., Huang, W.C., He, X., Hung, J.Y., Lai, C.C., et al.** (2007) IKK β suppression of TSC1 links inflammation and tumor angiogenesis via the mTOR pathway. *Cell*, **130**, 440–455.
- Leggatt, G.R. and Gabrielli, B.** (2011) Histone deacetylase inhibitors in the generation of the anti-tumour immune response. *Immunol Cell Biol*, doi: 10.1038/icb.2011.94.
- Li, C.M., Margolin, A.A., Salas, M., Memeo, L., Mansukhani, M., et al.** (2006) PEG10 is a c-MYC target gene in cancer cells. *Cancer Res*, **66**, 665–672.
- Li, H., Wittwer, T., Weber, A., Schneider, H., Moreno, R., Maine, G.N., Kracht, M., Schmitz, M.L. and Burstein, E.** (2011) Regulation of NF- κ B activity by competition between RelA acetylation and ubiquitination. *Oncogene*. doi: 10.1038/onc.2011.253.
- Lin, R., Mustafa, A., Nguyen, H., Gewertn, D. and Hiscott, J** (1994) Mutational Analysis of Interferon (IFN) Regulatory Factors 1 and 2. *J Biol Chem*, **269**, 17542-17549.

- Lin, R., Heylbroeck, C., Pitha, P.M. and Hiscott, J.** (1998) Virus-dependent phosphorylation of the IRF-3 transcription factor regulates nuclear translocation, transactivation potential, and proteasome-mediated degradation. *Mol Cell Biol*, **18**, 2986-2996.
- Liu, D.C., Yang, Z.L. and Jiang, S.** (2011) Identification of PEG10 and TSG101 as carcinogenesis, progression, and poor-prognosis related biomarkers for gallbladder adenocarcinoma. *Pathol Oncol Res*, **17**, 859-866.
- Look, A.T.** (1997) Oncogenic transcription factors in the human acute leukemias. *Science*, **278**, 1059-1064.
- Luo, J.** (2009) Glycogen synthase kinase 3beta (GSK3beta) in tumorigenesis and cancer chemotherapy. *Cancer Lett*, **273**, 194-200.
- Ma, X., Ezzeldin, H.H. and Diasio, R.B.** (2009) Histone deacetylase inhibitors: current status and overview of recent clinical trials. *Drugs*, **69**, 1911-1934.
- Mahon, P.C., Hirota, K. and Semenza, G.L.** (2001) FIH-1: a novel protein that interacts with HIF-1a and VHL to mediate repression of HIF-1 transcriptional activity. *Genes Dev*, **15**, 2675-2686.
- Mahoney, D.J., Cheung, H.H., Mrad, R.L., Plenchette, S., Simard, C., Enwere, E., Arora, V., et al.** (2008) Both cIAP1 and cIAP2 regulate TNF α -mediated NF- κ B activation. *Proc Natl Acad Sci USA*, **105**, 11778-11783.
- Majmundar, A.J., Wong, W.J. and Simon, M.C.** (2010) Hypoxia-inducible factors and the response to hypoxic stress. *Mol Cell*, **40**, 294-309.
- Mani, A. and Gelmann, E.P.** (2005) The ubiquitin-proteasome pathway and its role in cancer. *J Clin Oncol*, **23**, 4776-4789.
- Maniatis, T., Sambrook, J. and Fritsch, E.E.** (1989). Molecular cloning. *Cold Spring Harbour Laboratory Press*, New York.
- Martinez-Moczygemba, M., Gutch, M.J., French, D.L. and Reich, N.C.** (1997) Distinct STAT structure promotes interaction of STAT2 with the p48 subunit of the interferon- α stimulated transcription factor ISGF3. *J Biol Chem*, **272**, 20070-20076.
- Mateo, F., Vidal-Laliena, M., Pujol, M.J. and Bachs, O.** (2010) Acetylation of cyclin A: a new cell cycle regulatory mechanism. *Biochem Soc Trans*, **38**, 83-86.
- Maxwell, P.H., Wiesener, M.S., Chang, G.W., Clifford, S.C., Vaux, E.C., Cockman, M.E., Wykoff, C.C., Pugh, C.W., Maher, E.R. and Ratcliffe, P.J.** (1999) The tumour suppressor protein VHL targets hypoxia-inducible factors for oxygen-dependent proteolysis. *Nature*, **399**, 271-275.
- Meloche, S. and Pouyssegur, J.** (2007) The ERK1/2 mitogen-activated protein kinase pathway as a master regulator of the G1- to S-phase transition. *Oncogene*, **26**, 3227-3239.
- Melvin, A., Mudie, S. and Rocha, S.** (2011) Further insights into the mechanism of hypoxia-induced NF κ B. [corrected]. *Cell Cycle*, **10**, 879-882. Erratum in: *Cell Cycle*, **10**, 2041.

- Mercurio, F., Zhu, H., Murray, B.W., Shevchenko, A., Bennett, B.L., Li, J., et al.** (1997) IKK-1 and IKK-2: cytokine-activated I κ B kinases essential for NF- κ B activation. *Science*, **278**, 860-866.
- Moehler, T.M., Ho, A.D., Goldschmidt, H. and Barlogie, B.** (2003) Angiogenesis in hematologic malignancies. *Crit Rev Oncol Hematol*, **45**, 227-244.
- Moeller, B.J., Richardson, R.A. and Dewhirst, M.W.** (2007) Hypoxia and radiotherapy: opportunities for improved outcomes in cancer treatment. *Cancer Metastasis Rev*, **26**, 241-248.
- Mullis, K.B. and Faloona, F.A.** (1987) Specific synthesis of DNA in vitro via a polymerase-catalyzed chain reaction. *Methods Enzymol*, **155**, 335-350.
- Murat, A., Migliavacca, E., Hussain, S.F., Heimberger, A.B., Desbaillets, I., Hamou, M.F., Rugg, C., Stupp, R., Delorenzi, M. and Hegi, M.E.** (2009) Modulation of angiogenic and inflammatory response in glioblastoma by hypoxia. *PLoS One*, **4**, e5947.
- Nagel, S., Meyer, C., Quentmeier, H., Kaufmann, M., Drexler, H.G. and MacLeod, R.A.** (2008) MEF2C is activated by multiple mechanisms in a subset of T-acute lymphoblastic leukemia cell lines. *Leukemia*, **22**, 600-607.
- Nagel, S., Venturini, L., Meyer, C., Kaufmann, M., Scherr, M, Drexler, H.G. and Macleod, R.A.** (2011) Transcriptional deregulation of oncogenic myocyte enhancer factor 2C in T-cell acute lymphoblastic leukemia. *Leuk Lymphoma*. **52**, 290-297.
- Nicholl, M.J., Robinson, L.H. and Preston, C.M.** (2000) Activation of cellular interferon-responsive genes after infection of human cells with herpes simplex virus type 1. *J Gen Virol*, **81**, 2215-2218.
- Nizet, V. and Johnson, R.S.** (2009). Interdependence of hypoxic and innate immune responses. *Nat Rev Immunol*, **9**, 609-617.
- Nolan, G.P., Ghosh, S., Liou, H.C., Tempst, P. and Baltimore, D.** (1991) DNA binding and I κ B inhibition of the cloned p65 subunit of NF- κ B, a related polypeptide. *Cell*, **64**, 961-969.
- Nusinzon, I. and Horvath, C.M.** (2005) Unexpected roles for deacetylation in interferon- and cytokine-induced transcription. *J Interferon Cytokine Res*, **25**, 745-748.
- Nusse, R.** (2005) Wnt signaling in disease and in development. *Cell Res*, **15**, 28-32.
- Oeckinghaus, A., Hayden, M.S. and Ghosh, S.** (2011) Crosstalk in NF- κ B signaling pathways. *Nat Immunol*, **12**, 695-708.
- Okabe, H., Satoh, S., Furukawa, Y., Kato, T., Hasegawa, S, et al.** (2003) Involvement of PEG10 in human hepatocellular carcinogenesis through interaction with SIAH1. *Cancer Res*, **63**, 3043-3048.
- Papkoff, J., Rubinfeld, B., Schryver, B. and Polakis, P.** (1996) Wnt-1 regulates free pools of catenins and stabilizes APC-catenin complexes. *Mol Cell Biol*, **16**, 2128-2134.

- Pasparakis, M., Luedde, T. and Schmidt-Supprian, M.** (2006) Dissection of the NF- κ B signalling cascade in transgenic and knockout mice. *Cell Death Differ*, **13**, 861–872.
- Pawlowski, A.** (2011) Aktivierung des ISG56-Promotors durch Papillomavirusbindungs Faktor (PBF) *Diplomarbeit am Institut für Virologie der Universität zu Köln*.
- Pellegrini, S. and Schindler, C.** (1993) Early events in signaling by interferons. *Trends Biochem Sci*, **18**, 338–342.
- Peng, J., Schwartz, D., Elias, J.E., Thoreen, C.C., Cheng, D., Marsischky, G., Roelofs, J., Finley, D. and Gygi, S.P.** (2003) A proteomics approach to understanding protein ubiquitination. *Nat Biotechnol*, **21**, 921-926.
- Petroski, M.D. and Deshaies, R.J.** (2005) Function and regulation of cullin-RING ubiquitin ligases. *Nat Rev Mol Cell Biol*, **6**, 9-20.
- Platanias, L.C.** (2005) Mechanisms of type-I- and type-II-interferon-mediated signalling. *Nat Rev Immunol*, **5**, 375–386.
- Pobezinskaya, Y.L., Kim, Y.S., Choksi, S., Morgan, M.J., Li, T., Liu, C. and Liu, Z.** (2008) The function of TRADD in signaling through tumor necrosis factor receptor 1 and TRIF-dependent Toll-like receptors. *Nat Immunol*, **9**, 1047–1054.
- Ponten, J. and Macintyre, E.H.** (1968) Long term culture of normal and neoplastic human glia. *Acta Pathol Microbiol Scand*, **74**, 465-486.
- Purdie, K.J., Sexton, C.J., Proby, C.M., Glover, M.T., Williams, A.T., Stables, J.N. and Leigh, I.M.** (1993) Malignant transformation of cutaneous lesions in renal allograft patients: a role for human papillomavirus. *Cancer Res*, **53**, 5328-5333.
- Qian, B.Z. and Pollard, J.W.** (2010) Macrophage diversity enhances tumor progression and metastasis. *Cell*, **141**, 39–51.
- Qiu, J., Huang, P., Liu, Q., Hong, J., Li, B., Lu, C., Wang, L., Wang, J. and Yuan, Y.** (2011) Identification of MACC1 as a novel prognostic marker in hepatocellular carcinoma. *J Transl Med*, **9**,166.
- Rothwarf, D.M., Zandi, E., Natoli, G. and Karin, M.** (1998) IKK-gamma is an essential regulatory subunit of the I κ B kinase complex. *Nature*, **395**, 297-300.
- Sadoul, K., Boyault, C., Pabion, M. and Khochbin, S.** (2008) Regulation of protein turnover by acetyltransferases and deacetylases. *Biochimie*, **90**, 306-312.
- Schmidt, H.M., Steger, G. and Pfister, H.** (1997) Competitive binding of viral E2 protein and mammalian core-binding factor to transcriptional control sequences of human papillomavirus type 8 and bovine papillomavirus type 1. *J Virol*, **71**, 8029-8034.

- Semenza, G.** (2007) Evaluation of HIF-1 inhibitors as anticancer agents. *Drug Discov Today*, **12**, 853–859.
- Seo, Y. S., Muller, F., Lusky, M. and Hurwitz, J.** (1993) Bovine papilloma virus (BPV)-encoded E1 protein contains multiple activities required for BPV DNA replication. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **90**, 702-706.
- Shakespeare, M.R., Halili, M.A., Irvine, K.M., Fairlie, D.P. and Sweet, M.J.** (2011) Histone deacetylases as regulators of inflammation and immunity. *Trends Immunol*, **32**, 335–343.
- Shimazu, T., Komatsu, Y., Nakayama, K.I., Fukazawa, H., Horinouchi, S. and Yoshida, M.** (2006) Regulation of SV40 large T-antigen stability by reversible acetylation. *Oncogene*, **25**, 7391-7400.
- Shimizu, Y., Okuda-Shimizu, Y. and Hendershot, L. M.** (2010) Ubiquitylation of an ERAD substrate occurs on multiple types of amino acids. *Mol Cell*, **40**, 917–926.
- Sichtig, N.** (2006) Charakterisierung des zellulären Proteins "Papillomavirus Binding Factor" PBF. *Doktorarbeit am Institut für Virologie der Universität zu Köln*.
- Sichtig, N., Silling, S. and Steger, G.** (2007a) Papillomavirus binding factor (PBF) mediated inhibition of cell growth is regulated by 14-3-3 β . *Archives of Biochemistry and Biophysics*, **464**, 90-99.
- Sichtig, N., Körfer, N. and Steger, G.** (2007b) Papillomavirus binding factor represses transcription via recruitment of the Sin3/HDAC co-repressor complex. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, **467**, 67-75.
- Simonsson, M., Heldin, C.H., Ericsson, J. and Grönroos, E.** (2005) The balance between acetylation and deacetylation controls Smad7 stability. *J Biol Chem*, **280**, 21797-21803.
- Skubitz, K.M., Zimmermann, W., Kammerer, R., Pambuccian, S. and Skubitz, A.P.** (2006) Differential gene expression identifies subgroups of renal cell carcinoma. *J Lab Clin Med*, **147**, 250-267.
- Smith, J.A., Schmechel, S.C., Raghavan, A., Abelson, M., Reilly, C., Katze, M.G., Kaufman, R.J., Bohjanen, P.R. and Schiff, L.A.** (2006) Reovirus induces and benefits from an integrated cellular stress response. *J Virol*, **80**, 2019–2033.
- Speck, N.A. and Gilliland, D.G.** (2002) Core-binding factors in haematopoiesis and leukaemia. *Nat Rev Cancer*, **2**, 502-513.
- Stawowczyk, M., Van Scoy, S., Kumar, K.P. and Reich, N.C.** (2011) The interferon stimulated gene 54 promotes apoptosis. *J Biol Chem*, **286**, 7257-7266.
- Stehling-Sun, S., Dade, J., Nutt, S.L., DeKoter, R.P. and Camargo FD.** (2009) Regulation of lymphoid versus myeloid fate 'choice' by the transcription factor Mef2c. *Nat Immunol*, **10**, 289-296.

- Stein, U., Walther, W., Arlt, F., Schwabe, H., Smith, J., Fichtner, I., Birchmeier, W. and Schlag, P.M.** (2009) MACC1, a newly identified key regulator of HGF-MET signaling, predicts colon cancer metastasis. *Nat Med*, **15**, 59-67.
- Storey, J.D. and Tibshirani, R.** (2003) Statistical significance for genomewide studies. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **100**, 9440-9445.
- Stubenrauch, F., Malejczyk, J., Fuchs, P.G. and Pfister, H.** (1992) Late promoter of human papillomavirus type 8 and its regulation. *J Virol*, **66**, 3485-3493.
- Sun, S.C.** (2011) Non-canonical NF- κ B signaling pathway. *Cell Res*, **21**, 71-85.
- Sundstrom, C. and Nilsson, K.** (1976) Establishment and characterization of a human histiocytic lymphoma cell line (U-937). *Int J Cancer*, **17**, 565-577.
- Sung, F.L., Hui, E.P., Tao, Q., Li, H., Tsui, N.B., Dennis Lo., Y.M., Ma, B.B., To, K.F., Harris, A.L. and Chan, A.T.** (2007) Genome-wide expression analysis using microarray identified complex signaling pathways modulated by hypoxia in nasopharyngeal carcinoma. *Cancer Lett*, **253**, 74-88.
- Tait, S. W. et al.** (2007) Apoptosis induction by Bid requires unconventional ubiquitination and degradation of its N-terminal fragment. *J Cell Biol*, **179**, 1453-1466.
- Tamura, T., Yanai, H., Savitsky, D. and Taniguchi, T.** (2008) The IRF family transcription factors in immunity and oncogenesis. *Annu Rev Immunol*, **26**, 535-584.
- Tanaka, K., Shouguchi-Miyata, J., Miyamoto, N. and Ikeda, J.-E.** (2004) Novel nuclear shuttle proteins, HDBP1 and HDBP2, bind to neuronal cell-specific cis-regulatory element in the promoter for the human Huntington disease gene. *J Biol Chem*, **279**, 7275-7286.
- Tan, P., Fuchs, S.Y., Chen, A., Wu, K., Gomez, C., Ronai, Z. and Pan, ZQ.** (1999) Recruitment of a ROC1-CUL1 ubiquitin ligase by Skp1 and HOS to catalyze the ubiquitination of I kappa B alpha. *Mol Cell*, **3**, 527-533.
- Terenzi, F., Pal, S. and Sen, G.C.** (2005) Induction and mode of action of the viral stress-inducible murine proteins, P56 and P54. *Virology*, **340**, 116-124.
- Terenzi, F., Hui, D.J., Merrick, W.C. and Sen, G.C.** (2006) Distinct induction patterns and functions of two closely related interferon-inducible human genes, ISG54 and ISG56. *J Biol Chem*, **281**, 34064-34071.
- Terenzi, F., Saikia, P. and Sen, G.C.** (2008) Interferon-inducible protein, P56, inhibits HPV DNA replication by binding to the viral protein E1. *Embo J*, **27**, 3311-3321.
- Tergaonkar, V., Correa, R.G., Ikawa, M. and Verma, I.M.** (2005) Distinct roles of I kappa B proteins in regulating constitutive NF-kappa B activity. *Nat Cell Biol*, **7**, 921-923.
- Thrower, J.S., Hoffman, L., Rechsteiner, M. and Pickart, C.M.** (2000) Recognition of the polyubiquitin proteolytic signal. *EMBO J*, **19**, 94-102.

- Tilg, H. and Moschen, A.R.** (2008) Inflammatory mechanisms in the regulation of insulin resistance. *Mol Med*, **14**, 222–231.
- Tsou, A.P., Chuang, Y.C., Su, J.Y., Yang, C.W., Liao, Y.L., et al.** (2003) Overexpression of a novel imprinted gene, PEG10, in human hepatocellular carcinoma and in regenerating mouse livers. *J Biomed Sci*, **10**, 625–635.
- Tsuji, K., Yasui, K., Gen, Y., Endo, M., Dohi, O., Zen, K., Mitsuyoshi, H., Minami, M., Itoh, Y., Taniwaki, M., Tanaka, S., Arii, S., Okanoue, T. and Yoshikawa, T.** (2010) PEG10 is a probable target for the amplification at 7q21 detected in hepatocellular carcinoma. *Cancer Genet Cytogenet*, **198**, 118-125.
- Tsukahara, T., Nabeta, Y., Kawaguchi, S., Ikeda, H., Sato, H., Shimozawa, K., Ida, K., Asanuma, H., Hirohashi, Y., Torigoe, T., Hiraga, H., Nagoya, S., Wada, T., Yamashita, T. and Sato, N.** (2004) Identification of human autologous cytotoxic T-lymphocyte-defined osteosarcoma gene that encodes a transcriptional regulator, papillomavirus binding factor. *Cancer Res*, **64**, 5442-5448.
- Unterholzner, L., Keating, S.E., Baran, M., Horan, K.A., Jensen, S.B., Sharma, S., Sirois, C.M., Jin, T., Latz, E., Xiao, T.S., Fitzgerald, K.A., Paludan, S.R. and Bowie, A.G.** (2010) IFI16 is an innate immune sensor for intracellular DNA. *Nat Immunol*, **11**, 997-1004.
- Vervoorts, J., Lüscher-Firzlaff, J. and Lüscher, B.** (2006) The ins and outs of MYC regulation by posttranslational mechanisms. *J Biol Chem*, **281**, 34725-34729.
- Vilcek J.** (2006) Fifty years of interferon research: aiming at a moving target. *Immunity*, **25**, 343-348.
- Wacher, C., Muller, M., Hofer, M.J., Getts, D.R., Zabarar, R., Ousman, S.S., Terenzi, F., Sen, G.C., King, N.J. and Campbell, I.L.** (2007) Coordinated regulation and widespread cellular expression of interferon-stimulated genes (ISG) ISG-49, ISG-54, and ISG-56 in the central nervous system after infection with distinct viruses. *J Virol*, **81**, 860–871.
- Wang, H., Brown, J. and Martin, M.** (2011) Glycogen synthase kinase 3: a point of convergence for the host inflammatory response. *Cytokine*, **53**, 130-140.
- Wang, X. et al.** (2007) Ubiquitination of serine, threonine, or lysine residues on the cytoplasmic tail can induce ERAD of MHC-I by viral E3 ligase mK3. *J Cell Biol*, **177**, 613–624.
- Webb, J., Coleman, M. and Pugh, C.** (2009). Hypoxia, hypoxia-inducible factors (HIF), HIF hydroxylases and oxygen sensing. *Cell Mol Life Sci*, **66**, 3539–3554.
- Wilker, P.R., Kohyama, M., Sandau, M.M., Albring, J.C., Nakagawa, O., Schwarz, J.J. and Murphy, K.M.** (2008) Transcription factor Mef2c is required for B cell proliferation and survival after antigen receptor stimulation. *Nat Immunol*, **9**, 603-612.
- Williams, C., van den Berg, M., Sprenger, R. R. and Distel, B.** (2007) A conserved cysteine is essential for Pex4p-dependent ubiquitination of the peroxisomal import receptor Pex5p. *J Biol Chem*, **282**, 22534–22543.

- Woronicz, J.D., Gao, X., Cao, Z., Rothe, M. and Goeddel, D.V.** (1997) I κ B kinase- β : NF- κ B activation and complex formation with I κ B kinase- α and NIK. *Science*, **278**, 866-869.
- Wu, C.J., Conze, D.B., Li, T., Srinivasula, S.M., and Ashwell, J.D.** (2006). Sensing of Lys 63-linked polyubiquitination by NEMO is a key event in NF- κ B activation. *Nat Cell Biol*, **8**, 398–406.
- Wu, J.Q., Dwyer, D.E., Dyer, W.B., Yang, Y.H., Wang, B. and Saksena, N.K.** (2008) Transcriptional profiles in CD8+ T cells from HIV+ progressors on HAART are characterized by coordinated up-regulation of oxidative phosphorylation enzymes and interferon responses. *Virology*, **380**, 124-135.
- Xia, Y., Padre, R.C., De Mendoza, T.H., Bottero, V., Tergaonkar, V.B. and Verma, I.M.** (2009) Phosphorylation of p53 by I κ B kinase 2 promotes its degradation by beta-TrCP. *Proc Natl Acad Sci USA*, **106**, 2629-2634.
- Xin, H., Curry, J., Johnstone, R.W., Nickoloff, B.J. and Choubey, D.** (2003) Role of IFI 16, a member of the interferon-inducible p200-protein family, in prostate epithelial cellular senescence. *Oncogene*, **22**, 4831-4840.
- Xin, H., Pereira-Smith, O.M. and Choubey, D.** (2004) Role of IFI 16 in cellular senescence of human fibroblasts. *Oncogene*, **23**, 6209-6217.
- Xu, C., Kim, N.G. and Gumbiner, B.M.** (2009) Regulation of protein stability by GSK3 mediated phosphorylation. *Cell Cycle*, **8**, 4032-4039.
- Yabe, H., Tsukahara, T., Kawaguchi, S., Wada, T., Sato, N. and Morioka, H.** (2008) Overexpression of papillomavirus binding factor in Ewing's sarcoma family of tumors conferring poor prognosis. *Oncol Rep*, **19**, 129-134.
- Yamaoka, S., Courtois, G., Bessia, C., Whiteside, S.T., Weil, R., Agou, F., Kirk, H.E., Kay, R.J. and Israël, A.** (1998) Complementation cloning of NEMO, a component of the I κ B kinase complex essential for NF- κ B activation. *Cell*, **93**, 1231-1240.
- Yang, C.K., Kim, J.H., Li, H. and Stallcup, M.R.** (2006) Differential use of functional domains by coiled-coil coactivator in its synergistic coactivator function with beta-catenin or GRIP1. *J Biol Chem*, **281**, 3389-3397.
- Yang, L., Mohr, I., Clark, R. and Botchan, M.** (1993) The E1 protein of bovine papillomavirus 1 is an ATP-dependent DNA helicase. *Proc Natl Acad Sci USA*, **90**, 5086-5090.
- Yang, X.J. and Seto, E.** (2008) Lysine acetylation: codified crosstalk with other posttranslational modifications. *Mol Cell*, **31**, 449-461.
- Yaron, A., Hatzubai, A., Davis, M., Lavon, I., Amit, S., Manning, A.M., Andersen, J.S., Mann, M., Mercurio, F. and Ben-Neriah, Y.** (1998) Identification of the receptor component of the I κ B α -ubiquitin ligase. *Nature*, **396**, 590-594.
- Yook, J.I., Li, X.Y., Ota, I., Fearon, E.R. and Weiss SJ.** (2005) Wnt-dependent regulation of the E-cadherin repressor snail. *J Biol Chem*, **280**, 11740-11748.

- Yook, J.I., Li, X.Y., Ota, I., Hu, C., Kim, H.S., Kim, N.H., Cha, S.Y., et al,** (2006) A Wnt-Axin2-GSK3beta cascade regulates Snail1 activity in breast cancer cells. *Nat Cell Biol*, **8**, 1398-1406.
- Zandi, E., Rothwarf, D.M., Delhase, M., Hayakawa, M. and Karin, M.** (1997) The IkkappaB kinase complex (IKK) contains two kinase subunits, IKKalpha and IKKbeta, necessary for IkkappaB phosphorylation and NF-kappaB activation. *Cell*, **91**, 243-252.
- Zarubin, T. and Han, J.** (2005) Activation and signaling of the p38 MAP kinase pathway. *Cell Res*, **15**, 11-18.
- Zhang, Y., Iratni, R., Erdjument-Bromage, H., Tempst, P., and Reinberg, D.** (1997) Histone deacetylases and SAP18, a novel polypeptide, are components of a human Sin3 complex. *Cell*, **89**, 357-364.
- Zhang, Y., Sun, Z.W., Iratni, R., Erdjument-Bromage, H., Tempst, P., Hampsey, M., and Reinberg, D.** (1998) SAP30, a novel protein conserved between human and yeast, is a component of a histone deacetylase complex. *Mol Cell*, **1**, 1021-1031.
- Zhou BP, Deng J, Xia W, Xu J, Li YM, Gunduz M, Hung MC.** (2004) Dual regulation of Snail by GSK-3beta-mediated phosphorylation in control of epithelial-mesenchymal transition. *Nat Cell Biol*, **6**, 931-940.
- Zhu, H., Cong, J.P. and Shenk, T.** (1997) Use of differential display analysis to assess the effect of human cytomegalovirus infection on the accumulation of cellular RNAs: induction of interferon-responsive RNAs. *Proc Natl Acad Sci USA*, **94**, 13985-13990.

7 Abkürzungsverzeichnis

Abb.	Abbildung
AK	Antikörper
APC/C	<i>anaphase-promoting complex/cyclosome</i>
APS	Ammoniumpersulfat
AS	Aminosäure
bp	Basenpaare
BS	Bindestelle
BSA	Bovines Serumalbumin
CBP	<i>CREB binding protein</i>
CMV	Cytomegalovirus
CREB	<i>cAMP responsive element binding protein</i>
Da	Dalton
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP's	Desoxynukleotide
Dox	Doxycyclin
ds	doppelsträngig
DTT	Dithiothreitol
ECL	<i>Enhanced chemiluminescence</i>
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
EGTA	Ethylen-Glycol-bis(β -aminoethylether)
EGF	<i>Epidermal growth factor</i>
ERK	<i>extracellular signal-regulated kinase</i>
et al.	und andere
FIH	<i>factor inhibiting HIF</i>
GSK3	Glykogen Synthase Kinase 3
GST	Glutathion-S-Transferase
FCS	Fötales Kälberserum
g	Erdbeschleunigung
GEF	<i>GLUT4 Enhancer Factor</i>
GIG1	<i>Glucocorticoid Induced Gene</i>
h	Stunde
HAT	Histonacetyltransferase
HBS	<i>Hepes buffered saline</i>
HEPES	N-2-Hydroxyethylpiperazin-N'-2-Ethansulfonsäure

HDAC	Histondeacetylase
HDBP2	<i>Huntington Disease Binding Protein 2</i>
HIF	Hypoxie-induzierbarer Faktor
HPV	Humanes Papillomvirus
HRE	Hypoxie-responsive Elemente
IFN	Interferon
IgG	Immunglobulin G
IKK	I κ B Kinase
IP	Immunpräzipitation
IPTG	Isopropyl- β -D-Thiogalactopyranosid
IRF	<i>IFN regulatory factor</i>
ISG	Interferon-stimulierte Gene
ISRE	<i>interferon stimulated response element</i>
ivt	<i>in vitro</i> translatiert
kb	Kilobasen
kDa	Kilodalton
LSDB	<i>Low salt dilution buffer</i>
Luc	Luciferase
MAPK	<i>mitogen activated protein kinase</i>
MCS	<i>Multiple cloning side</i>
MLP	<i>major late promoter</i>
MEM	Modified Eagle Medium
mRNA	<i>messenger RNA</i>
NCR	<i>Non coding region</i>
OD	Optische Dichte
ORF	<i>Open reading frame</i>
ori	<i>origin of replication</i>
P	Phosphorylierung
PAG	Poly-Acrylamid-Gel
PAGE	Poly-Acrylamid-Gel-Elektrophorese
PAMP	Pathogen-assoziierte molekulare Muster
PBF	<i>Papillomavirus Binding Factor</i>
PBS	<i>Phosphate buffered saline</i>
PCAF	<i>p300/CBP associated factor</i>
PCR	<i>Polymerase chain reaction</i>
PHD	Prolylhydroxylasen
PI3K	Phosphatidylinositol 3- Kinase

PMSF	Phenylmethylsulfonylfluorid
POD	Peroxidase
Poly I:C	Polyinosinische-polycytidylische Säure
pRb	Retinoblastom-Protein
PV	Papillomvirus
RNA	Ribonukleinsäure
RLU	<i>Relative light unit</i>
rpm	<i>rounds per minute</i>
RT	Raumtemperatur
RT-PCR	<i>Reverse transcriptase polymerase chain reaction</i>
SAP30	Sin3-assoziiertes Polypeptid p30
SDS	Sodium-Dodecyl-Sulfat
S	Serin
Sec	Sekunde
Ser	Serin
STAT	<i>signal transducers and activators of transcription</i>
T	Threonin
T-ALL	akuten lymphoblastischen T-Zell Leukämie
TBST	<i>Tris buffered saline + Tween20</i>
TBK	<i>tank-binding kinase</i>
TEMED	N, N, N', N' - Tetramethylethylendiamin
Tet	Tetracyclin
TetO	Tet-Operator
Thr	Threonin
TLR	<i>toll-like receptor</i>
TNF	Tumor Nekrose Faktor
TRAF	TNFR-assoziierte Faktoren
TRIF	<i>TIR-domain-containing adaptor protein-inducing IFNβ</i>
TSA	Trichostatin A
TSC	<i>Tuberous sclerosis</i>
Ub	Ubiquitin(-ierung)
VHL	von Hippel-Lindau
VSIG	<i>viral stress-inducible genes</i>
wt	Wildtyp

8 Zusammenfassung

Genom-weite Expressionsanalysen fanden eine erhöhte Expression des bisher kaum charakterisierten Transkriptionsfaktors PBF (*Papillomavirus Binding Factor*, offizieller Gennamen ZNF395) in verschiedenen Krebstypen. Das Ziel dieser Arbeit war, die zellulären Gene von PBF zu identifizieren und die posttranslationale Kontrolle des Proteins näher zu untersuchen. Wie Microarray Analysen und qRT-PCR zeigten, induzierte die Überexpression von PBF die Transkription einer kleinen Gruppe von Interferon-stimulierten Genen, u.a. ISG56 und IFI44, sowie mehrerer Krebs-assoziierten Gene. Zur optimalen Aktivierung des ISG56 Promotors brauchte PBF beide ISREs (*interferon stimulated response element*), die im ISG56 Promotor vorliegen, wie mit Hilfe von transienten Transfektionen gezeigt wurde. Behandlung von Zellen mit TNF- α oder Poly I:C, einem doppelsträngigen RNA Analogon, die beide I κ B α Kinase (IKK) aktivieren, resultierte in der Degradation von rekombinantem PBF. Phosphorylierung von I κ B α durch IKK ist wichtig für die Aktivierung von NF- κ B. IKK reguliert auch andere Substrate, die an der Immunantwort und der Karzinogenese beteiligt sind. BMS-345541, ein spezifischer IKK Inhibitor, verhinderte die proteasomale Degradation von rekombinantem PBF und stabilisierte auch endogenes PBF. Dies weist daraufhin, dass Phosphorylierung von PBF durch IKK als Signal für dessen Ubiquitinierung und den proteasomalen Abbau dient. Es konnte gezeigt werden, dass die Aminosäuren S212/214/215 und T216 bei der Degradation involviert sind. Allerdings ist mindestens eine weitere Region in PBF an den IKK-abhängigen Abbau beteiligt. Inhibition von IKK durch BMS-345541 verminderte die PBF-vermittelte Aktivierung des ISG56 Promotors in transienten Transfektionen. Dies impliziert, dass die IKK-abhängige Phosphorylierung nicht nur die Degradation von PBF, sondern auch die transkriptionelle Aktivität induziert. Es könnte sich dabei um einen negativen Feedback-Mechanismus handeln, um sicherzustellen, dass die Aktivierung der Zielgene durch PBF gering und nur vorübergehend ist. Die Stabilität von PBF wurde ebenfalls durch Überexpression von Komponenten des Histondeacetylase (HDAC) Komplexes, SAP30 und HDAC1, die beide direkt mit PBF interagieren, erhöht. HDAC Aktivität ist essentiell bei der Immunantwort, während HDAC Inhibitoren spezifisch das Wachstum von Krebszellen hemmen. Die hier identifizierten Zielgene von PBF und die Signalwege, die die Stabilität von PBF kontrollieren, sind essentielle Komponenten der angeborenen Immunantwort und der Krebsentstehung. Dies untermauert eine funktionelle Rolle von PBF bei Krebs und der angeborenen Immunantwort.

9 Abstract

Genome-wide expression analysis found the so far poorly characterized transcription factor PBF (Papillomavirus Binding Factor, official gene symbol ZNF395) upregulated in various cancers. The aim of this work was to identify the cellular target genes of PBF and to study its post-translational control.

As shown by microarray analysis and real-time PCR, overexpressed PBF induced the transcription of a small subset of interferon-stimulated genes, including ISG56 and IFI44, as well as cancer-associated genes. Transient transfections revealed that both interferon-stimulated response elements (ISREs) present in the ISG56 promoter are required for optimal activation by PBF. Treatment of cells with TNF- α or poly I:C, the mimic of dsRNA, both activating I κ B α kinase (IKK), resulted in the degradation of recombinant PBF. Phosphorylation of I κ B α by IKK is crucial for the activation of NF- κ B. IKK also regulates other substrates that have roles in immunity and cancer. Specific IKK inhibition by BMS-345541 abolished the degradation of recombinant PBF and stabilized endogenous PBF as well. This suggests that phosphorylation by IKK marks PBF for ubiquitin mediated degradation. It could be demonstrated here that amino acids S212/214/215 and T216 are involved in the IKK dependent degradation although at least one additional protein region participates in this process as well. Furthermore, inhibition of IKK by BMS-345541 reduced PBF mediated activation of the ISG56 promoter, which implies that IKK dependent phosphorylation induces not only the degradation of PBF, but also is required to allow activation of transcription. This may represent a negative feedback to ensure that the activation of target genes by PBF is weak and transient. Overexpressed components of the histone deacetylase complex, SAP30 and HDAC1, both interacting directly with PBF, also enhanced the stability of PBF and thus contribute to the post-translational control of PBF. HDAC activity is essential for the immune response, while HDAC inhibitors specifically inhibit the growth of cancer cells. The identified target genes of PBF and the pathways controlling the stability of PBF are essential components of the innate immune response and in carcinogenesis, which support a functional relevance of PBF in these pathways.

10 Danksagung

Frau Dr. Gertrud Steger möchte ich meinen besonderen Dank - in vielerlei Hinsicht - widmen. Ich danke zunächst für die mir eingeräumte Möglichkeit, diese Arbeit in Ihrer Arbeitsgruppe durchzuführen. Umso mehr bin ich dankbar für die ehrlichen, unterstützenden Ratschläge, die mir zuteil wurden und ganz wesentlich zum Gelingen meiner Arbeit beigetragen haben. Letztlich danke ich Frau Dr. Steger für Ihre unmittelbare Art, die die Weichen für ein freundliches Arbeitsklima gelegt hat.

Bei Herrn Prof. Dr. Dr. h.c. Herbert Pfister bedanke ich mich für die konstruktive Kritik und die anregenden Diskussionen bezüglich meiner Arbeit und natürlich auch für die Betreuung der Promotion, wofür ich meinen Dank auch Prof. Dr. Thorsten Hoppe aussprechen möchte.

Ich danke Herrn Prof. Dr. Wolfgang Werr für die Bereitschaft den Prüfungsvorsitz meiner Disputation zu übernehmen.

Bei meinen Laborkolleginnen und Laborkollegen bedanke ich mich für das entspannte Arbeitsumfeld und für die wertvollen Tipps und Ratschläge. Ganz besonders danke ich Dali Lazic, Christine Herwartz, Anna Pawlowski, Baki Akgül, Martin Hufbauer und Melanie Balduin für die fachlichen und privaten Diskussionen.

Ich danke meinen Freunden, die mir auf ihre Art und Weise durch die stressige Zeit geholfen haben.

Ein ganz persönlicher Dank gilt meiner Familie, die immer unterstützend hinter mir stand.

Nicht zuletzt ein großes Dankeschön auch an die Deutsche Forschungsgemeinschaft (DFG) für die Förderung dieses Projekts.

11 Erklärung

Ich versichere, dass ich die von mir vorgelegte Dissertation selbständig angefertigt, die benutzten Quellen und Hilfsmittel vollständig angegeben und die Stellen der Arbeit- einschließlich Tabellen, Karten und Abbildungen -, die anderen Werken im Wortlaut oder dem Sinn nach entnommen sind, in jedem Einzelfall als Entlehnung kenntlich gemacht habe; dass diese Dissertation noch keiner anderen Fakultät oder Universität zur Prüfung vorgelegen hat; dass sie noch nicht veröffentlicht worden ist, sowie, dass ich eine solche Veröffentlichung vor Abschluss des Promotionsverfahrens nicht vornehmen werde. Die Bestimmungen dieser Promotionsordnung sind mir bekannt. Die von mir vorgelegte Dissertation ist von Herrn Prof. Dr. Dr. h.c. Herbert Pfister und Prof. Dr. Thorsten Hoppe betreut worden.

Köln, den 16. Dezember 2011

Darko Jordanovski