

Charakterisierung des Transkriptionsfaktors  
ZNF395/PBF  
im Rahmen der angeborenen Immunantwort

Inaugural-Dissertation

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

vorgelegt von  
Christine Herwartz  
aus Göttingen

November 2013, Köln Ehrenfeld

Berichterstatter:

Prof. Dr. Günter Plickert

Prof. Dr. Dr.h.c. Herbert Pfister

Tag der Disputation:

28.01.2014

|          |   |           |
|----------|---|-----------|
| <b>1</b> | <b>EINLEITUNG .....</b>   | <b>7</b>  |
| 1.1      | Das angeborene Immunsystem .....  | 7         |
| 1.1.1    | Monozyten und Makrophagen als zelluläre Komponente des angeborenen Immunsystems ..... | 7         |
| 1.1.2    | Der Interferon Signalweg .....  | 9         |
| 1.1.3    | IKK als eine Komponente des NF- $\kappa$ B Signalwegs .....                           | 12        |
| 1.2      | Hypoxie .....   | 13        |
| 1.3      | Das zelluläre Protein ZNF395/PBF .....  | 16        |
| 1.3.1    | ZNF395 aktiviert die Transkription IFN-stimulierter und Krebs-assoziiertes Gene ..... | 17        |
| 1.3.2    | ZNF395 ist ein potentielles Zielprotein von IKK .....                                 | 18        |
| 1.4      | ZNF395 als Zielgen Hypoxie- und Krebs-assoziiertes Signalwege .....                   | 18        |
| 1.5      | Zielsetzung der Arbeit .....  | 19        |
| <b>2</b> | <b>MATERIAL UND METHODEN .....</b>  | <b>20</b> |
| 2.1      | Bakterienstämme .....   | 20        |
| 2.2      | Eukaryote Zellen .....  | 20        |
| 2.3      | Nukleinsäuren .....   | 21        |
| 2.3.1    | Synthetisch hergestellte Oligonukleotide .....  | 21        |
| 2.3.2    | Prokaryote Expressionsvektoren .....  | 23        |
| 2.3.3    | Reporterplasmide .....  | 23        |
| 2.3.4    | Eukaryote Expressionsvektoren .....   | 24        |
| 2.3.5    | Expressionsvektoren für Transkriptionsfaktoren/Proteine .....                         | 24        |
| 2.3.6    | DNA-Längenstandards .....   | 25        |
| 2.3.7    | Sonstige Nukleinsäuren .....  | 26        |
| 2.4      | Proteine .....  | 26        |
| 2.4.1    | Enzyme .....  | 26        |
| 2.4.2    | Größenstandards .....   | 26        |
| 2.4.3    | Antiseren .....   | 26        |
| 2.4.3.1  | Primär-Antikörper .....   | 26        |
| 2.4.3.2  | Sekundär-Antikörper .....   | 28        |
| 2.5      | Protease- und Phosphatase Inhibitoren .....   | 28        |
| 2.6      | Medien und Antibiotika für die Kultivierung von Bakterien .....                       | 29        |
| 2.6.1    | Medien und Zusätze für die Kultivierung eukaryoter Zellen .....                       | 30        |
| 2.7      | Sonstige Reagenzien .....   | 31        |
| 2.7.1    | Puffer und Lösungen .....   | 32        |
| 2.7.2    | Sonstige Chemikalien und Materialien .....  | 35        |
| 2.7.3    | Reagenziensysteme (Kits) .....  | 35        |
| 2.8      | Verwendete Geräte .....   | 36        |

|          |   |           |
|----------|---|-----------|
| <b>3</b> | <b>METHODEN .....</b>   | <b>37</b> |
| 3.1      | Bakterienkultur .....   | 37        |
| 3.1.1    | Herstellung transformationskompetenter Bakterien .....                      | 37        |
| 3.1.2    | Transformation kompetenter Bakterien .....                                  | 37        |
| 3.1.3    | Kulturen zur Plasmidisolierung .....  | 37        |
| 3.1.4    | Langzeitlagerung von Bakterien .....  | 38        |
| 3.2      | Zellkulturmethoden .....  | 38        |
| 3.2.1    | Kultivierung eukaryoter Zellen .....  | 38        |
| 3.2.2    | Einfrieren und Lagerung von Zellen .....                                    | 38        |
| 3.2.3    | Zellzahlbestimmung .....  | 39        |
| 3.2.4    | Transfektion eukaryoter Zellen mit Plasmid-DNA .....                        | 39        |
| 3.2.4.1  | Transiente Transfektion mittels Calciumphosphat-Präzipitation .....         | 39        |
| 3.2.4.2  | Transiente Transfektion mittels „FuGENE“ oder „X-tremeGene9“ .....          | 39        |
| 3.2.5    | Hypoxie-Behandlung von Zellen .....   | 40        |
| 3.2.6    | Knockdown Experimente“: RNA Interferenz zum Ausschalten von Zielgenen ..... | 40        |
| 3.2.7    | Ernte der transfizierten Zellen .....                                       | 41        |
| 3.2.7.1  | Ernte durch physikalischen Zellaufschluss .....                             | 41        |
| 3.2.7.2  | Ernte durch chemischen Zellaufschluss .....                                 | 41        |
| 3.2.8    | Bestimmung der Luziferase-Aktivität .....                                   | 41        |
| 3.3      | DNA-Methoden .....  | 42        |
| 3.3.1    | Plasmidpräparationen .....  | 42        |
| 3.3.2    | DNA-Sequenzierung .....   | 42        |
| 3.3.3    | Polymerase-Kettenreaktion (PCR) mit KOD extreme .....                       | 43        |
| 3.3.4    | DNA Standardmethoden .....  | 43        |
| 3.3.5    | Quantitative Echtzeit-PCR .....   | 44        |
| 3.3.6    | <i>In vitro</i> Mutagenese .....  | 45        |
| 3.4      | RNA-Methoden .....  | 46        |
| 3.4.1    | RNA-Isolierung .....  | 46        |
| 3.5      | Proteinmethoden .....   | 47        |
| 3.5.1    | Herstellung von Ganzzellextrakten .....                                     | 47        |
| 3.5.2    | Quantitative Proteinbestimmung .....  | 47        |
| 3.5.3    | Affinitäts-chromatographische Reinigung des ZNF395-Antiserums .....         | 47        |
| 3.5.4    | Proteininduktion .....  | 48        |
| 3.5.5    | Behandlung von Ganzzellextrakt mit $\lambda$ -Phosphatase .....             | 48        |
| 3.5.6    | Western Blots .....   | 48        |
| 3.5.7    | Strippen von Western Blots .....  | 49        |
| 3.6      | Histologische Untersuchungen von Paraffin-gebetteten Gewebeschnitten .....  | 49        |
| 3.6.1    | Immunfluoreszenzfärbung .....   | 49        |
| 3.6.2    | Immunhistochemische Färbung .....   | 50        |

|          |  |            |
|----------|--|------------|
| <b>4</b> | <b>ERGEBNISSE .....</b>  | <b>51</b>  |
| 4.1      | ZNF395 ist in Tumorgeweben exprimiert.....   | 51         |
| 4.1.1    | ZNF395 ist in Tumor-infiltrierenden CD14 <sup>+</sup> Monozyten und CD79a <sup>+</sup> B-Lymphozyten exprimiert .....  | 54         |
| 4.1.2    | ZNF395 Expression nimmt im Zuge der Differenzierung von prämonozytären U937 zu Makrophagen ab.....   | 57         |
| 4.2      | Analyse des Promotors von ZNF395.....  | 59         |
| 4.2.1    | Klonierung der regulatorischen Region von ZNF395.....  | 59         |
| 4.2.2    | HIF1 $\alpha$ und C/EBP $\beta$ kooperieren bei der Aktivierung der ZNF395 Expression.....   | 60         |
| 4.2.3    | Aktivierung des ZNF395 Promotors erfolgt durch die LAP*-Isoform von C/EBP $\beta$ .....  | 62         |
| 4.3      | Knockdown Experimente .....  | 65         |
| 4.3.1    | SiRNA basierter Knockdown von C/EBP $\beta$ führt zu reduzierter Expression von ZNF395 in U87MG-Zellen .....   | 65         |
| 4.3.2    | ZNF395 Expression wird in U87MG-Zellen durch Hypoxie induziert und benötigt dafür kein C/EBP $\beta$ ...   | 67         |
| 4.4      | ZNF395 ist ein Zielgen von HIF1 $\alpha$ .....   | 70         |
| 4.4.1    | Hypoxie-induzierte Expression von ZNF395 in verschiedenen Zelllinien variiert.....   | 70         |
| 4.4.2    | Knockdown des Transkriptionsfaktors HIF1 $\alpha$ verhindert die Hypoxie-Induktion von ZNF395.....   | 72         |
| 4.4.3    | HIF1 $\alpha$ und ZNF395 Expression findet in den selben Zellen des Tumorstromas statt.....  | 74         |
| 4.5      | ZNF395 wird durch IKK phosphoryliert.....  | 75         |
| 4.5.1    | IKK Knockdown führt zur Stabilisierung des endogenen ZNF395 .....  | 75         |
| 4.5.2    | ZNF395-vermittelte Aktivierung des ISG56-Promotors benötigt Kinaseaktivität von IKK $\alpha$ und IKK $\beta$ .....   | 76         |
| 4.5.3    | Posttranskriptionale Modifikation von ZNF395 unter Hypoxie .....   | 79         |
| 4.6      | ZNF395 aktiviert Interferon-stimulierte Gene .....   | 81         |
| 4.6.1    | Effiziente Aktivierung der Interferon-stimulierten Gene ISG56, IFI44, IFI16 und IFIT2 durch IFN $\alpha$ benötigt ZNF395 .....   | 82         |
| 4.6.2    | Effiziente Aktivierung der Interferon-regulierten Gene ISG56, IFI44, IFI16 und IFIT2 durch das dsRNA Analogon Poly (I:C) benötigt ZNF395.....  | 85         |
| 4.6.3    | Acetylierung hemmt die IFN $\alpha$ -Stimulierbarkeit von ISG56, IFI44, IFI16 und IFIT2 .....  | 86         |
| 4.6.4    | Überexpression von ZNF395 resultiert in verstärkter IFN $\alpha$ -induzierter Aktivierung von ISG56, IFI44, IFI16 und IFIT2, verändert aber nicht durch TSA vermittelte Effekte..... | 89         |
| <b>5</b> | <b>DISKUSSION.....</b>   | <b>92</b>  |
| <b>6</b> | <b>LITERATURVERZEICHNIS.....</b>   | <b>102</b> |
| 6.1      | Dissertationen .....   | 102        |
| 6.2      | Bücher.....  | 102        |
| 6.3      | Fachjournale.....  | 102        |
| <b>7</b> | <b>ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS .....</b>   | <b>114</b> |

|           |                              |            |
|-----------|------------------------------|------------|
| <b>8</b>  | <b>ZUSAMMENFASSUNG .....</b> | <b>117</b> |
| <b>9</b>  | <b>ABSTRACT .....</b>        | <b>119</b> |
| <b>10</b> | <b>DANKSAGUNG .....</b>      | <b>121</b> |
| <b>11</b> | <b>ERKLÄRUNG .....</b>       | <b>123</b> |

# 1 Einleitung

## 1.1 Das angeborene Immunsystem

Das humane Immunsystem ist ein koordiniertes Netzwerk zur Abwehr potentieller Pathogene, die eine Gewebeschädigung auslösen können.

Das angeborene Immunsystem stellt dabei eine primäre, schnelle aber unspezifische Abwehrreaktion dar und verfolgt die Strategie des: „Erkennen und Zerstörens“ von Fremdem oder Entartetem (O'Farrelly et al. 2007). Das adaptive Immunsystem hingegen detektiert Pathogene zielgerichteter und reagiert mit spezifischem Abtöten der Pathogene durch die humorale und zellvermittelte Immunantwort (Dempsey et al., 2003).

Das angeborene Immunsystem besteht aus drei Komponenten. Eine äußere Barriere stellen die Epithelgewebe der Haut bzw. der Schleimhaut des Gastrointestinaltrakts, des respiratorischen und des reproduktiven Systems dar. Zur zweiten Komponente zählen im Blut zirkulierende lösliche antimikrobielle Faktoren, wie die Akut-Phase-Proteine, das Komplementsystem und die Zytokine (O'Farrelly et al. 2007). Diese sorgen zum einen für eine lokale Verbreitung des Signals eines eingedrungenen Pathogens, zum anderen verhindern sie eine Ausbreitung in entfernte Gewebe. Die dritte Komponente des angeborenen Immunsystems bilden die Leukozyten. Sie reifen aus im Knochenmark gebildeten, teilungsunfähigen myeloiden Vorläuferzellen und differenzieren, je nach Stimulus zu Dendritischen Zellen, Mastzellen, Neutrophilen, Granulozyten, Natürlichen Killer-Zellen und zu Monozyten, die im Rahmen von Entzündungsreaktionen zu Makrophagen reifen. Leukozyten koordinieren Prozesse, wie Antigenpräsentation, Sezernierung von Zytokinen und toxischen Reagenzien sowie Phagozytose. Induziert wird dies durch bakterielle und virale Pathogene, mechanische und chemische Reize, sowie Krebs oder Autoimmunkrankheiten (Coussens und Werb 2002).

### 1.1.1 Monozyten und Makrophagen als zelluläre Komponente des angeborenen Immunsystems

Monozyten und Makrophagen bilden das sogenannte mononukleäre Phagozytosesystem, das primär dem Erkennen, der Signalweiterleitung und der Phagozytose eingedrungener Pathogene dient (Huber et al., 2012; Liaskou et al., 2012). Monozyten zirkulieren zunächst im Blut- und Lymphsystem und sind als Immuneffektorzellen mit den „Pattern Recognition Receptors“ (PRR) ausgestattet. Gelangen Pathogene wie Viren, Bakterien, Pilze oder

Parasiten trotz äußerer Epithelbarriere in den Organismus, werden diese über die PRRs anhand von charakteristischen Mustern, den sogenannten PAMPs (pathogen associated molecular patterns) von den Zellen erkannt (Kawai und Akira 2008; Vadillo und Pelayo 2012). Monozyten sind hierbei initial in der Lage toxische Moleküle aufzunehmen und inflammatorische Zytokine zu produzieren, um weitere Immunzellen zu rekrutieren (Huber et al., 2012). Die Zellen erkennen über ihre spezifischen Rezeptoren im Zuge von Entzündungen sezernierte Chemokine. Chemotaktisch angelockt infiltrieren sie die peripheren Gewebe (Gordon und Taylor 2005; Geissmann et al., 2010). Erfolgt im Zuge einer Entzündungsreaktion eine Stimulierung der Monozyten mit Zytokinen des T-Helfer 1 ( $T_H1$ )-Typs wie GM-CSF (granulocyte macrophage colony-stimulating factor), M-CSF, IFN- $\gamma$  (Interferon  $\gamma$ ), TNF (Tumornekrosefaktor), IL-1 $\beta$  (Interleukin  $\beta$ ) oder LPS (Lipopolysaccharid gramnegativer Bakterien), reifen diese zu pro-inflammatorischen Makrophagen. Diese sind maßgeblich an der Zerstörung infizierter Zellen und Tumorzellen beteiligt, um die Entzündung aufzulösen und eine Homöostase des betroffenen Gewebes wieder herzustellen (Gordon 2003; Mantovani et al., 2005; Parihar et al., 2010).

Die Stimulation zur Differenzierung von Monozyten zu Makrophagen wird hauptsächlich durch Zytokine des CSF-Typs gesteuert. Die Bindung der Liganden an den CFR-1-Rezeptor initiiert ein Programm zur Aktivierung der Transkriptionsfaktoren PU.1 (*purine-rich nucleic acid binding protein 1*), RUNX1 (früher auch AML-1 (acute myeloid leukemia 1 protein) genannt), und der Familie der C/EBPs (CCAAT/enhancer-binding-protein) (Hume 2008), die die Differenzierung einleiten.

Die C/EBPs sind eine Transkriptionsfaktor Familie, die aus sechs verschiedenen Mitgliedern ( $\alpha, \beta, \gamma, \delta, \epsilon, \zeta$ ) besteht. C/EBP $\alpha$  wurde erstmals über seine Fähigkeit an die Sequenz CCAAT in den Promotoren verschiedener DNA Viren zu binden, identifiziert (Landschulz et al., 1988). C/EBP $\beta$  wurde 1990 als bZIP-Dimerisierungsdomänen-Protein gefunden, das an IL-1 responsive Elemente im IL-6 Promotor bindet, wodurch es zunächst "nuclear factor for IL-6 (NF-IL6) genannt wurde (Wilson et al., 1990). C/EBP $\alpha$ , C/EBP $\beta$  und die übrigen Familienmitglieder weisen starke Homologien zueinander auf. Neben der Expression in Geweben wie Lunge, Leber, Niere, Milz etc. sind die Mitglieder in Monozyten und Makrophagen stark exprimiert (Williams et al., 1991; Katz et al., 1993). C/EBP $\beta$  spielt eine essenzielle Rolle bei der Regulation der Monozyten Genexpression. Seine Expression und Aktivierung ist durch ein komplexes Netzwerk transkriptionaler Mechanismen, translationaler Isoformen (siehe Kapitel 4.2.3.), posttranskriptionaler Modifikationen und Protein-Protein Wechselwirkungen kontrolliert. Im Verlauf der Differenzierung wird die Menge an C/EBP $\beta$  in den Zellen erhöht. Die Zielgene des Transkriptionsfaktors sind u.a. Zytokine wie TNF $\alpha$ , IL-

1 $\beta$ , IL-6 und IL-16, Chemokine, Rezeptorproteine, pro-inflammatorische Gene und Gene, die an Proliferations- und Differenzierungsprozessen beteiligt sind (Poli 1998; Huber et al., 2012). Es wurde gezeigt, dass C/EBP $\beta$  die Proliferation der Monozyten inhibiert und dadurch Differenzierung eingeleitet werden kann, indem es den Retinoblastom/E2F/CyclinE Komplex beeinflusst (Gutsch et al., 2011). Auch C/EBP $\alpha$  ist in Monozyten an der Koordination der Balance zwischen Proliferation und Differenzierung beteiligt. So konnte gezeigt werden, dass Mutationen in den meisten Fällen zu akuter myeloider Leukämie (AML) führen (Wang et al., 2012). Hingegen resultierte eine Überexpression von C/EBP $\alpha$  in myeloiden Vorläuferzellen in direkter Differenzierung zu Monozyten (Tsukada et al., 2011; Huber et al., 2012).

### 1.1.2 Der Interferon Signalweg

Ein Kontakt mit Viren führt in Immunzellen zu einer Signalkaskade, die zum einen ein antivirales Immunprogramm in der infizierten Zelle initiiert und zum anderen die Expression und Sezernierung von Interferonen (IFN) induziert. Diese Zytokine aktivieren umliegende virusinfizierte sowie nichtinfizierte Zellen, indem sie auch in diesen Zellen ein antivirales Genprogramm hervorrufen. Zu dem zählt maßgeblich die Aktivierung hunderter IFN-regulierter Gene, deren Produkte unter anderem die virale Replikation und Proteinsynthese unterbinden (Goubau et al., 2013).

Ein PRR, der eine zentrale Rolle in der antiviralen Reaktion spielt, ist der Toll-like Rezeptor 3 (TLR3), der intrazellulär auf der Oberfläche von Endosomen lokalisiert ist (Abb. 1). Dieser erkennt doppelsträngige RNA (dsRNA) als ein molekulares Muster, das mit viraler Infektion assoziiert ist, da dsRNA häufig als ein Zwischenprodukt bei der viralen Replikation entsteht (Schroder und Bowie 2005). Die zytoplasmatische Domäne des TLR3 wird Toll/IL-1R (TIR) genannt und vermittelt, nach Bindung der dsRNA-Liganden, die Interaktion der Rezeptoren mit dem Adaptermolekül TRIF (TIR-domain-containing adaptor protein-inducing IFN $\beta$ ). TRIF assoziiert spezifisch mit weiteren Proteinen und leitet dadurch zwei unabhängige Signalkaskaden ein, die zur Aktivierung von NF- $\kappa$ B (nuclear factor 'kappa-light-chain-enhancer' of activated B-cells) und von IRF3 und IRF7 (Interferon regulatory factor 3 bzw. 7) führen (Schroder und Bowie 2005; Meylan et al., 2006; Ning et al., 2011). Eine schematische Darstellung des IFN-Signalweges ist in Abb. 1 dargestellt.

Wird TRIF an seiner N-terminalen Domäne von TRAF6 (TNF-receptor-associated factor) gebunden, so wird über die Assoziation mit TAK1 (TGF- $\beta$ -activated kinase) die Freisetzung und Aktivierung des NF- $\kappa$ B mit seinen Untereinheiten p50/p65 initiiert. Nach Translokation in den Zellkern aktiviert NF- $\kappa$ B als Master-Regulator des angeborenen Immunsystems und von Entzündungsprozessen Gene, die wichtig sind bei der Immunantwort, aber auch Gene, die

für Prozesse wie Onkogenese, Embryonalentwicklung, Proliferation und Apoptose von Bedeutung sind (Hayden und Ghosh 2011; Zheng et al., 2011).

In nicht stimulierten, gesunden Zellen ist NF- $\kappa$ B an seinen Inhibitor I $\kappa$ B $\alpha$  (Inhibitor des nuclear transcription factor NF- $\kappa$ B) gebunden. Der Inhibitor maskiert die NLS, wodurch NF- $\kappa$ B im Zytoplasma verbleibt (Huang und Miyamoto 2001; Hayden und Ghosh 2011; Napetschnig und Wu 2013). Eine essentielle Komponente bei der Aktivierung des NF- $\kappa$ B Signalweges spielt die I $\kappa$ B $\alpha$ -Kinase IKK. Die Bindung der Rezeptoren durch ihre Liganden, wie virale dsRNA, das Zytokin TNF $\alpha$  (Tumornekrosefaktor- $\alpha$ ) oder bakterielles LPS (Lipopolysaccharide gramnegativer Bakterien), führt über eine Kaskade zur Aktivierung von IKK. IKK phosphoryliert den Inhibitor von NF- $\kappa$ B, I $\kappa$ B $\alpha$ , was zu dessen Ubiquitin-abhängigen Degradation führt. Dies ermöglicht den Transport des NF- $\kappa$ B-Dimers in den Zellkern, wo es an die Konsensus-Sequenzen, die sich in den Promotoren seiner Zielgene befinden, binden kann und deren Expression reguliert (Baxter et al., 2006; Hayden und Ghosh 2008; Israel 2010).

Die Rekrutierung der TBK1 (TANK-binding Kinase-1) an TLR3 gebundenes TRIF hingegen induziert die Assoziation mit TRAF3 und der I $\kappa$ -B Kinase  $\epsilon$  (IKK $\epsilon$ ). Dies führt zur Phosphorylierung und der daraus resultierenden Aktivierung von IRF3 und IRF7 (Takeda und Akira 2004; Schroder und Bowie 2005; Ning et al., 2011). Phosphoryliertes IRF3 und IRF7 homodimerisieren und translozieren in den Zellkern und tragen gemeinsam mit NF- $\kappa$ B und ATF-2/c-Jun zur Expression der Typ-1 IFNs IFN $\alpha$  und IFN $\beta$  bei (Genin et al., 2009).

IRF7 ist zur Aktivierung von IFN $\alpha$  und IFN $\beta$  notwendig. Während IRF3 nicht in der Lage ist, die Transkription von IFN $\alpha$  zu induzieren, kann phosphoryliertes IRF3 direkt eine IFN-unabhängige Aktivierung der Expression von ISG56/IFIT1 (Interferon-induced protein with tetratricopeptide repeats 1) vermitteln, um eine schnelle und effiziente antivirale Immunantwort der infizierten Zelle zu gewährleisten (wie unten beschrieben), ohne erst die Synthese der IFN abzuwarten (Grandvaux et al., 2002; Akira et al., 2006). Die zeitgleiche Sezernierung von IFN $\alpha$  und  $\beta$  sorgt für eine rapide interzelluläre Verbreitung des Signals der viralen Infektion, da die Typ1 IFNs an die extrazelluläre Domäne der Interferon-spezifischen Transmembranrezeptoren IFNAR-1 und IFNAR-2 von Nachbarzellen binden. Dies führt zur Aktivierung des sogenannten JAK-STAT-Signalwegs, mit der Bildung und Aktivierung eines Transkriptionsfaktor-Komplexes, bestehend aus einem STAT1-STAT2-Heterodimer (Signal Transducer and Activator of Transcription) und IRF9 (Au-Yeung et al., 2013). Dieser sogenannte ISGF3-Komplex („IFN-stimulated gene factor 3 complex“) bindet an die ISREs („interferon stimulated response elements“), die sich in der promotorproximalen Region IFN-regulierter Gene befinden und induziert effizient ihre Expression (Sen und Sarkar 2007;

Wesoly et al., 2007; Liu et al., 2013). Für die Aktivierung IFN-regulierter Gene konnte gezeigt werden, dass die Rekrutierung des HDAC Komplexes nötig ist (Nusinzon und Horvath 2005). Sakamoto et al. beschrieben, dass eine Hemmung der HDACs durch TSA Behandlung zu verminderter IFN-Induktion von ISG56 und anderen IFN-stimulierten Genen führte (Sakamoto et al., 2004). Die genauen Mechanismen konnten dabei noch nicht aufgeklärt werden, und es ist nicht ausgeschlossen, dass noch weitere Faktoren an der Aktivierung der IFN-regulierten Gene von Bedeutung sind.

In den Promotoren IFN-regulierter Gene befinden sich eine oder mehrere Kopien der ISREs mit der Konsensussequenz AGTTTCNNTTTCC (Darnell et al., 1994). Heute sind einige hundert IFN-regulierte Gene bekannt (Randall und Goodbourn 2008). Zu den am frühesten entdeckten und klonierten Genen zählt die Familie der ISG56 Proteine, die neben ISG56/IFIT1 auch ISG54/IFIT2, ISG60/IFIT3 und ISG58/IFIT5 beinhaltet (Fensterl und Sen 2011). ISG56 hemmt verschiedene virale und zelluläre Prozesse wie z.B. Translation, Virusreplikation, Zellmigration und Proliferation (Fensterl und Sen 2011). Es wurde gezeigt, dass ISG56 die Translation zellulärer Gene über die Bindung des eukaryoten Translations-Initiationsfaktors eIF3 inhibiert und somit Mechanismen des Zellwachstums beeinflusst. Über die eIF3-Bindung inhibiert ISG56 auch die Translation der Hepatitis-C-Virus Proteine (Wang et al., 2003). Im Fall von HPV wird die virale DNA-Replikation über eine N-terminale Bindung von ISG56 mit den viralen E1-Proteinen verschiedener HPV-Typen gehemmt (Terenzi et al., 2008). ISG54/IFIT2 besitzt ebenfalls antivirale Aktivität und induziert Apoptose (Stawowczyk et al., 2011). Neben der ISG56 Familie zeigen auch viele andere IFN-regulierte Gene antivirale Effekte, wie z.B. IFI44 (Interferon-induced protein 44). IFI44 wurde als HCV-assoziiertes und IFN-induzierbares Gen gefunden (Kitamura et al., 1994) und zeigte nach Überexpression in Melanom-Zelllinien antiproliferative Effekte (Hallen et al., 2007).

Das streng regulierte Zusammenspiel verschiedener Faktoren, wie den Typ-1 IFNs, den Transkriptionsfaktoren IRF3 und 7, NF- $\kappa$ B und AP-1, die IFN-regulierte Gene aktivieren, trägt zu einer zielgerichteten antiviralen Immunantwort zum Schutz des Organismus bei.

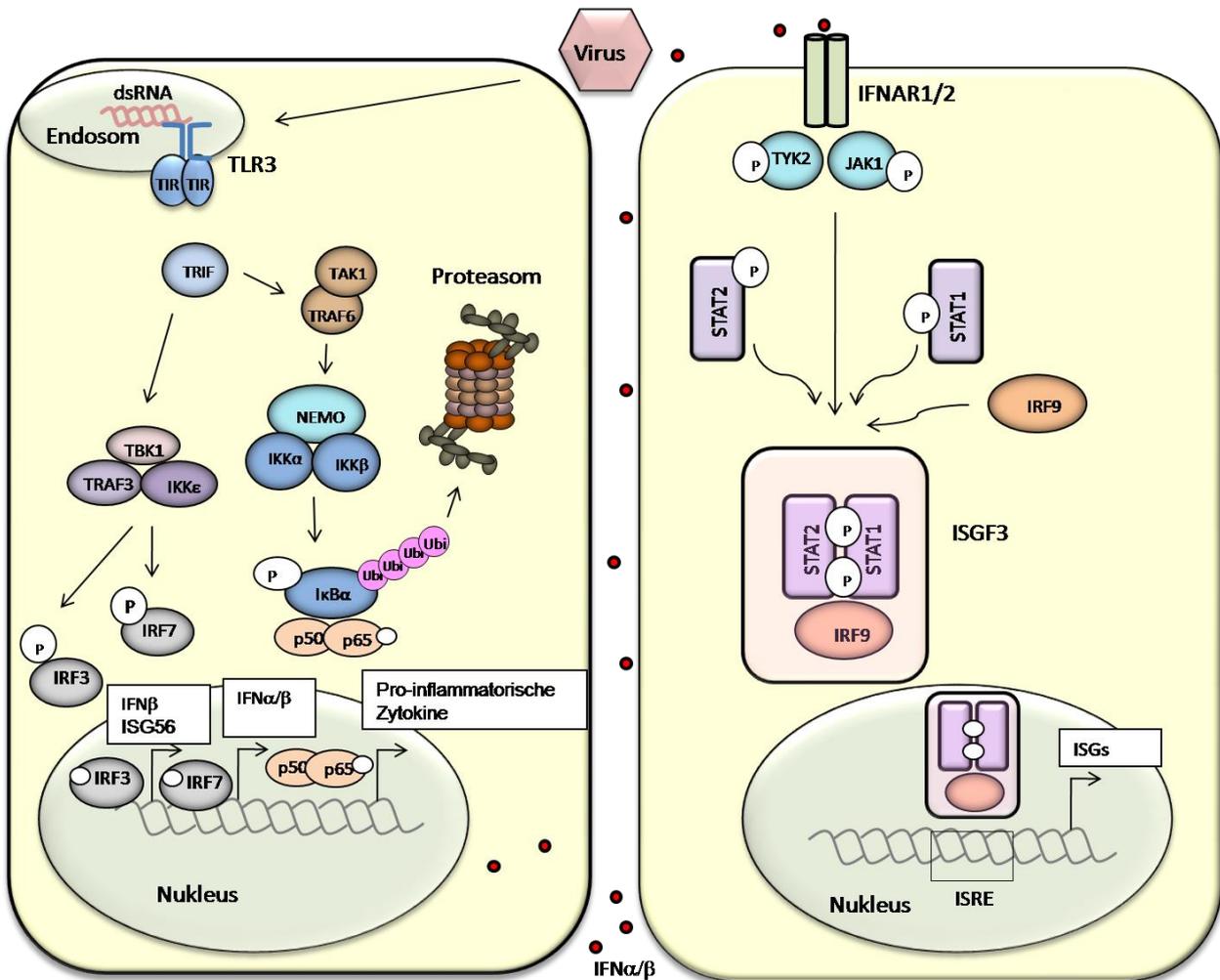


Abb. 1. Der IFN-Signalweg gewährleistet eine effiziente antivirale Immunantwort  
 Der TLR3 leitet über die Bindung seines Liganden dsRNA zwei über TRIF verlaufende Signalkaskaden ein, die die Aktivierung von IRF3 bzw. IRF7 und NF-κB induzieren. NF-κB aktiviert die Expression pro-inflammatorischer Zytokine. IRF3 und 7 Aktivierung resultiert in Expression der Typ-1-IFNs, gefolgt von deren Sezernierung, die eine interzelluläre antivirale Signalweiterleitung gewährleistet. Durch Bindung der IFNs an den IFN-Rezeptor der Nachbarzellen wird über den JAK-STAT Signalweg die Bildung des Transkriptionsfaktorkomplexes ISGF3 initiiert. Dieser aktiviert über die ISREs die Expression IFN-regulierter Gene, die eine antivirale Immunantwort einleiten. IRF3 kann auch direkt, über eine Bindung an die ISREs, die Expression von ISG56 aktivieren. Das Schema ist stark vereinfacht dargestellt und konzentriert sich auf die für das Verständnis dieser Arbeit notwendigen Komponenten. Modifiziert nach (Chevaliez und Pawlotsky 2007; Ozato et al., 2008)

### 1.1.3 IKK als eine Komponente des NF-κB Signalwegs

Der IKK Komplex besteht aus den beiden katalytischen Untereinheiten IKKα und IKKβ, sowie der regulatorischen IKKε-Untereinheit, die auch NEMO genannt wird. Im oben beschriebenen IKK/NF-κB Signalweg, dem kanonischen Signalweg, vermittelt IKKβ die haupt-katalytische Aktivität. Der IKK/NF-κB Signalweg ist in Zellen streng reguliert, denn eine Fehlsteuerung ist mit Autoimmunerkrankungen, chronischen Erkrankungen oder Krebs assoziiert (Napetschnig und Wu 2013).

Neben  $I\kappa\text{-B}\alpha$  hat  $IKK\beta$  weitere Substrate, die die  $IKK$ -Aktivität in  $\text{NF-}\kappa\text{B}$ -unabhängigen Prozessen, wie z.B. DNA-Reparatur, Allergien oder Tumorentwicklung vermitteln.  $IKK\beta$  phosphoryliert u.a. das Tumorsuppressorprotein p53, wodurch der E3-Ligase Komplex rekrutiert und das polyubiquitinierte Protein proteasomal degradiert wird. Dies führt zur Eliminierung des Proteins, womit Tumorprogression gefördert wird (Xia et al., 2009).  $IKK\beta$  induziert Tumorprogression auch über die Phosphorylierung und daraus resultierende proteasomale Degradation des Foxo3a (Forkhead-Box-Protein O3), was eine Proliferation von Brustkrebs-Zelllinien induziert (Karin et al., 2002).  $IKK\beta$  führt hier zum Export von Foxo3a aus dem Nukleus mit anschließender Proteasom-vermittelter Degradation. Auch TSC1 (Tuberous sclerosis protein1) unterliegt der  $IKK\beta$ -vermittelten Phosphorylierung mit anschließender Degradation, wodurch mTOR aktiviert und Angiogenese in Tumoren gesteigert wird (Hu et al., 2004).

IRF7 hingegen wird spezifisch durch  $IKK\alpha$  phosphoryliert. Dies wird durch den TLR9 vermittelt und resultiert in  $\text{IFN}\beta$ -Expression. Zudem ist  $IKK\alpha$ -spezifische Phosphorylierung von p100 notwendig, um die Prozessierung zu p52, einer Untereinheit des  $\text{NF-}\kappa\text{B}$ , zu ermöglichen, wodurch RelB/p52 Dimere aktiviert werden, die diverse Chemokine aktivieren und wichtig sind für die Bildung lymphoider Organe (Bonizzi et al., 2004).

Viele  $\text{NF-}\kappa\text{B}$ -unabhängige  $IKK$ -Zielgene wurden bereits beschrieben. Doch die Identifizierung noch unbekannter Zielgene wird zum besseren Verständnis vieler Signalwege beitragen und steht daher laut Chariot unter besonderem Interesse der Forschung (Chariot 2009). Dereguliertes  $IKK\beta$  kann zur Tumorprogression beitragen, indem es Angiogenese fördert. Dadurch können neu gebildete Blutgefäße den proliferierenden Tumor mit Sauerstoff versorgen, was Karzinogenese fördert und daher mit schlechter Prognose für den Patienten einhergeht.

## 1.2 Hypoxie

Die Aufrechterhaltung der Sauerstoffhomöostase ist eine Voraussetzung für das Überleben von Zellen. Der Begriff Hypoxie bezeichnet eine Mangelversorgung von Geweben mit Sauerstoff ( $\text{O}_2$ ), wodurch die Homöostase gestört ist. Sie tritt vor allem an Stellen akuter Entzündungsreaktionen auf, wie bei viralen oder bakteriellen Infektionen, chronischen Erkrankungen, Verletzungen oder Krebserkrankungen (Wenger et al., 2005; Dewhirst et al., 2008).

Im Fall von soliden Tumoren ist Hypoxie das Resultat einer erhöhten Proliferation der Tumorzellen und gleichzeitig unzureichender Angiogenese, da Regionen des Tumors weit

von versorgenden Blutgefäßen entfernt liegen können (Rocha 2007; Murat et al., 2009). Um das Überleben eines proliferierenden Tumors unter sauerstoffarmen Bedingungen zu gewährleisten, führen Zellen verschiedene Adaptationen durch. Diese beinhalten Mechanismen, wie z.B. die verstärkte Einleitung der Angiogenese zur Generierung neuer Blutgefäße, Invasion der Zellen, die Erythropoese, Resistenz gegenüber oxydativem Stress und eine Verschiebung des Metabolismus durch Erhöhung der Glykolyse und Verringerung der mitochondrialen ATP-Gewinnung (Lal et al., 2001; Dewhirst et al., 2008; Semenza 2010). Die Atmungskette, die in der Mitochondrienmembran stattfindet, benötigt Sauerstoff als terminalen Elektronenakzeptor zur Produktion von ATP. Dies stellt den effizientesten Mechanismus der aeroben Energiegewinnung in Zellen dar. Der Metabolismus in soliden, hypoxischen Tumoren ist jedoch stark verändert. Während gesunde Gewebe lediglich 10% des erzeugten ATPs aus der Glykolyse erhalten und 90% durch die Atmungskette in den Mitochondrien produziert wird, werden in Tumorbereichen aufgrund des Sauerstoffmangels 50% der zellulären Energie aus der weniger effizienten Glykolyse gewonnen (Denko 2008). Das veränderte Genprogramm unter Sauerstoffmangel wird durch den Transkriptionsfaktor HIF koordiniert, der unter verringerten Sauerstoffkonzentrationen die Expression von mehr als 100 Genen initiiert, die an der Aufrechterhaltung der Sauerstoffhomöostase beteiligt sind (Lisy und Peet 2008; Liu et al., 2012; Tsai und Wu 2012). Auf transkriptionaler Ebene wird die Expression von HIF u.a. durch NF- $\kappa$ B im Zuge von Entzündungen kontrolliert (Rius et al., 2008).

HIF1 ist ein heterodimerer Komplex, der aus einer O<sub>2</sub>-regulierten HIF $\alpha$ -Untereinheit und einer konstitutiv exprimierten HIF $\beta$ -Untereinheit besteht. Beide gehören zu einer „basic Helix–Loop–Helix“ Transkriptionsfaktor Familie, die durch eine PER/ARNT/SIM (PAS) Domäne charakterisiert ist (Kaelin und Ratcliffe 2008). Es gibt 3 paraloge Gene der  $\alpha$ -Untereinheit (HIF1 $\alpha$ , HIF2 $\alpha$  und HIF3 $\alpha$ ) und drei paraloge Gene der  $\beta$ -Untereinheit (HIF1 $\beta$ , HIF2 $\beta$  und HIF3 $\beta$ , auch Arnt1, Arnt2 und Arnt3 genannt), wobei lediglich HIF1 $\alpha$  und HIF2 $\alpha$  zusammen mit HIF1 $\beta$  einen funktionalen Transkriptionsfaktor-Komplex bilden können (Lisy und Peet 2008).

Unter normalen O<sub>2</sub>-Konditionen wird die HIF1 $\alpha$ -Untereinheit an Prolin 402 und 564 hydroxyliert. Diese Modifikation wird durch Prolylhydroxylasendomänen-Proteine (PHD) katalysiert und führt zur Erkennung durch das von Hippel-Lindau Tumor-Suppressor Protein (VHL), das mit Elongin C interagiert und den E3-Ubiquitin-Ligase Komplex rekrutiert. Dieser katalysiert die proteasomale Degradation der Untereinheit (Dehne und Brune 2009; Semenza 2010). Daneben wird auch die Transaktivierungsfunktion von HIF1 $\alpha$  unter Normoxie beeinträchtigt. FIH (Factor Inhibiting HIF) hydroxyliert ein C-terminales Asparagin (ASN 803), was den Verlust der Interaktion mit den zellulären Ko-Aktivatoren CBP (CREB

binding protein) und p300 zur Folge hat. Somit ist zum einen die Stabilität und zum anderen die transkriptionale Aktivität von HIF durch die O<sub>2</sub>-abhängigen Hydroxylierungen negativ reguliert (Lando et al., 2002; Kaelin und Ratcliffe 2008). Hypoxie führt, auf Grund des Mangels an Sauerstoff zum Verlust der HIF1 $\alpha$ -Hydroxylierungen. Zudem wird vermutet, dass durch Hypoxie eine erhöhte mitochondriale Produktion an Sauerstoffradikalen, den sogenannten ROS (reactive oxygen species), stattfindet, die die Hydroxylasen durch Oxidation eines Eisenatoms im katalytischen Zentrum hemmen (Guzy und Schumacker 2006). Der Verlust der Hydroxylaseaktivität führt zur Stabilisierung von HIF1 $\alpha$ . HIF1 $\alpha$  transloziert in den Zellkern, dimerisiert mit HIF1 $\beta$  und bindet an HIF-responsive Elemente (HRE) mit der Konsensussequenz 5'-(A/G)CGTG-3'. HREs befinden sich in regulatorischen Bereichen verschiedener Gene, die an der Aufrechterhaltung der Sauerstoffhomöostase oder der Adaption an Hypoxie beteiligt sind (Semenza 2009). Dazu zählen u.a. der „Vascular Endothelial Growth Factor“ (VEGF) und Angiopoietin2, die eine Schlüsselrolle bei der Angiogenese und Vaskularisierung spielen, die Glukosetransporter GLUT1 und GLUT2, die eine konstitutive Glukoseaufnahme der Zellen gewährleisten oder der Metastase-assoziierte Faktor „TWIST“, der als ein Regulator der epithelial-mesenchymalen Transition gilt (Liu et al., 2012).

Hypoxie und die konstitutive Aktivierung des NF $\kappa$ B-Signalweges durch IKK spielen eine zentrale Rolle bei Entzündungsreaktionen, die durch bakterielle oder virale Infektionen, Krebsentstehung und Tumorprogression ausgelöst werden (Kumar und Mehta 2012; Schoolmeesters et al., 2012). Neben dem Transkriptionsfaktor C/EBP $\beta$ , ist auch HIF1 $\alpha$  ein wichtiger Regulator im Zuge der Differenzierung von Monozyten zu Makrophagen (Zhang et al., 2008; Rahat et al., 2011). HIF1 $\alpha$  spielt im Zuge dieser Differenzierung u.a. eine wichtige Rolle bei der Regulierung des Glukose Haushalts. So konnte gezeigt werden, dass HIF1 $\alpha$ -Knockdown zu verminderter ATP-Produktion der myeloiden Zellen führte, womit die Fähigkeit der Invasion in entzündete Gewebe eingeschränkt und die Phagozytose von Bakterien unterbunden war (Cramer et al., 2003). Expression von HIF1 $\alpha$  in Makrophagen trägt auch unabhängig der Vaskularisierung zur Tumorprogression bei, in dem es die tumorsuppressive Funktion der T-Zellen unterdrückt, die normalerweise zur Bekämpfung entarteter Zellen führt (Doedens et al., 2010).

### 1.3 Das zelluläre Protein ZNF395/PBF

Im Rahmen dieser Arbeit sollte die Beteiligung des wenig untersuchten zellulären Transkriptionsfaktors ZNF395 bei der antiviralen Immunantwort und die Rolle von IKK zur Kontrolle seiner Aktivität untersucht werden.

ZNF395 wurde erstmals im Jahr 2001 über seine Fähigkeit, sequenzspezifisch an die regulatorischen Regionen einiger Papillomvirus (PV)-Typen zu binden, identifiziert. Daraufhin wurde es zunächst PBF (Papillomavirus Binding Factor) genannt (Boeckle et al., 2002).

Der Faktor bindet ebenfalls an regulatorische Elemente innerhalb des humanen Huntingtin Promotors, weshalb das Protein auch HDBP2 (Huntington Disease Binding Protein 2) genannt wurde (Tanaka et al., 2004). ZNF395 ist homolog zu dem Glut4-Enhancer Faktor (GEF; auch genannt HDBP1), einem zellulären Transkriptionsfaktor, der die Expression des Glukose Transporters GLUT4 aktiviert (Knight et al., 2003). Desweiteren zeigt ZNF395 Homologien zum Maus-Glucocorticoid induzierbaren Gen GIG1, dem humanen ZNF704, das an den MyoD „Enhancer“ bindet und somit eine Rolle bei der Skelettmuskel-Differenzierung während der Embryogenese spielen könnte (Yamamoto et al., 2007). ZNF395, GEF und GIG1 besitzen hochkonservierte Regionen (CR1, CR2 und CR3) mit bis zu 86% Sequenzübereinstimmung, weshalb vorgeschlagen wurde, diese drei Proteine zu einer neuen Familie mit unbekannter Funktion zusammenzufassen (Tanaka et al., 2004).

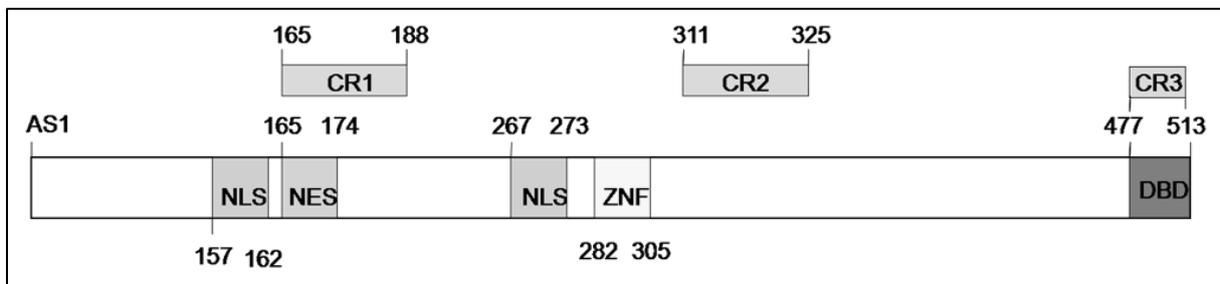


Abb. 2: Schematische Darstellung von ZNF395  
Dargestellt ist das 513 AS große ZNF395-Protein. Eingezeichnet sind die Position der funktionellen nukleären Exportsequenz (NES), der beiden potentiellen nukleären Lokalisationssequenzen (NLS), der DNA Bindedomäne (DBD) und des Zinkfingermotifs (ZNF). CR1, 2 und 3 sind konservierte Regionen von ZNF395, GEF und GIG1.

Wie in Abb. 2 schematisch dargestellt, besteht ZNF395 aus 513 Aminosäuren (AS), was einem Molekulargewicht von ca. 56 kDa entspricht. Das Protein wird im denaturierenden SDS-PAG jedoch auf einer Höhe von ca. 80 kDa detektiert. Alle drei Proteine besitzen neben den konservierten Regionen CR1, CR2 und CR3 auch eine typische Zink-Finger Struktur des Typs C2H2, die bei ZNF395 im zentralen Teil von Position 282-305 liegt. Die konservierte Region CR3 vermittelt im Fall von ZNF395 die DNA-Bindung (Sichtig et al., 2007). ZNF395

besitzt zwei Kernlokalisationssequenzen (NLS) in AS-Position 157-162 und 267-273, sowie eine funktionelle Kernexportsequenz (NES) in AS-Position 165-174, die es dem Faktor ermöglichen, zwischen dem Kern und dem Zytoplasma zu translozieren (Tanaka et al., 2004; Sichtig et al., 2007).

Es konnte gezeigt werden, dass die Überexpression von ZNF395 in einer Repression des HPV8 (Humanes Papillomvirus Typ 8), des HPV16 (pers. Mitteilung G. Steger) und des BPV1 (Bovines Papillomvirus Typ1) resultierte (Boeckle et al., 2002). Die Bindung der regulatorischen Regionen der Zielgene von ZNF395 wird über die CR3-Region vermittelt. Dieses Motiv ist zu dem sogenannten E-Tail bestimmter Isoformen der T-Zell-Faktoren TCF-1, -3 und -4 hochkonserviert (Sichtig et al., 2007). Die Sequenzen, die notwendig für eine Bindung von ZNF395 im Promotor-Bereich sind, konnten durch Mutationsanalysen im Fall von HPV8 auf CCGG (Boeckle et al., 2002) und für Huntingtin auf GCCGGCG (Tanaka et al., 2004) eingegrenzt werden. Diese Repression des HPV8 benötigte zum einen die C-terminale CR3 Bindedomäne und zum anderen die AS 263-312, die eine Interaktion mit SAP30 vermittelt (Sichtig et al., 2007). SAP30 ist eine Komponente des SIN3A/HDAC1/2 Komplexes. Da Behandlung der Zellen mit Trichostatin A (TSA), einem spezifischen Inhibitor der Klasse I und II HDACs (Marks et al., 2000), zur Aufhebung des reprimierenden Effektes durch ZNF395 führte, benötigt die ZNF395-vermittelte Repression der Promotoren die Aktivität des HDAC-Komplexes.

### **1.3.1 ZNF395 aktiviert die Transkription IFN-stimulierter und Krebs-assoziiertes Gene**

Zur Identifizierung der Zielgene von ZNF395 wurde ein Mikroarray durchgeführt. Dieser zeigte nach Überexpression von ZNF395 eine signifikant erhöhte Expression von zehn Genen. Darunter waren sechs Gene, die im Verlauf der antiviralen Immunantwort durch Typ-1 Interferone (Typ-1 IFN) aktiviert werden.

Die beiden Faktoren, die durch Überexpression von ZNF395 am höchsten aktiviert wurden, waren ISG56 und IFI44. Daneben wurde auch die Expression von IFI16 (Interferon-induced protein 16), IFIT2/ISG54, CARD6 (Caspase recruitment domain family member 6) und SAMD9 (Sterile alpha motif domain containing 9) durch ZNF395 erhöht (Jordanovski et al., 2013).

Die durch ZNF395-vermittelte Aktivierung von ISG56 benötigte die Regionen CR3 und CR1. Durch Mutation der Kernexportsequenz von ZNF395 konnte die Aktivierung seiner Zielgene verstärkt werden. Dies belegt, dass im Zellkern lokalisiertes ZNF395 die Aktivierung vermittelt, da diese Mutante konstitutiv im Zellkern arretiert ist (Sichtig et al., 2007). Zur

optimalen Aktivierung des ISG56 Promotors braucht ZNF395 die beiden ISREs (interferon stimulated response element) im ISG56 Promotor, über die auch die Typ1 IFN und IRF3 den ISG56 Promotor stimulieren. DNA-Bindungsstudien belegten, dass ZNF395 an den ISREs gebunden vorliegt (Jordanovski et al., 2013).

Eine Rolle von ZNF395 bei der IFN-vermittelten Induktion von ISG56, oder den anderen im Mikroarray als erhöht gefundenen Faktoren, ist bisher nicht untersucht.

### **1.3.2 ZNF395 ist ein potentielles Zielprotein von IKK**

Gleichzeitig wurde rekombinantes ZNF395 in Folge der Aktivierung der angeborenen Immunantwort durch Inkubation der Zellen mit  $TNF\alpha$  oder Poly I:C degradiert. BMS-345541, ein spezifischer IKK Inhibitor, verhinderte die proteasomale Degradation von rekombinantem ZNF395 und stabilisierte auch endogenes ZNF395. Dies legte die Vermutung nahe, dass ein aktiver IKK-Komplex die proteolytische Degradation von ZNF395 induziert. Luziferase Reporterassays zeigten verminderte Aktivität des ISG56 Promotors durch ZNF395 nach Inkubation der Zellen mit BMS-345541. Die Hypothese aus diesen Experimenten war, dass ZNF395 zur Aktivierung des ISG56 Promotors einen aktiven IKK-Signalweg braucht, was gleichzeitig auch seinen Abbau induziert (Jordanovski, Dissertation, 2012).

## **1.4 ZNF395 als Zielgen Hypoxie- und Krebs-assoziiierter Signalwege**

Der oben erwähnte Mikroarray zur Identifizierung der ZNF395-Zielgene fand neben den IFN-regulierten Genen auch vier Gene, die in möglichem Zusammenhang mit Krebs stehen. Diese beinhalten CALCOCO, MEF2C, PEG10 und MACC1, die als Transkriptionsfaktoren und Ko-Aktivatoren mit Tumorprogression und Metastasierung in Zusammenhang stehen (Yang et al., 2006; Stein et al., 2009; Tsuji et al., 2010; Homminga et al., 2011).

Eine Rolle von ZNF395 bei der Krebsentstehung wird auch durch publizierte Expressionsanalysen unterstützt, die eine erhöhte Expression des Faktors in verschiedenen Krebsarten beschreiben. Nierenzellkarzinome, Osteosarkome oder das Ewing-Sarkom zeigten eine erhöhte Expression von ZNF395 (Tsukahara et al., 2004; Skubitz et al., 2006; Dalgin et al., 2007; Yabe et al., 2008). Ferner wurde eine verstärkte Expression des Faktors in Glioblastomen und Neuroblastomen, vor allem im Rahmen einer Antwort auf Hypoxie gefunden, die mit einer schlechten Prognose für den Patienten korrelierte (Murat et al., 2009; Fardin et al., 2010). In Krebs-Zelllinien konnte nach Hypoxie oder Überexpression des Hypoxia-inducible factor  $1\alpha$  (HIF1 $\alpha$ ) eine signifikant erhöhte Menge an ZNF395-mRNA

festgestellt werden (Lal et al., 2001; Jiang et al., 2003; Elvidge et al., 2006). Diese Daten implizieren, dass die Expression von ZNF395 bei geringen Sauerstoffkonzentrationen erhöht ist.

## **1.5 Zielsetzung der Arbeit**

Die beschriebenen Befunde aus den Vorarbeiten und der Literatur legen nahe, dass ZNF395 ein durch Hypoxie induzierbarer Faktor ist, dessen transkriptionelle Aktivität und Proteinstabilität durch einen aktiven IKK-Signalweg reguliert sind. Eine erhöhte Expression von ZNF395 induziert seine Zielgene, die zum einen die Immunantwort gegen Viren und zum andern die Karzinogenese fördern. Um eine Rolle von ZNF395 bei der angeborenen Immunantwort gegen Viren und bei Krebs zu untersuchen soll im Rahmen der vorliegenden Arbeit die Rolle von HIF und IKK bei der Regulation der Expression und der Proteinstabilität von ZNF395 aufgeklärt werden. Ferner soll eine Bedeutung von ZNF395 für eine Typ-1 IFN-induzierte Immunantwort gegen Viren charakterisiert werden.

## 2 Material und Methoden

### 2.1 Bakterienstämme

#### **Epicurian coli ® BL21(DE3)pLysS**

Genotyp: B, F-, dcm, ompT, hsdS (r<sub>B</sub>-m<sub>B</sub>), gal, λ(DE3), [pLysS Cam<sup>r</sup>]  
(Stratagene, La Jolla, USA)  
für Proteinexpression

#### **Epicurian coli ® XL1-Blue**

Genotyp: recA1, end A1, gyr96, thi-1, hsdR17, supE44, relA1, lac[F'proAB lac<sup>q</sup>ZΔAM15 Tn10 (Tet<sup>r</sup>)]  
(Stratagene, La Jolla, USA)  
für Klonierungen

### 2.2 Eukaryote Zellen

**RTS3b** Humane Plattenepithelkarzinom-Zelllinie aus einer Ev-ähnlichen Läsion eines Nierentransplantatempfängers; ursprünglich HPV-5 und 8 positiv, nach mehreren Passagen HPV-negativ (Purdie et al., 1993).

**RTS3b-TR-FLAG-ZNF395:** ermöglicht die induzierbare Expression von ZNF395 unter der Kontrolle des sogenannten „Tet-on Systems“. In Gegenwart von 1 µg/ml Doxycyclin für 24 h wird ZNF395 exprimiert (Jordanovski et al., 2013)

#### **C33A (ATTC® HTB-31)**

Spontan immortalisierte humane Zervixkarzinom-Zelllinie ohne HPV-Genom mit epithelialer Morphologie (Auersperg 1969; Del Vecchio et al., 1992).

#### **U87MG (ATCC® HTB-14™)**

Humane Glioblastoma (Astrozytom)- Zelllinie (Beckman et al., 1971).

### 293 (HEK-293, ATCC® CRL-1573™)

Künstlich durch das Adenovirus 5 transformierte humane embryonale Nierenzelllinie (Graham et al., 1977).

### U937 (ATCC® CRL-1573™)

Humane Monozyten-Zelllinie aus einem histiozytären Lymphom mit der Fähigkeit der Differenzierung zu Makrophagen (Koren et al., 1979).

## 2.3 Nukleinsäuren

### 2.3.1 Synthetisch hergestellte Oligonukleotide

Die Oligonukleotide wurden HPLC-gereinigt von der Firma Operon (Köln), der Firma Biolegio (Nimwegen, Niederlande) und der Firma Integrated DNA Technologies, BVBA (Leuven, Belgien) bezogen. Gegenüber der Wildtyp-Sequenz veränderte Nukleotide sind Fett hervorgehoben.

#### Oligonukleotide für die Klonierung des Promotors und des 5' regulatorischen Bereichs von ZNF395

| Oligoname            | Sequenz (5' → 3')                                  |
|----------------------|--|
| 1071 mit Bam         | TAGGGATCCGTC <del>CCCC</del> CAGGAAGGGCAAGCCTTAG   |
| PromPBF3939-3919KPNI | CCCCCGGTAC <del>CCCC</del> AAAGTGAAGGCGCTGAGCCCTGC |

#### Oligonukleotide für *in vitro* Mutagenesen des ZNF395 Promotors

| Oligoname                          | Forward/Reverse Primer<br>Sequenz (5' → 3')                      |
|------------------------------------|--|
| sdm pos.934<br>forw.C/EBPbeta      | CCACTTTACTCTGGGG <b>ACTAG</b> TCTTAGAGCATAATTATATG               |
| sdm pos.934 rev C/EBP<br>beta3'    | CATATAATTATGCTCTAAG <b>ACTAG</b> TCCCCAGAGTAAAGTGG               |
| sdm 2 pos. 1781 forw.<br>C/EBPbeta | GGTTCTAGTTAGATAATGTTCTTAG <b>ACTAG</b> TGTCATGGTGGGAGATGGA<br>GG |
| Sdm 2 pos. 1781                    |  |

|                     |   |
|---------------------|---|
| rev.C/EBP beta      | CCTCCATCCCCACCAT <b>GACTAG</b> CTAAGAACATTATCTAACTAGAACC          |
| Hif BS 2 2725 rev   | CGTTTGACAAATACATGAGTGCGTCTT <b>AAAT</b> GCAAAGTGAGCCAAAA<br>TAGTC |
| Hif BS 2 2673 forw. | GACTATTTTGGCTCACTTTGC <b>ATTTA</b> AGACGCACTCATGTATTTGTCA<br>AACG |

### Oligonukleotide für *in vitro* Mutagenese von IKK $\alpha$ K44M

| Oligoname                      | Forward/Reverse Primer<br>Sequenz (5' → 3')          |
|--------------------------------|--|
| IVM IKK $\alpha$ K44M<br>forw. | GATCTCAAATAGCAATT <b>ATGTCT</b> TGTGCGTTTAGAGCTAAG   |
| IVM IKK $\alpha$ rev.          | CTTAGCTCTAAACGACAAG <b>GACATA</b> AATTGCTATTTTGAGATC |

### Oligonukleotide für die qRT-PCR

| Name des Gens  | Forward Primer Sequenz (5' → 3') | Reverse Primer: Sequenz (5' → 3') |
|----------------|----------------------------------|-----------------------------------|
| PBF            | CGAAAAAGAAAGAACTCTGTG            | CTGTGTCCCCCAGATGGAG               |
| HPRT1          | TGACACTGGCAAACAATGCA             | GGTCCTTTTCACCAGCAAGCT             |
| C/EBP $\beta$  | TTTCGAAGTTGATGCAATCG             | CAACAAGCCCGTAGGAACAT              |
| C/EBP $\alpha$ | GAATCTCCTAGTCCTGGCTC             | GACAAGAACAGCAACGAGTAC             |
| ISG56          | TCATCAGGTCAAGGATAGTCTG           | GGTGTTCACATAGGCTAGTAG             |
| IFI44          | TGGCAGTGACAACCTCGTTTGA           | CCGCTTCCCTCCAAAA                  |
| IFI16          | CTGCACCCTCCACAAG                 | CCATGGCTGTGGACATG                 |
| IFIT2          | ACTGCAACCATGAGTGAGAAC            | GCCTCGTTTTGCCCTTTGAG              |
| MEF2C          | GCCCTGAGTCTGAGGACAAG             | AGTGAGCTGACAGGGTTGCT              |

### siRNAs für Knockdown Experimente

Die siRNAs bestehen aus einem Gemisch von drei bis vier verschiedenen siRNAs um effizientes Ausschalten („knockdown“) von Genen zu gewährleisten.

| Name des Zielgens    | Firma, Artikelnummer           |
|----------------------|--------------------------------|
| ZNF395               | Santa Cruz, Sc 77820           |
| C/EBP $\alpha$       | Thermo Scientific, M-006422-03 |
| C/EBP $\beta$        | Thermo Scientific, M-006423-03 |
| HIF1 $\alpha$        | Thermo Scientific, M-004018-01 |
| IKK $\alpha$ (CHUK)  | Thermo Scientific, M-003473-02 |
| IKK $\beta$          | Thermo Scientific, M-003503-03 |
| HPV8E6 als Kontrolle | Qiagen, Hilden                 |

### 2.3.2 Prokaryote Expressionsvektoren

- **pET14b** (4,7 kb) erlaubt die Expression von Proteinen, die N-terminal mit einem Epitop von sechs Histidinresten fusioniert sind, unter der Kontrolle eines T7-Promotors (Novagen, Madison, USA).

### 2.3.3 Reporterplasmide

- **pALuc** (5,2 kb) ermöglicht den Einbau eines Promotors und dessen regulatorischer Region stromaufwärts des *firefly*-Luziferasegens (Dong et al., 1994).
- **ZNF395 PromLuc-3970+88** (9,3kb) enthält die Nukleotide von -3970 bis + 88 des 5'-regulatorischen Bereiches von ZNF395, wobei die potentielle Transkriptionsstartstelle als +1 gesetzt wurde. Kloniert wurde das PCR-Fragment über BamHI und KpnI in das Reporterkonstrukt pALuc (2010, vorliegende Arbeit).
- **ZNF395 PromLuc-1190+51** enthält die Nukleotide von -1190 bis + 51 des 5'-regulatorischen Bereiches von ZNF395
- **ISG56-PromLuc** beinhaltet die Nukleotide -654 bis -3 des ISG56 Promotors. Diese wurden über SacI/HindIII in pGL3-Basic kloniert (Grandvaux et al., 2002).

### 2.3.4 Eukaryote Expressionsvektoren

- **pcDNA 3.1+** (5.4 kb) erlaubt die eukaryotische Expression von Proteinen unter der Kontrolle eines CMV-Promotors. Er enthält außerdem einen T7 und einen SP6-Promotor sowie einen SV-40-Replikationsursprung. Der Vektor verfügt über eine Neomycin- und eine Ampicillin-Resistenz (Invitrogen, Karlsruhe).
- **pcDNA3.1+-FLAGI und pcDNA3.1+-FLAGII** (5,4 kb) exprimieren Proteine, die N-terminal mit einem FLAG-Epitop fusioniert sind, unter der Kontrolle des CMV-Promotors. Hierfür wurden die komplementären Oligonukleotide FLAG-HindIII/BamH1-5' und FLAG-HindII/BamH1-3' über HindIII und BamH1 in pcDNA3.1+ kloniert. Beide Vektoren unterscheiden sich lediglich im Leseraster (Muller et al., 2002).
- **pCMV1** (4,8kb) mit einem CMV-Promotor. Wurde zum Ausgleichen der DNA-Mengen bei Transfektionsansätzen verwendet (Invitrogen, Karlsruhe).
- **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).
- **pECFP-C1**(4,7kB) mit einem CMV-Promotor. Wurde zum Ausgleichen der DNA-Mengen bei Transfektionsansätzen verwendet (Clontech Heidelberg).

### 2.3.5 Expressionsvektoren für Transkriptionsfaktoren/Proteine

- **pcDNA3.1+FLAGI-Hif1 $\alpha$**  (9 kb) kodiert für den ORF von Hif1 $\alpha$ , welches N-terminal mit einem FLAG-Epitop fusioniert ist. Das Insert wurde über HindIII und NotI in den Vektor kloniert, von D.Richard zur Verfügung gestellt (Richard et al., 1999).
- **pcDNA3.1+C/EBP $\alpha$  (6,5kb)** kodiert für den ORF von C/EBP $\alpha$ . Das Insert wurde über KpnI und XhoI in den Vektor kloniert (Hadaschik et al., 2003).
- **pcDNA3.1+C/EBP $\beta$  (6,4kb)** kodiert für den gesamten ORF von C/EBP $\beta$ . Synonyme sind NF-IL6 und LAP\*. Der ORF besteht aus AS 1-345. Das Insert wurde über XhoI in den Vektor kloniert (Hadaschik et al., 2003).
- **pcDNA3.1.-NFIL6- $\Delta$ N24 (5,7kb)** kodiert für eine Deletionsmutante von C/EBP $\beta$ /NF-IL6 und wird in der Literatur auch LAP genannt. Seine ersten 24 AS wurden deletiert. Mittels PCR wurde aus dem Vektor pCMV-NF-IL6 ein Fragment ab dem Nukleotid 73 amplifiziert, das zusätzlich Restriktionsstellen für EcoRI enthält, in pCAPs zwischenkloniert und dort mit EcoRI und BamHI wieder ausgeschnitten und in den

Vektor pECFP-C1 kloniert (Hadaschick, Dissertation, 2002). In dieser Arbeit wurde NF-IL6- $\Delta$ N24 aus dem pECFP-Vektor über HindIII und BamHI in pcDNA3.1.+ kloniert.

- **pcDNA3.1.+NFIL6-LIP (5,1kb)** kodiert für eine Deletionsmutante von C/EBP $\beta$ /NF-IL6 und enthält die AS 200-345 vom ORF von C/EBP $\beta$ /NF-IL6 (Hadaschik et al., 2003) In dieser Arbeit wurde NF-IL6-LIP aus dem pECFP-Vektor über HindIII und BamHI in pcDNA3.1.+ kloniert.
- **pcDNA3.1.+(+AD1)NFIL6- $\Delta$ C (5,2kb)** kodiert für eine Deletionsmutante von C/EBP $\beta$ /NF-IL6 bestehend aus den AS 25-196. Das Plasmid enthält einen zusätzlichen, durch die Klonierung bedingten doppelsträngigen Oligonukleotidadapter (+Ad1) (Hadaschik et al., 2003). In dieser Arbeit wurde NFIL6- $\Delta$ C aus dem pECFP-Vektor über XhoI in pcDNA3.1.+ kloniert.
- **pCR-HA-IKKalpha** kodiert für murines IKK1/IKK $\alpha$ , welches N-terminal mit einem HA-Epitop fusioniert ist und unterliegt der Kontrolle eines T7 Promotors (Addgene Inc., Cambridge, MA 02139, USA).
- **pCR3.1-HA-IKK $\alpha$ -K44M** kodiert für eine konstitutiv inaktive Mutante von murinem IKK1/IKK $\alpha$ , die N-terminal mit einem HA-Epitop fusioniert ist, unter der Kontrolle eines T7 Promotors (2013, vorliegende Arbeit).
- **pCR-HA-IKKbeta** kodiert für murines IKK2/IKK $\beta$ , welches N-terminal mit einem HA-Epitop fusioniert ist, unter der Kontrolle eines T7 Promotors (Addgene Inc., Cambridge, MA 02139, USA).
- **pCMV-2-IKK2-WT** kodiert für den ORF von humanem IKK2/IKK $\beta$  welcher der Kontrolle des CMV Promotors unterliegt (Addgene Inc., Cambridge, MA 02139, USA).
- **IKK2-K44M** kodiert für eine konstitutiv inaktive Mutante von humanem IKK2/IKK $\beta$ , die N-terminal mit einem FLAG-Epitop fusioniert ist, unter der Kontrolle eines CMV2 Promotors (Mercurio et al., 1997).
- **pcDNA-FLAGII-ZNF395** kodiert für humanes PBF/ZNF395 (513 AS). ZNF395 wurde mit XhoI aus pET-14b ausgeschnitten und über XhoI-Enden in pcDNA3.1+FLAGII kloniert (Sichtig et al., 2007).
- **pcDNA-FLAGII-ZNF395mutNES** kodiert für eine Mutante von humanem PBF/ZNF395 . Die Kernexportsequenz wurde mutiert, somit verbleibt diese Mutante konstitutiv im Zellkern (Sichtig et al., 2007).

### 2.3.6 DNA-Längenstandards

1 kb DNA-Leiter

(Invitrogen, Karlsruhe)

### 2.3.7 Sonstige Nukleinsäuren

|                          |                               |
|--------------------------|-------------------------------|
| Desoxynukleotide (dNTPs) | (MBI Fermentas, St. Leon-Rot) |
| T-7-Primer               | (EuroGentec, Brüssel)         |

## 2.4 Proteine

### 2.4.1 Enzyme

|                                       |                               |
|---------------------------------------|-------------------------------|
| Alkalische Phosphatase aus Kälberdarm | (MBI Fermentas, St. Leon-Rot) |
| Taq-Polymerase                        | (Biomol, Hamburg)             |
| Accu-Pol-DNA-Polymerase               | (Biomol, Hamburg)             |
| T4-DNA-Ligase                         | (MBI-Fermentas, St. Leon-Rot) |

Restriktionsendonukleasen wurden von folgenden Firmen bezogen:

- MBI-Fermentas St. Leon-Rot
- New England BioLabs GmbH,  
Schwalbach
- Thermo Scientific, Waltham, MA, USA

### 2.4.2 Größenstandards

|   |                                       |
|---|---------------------------------------|
| SDS-PAGE Molekulargewichtsmarker, niedermolekular, vorgefärbt | (MBI Fermentas, St.Leon-Rot)          |
| PageRuler Prestained Protein Ladder                           | (Thermo Scientific, Waltham, MA, USA) |

### 2.4.3 Antiseren

#### 2.4.3.1 Primär-Antikörper

**$\alpha$ -PBF/ZNF395:** in Kaninchen hergestelltes Antiserum (Boeckle et al., 2002), das über Protein A/G Sepharose affinitäts-gereinigt wurde. (Christine Koehler, Oktober 2009, Diplomarbeit).

**$\alpha$ -HIF1 $\alpha$  (EP1215Y):** monoklonaler Antikörper, hergestellt in Kaninchen, gegen ein synthetisches Peptid nahe dem C-Terminus von humanem HIF1 $\alpha$  (Epitomics, Kalifornien, USA).

**$\alpha$ -HIF1 $\alpha$  (IgG2b):** monoklonaler Antikörper, hergestellt in Maus, gegen ein Fusionsprotein von humanem HIF-1 $\alpha$  (Novus Biologicals, Cambridge, UK).

**$\alpha$ -CD79a (JCB117):** Monoklonaler Antikörper, hergestellt in der Maus, gegen humanes CD79a (DAKO, Glostrup, Dänemark).

**$\alpha$ -IKK $\beta$ :** Polyklonaler Antikörper, hergestellt im Kaninchen, gegen ein synthetisches Peptid welches aus dem C-Terminus von humanem IKK $\beta$  stammt (Cell Signalling, Boston, MA, USA).

**$\alpha$ -IKK $\alpha$ :** Polyklonaler Antikörper, hergestellt, im Kaninchen gegen ein synthetisches Peptid aus dem C-Terminus von humanem IKK $\alpha$  (Cell Signalling, Boston, MA, USA).

**$\alpha$ -IKK beta:** Polyklonaler Antikörper, hergestellt im Kaninchen, gegen humanes IKK $\beta$  (Abcam, Cambridge, UK).

**$\alpha$ -CD163 (EDHu-1):** Monoklonaler Antikörper, hergestellt in der Maus, gegen humanes CD163 (AbD serotec, Kidlington, Oxford, UK).

**$\alpha$ -C/EBP $\beta$  (H7):** Monoklonaler Antikörper, hergestellt in der Maus, gegen humanes C/EBP $\beta$  (Santa Cruz, Heidelberg).

**$\alpha$ -CD14 (5A3B11B5):** Monoklonaler Antikörper, hergestellt in der Maus, gegen humanes CD14 (Santa Cruz, Heidelberg).

**$\alpha$ -CD14 (UCH-M1):** Monoklonaler Antikörper, hergestellt in der Maus, gegen humanes CD14 (Santa Cruz, Heidelberg).

**$\alpha$ -CD68 (KP1):** Monoklonaler Antikörper, hergestellt in der Maus, gegen eine Fraktion alveolarer Makrophagen (Santa Cruz, Heidelberg).

**$\alpha$ -Filaggrin (FLG01):** Monoklonaler Antikörper, hergestellt in der Maus, gegen rekombinates humanes Filaggrin (Oncogene, La Jolla, CA, USA).

**$\alpha$ -Vimentin (C-20):** Polyklonaler affinitätsgereinigter Antikörper, hergestellt in der Ziege, gegen ein Peptid des C-Terminus humanen Vimentins (Santa Cruz, Heidelberg).

**$\alpha$ -Smooth Muscle Actin:** Monoklonaler Antikörper, hergestellt in der Maus, gegen ein N-Terminales synthetisches humanes Dekapeptid von Smooth Muscle Actin (DAKO, Glostrup, Dänemark)

**$\alpha$ -Actin-HRP (C-11):** polyklonaler affinitätsgereinigter Antikörper aus der Ziege erkennt den C-Terminus humanen Aktins. Der Antikörper ist bereits Peroxidase gekoppelt (Santa Cruz, Heidelberg).

### 2.4.3.2 Sekundär-Antikörper

#### Für Peroxidase-gekoppelte Färbungen:

**$\alpha$ -Maus/Kaninchen:** Horseradish-Peroxidase (HRP)-gekoppelter Antikörper gegen Maus- und Kaninchen-IgG (Roche Diagnostics, Mannheim).

**$\alpha$ -Maus POD:** HRP-gekoppelter Antikörper gegen Maus-IgG (dianova, Hamburg).

**$\alpha$ -Kaninchen POD:** HRP-gekoppelter Antikörper gegen Kaninchen-IgG (dianova, Hamburg).

#### Für Immunfluoreszenz:

**TRITC  $\alpha$ -Maus:** Rhodamin (TRITC)-gekoppelter affinitätsgereinigter Antikörper gegen Maus-IgGs. (Dianova, Hamburg)

**Dyelight Red 594  $\alpha$ -Maus:** Dyelight Fluor gekoppelter affinitätsgereinigter Antikörper gegen Maus-IgGs (Bethyl Laboratories, Inc. Montgomery, TX, USA).

**FITC  $\alpha$ -Kaninchen:** Fluoreszin Isothiocyanat (FITC)-gekoppelter affinitätsgereinigter Antikörper gegen Kaninchen IgGs. (EuroGentec, Brüssel)

**TRITC  $\alpha$ -Ziege:** Rhodamin (TRITC)-gekoppelter affinitätsgereinigter Antikörper gegen Ziegen-IgGs. (Dianova, Hamburg)

## 2.5 Protease- und Phosphatase Inhibitoren

**Aprotinin:** Serin-Protease-Inhibitor, inhibiert Trypsin, Plasmin, Kallikrein und Chymotrypsin. (Sigma-Aldrich, Steinheim)

**Leupeptin:** Serin-, Thiol-Protease-Inhibitor, inhibiert: Trypsin, Plasmin, Proteinase K, Papain, Kallikrein, Thrombin, Cathepsin A und B. (Sigma-Aldrich, Steinheim)

**Pepstatin:** Aspartat-Protease-Inhibitor, inhibiert: Pepsin, Renin, Cathepsin D und mikrobiische Säureproteasen. (AppliChem, Darmstadt)

**PMSF:** Serin-, Cystein-Protease-Inhibitor, inhibiert: Trypsin, Chymotrypsin, Thrombin und Papain. (Sigma-Aldrich, Steinheim)

**Natriumorthovanadat:** Tyrosin-Phosphatase-Inhibitor (Sigma-Aldrich, Steinheim).

**Natriumfluorid:** Serin/Threonin-Phosphatase-Inhibitor (Sigma-Aldrich, Steinheim und AppliChem, Darmstadt).

## 2.6 Medien und Antibiotika für die Kultivierung von Bakterien

### **LB-Broth-Base** (Luria-Bertani-Medium)

Fertigmedium (AppliChem, Darmstadt und Invitrogen, Karlsruhe)

|              |       |
|--------------|-------|
| Trypton      | 10g/l |
| Hefe-Extrakt | 5g/l  |
| NaCl         | 10g/l |

(pH-Wert: 7,2)

20min bei 121°C autoklaviert und anschließend bei 4°C gelagert. Zur Selektion wurden 100µg/ml Ampicillin hinzugegeben.

### **LB-Agar** (Luria-Bertani-Agar)

Fertigmedium von AppliChem (Darmstadt)

|              |       |
|--------------|-------|
| Trypton      | 10g/l |
| Hefe-Extrakt | 5g/l  |
| Agar         | 15g/l |
| NaCl         | 10g/l |

(pH-Wert: 7,2)

20min bei 121°C autoklaviert. Nach Abkühlung auf ca 50°C wurde 100µg/ml Ampicillin hinzugefügt und der LB-Agar in Petrischalen gegossen. Lagerung bei 4°C.

### **Ampicillin** (Sigma-Aldrich, Steinheim)

Stocklösung: 100mg/ml wurden in H<sub>2</sub>O gelöst und steril filtriert. Endkonzentration in Medien und Agar: 100µg/ml

### **SOC-Medium**

|                   |       |
|-------------------|-------|
| Hefe Extrakt      | 0,5%  |
| Trypton           | 2%    |
| NaCl              | 10mM  |
| KCl               | 2,5mM |
| MgCl <sub>2</sub> | 10mM  |
| MgSO <sub>4</sub> | 10mM  |
| Glukose           | 20mM  |

Das SOC-Medium wurde bei 121°C für 20 min autoklaviert und anschließend wurde die Glukose dazugegeben.

### 2.6.1 Medien und Zusätze für die Kultivierung eukaryoter Zellen

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

Zusätze:

|                    |           |                              |
|--------------------|-----------|------------------------------|
| FCS                | 10%       |                              |
| Streptomycinsulfat | 100 mg/l  |                              |
| Penicillin         | 100 µg/ml | (alle Invitrogen, Karlsruhe) |

- **E-Medium** für RTS3b-Zellen

|                    |                        |                                 |
|--------------------|------------------------|---------------------------------|
| Dulbecco's MEM     | 50%                    |                                 |
| DMEM/F12           | 50%                    | (beide Invitrogen, Karlsruhe)   |
| Transferrin        | 5µg/ml                 |                                 |
| Triiod-thyronin    | 2x10 <sup>-11</sup> M  |                                 |
| Adenin             | 1.8X10 <sup>-4</sup> M |                                 |
| Insulin            | 5µg/ml                 |                                 |
| Hydrocortison      | 0,4µg/ml               | (alle Sigma-Aldrich, Steinheim) |
| Epinephrin         | 1µg/ml                 | (Calbiochem, Schwalbach)        |
| EGF                | 10ng/ml                | (Sigma-Aldrich, Steinheim)      |
| FCS                | 10%                    |                                 |
| Streptomycinsulfat | 100µg/ml               |                                 |
| Penicillin         | 100µg/ml               | (alle Invitrogen, Karlsruhe)    |

- **Trypsin/EDTA**

|             |        |  |
|-------------|--------|--|
| Trypsin     | 0,5g/l |  |
| EDTA x 4 Na | 0,2g/l |  |

enthält Phenolrot

In Hank's buffered salt solution (HBSS)

|                                  |        |
|----------------------------------|--------|
| NaCl                             | 0.137M |
| KCl                              | 5.4mM  |
| Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> | 0.25mM |
| KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>  | 0.44mM |
| CaCl <sub>2</sub>                | 1.3mM  |
| MgSO <sub>4</sub>                | 1.0 mM |
| NaHCO <sub>3</sub>               | 4.2 mM |

|                                  |          |                         |
|----------------------------------|----------|-------------------------|
| <b>DPBS 1x</b>                   |          | (Invitrogen, Karlsruhe) |
| NaCl                             | 137.93mM |                         |
| KCl                              | 2,67mM   |                         |
| Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> | 8,06mM   |                         |
| KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>  | 1,47mM   |                         |

**Einfriermedium:**

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

## 2.7 Sonstige Reagenzien

| Name          | Konzentration | Inkubation | Hersteller                           |
|---------------|---------------|------------|--------------------------------------|
| TNF- $\alpha$ | 1 ng/ml       | 24 h       | Cell Signaling Technology, USA       |
| BMS-345541    | 5 $\mu$ M     | 24 h       | Sigma-Aldrich, Steinheim             |
| Poly I:C      | 10 ng/ml      | 24 h       | InvivoGen, Toulouse, Frankreich      |
| TSA           | 3-100nM       | 6,5 h      | Biomol, Hamburg                      |
| IFN $\alpha$  | 1000 U/ml     | 6 h        | Biomol, Hamburg                      |
| PMA           | 10ng/ml       | 48h        | LKT Laboratories, Inc, St. Paul, USA |

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).

## 2.7.1 Puffer und Lösungen

### Für SDS-Polyacrylamidgele (PAG):

#### Trenngel 6-15%:

|                       |           |
|-----------------------|-----------|
| Acrylamid             | 0,2- 0,4% |
| Tris/Cl/SDS, pH 8,8   | 25%       |
| 10% Ammoniumpersulfat | 0,03%     |
| TEMED                 | 0,1%      |

#### Sammelgel 3,9%:

|                    |       |
|--------------------|-------|
| Acrylamid          | 3,9%  |
| Tris/Cl/SDS, pH6,8 | 25%   |
| Ammoniumpersulfat  | 0,05% |
| TEMED              | 0,1%  |

#### 4x Tris/Cl/SDS, pH 8,8:

|                                      |      |
|--------------------------------------|------|
| Tris-Base                            | 1,5M |
| SDS                                  | 0,4% |
| ( mit 1N HCl auf pH 8,8 eingestellt) |      |

#### 4x Tris/Cl/SDS, pH 6,8:

|                                      |      |
|--------------------------------------|------|
| Tris-Base                            | 1,5M |
| SDS                                  | 0,4% |
| ( mit 1N HCl auf pH 6,8 eingestellt) |      |

#### 2x SDS-Probenpuffer:

|                                  |       |
|----------------------------------|-------|
| TrisCl, pH6,8                    | 125mM |
| Glycerin                         | 20%   |
| SDS                              | 2%    |
| β-Mercaptoethanol                | 2%    |
| Bromphenol-Blau                  | 15μM  |
| ( mit 1N auf pH 6,8 eingestellt) |       |

#### SDS-Elektrophorese-Puffer:

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

#### Coomassie Färbelösung:

|                          |       |
|--------------------------|-------|
| Methanol                 | 50%   |
| Essigsäure               | 10%   |
| Coomassie brilliant blue | 0,05% |

#### Entfärbelösung:

|            |    |
|------------|----|
| Methanol   | 5% |
| Essigsäure | 7% |

### Für Westernblots:

#### Transferpuffer:

|           |       |
|-----------|-------|
| Tris-Base | 25mM  |
| Glycerin  | 192mM |
| Methanol  | 20%   |

#### 1x TBST:

|                |       |
|----------------|-------|
| TrisCl, pH 8,0 | 10mM  |
| NaCl           | 150mM |
| Tween 20       | 0,05% |

#### Abblocklösung:

|                   |    |
|-------------------|----|
| Magermilchpulver  | 4% |
| In 1x TBST-Lösung |    |

#### Antikörper-Verdünnungslösung:

|                   |    |
|-------------------|----|
| Magermilchpulver  | 4% |
| In 1x TBST-Lösung |    |

**Stripping-Puffer:**

|                          |            |
|--------------------------|------------|
| SDS                      | 10%        |
| Tris-HCl                 | 62,5 mM    |
| $\beta$ -Mercaptoethanol | 70 $\mu$ l |

**Für Luziferasetests:****KPO<sub>4</sub>-Puffer 1M, pH 7,8:**

|                                 |        |
|---------------------------------|--------|
| K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> | 915 mM |
| KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> | 85 mM  |

**Reportersol-Puffer:**

|                                  |        |
|----------------------------------|--------|
| KPO <sub>4</sub> -Puffer, pH 7,8 | 100 mM |
| NP40                             | 0,5 %  |

**Luziferase-Reaktions-Puffer:**

|                                  |        |
|----------------------------------|--------|
| KPO <sub>4</sub> -Puffer, pH 7,8 | 100 mM |
| MgSO <sub>4</sub>                | 15 mM  |
| ATP                              | 5 mM   |

**ATP-Stammlösung:**

|                  |        |
|------------------|--------|
| ATP              | 100 mM |
| Tris/ CL, pH 7,9 | 200 mM |

**Luziferin-Stammlösung (100x):**

|   |       |
|---|-------|
| D-Luziferin                                 | 100mg |
| in 7140 $\mu$ l Luziferase-Reaktions-Puffer |       |

**Für Agarosegele:****50x TAE-Puffer (pH 8,0):**

|             |      |
|-------------|------|
| Tris-Acetat | 2M   |
| EDTA        | 50mM |

**Ethidiumbromidbad:**

|                     |                |
|---------------------|----------------|
| Ethidiumbromid      | 0,5 $\mu$ g/ml |
| In H <sub>2</sub> O |                |

**Farbmarker (6x):**

|                      |       |
|----------------------|-------|
| Glycerin             | 30%   |
| Bromphenolblaulösung | 0,25% |
| Xylen-Cyanol-Lösung  | 0,25% |
| Tris pH 7,5          | 10mM  |
| EDTA                 | 1mM   |

## Für die Herstellung von Ganzzelextrakten:

LSDB (Low Salt Dilution Buffer):

0-1000mM

|                |         |
|----------------|---------|
| Glycerin       | 20%     |
| Tris/Cl pH 7,9 | 50mM    |
| DTT            | 1mM     |
| NP40           | 0,1%    |
| KCl            | 0-100mM |

Als Lysispuffer wurde der LSDB mit Protease- und Phosphatase Inhibitoren (PI) versetzt (Aprotinin, Leupeptin, Pepstatin je 0,1mM, DTT und PMSF je 1mM).

## Für Immunhistochemische Färbungen:

### 10x Citratpuffer (pH5,8):

Citrat 100mM

### Antikörperverdünnungslösung:

FCS 2%  
in 1x PBS

Abblocklösung:

FCS 20%  
in 1x PBS

## Sonstige Puffer

### PBS (Phosphat buffered Saline):

|                                  |       |
|----------------------------------|-------|
| NaCl                             | 137mM |
| KCl                              | 2,7mM |
| Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> | 4,3mM |
| KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>  | 1,4mM |
| TE-Puffer (pH 7,9):              |       |
| Tris/Cl                          | 10mM  |
| EDTA                             | 1mM   |

### 2X HBS:

|   |       |
|---|-------|
| NaCl  | 280mM |
| KCl   | 10mM  |
| Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> X 12H <sub>2</sub> O | 1,5mM |
| HEPES pH 7,05   | 50mM  |
| HSLB (pH7,9)  |       |
| NaCl  | 500mM |
| Tris  | 20mM  |
| Glycin  | 10%   |

## 2.7.2 Sonstige Chemikalien und Materialien

|  |                                |
|--|--------------------------------|
| Agarose („low EEO“)                              | (AppliChem, Darmstadt)         |
| Albumin Fraktion V                               | (AppliChem, Darmstadt)         |
| $\beta$ -Mercaptoethanol                         | (AppliChem, Darmstadt)         |
| DMSO (Dimethylsulfoxid)                          | (AppliChem, Darmstadt)         |
| D-Luziferin, freie Säure                         | (SYNCHEM OHG, Felsberg)        |
| Formaldehyd                                      | (Merck AG, Darmstadt)          |
| FuGene6  | (Roche Diagnostics, Mannheim)  |
| X-tremeGene9                                     | (Roche Diagnostics, Mannheim)  |
| Lipofectamin Rnaimax                             | (Invitrogen, Karlsruhe)        |
| IPTG (Isopropyl $\beta$ -D-Thiogalactopyranosid) | (Sigma-Aldrich, Steinheim)     |
| Protein Assay Dye Reagent Concentrate            | (BioRad, München)              |
| Saponin  | (AppliChem, Darmstadt)         |
| Ponceau-S-Rot                                    | (Appllichem, Darmstadt)        |
| TEMED (N ,N ,N',N'-Tetramethylendiamin)          | (AppliChem, Darmstadt)         |
| Western-Blot Membranen aus Nitrocellulose        | (Schleicher & Schuell, Dassel) |
| Immuno-Mount                                     | ( Thermo Scientific; USA)      |

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 (Santa Cruz, Heidelberg)

## 2.7.3 Reagenziensysteme (Kits)

|  |                               |
|--|-------------------------------|
| QIAprep Spin/Qiaprep 8 Miniprep            | (Qiagen,Heidelberg)           |
| Invitrogen Filter-Maxi-Prep                | (Invitrogen,Karlsruhe)        |
| Qiaquick Gel Extraction Kit                | (Qiagen,Heidelberg)           |
| Qia PCR Purification Kit                   | (Qiagen,Heidelberg)           |
| DyeEx 2.0 Spin Kit                         | (Qiagen,Heidelberg)           |
| Sequenzmix Big Dye® Terminator             | (AB Faster City, USA)         |
| BM Chemolumineszenz Western Blotting Kit   | (Roche Diagnostics, Mannheim) |
| Rneasy Mini Kit                            | (Qiagen, Hilden)              |
| NucleoSpin RNA II                          | (Macherey-Nagel, Düren)       |
| QIAamp DNA MiniKit                         | (Qiagen, Hilden)              |
| QuickChange™ Site-directed Mutagenesis Kit | (Stratagene, La Jolla, USA)   |
| SuperScript VILO cDNA Synthesis Kit        | (Invitrogen, Karlsruhe)       |

|  |                                   |
|--|-----------------------------------|
| nanoScript RT kit                      | (Primerdesign, UK)                |
| GoTaq qPCR Master Mix                  | (Promega, Madison, USA)           |
| LightCycler FastStart SYBR Green I Kit | (Roche, Mannheim)                 |
| Universal Vectastain ABC Kit           | (Vector Laboratories, Burlingame) |

## 2.8 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 Cyclers 480                | (Roche Applied Sciences, Mannheim) |
| Multigas Inkubator Sanyo MCO-5M  | (Panasonic, San Diego, USA)        |

## 3 Methoden

### 3.1 Bakterienkultur

#### 3.1.1 Herstellung transformationskompetenter Bakterien

Die kompetenten *E.coli* XL1-Blue Bakterien wurden nach der Methode von CHUNG UND MILLER (1988) hergestellt (Chung und Miller 1988). 100ml LB-Medium wurden in einem sterilen 1L Erlenmeyerkolben mit 2,5ml einer frischen Bakterienkultur angeimpft und bei 37°C unter Schütteln bis zu einer optischen Dichte (OD) bei 600nm von 0,5 inkubiert. Mit 20ml dieser Kultur wurde eine zweite Kultur von 100ml LB-Medium angeimpft, welche wiederum bis zu einer OD<sub>600</sub> von 0,5 inkubiert wurde. Der Kolben mit den Bakterien wurde dann für 10min auf Eis gestellt und die Bakterien anschließend 10min bei 4°C und 3000g pelletiert. Nach Abnahme des Überstandes wurden die Bakterien in 5ml eiskaltem TSB resuspendiert und 10min auf Eis gelagert. Anschließend wurden sie in vorgekühlte Eppendorfgefäße zu je 500µl aliquotiert und in flüssigen Stickstoff schockgefroren. Die Lagerung erfolgte bei -80°C.

Um die Effizienz der kompetenten Bakterien zu testen, wurden 100µl der Bakterien mit 1ng eines Testplasmids transformiert. Anhand der Anzahl der Kolonien konnte so die Effizienz der Bakterien für 1 µg zu transformierende DNA berechnet werden. Die Effizienz lag in der Regel zwischen  $5 \times 10^5$  und  $3 \times 10^6$ -Kolonien/µg DNA.

#### 3.1.2 Transformation kompetenter Bakterien

Für die Transformation kompetenter XL1-Blue- und BL21-pLysS-Bakterien wurden ca. 1 ng DNA bzw. die DNA eines Ligationsansatzes mit 100 µl Bakterien 30 min auf Eis inkubiert. Anschließend wurden die Bakterien einem 45 sekundigem Hitzeschock bei 42°C ausgesetzt, und danach wieder für 3 Minuten auf Eis gestellt. Nach Zugabe von 100 µl SOC-Medium erfolgte eine Inkubation von einer Stunde bei 37°C unter Schütteln, um das Resistenzgen zu exprimieren. Anschließend erfolgte die Selektion der transformierten Zellen auf einer ampicillinhaltigen LB-Agar Platte bei 37°C über Nacht.

#### 3.1.3 Kulturen zur Plasmidisolierung

Für die Plasmidisolierung wurde LB-Medium mit dem Antibiotikum Ampicillin in einer Konzentration von 100 µg/ml und mit Bakterien aus Vorkulturen, bzw. einer Kolonie von einer

LB-Agar-Platte gepickt, angeimpft und bei 37°C unter Schütteln über Nacht inkubiert. Für eine analytische Plasmidisolierung wurden 5 ml LB-Medium in einem 13 ml PE-Röhrchen (Sarstedt) und für eine präparative Plasmidisolierung bis zu einem Volumen von 200 ml in einem sterilen 1 L Erlenmeyer-Kolben angeimpft.

### **3.1.4 Langzeitlagerung von Bakterien**

Für die Langzeitlagerung wurde 1 ml 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% CO<sub>2</sub> und 80-90% Luftfeuchtigkeit mit geeignetem Medium in Zellkulturflaschen kultiviert. Alle Arbeiten mit den Zelllinien fanden unter einer Sterilbank statt.

### **3.2.1 Kultivierung eukaryoter Zellen**

Die adhärenenten C33A-, RTS3b-, U87MG-, 293-Zellen wurden bei einer Konfluenz von 80-90% subkultiviert, um Kontaktinhibition der adhärenenten Zellen in den Zellkulturflaschen zu vermeiden. Zum Lösen der Zellen vom Boden wurden sie zunächst mit PBS gewaschen und anschließend mit Trypsin/EDTA je nach Zelllinie für 2-7 min bei 37°C inkubiert. Die abgelösten Zellen wurden in frischem Medium resuspendiert und je nach Wachstumsgeschwindigkeit der Zelllinie bzw. erwünschtem Dichtegrad 1:2 bis 1:14 in neue Zellkulturflaschen ausgesät.

Die Suspensionszellen U937 wurden bei einer Zellkonzentration von maximal 1x10<sup>6</sup> 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 Langzeit-Lagerung von Zellen wurden die in einer großen Gewebekulturflasche (150 cm<sup>2</sup>) zu 70-90% konfluent gewachsenen Zellen 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, das Pellet in 4.5 ml Einfriermedium resuspendiert und zu je 1.5 ml in Einfrierröhrchen aliquotiert. Die Lagerung erfolgte bei -150°C.

### **3.2.3 Zellzahlbestimmung**

Um die Zellzahl einer Suspension zu ermitteln, wurde eine Neubauer-Zählkammer mit einer Tiefe von 0,1 mm und einer Fläche von 0,002 m<sup>2</sup> verwendet. Nachdem sie mit einem Deckglas versehen wurde, konnte ihre Oberfläche mit einem Aliquot von der zuvor gut gemischten Zellsuspension versetzt werden. Unter dem Mikroskop wurden anschließend die Zellen in den vier Hauptquadraten gezählt und der Mittelwert gebildet. Die Anzahl der in einem Hauptquadrat gezählten Zellen multipliziert mit 10<sup>4</sup> entspricht der Anzahl der Zellen in 1 ml der Suspension.

### **3.2.4 Transfektion eukaryoter Zellen mit Plasmid-DNA**

Transiente Transfektionsanalysen wurden mit RTS3b-, U87MG- und C33A-Zellen durchgeführt. Dabei wurden Transfektionsreagenzien verwendet, die mit der eingesetzten DNA Komplexe bilden, und so die Aufnahme der DNA ermöglichen. Die in die Zellen eingeschleuste DNA wird in der Regel nicht ins Zellgenom integriert und geht somit im Verlauf der Zellteilung wieder verloren. Die so transfizierten Zellen wurden etwa 48 Stunden nach der Transfektion auf die Expression der Plasmide untersucht.

#### **3.2.4.1 Transiente Transfektion mittels Calciumphosphat-Präzipitation**

Die Transfektionen von C33A-Zellen wurden mittels Calciumphosphat-Präzipitation nach AUSUBEL *et al.*, (1992) durchgeführt. Dafür wurden in 10 cm Zellkulturschalen 3,16x10<sup>6</sup> Zellen ausgesät. Am darauf folgenden Tag wurde die zu transfizierende DNA (bis zu 15 µg) mit H<sub>2</sub>O auf ein Volumen von 430 µl aufgefüllt und mit 493 µl 2xHBS vermischt. Nach Zugabe von 63 µl 2M CaCl<sub>2</sub> wurden die Proben sofort 10 sec mit Hilfe eines Vortexers gemixt und 20 min bei Raumtemperatur (RT) inkubiert. Anschließend wurde das Präzipitat vorsichtig auf die Zellen pipettiert. Am nächsten Tag wurde ein Mediumwechsel durchgeführt. Die Ernte erfolgte 48 h nach der Transfektion.

#### **3.2.4.2 Transiente Transfektion mittels „FuGENE“ oder „X-tremeGene9“**

Die Transfektion von RTS3b- und U87MG-Zellen wurde mit „FuGene“ oder „XtremeGene9“ durchgeführt. Dafür wurden die Zellen in 6-Loch-Platten ausgesät. Die Anzahl der Zellen pro

Loch betrug  $0,9 \times 10^5$  (RTS3b), bzw.  $3 \times 10^5$  (U87MG). Am darauf folgenden Tag erfolgte die Transfektion.

Das Verhältnis von „FuGene“ bzw. „XtremeGene9“ und DNA betrug 2:1. Es wurden pro Probe 100µl serumfreies Medium mit dem der DNA in den einzelnen Ansätzen entsprechend doppelten Volumen Transfektionsreagenz für 5 min bei RT inkubiert. Anschließend wurde das Gemisch zu der DNA gegeben und zur Komplexbildung 15 min bei RT inkubiert. Die Transfektionsansätze wurden daraufhin auf die Zellen pipettiert. Die Ernte erfolgte 48 h nach Transfektion.

### **3.2.5 Hypoxie-Behandlung von Zellen**

Zur Untersuchung des Effekts von Hypoxie auf die Expression von ZNF395 wurden verschiedene Zelllinien bei einer Sauerstoffkonzentrationen von 2% kultiviert. Um diese Konzentration zu erhalten, wird der Sauerstoff durch in den Brutschrank strömenden Stickstoff verdrängt. Hier wurden die Zellen bei 37°C, 6% CO<sub>2</sub> sowie 2% O<sub>2</sub> für die angegebenen Zeiten inkubiert.

### **3.2.6 Knockdown Experimente“: RNA Interferenz zum Ausschalten von Zielgenen**

Um die Expression von Genen zu inhibieren (Knockdown) bedient man sich der Technik der siRNA-Interferenz. Kurze, doppelsträngige RNAs mit einer Länge von 19-23 Nukleotiden, so genannte siRNAs ("*small interfering RNAs*") werden mit einem Transfektionsreagenz (Lipofectamin RNAiMAX, Invitrogen) in die Zelle eingeschleust. Die siRNAs werden von dem Enzymkomplex RISC („RNA-induced silencing complex“) erkannt und einer der beiden Stränge wird degradiert. Der übrig gebliebene Leitstrang bindet komplementär an die Ziel-mRNA was zur Unterdrückung der Translation führt (Cerutti und Casas-Mollano 2006).

$0,9 \times 10^5$  Zellen U87MG oder  $1,2 \times 10^5$  Zellen RTS3b wurden in 6-Loch-Platten gesät. Am darauf folgenden Tag wurden 75 pmol der zu transfizierenden siRNA (siehe Punkt 2.3.1.) mit 250µl serumfreien OptiMEM (Invitrogen) versetzt und mit 5µl RNAiMAX Transfektionsreagenz, ebenfalls in 250µl OptiMEM, gemischt. Nach 15 minütiger Inkubation bei RT wurde das Gemisch zu den Zellen gegeben. 24h später erfolgte ein Mediumwechsel, nach weiteren 24h wurden die Zellen geerntet, um RNA- oder Zell-Extrakte herzustellen.

### **3.2.7 Ernte der transfizierten Zellen**

#### **3.2.7.1 Ernte durch physikalischen Zellaufschluss**

Adhärente Zellen einer 10 cm Zellkulturchale wurden mit 5 ml kaltem PBS gewaschen und in 150 µl 0,1 M LSDB-Puffer mit einem Gummischaber vom Boden abgelöst und in ein 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt. Die Suspensionszellen U937 wurden 5 min bei Raumtemperatur (RT) und 250 x g zentrifugiert. Die pelletierten Zellen wurden in kaltem PBS resuspendiert und erneut pelletiert (5 min, 250 x g, RT). Anschließend wurde das Zellepellet in 150µl 0,1M LSDB-Puffers resuspendiert und in ein 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt. Beide Zelltypen wurden anschließend 7 Minuten lang auf Eis sonifiziert, um die Zellmembranen zu zerstören. Der lösliche Zellextrakt wurde durch eine 10-minütige Zentrifugation bei 4°C und 21000g von den Zelltrümmern getrennt und in ein neues Reaktionsgefäß auf Eis überführt. Dieser konnte dann bei -80°C gelagert werden oder direkt für Proteinanalysen eingesetzt werden.

#### **3.2.7.2 Ernte durch chemischen Zellaufschluss**

Besonders fest am Boden von Gewebegefäßen haftende Zellen, wie RTS3b- Zellen, werden während des Abschabens mit dem Gummischaber beschädigt. Dadurch geht ein Großteil des Extraktes verloren. Dies konnte durch einen chemischen Zellaufschluss mit NP40 verhindert werden. Die Zellen wurden hierfür zweimal mit 1 ml PBS gewaschen, mit 150 µl Reportersol überschichtet und 5 min bei RT inkubiert. Der Überstand konnte direkt für die Luziferaseanalysen eingesetzt werden.

### **3.2.8 Bestimmung der Luziferase-Aktivität**

Pro Zellextrakt, hergestellt aus den Zellen eines Wells einer 6-Loch Platte, wurde 300µl an Luziferase-Reaktionspuffer 1:100 mit D-Luziferin versetzt. Die Messung der Luziferase-Aktivität erfolgte im Wallac Victor<sup>2</sup> (1420 Multilabel Counter) von Perkin Elmer. Nach sechs Waschschritten des Gerätes mit diesem Luziferinpuffer wurden jeweils 75µl Zellextrakt in eine lichtundurchlässige schwarze 96-Loch-Platte gegeben (Microplates für lifescience research von Perkin Elmer), und diese unmittelbar in den Victor gestellt. Nach Injektion von 150µl Luziferinhaltigem Puffer, wurde die Lichtemission im Victor über einen Zeitraum von 10sec gemessen. Der angezeigte Wert (RLU) war proportional zur Aktivität der exprimierten Luziferase, und wurde zur Anzahl der Zellen, ermittelt durch Bestimmung der Proteinkonzentration, relativiert (RLU/ Proteinkonzentration).

## 3.3 DNA-Methoden

### 3.3.1 Plasmidpräparationen

Sowohl analytische und präparative Plasmidisolierungen als auch DNA-Fragment-Aufreinigungen wurden mit Reagenziensystemen (Kits) der Firma Invitrogen (Karlsruhe) (Pure Link™ HiPure Plasmid Filter Midi- und Maxiprep Kit) und der Firma QIAGEN (Hilden) nach Protokollen der jeweiligen Hersteller durchgeführt (QIAprep Spin/QIAprep 8 Miniprep, Plasmid Midi- und Maxiprep, *Gel Extraction* und *PCR Purification* Kit). Sie basieren auf der alkalischen Extraktionsmethode nach BIRNBOIM und DOLY (Birnboim und Doly 1979) und der Bindung der DNA an Anionen-Austauscher-Säulen (Quarzgel). Der DNA-Gehalt wurde am Nanodrop ND-1000 Spektrophotometer (Wilmington, Delaware, USA) bestimmt.

### 3.3.2 DNA-Sequenzierung

Für die Sequenzierung wurden:

20-40ng PCR-Produkt oder 200-500ng Plasmid- DNA aus der Mini-DNA-Präparation eingesetzt.

#### Ansatz:

2µl Sequenzmix

2µl DNA

1µl Primer (3,33µM)

#### Sequenzierungs-Programm:

|    |                  |      |        |                   |
|----|------------------|------|--------|-------------------|
| 1  | Temperaturzyklus | 96°C | 10 sec |                   |
| 29 | Temperaturzyklen | 96°C | 10 sec | (Denaturierung)   |
|    |                  | 42°C | 10 sec | (Hybridisierung)  |
|    |                  | 60°C | 3 min  | (Polymerisierung) |
| 1  | Temperaturzyklus | 4°C  | endlos |                   |

Die Aufreinigung der Reaktion erfolgte über das DyeEx 2.0 Spin Kit von Quiagen. Die Analyse der Sequenzierreaktionen am Sequenzer erfolgte im Institut durch die AG Kaiser. Die Sequenzen konnten dann mit dem Programm Vector NTI von Invitrogen analysiert werden.

### 3.3.3 Polymerase-Kettenreaktion (PCR) mit KOD extreme

Die PCR ist ein Verfahren zur selektiven Amplifikation einer DNA-Sequenz, die durch die Bindung zweier Oligonukleotide (Primer) an eine DNA-Matrize begrenzt wird (Mullis und Faloona 1987). Der Sense und der Antisense Primer grenzen den zu amplifizierenden Bereich ein. Die Amplifikation des ca. 4 kb großen regulatorischen Bereiches von ZNF395 erfolgte in einer PCR-Reaktion, die in einem Reaktionsvolumen von 50 µl durchgeführt wurde. Hierfür wurden 100ng gesamt zellulärer DNA aus Rts3b-Zellen und jeweils 0,3 µM der beiden Primer eingesetzt. Die Reaktion fand in Gegenwart von 3mM Mg<sup>2+</sup>-und je 0,4 µM der vier Desoxynukleotide statt. Nach Zugabe von 1 U KOD Xtreme Hot Start DNA Polymerase (Novagen), einer Polymerase die sich für besonders GC-reiche Sequenzen eignet, wurden die Ansätze in das auf 94°C vorgeheizte PCR-Gerät (T3-Thermocycler, Biometra, Göttingen) gestellt. Die Temperaturzyklen hatten folgendes Schema:

|    |                   |      |        |                   |
|----|-------------------|------|--------|-------------------|
| 1  | Temperaturzyklus: | 94°C | 2 min  |                   |
| 30 | Temperaturzyklen  | 98°C | 10 sec | (Denaturierung)   |
|    |                   | 68°C | 30 sec | (Hybridisierung)  |
|    |                   | 68°C | 4 min  | (Polymerisierung) |
| 1  | Temperaturzyklus  | 72°C | 10 min | (Polymerisierung) |

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.

### 3.3.4 DNA Standardmethoden

Die hier aufgeführten Methoden wurden nach Protokollen von Maniatis et al. (1989) und Ausubel et al. (1997) durchgeführt.

- Spaltung von DNA durch Restriktionsendonukleasen
- Dephosphorylierung der 5'-Enden von DNA-Fragmenten mit alkalischer Phosphatase
- Ligation von DNA-Fragmenten mit der T4-Ligase
- Gelelektrophorese von Nukleinsäuren (Agarosegele)
- Reinigung von PCR-Produkten und DNA-Gelextraktionen
- Auffüllen von 5'-Überhängen mit Klenow-Polymerase

### 3.3.5 Quantitative Echtzeit-PCR

Das Verfahren der quantitativen 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 der LightCycler480 von Roche verwendet, zusammen mit den Reagenzienkits SYBRGreen I (Roche) oder BRYTGreen (Promega), 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.

Die Auswertung der qPCRs erfolgte nach dem mathematischen Prinzip der relativen Quantifizierung nach PFAFFL. Diese beinhaltet die Normalisierung der Expressionsergebnisse anhand eines nicht regulierten „House-keeping Gens“ (HPRT), die Berechnung der real-time PCR Effizienz sowie die Verrechnung und statistische Auswertung der Expressionsergebnisse bezogen auf einen basalen Wert. Als Maß für die Quantifizierung der Startmenge werden die sogenannten CP (= Crossing Point) Werte herangezogen. Sie entsprechen der Anzahl der PCR Zyklen, die nötig sind um ein konstant definiertes Fluoreszenzniveau zu erreichen (Pfaffl 2001).

#### **Ansatz:**

|      |   |
|------|---|
| 2 µl | cDNA  |
| 10µl | 2xMix „LightCycler FastStart DNA Master SYBR Green“ (Roche)<br>oder „The GoTaq® qPCR“ (Promega) |
| 6µl  | µl H <sub>2</sub> O   |
| 1µl  | Primer (10µm)   |
| 1µl  | Primer (10µl)   |

### **PCR-Bedingungen:**

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

### **3.3.6 *In vitro* Mutagenese**

Punktmutationen in DNA (und dadurch resultierende Aminosäureaustausche in Proteinen) wurden nach dem Protokoll des Reagenziensystems „QuickChange™ Site-directed Mutagenesis Kit“ (Stratagene, La Jolla, USA) hergestellt. 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 µl Reaktionspuffer  
1 µl Plasmid (50 ng/µl)  
1 µl Oligonukleotid A (125 ng/µl)  
1 µl Oligonukleotid B (125 ng/µl)  
1 µl dNTP-Mix  
1 µl *Pfu Turbo* DNA-Polymerase  
ad 50 µl H<sub>2</sub>O

## 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-Bakterien verwendet. Aus den gewachsenen Bakterienklonen wurde die Plasmid-DNA präpariert, die durch Sequenzierung auf die Anwesenheit der Mutation überprüft wurde.

## 3.4 RNA-Methoden

### 3.4.1 RNA-Isolierung

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

#### Reverse Transkription

Für die Umschreibung der gesamt RNA wurde ein Kit der Firma Invitrogen (Superskript VILO cDNA Synthese Kit) oder der Firma Primer Design (nanoScript RT kit) verwendet. Es wurden 2 µg RNA eingesetzt. Die Ansätze und Inkubationszeiten wurden den Angaben des Herstellers entnommen. Die c-DNA wurde für eine anschließende Echtzeit-PCR eingesetzt. (s. Kapitel 3.3.5.).

## 3.5 Proteinmethoden

### 3.5.1 Herstellung von Ganzzellextrakten

Ganzzellextrakte wurden durch physikalischen Zellaufschluss, wie unter 3.2.6. beschrieben, hergestellt.

### 3.5.2 Quantitative Proteinbestimmung

Die Proteinkonzentration einer Lösung wurde nach BRADFORD (1976) bestimmt (Bradford 1976). Hierfür wurde in eine 96-Loch-Platte zum einen eine BSA-Verdünnungsreihe (0-10 µg) zur Erstellung einer Eichkurve, und zum anderen jeweils 2 µl der proteinhaltigen Zellextrakte pipettiert. Um die Auswirkung von Pipettierungenauigkeiten zu reduzieren, wurde jede Probe im Doppellansatz eingesetzt. Alle Proben wurden mit je 150 µl einer 1:5 Verdünnung des *Protein Assay Reagents* (BioRad) versetzt. Anschließend wurde die OD<sub>620</sub> in einem Spektralphotometer (Spectra, Tecan, Crailsheim) gemessen und die Proteinkonzentration anhand der Eichkurve bestimmt.

### 3.5.3 Affinitäts-chromatographische Reinigung des ZNF395-Antiserums

Die Aufreinigung des ZNF395-Antiserums erfolgte mit dem ImmunoPure (A/G) IgG Purification Kit (Pierce, Rockford, USA).

Zwei ml des polyklonalen Antiserums gegen bakteriell expimiertes His getaggttes ZNF395, das in Kaninchen hergestellt wurde (Boeckle et al., 2002), wurden für 10 min bei 3600 rpm und 4°C zentrifugiert. Der Überstand wurde 1:1 mit einem Bindepuffer verdünnt und auf eine Protein A/G Sepharose Säule geladen, die zuvor mit 5 ml dieses Puffers equilibriert wurde. Die Immunglobuline aus dem Kaninchenserum binden an die A/G-Sepharosebeads, im Gegensatz zu anderen Proteinen und Komponenten des Serums. Der Durchfluss wurde verworfen, und die Säule mit 5 ml Bindepuffer gewaschen. Eluiert wurden die Immunglobuline in einem Gesamtvolumen von 8 ml saurem Elutionspuffer. Das Eluat wurde in 500µl-Aliquots in Eppendorf Reaktionsgefäßen, die bereits 100 µl Neutralisationspuffer enthielten, gesammelt. Die Eluate, welche bei 4°C aufbewahrt werden, wurden mit 0,02% NaNO<sub>3</sub> versetzt, um eine Kontamination zu verhindern. Anschließend wurde die Proteinkonzentration nach Bradford bestimmt.

### **3.5.4 Proteininduktion**

Die Expression von Proteinen in Bakterien erfolgte in BL21-pLysS. Dafür wurden 200 ml LB-Medium 1:40 mit einer dichten Vorkultur der Bakterien, welche die gewünschte Plasmid-DNA enthielten, angeimpft und bei 37°C und 200 rpm bis zu einer OD600 von 0,5-0,6 inkubiert. Zur Selektion wurde dem Medium 100 µg/ml Ampicillin beigesetzt. Die Proteinexpression wurde durch Zugabe von 0,25-1mM IPTG induziert und erfolgte für 2,5 h bei 30 oder 37°C. Vor der Induktion und Ernte wurden je 1ml Aliquots entnommen, die Bakterien durch 10-minütige Zentrifugation bei 4°C und 3000g pelletiert, und in 100µl 2x SDS aufgenommen. Die restliche Bakteriensuspension wurde ebenso pelletiert, das Pellet in 3 ml HSLB resuspendiert und durch viermaliges Sonifizieren für je 20 sec bei 100 Watt auf Eis lysiert. Die Zelltrümmer wurden daraufhin durch zweimalige Zentrifugation für je 10 min bei 4°C und 21000 g pelletiert. Der im Überstand befindliche Proteinextrakt wurde in Aliquots bei -80°C gelagert, oder direkt für Analysen eingesetzt.

### **3.5.5 Behandlung von Ganzzellextrakt mit λ-Phosphatase**

50 µg Ganzzellextrakt wurden 30 min bei 30°C mit 600 Units λ-Phosphatase (Santa Cruz, Heidelberg) in 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.

### **3.5.6 Western Blots**

Für Western Blot Analysen wurden die über ein SDS-Proteingel aufgetrennten Proteine auf eine Nitrocellulose-Membran (NC, BioRad, München) übertragen. Dafür wurde eine luftblasenfreie Schichtung aus einem in Transfer-Puffer getränkten Schwamm, zwei Whatman-Papieren, dem Gel, der NC-Membran, zwei weiteren Whatman-Papieren sowie einem weiteren Schwamm hergestellt, und nach der Fixierung zwischen zwei Kunststoffplatten in eine Blotkammer überführt. Es wurde entweder eine Spannung von 35 V über Nacht oder von 80 V für mindestens 2 Stunden so angelegt, dass sich der Filter zwischen dem Gel und der Anode der Kammer befand. Nach dem Transfer folgte eine Anfärbung der Proteine mit einer Ponceau-S-Lösung. Durch das Waschen der Membran mit H<sub>2</sub>O wurde der Hintergrund entfärbt und die Markerbanden mit einem Stift nachgezogen. Die Membran wurde mit einem Skalpell zurechtgeschnitten und anschließend in 1x TBST vollständig entfärbt. Die unspezifische Bindung der Antikörper an die proteinfreien Stellen wurde durch einstündige Inkubation der NC-Membran in Abblocklösung verhindert.

Daraufhin wurde der Filter auf Parafilm gelegt, mit einer entsprechenden Menge 1. Antikörper überschichtet und zwei Stunden bei RT inkubiert. Es folgten drei zehnmütige Waschschritte in TBST und eine einstündige Inkubation mit verdünntem, POD-gekoppelten 2. Antikörper. Die Antikörper wurden in 4% Magermilchpulver in 1x TBST Lösung, verdünnt. Anschließend wurde die Membran 4 x 10 min in 1x TBST gewaschen, erneut auf Parafilm gelegt und für eine Minute mit 1,5 ml „BM Chemiluminescent Blotting Substrat“ (verdünnt 1:100, Lösung A zu 99 und Lösung B zu 1) überschichtet. Diese Lösung enthält Luminol, das durch die an den zweiten Antikörper gekoppelte POD in einer Oxidationsreaktion umgesetzt wird. Das entstandene Zwischenprodukt zerfällt unter Emission von Licht. Der Filter wurde vorsichtig abgetropft und zwischen zwei Klarsichtfolien in einer Expositions-kassette fixiert. In der Dunkelkammer konnte dann, je nach Stärke des Signals, für einige Sekunden bis hin zu mehreren Minuten ein ECL-Film aufgelegt und anschließend entwickelt werden, um das Signal sichtbar zu machen. Bei starken Signalen konnte der Blot auch in der Gel-Dokumentationsanlage mit Chemilumineszenz-Einheit der Firma BioRad (München) entwickelt werden.

### **3.5.7 Strippen von Western Blots**

Um bereits gebundene Primär- und Sekundär- Antikörper von Western Blot zu entfernen, werden die Membranen gestrippt. Die Membran wird für 30 min bei 55°C im Rollinkubator in 10 ml Stripping-Puffer inkubiert. Nach anschließendem viermaligen waschen mit 1x TBST kann der Western Blot erneut in Milchpulverlösung geblockt und mit weiteren Primär-Antikörpern behandelt werden.

## **3.6 Histologische Untersuchungen von Paraffin-gebetteten Gewebeschnitten**

### **3.6.1 Immunfluoreszenzfärbung**

Die Paraffin-gebetteten Schnitte wurden zunächst entparaffinisiert. Dafür wurden sie 2 mal 5 min in Xylol inkubiert, gefolgt von je 5 min in einer absteigenden Alkoholreihe, bestehend aus 100%, 90% und 70% Ethanol. In destilliertem Wasser wurden sie kurz zwischengelagert, bevor mittels 3% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> verdünnt in Methanol für 10 min die endogenen Peroxidasen inaktiviert wurden. Um das Gewebe aufzuschließen, wurden die Schnitte in 1 l Citratpuffer (pH5,8), der zuvor im Dampfgarer ohne Deckel in der Mikrowelle bei maximaler Stärke 12 min aufgekocht wurde, in der Mikrowelle 4 min bei maximaler Leistung erhitzt. Anschließend

wurden die Objektträger mit destilliertem Wasser abgespült, die Fläche mit einem Papiertuch um den Schnitt herum abgetrocknet und mit einem DAKO-Fettstift umrandet, um das benötigte Volumen der Lösungen zu minimieren. Unspezifische Bindungen wurden daraufhin durch Zugabe der Blockierungslösung, bestehend aus 20% FCS in 1x PBS, bei RT 1 Stunde abgeblockt, gefolgt von der Inkubation mit dem ersten Antikörper, verdünnt in 2% FCS in 1x PBS, über Nacht bei 4°C oder für 90 min bei RT. Daraufhin wurden die Schnitte zweimal mit 1x PBS für 5 min gewaschen und mit den jeweiligen fluoreszierenden Sekundär-Antikörpern für 2 Stunden im Dunkeln inkubiert. Danach erfolgte erneutes 2-maliges Waschen für 5min in 1x PBS. Anschließend wurden die Schnitte in Immuno-Mount (ThermoScientific, Pittsburgh) eingebettet. Das Trocknen der Schnitte erfolgte bei 4° über Nacht im Dunkeln. Die Schnitte konnten am nächsten Tag unter dem Fluoreszenzmikroskop beurteilt werden.

### **3.6.2 Immunhistochemische Färbung**

Die Vorbereitung der Paraffinschnitte für die immunhistochemische Färbung wurde bis einschließlich der Anwendung der ersten Antikörper wie in Punkt 3.6.1 (Immunfluoreszenzfärbung) beschrieben, durchgeführt.

Um das Signal zum Nachweis des gebundenen Primär-Antikörpers zu verstärken, wurde zuerst der biotinylierte Sekundär-Antikörper, gerichtet gegen Maus- und Kaninchen-IgGs eingesetzt. Durch Zugabe des Vectastain ABC Reagenz, das aus einem Avidin- und Biotin-„Horseradish-Peroxidase“(HRP)-Complex besteht, kommt es zur Bindung mehrerer Moleküle des HRP-Komplexes an den biotinylierten Antigen-Antikörper Komplex. Die HRP-Aktivität wurde dann durch Zugabe eines chromogenen Substrates, Diaminobenzidin-Tetrahydrochlorid (DAB) nachgewiesen. Im einzelnen wurde Solution I, welche den Biotin gekoppelten Sekundär-Antikörper enthält auf die Schnitte getropft, die dann nach 30 Minuten Inkubation bei RT drei mal je 5 Minuten mit PBS gewaschen wurden, gefolgt von einer 20-minütigen Inkubation bei RT mit Solution II, welche den ABC-Komplex enthält. Nach erneutem 3-maligem Waschen mit PBS folgte die enzymatische Umsetzung des DAB-Substrats der Firma BioGenex durch die Peroxidase, bei der sich nach 5-10 Minuten ein sichtbarer Farbumschlag zeigte, der durch Eintauchen der Schnitte in PBS gestoppt wurde. Abschließend wurde das Gewebe durch 2%-iges Hämatoxilin für 1-3 Minuten gegengefärbt, welches die Zellkerne blau anfärbt, und mit einer aufsteigenden Alkoholreihe für die Einbettung in DePex (Serva Electrophoresis GmbH, Heidelberg) vorbereitet. Nach Trocknen über Nacht konnten die Schnitte am nächsten Tag unter dem Mikroskop betrachtet werden.

## 4 Ergebnisse

### 4.1 ZNF395 ist in Tumorgeweben exprimiert

In der Literatur gibt es vermehrt Hinweise darauf, dass die Expression von ZNF395 in Krebsgeweben und als Antwort auf Hypoxie, die in den meisten Fällen mit einer schlechten Prognose für den Patienten einhergeht, erhöht ist (Tsukahara et al., 2004; Skubitz et al., 2006; Dalgin et al., 2007; Yabe et al., 2008). Es ist wichtig zu charakterisieren, in welchen Krebsgeweben und in welchen Zelltypen eine Expression von ZNF395 zu detektieren ist, da es in Krebs-assoziierten Prozessen eine funktionale Rolle spielen könnte.

Frühere immunhistochemische (IHC) Färbungen mit einem affinitätsgereinigten Antikörper gegen ZNF395 zeigten im Zuge meiner Diplomarbeit eine zytoplasmatische Expression von ZNF395 in Zellen des Tumorstromas eines Pankreas- und Zervix-Karzinoms. Diese Ergebnisse wurden mit weiteren Proben bestätigt und sind exemplarisch in Abb. 3 dargestellt. Um systematisch die Expression von ZNF395 in verschiedenen Tumoren zu analysieren, wurde ein so genannter „Tissue Array“ verwendet, der Gewebestanden verschiedener Tumoren sowie normaler Gewebe auf einem Objektträger enthält. Dieser Array erlaubte somit die gleichzeitige Analyse mehrerer Gewebe auf einem Objektträger unter konstanten Bedingungen. Der Antikörper gegen ZNF395 wurde in einer Konzentration von 2,5 µg/ml eingesetzt. Ein Kontrollserum mit unspezifischen Kaninchen-Immunglobulinen diente als Negativkontrolle. Die Auswertung der Ergebnisse dieser Färbungen erfolgte in Kooperation mit dem Institut für Pathologie der Universität zu Köln.

Eine Übersicht über die verschiedenen Krebsgewebe des Tissue Arrays und die Lokalisation der ZNF395 Expression sind in Tabelle 1 zusammengefasst. Abb. 4 zeigt exemplarisch die Ergebnisse einiger IHC Analysen. Dargestellt ist ein Beispiel, in dem eine ZNF395 Expression im Nukleus von Tumorzellen eines Zervixkarzinom detektiert wurde (A), ein Zervixkarzinom, das keine Expression von ZNF395 zeigte (B), sowie ein Prostatakarzinom (C) und ein kolorektales Karzinom (D), die beide eine zytoplasmatische Expression von ZNF395 in Zellen des Tumorstromas aufwiesen. Die Analyse des Tissue Arrays ergab, dass für viele Krebsarten Beispiele gefunden werden konnten, die entweder keine, eine Expression von ZNF395 in Zellen des Tumorstromas, oder zusätzlich eine Expression von ZNF395 in den Tumorzellen aufwiesen. Auffällig war, dass ZNF395 in Tumorstromazellen im Zytoplasma, und in den Tumorzellen im Zellkern vorlag (Abb. 5).

| Krebsart nach Gewebetyp unterteilt              | Gesamtzahl der Gewebe | zytoplasmatische Expression in Tumorstromazellen | Negativ (total) | positive Tumorzellen, nukleäre Expression |
|---|-----------------------|--|-----------------|---|
| Hepatozellulär                                  | 3                     |  | 3               |   |
| Nierenzell                                      | 2                     |  | 2               |   |
| Prostata  | 4                     | 1  | 2               | 1   |
| Brust   | 1                     | 1  |                 | 1   |
| Kolorektal                                      | 2                     | 1  | 1               |   |
| Osteo   | 2                     |  | 2               |   |
| Gastrointestinal                                | 3                     |  | 3               |   |
| Urothel   | 2                     | 1  | 1               | 1   |
| Pankreas  | 3                     | 3  |                 |   |
| Plattenepithel des Pharynx (1x), der Lunge (2x) | 3                     |  | 3               |   |
| Magen   | 2                     |  | 2               |   |
| Zervix  | 4                     | 1  | 2               | 1   |

Tabelle 1 Tissue Array: Anzahl, Typ und Lokalisation ZNF395 exprimierender Zellen wurden aufgelistet. Der Nachweis erfolgte mittels IHC Analysen verschiedener, auf einem Array angeordneter Gewebe mit einem gegen ZNF395 gerichteten Antikörper.

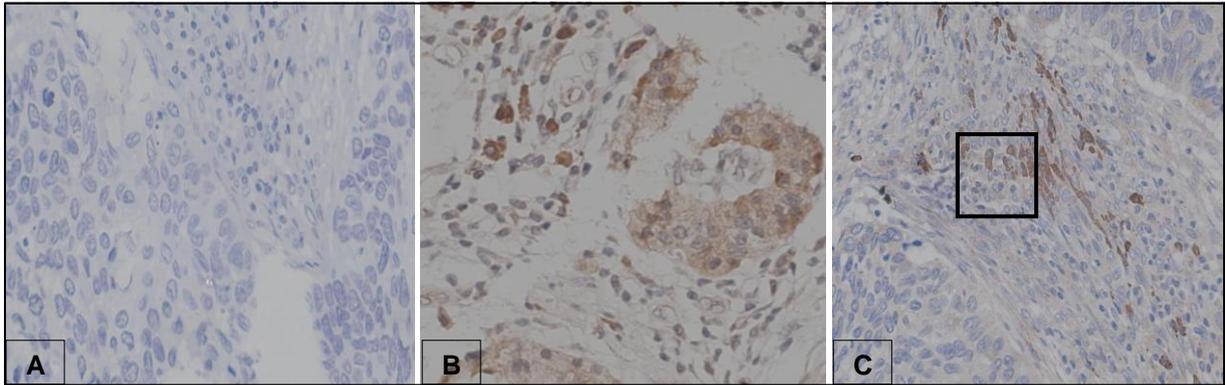


Abb. 3 Immunhistochemischer Nachweis von ZNF395 in Tumorstromazellen eines Pankreaskarzinoms (B) und eines Zervixkarzinoms (C)

In Paraffin eingebettete Gewebeschnitte eines Pankreaskarzinoms (B) und eines Zervixkarzinoms (C) wurden mit dem Antikörper gegen ZNF395 inkubiert. Der Nachweis des Antikörpers erfolgte mittels DAB Substrat. Die Zellkerne wurden mit Hämatoxylin gegengefärbt. Als Negativkontrolle diente eine Behandlung des Pankreaskarzinoms mit einem Kontrollserum aus Kaninchen (Abb. 3A). Vergr.: 200x

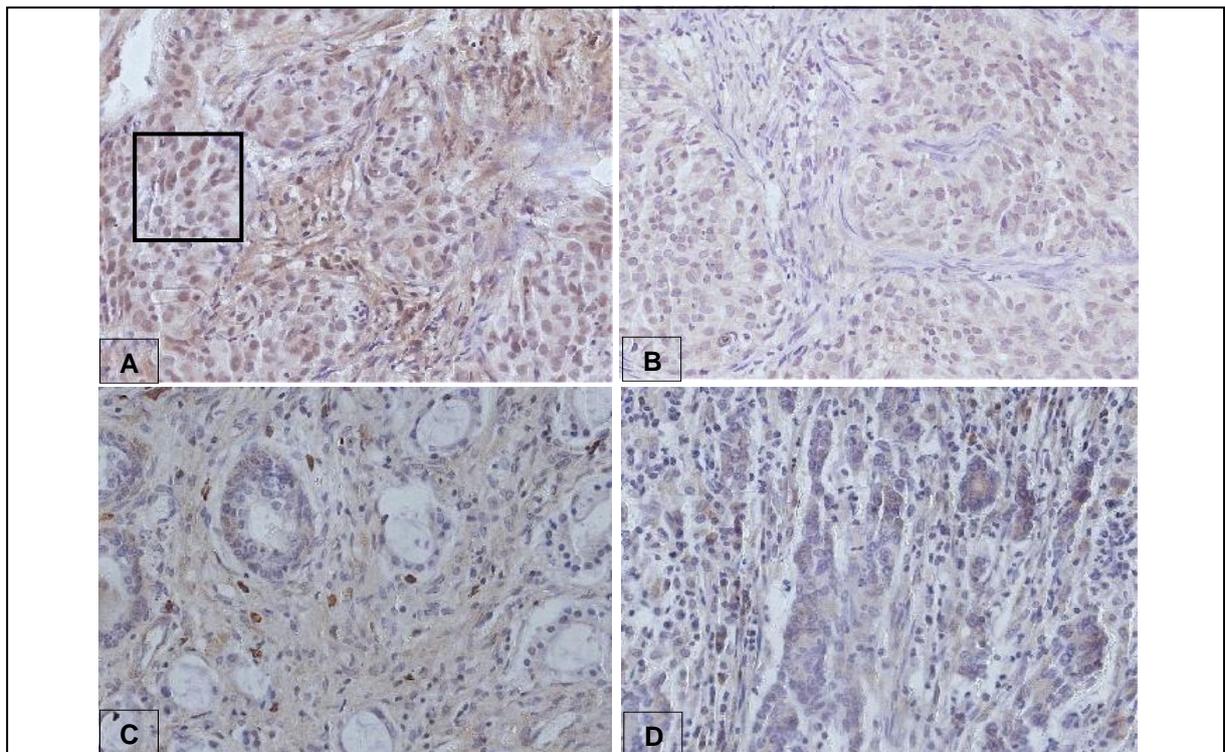


Abb. 4 Tissue Array: Immunhistochemischer Nachweis von ZNF395 in Zervixkarzinomen (A, B), im Prostatakarzinom (C) und im Kolorektalen Karzinom (D)

In Paraffin eingebettete Gewebeschnitte wurden mit dem Antikörper gegen ZNF395 inkubiert. Der Nachweis des Antikörpers erfolgte mittels DAB Substrat. Die Zellkerne wurden mit Hämatoxylin gegengefärbt. Exemplarisch sind verschiedene Lokalisationen von ZNF395 gezeigt. Es zeigte sich nukleäre Expression von ZNF395 (A), keine ZNF395 Expression (B) und zytoplasmatische Expression (C, D). Vergr. 200x

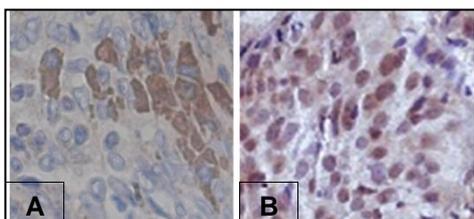


Abb. 5 ZNF395 Expression ist in Stromazellen cytoplasmatisch (A) und in Tumorzellen nukleär (B) lokalisiert  
Vergrößerung, der durch Kästchen hervorgehobenen Gewebebereiche des Zervixkarzinoms aus Abb.3C mit einer cytoplasmatischen Expression von ZNF395 in Stromazellen und des Zervixkarzinoms aus Abb.4A mit nukleärer Expression von ZNF395 in Tumorzellen

#### **4.1.1 ZNF395 ist in Tumor-infiltrierenden CD14<sup>+</sup> Monozyten und CD79a<sup>+</sup> B-Lymphozyten exprimiert**

Tumoren bestehen aus zwei Arten von Gewebe, den neoplastischen Tumorzellen, die durch Fehlregulation des Zellwachstums entstehen, und den Tumor umgebendem Stroma. Das Tumorstroma setzt sich aus verschiedenen Zellen zusammen, wie z.B. Fibroblasten, Keratinozyten, Endothelzellen, die Blutgefäße bilden um den Tumor mit Sauerstoff zu versorgen, und aus infiltrierenden Immunzellen (Bremnes et al., 2011; Dutsch-Wicherek und Kazmierczak 2013). Wie in Abb.3 und 4 dargestellt, zeigten Färbungen verschiedener Krebsarten eine starke, scharf abgegrenzte Färbung von ZNF395 im Zytoplasma von Tumorstromazellen, was auf eine starke Expression schließen lässt.

Um eine mögliche funktionale Rolle von ZNF395 verstehen zu können, sollten diese Zellen, (welche ZNF395 im Zytoplasma exprimieren), charakterisiert werden. Eine Möglichkeit dafür ist die Immunfluoreszenz (IF), bei der Antigene von Antikörpern gebunden werden, die mit fluoreszierenden Farbstoffen markiert sind und unter UV-Bestrahlung mit geeigneter Wellenlänge sichtbar gemacht werden. Die IF erlaubt es, mit zwei verschiedenen Primär-Antikörpern zu arbeiten, welche von verschiedenen Fluoreszenz-markierten Sekundär-Antikörpern (FITC-gekoppelt, grün und TRITC/Dyelight594-gekoppelt, rot) erkannt werden. Die Färbung des Zellkerns erfolgt mittels blau fluoreszierendem DAPI. Ein hohes Maß an Kolo-kalisation zeigt sich bei der IF durch Überlagerung des roten und des grünen Fluoreszenzfarbstoffs, die zu einer gelb-orangen Farbe führt.

Um die ZNF395 exprimierenden Zellen zu identifizieren, wurden Gewebeschnitte mit einem Antikörper gegen ZNF395 und mit Antikörpern gegen bestimmte Oberflächenproteine, deren Expression charakteristisch für bestimmte Zelltypen des Tumorstromas ist, behandelt (siehe 2.4.3.1).

Färbungen mit Antikörpern gegen Markerproteine für Stromazellen wie Vimentin oder „Smooth muscle Actin“, beide exprimiert in Myofibroblasten, die in das Tumorstroma eingewandert sind und aktivierte, nicht transformierte Fibroblasten darstellen, oder Fillagrin, das in Keratinozyten exprimiert ist (Polanska und Orimo 2013), ergaben keine überlagernde Fluoreszenz (Daten nicht gezeigt). ZNF395 scheint somit in diesen Zellen nicht überexprimiert vorzuliegen.

Die Morphologie der ZNF395 exprimierenden Zellen ähnelte Immunzellen. CD79a ist ein Marker, der typischerweise auf Plasma B-Zellen, die in das Tumorstroma infiltrieren können, exprimiert ist (Chu und Arber 2001). Wie Abb. 6 zeigt, war bei ca. der Hälfte der jeweils durch den ZNF395 oder CD79a Antikörper gefärbten Zellen eine Überlagerung der roten und grünen Fluoreszenz zu detektieren. Dies verdeutlicht, dass in einigen Plasmazellen eine nachweisbare Menge an ZNF395 Proteinen vorliegt.

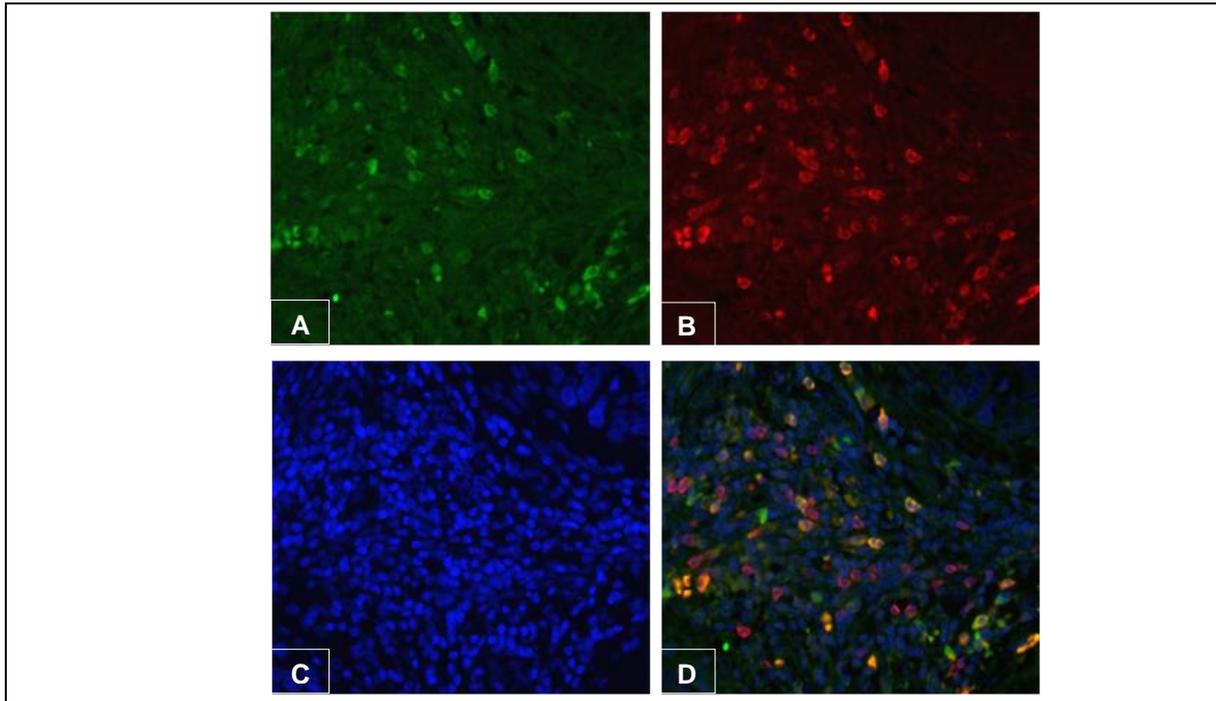


Abb. 6 Nachweis von ZNF395 und CD79a im Zervixkarzinom mittels Immunfluoreszenz  
 Ein in Paraffin eingebetteter Gewebeschnitt eines Zervixkarzinoms wurde mit einem in Kaninchen hergestellten Antikörper gegen ZNF395 und einem in der Maus hergestellten Antikörper gegen CD79a inkubiert, gefolgt von der Inkubation mit FITC gekoppeltem Sekundär-Antikörper gegen Kaninchen IgG (A: grüne Fluoreszenz), und einem Dyelight594-gekoppelten Sekundär-Antikörper gegen Maus IgG (B: rote Fluoreszenz) und DAPI, welches die Zellkerne blau anfärbt (C). Die Überlagerung der Fluoreszenzen erfolgte mit geeigneter Computersoftware (D). Vergr. 200x

Eine starke Überlagerung der roten und grünen Fluoreszenz ergaben die Analysen des Zervix Karzinoms mit Antikörpern gegen ZNF395 (grün) und CD14 (rot), einem Markerprotein, dessen Oberflächen-Expression charakteristisch für Monozyten ist (Abb.7).

Eine Koexpression von ZNF395 und CD14 konnte auch in Tumorstromazellen eines Pankreaskarzinoms gefunden werden (Daten nicht gezeigt).

Im Blut zirkulierende Monozyten werden chemotaktisch durch Zytokine zu entzündetem Geweben gelockt und dringen in dieses ein. Währenddessen reifen sie zu Makrophagen. Während dieser Reifung nimmt die Expression von CD14 ab und die von CD68 und CD163 zu, sodass deren Detektion auf reife Makrophagen beschränkt ist. Färbungen mit Antikörpern gegen diese charakteristischen Oberflächenproteine schlossen sich an, um die Expression von ZNF395 im Laufe der Reifung zu untersuchen. Abb. 8 zeigt, dass keine Koimmunofluoreszenz bedingt durch ZNF395 und CD163 zu detektieren war (links). Eine Koexpression von ZNF395 und CD68 war hingegen in einigen Zellen zu beobachten. Es gab Zellen, die schwach positiv für CD68 und stark positiv für ZNF395 waren. Die stark rotgefärbten Zellen zeigten jedoch keine starke grüne Fluoreszenz. Dies weist darauf hin, dass mehr ZNF395 in CD14 positiven tumorinfiltrierenden Monozyten vorliegt als in reifen Makrophagen und impliziert eine Modifikation von ZNF395 im Laufe der Differenzierung.

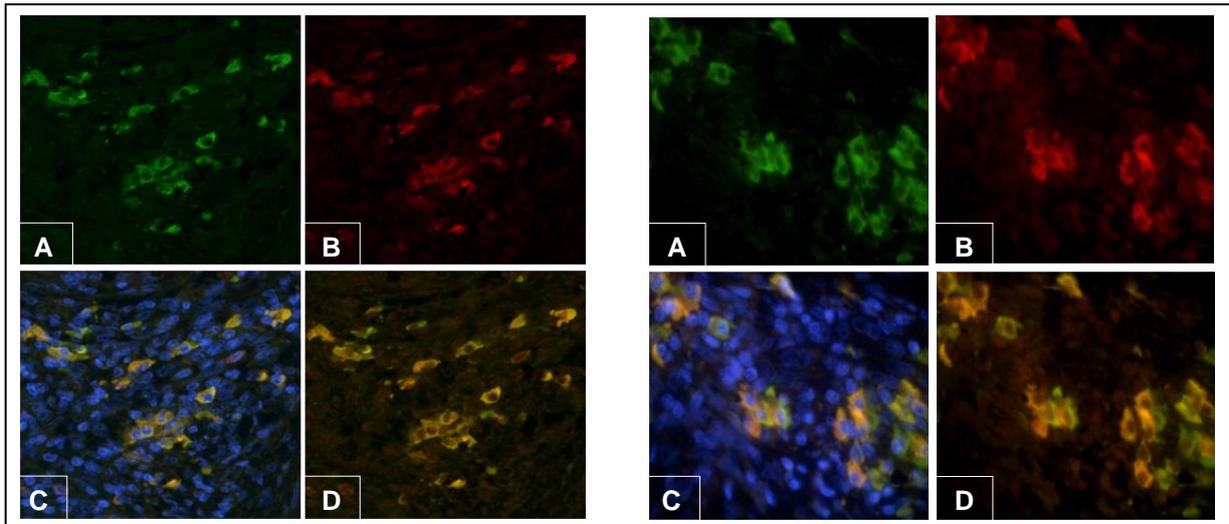


Abb. 7 Nachweis von ZNF395 und CD14 im Zervixkarzinom mittels Immunfluoreszenz  
 Ein in Paraffin eingebetteter Gewebeschnitt eines Zervixkarzinoms wurde mit einem in Kaninchen hergestellten Antikörper gegen ZNF395 und einem in der Maus hergestellten Antikörper gegen CD14 inkubiert, gefolgt von der Inkubation mit geeigneten Sekundär-Antikörpern, wie in Abb.3 beschrieben.  
 Vergr. Links 200x, rechts 400x

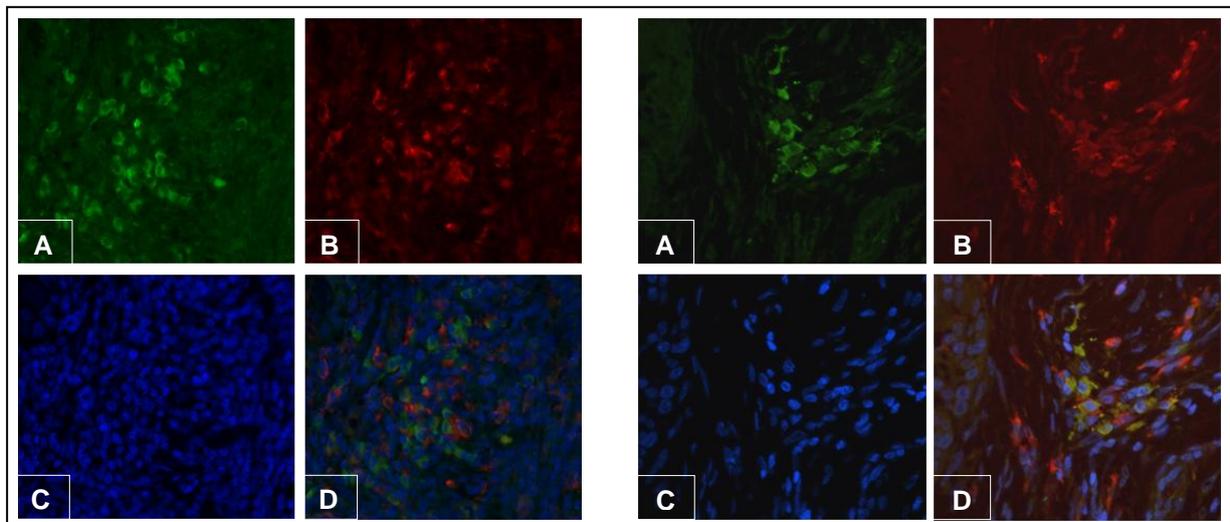


Abb. 8 Nachweis von ZNF395 und CD163 (links) und CD68 (rechts) im Zervixkarzinom mittels Immunfluoreszenzchemie  
 Ein in Paraffin eingebetteter Gewebeschnitt eines Zervixkarzinoms wurde mit einem in Kaninchen hergestellten Antikörper gegen ZNF395 und einem in der Maus hergestellten Antikörper gegen CD163 (links) und CD68 (rechts) inkubiert, gefolgt von der Inkubation mit geeigneten Sekundär-Antikörpern, wie in Abb.3 beschrieben.  
 Vergr. Links 200x, rechts 400x

#### 4.1.2 ZNF395 Expression nimmt im Zuge der Differenzierung von prämonozytären U937 zu Makrophagen ab

Monozyten zirkulieren im Blut und wandern in Gewebe ein, wo sie zu Makrophagen reifen (Castagna et al., 2012). Die prämonozytäre Zelllinie U937 aus einem histiozytären Lymphom dient als *in vitro* Modell System, da die Differenzierung zu Makrophagen durch Phorbol 12-Myristat 13-Acetat (PMA) induziert werden kann. Die Zugabe von PMA zum Zellkulturmedium führt zur Inhibierung der Proliferation und leitet dadurch die Differenzierung ein. Erkennbar ist dies durch Veränderung der Morphologie und veränderte Expression zelltypspezifischer Marker.

Um die Expression von ZNF395 im Zuge der PMA-induzierten Differenzierung zu untersuchen, wurde mit diesen Zellen gearbeitet. U937 Zellen wurden mit einer Dichte von  $1 \times 10^5$  Zellen pro ml ausgesät und nach 24h mit 10ng/ml PMA im Medium inkubiert. Nach weiteren 48h wurden die Zellen am Mikroskop betrachtet. Die Suspensionszellen wurden in Folge der PMA-Behandlung adhärent. Zudem war eine Zunahme der Größe der Zellen im Gegensatz zu den nicht behandelten Zellen zu erkennen. Der Zellkern vergrößerte sich, das Verhältnis Zellkern zu Zytoplasma nahm ab, im Zytoplasma bildeten sich Vakuolen und die Membranen zeigten Pseudopodien (Abb. 9). Die Veränderungen stimmten mit den in der Literatur beschriebenen Beobachtungen überein (Kim und Feldman 2002).

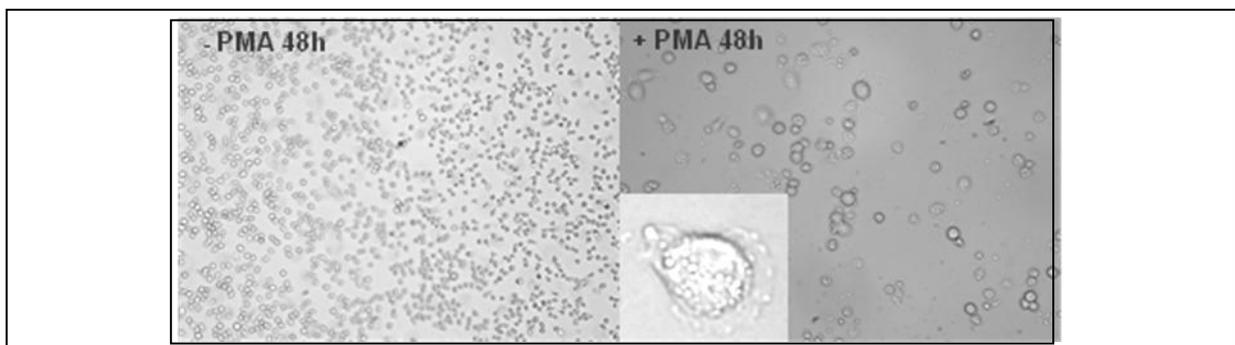


Abb. 9 U937 Prä-Monozyten differenzieren durch Stimulation mit PMA zu einem Makrophagen-ähnlichen Phänotyp  
 $1 \times 10^5$  Zellen/ml wurden für 48h mit PMA haltigem Medium in einer Konzentration von 10ng/ml inkubiert und fotografiert. Vergr.: 200x, rechts im Ausschnitt: 400x

Um die Expression von ZNF395 während der Differenzierung quantitativ bestimmen zu können, wurden aus den adhärennten PMA-behandelten und den unbehandelten Suspensions-U937-Zellen Proteinextrakte hergestellt, bzw. RNA isoliert. Die extrahierten Proteine wurden im Western Blot mit einem Antikörper gegen ZNF395 auf dessen Expression hin analysiert. Es zeigte sich eine deutliche Abnahme der Menge an ZNF395 nach Behandlung der Zellen mit PMA (Abb. 10A). Gesamtzelluläre RNA aus PMA-

behandelten und unbehandelten U937-Zellen wurde revers transkribiert und die Menge der ZNF395 spezifischen Transkripte durch qRT-PCR im Light Cycler gemessen. Die Expression des „Housekeeping-Gens“ HPRT1 wurde ebenfalls bestimmt und war durch PMA nicht beeinflusst. Die HPRT-Menge konnte somit als Basis verwendet werden, um die fache Änderung der ZNF395 mRNA behandelter Zellen in Relation zu unbehandelten Zellen zu ermitteln. Im Zuge dieser Differenzierung war eine gesteigerte Menge an C/EBP $\beta$  zu detektieren. Dies ist für die Reifung von Monozyten charakteristisch und unterstützt den Befund, dass die Differenzierung erfolgreich war. Die jeweiligen Werte wurden nach einem mathematischen Modell zur relativen Quantifizierung der RT-PCRs (Pfaffl 2001), wie in Kapitel 3.3.5 beschrieben, berechnet. Nach Zugabe von PMA zum Medium waren in U937 Zellen nur noch 60% der ZNF395 Transkripte nachweisbar. Die Menge an ZNF395 RNA und Protein nimmt somit im Zuge der Differenzierung von Monozyten zu Makrophagen ab.

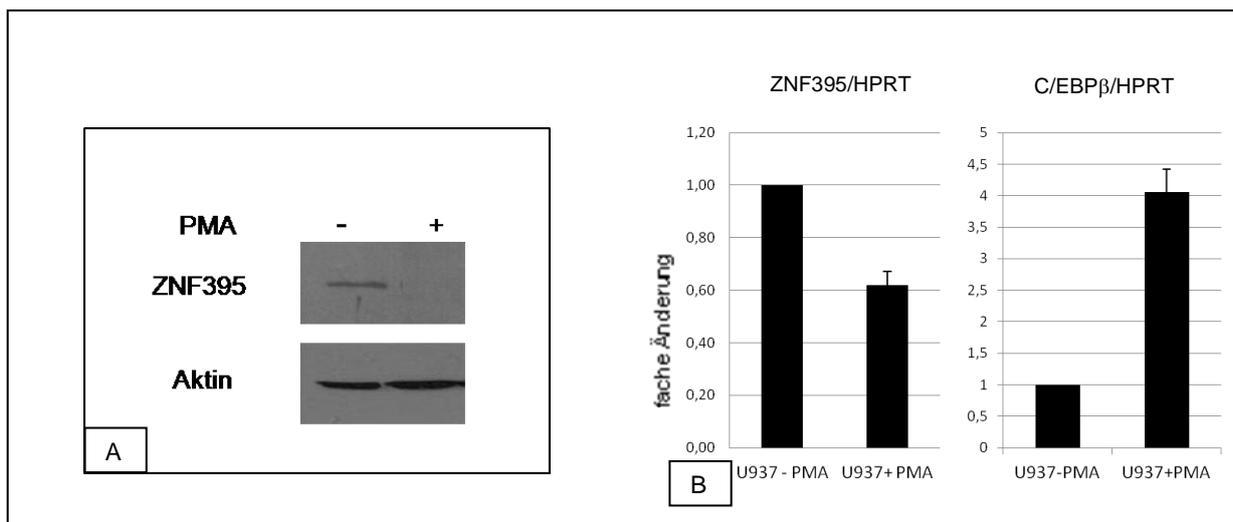


Abb. 10 ZNF395 Expression in U937 in Folge der Stimulation mit PMA  
U937 Zellen wurden für 48h Stunden mit 10ng/ml PMA behandelt.

A: Expressionsnachweis: Zellextrakte wurden von differenzierten, adhärennten Zellen (+), sowie unbehandelten Suspensions Zellen hergestellt. Jeweils 60  $\mu$ g Gesamtzell-extrakt wurde in einem 8%igen SDS-PAG aufgetrennt. Die Expression von ZNF395 wurde im Western Blot mit dem Antikörper gegen ZNF395 nachgewiesen. Als Beladungskontrolle wurde  $\beta$ -Aktin nachgewiesen.

B: QRT-PCR: 1 $\mu$ g Gesamtzelluläre RNA aus PMA-behandelten und unbehandelten U937-Zellen wurde revers transkribiert. Die relativen Spiegel der ZNF395-mRNA und C/EBP $\beta$ -mRNA wurden mit der  $\Delta\Delta$ CP-Methode durch Normalisierung gegen HPRT berechnet (Pfaffl 2001). Die im Diagramm aufgeführten Werte stellen die fache Veränderung der behandelten Probe in Relation zu der unbehandelten Probe dar. Die Balken repräsentieren die Mittelwerte aus drei unabhängigen qRT-PCRs. Die Standardabweichungen sind angegeben.

## 4.2 Analyse des Promotors von ZNF395

### 4.2.1 Klonierung der regulatorischen Region von ZNF395

IHC und IF Analysen zeigten, dass ZNF395 in CD14 und CD79a positiven Zellen des Tumorstromas exprimiert ist. Die zuvor beschriebenen Ergebnisse weisen darauf hin, dass die Menge an ZNF395 im Rahmen der Reifung von Monozyten zu Makrophagen abnimmt. Wie in der Einleitung beschrieben, charakterisieren Mikroarray Analysen ZNF395 als einen Faktor, dessen Expression durch Hypoxie induziert wird (Lal et al., 2001; Murat et al., 2009). Um diese Befunde zu untermauern, sollte nun untersucht werden, ob Transkriptionsfaktoren, die Hypoxie bzw. Makrophagen-Reifung regulieren, an der Kontrolle der Expression von ZNF395 beteiligt sind. Ein besonderer Fokus lag dabei auf der Untersuchung von Transkriptionsfaktoren, die essentielle Funktionen in der Regulation der angeborenen Immunantwort spielen, wie z.B. C/EBP, PU.1 und RUNX1 und von HIF-1 $\alpha$ , dem Hauptregulator der Hypoxie.

Im Zuge meiner Diplomarbeit wurde eine Sequenz, welche die Nukleotide -1190 bis +51, wobei +1 dem Transkriptionsstartpunkt entspricht, wie früher durch 5'-RACE bestimmt wurde (Boeckle et al., 2001), in ein Luziferase-Reporterkonstrukt kloniert. Transiente Transfektionsanalysen von RTS3b-Zellen mit diesem Reporterkonstrukt -1190 bis +51PromLuc und Expressionsvektoren für die Transkriptionsfaktoren E2F1/DP1 und Sp1 zeigten eine 4 bzw. 5-fache Aktivierung des Promotors. Überexpression von HIF1 $\alpha$  resultierte lediglich in einer 1,5-fachen Aktivierung (Christine Koehler, Diplomarbeit 2010, Daten nicht gezeigt). Hier wurden auf Grund der beschriebenen Daten aus der Literatur höhere Promotoraktivitäten erwartet. Da Enhancer-Elemente i.d.R. einige kb entfernt vom Promotor liegen, sollte ein größeres, den 5'-regulatorischen Bereich beinhaltendes Fragment kloniert werden. Eine PCR-basierte Amplifikation dieses Bereiches war jedoch während meiner Diplomarbeit nicht möglich was möglicherweise durch den hohen GC Gehalt stromaufwärts der Nukleotide -1190 (bis zu 90%) bedingt war.

Zu Beginn dieser Doktorarbeit wurde mit Hilfe des KOD Xtreme Hot Start DNA Polymerase-Kits (Novagen), welches speziell für die Amplifikation langer GC-reicher Sequenzen optimiert ist, die Region von -3970 bis +88 stromaufwärts der m-RNA von ZNF395 aus genomischer DNA amplifiziert und in ein Luziferase-Reporterkonstrukt kloniert. ZNF395PromLuc-3970+88 ist in Abb. 11A dargestellt.

## 4.2.2 HIF1 $\alpha$ und C/EBP $\beta$ kooperieren bei der Aktivierung der ZNF395 Expression

Der Einfluss von HIF1 $\alpha$ , C/EBP $\alpha$ , C/EBP $\beta$ , RUNX1 und PU.1 auf die Expression von ZNF395 sollte mittels Reporteranalysen gezeigt werden. PU.1 ist ein Transkriptionsfaktor, der Gene aktiviert, die für die myeloide und B-lymphoide Zell-Entwicklung essentiell sind (Carotta et al., 2010). Transiente Transfektionsanalysen mit dem Reporterkonstrukt ZNF395PromLuc-3970+88 wurden in RTS3b durchgeführt. 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. Wie in Abb. 11B dargestellt, aktivierte HIF1 $\alpha$  den Promotor maximal 2,2-fach. Während C/EBP $\alpha$  den ZNF395 Promotor ca. 4-fach aktivierte, lag die Aktivierung durch C/EBP $\beta$  bei über 20-fach (Abb. 11C). Durch Überexpression von PU.1 und RUNX1 wurde der ZNF395 Promotor nicht aktiviert (Daten nicht gezeigt).

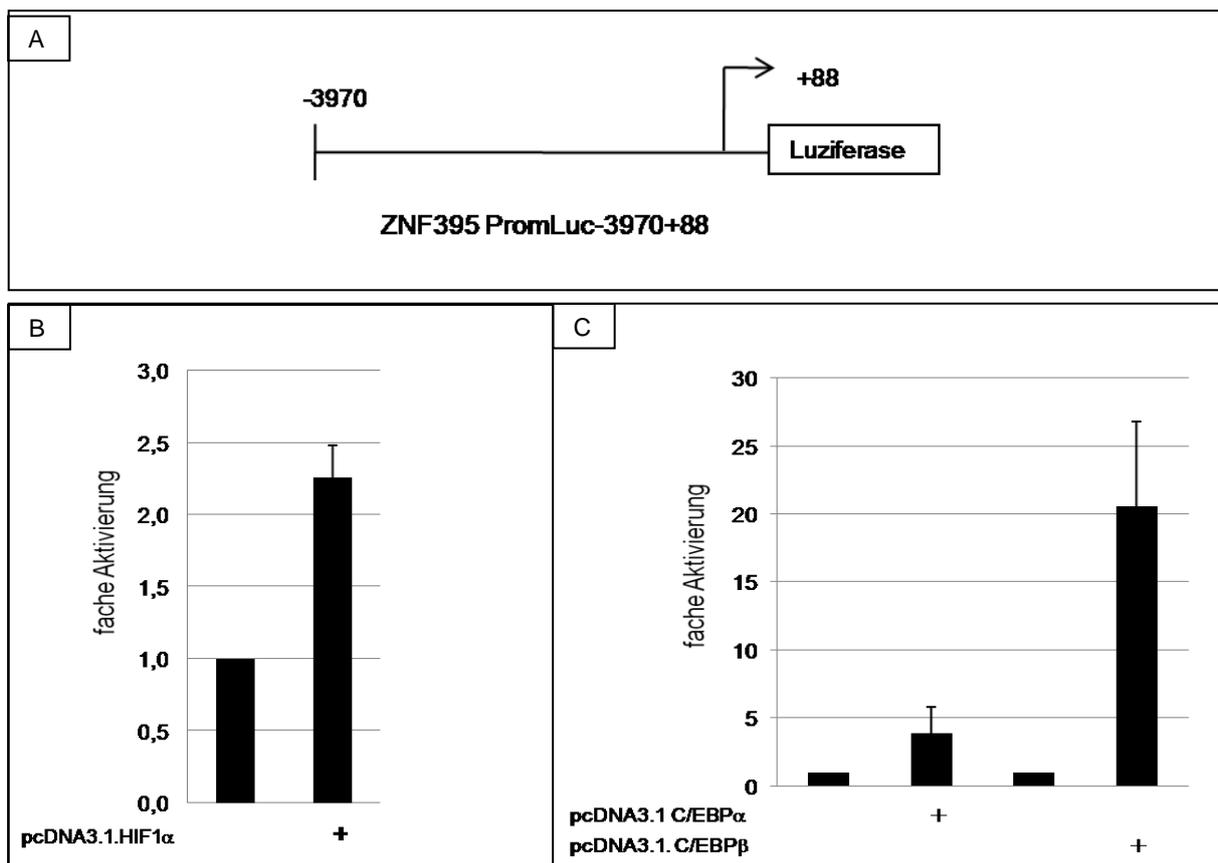


Abb. 11 HIF1 $\alpha$  und C/EBP $\beta$  aktivieren den ZNF395 Promotor  
A: Schematische Darstellung des Reporterkonstrukts ZNF395PromLuc -3970+88. Die Zahlenangaben beziehen sich auf die Position der Nukleotide, wobei der Transkriptionsstartpunkt als +1 gesetzt wurde. B+C: Transiente Transfektionsstudie: RTS3b Zellen wurden mit 500ng des Reporterkonstrukts PBF PromLuc -3970+88 und 300ng pcDNA3.1+FLAG1 Hif1 $\alpha$  (B) und 50ng pcDNA3.1+C/EBP $\alpha$  bzw. pcDNA3.1+C/EBP $\beta$  (C) kotransfiziert. Die DNA-Mengen wurden mit entsprechendem Leervektor ausgeglichen. Die basale Luziferase-Aktivität wurde als 1 definiert. Die Balken repräsentieren die Mittelwerte aus drei unabhängigen Experimenten. Die Standardabweichungen sind angegeben.

In der Literatur findet man Hinweise darauf, dass HIF1 $\alpha$  und C/EBP $\alpha$  bei der Aktivierung von Promotoren kooperieren können, wie im Fall des Galektin-1, das Prozesse wie Proliferation, Differenzierung und Migration koordiniert (Zhao et al., 2011). Durch Kotransfektion beider Expressionsplasmide sollte untersucht werden, ob dies auch auf den ZNF395 Promotor zutrifft. Transiente Transfektionen in RTS3b-Zellen ergaben nach gemeinsamer Überexpression von HIF1 $\alpha$  und C/EBP $\alpha$  eine 4,5-fache Aktivierung (Abb. 12B), was rein additiv war. In Abb. 12C ist dargestellt, dass jedoch die 20-fache Aktivierung des ZNF395 Promotors nach Überexpression von C/EBP $\beta$  auf über 40-fach anstieg, wenn der Vektor für HIF1 $\alpha$  kotransfiziert wurde. Dieser kooperative Effekt auf die Promotoraktivität von ZNF395 impliziert eine Wechselwirkung von HIF1 $\alpha$  und C/EBP $\beta$ . Eine genaue Charakterisierung der Interaktion der beiden Transkriptionsfaktoren an dem regulatorischen Bereich von ZNF395 ergab jedoch keine Hinweise über die molekularen Grundlagen dieser funktionellen Wechselwirkung zwischen HIF1 $\alpha$  und C/EBP $\beta$ .

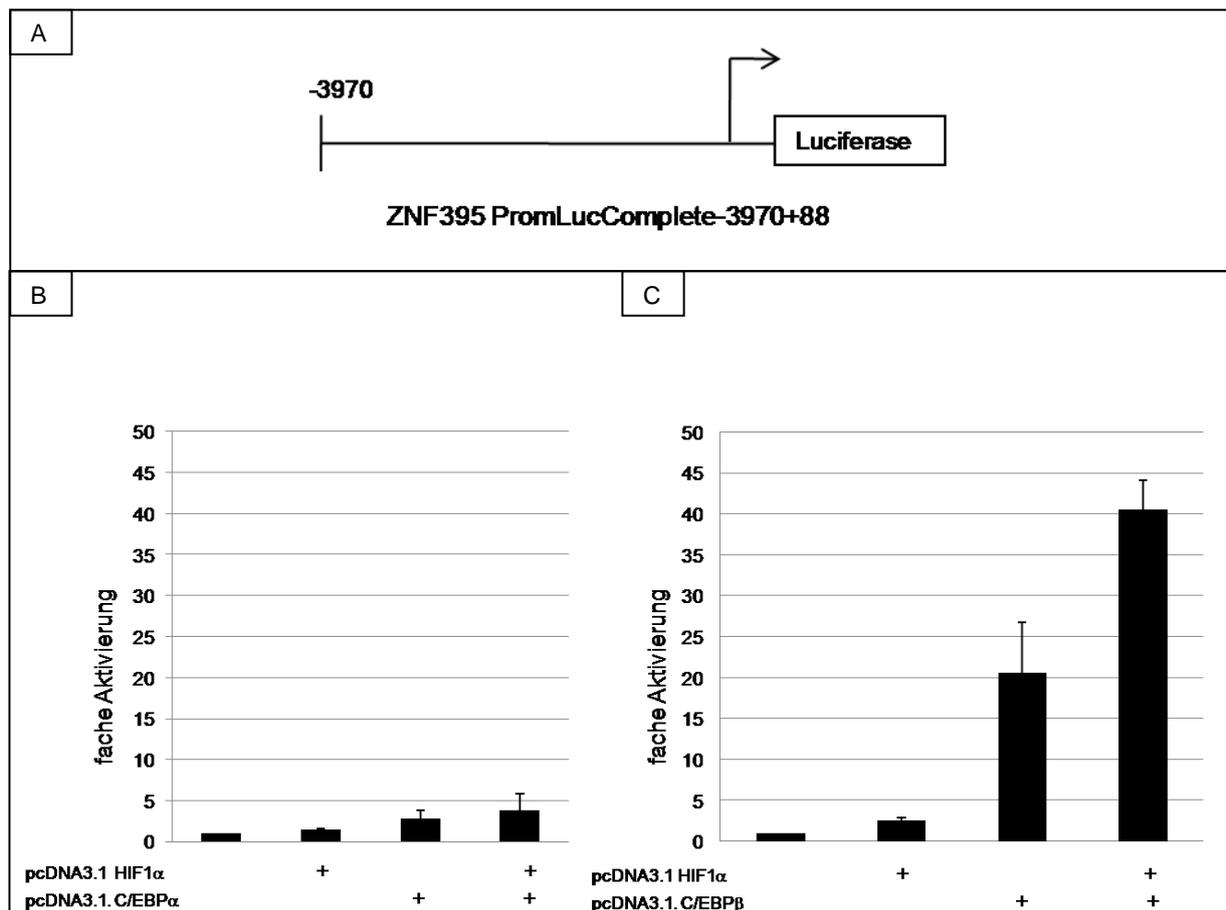


Abb. 12 HIF1 $\alpha$  und C/EBP $\beta$  kooperieren in der Aktivierung von ZNF395

A: Schematische Darstellung des Reporterkonstrukts ZNF395PromLuc -3970+88

B/C: Transiente Transfektionsstudie: RTS3b Zellen wurden mit 500ng des Reporterkonstrukts ZNF395PromLuc -3970+88 und 300ng pcDNA3.1+FLAG1 Hif1 $\alpha$  zusammen mit 50ng pcDNA3.1+C/EBP $\alpha$  (B) bzw. pcDNA3.1+C/EBP $\beta$  (C) kotransfiziert. Die DNA-Mengen wurden mit entsprechendem Leervektor ausgeglichen. Die basale Luziferase-Aktivität wurde als 1 definiert. Die Balken repräsentieren die Mittelwerte aus drei unabhängigen Experimenten. Die Standardabweichungen sind angegeben.

### 4.2.3 Aktivierung des ZNF395 Promotors erfolgt durch die LAP\*-Isoform von C/EBP $\beta$

Die Expression von C/EBP $\beta$  führt, bedingt durch die zusätzliche interne Initiation der Translation an zwei weiteren Startcodons in den Methioninen in den Positionen 24 und 199 zu translationalen Isoformen des Transkriptionsfaktors, dem „liver-enriched activating protein\*“ (LAP\*, AS 1-345), dem „liver-enriched activating protein“ (LAP, AS 24-345) oder dem „liver-enriched inhibitory protein“ (LIP, AS 199-345) (Descombes und Schibler 1991; Zahnnow 2009; Gutsch et al., 2011). Alle drei Isoformen haben die C-terminale bZIP-Dimerisierungs-Domäne. Darüber hinaus besitzen die langen Isoformen LAP\* und LAP, die sich lediglich in dem Vorhandensein bzw. Fehlen der ersten 24 AS unterscheiden, eine N-terminale Transaktivierungsdomäne (Smink et al., 2009). In Abb. 13A sind die drei Isoformen schematisch dargestellt. LAP\* und LAP gelten als Aktivatoren von Genen, die während der Differenzierung eine Rolle spielen, LIP hingegen wurde vermehrt in proliferierenden Zellen gefunden, als dominant negativer Inhibitor der Aktivatorformen (Zahnnow 2009).

Die Luziferase Reporterassays, die in Abb. 12 gezeigt sind, wurden mit dem Plasmid pcDNA3.1.+C/EBP $\beta$  durchgeführt, das die Synthese aller drei Isoformen erlaubt. Reporteranalysen mit Überexpression der einzelnen Isoformen LAP\*, LAP und LIP, sollten zeigen, welche Isoform an der Aktivierung des ZNF395 Promotors beteiligt ist. Abb. 13A zeigt schematisch die vier in dieser Arbeit verwendeten Formen des Transkriptionsfaktors, deren Gene aus pECFP-Vektoren (Hadaschik et al., 2003) in pcDNA3.1.+Vektoren umklontiert worden sind, um eine ähnlich starke Expression zu gewährleisten. Neben diesen natürlich vorkommenden Formen wurde die Variante DC durch Deletion des C-Terminus und der N-terminalen 24 AS generiert (Hadaschik et al., 2003). DC fehlt die DNA-Binde- und bZip-Domäne und diente als negative Kontrolle. Um die Region in C/EBP $\beta$ , die die kooperierenden Effekte mit dem Transkriptionsfaktor HIF1 $\alpha$  vermittelt, einzugrenzen, wurden die Expressionsvektoren der C/EBP $\beta$  Isoformen auch mit dem Expressionsvektor für HIF1 $\alpha$  kotransfiziert. Reporteranalysen wurden in RTS3b-Zellen durchgeführt.

Wie Abb. 13C verdeutlicht, war lediglich die lange LAP\* Isoform in der Lage den ZNF395 Promotor zu aktivieren (6-fach) und mit HIF1 $\alpha$  zu kooperieren (15-fach). Die N-terminal verkürzten Isoformen LAP, LIP und DC zeigten eine 2-fache Aktivierung, die durch die Koexpression von HIF1 $\alpha$  auf das 3-fache erhöht wurde. Die Effekte von HIF1 $\alpha$  und den N-terminal verkürzten Versionen von C/EBP $\beta$  sind somit additiv. Obwohl die in diesem Experiment erhaltenen Aktivierungen deutlich geringer waren als die in Abb. 12B, zeigte dies, dass die 24-N-terminalen AS, die in LAP\* vorhanden sind, für C/EBP $\beta$  notwendig sind,

den ZNF395 Promotor zu aktivieren und mit HIF1 $\alpha$  zu kooperieren. Um sicherzustellen, dass der Expressionsvektor der LAP-Isoform zu einem transkriptional aktiven Protein führt, wurde ein Reporterassay mit dem CCL-20 Promotor durchgeführt. CCL20 spielt als Chemokin eine zentrale Rolle in Makrophagen. Es konnte gezeigt werden, dass Überexpression von C/EBP $\beta$  in RTS3b-Zellen zu einer 10-fachen Induktion der CCL20 RNA-Spiegel führte (Sperling et al., 2012). Reporterassays in RTS3b-Zellen belegten eine 13-fache Aktivierung des CCL20 Promotors durch Überexpression von LAP\* und eine 8-fache Aktivierung durch LAP (Abb. 13D). Die Isoform LIP aktivierte den CCL20 nicht.

Zusätzlich dazu sollte auch die Proteinmenge der vier Isoformen mittels Western Blot Analysen gezeigt werden. Der Antikörper gegen C/EBP $\beta$  erkennt die AS 199-345, womit, außer der DC-Isoform, alle drei Formen im Western Blot nachweisbar sein sollten. LAP\* und Transfektion des Vektors für das Volle-Länge C/EBP $\beta$  führte nicht nur zur Synthese der LAP\* Isoform, sondern auch zu den beiden verkürzten Formen LAP und LIP, die jeweils auch in diesen Spuren zu sehen sind. Die Expression von LIP alleine war nach Transfektion des Vektors dafür in diesem Blot nicht detektierbar. Da die Expression der Isoform LIP weder im Western Blot gezeigt werden konnte, noch die Überexpression dieser Isoform die Promotoraktivität beeinflusste, kann auch keine Aussage über die Funktionalität des Faktors gemacht werden.

Dies zeigt, dass zwar beide Isoformen, LAP\* und LAP, die Transkription aktivieren können, jedoch LAP nicht an der Aktivierung des ZNF395 Promotors beteiligt ist.

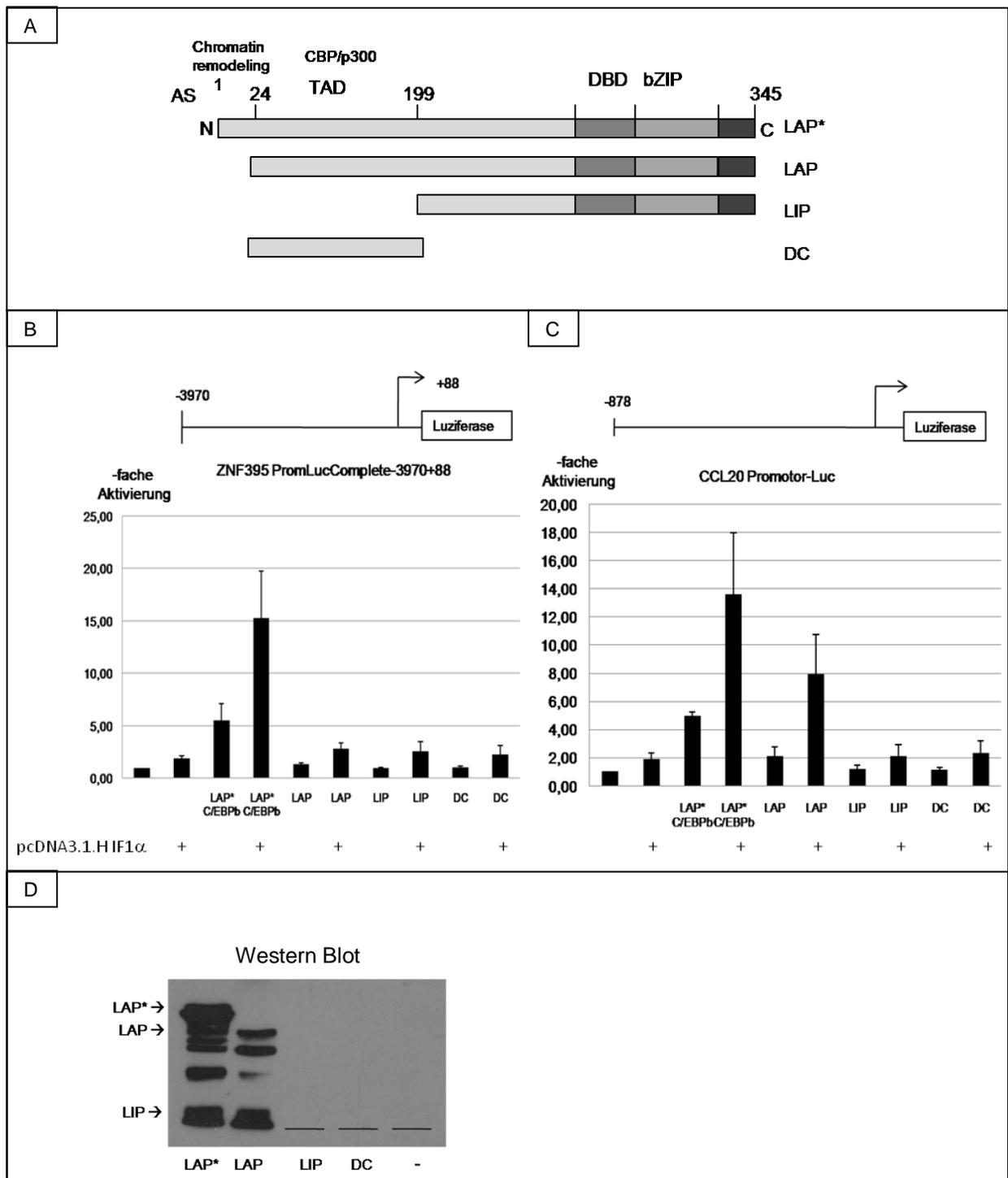


Abb. 13 Aktivierung des ZNF395 Promotors durch translationale Isoformen von C/EBP $\beta$

A: Schematische Darstellung der natürlich vorkommenden translationalen C/EBP $\beta$ -Isoformen LAP\*, LAP, LIP und der generierten Mutante DC. Die AS Positionen der Translations-Start-Codons (AS1,24,199), sowie die Dimerisierungs-(bZIP), die DNA-binde-(DBD), die Transaktivierungsdomäne (TAD) sind angegeben. Über die TAD interagiert C/EBP $\beta$  mit Co-Aktivatoren wie CBP oder p300. Die N-terminale Domäne von LAP\* ist in der Lage den Chromatin-remodeling Komplex zu rekrutieren. B/C: Transiente Transfektionsstudien: RTS3b-Zellen wurden mit 500ng des Reporterkonstrukts PBF PromLuc 3970+88(B) oder CCL20PromotorLuc (C) und 300ng pcDNA3.1+FLAG1 HIF1 $\alpha$  zusammen mit 50ng pcDNA3.1+C/EBP $\beta$ (LAP\*), pECFP-NFIL6- $\Delta$ N24 (LAP), pECFP-NFIL6-LIP (LIP) und pECFP-(+AD1)NFIL6- $\Delta$ C (DC) kotransfiziert. Die DNA-Mengen wurden mit entsprechendem Leervektor ausgeglichen. Die basale Luziferase-Aktivität wurde als 1 definiert. Die Balken repräsentieren die Mittelwerte aus drei unabhängigen Experimenten. Die Standardabweichungen sind angegeben. D: Expressionsnachweise der LAP\* und LAP Isoform mittels Western Blot mit einem Antikörper gegen humanem C/EBP $\beta$ .

## 4.3 Knockdown Experimente

### 4.3.1 SiRNA basierter Knockdown von C/EBP $\beta$ führt zu reduzierter Expression von ZNF395 in U87MG-Zellen

Eine Rolle von C/EBP $\beta$  bei der Regulation der Aktivierung des ZNF395 Promotors sollte mit Knockdown Experimenten unterstützt werden. Zunächst wurde eine qRT-PCR zur Quantifizierung der mRNA-Mengen von endogenem ZNF395 durchgeführt, um die Expressionsrate von ZNF395 in verschiedenen Zelllinien zu vergleichen. In der Monozyten-Zelllinie U937 war die Menge an ZNF395 mRNA doppelt so hoch wie in der Keratinozyten Zelllinie RTS3b, die hier als Referenz gewählt wurde. C33a-, 293- und U87MG-Zellen hatten niedrigere mRNA-Spiegel verglichen mit RTS3b-Zellen (Abb. 14).

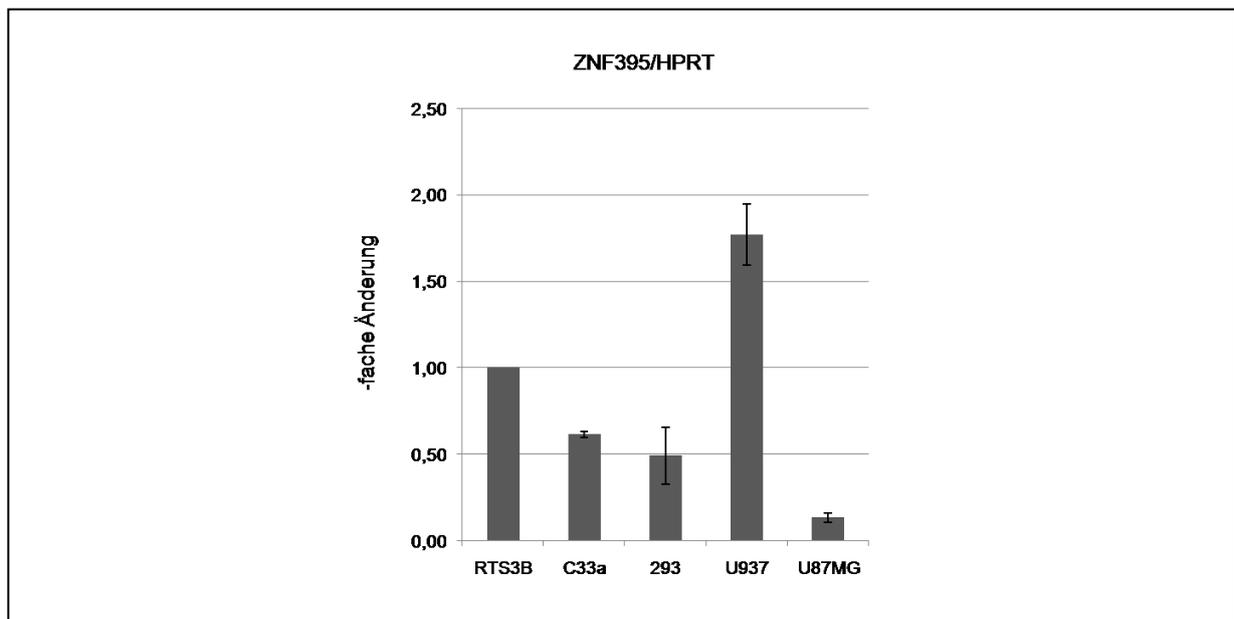


Abb. 14 Vergleich der ZNF395 mRNA Spiegel in U937-, C33a-, 293-, U937- und U87MG-Zellen  
B: QRT-PCR: 1 $\mu$ g Gesamtzelluläre RNA jeder Zelllinie wurde revers transkribiert. Die relativen Spiegel der ZNF395-mRNA wurden mit der  $\Delta\Delta$ CP-Methode durch Normalisierung gegen HPRT berechnet (Pfaffl 2001). Die im Diagramm aufgeführten Werte stellen die fache Veränderung der mRNA-Spiegel der Zelllinien in Relation zu der RTS3b-Zelllinie dar. Die Balken repräsentieren die Mittelwerte aus drei unabhängigen qRT-PCRs. Die Standardabweichungen sind angegeben.

Die U937-Zelllinie zeigte eine vergleichsweise hohe mRNA Menge an ZNF395. Zudem weisen die bereits beschriebenen Ergebnisse darauf hin, dass die ZNF395-Expression in CD14+ Monozyten besonders hoch ist und C/EBP $\beta$  für die Differenzierung dieser Zellen zu Makrophagen notwendig ist (Huber et al., 2012). Aus diesem Grund sollte die Auswirkung des C/EBP $\beta$ -Knockdowns auf die Expression von ZNF395 zunächst in U937-Zellen

untersucht werden. Die Suspensionszellen gelten allerdings als schwer zu transfizieren, jedoch wurde in der Literatur das Einbringen von Fremd-DNA in U937 mittels Elektroporation beschrieben. Elektroporation von U937-Zellen mit einer gegen C/EBP $\beta$  gerichteten siRNA zeigte nur eine 72%ige Reduktion der C/EBP $\beta$  mRNA Level und keinen signifikanten Effekt auf die Transkription von ZNF395 (Daten nicht gezeigt).

In der Literatur wurde beschrieben, dass die Expression von ZNF395 in der Glioblastom-Zelllinie U87MG durch Hypoxie induziert wurde (Murat et al., 2009). Anhand einer umfangreichen Analyse von Glioblastom-Geweben und Glioblastom-Zelllinien, die u.a. IHC-, Mikroarray- und Western Blot Analysen beinhalteten, wurde C/EBP $\beta$  als neuer Masterregulator des nekrotisierenden „Tumormicroenvironments“ gezeigt, da seine erhöhte Expression mit einer schlechten Prognose für den Patienten korrelierte. Der Faktor zählte in Expressionsstudien zu den am stärksten erhöhten Faktoren gegenüber nicht nekrotisierendem Gewebe. Neben C/EBP $\beta$  wurden auch HIF1 $\alpha$  und ZNF395 in Mikroarrayanalysen mit einer erhöhten Transkription in den nekrotisierenden Glioblastom-Geweben detektiert. Desweiteren konnte durch Western Blot Analysen eine erhöhte Expression von C/EBP $\beta$  in U87MG-Zellen nach Inkubation der Zellen unter Hypoxie gezeigt werden (Cooper et al., 2012).

Aufgrund dieser Beobachtungen sollte die Rolle von C/EBP $\beta$  und HIF1 $\alpha$  bei der Kontrolle der ZNF395-Expression in U87-MG-Zellen mit Hilfe siRNA-basierter Knockdown Experimente analysiert werden. U87MG-Zellen wurden mit siRNA gegen C/EBP $\alpha$  und gegen C/EBP $\beta$  transfiziert. Da die Transfektion mit siRNA gegen C/EBP $\alpha$  keine Effekte auf den ZNF395-Promotor zeigte, wurde diese siRNA als Referenz für C/EBP $\beta$  gewählt. Eine 94%ige Reduktion der Menge an C/EBP $\beta$ -mRNA ist in Abb. 15A gezeigt. Dies führte zu 32% verminderter Transkription für ZNF395 (Abb. 15B). Das Experiment unterstützt die Annahme, dass der Transkriptionsfaktor C/EBP $\beta$  an der Aktivierung der ZNF395 Expression beteiligt ist.

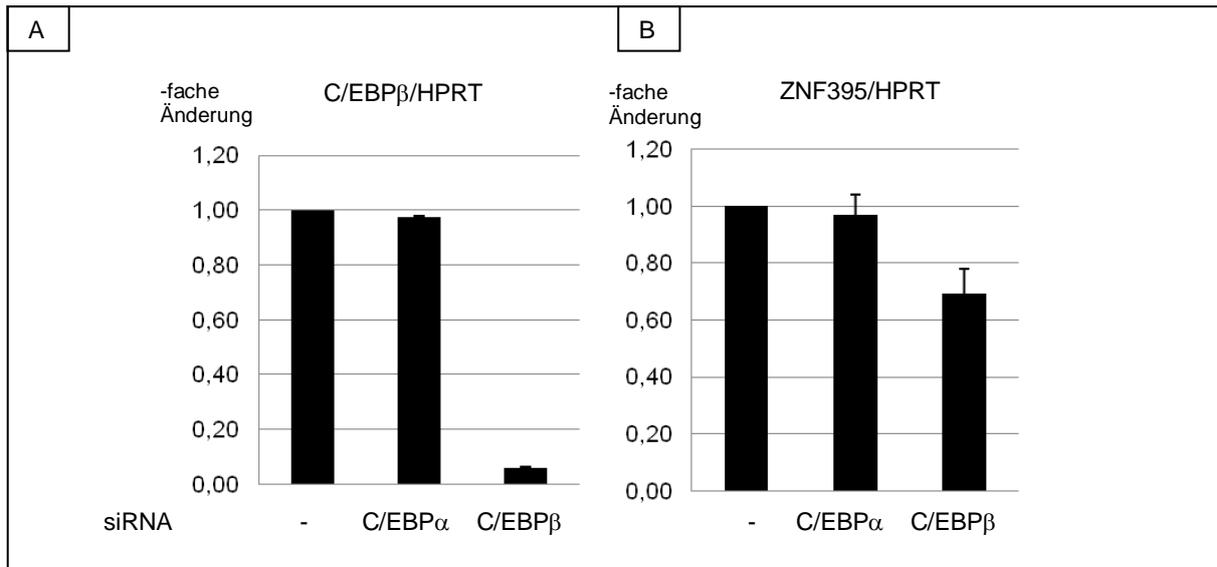


Abb. 15 Maximale endogene Transkription von ZNF395 in U87-MG-Zellen benötigt C/EBPβ  
 Transfektion von 150pmol siRNA gegen C/EBPα oder C/EBPβ in U87MG Zellen. QRT-PCR: 1µg Gesamtzelluläre RNA wurde revers transkribiert. Die relativen Level der C/EBβ-mRNA (A) oder ZNF395-mRNA (B) wurden mit der ΔΔCP-Methode durch Normalisierung gegen HPRT berechnet (Pfaffl 2001). Die im Diagramm aufgeführten Werte stellen die fache Veränderung der mit siRNA-transfizierten Proben in Relation zu der nicht transfizierten Probe dar. Die Balken repräsentieren die Mittelwerte aus drei unabhängigen qRT-PCRs. Die Standardabweichungen sind angegeben.

#### 4.3.2 ZNF395 Expression wird in U87MG-Zellen durch Hypoxie induziert und benötigt dafür kein C/EBPβ

Um zu analysieren, ob C/EBPβ für die Hypoxie-Induktion von ZNF395 in U87MG relevant ist, wurde das Knockdown-Experiment, das unter 4.3.1 beschrieben ist, einerseits unter normalen Sauerstoffbedingungen und andererseits unter sauerstoffarmen Bedingungen wiederholt.

U87MG-Zellen wurden mit siRNAs transfiziert und 12h vor der Ernte unter hypoxischen Bedingungen von 2% Sauerstoffkonzentration kultiviert. Als Kontroll-siRNA wurde in diesem Versuch neben siRNA gegen C/EBPα zusätzlich eine siRNA gegen HPV8E6 transfiziert, um unspezifische Reaktionen durch die siRNA-Transfektion auszuschließen. Bei HPV8E6 handelt es sich um ein virales Onkogen humaner Papillomviren, welches in U87MG-Zellen nicht vorliegt.

Abb. 16B verdeutlicht, dass auch in diesem Experiment der Knockdown von C/EBPβ eine 94%ige Reduktion der mRNA von C/EBPβ zur Folge hatte, unabhängig der Sauerstoffkonzentration (Spur 5 und 10). Eine Induktion von C/EBPβ auf Ebene der Transkription durch Hypoxie konnte in diesem Experiment nicht gezeigt werden (Spur 6 bis

9). Suppression von C/EB $\beta$  führte unter normoxischen und unter hypoxischen Konditionen zu verminderter Menge an ZNF395 mit einer ähnlichen Effizienz (Abb.A, Spur 5 und 10). Die Kultivierung der Zellen unter Hypoxie resultierte in einer 5-fachen Induktion von ZNF395 und bestätigt damit die Angaben der Literatur, dass ZNF395 in U87MG-Zellen ein Hypoxie-induzierbares Gen ist (Murat et al., 2009). Diese Induktion war auch nach Knockdown von C/EB $\beta$  zu beobachten. Die Transfektion von HPV8E6-siRNA änderte die ZNF395-Spiegel nicht nennenswert im Vergleich zu untransfizierten Zellen, wie Spur 2 und Spur 7 zeigen. Der Knockdown von ZNF395 zeigte eine Effizienz von 90% (Abb.A, Spur 3) und konnte auch durch Hypoxie nicht kompensiert werden (Abb.A, Spur 8). Dies verdeutlicht, dass für die durch Hypoxie-induzierte Erhöhung der ZNF395-mRNA in U87MG-Zellen C/EBP $\beta$  nicht notwendig ist (Spur 10).

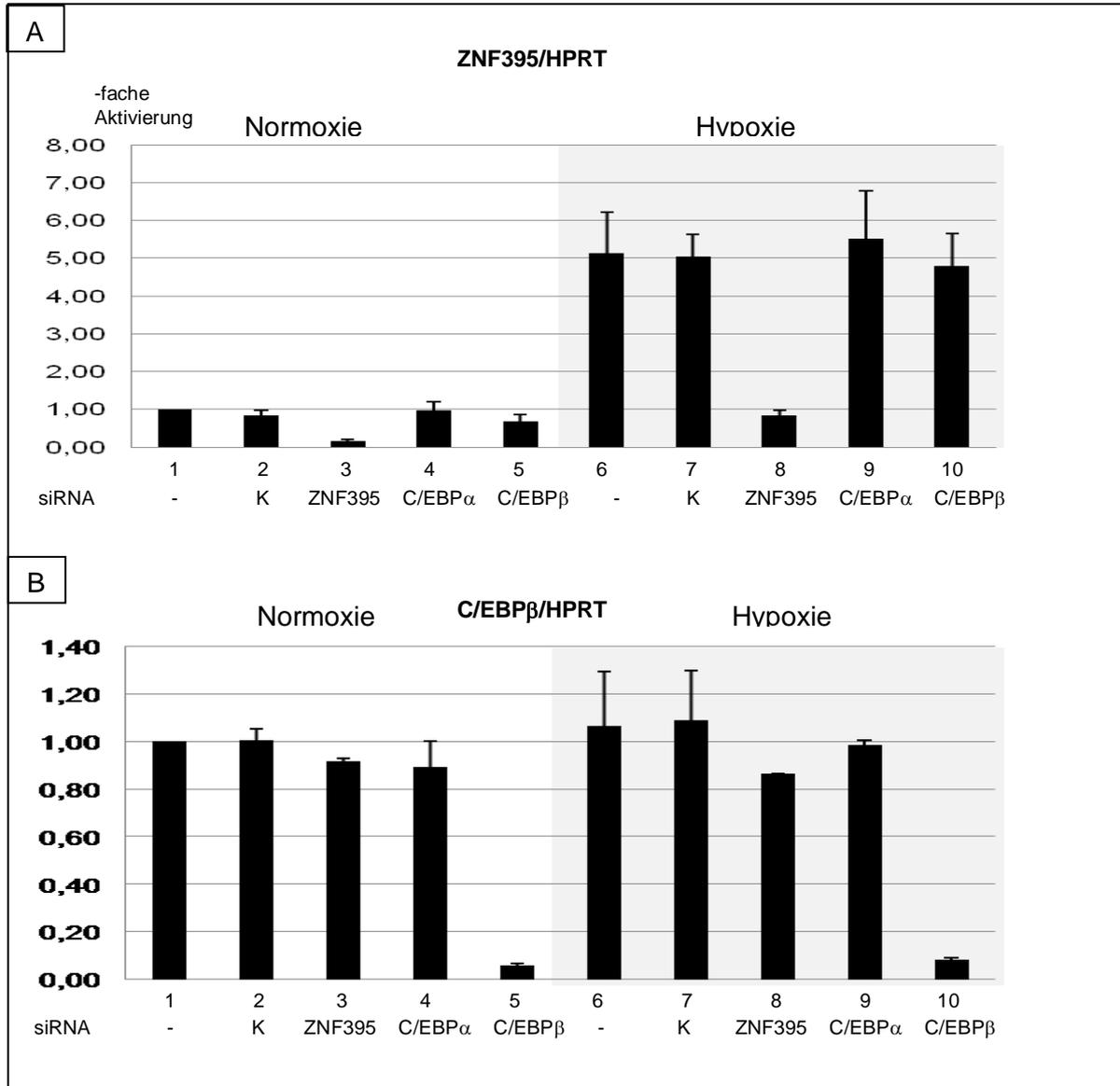


Abb. 16 Hypoxie-Induktion von ZNF395 in U87MG-Zellen benötigt kein C/EBP $\beta$

Transfektion von 150pmol siRNA gegen HPV8E6 als Kontrolle (K), ZNF395, C/EBP $\alpha$  und C/EBP $\beta$  in U87MG Zellen. Die Zellen wurden unter normalen Sauerstoffbedingungen (links) oder für 12h vor der Ernte unter sauerstoffarmen Konditionen von 2% O<sub>2</sub>-Konzentration kultiviert (rechts, grau hinterlegt).

QRT-PCR: 1 $\mu$ g Gesamtzelluläre RNA wurde jeweils revers transkribiert. Die relativen Level der ZNF395-mRNA (A) oder C/EBP $\beta$ -mRNA (B) wurden mit der  $\Delta\Delta$ CP-Methode durch Normalisierung gegen HPRT berechnet (Pfaffl 2001). Die im Diagramm aufgeführten Werte stellen die fachen Veränderungen der mit den jeweiligen siRNA-transfizierten Zellen in Relation zu den untransfizierten Zellen dar. Die Balken repräsentieren die Mittelwerte aus drei unabhängigen qRT-PCRs. Die Standardabweichungen sind angegeben.

## 4.4 ZNF395 ist ein Zielgen von HIF1 $\alpha$

### 4.4.1 Hypoxie-induzierte Expression von ZNF395 in verschiedenen Zelllinien variiert

Während qRT-PCRs eine 5-fache Induktion von ZNF395 in der Glioblastom-Zelllinie U87MG durch Hypoxie ergaben, zeigten Reporterassays eine maximal 2,2-fache Aktivierung des Promotors durch Überexpression von HIF1 $\alpha$  in RTS3b-Zellen. Um zu unterscheiden, ob die geringere Induktion des ZNF395 Promotors durch Überexpression von HIF1 $\alpha$  auf das kotransfizierte Reporterkonstrukt zurückzuführen ist oder spezifisch für RTS3b-Zellen ist, wurde die Aktivierung der Expression des endogenen ZNF395 unter normalen Sauerstoffbedingungen und unter Hypoxie in dieser und vier anderen Zelllinien verglichen.

QRT-PCR Analysen ergaben für alle fünf Zelllinien eine Induktion von ZNF395 durch Hypoxie. Wie in Abb. 17A dargestellt, variierte diese je nach Zelllinie. Eine mehr als 5-fache Induktion der RNA Menge nach Hypoxie-Behandlung in U87-MG wurde in keiner anderen Zelllinie erreicht. C33a- und 293-Zellen zeigten eine knapp 3-fache Erhöhung der ZNF395-Spiegel in Folge der Hypoxie, während es in RTS3b-Zellen und U937-Zellen zu einer knapp 2- bzw. 1,4-fachen Induktion kam. Um die absoluten mRNA-Spiegel unter den einzelnen Zelllinien vergleichen zu können, wurde der CP-Wert für die ZNF395-Transkripte durch den für HPRT geteilt. Der normierte Wert für RTS3b wurde als 1 gesetzt und alle anderen darauf bezogen. Wie aus dieser Abbildung hervorgeht, ist die Menge von ZNF395 unter normalen Sauerstoffbedingungen in U87MG-Zellen sehr gering, während in U937-Zellen die basalen mRNA-Spiegel von ZNF395 fast 10-mal so hoch sind. Dies verdeutlicht, dass niedrige basale mRNA-Spiegel von ZNF395 stärker Hypoxie-induzierbar sind, hohe Spiegel, wie im Fall der U937-Zellen, jedoch kaum. Trotz der geringen Induktion durch Hypoxie besitzen U937-Zellen immer noch mehr ZNF395-Transkripte als U87MG-Zellen nach Hypoxie.

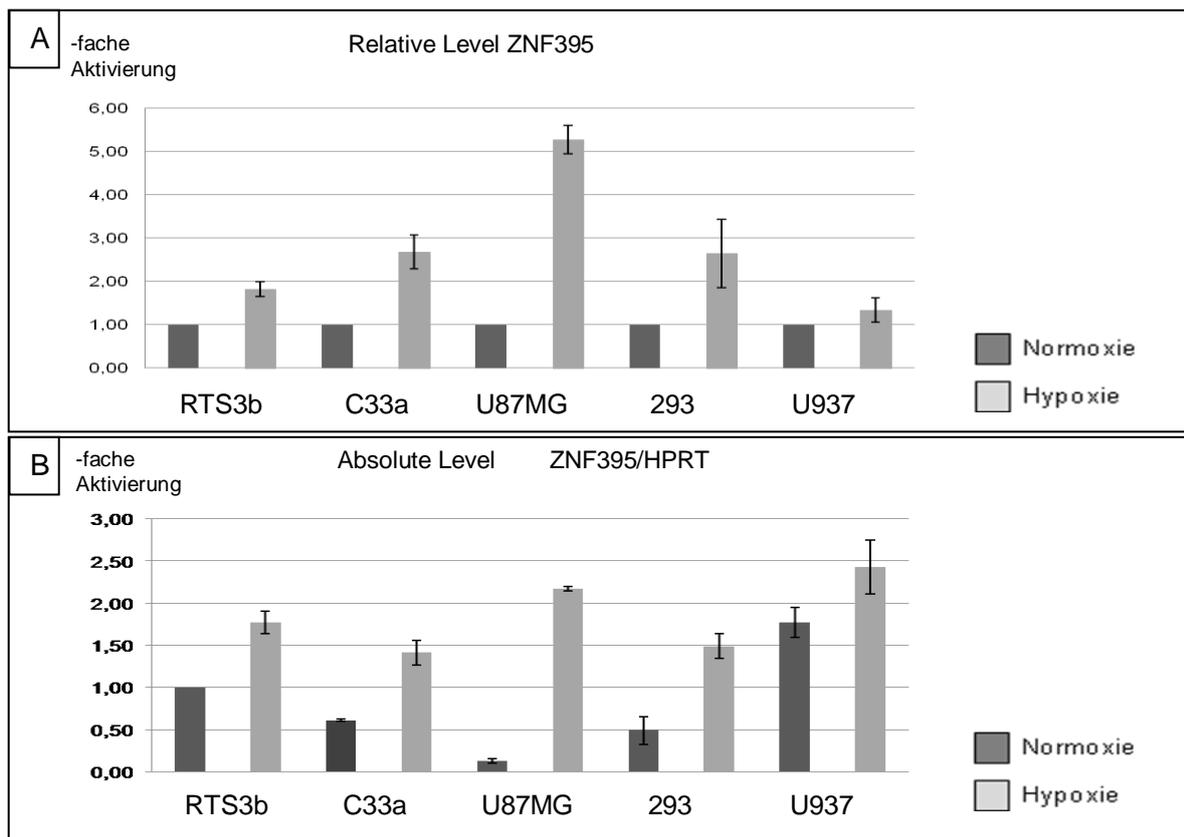


Abb. 17 Hypoxie-induziertes ZNF395 in Krebs-Zelllinien  
Fünf verschiedene Zelllinien (RTS3b, C33a, U87MG, 293 und U937) wurden unter normalen Sauerstoffbedingungen (schwarze Balken) oder für 12h vor der Ernte unter sauerstoffarmen Konditionen von 2% O<sub>2</sub>-Konzentration kultiviert (graue Balken). QRT-PCR: 1µg Gesamtzelluläre RNA wurde jeweils revers transkribiert und wie in Abb.13 dargestellt, berechnet. Die im Diagramm aufgeführten Werte stellen die fache Veränderung der in Hypoxie kultivierten Probe in Relation zu der jeweiligen in Normoxie kultivierten Probe (A) oder in Relation zu RTS3b-Zellen, die unter Normoxie-kultiviert wurden(B) dar. Die Balken repräsentieren die Mittelwerte aus drei unabhängigen qRT-PCRs. Die Standardabweichungen sind angegeben.

Um zu überprüfen, ob die Hypoxie-Induktion in den verschiedenen Zelllinien effizient stattfand, wurde die Menge an HIF1 $\alpha$  nach Hypoxie-Induktion überprüft. Gesamtprotein-Extrakte wurden im Western Blot mit einem Antikörper gegen HIF1 $\alpha$  analysiert. In allen Zellen außer U937 konnte HIF1 $\alpha$ -Expression nachgewiesen werden. Während ZNF395 in den Zellen, die unter Normoxie kultiviert wurden, nicht detektierbar war, konnte unter Hypoxie ZNF395 in allen Zellen außer U937 nachgewiesen werden (Abb. 18). Die Menge an ZNF395, die die Western Blots zeigten, korrelierte mit den Ergebnissen der RT-PCR in RTS3b-, C33a-, U87MG- und 293-Zellen, allerdings nicht in U937-Zellen. Entsprechend der RT-PCR sollten hier viel höhere Mengen an ZNF395 vorliegen.

Das Ergebnis des Western Blots und der qRT-PCR zeigte die Hypoxie-Induzierbarkeit von ZNF395 in verschiedenen Zelllinien. Allerdings bestand keine Korrelation zwischen der

Induktion von HIF1 $\alpha$  und ZNF395, wie der Vergleich von RTS3b- und U87MG-Zellen verdeutlicht. Während in RTS3b-Zellen die Menge an HIF1 $\alpha$  in Folge der Hypoxie stark erhöht ist, nimmt die Menge an ZNF395 im Gegensatz zu den U87MG-Zellen nur schwach zu. Dies weist auf zusätzliche Regulationsmechanismen innerhalb der verschiedenen Zelllinien hin.

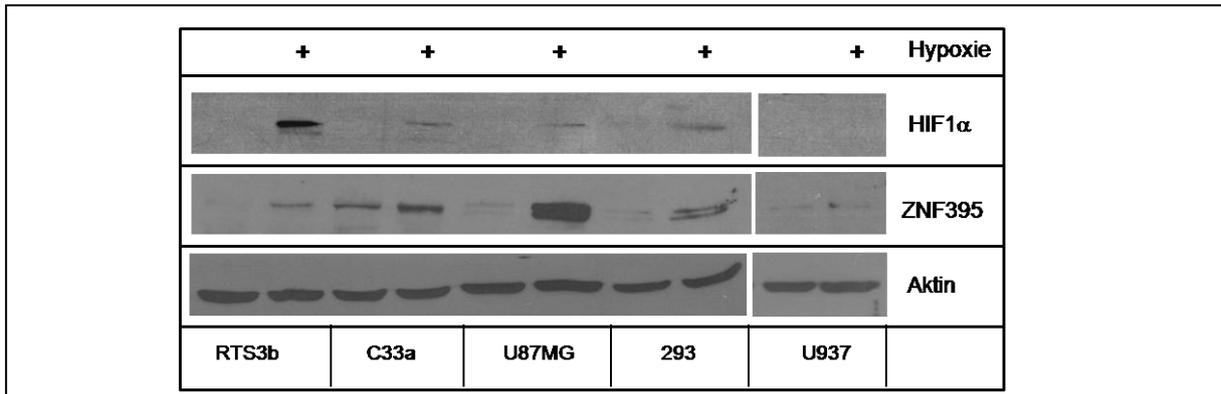


Abb. 18 Hypoxie-induziertes ZNF395 in Krebs-Zelllinien  
 Expressionsnachweis: Fünf verschiedene Zelllinien (RTS3b, C33a, U87MG, 293 und U937) wurden unter normalen Sauerstoffbedingungen oder für 12h vor der Ernte unter sauerstoffarmen Konditionen von 2% O<sub>2</sub> kultiviert. 60 µg Gesamtprotein-Extrakt wurde in einem 8%igen SDS-PAG aufgetrennt und auf eine Nitrocellulosemembran transferiert. Die Menge an ZNF395, HIF1 $\alpha$  und Aktin wurde durch Inkubation des Blots mit entsprechenden Antikörpern detektiert.

#### 4.4.2 Knockdown des Transkriptionsfaktors HIF1 $\alpha$ verhindert die Hypoxie-Induktion von ZNF395

Knockdown Experimente sollten zeigen, welche Relevanz HIF1 $\alpha$  bei der Hypoxie-Induktion von ZNF395 hat. U87MG-Zellen wurden mit siRNA gegen HIF1 $\alpha$  oder Kontroll-siRNA im Doppelansatz transfiziert. Ein Ansatz wurde unter normalen Sauerstoffbedingungen kultiviert, der jeweils andere unter Hypoxie. Wie der Western Blot in Abb. 19 zeigt, konnte die Expression von ZNF395 unter normalen Sauerstoffbedingungen nicht detektiert werden, lediglich wenn die Zellen unter Hypoxie kultiviert wurden, waren ZNF395-spezifische Banden sichtbar (Spur 2). Während die Transfektion mit der Kontroll-siRNA den Nachweis von Hypoxie-induziertem ZNF395 nicht veränderte (Spur 3), war dies nach Transfektion der siRNA gegen HIF1 $\alpha$  nicht mehr detektierbar (Spur 4). Der Knockdown von HIF1 $\alpha$  führt dementsprechend zum Verlust der Hypoxie-Induzierbarkeit von ZNF395. Eine Detektion des HIF1 $\alpha$  Proteins mit spezifischen Antikörpern, die den HIF1 $\alpha$  Knockdowns bestätigen könnten, war jedoch nicht möglich. Um die Effizienz der Suppression von HIF1 $\alpha$  dennoch zu

bestätigen, wurden U87MG-Zellen mit siRNA gegen HIF1 $\alpha$  oder mit Kontroll-siRNA transfiziert und die mRNA Menge von HIF1 $\alpha$  mittels qRT-PCR gemessen. Die Hypoxie-Induktion von HIF1 $\alpha$  erfolgt zwar durch die Erhöhung der Stabilität des Proteins über Hemmung der PHD Aktivität unter Sauerstoffmangel und nicht über Aktivierung der Expression des Transkriptionsfaktors, Die siRNA agiert aber über Degradation der spezifischen mRNA, die über RT-PCR gemessen werden konnte. Wie in Abb. 19B gezeigt, konnte eine Reduzierung der HIF1 $\alpha$ -Transkripte um 86% gemessen werden, was eine Hypoxie-Induktion von ZNF395 verhinderte, wie der Western Blot verdeutlichte. Dies belegt, dass der Transkriptionsfaktor HIF1 $\alpha$  maßgeblich an der Hypoxie-induzierbarkeit von ZNF395 beteiligt ist.

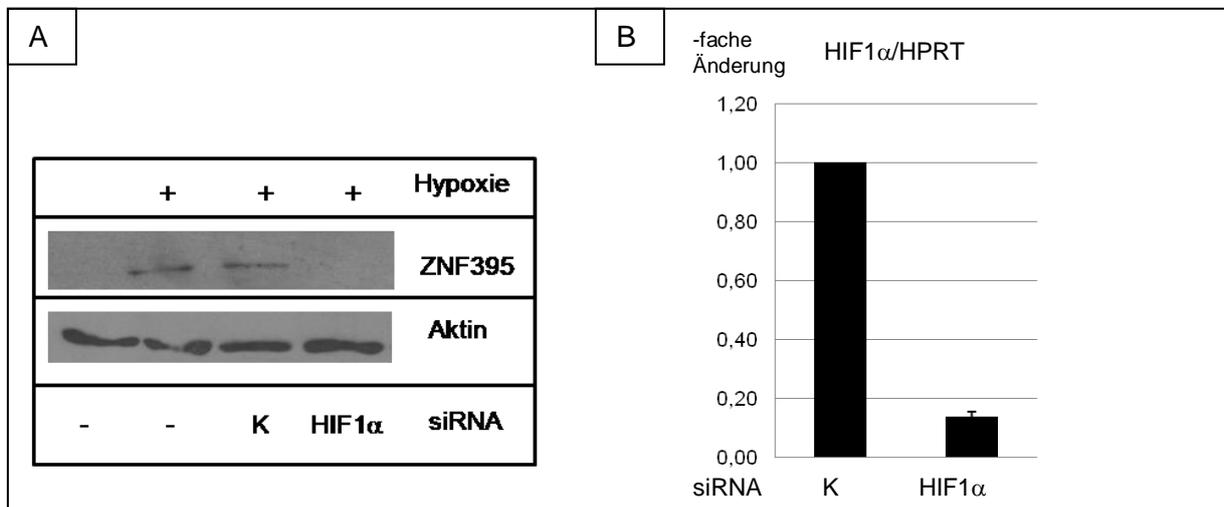


Abb. 19 Hypoxie-Induktion von ZNF395 findet nach HIF1 $\alpha$  „Knockdown“ in U87MG-Zellen nicht statt

A: Expressionsnachweis: U87MG-Zellen wurden mit 150pmol siRNA gegen HIF1 $\alpha$  oder gegen HPV8E6 als Kontrolle (K) transfiziert. Die transfizierten Zellen wurden entweder unter normalen Sauerstoffbedingungen oder für 12h vor der Ernte unter sauerstoffarmen Konditionen von 2% O<sub>2</sub>-Konzentration kultiviert. Hypoxie-Behandlung ist mit einem + markiert. 60  $\mu$ g der Gesamtprotein-Extrakte wurden in einem achtprozentigen SDS-PAG aufgetrennt, auf eine Nitrozellulosemembran transferiert und ZNF395 detektiert. Als Beladungskontrolle wurde  $\beta$ -Aktin nachgewiesen.

B: qRT-PCR: U87MG-Zellen wurden mit 150pmol siRNA gegen HIF1 $\alpha$  oder gegen HPV8E6 als Kontrolle (K) transfiziert. RNA wurde 48h nach der Transfektion aus den Zellen isoliert. 1 $\mu$ g Gesamtzelluläre RNA wurde revers transkribiert und wie in Abb. 10 dargestellt, berechnet. Die Balken repräsentieren die Mittelwerte aus drei unabhängigen qRT-PCRs. Die Standardabweichungen sind angegeben.

#### 4.4.3 HIF1 $\alpha$ und ZNF395 Expression findet in den selben Zellen des Tumorstromas statt

Die beschriebenen Ergebnisse belegen, dass die Expression von ZNF395 durch HIF1 $\alpha$  aktiviert wird. Um zu untersuchen, ob HIF1 $\alpha$  als Regulator der Expression von ZNF395 in den Zellen des Tumorstromas beteiligt ist, wurden IF Analysen mit Gewebeschnitten eines Zervixkarzinoms durchgeführt. ZNF395-Proteine wurden mit einem grün-fluoreszierenden und HIF1 $\alpha$  Proteine mit einem rot-fluoreszierenden Sekundär-Antikörper nachgewiesen. Die Ergebnisse der IF sind in Abb. 20 anhand von zwei Bilderreihen, die verschiedene Bereiche des Karzinoms zeigen, dargestellt. Viele der HIF1 $\alpha$  exprimierenden Zellen wiesen auch eine Expression von ZNF395 auf, was zu einer Überlagerung der fluoreszierenden Farbstoffe und daraus resultierender gelb-orangen Fluoreszenz führt. Nahezu alle ZNF395-exprimierenden Zellen waren ebenso positiv für HIF1 $\alpha$ . Dies verdeutlicht die Expression beider Faktoren in denselben Zellen des Tumorstromas und weist darauf hin, dass die Expression von HIF1 $\alpha$  zur Aktivierung von ZNF395 in Zellen des Tumorstromas führen könnte.

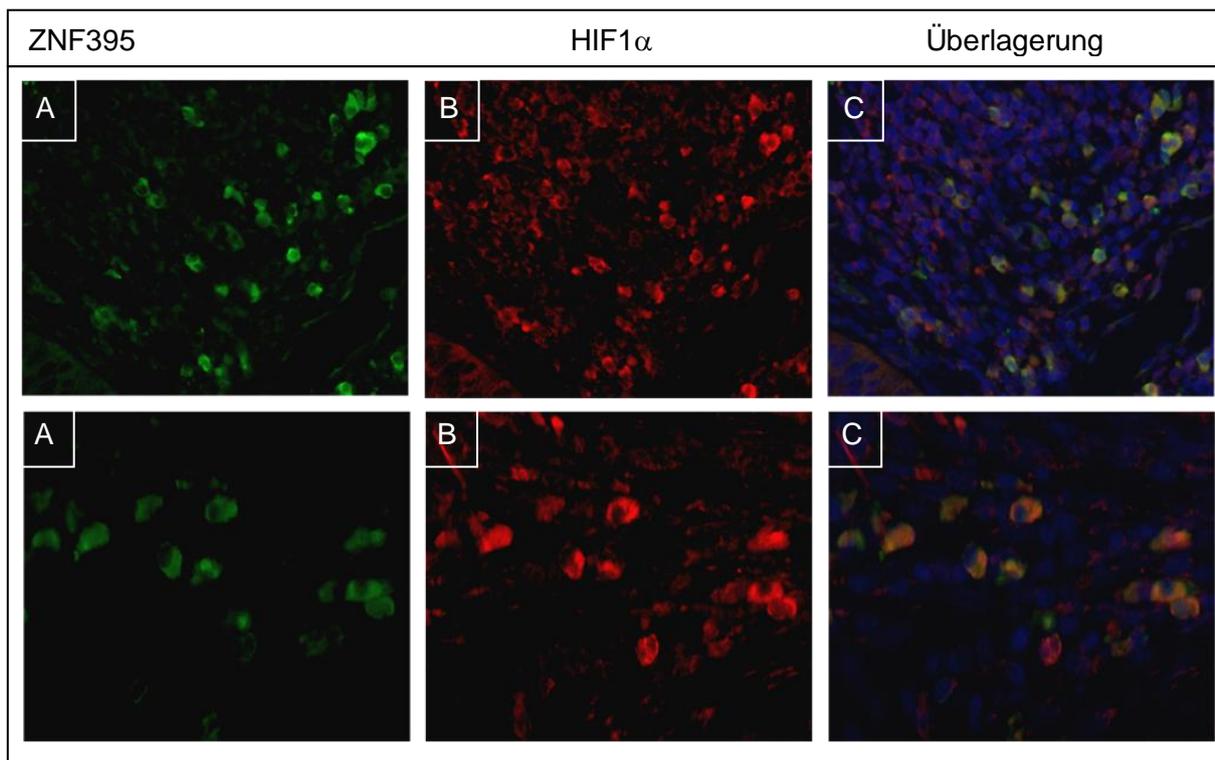


Abb. 20 Nachweis von ZNF395 und HIF1 $\alpha$  im Zervixkarzinom mittels Immunfluoreszenzchemie

Ein in Paraffin eingebetteter Gewebeschnitt eines Zervixkarzinoms wurde mit einem in Kaninchen hergestellten Antikörper gegen ZNF395 und einem in der Maus hergestellten Antikörper gegen HIF1 $\alpha$  inkubiert, gefolgt von der Inkubation mit FITC gekoppeltem Sekundär-Antikörper gegen Kaninchen IgG (A: grüne Fluoreszenz), und einem TRITC gekoppelten Sekundär-Antikörper gegen Maus IgG (B: rote Fluoreszenz) und DAPI, welches die Zellkerne blau anfärbt. Die Überlagerung der Fluoreszenz erfolgte mit geeigneter Computersoftware (C). Zwei Bilderreihen sind gezeigt, die verschiedene Bereiche des Zervixkarzinoms beinhalten und mit unterschiedlicher Vergrößerung fotografiert wurden.

## 4.5 ZNF395 wird durch IKK phosphoryliert

Eine zeitgleich im Labor angefertigte Doktorarbeit zur Charakterisierung der posttranslationalen Modifikationen von ZNF395 fand, dass ZNF395 einen aktiven IKK-Signalweg braucht, damit es ISG56 aktivieren kann. Inhibition von IKK durch BMS-345541, einem spezifischen IKK Inhibitor, verminderte die ZNF395-vermittelte Aktivierung des ISG56 Promotors. Zusätzlich verhinderte BMS-345541 die proteasomale Degradation von rekombinatem ZNF395 und stabilisierte auch das endogene Protein (Jordanovski et al., 2013). Frühere Ergebnisse der Arbeitsgruppe fanden, dass  $\text{TNF}\alpha$  und POLY I:C, die beide unter anderem auch den IKK-Signalweg aktivieren, die verstärkte Degradation von rekombinatem ZNF395 induzierten. Dies weist daraufhin, dass der IKK-Signalweg die Aktivität und Stabilität von ZNF395 kontrolliert.

Ein aktiver IKK-Signalweg führt zur Aktivierung von NF- $\kappa$ B, einem zentralen Regulator des angeborenen Immunsystems. Die Rolle von IKK bei der Kontrolle der transkriptionalen Aktivität von ZNF395 sollte in dieser Arbeit fortführend untersucht werden.

### 4.5.1 IKK Knockdown führt zur Stabilisierung des endogenen ZNF395

IKK besteht aus den beiden katalytischen Untereinheiten  $\text{IKK}\alpha$  und  $\text{IKK}\beta$  und der strukturellen Untereinheit  $\text{IKK}\gamma$ , die auch NEMO genannt wird.  $\text{IKK}\beta$  vermittelt dabei die Haupt-katalytische Aktivität zur Aktivierung von NF $\kappa$ B als Folge von Stimuli wie pro-inflammatorischen Zytokinen.  $\text{IKK}\alpha$  und  $\beta$  phosphorylieren aber auch unabhängig voneinander viele NF- $\kappa$ B-unabhängige zytoplasmatische und nukleäre Faktoren, die mit verschiedenen Krankheiten, Allergien oder Tumoren assoziiert sind (Chariot 2009). Um herauszufinden, welche der beiden katalytischen Untereinheiten zur Phosphorylierung und daraus resultierenden Degradation von ZNF395 beiträgt, sollten Knockdown Experimente durchgeführt werden. Das Ausschalten der Kinase, erfolgte durch siRNA basierten Knockdown. Die daraus resultierende Stabilisierung sollte dazu führen, dass ZNF395 im Western Blot detektierbar wird.

Dafür wurden U87MG-Zellen mit zwei verschiedenen Mengen siRNA gegen  $\text{IKK}\alpha$ ,  $\text{IKK}\beta$  oder gegen beide Kinasen zusammen transfiziert. Als Kontrolle und zum Angleichen der siRNA Mengen wurde wie unter 4.3.2 beschrieben, siRNA gegen HPV8E6 verwendet. Eine Western Blot Analyse der extrahierten Proteine zeigte, dass der Knockdown sowohl von endogenem  $\text{IKK}\alpha$  als auch von  $\text{IKK}\beta$  zu einer Dosis abhängigen Stabilisierung von ZNF395 führte, was durch verstärkten Nachweis von ZNF395 deutlich wurde (Abb. 21, Spur 1-4). SiRNA gegen HPV8E6 als Kontrolle ermöglichte dagegen nicht, ZNF395 zu detektieren (Spur 6). Die

erfolgreiche spezifische Unterdrückung der Expression von IKK $\alpha$  und IKK $\beta$  wurde mit entsprechenden Antikörpern nachgewiesen. Dieses Experiment verdeutlicht, dass beide Kinasen, IKK $\alpha$  wie auch IKK $\beta$ , die Phosphorylierung des endogenen ZNF395 katalysieren, was schließlich zur proteasomalen Degradation des Proteins führt.

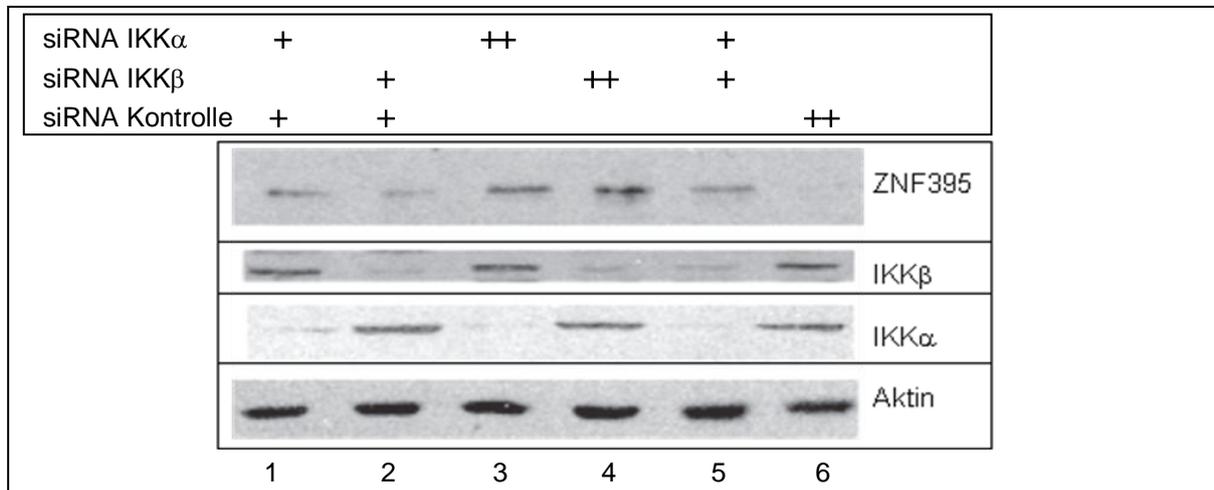


Abb. 21 „Knockdown“ von IKK $\alpha$  und IKK $\beta$  führt zur Stabilisierung von endogenem ZNF395  
 Expressionsnachweis: U87MG-Zellen wurden mit 150pmol (+) oder 300pmol (++) siRNA gegen IKK $\alpha$  wie auch IKK $\beta$  und gegen HPV8E6 als Kontrolle und zum Ausgleich der RNA Mengen transfiziert. 70  $\mu$ g Gesamtprotein-Extrakt wurde in einem achtprozentigen SDS-PAG aufgetrennt und auf eine Nitrocellulosemembran transferiert, auf der ZNF395 detektiert wurde. IKK $\alpha$  und IKK $\beta$  wurden zur Überprüfung der Effizienz des „Knockdowns“ nachgewiesen. Als Beladungskontrolle diente  $\beta$ -Aktin.

#### 4.5.2 ZNF395-vermittelte Aktivierung des ISG56-Promotors benötigt Kinaseaktivität von IKK $\alpha$ und IKK $\beta$

Um die Notwendigkeit von IKK $\alpha$  und IKK $\beta$  für die ZNF395 vermittelte Aktivierung des ISG56-Promotors zu bestätigen, wurden jeweils Kinase-inaktive Mutanten eingesetzt. Der Austausch von Lysin (K) nach Methionin (M) an Position 44 (K44M) (Geleziunas et al., 1998) (Mercurio et al., 1997), bewirkt, dass sowohl in IKK $\alpha$  als auch in IKK $\beta$  das für die Phosphorylierung nötige ATP nicht mehr gebunden werden kann (Massa et al., 2005). In Folge dieses Austausches kann Phosphorylierung durch diese Kinasen nicht mehr stattfinden. Das Expressionsplasmid IKK2-K44M (IKK $\beta$ -K44M) wurde zur Verfügung gestellt (Mercurio et al., 1997). Wird diese Mutante in den Zellen überexprimiert, verdrängt sie endogenes IKK $\beta$  aus dem IKK-Komplex und inhibiert die Kinaseaktivität. Durch transiente Transfektionsanalysen mit dem Reporterkonstrukt ISG56-Prom-Luc und den Expressionsvektoren für die mutierte Kinase sollte untersucht werden, ob diese Mutante die ZNF395 vermittelte Aktivierung des ISG56 Promotors beeinflusst.

Um diese Aktivität zu verstärken, wurde für ZNF395 ein Plasmid transfiziert, das eine Mutante exprimiert, die konstitutiv im Zellkern verbleibt und dadurch Transkription effizienter aktiviert (pcDNA-FLAGII-ZNF395mutNES). 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. Abb. 22A zeigt schematisch den Aufbau des ISG56-Promotors im Luziferase-Reporterplasmid. ZNF395mutNES aktivierte den ISG56-Promotor 2,5-fach (B). Geringe Mengen (2-8ng) an Expressionsvektoren für ZNF395 reichen dafür aus. Die Überexpression von ZNF395 zusammen mit der IKK $\beta$ -K44M Mutante (B) führten zu Werten, die niedriger waren, als die basale Aktivität (erste Spur). Die Aktivierung des ISG56-Promotors durch ZNF395 war somit durch Kotransfektion des Expressionsplasmids für die inaktive Phosphorylierungsmutante IKK $\beta$ K44M vollständig unterbunden.

Diese Ergebnisse unterstützen die Hypothese, dass IKK $\beta$  an der Phosphorylierung von ZNF395 beteiligt ist, was zur Aktivierung seiner Funktion als Transkriptionsfaktor führt.

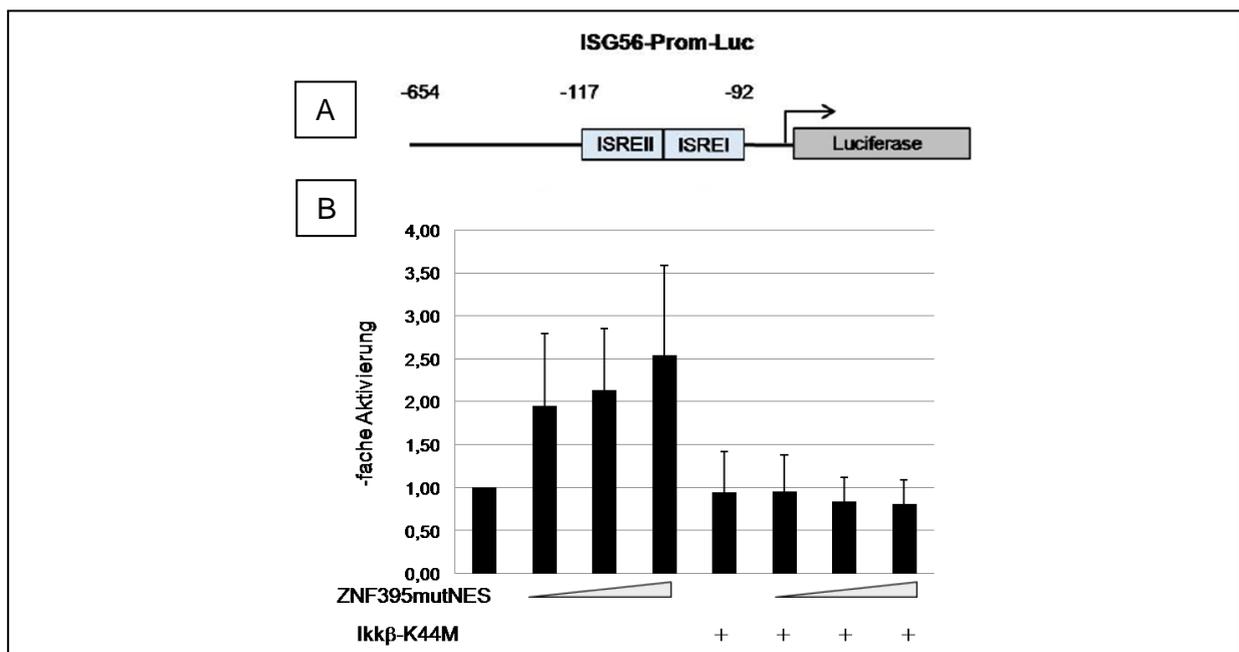


Abb. 22 Aktivierung des ISG56-Promotors durch ZNF395 benötigt Kinaseaktivität von IKK $\beta$

A: Schematische Darstellung des Reporterkonstrukts ISG56PromLuc. Die Zahlenangaben beziehen sich auf die Position der Nukleotide um den Transkriptionsstartpunkt +1. Die ISREs, die die INF $\alpha$  sowie die ZNF395 induzierte Aktivierung vermitteln, sind zur Verdeutlichung mit einem Kästchen markiert.

B: Transiente Transfektionsstudie: RTS3b Zellen wurden mit 125ng des Reporterkonstrukts ISG56PromLuc, 30ng IKK $\beta$ K44M und 2,4 oder 8ng pcDNA-FLAGII-ZNF395mutNES kotransfiziert. Die DNA-Mengen wurden mit entsprechendem Leervektor ausgeglichen. Die basale Luziferase-Aktivität wurde als 1 definiert. Die Balken repräsentieren die Mittelwerte aus drei unabhängigen Experimenten. Die Standardabweichungen sind angegeben.

Die K44M Mutation wurde zunächst über eine *in vitro* Mutagenese wie unter Kapitel 3.3.6 in den Expressionsvektor, der für IKK $\alpha$  kodiert, eingeführt.

Wie Abb. 23 verdeutlicht, konnte ZNF395mutNES in diesem Experiment den ISG-Promotor 1,8-fach aktivieren (B). Dies war durch Kotransfektion des Expressionsplasmides für die inaktive Mutante IKK $\alpha$ K44M vollständig unterbunden.

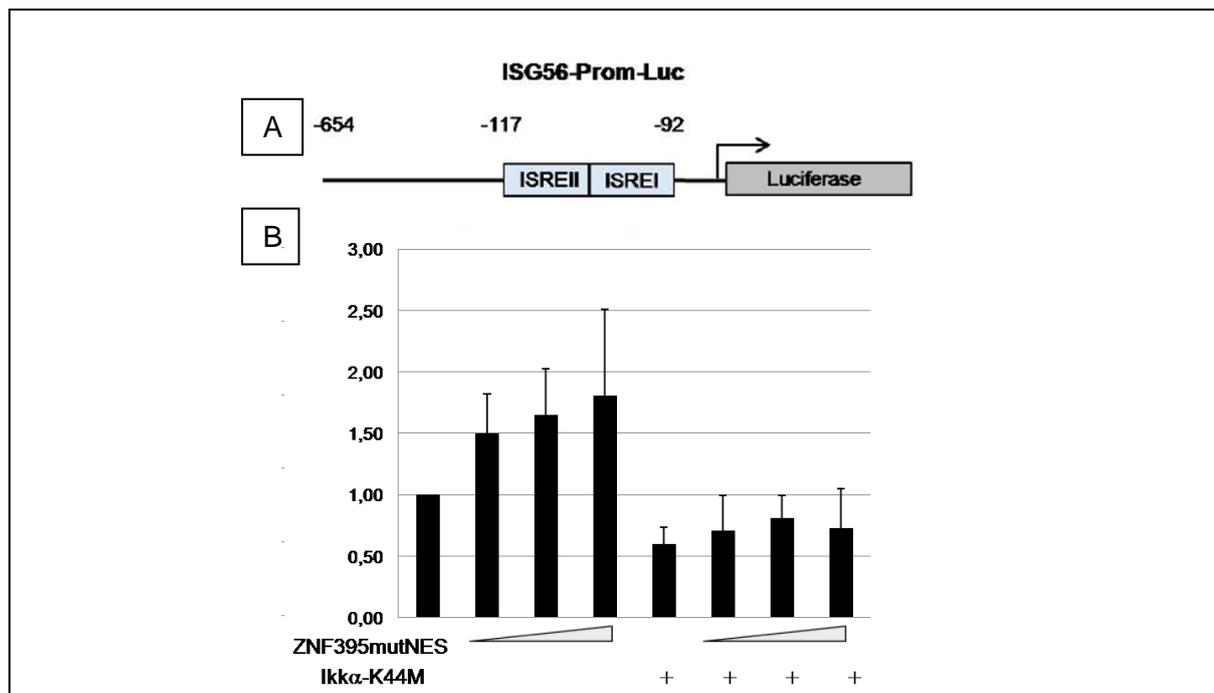


Abb. 23 Schematische Darstellung des Reporterkonstrukts ISG56PromLuc. Die Zahlenangaben beziehen sich auf die Position der Nukleotide mit den Transkriptionsstartpunkt als +1. Die ISREs, die die INF $\alpha$  sowie die ZNF395 induzierte Aktivierung vermitteln, sind zur Verdeutlichung mit einem Kästchen markiert.

B: Transiente Transfektionsstudie: RTS3b Zellen wurden mit 125ng des Reporterkonstrukts ISG56PromLuc, 30ng IKK $\alpha$ K44M und 2,4 oder 8ng pcDNA-FLAGII-ZNF395mutNES kotransfiziert. Die 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.

Die transienten Transfektionsanalysen, dargestellt in Abb. 22 und Abb. 23, zeigen den Verlust der Aktivierung des ISG56-Promotors durch ZNF395 nach Koexpression kinase-inaktiver Mutanten von IKK $\alpha$  und IKK $\beta$ . Die siRNA basierte Hemmung der Expression von endogenem IKK $\alpha$  und IKK $\beta$  führte zu einer Stabilisierung von ZNF395 (Abb. 21). Diese beiden Beobachtungen implizieren, dass die Phosphorylierung durch IKK $\alpha$  und IKK $\beta$  ZNF395 erlaubt Transkription zu aktivieren, gleichzeitig aber seine Degradation herbeiführt.

### 4.5.3 Posttranskriptionale Modifikation von ZNF395 unter Hypoxie

Hypoxie und die konstitutive Aktivierung des NF $\kappa$ B-Pathways durch IKK spielen auch bei Entzündungsreaktionen und Tumorprogression eine zentrale Rolle. Um eine Verbindung zwischen der Induktion der ZNF395-Expression durch Hypoxie und seiner Modifikation durch IKK herzustellen, sollte untersucht werden, ob Hypoxie-induziertes ZNF395 in der durch IKK phosphorylierten Form vorliegt, somit transkriptionell aktiv ist. U87MG-Zellen wurden in An- oder Abwesenheit von 5 $\mu$ M BMS-345541 entweder unter normalen Sauerstoffbedingungen oder unter Hypoxie kultiviert. Während Hypoxie-induziertes ZNF395 als eine einzelne Bande detektierbar war (Abb. 24, Spur 2), zeigte sich eine Doppelbande bei dem durch BMS-345541 stabilisierten ZNF395, unabhängig von der Sauerstoffkonzentration (Abb. 24, Spur 3, 4), was auf eine IKK-bedingte Phosphorylierung schließen ließ (Spur 4). Die Behandlung der Extrakte mit  $\lambda$ -Phosphatase sollte dies genauer charakterisieren. Durch Inkubation der Proben mit diesem Enzym und anschließenden Western Blot kann gezeigt werden, ob ein Protein in phosphorylierter Form vorliegt, da es nach Entfernung der Phosphatreste von Serinen, Threoninen und Tyrosinen durch  $\lambda$ -Phosphatase im SDS-PAG schneller migriert. Die extrahierten Proteine wurden zum einen mit oder ohne  $\lambda$ -Phosphatase, aber in entsprechenden Puffern, wie unter 3.5.5 beschrieben, inkubiert und im Western Blot mit einem Antikörper gegen ZNF395 analysiert. Hypoxie-induziertes ZNF395 (Spur 7) migrierte nach Inkubation mit  $\lambda$ -Phosphatase im SDS-PAG schneller, was auf eine Dephosphorylierung durch das Enzym schließen lässt. Der Unterschied des Molekulargewichts betrug ca. 8 kDa, wobei die nicht phosphorylierte Form bei ca. 75 kDa läuft, wie mit einem zusätzlich auf das Gel aufgetragenen Protein-Standard abgeschätzt wurde. Das in Folge von BMS-Behandlung stabilisierte ZNF395 erschien in einer ähnlichen Bande wie durch Hypoxie-induziertes ZNF395 und zusätzlich in einer etwas schneller laufenden Bande (Spur 8). In Folge der  $\lambda$ -Phosphatase-Inkubation entstand eine ZNF395-spezifische Bande, entsprechend der dephosphorylierten Form unter Hypoxie (Spur 9). Im Gegensatz zur Hypoxie-Induktion blieb allerdings ein beträchtlicher Teil der höher laufenden Bande erhalten. Dies lässt sich folgendermaßen interpretieren: endogenes Hypoxie-induziertes ZNF395 liegt durch IKK phosphoryliert vor, wird aber auch durch andere Kinasen phosphoryliert. Die Phosphatase-resistente Form die unter BMS-345541-Inkubation entstand, ist auf andere posttranskriptionale Modifikationen von ZNF395 in Folge des Fehlens der Phosphorylierung durch IKK zurückzuführen. Diese Daten belegen, dass Hypoxie-induziertes ZNF395 in U87MG-Zellen durch IKK phosphoryliert ist, und somit transkriptional aktiv sein sollte.

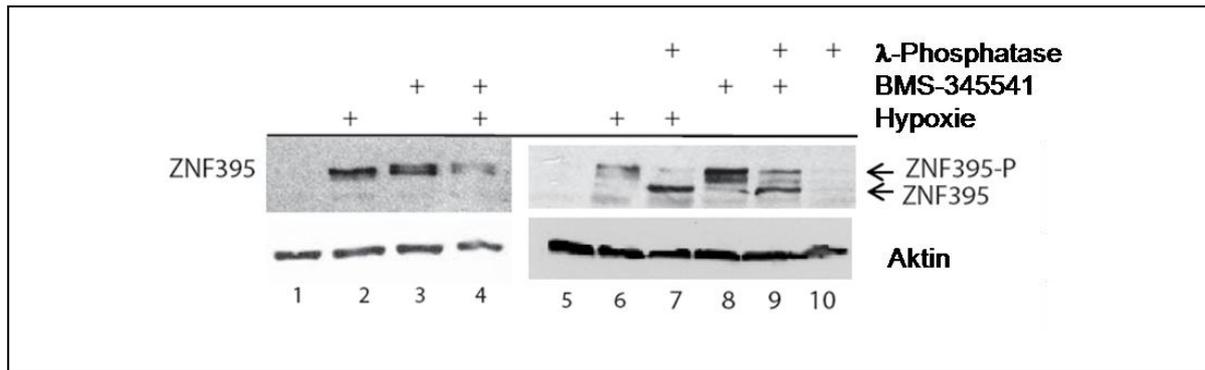


Abb. 24 Hypoxie-induziertes ZNF395 wird durch IKK phosphoryliert  
 Expressionsnachweis: U87MG-Zellen wurden in An- oder Abwesenheit von 5µM BMS-345541 für 24h inkubiert und zusätzlich unter normalen Sauerstoffbedingungen oder für 12h vor der Ernte unter sauerstoffarmen Konditionen von 2% O<sub>2</sub>-Konzentration(Hypoxie) kultiviert. Hypoxie-Behandlung ist mit einem + markiert. 50 µg Gesamtprotein-Extrakt wurden 30 min mit 600Units λ-Phosphatase inkubiert. Anschließend wurden die Proteine im 8%igen SDS-PAG aufgetrennt und auf eine Nitrocellulosemembran transferiert und mit dem ZNF395-Antikörper visualisiert. Als Beladungskontrolle wurde β-Aktin nachgewiesen.

Anschließend sollte untersucht werden, ob die durch Hypoxie erhöhte Expression von ZNF395 lediglich auf der HIF1 $\alpha$ -aktivierten Induktion des Promotors beruht, oder ob auch die IKK-vermittelte Degradation von ZNF395 durch diese Bedingungen reduziert ist und somit zu den höheren Mengen an ZNF395 unter Hypoxie beiträgt.

Dafür wurde mit der RTS3b-TR-FLAG-ZNF395-Zelllinie gearbeitet. Diese Zelllinie besitzt das sogenannte „Tet-on System“ und ermöglicht eine durch Doxycyclin induzierbare Expression von rekombinanten ZNF395. Die Zugabe von TNF $\alpha$  zum Zellkulturmedium sollte zur Aktivierung des IKK Signalweges führen. Um die Effekte von Hypoxie zu charakterisieren, wurde je ein Ansatz unter normalen und ein Ansatz unter sauerstoffarmen Konditionen von 2% O<sub>2</sub>-Konzentration inkubiert. 20µg der extrahierten Proteine wurden für Western Blot Analysen zum Nachweis der Mengen an ZNF395 eingesetzt. Während durch Hypoxie-induziertes endogenes ZNF395 nicht detektiert werden konnte (Abb. 25, Spur 1-4), da 20µg Proteinextrakt hier nicht ausreichten, führte die Zugabe von Doxycyclin zu einer deutlichen ZNF395-spezifischen Bande. Wie erwartet, war diese von gleicher Intensität unabhängig von der O<sub>2</sub>-Konzentration (Spur 5 und 7) da die Expression hier unter Kontrolle des Dox-regulierten Promotors erfolgte. Die Intensität dieser Bande war unter den verschiedenen Sauerstoffkonzentrationen in gleichem Maße nach Zugabe von TNF $\alpha$  reduziert, was auf eine verstärkte Degradation des Proteins unter beiden Bedingungen schließen lässt.

Dies zeigt, dass ZNF395 auch unter hypoxischen Bedingungen durch Aktivierung des IKK Signalweges degradiert wird und somit als Aktivator der Expression von ISG56 agieren sollte.

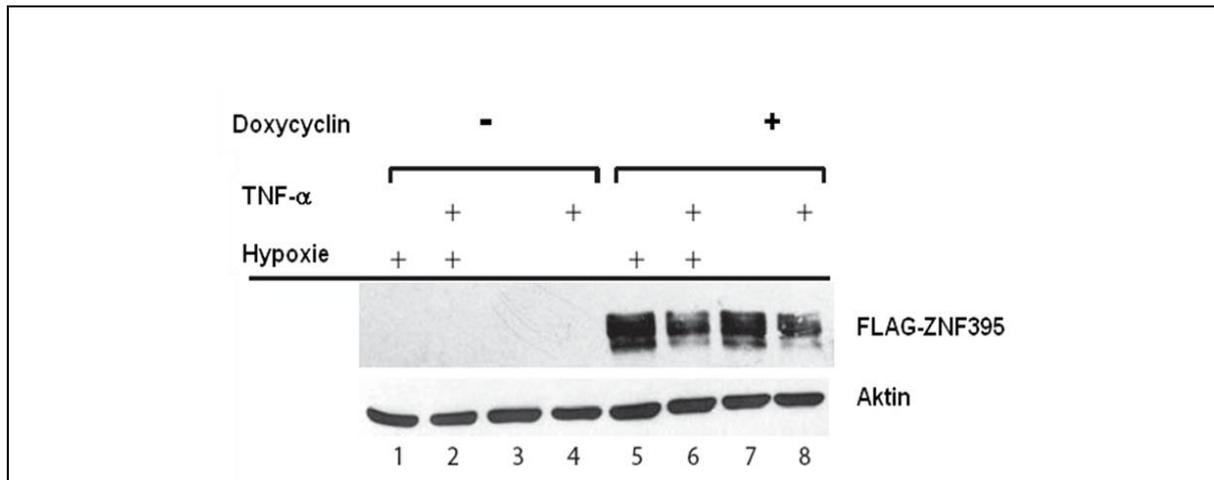


Abb. 25 Hypoxie interferiert nicht mit der IKK-vermittelten Kontrolle der Proteinestabilität

RTS3b-TR-FLAG-ZNF395-Zellen wurden zunächst in An- oder Abwesenheit von 1 $\mu$ g/ml Doxycyclin für 24h und dann für 20h mit TNF $\alpha$  inkubiert. Die in Spur 1,2,5 und 6 verwendeten Zellen wurden 12h vor der Ernte unter sauerstoffarmen Konditionen von 2% O<sub>2</sub>-Konzentration (Hypoxie) kultiviert. 20  $\mu$ g Gesamtprotein-Extrakt wurden in einem 8%igen SDS-PAG aufgetrennt und auf eine Nitrocellulosemembran transferiert und mit dem ZNF395-Antikörper visualisiert. Als Beladungskontrolle wurde  $\beta$ -Aktin nachgewiesen

## 4.6 ZNF395 aktiviert Interferon-stimulierte Gene

Wie bereits beschrieben, zeigten Microarray- und qRT-PCR-Analysen, dass die Überexpression von ZNF395 zur Stimulation einiger Interferon-regulierter Gene, wie ISG56, IFI44, IFI16 und IFIT2 führte (Jordanovski et al., 2013). Sie besitzen anti-virale Aktivität und werden im Rahmen der angeborenen Immunantwort auf virale Infektionen durch die Typ1-Interferone  $\alpha$  und  $\beta$  (IFN $\alpha$ ,  $\beta$ ) aktiviert. Die Aktivierung erfolgt dabei über die ISREs in den promotorproximalen Regionen dieser Gene, die vom Transkriptionsfaktor Komplexes ISGF3 nach IFN-Stimulation gebunden werden (Sen und Sarkar 2007; Wesoly et al., 2007; Liu et al., 2013).

Da sechs IFN-sregulierte Gene unter den Zielgenen von ZNF395 waren, sollte untersucht werden, ob ZNF395 eine Rolle bei der IFN-vermittelten Induktion dieser Gene spielt. Knockdown Experimente sollten zeigen, wie sich die Reduzierung endogener ZNF395 Spiegel auf die basale Expression von ISG56, IFI44, IFI16 und IFIT2 und die Interferon-induzierte Aktivierung der Gene auswirkt. Hierfür wurden RTS3b- und U87MG-Zellen mit siRNA gegen ZNF395 und siRNA gegen eine Kontrolle (K, HPV8E6), wie unter 4.3.1 beschrieben, transfiziert. Der Knockdown von ZNF395 war mit 90%-Reduzierung in RTS3b und 85% in U87MG effizient (Abb. 26 A, B, jeweils linkes Diagramm). Dies führte in beiden Zelllinien zu verminderter basaler Transkription von ISG56, IFI44, IFI16 und IFIT2. Die mRNA Spiegel waren von 10% im Fall von IFIT2 in RTS3b-Zellen, bis zu knapp 50%, im Fall

von ISG56 in RTS3b und IFI16 in U87MG-Zellen, niedriger (Abb. 26). Dies bestätigt, dass die basale Transkription von ISG56, IFI44, IFI16 und IFIT2 von ZNF395 abhängig ist.

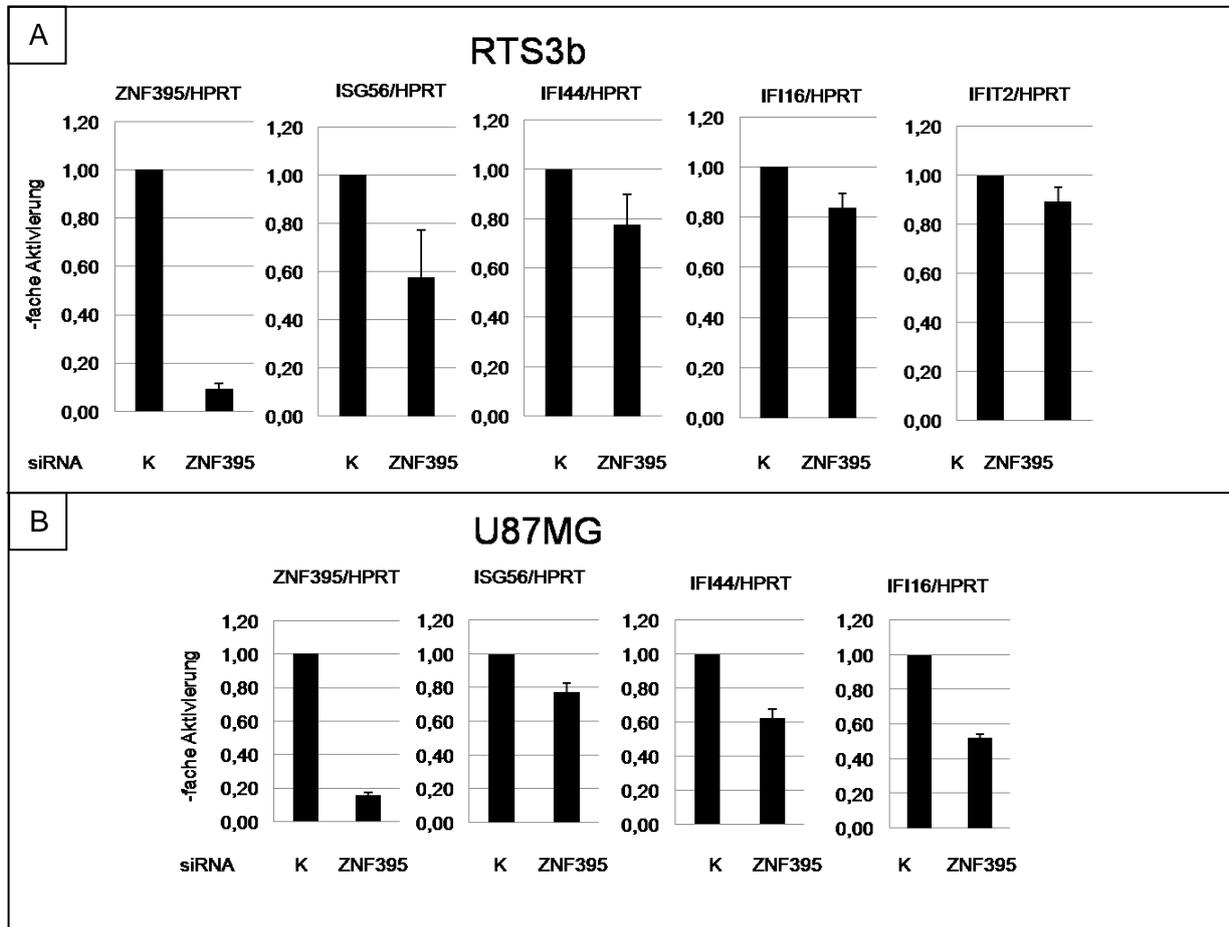


Abb. 26 ZNF395 ist an der Transkription der Interferon-stimulierten Gene ISG56, IFI44, IFI16 und IFIT2 beteiligt. Transfektion von 150pmol siRNA gegen HPV8E6 (Kontrolle, K) oder ZNF395 in RTS3b- (A) oder U87MG-Zellen (B). QRT-PCR: 1µg Gesamtzelluläre RNA wurde jeweils revers transkribiert. Die relativen Level der ZNF395-, ISG56-, IFI44- und IFI16-mRNA wurden mit der  $\Delta\Delta\text{CP}$ -Methode durch Normalisierung gegen HPRT berechnet (Pfaffl 2001). Die im Diagramm aufgeführten Werte stellen jeweils die fache Veränderung der mit siRNA gegen ZNF395-transfizierten Probe in Relation zu der mit Kontroll-siRNA-transfizierten Probe dar. Die Balken repräsentieren die Mittelwerte aus drei unabhängigen qRT-PCRs. Die Standardabweichungen sind angegeben.

#### 4.6.1 Effiziente Aktivierung der Interferon-stimulierten Gene ISG56, IFI44, IFI16 und IFIT2 durch $\text{IFN}\alpha$ benötigt ZNF395

Ohne Stimuli sind IFN-regulierte meist nicht oder nur sehr gering exprimiert. Die Induktion dieser Gene durch IFN ist dann schnell, mit einem Optimum von 6 Stunden nach IFN-Stimulus, effizient und transient (Fensterl und Sen, 200y). Um den Beitrag von ZNF395 bei der IFN-induzierten Aktivierung zu verdeutlichen, wurden die mit siRNA gegen ZNF395 und siRNA gegen eine Kontrolle (K) transfizierten RTS3b- und U87MG-Zellen 42h später für 6h

mit IFN $\alpha$ -haltigem Medium inkubiert. Die Transfektion der siRNA gegen ZNF395 resultierte in einer Knockdown-Effizienz von 90% in RTS3b und 85% in U87MG-Zellen. Die Inkubation der Zellen mit IFN $\alpha$  zeigte keine starken Effekte, was verdeutlicht, dass ZNF395 durch dieses Zytokin nicht reguliert wird. Während die IFN $\alpha$ -stimulierte Aktivierung von ISG56 in RTS3b-Zellen um 240-fach lag, war der Wert nach si-basierter Hemmung von ZNF395 um das 5-fache reduziert und zeigte lediglich eine 50-fache Aktivierung (Abb. 27 A). Die mRNA Spiegel für IFI44 wurden in RTS3b-Zellen durch IFN $\alpha$  30-fach induziert, aber nach ZNF395-Knockdown durch IFN $\alpha$  lediglich 10-fach. Ähnlich sank die 20-fache Aktivierung von IFIT2 durch IFN $\alpha$  auf 4-fach nach siRNA Transfektion gegen ZNF395. Die Expression von IFI16 wurde durch IFN $\alpha$  5-fach aktiviert, nach ZNF395-Knockdown führte die IFN $\alpha$ -Behandlung lediglich zu einer zweifachen Aktivierung. Die Hemmung der Expression von ZNF395 hatte also eine 3-5-fache Reduzierung der IFN $\alpha$ -induzierten Expression dieser Faktoren in RTS3b-Zellen zur Folge.

Die absoluten IFN $\alpha$ -induzierten mRNA-Spiegel für diese Faktoren waren in U87MG-Zellen (Abb. 27 B) nicht so hoch wie in RTS3b-Zellen (Abb. 27 A), der verminderte Effekt nach ZNF395-Knockdown war jedoch deutlich sichtbar. Die Ergebnisse dieser qRT-PCRs zeigen, dass ZNF395-Expression für die maximale Aktivierung der Gene ISG56, IFI44, IFI16 und IFIT2 durch IFN $\alpha$  notwendig ist.

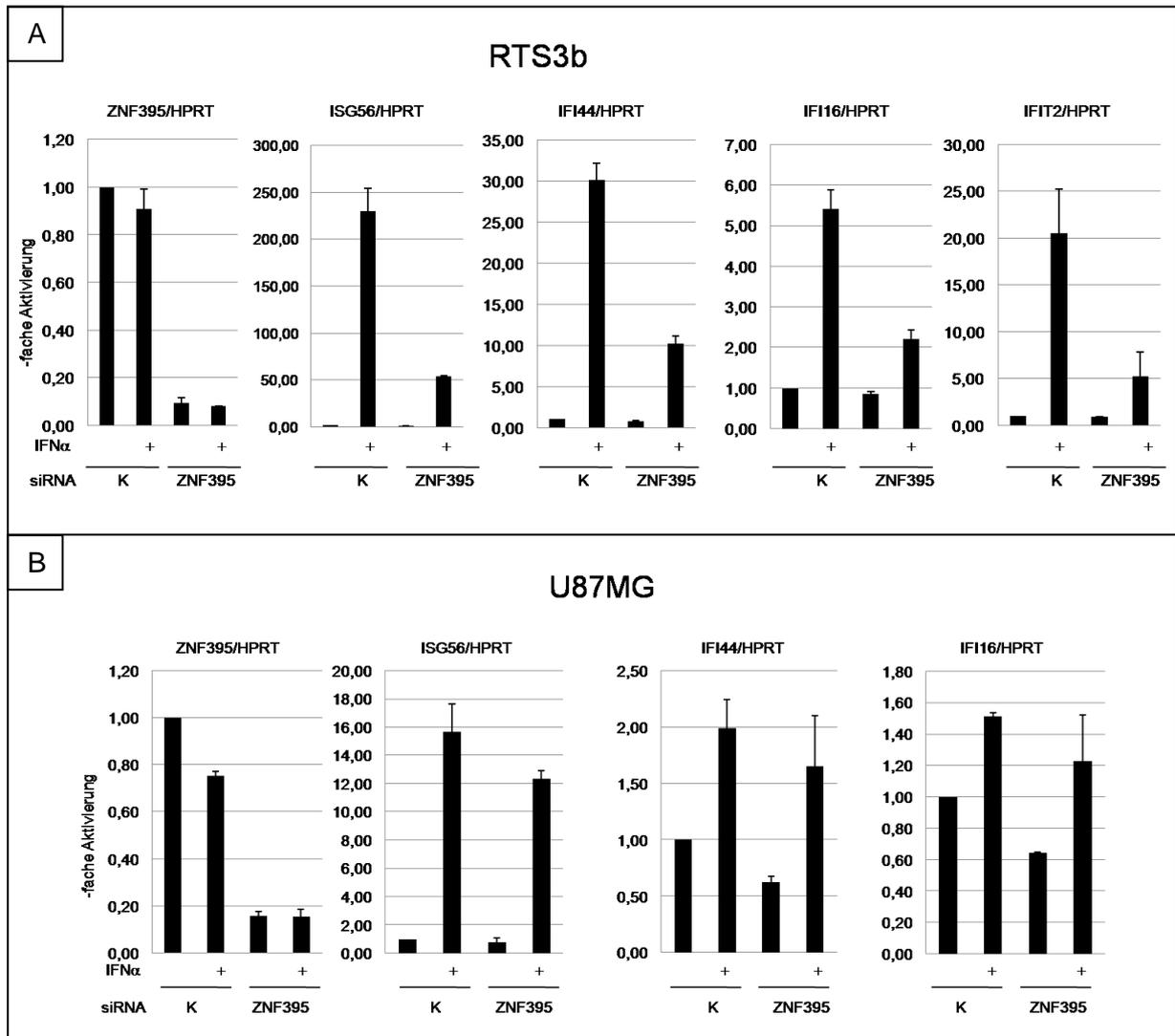


Abb. 27 ZNF395 Expression ist notwendig für die maximale Aktivierung der INF $\alpha$ -induzierten Aktivierung von ISG56, IFI44, IFI16 und IFIT2

Transfektion von 150pmol siRNA gegen HPV8E6 (Kontrolle, K) oder ZNF395 in RTS3b (A) oder U87MG Zellen (B). QRT-PCR: Die Zellen wurden 6h vor der Ernte mit 1000 U/ml INF $\alpha$  im Medium inkubiert. 1 $\mu$ g Gesamtzelluläre RNA wurde jeweils revers transkribiert und die relativen Level der ZNF395-, ISG56-, IFI44- und IFI16-, IFIT2 mRNAs wie in Abb. 27 dargestellt, berechnet. Die Balken repräsentieren die Mittelwerte aus drei unabhängigen qRT-PCRs. Die Standardabweichungen sind angegeben.

#### **4.6.2 Effiziente Aktivierung der Interferon-regulierten Gene ISG56, IFI44, IFI16 und IFIT2 durch das dsRNA Analogon Poly (I:C) benötigt ZNF395**

Um die Bedeutung von ZNF395 bei der Induktion antiviraler Gene zu untermauern, wurden Zellen mit Poly (I:C) (PIC), einer synthetisch hergestellten doppelsträngigen RNA (dsRNA), das als Analogon zu viraler RNA fungiert, inkubiert. Der TLR3 erkennt dsRNAs und leitet auch nach Inkubation der Zellen mit PIC die spezifischen Signal-Transduktionskaskaden ein, welche die Aktivierung von NF- $\kappa$ B und IRF3/IRF7 zur Folge hat und in IFN-Sezernierung resultiert (Matsumoto und Seya 2008; Reimer et al., 2008; Zhao et al., 2012). Da U87MG-Zellen den TLR3 nicht exprimieren, wurde die Rolle von ZNF395 bei der PIC-induzierten Aktivierung von ISG56, IFI44, IFI16 und IFIT2 in RTS3b-Zellen untersucht. 24h nach Transfektion der siRNAs gegen ZNF395 und der Kontroll-siRNA wurde 10ng/ml PIC zum Medium gegeben, gefolgt von einer weiteren 24-stündigen Inkubation.

Die Effizienz des ZNF395 Knockdowns betrug in diesem Fall 80% und ist im linken Diagramm dargestellt. Durch Inkubation mit PIC wurden die mRNA Spiegel der vier untersuchten Zielgene von 3,5-fach bei IFI16, bis 66-fach, bei ISG56 (Abb. 28), erhöht. Hemmung von ZNF395 verminderte diesen Effekt auf jeweils 1,5-fach und 22-fach. IFI44 und IFIT2 zeigten durch PIC eine jeweils 30-fach erhöhte Transkription und nach Suppression von ZNF395 lediglich eine 10-fach erhöhte.

Mit diesem Experiment wurde bestätigt, dass PIC-abhängige Induktion der Gene ISG56, IFI44, IFI16 und IFIT2 in RTS3b-Zellen den zellulären Transkriptionsfaktor ZNF395 benötigt, um maximale Expression zu erreichen. ZNF395 stellt damit einen neuen Faktor dar, der eine funktionale Rolle bei der IFN-Immunantwort und der angeborenen Immunität spielt.

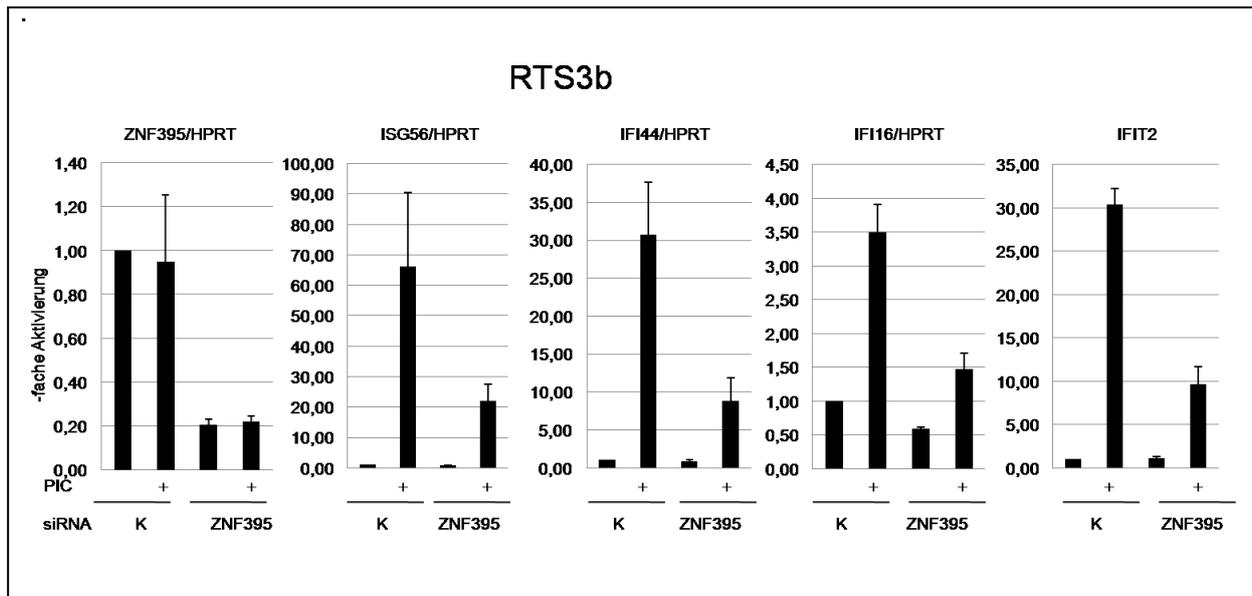


Abb. 28 ZNF395 Expression ist notwendig für die maximale Aktivierung der durch PIC-vermittelten Aktivierung von ISG56, IFI44, IFI16 und IFIT2

Transfektion von 150pmol siRNA gegen HPV8E6 (Kontrolle, K) oder ZNF395 in RTS3b. Die Zellen wurden 24h vor der Ernte mit 10ng/ml PIC im Medium inkubiert. QRT-PCR: 1µg Gesamtzelluläre RNA wurde jeweils revers transkribiert und die relativen Level der ZNF395-, ISG56-, IFI44-, IFI16- und IFIT2-mRNA wie in Abb. 26 dargestellt, berechnet. Die Balken repräsentieren die Mittelwerte aus drei unabhängigen qRT-PCRs. Die Standardabweichungen sind angegeben.

### 4.6.3 Acetylierung hemmt die IFN $\alpha$ -Stimulierbarkeit von ISG56, IFI44, IFI16 und IFIT2

Histon-Acetylierungen und -Deacetylierungen spielen eine wichtige Rolle bei der Regulation der Genexpression. HDACs sind eine Familie von Enzymen, die Acetylgruppen von Lysinen des N-terminalen Histonendes entfernen. Promotoren eukaryoter Gene liegen oft in Chromatin mit acetylierten Histonenden vor, dies führt zur Lockerung des Chromatins und begünstigt die Transkription durch die RNA Pol II (Walkinshaw und Yang 2008; Lombardi et al., 2011). Die Entfernung dieser Acetylgruppen durch HDACs korreliert in den meisten Fällen mit Repression der Genexpression. Trichostatin A (TSA) hemmt in nanomolaren Konzentrationen Klasse I und II HDACs (Marks et al., 2000). Hemmung der HDACs durch TSA führt in vielen Fällen zu erhöhter Genexpression durch konstitutive Acetylierung der Histone. Neben den Histonen können auch Transkriptionsfaktoren der Regulation durch HDACs unterliegen.

Die Expression der IFN-regulierten Gene hingegen benötigt Histon-Deacetylase (HDAC) Aktivität, und stellt damit eine Ausnahme dar. Sakamoto et al. zeigten, dass eine Hemmung der HDACs durch TSA Behandlung zu verminderter IFN-stimulierter Genexpression von ISG56 und anderen IFN-regulierten Genen führte. (Sakamoto et al., 2004). Es wurde

berichtet, dass ISGF3 HDAC-Aktivität benötigt, um die Transkription seiner Zielgene zu aktivieren (Nusinzon und Horvath 2005). Frühere Daten der Arbeitsgruppe zeigten, dass Überexpression von ZNF395 zur Repression der HPV8 Genexpression führte. Diese Repression benötigte die C-terminale DNA-Bindedomäne von ZNF395, sowie dessen Interaktion mit SAP30 (Sichtig et al., 2007). SAP30 ist eine Untereinheit des SIN3A/HDAC1/2 Komplexes. Mittlerweile konnte gezeigt werden, dass ZNF395 auch direkt mit HDAC interagiert (Sichtig et. al, unveröffentlichte Daten).

Da im Falle der IFN-induzierten Expression der IFN-regulierten Gene eine HDAC-Aktivität notwendig ist, könnte ZNF395 über die Rekrutierung des HDAC-Komplexes an die Promotoren der Gene zur Aktivierung beitragen. Um eine mögliche Rolle der Interaktion von ZNF395 mit dem SIN3A/HDAC1/2-Komplex bei der IFN $\alpha$ -induzierten Genexpression zu untersuchen, sollten Zellen mit TSA behandelt werden, was zur Reduktion der IFN-induzierten Transkription der IFN-regulierten Gene führt. Es sollte untersucht werden, ob die Reduktion bzw. die Überexpression von ZNF395 die TSA-vermittelte Hemmung beeinflusst. Dafür wurden RTS3b-Zellen mit siRNA gegen ZNF395 und Kontroll-siRNA (K), wie unter 4.3.1 beschrieben, transfiziert. 41,5h später wurden die Zellen mit 100nM TSA und 30 Minuten später mit 1000 U/ml IFN $\alpha$  im Medium für weitere 6 h inkubiert. Eine Konzentration von 100nM TSA garantiert eine effiziente Hemmung endogener HDACs. Abb. 29 zeigt, dass die mRNA Spiegel des endogenen ZNF395 nach Inkubation der Zellen mit IFN $\alpha$  um 13% und mit TSA um 36% verringert waren. Gleichzeitige Zugabe von IFN $\alpha$  und TSA führte zu 49%iger Hemmung. Während die IFN $\alpha$ -Behandlung der RTS3b-Zellen in 70-facher Induktion der ISG56 Transkription resultierte, war die IFN $\alpha$ -Induzierbarkeit durch TSA-Behandlung nahezu vollständig aufgehoben. Ebenso war die IFN $\alpha$ -abhängige Induktion von IFI44, IFI16 und IFIT2 nach TSA-Behandlung vollständig unterbunden. Die Suppression von ZNF395 führte, wie auch schon in Abb. 28 dargestellt, zu einer 3- bis 5-fach verminderten Genexpression der untersuchten Faktoren in Gegenwart von IFN $\alpha$ .

Da 100nM TSA jegliche IFN $\alpha$ -Induktion effizient unterdrückte, war auch kein Effekt mehr durch Elimination von ZNF395 zu beobachten. Eine Überexpression von ZNF395 sollte hier mehr Aufschluss geben und wurde im Folgenden untersucht.

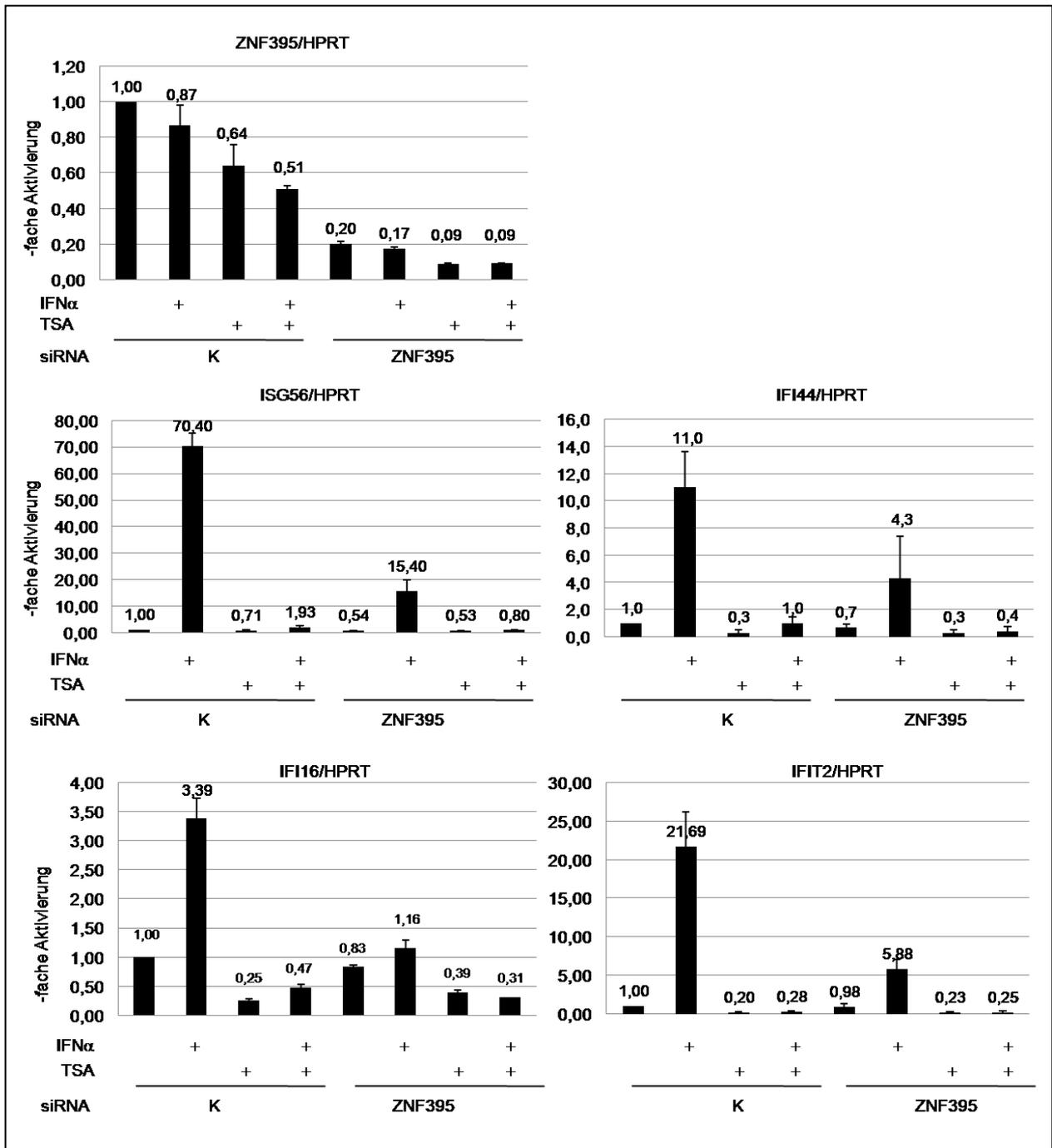


Abb. 29 Acetylierung führt zur Inhibierung der Expression von ISG56, IFI44, IFI16 und IFIT1  
 Transfektion von 150pmol siRNA gegen HPV8E6 (Kontrolle, K) oder ZNF395 in RTS3b-Zellen. Die Zellen wurden 6,5h vor der Ernte mit 100nM TSA im Medium und 6h vor der Ernte mit 1000 U/ml IFN $\alpha$  im Medium inkubiert. QRT-PCR: 1 $\mu$ g Gesamtzelluläre RNA wurde jeweils revers transkribiert und die relative Level der ZNF395-, ISG56-, IFI44-, IFI16- und IFIT2-mRNA wie in Abb. 26 dargestellt, berechnet. Die Balken repräsentieren die Mittelwerte aus drei unabhängigen qRT-PCRs. Die Standardabweichungen sind angegeben.

#### **4.6.4 Überexpression von ZNF395 resultiert in verstärkter IFN $\alpha$ -induzierter Aktivierung von ISG56, IFI44, IFI16 und IFIT2, verändert aber nicht durch TSA vermittelte Effekte**

Um eine mögliche Beteiligung von ZNF395 mit dem SIN3A/HDAC1/2-Komplex bei der IFN $\alpha$ -Induzierbarkeit der IFN-regulierten Genen zu verstehen, sollte untersucht werden, ob eine verstärkte Expression von ZNF395 eine Auswirkung auf die IFN $\alpha$ -abhängige Induktion der IFN-regulierten Genen hat. Es sollte die Frage geklärt werden, ob ZNF395 dem inhibitorischen Effekt, der durch TSA-vermittelt wird, entgegen wirken kann. Um die IFN $\alpha$ -Induzierbarkeit durch TSA nicht vollständig durch Acetylierung aufzuheben, wurden die Zellen nicht wie zuvor mit einer Konzentration von 100nM TSA behandelt, sondern mit 3nM. Das entspricht der mittleren inhibitorischen Konzentration ( $IC_{50}$ ), und beschreibt die Konzentration eines Inhibitors, bei der eine halbmaximale Inhibition beobachtet wird. Überexpression von ZNF395 sollte durch die RTS3b-TR-FLAG-ZNF395-Zelllinie, welche die Doxycyclin-abhängige Induktion der Expression von ZNF395 erlaubt, gewährleistet werden. Nach Behandlung der Zellen mit 1  $\mu$ g/ml Doxycyclin für 24h, wie unter 4.7.1. beschrieben, war die Transkription von ZNF395 11-fach erhöht (Abb. 30, oberes Diagramm). Doxycyclin-behandelte und unbehandelte Zellen wurden 6,5h vor der Ernte mit 3nM TSA und 6h vor der Ernte mit 1000 U/ml IFN $\alpha$  im Medium inkubiert. Abb. 30 zeigt deutlich, dass die 11-fache Induktion des Transkriptionsfaktors ZNF395 durch Doxycyclin weder durch TSA, noch durch IFN $\alpha$  beeinflusst wurde.

Überexpression von ZNF395 in Kombination mit IFN $\alpha$  führte zu einer 550-fachen Aktivierung des ISG56 Promotors. Durch TSA-Behandlung der Zellen wurde diese um 32% vermindert und es lag lediglich eine 372-fache Aktivierung vor. Aktivierung der ISG56 Transkription durch IFN $\alpha$  wurde ähnlich durch 3nM TSA gehemmt. Die 144-fache Induktion wurde in Anwesenheit von TSA um 35% vermindert. Allerdings hatte TSA keine Auswirkung auf die ZNF395 abhängige Aktivierung von ISG56. Sie stieg leicht von 15-fach auf 16,2-fach. Um diese Ergebnisse zu bestätigen, wurden auch andere IFN $\alpha$ -abhängigen Gene untersucht. TSA reduzierte die IFN $\alpha$ -vermittelte Induktion von IFIT2 von 70-fach auf 40-fach und von 247-fach auf 162-fach nach Überexpression von ZNF395. Die durch Überexpression von ZNF395 11,7-fach erhöhte IFIT2 Expression stieg durch TSA auf 15,4-fach an. Die Quantifizierungen der Zielgene IFI44 und IFI16 durch qRT-PCR zeigten ähnliche Ergebnisse. Dies verdeutlicht, dass die Überexpression von ZNF395 nicht zur Aufhebung des reprimierenden Effektes durch die Hemmung der HDAC-Aktivität auf die IFN $\alpha$ -vermittelte Induktion führte. TSA beeinflusste aber nicht die Aktivierung der IFN-regulierten Genen durch ZNF395 in Abwesenheit von IFN.

Die hier gezeigten Daten lassen keine Schlüsse über eine Beteiligung von ZNF395 an der Regulation der IFN $\alpha$ -abhängigen Transkription durch Acetylierung und Deacetylierung zu.

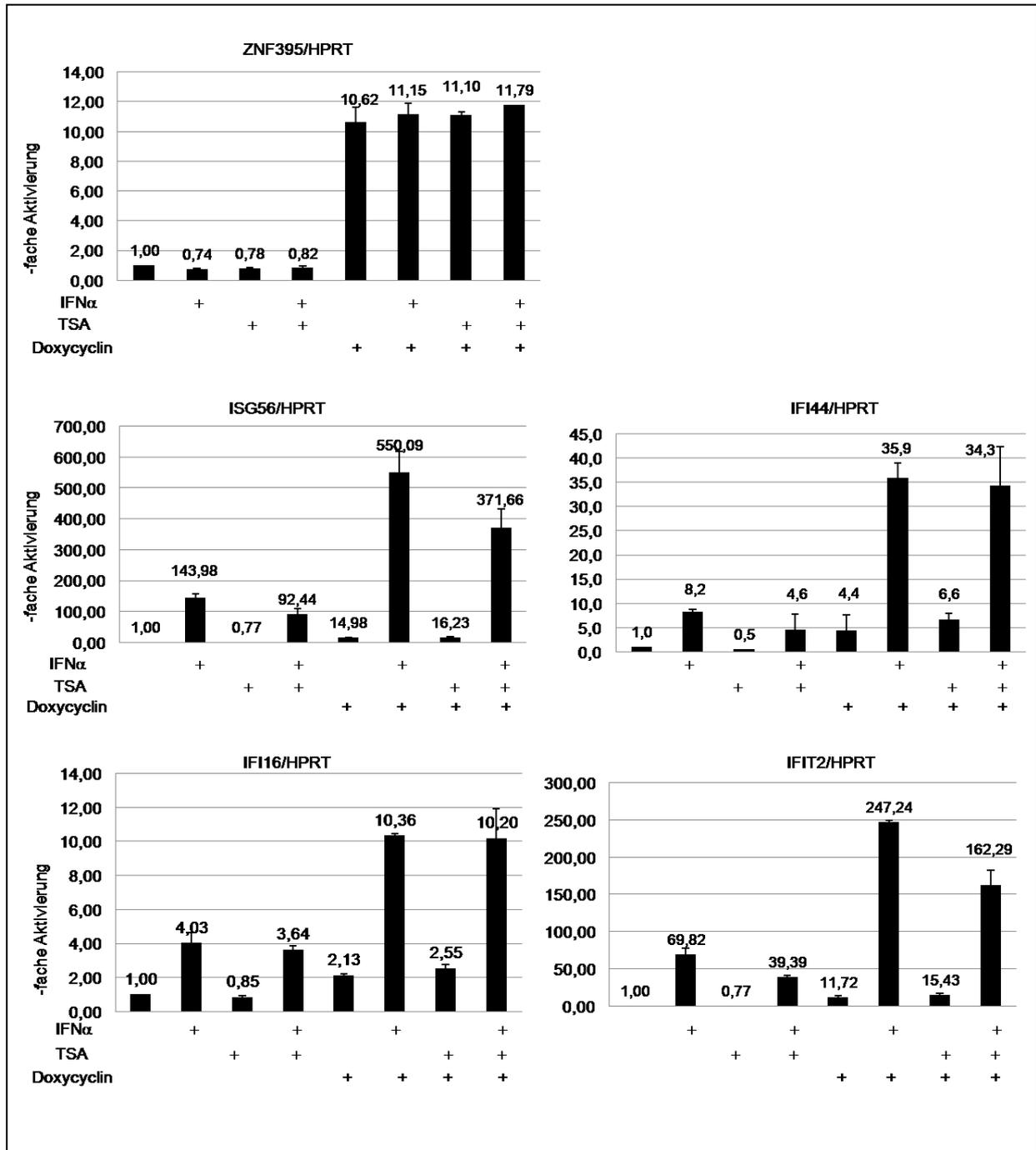


Abb. 30 IFN $\alpha$ -induzierte Expression von ISG56, IFI44, IFI16 und IFIT1 wird durch Kooperation mit ZNF395 verstärkt aber durch TSA, reprimiert

QRT-PCR: RTS3b-TR-FLAG-ZNF395-Zellen wurden in An- oder Abwesenheit von 1 $\mu$ g/ml Doxycyclin im Medium für 24h vor der Ernte inkubiert. Die Zellen wurden 6,5h vor der Ernte mit 3nM TSA im Medium und 6h vor der Ernte mit 1000 U/ml IFN $\alpha$  inkubiert. 1 $\mu$ g Gesamtzelluläre RNA wurde jeweils revers transkribiert und die relativen Level der ZNF395-, ISG56-, IFI44-, IFI16- und IFIT2-mRNA wie in Abb. 26 dargestellt, berechnet. Die Balken repräsentieren die Mittelwerte aus drei unabhängigen qRT-PCRs. Die Standardabweichungen sind angegeben.

Darüber hinaus zeigen diese Daten, dass IFN $\alpha$  die ISG56-Expression bis zu 550-fach induzieren konnte, wenn die intrazelluläre Menge an ZNF395 erhöht wurde (Abb. 30). Wie in Abb. 27 verdeutlicht, sank die IFN $\alpha$ -induzierte Aktivierung von ISG56 auf eine 50-fache Aktivierung nach Unterdrückung der Expression des endogenen ZNF395 durch siRNA. Das demonstriert, dass ZNF395 die IFN $\alpha$ -vermittelte Induktion von ISG56 um den Faktor 10 moduliert. Ähnliche Effekte waren auch für die IFN $\alpha$ -induzierte Expression von ISG54, IFI44 und IFI16 zu beobachten. Die hier beschriebenen Ergebnisse belegen, dass ZNF395 die Aktivierung der Expression dieser Gene über einen weiten Bereich moduliert und für eine effiziente Induktion der hier gezeigten Zielgene von IFN $\alpha$  notwendig ist und untermauern seine Funktion bei der antiviralen Immunantwort.

## 5 Diskussion

Im Zuge dieser Arbeit wurde die Expression des wenig erforschten ZNF395 in Gewebebiopsien unterschiedlicher Tumoren demonstriert. Die IHC-Analyse eines Tissue Arrays erlaubte dabei eine Charakterisierung verschiedener Krebstypen unter konstanten Färbe-Bedingungen mit einem gegen ZNF395 gerichteten Antikörper. Es gab Tumorbiopsien, die keine Expression von ZNF395 erkennen ließen, aber in den meisten Tumoren, auch verschiedenen Ursprungs, war ZNF395 in myeloiden Zellen des Tumorstromas detektierbar. In einigen Tumoren war ZNF395 auch in den Tumorzellen selbst nachweisbar. Auffällig war, dass ZNF395 in den Tumorstromazellen im Zytoplasma lokalisiert war, in den Tumorzellen aber im Zellkern. Eine nukleäre Lokalisation von ZNF395 in Tumorzellen wurde bereits früher beobachtet. Tsukahara et al. identifizierten ZNF395 als ein Osteosarkom-spezifisches Antigen. In 92% untersuchter Osteosarkome war ZNF395 im Zellkern lokalisiert, was mit einer schlechten Prognose für die Patienten korrelierte. Hingegen war es in nicht entarteten adulten Geweben wie Pankreas, Leber, Milz oder den Ovarien im Zytoplasma lokalisiert (Tsukahara et al., 2004).

Diese Ergebnisse lassen den Schluss zu, dass die subzelluläre Lokalisation von ZNF395 eine wichtige Rolle bei seiner Funktion spielen könnte. ZNF395 wurde bereits als Protein identifiziert, das zwischen Nukleus und Zytoplasma wechseln kann (Tanaka et al., 2004; Sichtig et al., 2007). Die Mutation der NES resultierte in rein nukleärem ZNF395. Während überexprimiertes ZNF395 zum größten Teil zytoplasmatisch vorlag, führte der Entzug von Wachstumsfaktoren zu einer nukleären Lokalisation von ZNF395. Es zeigte sich, dass die AKT-Kinase und eine weitere, durch den PI3K-Signalweg aktivierte Kinase ZNF395 an zwei Stellen phosphoryliert, was dessen Interaktion mit 14-3-3- $\beta$  erlaubt. Diese trägt zur Retention von ZNF395 im Zytoplasma bei. Durch den Entzug von Wachstumsfaktoren wird der PI3K-Signalweg nicht mehr stimuliert und die Interaktion von ZNF395 mit 14-3-3- $\beta$  geht verloren (Sichtig et al., 2007). Welche anderen Signalwege die nukleäre Translokation von ZNF395 kontrollieren ist unklar.

Laut den Vorarbeiten in der Arbeitsgruppe und den hier gezeigten Daten könnte nukleäres ZNF395 neben den IFN-regulierten Genen auch Gene, die im Zusammenhang mit Krebs stehen (Jordanovski, Dissertation, 2012) aktivieren und so zur Tumorprogression beitragen. Diese beinhalten CALCOCO, MEF2C, PEG10 und MACC1, die als Transkriptionsfaktoren und Ko-Aktivatoren mit Tumorprogression und Metastasierung in Zusammenhang stehen (Yang et al., 2006; Stein et al., 2009; Tsuji et al., 2010; Homminga et al., 2011). Die Charakterisierung der subzellulären Lokalisation von ZNF395 im Zuge der Karzinogenese lässt noch viele Fragen offen, scheint aber von funktionaler Bedeutung zu sein.

ZNF395 war in einem Teil der in das Tumorstroma infiltrierenden CD79a<sup>+</sup> B-Zellen und in nahezu 100% der CD14<sup>+</sup> Monozyten exprimiert. Das Oberflächenprotein CD14 ist ein Marker von Monozyten, der in geringem Maße auch auf den aus Monozyten differenzierenden Zellen wie Makrophagen, dendritischen Zellen oder spezialisierten Monozyten exprimiert ist. Die Mengen von ZNF395 in CD68<sup>+</sup> und CD163<sup>+</sup> Makrophagen waren im Vergleich zu den Monozyten stark reduziert, was daraufhin weist, dass die Expression im Laufe der Makrophagen-Reifung verringert wird. Unterstützt wird dieses Ergebnis durch Western Blot und qRT-PCR Analysen mit der U937-Zelllinie, die als *in vitro* Modell der Monozyten-Differenzierung gilt. Im Zuge der PMA-induzierten Reifung zu Makrophagen sanken die ZNF395-Spiegel auf RNA und Protein-Ebene. Die Beobachtung wird durch eine Publikation unterstützt. Mikroarray Analysen zur Charakterisierung der post-transkriptionalen Effekte PMA-behandelter U937-Monozyten im Vergleich zu unbehandelten Zellen identifizierten ZNF395 als eines von 105 Genen, dessen zytoplasmatische und polysomale RNA durch die PMA-induzierte Reifung reduziert vorlagen. Die polysomal-assoziierte ZNF395-RNA-Menge, d.h. die von Ribosomen gebundene RNA, war dabei verstärkt reduziert. Das bedeutet, dass neben verringerter Transkription auch post-transkriptionelle Mechanismen die ZNF395 RNA-Menge im Laufe dieser Differenzierung negativ regulieren könnten (Kitamura et al., 2004). Dies könnte auch die Beobachtung erklären, dass die ZNF395 Protein Menge in PMA-behandelten Zellen deutlich verringert war, während die RNA-Menge nur relativ schwach abnahm.

Ein 2011 veröffentlichtes Genexpressionsprofil, das klassische CD14<sup>++</sup>/CD16<sup>-</sup>, intermediäre CD14<sup>++</sup>/CD16<sup>+</sup> und nicht-klassische CD14<sup>+</sup>/CD16<sup>++</sup> periphere Blutmonozyten miteinander verglich, fand, dass neben CD14 auch ZNF395 zu den 50 Genen gehörte, deren Expression am meisten variierte. Verglichen mit dem intermediären Typ, dessen Expressions-Spiegel als 1 gesetzt wurden, war ZNF395-Expression in klassischen Monozyten um das 4,11-fache erhöht, wohingegen in nicht-klassischen Monozyten die Expression um das 1,57-fache reduziert war (Wong et al., 2011). Die nicht-klassischen Monozyten machen zusammen mit den intermediären Monozyten ca. 10-20% der Monozyten-Population im Blut gesunder Menschen aus. Die nicht-klassischen Monozyten sind charakteristisch für die Initialisierung einer anti-inflammatorischen Immunreaktion, die von Revaskularisierung gekennzeichnet ist (Weber et al., 2000; Ancuta et al., 2009; Liaskou et al., 2012). Die klassischen pro-inflammatorischen CD14<sup>++</sup>/CD16<sup>-</sup> Monozyten stellen 80-90% der Monozyten gesunder Menschen dar. Dies weist auf eine generelle Funktion von ZNF395 in klassischen, pro-inflammatorischen CD14<sup>++</sup>/CD16<sup>-</sup> Zellen hin.

Durch die starken, zytoplasmatischen ZNF395-spezifischen Signale könnten geringe Mengen des nukleären ZNF395 nicht sichtbar sein. Alternativ könnte ZNF395 auch im

Zytoplasma eine wichtige Funktion in den pro-inflammatorischen Monozyten erfüllen. Unabhängige Funktionen von Proteinen im Zellkern und im Zytoplasma kommen nicht selten vor. STAT3 zum Beispiel ist ein Faktor, der durch Zytokine und Wachstumsfaktoren über Signalkaskaden aktiviert wird, in den Zellkern transloziert und dort als Transkriptionsfaktor die Onkogenese fördert. Unabhängig davon trägt zytoplasmatisches STAT3 jedoch auch zur Regulation der Elektronentransportkette in Mitochondrien bei und vermittelt auch RAS-induzierte Transformation von Maus-Fibroblasten (Zhou und Too 2011; Zhang et al., 2013). Ferner lässt sich eine Funktion von ZNF395 in den gereiften CD68<sup>+</sup> Makrophagen nicht ausschließen. Die reduzierten Proteinmengen könnten auf die zunehmende Aktivität von IKK im Rahmen der Makrophagen-Reifung oder anderen Signalwegen zurückzuführen sein, die den „Turn over“ von ZNF395 erhöhen, es aber auch gleichzeitig als Transkriptionsfaktor aktivieren.

CD14<sup>+</sup> Tumorstroma-Zellen, die sogenannten TEMs (Tumor-associated TIE-2–expressing monocytes) wurden kürzlich identifiziert und charakterisiert. Hierbei handelt es sich um tumorinfiltrierende Monozyten, die über die Suppression der tumorspezifischen T-Zell Aktivierung die Tumorprogression fördern und mit schlechter Prognose für den Patienten einhergehen (Kuang et al., 2009). Diese Monozyten exprimieren hohe Mengen des Angiopoietin-Rezeptors TIE-2 und des VEGF-Rezeptors, die nach Bindung der Liganden wie VEGF, Signalkaskaden zur Tumor-Vaskularisierung einleiten und deshalb als immunsuppressiv gelten (Ibberson et al., 2013; Ji et al., 2013; Patel et al., 2013). Es könnte sich bei den ZNF395-positiven CD14<sup>+</sup> Tumorstromazellen auch um diese TEMs handeln, was durch den Nachweis der Koexpression geeigneter Marker untersucht werden muss. Eine erhöhte Expression von ZNF395 kann zum jetzigen Zeitpunkt lediglich auf klassische CD14<sup>+</sup> Monozyten, die im Tumorstroma eingewandert sind, beschränkt werden. Die genaue Charakterisierung dieser Zellen und eine mögliche Assoziation mit dem Tumorverlauf sind notwendig, um eine Rolle von ZNF395 im Tumor zu charakterisieren.

Reporteranalysen offenbarten, dass C/EBP $\beta$  und HIF1 $\alpha$ , die beide eine entscheidende Rolle in Monozyten und Makrophagen spielen, die Expression von ZNF395 aktivieren.

Eine bis zu 20-fache Aktivierung des ZNF395 Promotors konnte nach Überexpression von C/EBP $\beta$  in der Keratinozyten-Zelllinie RTS3b beobachtet werden. Die Aktivierung durch C/EBP $\alpha$  war im Gegensatz dazu sehr gering. Eine Beteiligung des Transkriptionsfaktors C/EBP $\beta$  an der basalen Transkription von ZNF395 konnte in Glioblastom-Zellen unterstützend gezeigt werden. Nach Suppression von C/EBP $\beta$  sanken hier die ZNF395-mRNA-Spiegel um 32%. In Monozyten ist C/EBP $\beta$  als Aktivator der Transkription beschrieben, der eine essenzielle Rolle bei der Kontrolle der Monozyten-spezifischen

Genexpression spielt und die Differenzierung einleiten kann (Huber et al., 2012). Im Verlauf der Differenzierung zu Makrophagen nimmt die Menge an transkriptional aktivem C/EBP $\beta$  zu. Dies steht im scheinbaren Widerspruch mit den in dieser Arbeit gezeigten Resultaten, dass die ZNF395-Menge im Zuge der Differenzierung von Monozyten zu Makrophagen abnimmt. Die hier erzielten Daten implizieren jedoch auch, dass nur die lange LAP\*-Isoform des Transkriptionsfaktors die Expression von ZNF395 induziert, was eine mögliche Erklärung darstellt. Western Blot Analysen bestätigten dabei, dass die Expressionsvektoren der beiden langen Aktivator-Isoformen LAP\* und LAP zu äquivalenten Proteinmengen führten. Durch Verwendung des Expressionvektors der LAP überexprimierte, konnte gezeigt werden, dass der CCL20-Promotor in einem Reporterkonstrukt auch durch diese Isoform aktiviert werden konnte. Den ZNF395 Promotor konnte jedoch nur die LAP\* aktivieren.

Eine spezifische Rolle bei der myeloiden Regulation wurde für die Isoform LAP\* beschrieben, da nur diese die Myeloid-spezifischen Gene 126 und 462 und das „Myb induced myeloid protein-1“ (Mim-1) aktiviert. LAP\* kodiert innerhalb der 24 zusätzlichen N-terminalen AS eine spezifische CR1, die den „Chromatin remodeling“ Komplex SWI/SNF und einen Mediator-Komplex rekrutieren, was für die Kontrolle der myeloid-spezifischen Genexpression im Chromatin notwendig ist (Kowenz-Leutz und Leutz 1999). Es wurde gezeigt, dass in Anwesenheit von aktivem RAS LAP\* über CR1 den Mediator Komplex CRSP70 rekrutiert und als Aktivator agiert, in Abwesenheit von RAS rekrutiert LAP\* jedoch einen CDK8-enthaltenden Komplex und agiert dann als Repressor (Mo et al., 2004; Tsutsui et al., 2013). Dies belegt, dass LAP\* in Abhängigkeit der zellulären Signalkaskade als Aktivator oder als Repressor fungieren kann. Es könnte somit sein, dass in transienten Transfektionen von Reportergenkonstrukten, die nicht komplett in Chromatin organisiert sind, C/EBP $\beta$  in den immortalisierten Keratinozyten-Zelllinien als Aktivator des ZNF395 Promotors fungiert. In reifenden Monozyten oder im Verlauf der myeloiden Differenzierung hingegen könnte C/EBP $\beta$  über spezifisch aktivierte Signalwege und Interaktion mit anderen Ko-Faktoren zum Repressor von ZNF395 werden.

Darüber hinaus ist nicht auszuschließen, dass die reduzierte Expression von ZNF395 in U937 in Folge der PMA-induzierten Differenzierung auch durch Regulation anderer PMA-induzierter Transkriptionsfaktoren erfolgt. PMA-Behandlung von Monozyten führt auch zur Aktivierung von NF- $\kappa$ B (Hida et al., 2000). Chip on Chip Experimente fanden ZNF395 unter den Genen, in deren Promotorbereich das NF- $\kappa$ B-Dimer p50/p52, welches Repression der Transkription vermittelt, gebunden vorlag (Schreiber et al., 2006). Ferner führte die Behandlung von Zellen mit BMS-345541, das IKK inhibiert, zu einer Erhöhung der Luziferase-Aktivität nach transienter Transfektion des ZNF395 Reporter-Konstrukts, was darauf hinweist, dass ZNF395 durch NF- $\kappa$ B reprimiert wird (Daten nicht gezeigt). Auch wurde

eine zunehmende Aktivierung des IKK-Komplexes während der Monozyten-Differenzierung (Li et al., 2010) und für die PMA-induzierte Differenzierung von U937-Monozyten beschrieben (Guha und Mackman 2001). Da IKK $\alpha$  und  $\beta$  die proteasomale Degradation von ZNF395 induzierten, wie in Kapitel 3.5 gezeigt werden konnte, könnten verminderte ZNF395-Proteinlevel zusätzlich durch eine erhöhte Aktivität von IKK im Verlauf der Differenzierung erklärt werden.

Entsprechend den hier vorgestellten Daten könnte ZNF395 als Faktor dessen Expression durch C/EBP $\beta$  aktiviert wird, in Monozyten bei der Einleitung der Differenzierung eine Rolle spielen.

Die Expression von C/EBP $\beta$  ist aber auch in Glioblastomen von großer Relevanz. Dort wurde der Faktor als ein Masterregulator der nekrotisierenden Tumormikroumgebung charakterisiert, dessen Expression erhöht vorlag und mit schlechter Prognose für den Patienten korrelierte (Cooper et al., 2012). Eine Beteiligung von ZNF395 in Glioblastomen wurde bereits durch die Studie von Murat et al. offensichtlich. ZNF395 wurde in dieser Krebsart überexprimiert gefunden, hier jedoch im Rahmen einer Antwort auf Hypoxie (Murat et al., 2009). Neben C/EBP $\beta$  war auch die Expression von ZNF395 und HIF1 $\alpha$  in den oben beschriebenen nekrotisierenden Glioblastomen erhöht (Cooper et al., 2012).

Es konnte hier gezeigt werden, dass C/EBP $\beta$  nicht an der Hypoxie-Induzierbarkeit von ZNF395 durch HIF1 $\alpha$  beteiligt ist. Nach spezifischem Knockdown von C/EBP $\beta$  wurde ZNF395 in U87MG-Zellen gleichermaßen durch Hypoxie induziert, wie unter normalen C/EBP $\beta$  Mengen.

In der Glioblastoma-Zelllinie U87MG wurde bereits mittels qRT-PCR eine 9-fache Erhöhung der mRNA-Spiegel für ZNF395 nach Hypoxie beschrieben. Eine vergleichende Quantifizierung der ZNF395-mRNA in den fünf Zelllinien RTS3b, C33a, U87MG, 293 und U937 offenbarte variierende endogene ZNF395-Spiegel unter normoxischen Konditionen von 21% O<sub>2</sub>. Die höchste Hypoxie-Induktion war dabei in den Glioblastom-Zellen U87MG zu sehen, die niedrigste in U937. Trotz der geringen Induktion durch Hypoxie besaßen U937-Zellen aber immer noch höhere Mengen an ZNF395-Transkripten als U87MG-Zellen nach Hypoxie. Die Relevanz von HIF1 $\alpha$  für die Hypoxie-Induktion konnte durch siRNA Knockdown in U87MG-Zellen untermauert werden. Western Blot Analysen offenbarten, dass die Induktion von ZNF395 nicht direkt mit der Menge an HIF1 $\alpha$  korrelierte. Die Menge an HIF1 $\alpha$  in U87MG-Zellen war sehr gering. In diesen Zellen ergab sich aber sowohl in PCR als auch in Western Blot Analysen die höchste Aktivierung von ZNF395. Dies bedeutet, dass die Expression von ZNF395 unter Hypoxie auch von anderen Faktoren abhängen muss.

Promotoranalysen zeigten nach Überexpression von HIF1 $\alpha$  eine 2,2-fache Aktivierung des ZNF395 Promotors in RTS3b-Zellen, offenbarten jedoch eine kooperative bis zu 40-fache Aktivierung des ZNF395 Promotors durch Überexpression der Transkriptionsfaktoren HIF1 $\alpha$  und C/EBP $\beta$ . Es gab zwar mehrfach Hinweise in der Literatur, dass C/EBP $\alpha$  in myeloiden Zellen mit HIF1 $\alpha$  kooperieren kann (Janardhan 2008; Song et al., 2008; Zhao et al., 2011), allerdings wurde eine derartige Kooperation zwischen HIF1 $\alpha$  und C/EBP $\beta$  bisher nicht beschrieben.

Ein Computer basierter Motivscan mit der Software „MatInspector Genomatix“ errechnete zwar in dem hier analysierten 4kbp großen 5`regulatorischen Bereich zwei Konsensussequenzen für HIF1 $\alpha$  und zwei für C/EBP $\beta$ , jedoch war es nicht möglich, die kooperierenden Effekte näher zu charakterisieren. Ein CHIP-Assay fand weder Hinweise auf eine Bindung von HIF1 $\alpha$  noch von C/EBP $\beta$  an diese Segmente (Daten nicht gezeigt). Auch führten Mutationen dieser errechneten Sequenz nicht zum Verlust der Luziferase-Aktivität nach Überexpression von HIF1 $\alpha$  und C/EBP $\beta$  (Daten nicht gezeigt). Eine direkte Proteinbindung von HIF1 $\alpha$  und C/EBP $\beta$  über Immunpräzipitations-Experimente konnte ebenfalls nicht nachgewiesen werden (Daten nicht gezeigt). Die Kern-Konsensussequenz von C/EBP gilt als variabel und wird gemeinhin mit RTTGC-GYAAAY (R = A oder G und Y = C oder T) beschrieben. Sie hängt überdies von variablen zusätzlichen sechs Nukleotiden im 5`und 3`Bereich ab und auch von der Bildung eines Heterodimers von C/EBP mit anderen Transkriptionsfaktoren wie z.B. CREB/ATF (Tsukada et al., 2011). Die Motive im ZNF395 Promotor wurden als: GTTGCAAT und TTTGTAAAT errechnet, scheinen jedoch weder für die Aktivierung, noch für die Kooperation mit HIF1 $\alpha$  verantwortlich zu sein. Auch die HRE liegen scheinbar nicht in dem klonierten Promotorfragment. Unterstützt wird dies durch eine vor kurzem erschienene Publikation. Ein Chip on CHIP Assay zur Bestimmung der Zielgene von HIF1 $\alpha$  und HIF2 $\alpha$  offenbarte HIF1 $\alpha$ - und HIF2 $\alpha$ -Bindung an zwei Sequenzen, deren nächstes Gen ZNF395 ist und die sich im Genom 81kbp, bzw. 38kbp vor dem Startcodon von ZNF395 befinden. Ferner belegten Schodel et.al, dass lediglich jedes fünfte Zielgen von HIF1 $\alpha$  auch die Konsensussequenz 5`-(A/G)CGTG-3` aufweist (Schodel et al., 2011). Somit sind wahrscheinlich diese weit vom Gen entfernten HREs für die Hypoxie-Induktion von ZNF395 verantwortlich. Die Mechanismen der Kooperation zwischen HIF1 $\alpha$  und C/EBP $\beta$  bei der Aktivierung der Expression von ZNF395 bleiben somit unklar.

Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit bestätigten, dass ZNF395 ein neues Zielprotein des IKK-Signalwegs ist (Jordanovski et al., 2013), basierend auf der Beobachtung, dass siRNA-vermittelte Unterdrückung beider Kinasen die Stabilität von endogenem ZNF395 erhöhte. Der Verlust von IKK $\alpha$  sowie IKK $\beta$  führte Dosis-abhängig zur Stabilisierung von ZNF395, wie

mit Western Blot Analysen demonstriert wurde. Zusammen mit der Beobachtung, dass die Überexpression von inaktiven Mutanten für beide Kinasen die ZNF395-vermittelte Aktivierung des ISG56 Promotors hemmte, zeigt dies, dass die Aktivität beider katalytischen Untereinheiten des IKK-Komplexes, IKK $\alpha$  und IKK $\beta$ , notwendig ist, um die Aktivierung und Stabilität von ZNF395 zu kontrollieren. Es ist mehrfach beschrieben, dass der kanonische NF- $\kappa$ B-Signalweg einzig durch IKK $\beta$  reguliert wird (Mercurio et al., 1997; Hayden und Ghosh 2008; Hayden und Ghosh 2011; Napetschnig und Wu 2013). Das könnte bedeuten, dass Modifikation von ZNF395 nicht nur eine Aktivierung des kanonischen Signalwegs über Zytokine wie LPS und TNF $\alpha$  oder über Stimulierung des TLR3 während der antiviralen Immunreaktion benötigt, sondern den aktiven IKK $\alpha$ -regulierten nicht-kanonischen Signalweg braucht. Ähnliches konnte z.B. für  $\beta$ -Catenin gezeigt werden. Sowohl IKK $\alpha$  als auch IKK $\beta$  tragen zur Phosphorylierung des transkriptionalen Ko-Aktivators bei. In Abhängigkeit verschiedener Stimuli führt hier die Phosphorylierung durch IKK $\alpha$  zur erhöhten Aktivität des Faktors, durch IKK $\beta$  jedoch zur verminderten (Chariot 2009).

Im Fall von ZNF395 vermitteln beide Kinasen die Aktivierung, wie durch Überexpression von inaktiven Mutanten bestätigt werden konnte.

Die IKK-induzierte Phosphorylierung von ZNF395 erfolgt auch nach dessen Hypoxie-Induktion. Wie durch  $\lambda$ -Phosphatase-Assays charakterisiert werden konnte, lag Hypoxie-induziertes ZNF395 in phosphorylierter Form vor. Die enzymatisch dephosphorylierte Bande lief auf derselben Höhe wie eine Bande, die ZNF395 entsprach, das nach IKK-Hemmung durch BMS-345541 stabilisiert vorlag. Unterstützend konnte gezeigt werden, dass auch unter hypoxischen Bedingungen der IKK-Signalweg an der Degradation von ZNF395 beteiligt ist. Doxycyclin-induziertes rekombinantes ZNF395 wurde über Aktivierung des Signalwegs mit TNF $\alpha$  zu einem gewissen Grad degradiert. Dies verdeutlicht, dass Hypoxie und der IKK-Signalweg über zwei verschiedene Mechanismen auf die Aktivität von ZNF395 einwirken und sich gegenseitig nicht hemmen. Die erhöhten Mengen von ZNF395 unter Hypoxie sind auf eine verstärkte Promotor-Aktivierung durch HIF1 $\alpha$  zurückzuführen, und nicht darauf, dass IKK unter Hypoxie möglicherweise verminderte Kinaseaktivität auf das Protein hat. Entsprechend den hier gezeigten Daten, wird somit die Aktivierung von ZNF395 als Transkriptionsfaktor durch den IKK-Signalweg auch unter Hypoxie gewährleistet.

Hypoxie und IKK, Signalwege, die sich auch wechselseitig aktivieren (Walmsley et al., 2005; Belaiba et al., 2007; Rius et al., 2008), spielen eine zentrale Rolle bei Entzündungsreaktionen und Tumorprogression und aktivieren im Zuge der angeborenen Immunantwort ihre Zielgene und Proteine (Lal et al., 2001; Pouyssegur et al., 2006; Lisy und Peet 2008; Rius et al., 2008; Hayden und Ghosh 2011).

Die hier gezeigten Daten belegen, dass beide Signalwege zu erhöhten Mengen an transkriptional aktivem ZNF395 führen und legen eine Beteiligung von ZNF395 in Entzündung und Krebs nahe.

ZNF395 konnte in dieser Arbeit als ein neuer Faktor der IFN-regulierten Immunantwort gezeigt werden, dessen An- bzw. Abwesenheit die IFN-Stimulierbarkeit um ein 10-faches modulieren kann. IFN-Stimulierung führte in RTS3b-Zellen zu einer ca. 200-fach erhöhten Transkription von ISG56, die nach Knockdown von ZNF395 lediglich 50-fach ist, nach Überexpression durch Doxycyclin-induziertes ZNF395 jedoch auf eine über 500-fache Aktivierung gesteigert werden konnte. In U87MG-Zellen hatte der Knockdown von ZNF395 einen nicht so starken Einfluss auf die Aktivierung IFN-regulierter Gene, doch sichtbar war er auch. Unterstützend konnte in Keratinozyten gezeigt werden, dass ZNF395 ebenso für die maximale PIC-induzierte Aktivierung der untersuchten IFN-regulierten Gene notwendig war, womit eine virale Infektion simuliert wurde.

Spezifischer Knockdown von ZNF395 reduzierte auch die endogenen RNA-Mengen von ISG56, IFI44, IFI16 und IFIT2 um 10-50% in RTS3b-Keratinozyten, sowie in U87MG-Glioblastom-Zellen, wie qRT-PCR zeigte. Es ist bekannt, dass die Aktivierung IFN-regulierter Gene die Aktivität von HDACs benötigt. Werden die HDACs inhibiert, ist die Transkription dieser Gene vermindert oder gehemmt. Genaue Mechanismen sind dabei jedoch nicht geklärt (Sakamoto et al., 2004; Nusinzon und Horvath 2005). Eine Hemmung der HDACs und daraus resultierende Repression der hier untersuchten IFN-regulierten Gene war durch ZNF395 nicht beeinflusst oder aufgehoben. Auch eine verminderte Hemmung durch TSA-Konzentrationen die den  $IC_{50}$ -Werten des Inhibitors entsprechen, konnten durch ZNF395 nicht aufgehoben werden, so dass die Rolle, die ZNF395 bei der IFN-regulierten Genexpression spielt, hier nicht geklärt werden konnte.

Im Rahmen einer früheren Diplomarbeit wurde klar, dass ZNF395 für die Aktivierung des ISG56-Promotors die beiden ISREs braucht. Deletionen beider ISREs, die auch für die Aktivierung durch ISGF3 im Zuge der antiviralen  $IFN\alpha$ -gesteuerten Immunantwort notwendig sind, hoben die ZNF395-vermittelte Aktivierung auf (Pawlowski, 2011; Jordanovski, Dissertation, 2012). Eine direkte Bindung von ZNF395 an die ISREs im ISG56-Promotor konnte über „Gel-shift“ gezeigt werden. Aufgereinigtes Histidin-ZNF395 veränderte das Laufverhalten radioaktiv-markierter Oligonukleotide, die beide ISREs beinhalten, was auf eine Proteinbindung zurückzuführen ist (Jordanovski et al., 2013). Ferner benötigte ZNF395 seine CR3-DNA-Bindedomäne um die Aktivierung des ISG56-Promotors zu gewährleisten (Jordanovski et al., 2013). Diese Daten lassen darauf schließen, dass ZNF395 über seine Bindung an die ISREs agiert. ISREs befinden sich in den Promotorbereichen IFN-regulierter Gene, ISG56, IFI44, IFI16 und IFIT2 eingeschlossen (Darnell et al., 1994).

Als zelluläre Komponente des Immunsystems spielen Immunzellen mit ihren diversen PRRs wie dem TLR3 auch eine wichtige Rolle bei der antiviralen Immunantwort (Meylan et al., 2006). Aufgrund der schlechten Transfektionseffizienz konnte ein Effekt von reduziertem ZNF395 bei der Aktivierung IFN-regulierter Gene in Monozyten hier nicht gezeigt werden. Es wurde zwar eine starke zytoplasmatische Expression des Proteins in Monozyten und auch in B-Zellen gefunden, aber die hier beschriebenen Daten belegen eine Rolle von ZNF395 bei der Regulation der Transkription als nukleärer Transkriptionsfaktor. Die Beteiligung von ZNF395 im IFN-Signalweg in diesen Zellen kann von ebenso hoher Relevanz sein.

Typ-1-IFNs können im Zuge der Immunantwort auch über weitere TLRs aktiviert werden. So erkennt der TLR7 z.B. einzelsträngige RNA, wie sie bei viraler Infektion auftreten kann. In diesem dadurch induzierten Signalweg konnte gezeigt werden, dass speziell IKK $\alpha$  für die Aktivierung von IRF3 und IRF7 nötig ist, um IFN $\alpha$  Genexpression zu aktivieren (Wang et al., 2008). Dies verdeutlicht noch einmal, dass der kanonische und der nicht kanonische Signalweg parallel induziert werden können und beide eine Rolle bei der Aktivierung von ZNF395 spielen könnten, wodurch ZNF395 seine Zielgene im Zuge einer antiviralen Immunreaktion aktiviert.

Die Relevanz von ZNF395 bei der IFN-induzierten Aktivierung der vier untersuchten Gene konnte hier eindrücklich gezeigt werden. Die Menge an aktivem ZNF395 scheint demnach ausschlaggebend für eine effiziente Induktion dieser vier antiviralen Gene, die hier in dieser Arbeit untersucht wurden. Allerdings ist nicht auszuschließen, dass ZNF395 neben diesen 4 Genen auch für die IFN-induzierte Expression anderer Gene generell von Bedeutung ist, da es an die ISREs bindet, die sich mit ein oder mehreren Kopien in den Promotoren der IFN-regulierten Gene befindet. Mittels Mikroarray Analysen mit IFN-behandelten Zellen, in denen ZNF395 zum einen überexprimiert und zum anderen supprimiert wird, könnte man die Frage klären, ob die IFN-Antwort im Allgemeinen verändert ist oder nur spezifische Gene.

ZNF395 wurde als „Papillomavirus Binding Factor“ über seine Fähigkeit an regulatorische Sequenzen des HPV8 zu binden, identifiziert. Neben der Repression der HPV8-Transkription kann ZNF395 durch Erkenntnisse aus genomweiten Expressionsanalysen mit antiviralen Eigenschaften in Verbindung gebracht werden. In Folge einer viralen Infektion reagiert das Immunsystem mit einer starken Erhöhung der CD8-positiven zytotoxischen T-Zellen (CD8+T-Zellen). Es konnte gezeigt werden, dass die Menge an ZNF395-mRNA in CD8+T-Zellen nach Infektion mit dem humanen Cytomegalovirus (HCMV), im Vergleich zu der Menge an ZNF395-mRNA in CD8+T-Zellen nicht infizierter Personen stark reduziert war (Hertoghs et al., 2010). Zudem war die Menge an ZNF395-mRNA in CD8+T-Zellen von virämischen HIV-Patienten, verglichen mit der Menge in CD8+T-Zellen uninfizierter Personen oder HIV-infizierter Langzeitüberlebender, die nicht in medikamentöser Behandlung sind, reduziert

(Hycza et al., 2007; Wu et al., 2008). Dies könnte bedeuten, dass ZNF395-mRNA-Spiegel reduziert sein müssen, damit virale Replikation effizient erfolgen kann, erhöhte Spiegel hingegen antivirale Effekte haben, wahrscheinlich über die Aktivierung IFN-regulierter Gene. Die in dieser Arbeit gezeigten Daten belegen, dass ZNF395 ein neuer Hypoxie-induzierbarer Faktor ist, dessen Aktivität und Stabilität durch IKK reguliert ist. ZNF395 könnte über die Aktivierung der im Microarray gefundenen Krebs-assoziierten Zielgene auch protumorigen wirken. Dies korreliert mit dem wiederholt gefundenen Nachweis, dass ZNF395-Expression in Krebsgeweben und unter Hypoxie erhöht ist und mit schlechter Prognose für den Patienten einhergeht. Ferner konnte seine Expression in Immunzellen und in Folge der Hypoxie als erhöht gezeigt werden, was eine generelle Funktion von ZNF395 in diesen Zellen untermauert. Im Rahmen der angeborenen Immunantwort aktiviert der Transkriptionsfaktor Zielgene, die zur Etablierung eines antiviralen Status beitragen. Die hier gefundenen Ergebnisse belegen eindeutig, dass ZNF395 ein Modulator der  $\text{INF}\alpha$ -induzierten Immunantwort ist und somit eine essenzielle Rolle bei der Antwort auf Virusinfektion spielt.

## 6 Literaturverzeichnis

### 6.1 Dissertationen

Hadaschick, Dissertation (2002) „Das Papillomvirus E2-Protein: Lokalisation und Modulation der zellulären Transkription“

Jordanovski, Dissertation (2012) „Posttranslationale Kontrolle des zellulären Transkriptionsfaktors PBF/ZNF395“

### 6.2 Bücher

C O'Farrelly, DG Doherty (2007). "Liver Immunology: Principles and Practice" Springer

### 6.3 Fachjournale

Akira, S., S. Uematsu, et al. (2006). "Pathogen recognition and innate immunity." Cell **124**(4): 783-801.

Ancuta, P., K. Y. Liu, et al. (2009). "Transcriptional profiling reveals developmental relationship and distinct biological functions of CD16+ and CD16- monocyte subsets." BMC Genomics **10**: 403.

Au-Yeung, N., R. Mandhana, et al. (2013). "Transcriptional regulation by STAT1 and STAT2 in the interferon JAK-STAT pathway." JAKSTAT **2**(3): e23931.

Auersperg, N. (1969). "Histogenetic behavior of tumors. I. Morphologic variation in vitro and in vivo of two related human carcinoma cell lines." J Natl Cancer Inst **43**(1): 151-173.

Baxter, F. O., P. J. Came, et al. (2006). "IKKbeta/2 induces TWEAK and apoptosis in mammary epithelial cells." Development **133**(17): 3485-3494.

Beckman, G., L. Beckman, et al. (1971). "G-6-PD and PGM phenotypes of 16 continuous human tumor cell lines. Evidence against cross-contamination and contamination by HeLa cells." Hum Hered **21**(3): 238-241.

Belaiba, R. S., S. Bonello, et al. (2007). "Hypoxia up-regulates hypoxia-inducible factor-1alpha transcription by involving phosphatidylinositol 3-kinase and nuclear factor kappaB in pulmonary artery smooth muscle cells." Mol Biol Cell **18**(12): 4691-4697.

- Birnboim, H. C. and J. Doly (1979). "A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA." Nucleic Acids Res **7**(6): 1513-1523.
- Boeckle, S., H. Pfister, et al. (2002). "A new cellular factor recognizes E2 binding sites of papillomaviruses which mediate transcriptional repression by E2." Virology **293**(1): 103-117.
- Bonizzi, G., M. Bebien, et al. (2004). "Activation of IKKalpha target genes depends on recognition of specific kappaB binding sites by RelB:p52 dimers." EMBO J **23**(21): 4202-4210.
- 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.
- Bremnes, R. M., T. Donnem, et al. (2011). "The role of tumor stroma in cancer progression and prognosis: emphasis on carcinoma-associated fibroblasts and non-small cell lung cancer." J Thorac Oncol **6**(1): 209-217.
- Carotta, S., L. Wu, et al. (2010). "Surprising new roles for PU.1 in the adaptive immune response." Immunol Rev **238**(1): 63-75.
- Castagna, A., R. Polati, et al. (2012). "Monocyte/macrophage proteomics: recent findings and biomedical applications." Expert Rev Proteomics **9**(2): 201-215.
- Cerutti, H. and J. A. Casas-Mollano (2006). "On the origin and functions of RNA-mediated silencing: from protists to man." Curr Genet **50**(2): 81-99.
- Chariot, A. (2009). "The NF-kappaB-independent functions of IKK subunits in immunity and cancer." Trends Cell Biol **19**(8): 404-413.
- Chevaliez, S. and J. M. Pawlotsky (2007). "Interferon-based therapy of hepatitis C." Adv Drug Deliv Rev **59**(12): 1222-1241.
- Chu, P. G. and D. A. Arber (2001). "CD79: a review." Appl Immunohistochem Mol Morphol **9**(2): 97-106.
- Chung, C. T. and R. H. Miller (1988). "A rapid and convenient method for the preparation and storage of competent bacterial cells." Nucleic Acids Res **16**(8): 3580.
- Cooper, L. A., D. A. Gutman, et al. (2012). "The tumor microenvironment strongly impacts master transcriptional regulators and gene expression class of glioblastoma." Am J Pathol **180**(5): 2108-2119.
- Coussens, L. M. and Z. Werb (2002). "Inflammation and cancer." Nature **420**(6917): 860-867.
- Cramer, T., Y. Yamanishi, et al. (2003). "HIF-1alpha is essential for myeloid cell-mediated inflammation." Cell **112**(5): 645-657.

- Dalgin, G. S., D. T. Holloway, et al. (2007). "Identification and characterization of renal cell carcinoma gene markers." Cancer Inform **3**: 65-92.
- Darnell, J. E., Jr., I. M. Kerr, et al. (1994). "Jak-STAT pathways and transcriptional activation in response to IFNs and other extracellular signaling proteins." Science **264**(5164): 1415-1421.
- Dehne, N. and B. Brune (2009). "HIF-1 in the inflammatory microenvironment." Exp Cell Res **315**(11): 1791-1797.
- Del Vecchio, A. M., H. Romanczuk, et al. (1992). "Transient replication of human papillomavirus DNAs." J Virol **66**(10): 5949-5958.
- Dempsey, P. W., S. A. Vaidya, et al. (2003). "The art of war: Innate and adaptive immune responses." Cell Mol Life Sci **60**(12): 2604-2621.
- Denko, N. C. (2008). "Hypoxia, HIF1 and glucose metabolism in the solid tumour." Nat Rev Cancer **8**(9): 705-713.
- Descombes, P. and U. Schibler (1991). "A liver-enriched transcriptional activator protein, LAP, and a transcriptional inhibitory protein, LIP, are translated from the same mRNA." Cell **67**(3): 569-579.
- Dewhirst, M. W., Y. Cao, et al. (2008). "Cycling hypoxia and free radicals regulate angiogenesis and radiotherapy response." Nat Rev Cancer **8**(6): 425-437.
- Doedens, A. L., C. Stockmann, et al. (2010). "Macrophage expression of hypoxia-inducible factor-1 alpha suppresses T-cell function and promotes tumor progression." Cancer Res **70**(19): 7465-7475.
- Dong, X. P., F. Stubenrauch, et al. (1994). "Prevalence of deletions of YY1-binding sites in episomal HPV 16 DNA from cervical cancers." Int J Cancer **58**(6): 803-808.
- Dutsch-Wicherek, M. and W. Kazmierczak (2013). "Creation of a suppressive microenvironment by macrophages and cancer-associated fibroblasts." Front Biosci (Landmark Ed) **18**: 1003-1016.
- Elvidge, G. P., L. Glenny, et al. (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**(22): 15215-15226.
- Fardin, P., A. Cornero, et al. (2010). "Identification of multiple hypoxia signatures in neuroblastoma cell lines by l1-l2 regularization and data reduction." J Biomed Biotechnol **2010**: 878709.
- Fensterl, V. and G. C. Sen (2011). "The ISG56/IFIT1 gene family." J Interferon Cytokine Res **31**(1): 71-78.

Geissmann, F., M. G. Manz, et al. (2010). "Development of monocytes, macrophages, and dendritic cells." Science **327**(5966): 656-661.

Geleziunas, R., S. Ferrell, et al. (1998). "Human T-cell leukemia virus type 1 Tax induction of NF-kappaB involves activation of the IkappaB kinase alpha (IKKalpha) and IKKbeta cellular kinases." Mol Cell Biol **18**(9): 5157-5165.

Genin, P., A. Vaccaro, et al. (2009). "The role of differential expression of human interferon--a genes in antiviral immunity." Cytokine Growth Factor Rev **20**(4): 283-295.

Gordon, S. (2003). "Alternative activation of macrophages." Nat Rev Immunol **3**(1): 23-35.

Gordon, S. and P. R. Taylor (2005). "Monocyte and macrophage heterogeneity." Nat Rev Immunol **5**(12): 953-964.

Goubau, D., S. Deddouche, et al. (2013). "Cytosolic sensing of viruses." Immunity **38**(5): 855-869.

Graham, F. L., J. Smiley, et al. (1977). "Characteristics of a human cell line transformed by DNA from human adenovirus type 5." J Gen Virol **36**(1): 59-74.

Grandvaux, N., M. J. Servant, et al. (2002). "Transcriptional profiling of interferon regulatory factor 3 target genes: direct involvement in the regulation of interferon-stimulated genes." J Virol **76**(11): 5532-5539.

Guha, M. and N. Mackman (2001). "LPS induction of gene expression in human monocytes." Cell Signal **13**(2): 85-94.

Gutsch, R., J. D. Kandemir, et al. (2011). "CCAAT/enhancer-binding protein beta inhibits proliferation in monocytic cells by affecting the retinoblastoma protein/E2F/cyclin E pathway but is not directly required for macrophage morphology." J Biol Chem **286**(26): 22716-22729.

Guzy, R. D. and P. T. Schumacker (2006). "Oxygen sensing by mitochondria at complex III: the paradox of increased reactive oxygen species during hypoxia." Exp Physiol **91**(5): 807-819.

Hadaschik, D., K. Hinterkeuser, et al. (2003). "The Papillomavirus E2 protein binds to and synergizes with C/EBP factors involved in keratinocyte differentiation." J Virol **77**(9): 5253-5265.

Hallen, L. C., Y. Burki, et al. (2007). "Antiproliferative activity of the human IFN-alpha-inducible protein IFI44." J Interferon Cytokine Res **27**(8): 675-680.

Hayden, M. S. and S. Ghosh (2008). "Shared principles in NF-kappaB signaling." Cell **132**(3): 344-362.

Hayden, M. S. and S. Ghosh (2011). "NF-kappaB in immunobiology." Cell Res **21**(2): 223-244.

- Hertoghs, K. M., P. D. Moerland, et al. (2010). "Molecular profiling of cytomegalovirus-induced human CD8+ T cell differentiation." J Clin Invest **120**(11): 4077-4090.
- Hida, A., A. Kawakami, et al. (2000). "Nuclear factor-kappaB and caspases co-operatively regulate the activation and apoptosis of human macrophages." Immunology **99**(4): 553-560.
- Homminga, I., R. Pieters, et al. (2011). "Integrated transcript and genome analyses reveal NKX2-1 and MEF2C as potential oncogenes in T cell acute lymphoblastic leukemia." Cancer Cell **19**(4): 484-497.
- Hu, M. C., D. F. Lee, et al. (2004). "IkappaB kinase promotes tumorigenesis through inhibition of forkhead FOXO3a." Cell **117**(2): 225-237.
- Huang, T. T. and S. Miyamoto (2001). "Postrepression activation of NF-kappaB requires the amino-terminal nuclear export signal specific to IkappaBalpha." Mol Cell Biol **21**(14): 4737-4747.
- Huber, R., D. Pietsch, et al. (2012). "Regulation of C/EBPbeta and resulting functions in cells of the monocytic lineage." Cell Signal **24**(6): 1287-1296.
- Hume, D. A. (2008). "Differentiation and heterogeneity in the mononuclear phagocyte system." Mucosal Immunol **1**(6): 432-441.
- Hyrca, M. D., C. Kovacs, et al. (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**(7): 3477-3486.
- Ibberson, M., S. Bron, et al. (2013). "TIE-2 and VEGFR kinase activities drive immunosuppressive function of TIE-2-expressing monocytes in human breast tumors." Clin Cancer Res **19**(13): 3439-3449.
- Israel, A. (2010). "The IKK complex, a central regulator of NF-kappaB activation." Cold Spring Harb Perspect Biol **2**(3): a000158.
- Janardhan, H. P. (2008). "The HIF-1 alpha-C/EBP alpha axis." Sci Signal **1**(43): jc2.
- Ji, J., G. Zhang, et al. (2013). "The Frequency of Tumor-infiltrating Tie-2-expressing Monocytes in Renal Cell Carcinoma: Its Relationship to Angiogenesis and Progression." Urology **82**(4): 974 e979-974 e913.
- Jiang, Y., W. Zhang, et al. (2003). "Gene expression profiling in a renal cell carcinoma cell line: dissecting VHL and hypoxia-dependent pathways." Mol Cancer Res **1**(6): 453-462.
- Jordanovski, D., C. Herwartz, et al. (2013). "The Hypoxia-Inducible Transcription Factor ZNF395 Is Controlled by Ikb Kinase-Signaling and Activates Genes Involved in the Innate Immune Response and Cancer." PLoS One **8**(9): e74911.

Kaelin, W. G., Jr. and P. J. Ratcliffe (2008). "Oxygen sensing by metazoans: the central role of the HIF hydroxylase pathway." Mol Cell **30**(4): 393-402.

Karin, M., Y. Cao, et al. (2002). "NF-kappaB in cancer: from innocent bystander to major culprit." Nat Rev Cancer **2**(4): 301-310.

Katz, S., E. Kowenz-Leutz, et al. (1993). "The NF-M transcription factor is related to C/EBP beta and plays a role in signal transduction, differentiation and leukemogenesis of avian myelomonocytic cells." EMBO J **12**(4): 1321-1332.

Kawai, T. and S. Akira (2008). "Toll-like receptor and RIG-I-like receptor signaling." Ann N Y Acad Sci **1143**: 1-20.

Kim, J. and R. A. Feldman (2002). "Activated Fes protein tyrosine kinase induces terminal macrophage differentiation of myeloid progenitors (U937 cells) and activation of the transcription factor PU.1." Mol Cell Biol **22**(6): 1903-1918.

Kitamura, A., K. Takahashi, et al. (1994). "Induction of the human gene for p44, a hepatitis-C-associated microtubular aggregate protein, by interferon-alpha/beta." Eur J Biochem **224**(3): 877-883.

Kitamura, H., T. Nakagawa, et al. (2004). "Post-transcriptional effects of phorbol 12-myristate 13-acetate on transcriptome of U937 cells." FEBS Lett **578**(1-2): 180-184.

Knight, J. B., C. A. Eyster, et al. (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**(25): 14725-14730.

Koren, H. S., S. J. Anderson, et al. (1979). "In vitro activation of a human macrophage-like cell line." Nature **279**(5711): 328-331.

Kowenz-Leutz, E. and A. Leutz (1999). "A C/EBP beta isoform recruits the SWI/SNF complex to activate myeloid genes." Mol Cell **4**(5): 735-743.

Kuang, D. M., Q. Zhao, et al. (2009). "Activated monocytes in peritumoral stroma of hepatocellular carcinoma foster immune privilege and disease progression through PD-L1." J Exp Med **206**(6): 1327-1337.

Kumar, S. and K. Mehta (2012). "Tissue transglutaminase constitutively activates HIF-1alpha promoter and nuclear factor-kappaB via a non-canonical pathway." PLoS One **7**(11): e49321.

Lal, A., H. Peters, et al. (2001). "Transcriptional response to hypoxia in human tumors." J Natl Cancer Inst **93**(17): 1337-1343.

Lando, D., D. J. Peet, et al. (2002). "FIH-1 is an asparaginyl hydroxylase enzyme that regulates the transcriptional activity of hypoxia-inducible factor." Genes Dev **16**(12): 1466-1471.

- Landschulz, W. H., P. F. Johnson, et al. (1988). "Isolation of a recombinant copy of the gene encoding C/EBP." Genes Dev **2**(7): 786-800.
- Li, T., M. J. Morgan, et al. (2010). "MicroRNAs modulate the noncanonical transcription factor NF-kappaB pathway by regulating expression of the kinase IKKalpha during macrophage differentiation." Nat Immunol **11**(9): 799-805.
- Liaskou, E., D. V. Wilson, et al. (2012). "Innate immune cells in liver inflammation." Mediators Inflamm **2012**: 949157.
- Lisy, K. and D. J. Peet (2008). "Turn me on: regulating HIF transcriptional activity." Cell Death Differ **15**(4): 642-649.
- Liu, W., S. M. Shen, et al. (2012). "Targeted genes and interacting proteins of hypoxia inducible factor-1." Int J Biochem Mol Biol **3**(2): 165-178.
- Liu, Y., Y. B. Zhang, et al. (2013). "Lineage-specific expansion of IFIT gene family: an insight into coevolution with IFN gene family." PLoS One **8**(6): e66859.
- Lombardi, P. M., K. E. Cole, et al. (2011). "Structure, mechanism, and inhibition of histone deacetylases and related metalloenzymes." Curr Opin Struct Biol **21**(6): 735-743.
- Mantovani, A., A. Sica, et al. (2005). "Macrophage polarization comes of age." Immunity **23**(4): 344-346.
- Marks, P. A., V. M. Richon, et al. (2000). "Histone deacetylase inhibitors: inducers of differentiation or apoptosis of transformed cells." J Natl Cancer Inst **92**(15): 1210-1216.
- Massa, P. E., X. Li, et al. (2005). "Gene expression profiling in conjunction with physiological rescues of IKKalpha-null cells with wild type or mutant IKKalpha reveals distinct classes of IKKalpha/NF-kappaB-dependent genes." J Biol Chem **280**(14): 14057-14069.
- Matsumoto, M. and T. Seya (2008). "TLR3: interferon induction by double-stranded RNA including poly(I:C)." Adv Drug Deliv Rev **60**(7): 805-812.
- Mercurio, F., H. Zhu, et al. (1997). "IKK-1 and IKK-2: cytokine-activated IkappaB kinases essential for NF-kappaB activation." Science **278**(5339): 860-866.
- Meylan, E., J. Tschopp, et al. (2006). "Intracellular pattern recognition receptors in the host response." Nature **442**(7098): 39-44.
- Mo, X., E. Kowenz-Leutz, et al. (2004). "Ras induces mediator complex exchange on C/EBP beta." Mol Cell **13**(2): 241-250.
- Muller, A., A. Ritzkowsky, et al. (2002). "Cooperative activation of human papillomavirus type 8 gene expression by the E2 protein and the cellular coactivator p300." J Virol **76**(21): 11042-11053.

- Mullis, K. B. and F. A. Faloon (1987). "Specific synthesis of DNA in vitro via a polymerase-catalyzed chain reaction." Methods Enzymol **155**: 335-350.
- Murat, A., E. Migliavacca, et al. (2009). "Modulation of angiogenic and inflammatory response in glioblastoma by hypoxia." PLoS One **4**(6): e5947.
- Napetschnig, J. and H. Wu (2013). "Molecular basis of NF-kappaB signaling." Annu Rev Biophys **42**: 443-468.
- Ning, S., J. S. Pagano, et al. (2011). "IRF7: activation, regulation, modification and function." Genes Immun **12**(6): 399-414.
- Nusinzon, I. and C. M. Horvath (2005). "Unexpected roles for deacetylation in interferon- and cytokine-induced transcription." J Interferon Cytokine Res **25**(12): 745-748.
- Ozato, K., D. M. Shin, et al. (2008). "TRIM family proteins and their emerging roles in innate immunity." Nat Rev Immunol **8**(11): 849-860.
- Parihar, A., T. D. Eubank, et al. (2010). "Monocytes and macrophages regulate immunity through dynamic networks of survival and cell death." J Innate Immun **2**(3): 204-215.
- Patel, A. S., A. Smith, et al. (2013). "TIE2-expressing monocytes/macrophages regulate revascularization of the ischemic limb." EMBO Mol Med **5**(6): 858-869.
- Pfaffl, M. W. (2001). "A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR." Nucleic Acids Res **29**(9): e45.
- Polanska, U. M. and A. Orimo (2013). "Carcinoma-associated fibroblasts: non-neoplastic tumour-promoting mesenchymal cells." J Cell Physiol **228**(8): 1651-1657.
- Poli, V. (1998). "The role of C/EBP isoforms in the control of inflammatory and native immunity functions." J Biol Chem **273**(45): 29279-29282.
- Pouyssegur, J., F. Dayan, et al. (2006). "Hypoxia signalling in cancer and approaches to enforce tumour regression." Nature **441**(7092): 437-443.
- Purdie, K. J., C. J. Sexton, et al. (1993). "Malignant transformation of cutaneous lesions in renal allograft patients: a role for human papillomavirus." Cancer Res **53**(21): 5328-5333.
- Rahat, M. A., H. Bitterman, et al. (2011). "Molecular mechanisms regulating macrophage response to hypoxia." Front Immunol **2**: 45.
- Randall, R. E. and S. Goodbourn (2008). "Interferons and viruses: an interplay between induction, signalling, antiviral responses and virus countermeasures." J Gen Virol **89**(Pt 1): 1-47.

Reimer, T., M. Brcic, et al. (2008). "poly(I:C) and LPS induce distinct IRF3 and NF-kappaB signaling during type-I IFN and TNF responses in human macrophages." J Leukoc Biol **83**(5): 1249-1257.

Richard, D. E., E. Berra, et al. (1999). "p42/p44 mitogen-activated protein kinases phosphorylate hypoxia-inducible factor 1alpha (HIF-1alpha) and enhance the transcriptional activity of HIF-1." J Biol Chem **274**(46): 32631-32637.

Rius, J., M. Guma, et al. (2008). "NF-kappaB links innate immunity to the hypoxic response through transcriptional regulation of HIF-1alpha." Nature **453**(7196): 807-811.

Rocha, S. (2007). "Gene regulation under low oxygen: holding your breath for transcription." Trends Biochem Sci **32**(8): 389-397.

Sakamoto, S., R. Potla, et al. (2004). "Histone deacetylase activity is required to recruit RNA polymerase II to the promoters of selected interferon-stimulated early response genes." J Biol Chem **279**(39): 40362-40367.

Schodel, J., S. Oikonomopoulos, et al. (2011). "High-resolution genome-wide mapping of HIF-binding sites by CHIP-seq." Blood **117**(23): e207-217.

Schoolmeesters, A., D. D. Brown, et al. (2012). "Kinome-wide functional genomics screen reveals a novel mechanism of TNFalpha-induced nuclear accumulation of the HIF-1alpha transcription factor in cancer cells." PLoS One **7**(2): e31270.

Schreiber, J., R. G. Jenner, et al. (2006). "Coordinated binding of NF-kappaB family members in the response of human cells to lipopolysaccharide." Proc Natl Acad Sci U S A **103**(15): 5899-5904.

Schroder, M. and A. G. Bowie (2005). "TLR3 in antiviral immunity: key player or bystander?" Trends Immunol **26**(9): 462-468.

Semenza, G. L. (2009). "Regulation of oxygen homeostasis by hypoxia-inducible factor 1." Physiology (Bethesda) **24**: 97-106.

Semenza, G. L. (2010). "HIF-1: upstream and downstream of cancer metabolism." Curr Opin Genet Dev **20**(1): 51-56.

Sen, G. C. and S. N. Sarkar (2007). "The interferon-stimulated genes: targets of direct signaling by interferons, double-stranded RNA, and viruses." Curr Top Microbiol Immunol **316**: 233-250.

Sichtig, N., N. Korfer, et al. (2007). "Papillomavirus binding factor binds to SAP30 and represses transcription via recruitment of the HDAC1 co-repressor complex." Arch Biochem Biophys **467**(1): 67-75.

Sichtig, N., S. Silling, et al. (2007). "Papillomavirus binding factor (PBF)-mediated inhibition of cell growth is regulated by 14-3-3beta." Arch Biochem Biophys **464**(1): 90-99.

Skubitz, K. M., W. Zimmermann, et al. (2006). "Differential gene expression identifies subgroups of renal cell carcinoma." J Lab Clin Med **147**(5): 250-267.

Smink, J. J., V. Begay, et al. (2009). "Transcription factor C/EBPbeta isoform ratio regulates osteoclastogenesis through MafB." EMBO J **28**(12): 1769-1781.

Song, L. P., J. Zhang, et al. (2008). "Hypoxia-inducible factor-1alpha-induced differentiation of myeloid leukemic cells is its transcriptional activity independent." Oncogene **27**(4): 519-527.

Sperling, T., M. Oldak, et al. (2012). "Human Papillomavirus Type 8 Interferes with a Novel C/EBPbeta-Mediated Mechanism of Keratinocyte CCL20 Chemokine Expression and Langerhans Cell Migration." PLoS Pathog **8**(7): e1002833.

Stawowczyk, M., S. Van Scoy, et al. (2011). "The interferon stimulated gene 54 promotes apoptosis." J Biol Chem **286**(9): 7257-7266.

Stein, U., W. Walther, et al. (2009). "MACC1, a newly identified key regulator of HGF-MET signaling, predicts colon cancer metastasis." Nat Med **15**(1): 59-67.

Takeda, K. and S. Akira (2004). "TLR signaling pathways." Semin Immunol **16**(1): 3-9.

Tanaka, K., J. Shouguchi-Miyata, et al. (2004). "Novel nuclear shuttle proteins, HDBP1 and HDBP2, bind to neuronal cell-specific cis-regulatory element in the promoter for the human Huntington's disease gene." J Biol Chem **279**(8): 7275-7286.

Terenzi, F., P. Saikia, et al. (2008). "Interferon-inducible protein, P56, inhibits HPV DNA replication by binding to the viral protein E1." Embo J **27**(24): 3311-3321.

Tsai, Y. P. and K. J. Wu (2012). "Hypoxia-regulated target genes implicated in tumor metastasis." J Biomed Sci **19**: 102.

Tsuji, K., K. Yasui, et al. (2010). "PEG10 is a probable target for the amplification at 7q21 detected in hepatocellular carcinoma." Cancer Genet Cytogenet **198**(2): 118-125.

Tsukada, J., Y. Yoshida, et al. (2011). "The CCAAT/enhancer (C/EBP) family of basic-leucine zipper (bZIP) transcription factors is a multifaceted highly-regulated system for gene regulation." Cytokine **54**(1): 6-19.

Tsukahara, T., Y. Nabeta, et al. (2004). "Identification of human autologous cytotoxic T-lymphocyte-defined osteosarcoma gene that encodes a transcriptional regulator, papillomavirus binding factor." Cancer Res **64**(15): 5442-5448.

Tsutsui, T., R. Fukasawa, et al. (2013). "Mediator complex recruits epigenetic regulators via its two cyclin-dependent kinase subunits to repress transcription of immune response genes." J Biol Chem **288**(29): 20955-20965.

Vadillo, E. and R. Pelayo (2012). "[Toll-like receptors in development and function of the hematopoietic system]." Rev Invest Clin **64**(5): 461-476.

- Walkinshaw, D. R. and X. J. Yang (2008). "Histone deacetylase inhibitors as novel anticancer therapeutics." Curr Oncol **15**(5): 237-243.
- Walmsley, S. R., C. Print, et al. (2005). "Hypoxia-induced neutrophil survival is mediated by HIF-1alpha-dependent NF-kappaB activity." J Exp Med **201**(1): 105-115.
- Wang, C., J. Pflugheber, et al. (2003). "Alpha interferon induces distinct translational control programs to suppress hepatitis C virus RNA replication." J Virol **77**(7): 3898-3912.
- Wang, L. M., H. W. Xiao, et al. (2012). "[Roles of CEBPA mutation and expression abnormality in acute myeloid leukemia - review]." Zhongguo Shi Yan Xue Ye Xue Za Zhi **20**(5): 1256-1260.
- Wang, R. P., M. Zhang, et al. (2008). "Differential regulation of IKK alpha-mediated activation of IRF3/7 by NIK." Mol Immunol **45**(7): 1926-1934.
- Weber, C., K. U. Belge, et al. (2000). "Differential chemokine receptor expression and function in human monocyte subpopulations." J Leukoc Biol **67**(5): 699-704.
- Wenger, R. H., D. P. Stiehl, et al. (2005). "Integration of oxygen signaling at the consensus HRE." Sci STKE **2005**(306): re12.
- Wesoly, J., Z. Szweykowska-Kulinska, et al. (2007). "STAT activation and differential complex formation dictate selectivity of interferon responses." Acta Biochim Pol **54**(1): 27-38.
- Williams, S. C., C. A. Cantwell, et al. (1991). "A family of C/EBP-related proteins capable of forming covalently linked leucine zipper dimers in vitro." Genes Dev **5**(9): 1553-1567.
- Wilson, D. R., T. S. Juan, et al. (1990). "A 58-base-pair region of the human C3 gene confers synergistic inducibility by interleukin-1 and interleukin-6." Mol Cell Biol **10**(12): 6181-6191.
- Wong, K. L., J. J. Tai, et al. (2011). "Gene expression profiling reveals the defining features of the classical, intermediate, and nonclassical human monocyte subsets." Blood **118**(5): e16-31.
- Wu, J. Q., D. E. Dwyer, et al. (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**(1): 124-135.
- Xia, Y., R. C. Padre, et al. (2009). "Phosphorylation of p53 by IkkappaB kinase 2 promotes its degradation by beta-TrCP." Proc Natl Acad Sci U S A **106**(8): 2629-2634.
- Yabe, H., T. Tsukahara, et al. (2008). "Overexpression of papillomavirus binding factor in Ewing's sarcoma family of tumors conferring poor prognosis." Oncol Rep **19**(1): 129-134.
- Yamamoto, M., C. D. Watt, et al. (2007). "Cloning and characterization of a novel MyoD enhancer-binding factor." Mech Dev **124**(9-10): 715-728.

Yang, C. K., J. H. Kim, et al. (2006). "Differential use of functional domains by coiled-coil coactivator in its synergistic coactivator function with beta-catenin or GRIP1." J Biol Chem **281**(6): 3389-3397.

Zahnow, C. A. (2009). "CCAAT/enhancer-binding protein beta: its role in breast cancer and associations with receptor tyrosine kinases." Expert Rev Mol Med **11**: e12.

Zhang, J., L. P. Song, et al. (2008). "Accumulation of hypoxia-inducible factor-1 alpha protein and its role in the differentiation of myeloid leukemic cells induced by all-trans retinoic acid." Haematologica **93**(10): 1480-1487.

Zhang, Q., V. Raje, et al. (2013). "Mitochondrial Localized Stat3 Promotes Breast Cancer Growth via Phosphorylation of Serine 727." J Biol Chem **288**(43): 31280-31288.

Zhao, X., M. Ai, et al. (2012). "Poly I:C-induced tumor cell apoptosis mediated by pattern-recognition receptors." Cancer Biother Radiopharm **27**(9): 530-534.

Zhao, X. Y., K. W. Zhao, et al. (2011). "Synergistic induction of galectin-1 by CCAAT/enhancer binding protein alpha and hypoxia-inducible factor 1alpha and its role in differentiation of acute myeloid leukemic cells." J Biol Chem **286**(42): 36808-36819.

Zheng, C., Q. Yin, et al. (2011). "Structural studies of NF-kappaB signaling." Cell Res **21**(1): 183-195.

Zhou, L. and H. P. Too (2011). "Mitochondrial localized STAT3 is involved in NGF induced neurite outgrowth." PLoS One **6**(6): e21680.

## 7 Abkürzungsverzeichnis

|          |  |
|----------|--|
| Abb.     | Abbildung  |
| AK       | Antikörper   |
| Amp      | Ampicillin   |
| APS      | Ammoniumpersulfat  |
| AS       | Aminosäure   |
| Asn      | Asparagin  |
| ATP      | Adenosintriphosphat                                      |
| bp       | Basenpaar  |
| BPV      | Bovines Papillomvirus                                    |
| BS       | Bindestelle  |
| BSA      | Bovines Serumalbumin                                     |
| C/EBP    | CCAAT/Enhancer-Binding-Proteine                          |
| CBP      | CREB binding protein                                     |
| CD       | Cluster of Differentiation                               |
| CDK      | Cyclin-abhängige Kinase                                  |
| c-DNA    | komplementäre DNA  |
| CHIP     | Die Chromatin-Immunpräzipitation                         |
| CIN      | zervikale intraepitheliale Neoplasie                     |
| CK       | Cytokeratin  |
| CMV      | Cytomegalovirus  |
| CR       | konservierte Region                                      |
| CREB     | cAMP responsive element binding protein                  |
| DAPI     | 4,6-Diamidin-2-phenylindol                               |
| DMEM     | Dulbecco's modified eagle medium                         |
| DMOG     | Dimetyloxaloylglycin                                     |
| DMSO     | Dimethylsulfoxid   |
| DNA      | Desoxyribonukleinsäure                                   |
| dNTPs    | Desoxynukleotide   |
| DOX      | Doxycyclin   |
| DP1      | differentiation regulated transcription factor protein 1 |
| DTT      | Dithiothreitol   |
| ECL      | enhanced chemoluminescence                               |
| EDTA     | Ethylendiamintetraacetat                                 |
| EGF      | Epidermal growth factor                                  |
| EGF      | Epidermal growth factor                                  |
| et al.   | und andere   |
| FCS      | fötales Kälberserum (fetal calf serum)                   |
| FIH      | factor inhibiting Hif                                    |
| g        | Erdbeschleunigung  |
| GIG1     | Maus-Glucocorticoid induzierbarer Faktor                 |
| GLUT     | Glukosetransporter                                       |
| GLUT4-EF | GLUT4-enhancer factor                                    |
| h        | Stunde   |
| HAT      | Histon-Acetyltransferase                                 |
| HBS      | Hepes buffered saline                                    |

|                |  |
|----------------|--|
| HCV            | Hepatitis C Virus  |
| HDAC           | Histon-Deacetylase   |
| HDBP           | Huntington disease binding protein                               |
| HDM2           | Human double minute 2  |
| HEPES          | N-2-Hydroxyethylpiperazin-N-2-Ethansulfonsäure                   |
| HIF            | Hypoxia inducible factor   |
| HPV            | Humanes Papillomvirus  |
| HRE            | Hypoxie responsive element                                       |
| HRP            | Horse-radish-Peroxidase  |
| hTERT          | Telomerase reverse transcriptase Gen                             |
| IFN            | Interferon   |
| IGF            | Insulin growth factor  |
| IgG            | Immunglobulin G  |
| IK-B $\alpha$  | inhibitorische $\kappa$ B-Proteine                               |
| IKK            | I $\kappa$ B kinase  |
| IL             | Interleukin  |
| INF            | Interferon   |
| IP             | Immunpräzipitation   |
| IPTG           | Isopropyl-b-D-Thiogalactopyranosid                               |
| IRF            | Interferon regulatory factor                                     |
| ISG            | Interferon-stimuliertes Gen                                      |
| ISRE           | interferon stimulated response element                           |
| kb             | kilo Basen   |
| KDa            | kilo Dalton  |
| LAP            | Liver Activator Protein  |
| LB             | Luria-Bertani  |
| LIP            | Liver Inhibitor Protein  |
| LPS            | Lipopolysaccharid  |
| LSDB           | Low salt dilution buffer   |
| Luc            | Luziferase   |
| MCS            | Multiple cloning site  |
| MEM            | Modified Eagle Medium  |
| mRNA           | messenger-RNA  |
| MW             | Molekulargewicht   |
| NES            | Kernexportsequenz  |
| NF-IL6         | nuclear factor interleukin-6                                     |
| NF- $\kappa$ B | Nuclear factor 'kappa-light-chain-enhancer' of activated B-cells |
| NLS            | Kernlokalisationssequenz   |
| NP40           | Nonidet P40  |
| OD             | Optische Dichte  |
| ORF            | Open reading frame   |
| PAG            | Polyacrylamid-Gel  |
| PAGE           | Polyacrylamid-Gel Elektrophorese                                 |
| PBS            | Phosphate buffered saline  |
| PCR            | Polymerasekettenreaktion   |
| PDGF           | Platelet-derived growth factor                                   |
| PHD            | Prolylhydroxylasen   |

|        |  |
|--------|--|
| PI3K   | Phosphatidyl-Inositol-3-Kinase                             |
| PMSF   | Phenylmethylsulfonylfluorid                                |
| POD    | Peroxidase   |
| pRB    | Retinoblastom-Protein                                      |
| PV     | Papillomvirus  |
| RLU    | Relative light units                                       |
| RNA    | Ribonukleinsäure   |
| rpm    | revolutions per minute                                     |
| RT     | Raumtemperatur   |
| RT-PCR | Reverse Transkription Polymerasekettenreaktion             |
| S      | Serin  |
| SAP30  | Sin3-assoziiertes Polypeptid p30                           |
| SDS    | Sodium Dodecyl Sulfate                                     |
| siRNA  | small interfering RNA                                      |
| SP1    | Stimulating protein1                                       |
| STAT   | Signal Transducers and activators of transcription         |
| TBST   | Tris-Buffered Saline Tween-20                              |
| TE     | Tris-EDTA-Lösung   |
| TEMED  | Tetramethylethylendiamin                                   |
| TF     | Transkriptionsfaktor                                       |
| TNF    | Tumornekrosefaktor   |
| TRAF   | TNFR-assoziierte Faktoren                                  |
| TRIF   | TIR-domain-containing adaptor protein-inducing IFN $\beta$ |
| Tris   | Tris-(hydroxymethyl)-aminoethan                            |
| TSA    | Trichostatin A   |
| VEGF   | Vascular endothelial growth factor                         |
| VHL    | von Hippel Landau Protein                                  |
| ZNF    | Zinkfinger   |

## 8 Zusammenfassung

Genomweite Expressionsanalysen fanden eine erhöhte Expression des bisher wenig charakterisierten Transkriptionsfaktors ZNF395 in verschiedenen Krebsarten, u.a. im Rahmen einer Antwort des Tumors auf Hypoxie. Ein Mikroarray offenbarte, dass ZNF395 die Expression einer kleinen Gruppe Krebs-assoziiertes Gene aktivierte, sowie einiger Interferon-regulierter Gene wie ISG56/IFIT1 und IFI16, die zur antiviralen Immunantwort beitragen. Diese Aktivierung benötigte den IKK-Signalweg, der gleichzeitig die verstärkte Degradation von ZNF395 induzierte. Das Ziel dieser Arbeit lag darin, den Beitrag von ZNF395 bei der angeborenen Immunantwort und dessen Regulation, v.a. durch Hypoxie und den IKK-Komplex, zu charakterisieren.

Wie Immunfluoreszenz-Analysen zeigten, konnte eine Expression von ZNF395 im Kern von Tumorzellen in einzelnen Tumoren und weit häufiger im Zytoplasma von Immunzellen des Tumorstromas nachgewiesen werden. Diese konnten als CD79a<sup>+</sup> B-Lymphozyten sowie CD14<sup>+</sup> Monozyten identifiziert werden, hingegen war ZNF395 in CD68<sup>+</sup> Makrophagen nur schwach detektierbar. Eine Verringerung der Expression von ZNF395 konnte im Zuge der Reifung von Monozyten zu Makrophagen am Beispiel der Monozyten-Zelllinie U937 mit Western Blot und qRT-PCR-Analysen bestätigt werden. C/EBP $\beta$ , ein Transkriptionsfaktor, der eine essenzielle Rolle für die Differenzierung von Monozyten spielt, aktivierte den ZNF395 Promotor, wie Reporteranalysen offenbarten. Dies unterstützt die Annahme, dass ZNF395 eine funktionale Rolle in Monozyten hat und seine Expression im Rahmen der Makrophagen-Reifung abnimmt. Die Induktion von ZNF395 unter Hypoxie benötigt den Hypoxie-induzierten Transkriptionsfaktor HIF1 $\alpha$ , dessen Aktivität auch in Monozyten von Bedeutung ist. Es konnte zudem gezeigt werden, dass der IKK-Komplex, der durch Zytokine u.a. im Verlauf der Makrophagen Reifung aktiviert wird, für die Funktion von ZNF395 als Transkriptionsfaktor essenziell ist. Reporteranalysen und Knockdown-Experimente zeigten, dass sowohl aktives IKK $\alpha$  als auch IKK $\beta$  notwendig sind, dass ZNF395 den ISG56 Promotor aktivieren kann aber gleichzeitig auch dessen proteasomalen Abbau fördern. Bei diesem verstärkten IKK-stimulierten „turn over“ könnte es sich um einen negativen Feedback-Mechanismus handeln der dazu beiträgt, dass die Aktivierung der Zielgene durch ZNF395 gering und nur vorübergehend ist. SiRNA und qRT-PCR Analysen offenbarten, dass ZNF395 für die maximale IFN $\alpha$ -vermittelte Induktion der IFN-regulierten Gene ISG56/IFIT1, ISG54/IFIT2, IFI44 und IFI16 notwendig ist. ZNF395 konnte die IFN-abhängige Induktion der hier untersuchten antiviralen Faktoren bis zu zehnfach modulieren. Dies zeigt, dass ZNF395 zur Etablierung eines antiviralen Status der Zelle maßgeblich beiträgt. Die in dieser Arbeit beschriebenen Ergebnisse belegen, dass im Rahmen der angeborenen Immunantwort und

Entzündung die transkriptionelle Aktivität von ZNF395 über Stimulierung von HIF1 $\alpha$  und IKK erhöht wird und somit die Effizienz der IFN-Antwort verstärken kann. HIF1 $\alpha$  und IKK sind auch in Karzinomen regelmäßig konstitutiv aktiv, was zu erhöhten Mengen an aktivem ZNF395 führt, das dann über die Aktivierung seiner krebsassoziierten Zielgene die Karzinogenese unterstützen könnte.

## 9 Abstract

Genome-wide expression analyses found the so far poorly characterized transcription factor ZNF395 upregulated in various cancers and particularly in response to hypoxia. Microarray analysis demonstrated that overexpression of ZNF395 upregulated a small subset of cancer-associated genes as well as interferon-regulated genes known to contribute to an antiviral immune response, such as ISG56/IFIT1 and IFI16. The activation of transcription by ZNF395 required IKK signaling which simultaneously induced the proteasomal degradation of ZNF395. The aim of this work was to characterize the involvement of ZNF395 in the innate immune response and to decipher its regulation by hypoxia and the IKK complex.

As shown by immunofluorescence (IF) analyses, a nuclear expression of ZNF395 was occasionally detectable in tumor cells of various cancers. More frequently, a cytoplasmic expression of ZNF395 was observed in immune cells present in the tumor stroma. These cells could be identified as CD79a<sup>+</sup> B-lymphocytes and CD14<sup>+</sup> monocytes, while the expression in CD68<sup>+</sup> macrophages was weak. A reduction of the expression of ZNF395 during monocyte differentiation could be confirmed in the monocytic cell line U937 by IF, Western blot and qRT-PCR analyses. Reporter gene analyses revealed that C/EBP $\beta$ , a transcription factor also known to play an essential role in monocyte differentiation, was able to activate the ZNF395 promoter. These observations support the assumption that ZNF395 plays a functional role in monocytes and that its expression is altered during macrophage maturation. The induction of ZNF395 upon hypoxia required the hypoxia-inducible transcription factor HIF1 $\alpha$ , which is also involved in monocyte function. Furthermore, it was demonstrated that activity of the IKK complex, which is also activated by cytokines during the macrophage maturation process, is essential for ZNF395 to activate transcription. Reporter gene assays and knockdown experiments demonstrated that both IKK $\alpha$  and IKK $\beta$  are required for ZNF395-induced ISG56 promoter activation, but simultaneously enhance the proteasomal degradation of ZNF395. This IKK-induced turn over may represent a negative feedback mechanism to ensure that the activation of target genes by ZNF395 is weak and transient. SiRNA and qRT-PCR analyses revealed, that ZNF395 is required for the maximal IFN $\alpha$ -induction of IFN-regulated genes ISG56/IFIT1, ISG54/IFIT2, IFI44 and IFI16. ZNF395 could modify the range of IFN-mediated induction of these antiviral factors up to ten-fold. This demonstrates that ZNF395 strongly contributes to the establishment of an antiviral state within the cell. These results show that during innate immune response and within inflammation, the transcriptional activity of ZNF395 increases due to hypoxia and IKK stimulation, thus leading to an enhanced IFN-response. Furthermore, HIF1 $\alpha$  and IKK are

frequently constitutively active in cancer, resulting in elevated amounts of active ZNF395 that may contribute to carcinogenesis by inducing its cancer-associated target genes.

## 10 Danksagung

Mein besonderer Dank gilt Frau Dr. Gertrud Steger für die hervorragende Betreuung während meiner Diplom und Doktorarbeit. Es herrschte immer eine außerordentlich nette Atmosphäre und die aufbauenden Worte taten oft gut. Ich habe mich in der Arbeitsgruppe immer sehr wohl gefühlt und bin sehr dankbar, dass ich das alles mit ihrer Hilfe geschafft habe. Danke Gerti

Ich bedanke mich bei Herrn Prof. Dr. Dr.h.c. H. Pfister, für die Möglichkeit, diese Arbeit am Institut für Virologie durchgeführt haben zu können. Ich danke auch für die gute Kritik, die das Gelingen dieser Arbeit vorangetrieben hat und teils mit tollen Bildern, Vergleichen und Situationen veranschaulicht wurde.

Prof. Dr. G. Plickert danke ich für die Betreuung meiner Promotion von Seiten des Fachbereichs der Biologie der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät der Universität zu Köln. Danke, dass Sie sich dazu bereiterklärt haben, diese fachfremde Arbeit zu betreuen.

Ich bedanke mich bei Herrn Prof. Dr. G. Schwarz, dass er den Vorsitz meiner Prüfung übernommen hat und bei Frau Dr. D. Fusca, dass sie die Rolle des Schriftführers übernommen hat.

Ein ganz besonderer Dank gilt Martin Hufbauer und Darko Jordanovski für die Einarbeitung im Labor, ihre stete Bereitschaft mir in jeglicher Hinsicht zu helfen, für hervorragendes Fachwissen und die vielen interessanten Gespräche während des Laboralltages.

Ich danke meiner lieben Steffi Taute, dass sie nicht nur 2 Jahre die beste Laborkollegin gewesen ist, sondern zur richtigen Freundin wurde. Ohne Dich wäre die Arbeit hier nicht halb so schön gewesen.

Ich bedanke mich auch ganz herzlich bei Sandra Heuser für die vielen schönen Mittags- und Kaffeepausen im freundschaftlichen Rahmen zusammen mit Martin und Steffi.

Des Weiteren bedanke ich mich bei allen Mitarbeitern der Virologie für das super nette Arbeitsklima. Ein ganz besonderer Dank gilt dabei den Viro-Mädels: Sabrina Brüggemann, Claudia Müller, Maria Neumann-Fraune, Melanie Balduin, Elena Knops, Saleta Sierra, Dali Lazic und Tanya Sperling und natürlich Baki Akgül, Paolo Marcuzzi und Zeb Tolman.

Ich danke meinem lieben Mann Alex dafür, dass er in allen Jahren der Doktorarbeit nicht müde wurde, Probevorträge über sich ergehen zu lassen, Korrekturen zu lesen, Nervenzusammenbrüche über mislungene Forschungsergebnisse zu ertragen und mich auch zu später Stunde oder am Wochenende kurz am Institut vorbeibrachte oder abholte. Danke, dass du Dich mit mir freuen konntest, wenn alles gut lief und mich davon abgehalten hast alles zu schmeißen, wenn es nicht gut lief.

...zu guter Letzt danke ich meinen Eltern, die mir nicht nur die Finanzierung des Studiums ermöglicht haben, sondern mir auch immer bei allen Belangen geholfen haben.

Ihr seid die Besten!

## 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 - abgesehen von unten angegebenen Teilpublikationen - 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. Günter Plickert betreut worden.

Köln, 25. November 2013

---

(Christine Herwartz)