

**Untersuchungen zur Regulation des Transkriptionsfaktors
Grainyhead-like 2 (GRHL2)
in humanen Mammakarzinomzelllinien**

DISSERTATION

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

an der Fakultät für Mathematik, Informatik und Naturwissenschaften
im Fachbereich Chemie der Universität Hamburg

vorgelegt von

JOHANNA NEU

geb. Keller

Hamburg

2022

Erstgutachter: **Prof. Dr. Klaus Pantel**
Universitätsklinikum Hamburg-Eppendorf
Zentrum für Experimentelle Medizin
Institut für Tumorbologie

Zweitgutachter: **Prof. Dr. Michael Kolbe**
Universität Hamburg
Fachbereich Chemie
Institut für Biochemie und Molekularbiologie

Prüfungskommission: Prof. Dr. Hartmut Schlüter
Prof. Dr. Klaus Pantel
Dr. Thomas Hackl

Datum der Disputation: 15.07.2022

Die vorliegende Arbeit wurde in der Zeit von März 2017 bis März 2021 am Universitätsklinikum Hamburg-Eppendorf im Institut für Tumorbiologie unter der Leitung von Herrn Prof. Dr. Klaus Pantel und der Betreuung durch Herrn Dr. Volker Aßmann angefertigt.

Inhalt

Inhalt	I
Abkürzungen	V
1. Zusammenfassung	1
1.1. Abstract.....	2
2. Einleitung	5
2.1. Tumormetastasierung	5
2.2. Die Epithelial-Mesenchymale Transition (EMT)	6
2.2.1. Die Regulation der EMT	7
2.3. Der Transkriptionsfaktor Grainyhead-like 2	10
2.3.1. Die Familie der Grainyhead-Transkriptionsfaktoren.....	10
2.3.2. Die Struktur des Transkriptionsfaktors GRHL2.....	11
2.3.3. Expression und physiologische Relevanz von GRHL2	12
2.3.4. Die Bedeutung von GRHL2 bei der Entstehung und Progression von Tumoren.....	14
3. Zielsetzung	18
4. Material	19
5. Methoden	19
5.1. Zellkulturmethoden.....	19
5.1.1. Kulturmedien.....	19
5.1.2. Verwendete Zelllinien	19
5.1.3. Zellkultivierung	20
5.1.4. Kryokonservierung eukaryotischer Zellen.....	20
5.1.5. Transfektion eukaryotischer Zellen mit Plasmid-DNA.....	21
5.1.6. Transfektion eukaryotischer Zellen mit siRNA	21
5.1.7. Gentransfer mit Hilfe von Lentiviren	22
5.1.8. Pharmakologische Interventionen	23
5.2. Molekularbiologische Methoden	24

5.2.1.	Kultivierung von <i>Escherichia coli</i> (<i>E. coli</i>)	24
5.2.2.	Generierung transformationskompetenter <i>E. coli</i>	24
5.2.3.	Transformation von <i>E. coli</i>	25
5.2.4.	Isolierung von Plasmid-DNA im analytischen Maßstab.....	25
5.2.5.	Isolierung von Plasmid-DNA im präparativen Maßstab.....	25
5.2.6.	Bestimmung der Konzentration und Reinheit von Nukleinsäuren.....	25
5.2.7.	Restriktionsverdau.....	26
5.2.8.	Dephosphorylierung von Plasmid-DNA.....	26
5.2.9.	Agarosegelelektrophorese.....	26
5.2.10.	Aufreinigung von DNA aus Agarosegelen.....	26
5.2.11.	Ligation von DNA-Fragmenten	27
5.2.12.	Polymerasekettenreaktion (PCR) zur DNA-Amplifikation.....	27
5.2.13.	Aufreinigung von PCR-Produkten.....	27
5.2.14.	Zielgerichtete Mutagenese	28
5.2.15.	DNA-Sequenzanalyse	28
5.2.16.	Isolierung von Gesamt-RNA.....	29
5.2.17.	Reverse Transkription von RNA	29
5.2.18.	Quantitative <i>Realtime</i> -PCR (qRT-PCR)-Analyse	29
5.3.	Proteinbiochemische Methoden.....	30
5.3.1.	Herstellung von Gesamtzellextrakten unter nativen Bedingungen	30
5.3.2.	Herstellung von Gesamtzellextrakten unter denaturierenden Bedingungen	30
5.3.3.	Herstellung von Zellkernextrakten	30
5.3.4.	Bestimmung der Proteinkonzentration nach Bradford.....	31
5.3.5.	SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE).....	31
5.3.6.	<i>Semi-dry</i> -Transfer von Proteinen auf Membranen	32
5.3.7.	Immunoblot-Analyse.....	32
5.3.8.	Dephosphorylierung von Proteinen mit Lambda Protein Phosphatase.....	33
5.3.9.	Herstellung phospho-spezifischer GRHL2-Antikörper.....	34
5.3.10.	Identifizierung von Kandidaten-Kinasen mittels <i>KinaseFinder Screening</i>	34

5.4.	Bioinformatische Analysen	35
6.	Ergebnisse.....	37
6.1.	Posttranslationale Regulation des Transkriptionsfaktors GRHL2.....	37
6.1.1.	GRHL2 enthält eine mögliche Phosphorylierungsstelle an Position T ²¹¹	37
6.1.2.	Identifizierung eines eine PEST-Sequenz enthaltenen Degrons in GRHL2	38
6.1.3.	Mutationen innerhalb der PEST-Sequenz beeinflussen die Stabilität des GRHL2-Proteins.....	43
6.1.4.	GRHL2 wird an drei Positionen innerhalb der PEST-Sequenz phosphoryliert .	44
6.1.5.	Phosphorylierungen innerhalb der PEST-Sequenz beeinflussen die Halbwertszeit des GRHL2-Proteins	47
6.1.6.	Identifizierung von Kinasen, die GRHL2 innerhalb der PEST-Sequenz phosphorylieren.....	49
6.2.	Transkriptionelle Regulation des Transkriptionsfaktors GRHL2.....	53
6.2.1.	PMA induziert eine Suppression der GRHL2-Expression in Mammakarzinomzellen	53
6.2.2.	Pharmakologische Inhibition der PMA-induzierten Herunterregulation der GRHL2-Expression	56
6.2.3.	Untersuchung der Expression der nPKC-Isoformen in Mammakarzinomzelllinien	57
6.2.4.	Regulation der GRHL2-Expression durch PKC δ	58
6.2.5.	Identifizierung PKC δ -abhängiger Transkriptionsfaktoren mit möglichen Bindungstellen in der Promotor-Region des GRHL2-Gens.....	61
7.	Diskussion.....	64
7.1.	Identifizierung eines posttranslationalen Mechanismus der Regulation der GRHL2-Expression in Mammakarzinomzellen	64
7.2.	Identifizierung eines PKC δ -abhängigen, transkriptionellen Mechanismus der Regulation der GRHL2-Expression in Mammakarzinomzellen	70
7.3.	Ausblick.....	77
8.	Literaturverzeichnis	79
9.	Anhang.....	i
9.1.	Laborgeräte.....	i

Inhalt

9.2.	Verbrauchsmaterialien.....	ii
9.3.	Chemikalien.....	iii
9.4.	Expressionsplasmide.....	iv
9.5.	Oligonukleotide.....	v
9.6.	RNA-Interferenz	viii
9.7.	Antikörper.....	ix
9.8.	Ergebnis des KinaseFinder Screenings	x
9.9.	Sicherheit und Entsorgung	xii
9.9.1.	Sicherheit	xii
9.9.2.	Entsorgung.....	xiii
	Danksagung.....	xiv
	Eidesstattliche Versicherung.....	xv

Abkürzungen

μM	Mikromolar
μl	Mikroliter
μg	Mikrogramm
A	Ampère, Alanin
Abb.	Abbildung
APS	Ammoniumpersulfat
bp	Basenpaar
BSA	Bovines Serumalbumin
cDNA	<i>Complementary DNA</i>
CTC	<i>Circulating tumor cell</i>
DMEM	<i>Dulbecco's Modified Eagle Medium</i>
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	<i>Desoxyribonucleic Acid</i> , Desoxyribonukleinsäure
DNase	Desoxyribonuklease
dNTP	Desoxyribonukleosidtriphosphat
<i>E.coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
ECL	<i>Enhanced Chemiluminescence</i>
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
EGF	<i>Epidermal growth factor</i>
EMT	Epithelial-Mesenchymale Transition
FCS	<i>Fetal Calf Serum</i> , Fötales Kälberserum
GRHL	<i>Grainyhead-like</i>
h	Stunde
HA	Hämagglutinin
HEPES	2-[4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl]-ethansulfonsäure
HRP	<i>Horseradish peroxidase</i> , Meerrettich-Peroxidase
KD	<i>Knockdown</i>
kDa	Kilo-Dalton
LB-Medium	<i>Lysogeny Broth Medium</i>
MET	Mesenchymal-Epitheliale Transition
min	Minute
M-MuLV	<i>Moloney Murine Leukemia Virus Messenger</i>
mRNA	<i>messenger ribonucleic acid</i>
NTC	<i>non target control</i>
OD	<i>Optical density</i> , optische Dichte
PAGE	Polyacrylamidgelelektrophorese

Abkürzungen

PBS	Phosphatgepufferte Salzlösung
PCR	Polymerasekettenreaktion
PEI	Polyethylenimin
PKC	Proteinkinase C
PVDF	Polyvinylidenfluorid
rDNase	Rekombinante Desoxyribonuklease
RNA	Ribonukleinsäure
RNase	Ribonuklease
rpm	<i>Rounds per Minute</i> , Umdrehungen pro Minute
RT	Raumtemperatur
qRT-PCR	Quantitative <i>real-time</i> Polymerasekettenreaktion
SDS	<i>Sodiumdodecyl sulfate</i> , Natriumdodecylsulfat
sec	Sekunde
shRNA	<i>short hairpin</i> RNA
siRNA	<i>small interfering</i> RNA
TBS	Tris-gepufferte Salzlösung
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylethylendiamin
V	Volt
v/v	Volumen pro Volumen
w/v	Masse pro Volumen

1. Zusammenfassung

Der zur *Grainyhead*-Familie gehörende Transkriptionsfaktor *Grainyhead-like 2* (GRHL2) spielt eine wichtige Rolle während der Embryonalentwicklung und bei der Morphogenese und Differenzierung von Epithelzellen. In jüngster Zeit konnte darüber hinaus in zahlreichen Studien gezeigt werden, dass GRHL2 auch eine große Bedeutung bei der Entstehung und Progression unterschiedlichster Tumoren besitzt, indem es als potenter Suppressor der Epithelial-Mesenchymalen Transition (EMT) die Metastasierung von Tumoren unterdrücken, aber auch als Onkogen das Tumorwachstum fördern kann. Ziel dieser Arbeit war es, neue Mechanismen der Regulation der Aktivität oder Expression des GRHL2-Transkriptionsfaktors in Tumorzellen zu identifizieren, um dadurch ein besseres Verständnis der Rolle von GRHL2 bei der Entstehung und Progression des humanen Mammakarzinoms zu erlangen.

Im Rahmen dieser Arbeit konnten zwei neuartige, sehr unterschiedliche Mechanismen der Regulation von GRHL2 in Tumorzellen identifiziert werden:

1.) Phosphorylierungs-abhängige Regulation der Stabilität des GRHL2-Proteins

- Durch die Identifizierung von drei Phosphorylierungsstellen innerhalb des GRHL2-Proteins (S²¹⁰, T²¹¹, S²¹⁴) konnte erstmals der Nachweis erbracht werden, dass es sich bei dem Transkriptionsfaktor GRHL2 um ein nukleäres Phosphoprotein handelt.
- Es gelang die Herstellung und Charakterisierung Phospho-spezifischer Antikörper gegen alle drei Phosphorylierungsstellen von GRHL2, die als wertvolle Forschungsreagenzien für weitere Untersuchungen zur Verfügung stehen.
- Es konnte gezeigt werden, dass alle drei Phosphorylierungsstellen innerhalb einer PEST-Sequenz (AS S²¹⁰ - F²²⁰), die Teil eines ausgedehnten Degrons innerhalb des GRHL2-Proteins ist, lokalisiert sind.
- Umfassende Mutationsanalysen und der Einsatz des Proteinbiosynthese-Inhibitors Cycloheximid (CHX) belegten, dass die Phosphorylierungen innerhalb der PEST-Sequenz die Stabilität von GRHL2 unterschiedlich beeinflussen. Eine Phosphorylierung von GRHL2 an den Resten S²¹⁰ und T²¹¹ induzierte eine erhöhte Halbwertszeit und damit Stabilität des GRHL2-Proteins, wohingegen die Phosphorylierung an S²¹⁴ eher destabilisierend wirkte.
- Mit Hilfe aufwendiger *Screening*-Verfahren und durch den gezielten Einsatz von Kinase-Inhibitoren, konnten erste Kandidaten-Kinasen für die Phosphorylierung an den drei Resten S²¹⁰, T²¹¹, S²¹⁴ des GRHL2-Proteins identifiziert werden.

Obwohl Kinasen und Signalwege, die zur Phosphorylierung von GRHL2 innerhalb des eine PEST-Sequenz enthaltenen Degrons noch nicht eindeutig identifiziert werden konnten, belegen

die Resultate dieser Arbeit die Existenz eines neuartigen Regulationsmechanismus', der auf der posttranslationalen Regulation der GRHL2-Proteinstabilität in Tumorzellen beruht.

2.) Transkriptionelle Regulation der GRHL2-Expression in Tumorzellen

- Eine Stimulation mit dem Phorbol ester Phorbol-2-myristat-3-acetat (PMA), einem potenten Aktivator der Protein-Kinase C (PKC), induzierte eine signifikante Reduktion der GRHL2-Expression in einer Reihe von Mammakarzinomzelllinien, die unterschiedliche Subtypen dieser Tumorentität repräsentieren.
- Die Herabregulation der GRHL2-Expression erwies sich zeit- und konzentrationsabhängig.
- Die vergleichende Analyse der GRHL2 mRNA- und Protein-Expression in PMA-stimulierten Zellen ergab, dass die Herabregulation der GRHL2-Expression auf der transkriptionellen Ebene erfolgt.
- Durch den gezielten Einsatz unterschiedlicher Inhibitoren und einen siRNA-vermittelten *Knockdown* verschiedener PKC-Isoformen, konnte PKC δ als diejenige Kinase identifiziert werden, die die Herabregulation von GRHL2 in Mammakarzinomzellen induziert.
- Durch bioinformatische Analysen konnte eine kleine Anzahl von Transkriptionsfaktoren (z.B. SP1) identifiziert werden, die möglicherweise die PKC δ -induzierte Suppression der GRHL2-Expression in Mammakarzinomzellen vermitteln könnte.

Obwohl es noch einiger weiterführender Untersuchungen bedarf, kann zusammenfassend festgestellt werden, dass in dieser Arbeit zwei neuartige, mechanistisch sehr unterschiedliche Regulationsmechanismen identifiziert werden konnten, die die Expression und Aktivität des Transkriptionsfaktors GRHL2 in Mammakarzinomzellen modulieren. Mit der Identifizierung und teilweisen Aufklärung dieser neuen regulatorischen Prinzipien konnte ein wesentlicher Beitrag zum besseren Verständnis der Rolle des Transkriptionsfaktors GRHL2 bei der Entstehung und Progression des Mammakarzinoms geleistet werden.

1.1. **Abstract**

The transcription factor Grainyhead-like 2 (GRHL2), which belongs to the Grainyhead family, plays an important role during embryonic development and morphogenesis and differentiation of epithelial cells. In recent years, a multitude of studies have shown that GRHL2 also is very important for the development and progression of a wide variety of tumors by potently suppressing the epithelial-mesenchymal transition (EMT) and metastasis of tumors, but also through its oncogenic activity promoting tumor growth. The objective of this work was to identify novel mechanisms of regulation of the activity or expression of the GRHL2 transcription factor

in tumor cells to pave the way for a better understanding of the role of GRHL2 in the development and progression of human breast cancer.

In this study, two novel, very different mechanisms of regulation of GRHL2 in tumor cells could be identified:

1.) Phosphorylation-dependent regulation of the stability of the GRHL2 protein

- By identifying three phosphorylation sites within the GRHL2 protein (S²¹⁰, T²¹¹, S²¹⁴), it was possible to prove for the first time that the transcription factor GRHL2 is a nuclear phosphoprotein.
- Phospho-specific antibodies against all three phosphorylation sites within GRHL2 were generated and characterized. These valuable research reagents are available for further investigations.
- It could be shown that all three phosphorylation sites are located within a PEST sequence (aa S²¹⁰ - F²²⁰), which is part of an extensive degron within the GRHL2 protein.
- Through comprehensive mutation analyses and the use of the protein biosynthesis inhibitor cycloheximide (CHX), it could be demonstrated that phosphorylation of the PEST sequence differentially influences the stability of the GRHL2 protein. Modifications at residues S²¹⁰ and T²¹¹ induced an increased half-life and thus stability of the GRHL2 protein, whereas phosphorylation at S²¹⁴ rather evoked destabilization of the GRHL2 protein.
- By means of complex screening approaches and pharmacological inhibition of selective kinases, candidate kinases for phosphorylation of residues S²¹⁰, T²¹¹, S²¹⁴ of the GRHL2 protein could be identified.

Although kinases and signaling pathways involved in the phosphorylation of GRHL2 within the degron containing a PEST sequence could not unequivocally be identified, the results of this work still demonstrate the existence of a novel, posttranslational regulatory mechanism of GRHL2 protein stability in tumor cells.

2.) Transcriptional regulation of GRHL2 expression in tumor cells

- Stimulation with the phorbol ester phorbol-2-myristate-3-acetate (PMA), a potent activator of protein kinase C (PKC), induced a significant reduction in GRHL2 expression in a number of breast cancer cell lines representing different subtypes of this tumor entity.
- Downregulation of GRHL2 expression was shown to be time and concentration dependent.

- Comparative analysis of the GRHL2 mRNA and protein expression in PMA-stimulated cells revealed that downregulation of GRHL2 expression occurs on the transcriptional level.
- By means of selective PKC inhibitors and siRNA-mediated knockdown experiments of distinct PKC isoforms, the PKC δ -isoform could be identified as the kinase mediating downregulation of GRHL2 in breast cancer cells.
- Through bioinformatic analyses, a set of candidate transcription factors (e.g., SP1) mediating the PKC δ -induced suppression of GRHL2 expression in breast cancer cells could be identified.

Although some further investigations still are required, it can be concluded that in this study two novel, mechanistically distinct regulatory pathways modulating the expression and activity of the transcription factor GRHL2 in breast cancer cells could be identified. The identification and partial elucidation of these novel regulatory mechanisms contributes significantly to a better understanding of the role of the transcription factor GRHL2 in the development and progression of breast cancer.

2. Einleitung

Ein gemeinsames Merkmal maligner Tumoren ist ihre Fähigkeit, sich vom Ort des Primärtumors abzusondern und in weiter entfernt liegenden Organen Metastasen zu bilden. Zum Zeitpunkt der Diagnose hat bei sehr vielen Patienten eine Streuung der Tumorzellen in andere Organe bereits stattgefunden, so dass eine Heilung nur noch schwer zu erzielen ist. Tumormetastasierung stellt demnach die Hauptursache für Therapieversagen und den Tod von Krebspatienten dar. Trotz großer Fortschritte bei der Diagnose und Therapie von Primärtumoren, stellt die Behandlung von Patienten mit Metastasen nach wie vor eine große Herausforderung dar. Folglich ist es von großem Interesse, die molekularen Mechanismen der Metastasierung als Grundlage für eine verbesserte Behandlung von Krebspatienten genauer zu verstehen. In den letzten Jahren wurde der Epithelial-Mesenchymalen-Transition (EMT), einem morphogenetischen Programm, von dem angenommen wird, dass es den komplexen Prozess der Tumormetastasierung regulieren könnte, eine besondere Aufmerksamkeit zuteil. Im Mittelpunkt stehen hierbei Moleküle oder Signalwege, die die EMT induzieren oder inhibieren und dadurch den Metastasierungsprozess beeinflussen. Einer dieser wichtigen Regulatoren ist der weitestgehend uncharakterisierte Transkriptionsfaktor Grainyhead-like 2 (GRHL2). Im Rahmen dieser Arbeit sollten neuartige Mechanismen der Regulation der Expression oder Aktivität des Transkriptionsfaktors GRHL2 in Mammakarzinomzellen untersucht werden, um dadurch zu einem besseren Verständnis der Rolle von GRHL2 bei der Metastasierung von Tumoren zu gelangen.

2.1. Tumormetastasierung

Etwa 90 % aller tumorassoziierten Todesfälle sind auf Metastasen zurückzuführen (Gupta & Massagué, 2006; Lambert et al., 2017). Die Tumormetastasierung ist hochkomplex und wird häufig als mehrstufiger Prozess in Form einer metastatischen Kaskade beschrieben. Dabei verlieren epitheliale Zellen im Gewebsverband zunächst ihre Zell-Zell-Adhäsion, und es lösen sich einzelne Zellen vom Primärtumor ab. Der erworbene Verlust der Anoikis-Sensitivität bewahrt die Tumorzellen vor dem programmierten Zelltod, der normalerweise eingeleitet wird, sobald Zellen ihren Zellverband und die Extrazelluläre Matrix (EZM) verlassen (Babaei et al., 2021; Frisch et al., 2013; Simpson et al., 2008). Es kommt zur lokalen Invasion von Tumorzellen durch die Basalmembran und in das umgebende Stroma des Primärtumors. Durch Intravasation in das Blut- oder Lymphsystem können die nun zirkulierenden Tumorzellen (CTCs; *circulating tumor cells*) in entfernte Gewebe gelangen (Alix-Panabières & Pantel, 2021; Heidrich et al., 2021; Kelley & Pantel, 2020). CTCs migrieren entweder als einzelne Zellen oder im *Cluster*. Im *Cluster* haben die Zellen einen Überlebensvorteil und sind resistenter gegenüber den in der Zirkulation vorherrschenden mechanischen Kräften. Außerdem helfen Immun- und Stromazellen innerhalb dieser *Cluster* das Immunsystem zu umgehen. Das Potenzial von CTC-

Clustern, Metastasen zu bilden, ist im Vergleich zu einzelnen CTCs ungefähr 50-fach erhöht. (Aceto et al., 2014; Bardelli & Pantel, 2017; Cheung et al., 2016; Kelley & Pantel, 2020). CTCs können sich im Kapillarbett eines Zielorgans festsetzen und nach erfolgreicher Extravasation in das Organparenchym wandern. Diese disseminierten Tumorzellen (DTCs; *disseminated tumor cells*) können zunächst als Mikrometastasen in einem dormanten Zustand im Sekundärorgan verharren, ehe sie zu klinisch nachweisbaren Makrometastasen heranwachsen. Die Dormanz der Zellen kann unterschiedlich lange Zeitspannen umfassen und bis zu mehreren Jahren andauern (Endo & Inoue, 2019; Recasens & Munoz, 2019). Verfügen die Mikrometastasen über eine ausreichende Anpassung an die neue Mikroumgebung und durch die Neubildung von Blutgefäßen auch eine ausreichende Versorgung mit Nährstoffen, können detektierbare Makrometastasen entstehen. Klinisch relevante Metastasen können sich allerdings nur dann bilden, wenn die gesamte Metastasierungskaskade erfolgreich durchlaufen wird und die Zellen einer möglichen Immunantwort entgehen (Chiang & Massagué, 2008; Fidler, 2003; Lamouille et al., 2014). Daher ist die Metastasierung ein höchst ineffizienter Prozess, bei dem nur ein Bruchteil der CTCs Mikrometastasen bilden und auch nur wenige Tumorzellen tatsächlich zu Makrometastasen heranwachsen (Vanharanta & Massagué, 2013).

Es wird angenommen, dass die Epithelial-Mesenchymale Transition (EMT) eine entscheidende Rolle bei der Tumormetastasierung spielt (Dongre & Weinberg, 2019; Jolly et al., 2017).

2.2. Die Epithelial-Mesenchymale Transition (EMT)

Die Epithelial-Mesenchymale Transition (EMT) beschreibt ein morphogenetisches Programm, in dessen Verlauf epitheliale Zellen ihre charakteristische Proteinexpression, Zellpolarität und Morphologie verlieren und stattdessen sukzessive mesenchymale Eigenschaften erlangen. Verläuft dieser reversible Prozess in die entgegengesetzte Richtung, spricht man von einer Mesenchymal-Epithelialen Transition (MET) (Kalluri & Weinberg, 2009; Lamouille et al., 2014; Yang et al., 2020).

Elizabeth Hay beschrieb das Phänomen der EMT erstmals 1968 im Zusammenhang mit der Primitivstreifenbildung während der Embryogenese in Hühnern (Hay, 1968). Seither ist die EMT zu einem bedeutenden Forschungsschwerpunkt geworden, weil sie nicht nur in der Embryogenese, sondern auch während der Wundheilung und Tumorprogression und -metastasierung eine wichtige Rolle spielt (Bhatia et al., 2020; Kalluri & Weinberg, 2009; Lamouille et al., 2014). Aufgrund der unterschiedlichen funktionellen Bedeutung und dem jeweiligen biologischen Kontext wurden drei Subtypen der EMT definiert (Kalluri & Weinberg, 2009; Zeisberg & Neilson, 2009).

Die während der Embryogenese stattfindenden EMT-Prozesse werden als Typ 1 EMT zusammengefasst und sind für die Entwicklung des Embryos essenziell (Carver et al., 2001; M.

A. Nieto et al., 1994; Thiery et al., 1982). Zur Typ 2 EMT zählen solche Vorgänge, die bei der Geweberegeneration und -reparatur während der Wundheilung stattfinden. Dabei verschließen Keratinozyten die Wunde und stellen die Integrität der Epithelbarriere wieder her (Savagner & Arnoux, 2009; Stone et al., 2016). Von der Typ 3 EMT spricht man im Zusammenhang der Tumorprogression und -metastasierung. Durchlaufen primäre Tumorzellen eine EMT, erlangen sie migratorische und invasive Eigenschaften, die sie dazu befähigen den Primärtumor zu verlassen und in entfernten Geweben Metastasen zu bilden (Kalluri & Weinberg, 2009). Damit stellt die Typ 3 EMT ein *Hallmark* der Tumormetastasierung (Hanahan & Weinberg, 2011) und einen Schwerpunkt in der Tumorforschung dar.

Trotz einiger Unterschiede der EMT-Subtypen weisen sie doch grundlegende Gemeinsamkeiten auf. So führt die Aktivierung des EMT-Programms in all diesen Prozessen zu Veränderungen in zahlreichen fundamentalen Aspekten der zellulären Physiologie. Diese beinhalten eine Reorganisation des Zytoskeletts und damit einhergehende Veränderungen in der Zellmorphologie von kubischem, Platten- oder Säulenepithel hin zu länglichen, spindelförmigen Zellen. Außerdem kommt es zum Verlust von Zelladhäsionsmolekülen und der apikal-basalen Zellpolarität, wobei die Zellen eine *front-rear*-Polarität erlangen. Die Zellen werden motiler und sind in der Lage, die EZM zu reorganisieren und abzubauen, was wiederum die Zellinvasion ermöglicht (Nieto et al., 2016).

2.2.1. Die Regulation der EMT

Der hochkomplexe Prozess der EMT wird durch das Zusammenspiel von Transkriptionskontrolle, epigenetischen Modifikationen, alternativem Spleißen, Proteinstabilität und die subzelluläre Lokalisation von Proteinen sowie diverse intrazelluläre Signalwege auf verschiedenen regulatorischen Ebenen induziert und moduliert (s. Abb. 2-1) (Dongre & Weinberg, 2019; Nieto et al., 2016). Durch die EMT kommt es zu einer Rekonfiguration des Expressionsmusters mindestens 400 verschiedener Gene (Tauben et al., 2010). Dabei lassen sich der epitheliale und der mesenchymale Zustand anhand verschiedener Markerproteine diskriminieren. Zu den epithelialen und während der EMT herabregulierten Markern zählen beispielsweise das *Adherens Junction*-Protein E-Cadherin oder die *Tight Junction*-Proteine Occludin, Zonula Occludens-1 (ZO-1) oder Claudine sowie verschiedene Connexine, die zu den *Gap Junction*-Proteinen gehören und die alle zur Aufrechterhaltung der apikal-basalen Polarität der Zellen beitragen. Die, während der EMT induzierten Proteine N-Cadherin, Vimentin, *Smooth Muscle Actin* (α SMA), Fibronectin und Vitronectin sind mesenchymale Markermoleküle (Dongre & Weinberg, 2019; Yeung & Yang, 2017). Die Expression dieser Markerproteine wird durch verschiedene sog. EMT-Transkriptionsfaktoren (EMT-TFs), die allein oder in Kooperation mit anderen Transkriptionsfaktoren eine partielle oder vollständige Re-Programmierung der Zellen induzieren können, vermittelt. Es konnten zahlreiche Signalwege oder Faktoren identifiziert

werden, die die Expression oder Aktivität der EMT-TFs und damit EMT bzw. MET modulieren. Hierzu zählen u.a. Wachstumsfaktoren, wie z.B. der epidermale Wachstumsfaktor (EGF) und TGF- β (*transforming growth factor beta*), die an Rezeptortyrosinkinasen bzw. den TGF- β -Rezeptor binden, aber auch Wnt oder *Jagged*-Proteine, die spezifisch den *Frizzled*- bzw. Notch-Signalweg aktivieren. Die Liganden-Rezeptor-Komplexe können den Phosphatidylinositol 3-Kinase (PI3K)/Akt-, *Nuclear Factor- κ B* (NF- κ B)-, den Smad-, den Hedgehog-, den JAK-STAT-, oder auch den Hippo-Signalweg aktivieren. Auch Hypoxie, vermittelt durch *hypoxia-inducible factor 1-alpha* (HIF-1 α), kann EMT-ähnliche Veränderungen hervorrufen (Dongre & Weinberg, 2019; Gonzalez & Medici, 2014).

Bekanntere Vertreter der EMT-TFs sind die Zinkfinger-Proteine der SNAIL-Familie (SNAIL1 und SNAIL2), die basischen Helix-Loop-Helix-Transkriptionsfaktoren (bHLH; *basic helix loop helix*) *Twist related protein 1* (TWIST1), TWIST2 und E47 sowie die E-Box-bindenden Homöobox-Transkriptionsfaktoren *Zinc finger E-box binding homeobox 1* (ZEB1) und ZEB2 (Lamouille et al., 2014; Peinado et al., 2007). Die EMT-TFs Snail1, Snail2, ZEB2 und E47 sind in der Lage über Bindung der E-Box-Motive innerhalb des E-Cadherin-Promotors, die Expression des Zelladhäsionsmoleküls direkt zu reprimieren. TWIST1, TWIST2 und ZEB1 sowie weitere EMT-TFs wie *Forkhead box C1* (FoxC1), FoxC2 und Goosecoid (GSC) regulieren die E-Cadherin-Expression indirekt herab (Díaz et al., 2014; J.-Y. Lee & Kong, 2016; Puisieux et al., 2014). Die Herabregulation von E-Cadherin hat neben dem Verlust der Zellpolarität zur Folge, dass β -Catenin freigesetzt wird. Dieses aktiviert wiederum den Wnt/ β -Catenin-Signalweg, der zu einem Abflauen der EMT beiträgt (Jeanes et al., 2008; Pećina-Slaus, 2003).

Weitere Regulationsmechanismen der EMT sind microRNA (miRNA)-vermittelt. Die miRNAs-103/107 und miRNA-9 fördern beispielsweise eine EMT (Ma et al., 2010; Park et al., 2008) während miRNA-200, miRNA-205 und miRNA-34 EMT-suppressorische Eigenschaften besitzen (J. Zhang & Ma, 2012).

Verschiedene Signale führen außerdem zum Abbau der EZM bzw. Basalmembran. TWIST1 induziert dabei die Bildung der Aktin-reichen Invadopodien, die die Matrixmetalloprotease (MMP)-7, MMP-9 und MMP-14 an ihrer Vorderkante rekrutieren und damit den proteolytischen Abbau umsetzen (Eckert et al., 2011; Yeung & Yang, 2017). Darüber hinaus werden MMPs unter anderem auch durch TGF- β aktiviert (Krstic & Santibanez, 2014). Die Aktin-Reorganisation und Bildung von *actin stress fibres* trägt zur Entwicklung der *back-front*-Polarität und Motilität der Zellen bei (Dongre & Weinberg, 2019; Lamouille et al., 2014).

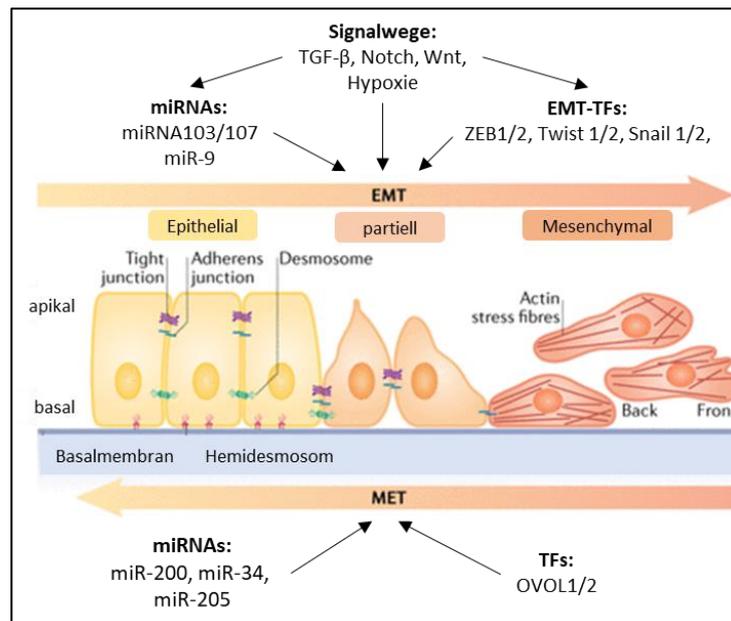


Abbildung 2-1: Die Epithelial-Mesenchymale Transition (EMT). Schematische Darstellung der EMT und des reversiblen Prozesses der MET mit ausgewählten Regulationsmechanismen. Erläuterungen siehe Text. Modifiziert nach (Dongre & Weinberg, 2019).

All diese Veränderungen können in unterschiedlichem Maße Teil einer EMT sein. Lange wurde angenommen, dass eine EMT immer den vollständigen Übergang von epithelialen Zellen (E) zu mesenchymalen Zellen (M) beschreibt. Mittlerweile ist bekannt, dass die EMT sich nicht wie ein binärer Schalter zwischen den beiden Zuständen verhält. Zellen durchlaufen nur äußerst selten ein komplettes EMT-Programm (Dongre & Weinberg, 2019; Nieto et al., 2016). Stattdessen ist die EMT ein hochdynamischer Prozess mit zahlreichen intermediären und reversiblen phänotypischen Zellzuständen (E/M), in denen die Zellen sowohl epitheliale als auch mesenchymale Eigenschaften in verschiedenen Kombinationen und Ausprägungen tragen. Dies verleiht ihnen ihre sogenannte phänotypische Plastizität und ermöglicht beispielsweise das Migrieren in *Clustern*, da einige Zellen etwa ihre Zelladhäsionsmoleküle nicht verlieren (Yang et al., 2020). Dabei ist ein hybrider EMT-Zustand nicht zwangsläufig ein Übergangszustand auf dem Weg zum mesenchymalen Phänotyp, sondern in sich stabil. Dafür sorgen sogenannte *phenotypic stability factors* (PSFs), die wie eine „molekulare Bremse“ verhindern, dass eine EMT vollständig abläuft. Zu diesen PSFs zählen die miRNA-145 und die Transkriptionsfaktoren OVOL2 und GRHL2 (Jolly et al., 2015; Jolly et al., 2016; Watanabe et al., 2014).

Die EMT führt in einigen Fällen zur Erlangung von stammzellähnlichen Eigenschaften der Tumorzellen (Mani et al., 2008). Diese wurden zunächst in Mammakarzinomzellen beobachtet, wo die für Stammzellen typischen Expressionsmuster der Oberflächenmarker CD44 und CD24 (CD44⁺/CD24⁻) identifiziert wurden (Al-Hajj et al., 2003; Scheel & Weinberg, 2012). In verschiedenen Studien konnte diese Beobachtung in weiteren Tumorentitäten bestätigt werden (Babaei et al., 2021; Celià-Terrassa & Jolly, 2020; Dongre & Weinberg, 2019). Die sogenannten

CSCs (*cancer stem cells*) können verschiedene Phänotypen auf der EMT/MET-Achse abbilden und zwischen ihnen konvertieren (Bocci et al., 2019; Liu et al., 2014; Thankamony et al., 2020), wobei bekannt ist, dass sie die Stammzeleigenschaften hauptsächlich im hybriden Zustand der EMT aufweisen und dass nach Durchlaufen einer kompletten EMT und damit dem Erwerb des mesenchymalen Phänotyps, die charakteristischen Merkmale wie Tumoringenierung, Chemoresistenz und Plastizität verloren gehen (Dongre & Weinberg, 2019; Fischer et al., 2015; Jolly et al., 2018; Pastushenko & Blanpain, 2019; Pastushenko et al., 2018; Thankamony et al., 2020). Diese vielfältigen, durch eine EMT ausgelösten zellulären und molekularen Veränderungen begünstigen letztlich Tumormetastasierung (Dongre & Weinberg, 2019; Jolly et al., 2017).

Über den umgekehrten Prozess der MET ist weniger bekannt. Dennoch konnten Faktoren identifiziert werden, die einer EMT entgegenwirken bzw. sie aufhalten können. Pattabiraman et al. konnten zeigen, dass die Proteinkinase A (PKA) die Histon-Demethylase PHF2 aktivieren und so die Expression epithelialer Gene fördern und eine MET auslösen kann (Pattabiraman et al., 2016). Außerdem konnte den Zinkfinger-Transkriptionsfaktoren OVOL1 und OVOL2 eine EMT-supprimierende Funktion in verschiedenen Tumorzelllinien zugewiesen werden (Roca et al., 2013). Und auch die miRNA-200-Familie, die mit dem EMT-TF ZEB1 eine reziproke *Feedback*-Schleife bildet, kann über dessen Inhibition eine EMT inhibieren (Burk et al., 2008; Gregory et al., 2008). Ein weiterer Faktor, der in der Lage ist, den Prozess der EMT zu supprimieren, stellt der bisher wenig charakterisierte Transkriptionsfaktor Grainyhead-like 2 (GRHL2) dar.

2.3. Der Transkriptionsfaktor Grainyhead-like 2

2.3.1. Die Familie der Grainyhead-Transkriptionsfaktoren

Das erste Mitglied der Familie der Grainyhead-Transkriptionsfaktoren wurde in der Taufliege *Drosophila melanogaster* (*D. melanogaster*) entdeckt. Dabei ist die Beobachtung, dass eine Mutation des entsprechenden Gens (*grh*) in Taufliegen zu einer losen embryonalen Kutikula und anatomischen Deformationen des Kopfes („*grainy head*“) führt, namensgebend für die Familie der Transkriptionsfaktoren (Nüsslein-Volhard et al., 1984). Unabhängig von dieser Studie wurde *grainyhead* in weiteren Arbeiten als *Element 1-binding activity factor* (Elf-1) und *Neurogenic element-binding transcription factor* (Ntf-1) beschrieben und erst später als *grainyhead* erkannt (Bray & Kafatos, 1991; Dynlacht et al., 1989). In *D. melanogaster* wurde *grainyhead* als Transkriptionsfaktor identifiziert, der die Expression der für die embryonale

Entwicklung relevanten Gene *Ultrabithorax (Ubx)*, *Drosophila Dopa Decarboxylase (Ddc)* und *fushi tarazu (ftz)* reguliert (Biggin & Tjian, 1988; Bray & Kafatos, 1991; Dynlacht et al., 1989).

Doch nicht nur in *D. melanogaster* ist Grainyhead vorhanden. Der Transkriptionsfaktor ist über verschiedene Artgrenzen hinweg hochkonserviert und ist von Insekten bis hin zum Menschen vorzufinden (Sundararajan et al., 2020). Während in *D. melanogaster* CP2 (*CCAAT box-binding protein 2*) und *grainyhead* die einzigen Vertreter dieser Transkriptionsfaktor-Familie sind, besteht die humane Grainyhead-Familie aus sechs Mitgliedern, die basierend auf Sequenzanalysen und unterschiedlicher DNA-Bindungseigenschaften in zwei phylogenetische Zweige unterteilt werden. Dabei sind die humanen Gene, die für Grainyhead-like 1 (GRHL1), GRHL2 und GRHL3 kodieren, Orthologe des *grh*-Gens der Taufliege. Die für *late SV40 factor* (LSF), *Leader binding protein 1a* (LBP-1a) und LBP-9 kodierenden Gene sind eher mit dem CP2-Gen der Taufliege verwandt. (Ting et al., 2003; Traylor-Knowles et al., 2010; Uv et al., 1997; Venkatesan et al., 2003; T. Wilanowski et al., 2002).

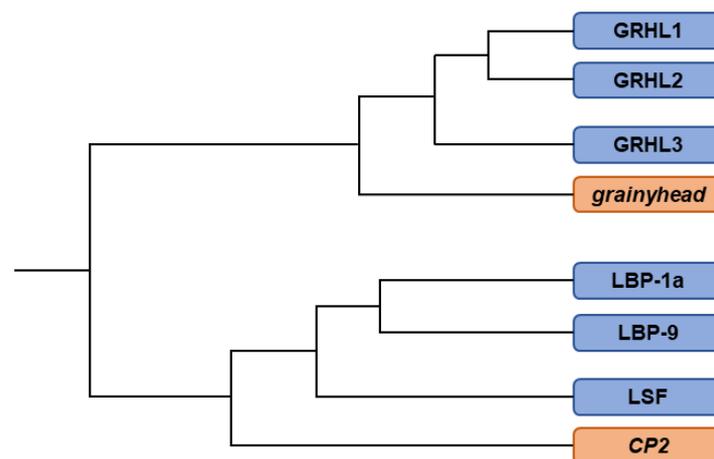


Abbildung 2-2: Phylogenetischer Stammbaum der Familie der Grainyhead-Transkriptionsfaktoren.
Erläuterungen siehe Text. Modifiziert nach (Ting et al., 2003).

Die Transkriptionsfaktoren der CP2/GRH-Familie sind an einer Reihe wichtiger physiologischer, aber auch pathologischer Vorgänge beteiligt. Die drei GRHL-Proteine spielen beispielsweise in verschiedenen physiologischen Prozessen wie Embryogenese und Wundheilung eine entscheidende Rolle, werden aber auch mit unterschiedlichen Tumorerkrankungen in Verbindung gebracht (Auden et al., 2006; Frisch et al., 2017; Mlacki et al., 2015). Besonders GRHL2 ist im Kontext der Tumorforschung in den letzten Jahren in den Fokus gerückt (Frisch et al., 2017; Mlacki et al., 2015; Reese et al., 2019).

2.3.2. Die Struktur des Transkriptionsfaktors GRHL2

Der humane Transkriptionsfaktor GRHL2 wird von dem GRHL2-Gen auf Chromosom 8q22.3 kodiert. Dieses umfasst etwa 177 kb mit 16 Exons und resultiert in einem Protein, das aus 625

Aminosäuren besteht und ein Molekulargewicht von etwa 71 kDa aufweist (Uv et al., 1997; Tomasz Wilanowski et al., 2002).

GRHL2 besitzt drei funktionelle Domänen: die Transaktivierungsdomäne (TAD) am N-Terminus, die zentral lokalisierte DNA-Bindungsdomäne (DBD) und die Dimerisierungsdomäne (DD) am C-Terminus (s. Abb. 2-3). Die Isoleucin-reiche TAD erstreckt sich von Position 1-133 und aktiviert die Transkription von Zielgenen (Attardi & Tjian, 1993). Die DBD, die sich von Position 247 bis 484 erstreckt, enthält eine aus neun Aminosäuren bestehende Sequenz (FCDKGAERK), die genauso auch in *D. melanogaster grh* und in GRHL1 und GRHL3 zu finden ist. Damit stellt die DNA-Bindungsdomäne einen hoch konservierten Sequenzabschnitt dar, der ausschlaggebend für die Bindung an die GRHL Konsensus-Sequenz (5'-AACCGGTT-3') ist (Boglev et al., 2011; Ming et al., 2018; Papadopoulos & Agarwala, 2007; Reese et al., 2019). Außerdem weist die DBD mit ihrer Immunglobulin-ähnlichen Faltung eine starke strukturelle Ähnlichkeit zu p53 auf (Kokoszyńska et al., 2008; Rudolph & Gergen, 2001). Die Ubiquitin C (UBC)-ähnliche DD umfasst die Reste 494-625 und ermöglicht eine Homodimerisierung sowie eine Heterodimerisierung mit GRHL1 und GRHL3 (Kokoszyńska et al., 2008; Shirra & Hansen, 1998; Wang & Samakovlis, 2012; Tomasz Wilanowski et al., 2002).



Abbildung 2-3: Schematische Darstellung der Struktur des GRHL2-Proteins. GRHL2 lässt sich in die drei funktionellen Domänen für Transaktivierung, DNA-Bindung und Dimerisierung einteilen (siehe Haupttext).

2.3.3. Expression und physiologische Relevanz von GRHL2

Riethdorf et al. konnten mithilfe der *Tissue-Microarray* Methode zeigen, dass GRHL2 in gesundem Gewebe bevorzugt in epithelialen Zellen exprimiert ist (Riethdorf et al., 2016). Die Expression konnte in variabler Intensität unter anderem in Epithelzellen der Nieren, der Lunge, der Prostata und der Mamma nachgewiesen werden. Die nicht epithelialen Zellen in der glatten Muskulatur der Magen-, Darm- oder Ösophaguswand oder die glatten Muskelzellen des linken Herzventrikels, in denen eine Expression des Proteins ebenfalls vorhanden ist, stellen eine Ausnahme dar (Riethdorf et al., 2016).

Diese Beobachtungen stehen im Einklang mit der von verschiedenen Arbeitsgruppen beschriebenen Funktion des ausschließlich nukleär exprimierten GRHL2 als Regulator der epithelialen Morphogenese und Integrität (Pyrgaki et al., 2011; Werth et al., 2010). Mäuse mit einem *GRHL2-Knockout* versterben aufgrund von Defekten bei der Neuralrohrschließung, der Tubulogenese der Niere und der Verzweigung der Trophoblastenzellen bereits an Tag 11,5 der Embryogenese (Pyrgaki et al., 2011; Rifat et al., 2010; Walentin et al., 2015; Werth et al., 2010).

Eine *nonsense*-Mutation im GRHL2-Gen, ausgelöst durch N-Ethyl-N-nitrosoharnstoff (ENU), führt zur embryonalen Letalität an Tag 12,5. Diese tritt als Folge von Fehlbildungen bei der Neuralrohrschließung und der Entwicklung des Herzens auf (Pyrgaki et al., 2011). Aber nicht ausschließlich der Verlust von GRHL2 hat negative Auswirkungen auf die Entwicklung von Embryonen. So zeigt sich in einem Mausmodell mit GRHL2-Überexpression ebenfalls eine Neuralrohrfehlbildung, die als *Spina Bifida* („offener Rücken“) bezeichnet wird (Brouns et al., 2011). Darüber hinaus spielt GRHL2 eine essenzielle Rolle bei der Morphogenese der Lungenverzweigung, der Aufrechterhaltung des mukoziliaren Flimmerepithels in der Lunge und der Tubulogenese der Niere (Aue et al., 2015; X. Gao et al., 2013; Varma et al., 2012).

Seine Rolle als epithelialer Transkriptionsfaktor zeigt sich ebenfalls in der Regulation verschiedener, für die epitheliale Integrität und den Ausbau von Zell-Zell-Adhäsionskomplexen entscheidender Gene. GRHL2 beeinflusst die Expression des *adherens junction* Proteins E-Cadherin und der *tight junction* Proteine Claudin 3 und Claudin 4 positiv durch direkte Bindung an die jeweiligen Promotoren. Ebenso ist Rab25, welches zu einer erhöhten Expression von Claudin 4 an den *tight junctions* führt, ein Zielgen des GRHL2-Transkriptionsfaktors. Zudem reguliert GRHL2 die Transkriptionsfaktoren Nkx2-1 und OVOL2, die ebenfalls mit der Aufrechterhaltung des epithelialen Zustands von Zellen in Verbindung gebracht werden (Aue et al., 2015; Senga et al., 2012; Varma et al., 2012; Werth et al., 2010).

Weiteren Untersuchungen zufolge agiert GRHL2 nicht ausschließlich als einfacher Transkriptionsfaktor, sondern darüber hinaus auch als sogenannter *Pioneer Factor*, der die Zugänglichkeit des Chromatins erhöht und damit die Bindung weiterer Transkriptionsfaktoren fördert (Reese et al., 2019; Zaret & Carroll, 2011). Es konnte gezeigt werden, dass ein *Knockout* der drei humanen GRHL-Proteine in der Mammakarzinomzelllinie MCF-7 zu einer Reduktion der Chromatin-Zugänglichkeit führt (Jacobs et al., 2018). Der *Knockout* von GRHL2 in Epiblasten-ähnlichen Zellen bestätigt diese Beobachtung (A. F. Chen et al., 2018). Eine epigenetische Funktion von GRHL2 zeigt sich außerdem darin, dass eine GRHL2-Expression beispielsweise essenziell ist, um aktivierende Histonmodifikationen im Promotor des E-Cadherin-Gens aufrechtzuerhalten. So resultiert der Verlust von GRHL2 in murinen Nierenzellen in einer Abnahme der Acetylierung von Lysin 9 und 14 im Histon 3 (H3K9/14ac) des E-Cadherin-Promotors (Werth et al., 2010).

GRHL2 wird außerdem mit verschiedenen Krankheiten in Verbindung gebracht. So sind diverse Veränderungen im GRHL2-Gen bekannt, die zu Taubheit führen können. Peters et al. konnten als Ursache für einen autosomal dominanten, nicht-syndromischen Hörverlust eine Leserasterverschiebung feststellen, die in einem verfrühten Stopp-Codon in Exon 14 resultiert, so dass GRHL2 als *autosomal-dominant deafness gene* (DFNA28) einzuordnen ist (Peters et al., 2002). Verschiedene Einzelnukleotid-Polymorphismen (SNPs) konnten als Ursache für

Lärm-induzierten und altersbedingten Hörverlust identifiziert werden (X. Li et al., 2013; Van Laer et al., 2008; Zhang et al., 2015). Ein weiterer Auslöser für die Krankheit ist eine Mutation des ersten Nukleotids in Exon 10, die zu einer Verschiebung der Spleiß-Position und dem Verlust dieses ersten Nukleotids führt, was wiederum in der Verwendung eines so entstandenen Stopp-Codons resultiert (Vona et al., 2013).

Diese Beispiele zeigen deutlich, dass GRHL2 neben einer physiologischen auch eine pathophysiologische Relevanz besitzt. Von besonderem Interesse ist dabei die mögliche, teilweise sogar gegensätzliche Bedeutung von GRHL2 in unterschiedlichen Tumoren.

2.3.4. Die Bedeutung von GRHL2 bei der Entstehung und Progression von Tumoren

Das Expressionsmuster des Transkriptionsfaktors GRHL2 in verschiedenen Tumorentitäten ist sehr komplex (Riethdorf et al., 2016). Eine Expression findet sich beispielsweise in Mammakarzinomen, in kolorektalen Karzinomen, in Ovarialkarzinomen oder hepatozellulären Karzinomen (Quan et al., 2014; Riethdorf et al., 2016; Tanaka et al., 2008). In diversen Tumorentitäten wurden Kopienzahlvariationen (*copy number variations*) beobachtet und in etwa 5 % der Fälle tritt eine Amplifikation des GRHL2-Gens auf. Im *Metastatic Breast Cancer Project* (2018) wurde sogar eine Quote der GRHL2-Amplifikation von 20 % ermittelt (Reese et al., 2019). Es konnte aber auch gezeigt werden, dass eine erhöhte Genzahl durch Polyploidie oder Amplifikation nicht zwangsläufig in einem erhöhten mRNA- oder Protein-Niveau von GRHL2 resultiert (Riethdorf et al., 2016). Die Bedeutung des Transkriptionsfaktors GRHL2 für unterschiedliche Tumorentitäten lässt sich auf der Basis der bisher publizierten Daten vieler Arbeitsgruppen nicht eindeutig definieren (Frisch et al., 2017; Mlacki et al., 2015; Sundararajan et al., 2020). Tatsächlich gibt es Hinweise dafür, dass GRHL2 als EMT- bzw. Tumor-Suppressor, aber auch als ein das Tumorwachstum förderndes Onkogen fungieren könnte (Frisch et al., 2017; Kotarba et al., 2020; Mlacki et al., 2015; Sundararajan et al., 2020).

Verschiedene Sachverhalte unterstützen die Hypothese, dass GRHL2 eine Funktion als Tumor-Suppressor ausüben könnte. So konnte gezeigt werden, dass ein Verlust von GRHL2 in Prostata-, Ovarial-, Mundhöhlen- oder Lungenkarzinomzelllinien zu einer erhöhten Migration und/oder Invasion führt, was darauf hindeutet, dass GRHL2 diese Prozesse normalerweise unterbindet (Chen et al., 2016; Chung et al., 2016; Paltoglou et al., 2017; Pan et al., 2017). Damit einhergehend induziert eine Überexpression von GRHL2 in Zelllinien von humanem Magen- und Mammakarzinom eine Reduktion der Migration und Invasion (Cieply et al., 2012; Werner et al., 2013; Xiang et al., 2017). Eine hohe GRHL2-Expression in Sarkomen korreliert mit erhöhtem Metastasen-freiem Überleben (Somarelli et al., 2016), und im Gebärmutterhalskrebs wird eine schwache GRHL2-Expression mit *high-grade* Tumoren in

Verbindung gebracht (Torres-Reyes et al., 2014). Werner et al. konnten zudem zeigen, dass die GRHL2-Expression an der invasiven Front primärer Mammakarzinome herabreguliert wird und dass ein solcher Verlust mit verstärktem Auftreten von Lymphknotenmetastasen assoziiert ist (Werner et al., 2013).

Es wird angenommen, dass die tumorsupprimierende Funktion des GRHL2-Transkriptionsfaktors hauptsächlich durch dessen Aktivität als EMT-Suppressor bedingt ist (Sundararajan et al., 2020). Von großer Bedeutung sind dabei unter anderem die epithelialen Marker E-Cadherin, Claudin 3 und Claudin 4, die als Zielgene von GRHL2 in ihrer Expression positiv beeinflusst werden (Almeida & Bray, 2005; Cieply et al., 2012; Senga et al., 2012; Werth et al., 2010). So führt beispielsweise ein *Knockdown* (KD) von GRHL2 in der Mammaepithelzelllinie MCF-10A zu einer verminderten E-Cadherin-Expression und hat damit eine EMT-fördernde Wirkung (Xiang et al., 2012). Auch die von der eigenen und anderen Arbeitsgruppen identifizierte reziproke *Feedback*-Schleife zwischen dem EMT-TF ZEB1 und GRHL2 belegt die EMT-suppressive Funktion von GRHL2 (Cieply et al., 2013; Werner et al., 2013). Diese gegenseitige Herabregulation konnte im Mammakarzinom (Werner et al., 2013), kolorektalen Karzinom (Quan et al., 2014), Ovarialkarzinom (Chung et al., 2016) und Blasenkarzinom (Shen et al., 2020) nachgewiesen werden. Über die Mikro-RNA miR-200, welche ein weiteres direktes Ziel von GRHL2 darstellt, kann GRHL2 ebenfalls eine ZEB1-gesteuerte EMT in Karzinomzellen inhibieren (Chung et al., 2016; Cieply et al., 2013; Gregory et al., 2011). Auffällig ist außerdem, dass GRHL2 vor allem in besonders aggressiven Mammakarzinom-Subtypen herunterreguliert ist, die als „*Claudin-low*“ bezeichnet werden und ein mesenchymales Expressionsprofil aufweisen (Cieply et al., 2012; Xiang et al., 2012; X. Yang et al., 2013). Die ektopische Expression von GRHL2 in solchen Zelllinien (z.B. MDA-MB-231) führt zur Reversion der EMT und stellt die Sensitivität gegenüber Anoikis wieder her (Chen et al., 2016; Farris et al., 2016). Auch in *cancer stem cells* (CSC) führt eine Überexpression von GRHL2 zur erneuten Erlangung der Anoikis-Sensitivität (Cieply et al., 2012). Die Inhibition der Histon-Acetyltransferase p300, die mesenchymale Gene positiv beeinflusst, gilt ebenfalls als Hinweis auf eine EMT-suppressive Funktion von GRHL2 (Pifer et al., 2016).

Neben Befunden, die GRHL2 eher als einen möglichen Tumor-Suppressor ausweisen, gibt es aber auch Hinweise für eine das Tumorwachstum fördernde Funktion von GRHL2. Verglichen mit Normalgewebe zeigt sich in diversen Tumorentitäten, wie dem Mamma- oder kolorektalen Karzinom, eine Überexpression von GRHL2 (Riethdorf et al., 2016), die z.B. beim kolorektalen Karzinom mit der Tumorgroße korreliert (Quan et al., 2015). Im Einklang mit diesen Beobachtungen führt der KD von GRHL2 in Zelllinien des kolorektalen Karzinoms (HCT116, HT29) zu einem signifikanten Rückgang der Zellproliferation (Quan et al., 2014). In ausgewählten Tumorentitäten (z.B. Mammakarzinom, hepatozelluläres Karzinom und dem klarzelligen Nierenzellkarzinom) korreliert eine hohe GRHL2-Expression mit einer schlechten

Prognose und einem vermehrten Auftreten von Rezidiven oder Metastasen (Butz et al., 2014; Tanaka et al., 2008; Xiang et al., 2012; X. Yang et al., 2013). GRHL2 fördert die Proliferation verschiedener Zellen, zu denen Zelllinien des Mammakarzinoms (Werner et al., 2013), des hepatozellulären Karzinoms, des oralen Plattenepithelkarzinoms und des kolorektalen Karzinoms sowie humane Keratinozyten zählen (W. Chen et al., 2010; X. Kang et al., 2009; Quan et al., 2014; Quan et al., 2015; Tanaka et al., 2008). Damit einhergehend konnte ERBB3, ein Mitglied der epidermalen Wachstumsfaktorrezeptor-Familie und ein wichtiger Faktor für die Proliferation von Mammakarzinomzellen, als ein Zielgen von GRHL2 identifiziert werden. Ein KD der GRHL2-Expression führte in Mammakarzinomzelllinien zu einer reduzierten ERBB3-Expression und damit zu einer verminderten Proliferation der Zellen (Werner et al., 2013).

Die onkogene Eigenschaft von GRHL2 konnte außerdem durch seine Fähigkeit NIH3T3-Fibroblasten zu transformieren, belegt werden. Die Überexpression von GRHL2 führte zu signifikanten morphologischen Veränderungen der Zelllinie, sowie gesteigerter Proliferation und Verankerungs-unabhängigem Wachstum (Werner et al., 2013). Darüber hinaus konnte im Mammakarzinom gezeigt werden, dass GRHL2 durch seinen negativen Einfluss auf die Expression der Todesrezeptoren FAS und DR5 zur Apoptose-Resistenz beiträgt (Dompe et al., 2011). Im Plattenepithelkarzinom agiert GRHL2 als positiver Regulator der humanen Telomerase (hTERT), was auf eine Rolle von GRHL2 während der Immortalisierung von Zellen hindeutet (W. Chen et al., 2010; X. Kang et al., 2009).

Die Übersichtsarbeit von Reese et al. verdeutlicht, dass GRHL2 außerdem immer häufiger mit dem Hormonstatus von Tumoren in Verbindung gebracht wird. Es wird vermutet, dass GRHL2 eine Rolle in der transkriptionellen Regulation verschiedener Steroidhormonrezeptoren spielt (Reese et al., 2019). Viele Tumorentitäten, die eine starke GRHL2-Amplifikation aufweisen, sind hormonabhängig, wie beispielsweise das Ovarial-, Mamma- oder Prostatakarzinom (Cerami et al., 2012; J. Gao et al., 2013; Hoadley et al., 2018). So korreliert die GRHL2-Expression signifikant mit Estrogenrezeptor (ER) α -positiven Mammakarzinomproben im Vergleich zu ER α -negativen Tumoren (Ross-Innes et al., 2012; Werner et al., 2013). Mittels *rapid immunoprecipitation mass spectrometry* (RIME) konnte GRHL2 sogar als ein direkter Bindungspartner von ER α identifiziert werden (Mohammed et al., 2013). Die gleiche Methode zeigte auch, dass darüber hinaus der Progesteronrezeptor (PR) und der Androgenrezeptor (AR) Bindungspartner von GRHL2 darstellen (Mohammed et al., 2015; Paltoglou et al., 2017). GRHL2 und der AR bilden eine positive *Feedback*-Schleife, wobei GRHL2 nicht nur für den Erhalt der AR-Expression bedeutsam ist, sondern darüber hinaus auch als transkriptioneller Ko-Aktivatoren des Steroidhormonrezeptors fungiert und damit die Tumorzellproliferation fördert (Paltoglou et al., 2017). Helzer et al. konnten in ER-positiven Mammakarzinomzellen (MCF-7) nachweisen, dass GRHL2 in seiner Funktion als *Pioneer Factor* die Zugänglichkeit des Chromatins für den an Position S¹¹⁸ phosphorylierten, nicht aber für den nicht-phosphorylierten

ER an spezifische Zielsequenzen fördert. Somit erscheint die Annahme berechtigt, dass GRHL2 tatsächlich als ein onkogener Ko-Transkriptionsfaktor des Hormonrezeptors fungiert (Helzer et al., 2019).

Interessanterweise scheint GRHL2 zudem auch eine wichtige Bedeutung bei der Bildung von Resistenzen gegenüber einer endokrinen Therapie beim Mammakarzinom zu spielen. Cocce et al. konnten in Tamoxifen-resistenten MCF-7-Zellen eine erhöhte GRHL2-Proteinexpression im Vergleich zu Tamoxifen-sensitiven Zellen beobachten. Durch die funktionelle Kooperation von GRHL2 mit dem Transkriptionsfaktor FOXA1 wird eine Heraufregulation des Membranrezeptors LYPD3 und seines Liganden AGR2 induziert, die zu einer erhöhten Resistenz gegenüber endokrinen Therapien führt (Cocce et al., 2019).

Die außerordentlich wichtige Rolle von GRHL2 während der Embryogenese und für den Erhalt der epithelialen Integrität ist unbestritten. Die Rolle des Transkriptionsfaktors GRHL2 in unterschiedlichen Tumoren scheint aber weitaus komplexer zu sein, weil GRHL2 durch seine EMT-Suppressoraktivität als Tumorsuppressor, aber auch als das Tumorstadium förderndes Onkogen agieren und auch Therapieresistenz von Tumoren fördern kann.

3. Zielsetzung

Dem Transkriptionsfaktor GRHL2 werden in verschiedenen Tumorentitäten zum Teil gegensätzliche Funktionen zugeschrieben. So konnte einerseits eine suppressorische Funktion während der EMT und der Metastasierung des Mammakarzinoms gezeigt werden, gleichzeitig weisen Ergebnisse der eigenen und weiterer Arbeitsgruppen darauf hin, dass GRHL2 außerdem onkogene Eigenschaften besitzt, die Tumorwachstum fördern können. Das Ziel des vorliegenden Promotionsvorhabens bestand daher darin, durch die Identifizierung und Charakterisierung neuartiger Mechanismen der Regulation der Expression oder Aktivität des GRHL2-Transkriptionsfaktors zu einem besseren Verständnis der Rolle von GRHL2 bei der Entstehung und Progression des Mammakarzinoms zu gelangen.

Aufbauend auf noch unpublizierten Beobachtungen der eigenen Arbeitsgruppe, dass es sich bei GRHL2 um ein Phosphoprotein handeln könnte, sollten mögliche Phosphorylierungsstellen identifiziert und durch Erzeugung und Charakterisierung Aktivierungs-spezifischer Antikörper bestätigt werden. Anschließend sollte der Frage nachgegangen werden, welchen Einfluss jeweilige Phosphorylierungen auf die Expression und Aktivität des Transkriptionsfaktors haben. Durch den Einsatz verschiedener Inhibitoren und *in vitro* Kinasierungsassays sollten erste Hinweise auf Kandidaten-Kinasen und Signalwege gefunden werden, die die Expression oder Aktivität von GRHL2 durch Phosphorylierung in Tumorzellen modulieren.

Da bisher nur sehr wenig über mögliche transkriptionelle Mechanismen der Regulation der Expression von GRHL2 in Tumorzellen bekannt ist, sollten nicht nur posttranslationale, sondern auch transkriptionelle Regulationsmechanismen untersucht werden. Im Verlauf dieser Arbeit konnten erste Hinweise für einen neuartigen, von der Proteinkinase C (PKC) abhängigen Regulationsmechanismus gefunden werden. Eine eingehende molekulare Analyse dieses neuen, transkriptionellen Regulationsnetzwerkes bildete einen weiteren Schwerpunkt dieser Arbeit.

Die Identifizierung und partielle molekulare Analyse neuartiger posttranslationaler und transkriptioneller Mechanismen der Regulation der Expression oder Aktivität von GRHL2 in Mammakarzinomzellen sollte dazu beitragen, die Rolle des Transkriptionsfaktors GRHL2 beim Mammakarzinom und auch anderen Tumorentitäten besser zu verstehen.

4. Material

Im Anhang der Arbeit befindet sich eine Auflistung häufig verwendeter Laborgeräte (Tabelle 9-1), Verbrauchsmaterialien (Tabelle 9-2), Chemikalien und Kits (Tabelle 9-3), Oligonukleotide (Tabelle 9-4 bis 9-8) und Antikörper (Tabelle 9-11/12).

5. Methoden

5.1. Zellkulturmethoden

5.1.1. Kulturmedien

Je nach Anforderung der verschiedenen in dieser Arbeit verwendeten Zelllinien, die alle am Institut für Tumorbologie (UKE) vorhanden waren, wurden unterschiedliche Kulturmedien eingesetzt (Tabelle 5-1).

Tabelle 5-1: Zusammensetzung der verwendeten Zellkulturmedien

Zusammensetzung	Kulturmedium 1	Kulturmedium 2	Kulturmedium 3	Kulturmedium 4
Basismedium	DMEM (PAN Biotech GmbH, Aidenbach)	DMEM (PAN Biotech GmbH)	Leibovitz's L-15 Medium (1X) (Gibco, USA)	RPMI-1640 (PAN Biotech GmbH)
Serum (Capricorn Scientific GmbH, Ebsdorfergrund)	10 % (v/v)	20 % (v/v)	20 % (v/v)	10 % (v/v)
Glutamin (Gibco by Life Technologies, USA)	2 mM	2 mM	-	2 mM

5.1.2. Verwendete Zelllinien

Für die im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten Experimente wurden die verschiedenen, in Tabelle 5-2 aufgeführten Zelllinien verwendet.

Tabelle 5-2: Verwendete Zelllinien

Zelllinie	Ursprung	Tumorart/Krankheit	Kulturmedium
BT-20	Primärtumor	Duktales Mammakarzinom	1
BT-474	Primärtumor	Duktales Mammakarzinom	1
MDA-MB-231	Pleuraeffusion	Duktales Mammakarzinom	1

Methoden

MDA-MB-361	Gehirn	Adenokarzinom der Brust	3
MDA-MB-453	Perikarderguss	Duktales Mammakarzinom	2
MDA-MB-468	Pleuraeffusion	Adenokarzinom der Brust	1
SK-BR-3	Pleuraeffusion	Duktales Mammakarzinom	1
T47-D	Pleuraeffusion	Duktales Mammakarzinom	1
ZR-75-1	Aszites	Duktales Mammakarzinom	1
Jurkat	T-Lymphozyt	Akute T-Zell-Leukämie	4
ψNX-ampho	Humane embryonale Nierenzellen	-	1
HEK293T	Humane embryonale Nierenzellen	-	1

5.1.3. Zellkultivierung

Alle Zelllinien wurden bei 37 °C, 10 % CO₂ und wassergesättigter Atmosphäre im HeraCell 150-Brutschrank (Kendro, Langenselbold) in sterilen Zellkulturflaschen (Sarstedt) und entsprechendem Kulturmedium (s. Tabelle 5-1 und 5-2) kultiviert.

Das Passagieren der Zellen erfolgte routinemäßig zweimal pro Woche in einem Verhältnis von 1:2 bis 1:15 unter sterilen Bedingungen. Nach dem Waschen der Zellen mit 1x PBS, folgte eine Inkubation mit Trypsin/EDTA [0,25 % (w/v) Trypsin, 1 mM EDTA in PBS ohne Mg²⁺ und Ca²⁺] für 2-5 min bei 37 °C, um die Zellen vom Boden der Zellkulturflaschen zu lösen. Anschließend wurden die Zellen in entsprechendem Kulturmedium aufgenommen und in einem 15 ml-Reaktionsgefäß bei 1.200 x g für 2 min (Zentrifuge Rotofix 32, Fa. Hettich, Tuttlingen) pelletiert. Das Zellpellet wurde in frischem Kulturmedium resuspendiert und in geeigneter Dichte in eine neue Zellkulturflasche überführt.

5.1.4. Kryokonservierung eukaryotischer Zellen

Zum Einfrieren wurden die Zellen zunächst, wie in Abschnitt 5.1.3. beschrieben, geerntet und sedimentiert. Nach Verwerfen des Überstandes wurde das Zellpellet einer T75-Zellkulturflasche in 4,5 ml Einfriermedium [10% DMSO, 90% Kulturmedium] resuspendiert, und je 1 ml der Suspension wurde in beschriftete Kryoröhrchen überführt. Diese wurden für 24 h bei -80 °C in einer Styroporbox eingefroren und für die Langzeitlagerung in einen Behälter mit flüssigem Stickstoff überführt.

Um eingefrorene Zellen in Kultur zu nehmen, wurden diese für 2-3 min bei 37 °C im Wasserbad aufgetaut und unmittelbar in 5 ml vorgewärmtes Kulturmedium überführt. Nach einem

Zentrifugationsschritt (Zentrifuge Rotofix 32) bei 1.200 x g für 2 min wurde der Überstand verworfen, das Zellpellet in Kulturmedium aufgenommen und in eine Zellkulturflasche überführt.

5.1.5. Transfektion eukaryotischer Zellen mit Plasmid-DNA

Für die Transfektion eukaryotischer Zellen wurden je nach Fragestellung entweder die Transfektionsreagenzien Polyethylenimin (PEI) (Longo et al., 2013) oder Lipofectamine™ 3000 verwendet.

5.1.5.1. Transfektion mit Polyethylenimin (PEI)

Vierundzwanzig Stunden vor der Transfektion wurden $1,5 \times 10^6$ HEK-293T-Zellen in 5 ml Kulturmedium in T25-Zellkulturflaschen ausgesät. Unmittelbar vor der Transfektion wurde das Kulturmedium nach Waschen des Zellrasens mit 1x PBS, durch serumfreies Medium (SFM) ersetzt. Die Transfektionsansätze enthielten jeweils 3 µg Plasmid-DNA, 30 µl PEI-Transfektionsreagenz (1 mg/ml in H₂O; Polysciences, Warrington, UK) und 300 µl SFM. Nach einer Inkubation für 10 min bei RT wurden die Transfektionsansätze tropfenweise zu den Zellen gegeben. Nach 6-8 h wurden die Transfektionskomplexe gegen Kulturmedium ausgetauscht. Die Zellen wurden 24-72 h nach der Transfektion geerntet und analysiert.

5.1.5.2. Transfektion mit Lipofectamine™ 3000

Die Transfektion von Plasmid-DNA mittels Lipofectamine™ 3000 (Thermo Fisher Scientific) wurde entsprechend den Herstellerangaben durchgeführt. Dafür wurden die Zellen 24 h vor der Transfektion so ausgesät, dass sie am Tag der Transfektion eine Dichte von ca. 70-90 % aufwiesen. Der Reaktionsansatz 1, bestehend aus 250 µl Opti-MEM (Gibco), 8 µg Plasmid-DNA und 16 µl P3000 wurde im Verhältnis 1:1 mit dem Reaktionsansatz 2, bestehend aus 250 µl Opti-MEM und 20 µl Lipofectamine 3000, verdünnt und für 10 min bei RT inkubiert. Anschließend wurden die DNA-Lipid-Komplexe tröpfchenweise auf die Zellen gegeben. Nach 6-8 h erfolgte ein Mediumwechsel. Die Zellen wurden 48-72 h nach der Transfektion geerntet und analysiert.

5.1.6. Transfektion eukaryotischer Zellen mit siRNA

Die verwendeten ON-TARGETplus siRNAs wurden von der Fa. Dharmacon (Lafayette, USA) je in einem Maßstab von 2 nmol bezogen. Die jeweiligen Sequenzen sind der Tabelle 9-9 zu entnehmen. Durch Zugabe von 20 µl nukleasefreiem Wasser wurden die siRNAs in einer Konzentration von 100 µM angesetzt, aliquotiert und bei -20 °C gelagert.

Die Transfektion von siRNAs in Mammakarzinomzelllinien wurde mithilfe des *Neon® Transfection Systems* (Invitrogen, Carlsbad, USA) durchgeführt. Pro Transfektion wurden

1,0 x 10⁶ Zellen in 100 µl Resuspensions-Puffer R aufgenommen und mit 0,5 µl der jeweiligen siRNA (100 µM) gemischt, sodass die finale Konzentration in einem Volumen von 1 ml 50 nM betrug. Entsprechend den Herstellerangaben wurde die Elektroporation unter folgenden Parametern durchgeführt:

Spannung:	1500 V
Pulsweite:	20 sec
Anzahl der Pulse:	1

Die Zellen wurden anschließend in 900 µl vorgewärmtes Kulturmedium gegeben und in gewünschter Dichte für nachfolgende Analysen ausgesät. Eine Herunterregulation der Genexpression (*Knockdown*) mittels siRNAs wurde fünf Tage nach Transfektion durch Immunoblot- und qRT-PCR-Analysen (s. Abschnitt 5.3.7 u. 5.2.18.) verifiziert.

5.1.7. Gentransfer mit Hilfe von Lentiviren

Die lentiviralen shRNA-Expressionskonstrukte, die für die Produktion der Lentiviren eingesetzt wurden, wurden vom TRC (*The RNAi Consortium*, Broad Institute, Cambridge, USA) hergestellt und über die Fa. Sigma-Aldrich bezogen. Genaue Angaben zu den Konstrukten sind Tabelle 9-10 zu entnehmen. Für die Produktion lentiviraler Partikel wurden zunächst HEK293T-Zellen, die am Vortag zu 2,5 x 10⁶ in 5 ml Kulturmedium pro 6 cm-Schale ausgesät wurden, mit Lipofectamine 3000 (s. Abschnitt 5.1.5.2) transfiziert, wobei sich das DNA-Gemisch folgendermaßen zusammensetzte: 4 µg pLKO.1 shRNA Plasmid-DNA (Tabelle 9-10), 3 µg psPAX2 (Addgene, Cambridge, USA) und 1 µg pMD2.G (Addgene, Cambridge, USA). psPAX2 und pMD2.G codieren für lentivirale Verpackungs- und Hüllproteine, die für die Virusproduktion essenziell sind. Zwei Tage nach der Transfektion wurde der virushaltige Zellkulturüberstand abgenommen, sedimentiert (500 x g, 5 min, Zentrifuge Rotofix 32) und mit Hilfe eines Spritzenvorsatzfilters (Millex[®]-HV, Steril Filter Unit, Low Protein Binding Durapore[®] (PVDF) Membrane, Porengröße 0,45 µm; Merck Millipore) steril filtriert und entweder direkt für die Infektion der Zielzellen verwendet oder bei - 80 °C gelagert. Am Tag vor der Infektion wurden die Zielzellen in T25-Zellkulturflaschen so ausgesät, dass sie zum Zeitpunkt der Transduktion eine Zelldichte von ca. 30-70 % aufwiesen. 500 µl des lentiviralen Überstandes wurden mit 5 ml frischem Polybrene-haltigem (8 µg/ml; Sigma-Aldrich) Kulturmedium gemischt und auf die Zellen gegeben. Am Tag nach der Infektion wurde das Medium gegen frisches Kulturmedium mit 0-4 µg/ml Puromycin (PAA Laboratories) ausgetauscht. Fünf Tage nach der Infektion wurde der *Knockdown* des Zielgens durch Immunoblot- (s. Abschnitt 5.3.7) und qRT-PCR-Analyse (s. Abschnitt 5.2.18.) verifiziert.

5.1.8. Pharmakologische Interventionen

Für eine pharmakologische Inhibition bzw. Aktivierung verschiedener Enzyme wurden die Zielzellen 24 h vor der Behandlung in T25-Zellkulturflaschen in gewünschter Zelldichte ausgesät. Der entsprechende Inhibitor bzw. Aktivator wurde in den in Tab. 5-3 angegebenen Konzentrationen in das vorhandene Kulturmedium gegeben. Unbehandelte oder mit Lösungsmittel behandelte Zellen dienten als Kontrolle. Die Zellen wurden nach der Behandlung zwischen 1 h und 24 h im Brutschrank inkubiert. Der Effekt der pharmakologischen Intervention wurde mittels Immunoblot- (s. Abschnitt 5.3.7) und/oder qRT-PCR-Analyse (s. Abschnitt 5.2.18.) untersucht.

Tabelle 5-3: Übersicht über die verwendeten Inhibitoren und Aktivatoren.

Inhibitor/Aktivator	Target*	eingesetzte Konzentration	Lösungs- mittel	Bezugsquelle
BIO CAS 667463-62-9	GSK3 α/β	50 μM	DMSO	Santa Cruz Biotechnology
BIRB-796 CAS 285983-48-4	p38 MAPK	50 μM	DMSO	Tebu-bio
CHIR99021 CAS 252917-06-9	GSK3 α/β	0-5 μM	DMSO	Sigma-Aldrich
Cycloheximid CAS 66-81-9	Peptidyl- transferase	50 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$	DMSO	Sigma-Aldrich
Gö6976 CAS 136194-77-9	cPKC	100 nM	DMSO	Biomol GmbH
Gö6983 CAS 133053-19-7	cPCK, nPKC	2 μM	DMSO	Biomol GmbH
IC261 CAS 186611-52-9	CK1 δ/ϵ	50 μM	DSMO	Sigma-Aldrich
KN-62 CAS 127191-97-3	CaMK II	1-50 μM	DMSO	Santa Cruz Biotechnology
Leucettine L41 CAS 1112978-84-3	DYRKs	1-10 μM	DMSO	Adipogen AG
ML-7 CAS 110448-33-4	MLCK	1-50 μM	DMSO	Santa Cruz Biotechnology
PD0332991 CAS 827022-33-3	CDK2/6	1-50 μM	H ₂ O	Sigma-Aldrich
PD98059 CAS 167869-21-8	MEK1	1-100 μM	DMSO	Tebu-bio
PF-4800567 CAS 1391052-28-0	CK1 ϵ	50 μM	DMSO	Sigma-Aldrich

Methoden

PF-670462 CAS 950912-80-8	CK1 δ/ϵ	0-50 μM	DMSO	Sigma-Aldrich
PMA CAS 16561-29-8	c/nPKC	5-100 nM	DMSO	Sigma-Aldrich
Roscovitine CAS 186692-46-6	CDK1/2/5	1-50 μM	DMSO	Santa Cruz Biotechnology
SR3029 CAS 1454585-06-8	CK1 δ	50 μM	DMSO	Axon Medchem
TBB CAS 17374-26-4	CK2	1-25 μM	DMSO	Santa Cruz Biotechnology
TBCA CAS 934358-00-6	CK2	1-100 μM	DMSO	Biomol GmbH

* Es ist nur die jeweils wichtigste Zielstruktur angegeben.

5.2. Molekularbiologische Methoden

5.2.1. Kultivierung von *Escherichia coli* (*E. coli*)

Für die Transformation und Plasmidamplifikation wurde der *E. coli*-Bakterienstamm DH5 α verwendet. Die Vermehrung von *E. coli* erfolgte in sterilem LB-Medium (pH 7,5) [1% (w/v) Bacto-Trypton, 0,5% (w/v) Hefeextrakt, 1% (w/v) NaCl] bei 37 °C und 180 rpm im Tischschüttler Certomat R (B. Braun Biotech, Melsungen) oder auf LB-Agarplatten [1% (w/v) Bacto-Trypton, 0,5% (w/v) Hefeextrakt, 1% (w/v) NaCl, 1,5% (w/v) Bacto-Agar] bei 37 °C im Wärme- und Trockenschrank Heraeus Function Line B12 (Kendro, Langenselbold). Sowohl das Flüssigmedium als auch der feste Nährboden wurden je nach Resistenzgen des Plasmides mit Ampicillin (Endkonzentration: 100 $\mu\text{g/ml}$; Fa. Roth, Karlsruhe) oder Kanamycin (Endkonzentration: 25 $\mu\text{g/ml}$; Fa. Roth, Karlsruhe) versetzt.

5.2.2. Generierung transformationskompetenter *E. coli*

Für die Generierung transformationskompetenter Bakterien wurden *E. coli* DH5 α verwendet. Zunächst wurden 3 ml LB-Medium mit Bakterien inokuliert und über Nacht bei 37 °C im Tischschüttler Certomat R (B. Braun Biotech, Melsungen) inkubiert. 2,5 ml dieser Vorkultur wurden in 250 ml LB-Medium überführt und bei 37 °C im Tischschüttler Certomat R (B. Braun Biotech) kultiviert, bis eine OD₅₅₀ von 0,4 bis 0,6 erreicht war. Es folgte die Kühlung der Bakterien suspension für 30 min auf Eis und anschließende Zentrifugation (Multifuge Heraeus 3S-R) bei 3.000 rpm und 4 °C für 15 min. Nach Verwerfen des Überstandes wurden die sedimentierten Bakterien in 80 ml FB-Puffer [100 mM KCl, 50 mM CaCl₂, 10 % (w/v) Glycerol, 10 mM KOAc; pH 6,4] resuspendiert und 30 min auf Eis inkubiert. Es folgte eine erneute

Zentrifugation (3.000 rpm; 4 °C; 15 min) und anschließende Resuspension der Bakterien in 20 ml FB-Puffer. Die so erhaltenen transformationskompetenten Bakterien wurden in Aliquots bei -80 °C gelagert.

5.2.3. Transformation von *E. coli*

Für die Transformation wurden chemisch kompetente DH5 α -Zellen (s. Abschnitt 5.2.2.) verwendet. Nach dem Auftauen auf Eis wurden 50 μ l der kompetenten Zellen zu 1 μ l vorgekühlter Plasmid-DNA gegeben und für 30 min auf Eis inkubiert. Es folgte ein Hitzeschock bei 42 °C für 30 sec und eine anschließende Inkubation auf Eis für 2 min. Nach Zugabe von 450 μ l LB-Medium und einer Inkubation bei 37 °C und 180 rpm für 1 h wurden die Bakterien auf Antibiotika-haltige Agarplatten ausgestrichen und über Nacht bei 37 °C im Wärme- und Trockenschrank Heraeus Function Line B12 (Kendro) inkubiert.

5.2.4. Isolierung von Plasmid-DNA im analytischen Maßstab

Zur Amplifikation von Plasmid-DNA wurde eine Kolonie transformierter *E. coli*-Zellen über Nacht in 5 ml Antibiotikum-haltigem LB-Medium bei 37 °C und 180 rpm im Tischschüttler Certomat R (B. Braun Biotech) inkubiert. Die Isolation von Plasmid-DNA erfolgte mit 1,5 ml der Übernachtskultur entsprechend den Herstellerangaben des *NucleoSpin® Plasmid (NoLid) Kits* (Macherey-Nagel, Düren). Die DNA wurde in einem Volumen von 50 μ l eluiert.

5.2.5. Isolierung von Plasmid-DNA im präparativen Maßstab

100 ml Antibiotikum-haltiges LB-Medium wurde mit 10 μ l einer Übernachtskultur angeimpft und über Nacht bei 37 °C und 180 rpm inkubiert. Die Bakterienkultur wurde bei 5.500 x g für 15 min (Multifuge Heraeus 3S-R) sedimentiert und dann entsprechend den Herstellerangaben des *NucleoBond® Xtra Midi Kits* (Macherey-Nagel) aufgearbeitet. Abschließend wurde die getrocknete DNA in einem geeigneten Volumen sterilem Tris-EDTA-Puffer (pH 8,0) aufgenommen.

5.2.6. Bestimmung der Konzentration und Reinheit von Nukleinsäuren

Die Konzentration und Reinheit von Nukleinsäure-Proben wurde mithilfe des Spektralphotometers NanoDrop ND-1000 (Thermo Fisher Scientific) bestimmt. Die OD₂₆₀ gibt dabei Aufschluss über die Konzentration, wobei eine Extinktion von 1 einer Konzentration von 50 μ g/ml dsDNA bzw. 40 μ g/ml RNA entspricht. Der Quotient OD₂₆₀/OD₂₈₀ wurde als ein Maß für die Reinheit der Proben herangezogen. DNA-Proben mit einem Verhältnis > 1,8 und RNA-

Proben mit einem Verhältnis $> 2,0$ wurden als rein betrachtet und für weitere Anwendungen eingesetzt.

5.2.7. Restriktionsverdau

DNA wurde mit Restriktionsendonukleasen und Reaktionspuffern der Firma New England BioLabs (NEB) verdaut. Dafür wurde die DNA mit einem leichten Überschuss an Enzym (3-5 U/ μ g DNA) im entsprechenden Puffer bei 37 °C für mindestens 3 h inkubiert.

5.2.8. Dephosphorylierung von Plasmid-DNA

Um die Eigenligation linearisierter Plasmid-DNA zu verhindern, wurde 1 μ g der zuvor mit Restriktionsenzymen verdauten DNA durch Einsatz von 1 μ l *Antarctic Phosphatase* (5 U/ μ l; NEB) in 10 x Reaktionspuffer in einem Gesamtvolumen von 30 μ l dephosphoryliert. Plasmid-DNA mit 5'-Überhang oder stumpfen Enden („*blunt ends*“) wurde für 15 min bei 37 °C inkubiert. Lag ein 3'-Überhang vor, erfolgte die Reaktion bei 37 °C für 1 h. Eine 10-minütige Inkubation bei 65°C für 10 min beendete die jeweilige Reaktion.

5.2.9. Agarosegelelektrophorese

Die Auftrennung von DNA-Fragmenten wurde je nach Größe in 1-2%-igen Gelen durchgeführt, die durch Erhitzen der entsprechenden Agarosemenge in 1x Tris-Acetat-EDTA-Puffer (TAE) [40 mM Tris-Acetat, 2 mM EDTA] und anschließendes Gießen in die horizontale Gelapparatur ComPhor L (Bioplastics RV, NL) hergestellt wurden. Der noch flüssigen Agaroselösung wurde zur späteren Sichtbarmachung der DNA der Farbstoff Ethidiumbromid (EtBr; Sigma-Aldrich) in einer Endkonzentration von 0,01 ‰ zugesetzt. Das ausgehärtete Gel wurde mit 1x TAE-Puffer überschichtet und die Gelkammern mit den mit 1/10 Volumen 10x DNA-Probenpuffer (pH 8,0) [50% (v/v) Glycerol, 1 mM EDTA, 0,4% (w/v) Bromphenolblau, 0,4% (w/v) Xylencyanol] versetzten DNA-Proben beladen. Als DNA-Größenstandard diente der HyperLadder I (1 kb; BioLine, Hildesheim). Die elektrophoretische Auftrennung erfolgte bei 90-100 V für 30-60 min. Zur Visualisierung und Dokumentation der Gele wurden das Geldokumentationssystem GeneGenius 2 (Syngene, Cambridge, UK) und die zugehörige GeneSnap-Software verwendet.

5.2.10. Aufreinigung von DNA aus Agarosegelen

Um mittels Agarosegelelektrophorese aufgetrennte DNA-Fragmente aus dem Gel zu isolieren, wurden entsprechende Banden unter UV-Licht mithilfe eines Skalpellts ausgeschnitten und in 1,5 ml-Reaktionsgefäße überführt. Das weitere Vorgehen entsprach den Herstellerangaben des

NucleoSpin® Gel and PCR clean-up Kit (Macherey-Nagel). Die DNA wurde abschließend in einem Volumen von 15 µl eluiert.

5.2.11. Ligation von DNA-Fragmenten

Für die Herstellung rekombinanter Plasmide wurde ein mittels PCR (s. Abschnitt 5.2.12.) und Restriktionsverdau (s. Abschnitt 5.2.7.) erzeugtes DNA-Fragment in einen zuvor linearisierten Vektor integriert, wobei das Verhältnis von Vektor-DNA zu Insert-DNA bei etwa 1:3 lag. Der Ligationsansatz bestand außerdem aus 1 µl T4-DNA-Ligase (400 U/µl; NEB), 1 µl des T4-Ligase-Puffers (10x) und wurde mit nukleasefreiem Wasser auf ein Endvolumen von 10 µl aufgefüllt. Die Reaktion fand über Nacht bei RT statt. Zur Amplifikation der rekombinanten Plasmide wurden kompetente *E.coli* DH5α-Zellen transformiert (s. Abschnitt 5.2.3.).

5.2.12. Polymerasekettenreaktion (PCR) zur DNA-Amplifikation

Für die PCR zur Amplifikation von cDNA-Fragmenten oder Plasmid-DNA wurde die Q5® High Fidelity DNA-Polymerase eingesetzt, die sich durch eine hohe *proofreading*-Aktivität auszeichnet. Ein 50 µl-Reaktionsansatz bestand aus 0,5 µl Q5® High Fidelity DNA-Polymerase (2000 U/ml; NEB), variablen Mengen der Template-DNA, 10 µl Q5-Puffer (5x), 10 µl Q5-Enhancer (5x), 1 µl dNTP-Mix (je 10 mM) und je 2 µl *Primer* (100 ng/µl). Die *Primer* wurden regelhaft von Sigma bezogen und in einer geeigneten Menge Tris-EDTA (pH 8,0) aufgenommen. Die PCR erfolgte im Flexigene-Thermocycler (Techne, Staffordshire, UK) unter folgenden Bedingungen:

	PCR-Schritt	Temperatur	Zeit
	Initiale Denaturierung der DNA	98 °C	30 sec
12-30 Zyklen	Denaturierung	98 °C	10 sec
	<i>Annealing</i>	58 - 63 °C	30 sec
	Elongation	72 °C	30 sec/1 kb
	Finale Elongation	72 °C	2 min

5.2.13. Aufreinigung von PCR-Produkten

Die bei der PCR entstandenen DNA-Fragmente wurden entsprechend den Herstellerangaben des *NucleoSpin® Gel and PCR clean-up Kit* (Macherey-Nagel) aufgereinigt und in 17 µl NE-Puffer eluiert. Die aufgereinigten PCR-Produkte wurden anschließend für den Restriktionsverdau (s. Abschnitt 5.2.7.) eingesetzt.

5.2.14. Zielgerichtete Mutagenese

Für die zielgerichtete Mutagenese wurden zur Amplifikation der Template-DNA komplementäre Oligonukleotide eingesetzt, die die gewünschte Mutation enthielten (s. Tabelle 9-6). Die in einem 50 µl-Reaktionsansatz durchgeführte Mutagenese-PCR-Reaktion (12 Zyklen) erfolgte im Flexigene-Thermocycler (Techne) wie im Abschnitt 5.2.12. beschrieben. Die Amplifikationsprodukte wurden aufgereinigt (s. Abschnitt 5.2.13.). Anschließend wurden dem Eluat zum Verdau der *Template*-DNA 2 µl *CutSmart*[®]-Puffer (10x; NEB) und 1 µl *Dpn* I (20 U/µl; NEB) zugesetzt und der Ansatz bei 37 °C für mindestens 3 h inkubiert. Für die Vermehrung der mutierten Plasmid-DNA wurden kompetente *E.coli* DH5α mit 1 µl des Restriktionsansatzes transformiert (s. Abschnitt 5.2.3.). Am nächsten Tag wurden einzelne Kolonien geerntet und über Nacht expandiert. Nach Isolation der Plasmid-DNA (s. Abschnitt 5.2.4.) wurde eine Überprüfung des korrekten Einbaus der Mutation mit Hilfe einer DNA-Sequenzanalyse durchgeführt (s. Abschnitt 5.2.15.).

5.2.15. DNA-Sequenzanalyse

Zur Überprüfung der Identität von DNA wurde eine DNA-Sequenzanalyse nach der Didesoxy-Methode (Sanger F, 1975) mithilfe des *BigDye*[®] *Terminator Cycle Sequencing Kit* (Applied Biosystems, Warrington, UK) durchgeführt. Hierzu wurde eine Sequenzierreaktion, die 400-500 ng DNA, 1 µl *Primer* (3,2 pmol/µl), 4 µl *BigDye*[®]-Reaktionspuffer (5x) und 2 µl *BigDye*[®]-Mix in einem Gesamtvolumen von 20 µl enthält, angesetzt und die DNA anschließend mittels einer PCR-Reaktion im Flexigene-Thermocycler (Techne) unter folgenden Bedingungen amplifiziert:

	PCR-Schritt	Temperatur	Zeit
	Initiale Denaturierung der DNA	95 °C	5 min
25 Zyklen	Denaturierung	96 °C	30 sec
	<i>Annealing</i>	50 °C	15 sec
	Elongation	60 °C	1 min

Das Reaktionsprodukt wurde durch Zugabe von 64 µl absolutem Ethanol und 16 µl H₂O und einer Inkubation von 15 min bei RT gefällt. Der Überstand wurde nach anschließender Zentrifugation bei 13.200 rpm für 30 min (Kühlzentrifuge 5415R; Eppendorf) verworfen und das Pellet mit 250 µl 70 % Ethanol gewaschen. Nach Zentrifugation bei 13.200 rpm für 5 min folgte eine Lufttrocknung der sedimentierten DNA für 5-10 min bei RT. Am Institut für Pathologie des Universitätsklinikums Eppendorf, Hamburg, wurde abschließend eine Kapillargelelektrophorese durchgeführt. Für die Sequenz-Auswertung wurde das Programm *FinchTV* (<https://download.cnet.com/developer/geospiza/i-10025185/>) eingesetzt.

5.2.16. Isolierung von Gesamt-RNA

Gesamt-RNA wurde mithilfe des *NucleoSpin® RNA Kit* (Macherey-Nagel) aus dem Zellmaterial einer subkonfluenten T25-Zellkulturflasche entsprechend den Herstellerangaben isoliert. Ein rDNAse-Verdau diente der Entfernung eventueller Verunreinigungen mit genomischer DNA. Abschließend wurde die RNA in 40 µl RNase-freiem Wasser aufgenommen und mittels einer Messung am NanoDrop ND-1000 auf Konzentration und Reinheit hin überprüft (s. Abschnitt 5.2.6).

5.2.17. Reverse Transkription von RNA

Die reverse Transkription von Gesamt-RNA wurde mit dem *First Strand cDNA Synthesis Kit* (Thermo Fisher Scientific) durchgeführt. Ein µg Gesamt-RNA wurde mit *Random Hexamer* oder *Oligo (dT) Primer* und der M-MuLV Reversen Transkriptase (20 U/µl) in einem 20 µl-Ansatz entsprechend den Herstellerangaben in cDNA umgeschrieben.

5.2.18. Quantitative Realtime-PCR (qRT-PCR)-Analyse

Für die qRT-PCR-Analyse wurde je Probe ein 15 µl-Reaktionsansatz, bestehend aus 7,5 µl Maxima SYBR Green/Rox qPCR Master Mix (2x) (Thermo Fisher Scientific), jeweils 0,375 µl (10 µM) *Primer* (s. Tabelle 9-8) und 6,75 µl der cDNA (1:20-Verdünnung) in ein *Well* der vorgekühlten *Hard-Shell® PCR Plate* (96-well, thin-wall; Bio-Rad Laboratories) pipettiert. Alle Proben wurden im Triplikat gemessen. Die Reaktion lief im CFX96 Touch™ Real-Time System (Bio-Rad Laboratories) bei folgenden Bedingungen:

	PCR-Schritt	Temperatur	Zeit
	Initiale Denaturierung der DNA	95 °C	10 min
40 Zyklen	Denaturierung	95 °C	15 sec
	<i>Annealing</i>	60 °C	30 sec
	Elongation	72 °C	30 sec
	Schmelzkurve	60-95 °C	20 min
			(in 0,5 °C-Schritten)

Die Auswertung der Daten erfolgte mit der Bio-Rad-Software *CFX Manager* nach der $\Delta\Delta CT$ -Methode, wobei RPLP0 als Referenzgen herangezogen wurde.

5.3. Proteinbiochemische Methoden

5.3.1. Herstellung von Gesamtzellextrakten unter nativen Bedingungen

Zunächst wurde das Kulturmedium verworfen und der Zellrasen mit 1x PBS gewaschen. Anschließend wurden die Zellen mit einem Zellschaber gelöst und in ein 1,5 ml-Reaktionsgefäß überführt. Die Zellen wurden bei 3.000 rpm und 4 °C (Kühlzentrifuge 5415R; Eppendorf) für 5 min sedimentiert und anschließend in unmittelbar vor Gebrauch mit Phosphatase (Phosphatase Inhibitor Cocktail Set V, 50X, EMD Millipore Corporation) - und/oder Protease-Inhibitor (cOmplete, Mini, Roche Diagnostics GmbH, Mannheim) versetztem NP40-Lysispuffer [1 % (w/v) Nonidet P-40, 150 mM NaCl, 50 mM Tris-HCl (pH 7,4)] resuspendiert. Unter gelegentlichem Mischen der Proben erfolgte eine 30-minütige Inkubation auf Eis. Anschließend wurden die Proben bei 13.200 rpm und 4°C für 10 min zentrifugiert. Der Überstand wurde in ein neues Reaktionsgefäß überführt und die Konzentration mittels Bradford Assay (s. Abschnitt 5.3.4.) bestimmt. Abschließend wurde das Lysat mit 2x SDS-Probenpuffer [4 % (w/v) SDS, 20 % (w/v) Glycerol, 120 mM Tris-HCl (pH 6,8), 0,01 % (w/v) Bromphenolblau] versetzt und für 5 min bei 95 °C denaturiert. Nach einer Inkubation für 5 min auf Eis konnten die Proben auf ein SDS-Gel (s. Abschnitt 5.3.6) geladen oder bei -20 °C gelagert werden.

5.3.2. Herstellung von Gesamtzellextrakten unter denaturierenden Bedingungen

Wie in Abschnitt 5.3.1. beschrieben wurden die Zellen aus der Zellkulturflasche gelöst, in ein 1,5 ml-Reaktionsgefäß überführt und sedimentiert. Das Zellpellet wurde in einem geeigneten Volumen Bromphenolblau-freiem SDS-Lysispuffer [2% (v/v) SDS, 62,5 mM Tris/HCl (pH 6,8), 10% (v/v) Glycerin] aufgenommen. Die Ultraschallbehandlung (Amplitude: 70 %, Zyklus: 0,5; UP50H; Hielscher Ultrasonics, Teltow) für 30 sec auf Eis wurde einmal wiederholt und diente der Degradierung der DNA. Es folgte ein Zentrifugationsschritt bei 13.200 rpm und RT für 10 min (Kühlzentrifuge 5415R; Eppendorf). Das Gesamtzellextrakt wurde in ein neues Reaktionsgefäß überführt und die Proteinkonzentration mit 5 µl der Probe mittels *DC Protein Assay Kit* (Bio-Rad Laboratories) entsprechend den Herstellerangaben ermittelt. Dem Lysat wurden anschließend 0,5 µl einer mit Bromphenolblau gesättigten ethanolischen Lösung zugesetzt. Es folgte die Denaturierung für 5 min bei 95 °C. Nach dem Abkühlen auf Eis wurden die Proben auf ein SDS-Gel (s. Abschnitt 5.3.6) geladen oder bei -20 °C gelagert.

5.3.3. Herstellung von Zellkernextrakten

Für die Isolation von Zellkernen wurden subkonfluent gewachsene Zellen zunächst zweimal mit 5 ml kaltem PBS gewaschen und mit einem Zellschaber vom Flaschenboden entfernt. $2,0 \times 10^6$ Zellen wurden in ein 1,5 ml-Reaktionsgefäß überführt und bei $1.500 \times g$ und 4 °C für 2,5 min

sedimentiert (Kühlzentrifuge 5415R; Eppendorf). Der Überstand wurde verworfen. Das entstandene Zellpellet wurde vorsichtig in 400 µl hypotonem Puffer [10 mM HEPES-KOH (pH 7,9 bei 4 °C), 1,5 mM MgCl₂, 10 mM KCl] resuspendiert und für 15 min auf Eis inkubiert. Nach Zugabe von 25 µl einer 10 %-igen NP40-Lösung wurden die Proben für 10 sec gemischt. Es folgte eine Zentrifugation bei 1.500 x g und 4 °C für 5 min. Die nun im Überstand befindliche zytosolische Fraktion wurde verworfen. Die Zellkernfraktion wurde in 50 µl hypertonem Lysispuffer [20 mM HEPES-KOH (pH7,9 bei 4 °C), 25 % (v/v) Glycerol, 420 mM NaCl, 1,5 mM MgCl₂, 0,2 mM EDTA] resuspendiert und mit Protease (cOmplete Mini; Roche Diagnostics, Mannheim) - und Phosphatase-Inhibitor (Phosphatase Inhibitor Cocktail Set V, 50X, EMD Millipore) versetzt. Einer 30-minütigen Inkubation auf Eis mit gelegentlichem Mischen folgte eine Zentrifugation bei 10.000 x g und 4 °C für 15 min. Der im Überstand befindliche Kernextrakt wurde in ein neues Reaktionsgefäß überführt und die Konzentration mit der Bradford-Methode (s. Abschnitt 5.3.4.) bestimmt. Der Kernextrakt wurde nun mit SDS-Probenpuffer versetzt und für die SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE) (s. Abschnitt 5.3.5.) eingesetzt oder bei -20 °C gelagert.

5.3.4. Bestimmung der Proteinkonzentration nach Bradford

Die Farbreaktion zur Proteinbestimmung nach Bradford erfolgte mit 2 µl Proteinextrakt, versetzt mit 798 µl 0,1 N NaOH und 200 µl Bradford-Reagenz (Bio-Rad), für 1-2 min in einem 1,5 ml-Reaktionsgefäß. Am BioPhotometer 6131 (Eppendorf) wurde die Absorption bei einer Wellenlänge von 595 nm bestimmt, wobei der Leerwert aus 800 µl 0,1 N NaOH und 200 µl Bradford-Reagenz bestand. Mittels einer auf BSA basierenden Eichkurve (1-32 µg/µl) wurde die Konzentration berechnet.

5.3.5. SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)

Die SDS-PAGE wurde entsprechend des von Laemmli (Laemmli, 1970) beschriebenen Systems durchgeführt. Die SDS-Polyacrylamidgele wurden in Doppel-Gelgießständen (Hofer) mit 1,0 mm-*Spacern* gegossen und waren wie folgt zusammengesetzt:

Komponente		8% Trenngel	5 % Sammelgel
H ₂ O	[ml]	2,3	1,4
1,5 M Tris-HCl (pH 8,8)	[ml]	1,3	-
1 M Tris-HCl (pH 6,8)	[ml]	-	0,25
30 % Polyacrylamid	[ml]	1,3	0,33
10 % SDS	[μ l]	50	20
10 % APS	[μ l]	50	20
TEMED	[μ l]	3	2

Nach ca. 30-minütiger Polymerisation wurden die Gele in eine SE250 Elektrophoresekammer (Hoefer) eingebaut und nach Befüllen mit 1x Laemmli-Puffer [192 mM Glycin, 0,1 % (w/v) SDS, 25 mM Tris-HCl (pH 8,3)] wurden die Geltaschen mit 10-50 μ g Gesamtzelleextrakt oder Zellkernextrakt, das unmittelbar zuvor für 5 min bei 95 °C denaturiert wurde und dem Proteingrößenstandard *PageRulerTM Prestained Protein Ladder* (Thermo Fisher Scientific), der den Bereich von 10 bis 250 kDa abdeckt, beladen. Die Gelelektrophorese lief bei 25 mA pro Gel für ca. 1 h.

5.3.6. *Semi-dry*-Transfer von Proteinen auf Membranen

Mittels *Semi-dry*-Transfers wurden die zuvor in der SDS-PAGE aufgetrennten Proteine aus dem Gel auf eine Nitrozellulose (*Nitrocellulose Blotting Membrane*; Porengröße: 0,45 μ m; GE Healthcare, Dassel) - oder PVDF-Membran (*Immobilon[®]-P PVDF Blotting Membrane*; Porengröße: 0,45 μ m; EMD Millipore, Schwalbach) übertragen und so immobilisiert. Vor dem Transfer wurden PVDF-Membranen aktiviert und äquilibriert, indem sie jeweils für 5 min in 100 % (v/v) Methanol, Wasser und abschließend in Transferpuffer [48 mM Tris, 39 mM Glycin, 20 % (v/v) Methanol, 0,037 % (v/v) SDS] inkubiert wurden. Nitrozellulose-Membranen wurden ausschließlich in Transferpuffer äquilibriert. In der Trans-Blot[®] SD *semi-dry*-Blotapparatur (Bio-Rad) wurden auf der Anode je zwei in Transferpuffer äquilibrierte *Whatman*-Filter (GE Healthcare, Dassel), gefolgt von der Nitrozellulose- oder PVDF-Membran, dem SDS-Gel und zwei weiteren *Whatman*-Filtern exakt übereinandergeschichtet. Der Transfer erfolgte nach Aufsetzen der Kathode für 1-2 h bei 0,8 mA/cm².

5.3.7. Immunoblot-Analyse

Im Anschluss an den *Semi-dry*-Transfer (s. Abschnitt 5.3.6.) wurden unspezifische Bindungsstellen auf der jeweiligen Membran durch eine 60-minütige Inkubation in Blockierungspuffer, bestehend aus 1 x TBS [137 mM NaCl, 20 mM Tris/HCl], 5 % (w/v) Magermilchpulver und 0,05 % (v/v) Tween-20, abgesättigt. Die Membran wurde anschließend

dreimal für 5 min mit Waschpuffer [1x TBS, 0,05 % (v/v) Tween-20] gewaschen. Es folgte die Inkubation der Membran mit dem Antikörper in geeigneter Verdünnung in 1x TBS, 0,05 % (v/v) Tween-20 und 5 % (w/v) BSA bei 4 °C über Nacht. Durch dreimaliges Waschen mit Waschpuffer für jeweils 5 min wurden ungebundene Antikörper entfernt. Die Membran wurde nun für 1 h bei RT in Blockierungslösung mit gegen den Primärantikörper gerichteten Meerrettichperoxidase-konjugiertem Sekundärantikörper inkubiert. Danach wurde die Membran erneut dreimal für 5 min mit Waschpuffer gewaschen. Zur Detektion der Protein-Antikörper-Komplexe wurde die Membran zunächst für 3 min in einer frisch hergestellten ECL-Lösung, bestehend aus den im Verhältnis 1:1 gemischten Lösungen 1 [0,1 M Tris-HCl (pH 8,5), 25 mM Luminol, 9 mM Cumarinsäure] und 2 [0,1 M Tris-HCl (pH 8,5), 0,018 % (v/v) H₂O₂], inkubiert. Durch Auflegen eines Röntgenfilms (Fujifilm Super RX-N, Fa. Hartenstein, Würzburg) auf die Membran und anschließende Entwicklung im Filmentwickler Curix 60 (AGFA HealthCare, BEL) wurde die entstandene Chemolumineszenz visualisiert. Eine Quantifizierung wurde mithilfe der frei zugänglichen ImageJ-Software (<https://imagej.nih.gov/ij/>) durchgeführt.

5.3.8. Dephosphorylierung von Proteinen mit Lambda Protein Phosphatase

Für die Dephosphorylierung von Proteinen mit Lambda Protein Phosphatase erfolgte in Anlehnung an ein von Choi *et al.* beschriebenes Protokoll für *Pulldown Assays* (Choi *et al.*, 2013) zunächst eine Anreicherung von His₆-markierten („getaggt“) GRHL2-Proteinen. Dafür wurden HEK293T-Zellen mit Expressionsplasmiden, die für His₆-getaggte GRHL2-Proteine kodieren, transient mittels PEI-Transfektionsreagenz (s. Abschnitt 5.1.5.1.) transfiziert. Die geernteten Zellen wurden in 1 ml Puffer A [6 M Guanidin-HCl, 0,1 M Na₂HPO₄/NaH₂PO₄, 10 mM Imidazol, pH 8,0] resuspendiert und mit dem UP50H-Ultraschallgerät (Hielscher Ultrasonics, Teltow) für 10 sec (Amplitude 70 %, Zyklus 0,5 %) behandelt. Anschließend wurde das Lysat zu 100 µl einer mit Puffer A voräquilibrierten Ni-NTA Agarose (QUIAGEN, Hilden) gegeben und für 4-6 h im Überkopfschüttler (neoLabLine Rotator 2-1175, neoLab Migge, Heidelberg) bei RT rotiert. Es folgten zwei Waschschriffe mit Puffer A, zwei Waschschriffe mit Puffer A/TI (1 Vol. Puffer A, 3 Vol. Puffer TI [25 mM Tris-HCl, 20 mM Imidazol, pH 6,8]) und ein Waschschriff mit Puffer TI. Nach Zentrifugation bei 13.200 rpm für 10 sec (Kühlzentrifuge 5415R; Eppendorf) bei RT wurde der Überstand vollständig entfernt. Die angereicherten Proteine befanden sich an der Nickel-NTA-Matrix gebunden.

Die Nickel-NTA-Matrix wurde nun mit 1 ml 1x NEB Puffer für Protein-Metallo-Phosphatasen (PMPs) [50 mM HEPES, 100 mM NaCl, 2 mM DTT, 0,01 % Brij35, 1 mM MnCl₂, pH 7,5] versetzt. Nach Zentrifugation (Kühlzentrifuge 5415R; Eppendorf) bei 13.200 rpm und RT für 10 min wurde so viel Überstand abgenommen, dass ca. 80 µl im Reaktionsgefäß verblieben. Anschließend wurden die Ansätze mit je 1 µl Protease (cOmplete, Mini, Roche) - und/oder Phosphatase-

Cocktails (Phosphatase Inhibitor Cocktail Set V, 50X, EMD Millipore) sowie Lambda-Phosphatase (400 U/μl; NEB) für 30 min bei 30 °C inkubiert. Zu allen Ansätzen wurden 40 μl 2x SDS-Probenpuffer [4 % (w/v) SDS, 20 % (w/v) Glycerol, 120 mM Tris-HCl (pH 6,8), 0,01 % (w/v) Bromphenolblau] gegeben und die Proben für 10 min bei 95-100 °C aufgeköcht. Nach kurzem Abkühlen der Proben folgte eine Zentrifugation bei 13.200 rpm und RT für 3 min. Der Überstand wurde in ein 1,5 ml-Reaktionsgefäß überführt und konnte nun für die Immunoblot-Analyse (s. Abschnitt 5.3.7.) verwendet werden.

5.3.9. Herstellung phospho-spezifischer GRHL2-Antikörper

In Zusammenarbeit mit der Fa. Davids Biotechnologie (Regensburg) wurden polyklonale Antikörper gegen die phosphorylierten S²¹⁰- T²¹¹- und S²¹⁴-Reste des GRHL2-Proteins hergestellt. Hierzu wurde je ein geeignetes Peptid (S²¹⁰: YLKDDQR**S**TPDSTYSES; T²¹¹: YLKDDQR**T**SPDSTYSES; S²¹⁴: DQR**S**TPD**S**TYSESFKDA), das den relevanten Rest in zentraler Position enthielt, in phosphorylierter und nicht-phosphorylierter Form synthetisiert. Das Phospho-Peptid wurde anschließend an *Keyhole Limpet Hemocyanin* (KLH) als *Carrier*-Protein gekoppelt und für die Immunisierung zweier Kaninchen verwendet. Die aus dem Vollblut gewonnenen Seren wurden für die chromatographische Aufreinigung eingesetzt. Dafür wurden zunächst die phosphorylierten Peptide für eine Positiv-Selektion immobilisiert und als Matrix für eine Affinitätschromatographie eingesetzt. Anschließend erfolgte eine Negativ-Selektion mit immobilisierten, nicht-phosphorylierten Peptiden, um gegen das Proteinrückgrat gerichtete Antikörper zu entfernen. Die nach Positiv- und Negativselektion erhaltenen Antikörper wurden hinsichtlich Reaktivität und Spezifität mittels Immunoblot-Analyse (s. Abschnitt 5.3.7.) charakterisiert. Typischerweise wurden ca. 8-12 ml aufgereinigte Antikörper mit einer Konzentration von 0,2-0,8 μg/μl erhalten.

5.3.10. Identifizierung von Kandidaten-Kinasen mittels *KinaseFinder* Screening

In Zusammenarbeit mit der Fa. ProQinase (Freiburg) wurde ein sogenanntes *KinaseFinder* Screening durchgeführt. Hierfür wurde zunächst ein biotinyliertes, die PEST-Sequenz enthaltendes Peptid (Biotin-Ahx-LKDDQRSTPDSTYSE-NH₂) von der Fa. JPT (Berlin) synthetisiert und an Streptavidin-beschichtete FlashPlate[®] PLUS-Platten (PerkinElmer, Boston, USA) gebunden. Jeder Reaktionsansatz enthielt eine von insgesamt 245 zu testenden Serin/Threonin-Kinasen (1-400 ng/50μl), entsprechende Reaktionspuffer, Kofaktoren und [γ-³³P]-ATP (1 μM). Pro FlashPlate[®] PLUS-Platte wurde als Kontrolle eine Reaktion ohne Enzym angesetzt. Die Reaktion fand für 1 h bei 30 °C statt und wurde anschließend durch Zugabe einer Stopplösung [4,7 M NaCl, 35 mM EDTA] beendet. Die Reaktionsansätze wurden anschließend

in szintillationsbeschichtete FlashPlate® HTS PLUS-Platten (PerkinElmer, Boston, USA) überführt und für 30 min bei RT unter gleichmäßigem Schütteln inkubiert. Mithilfe eines Szintillationszählers (Microbeta, Perkin Elmer) wurde die Inkorporation von radioaktivem ^{33}P und damit die Aktivität der verschiedenen Kinasen bestimmt. Die Ergebnisse dieser Analyse wurden von der Fa. ProQinase in Form einer EXCEL-Datei, die für jede Kinase einen Aktivitätswert, einen *Background*-Wert (Messung der Kinase-Aktivität ohne Vorhandensein des Peptids), den Median aus drei Messungen des Peptid-*Backgrounds* (ohne Kinase), einen korrigierten Aktivitätswert (Aktivitätswert minus Peptid-*Background*) und einen *Activity ratio*-Wert (Verhältnis zwischen Kinaseaktivität mit und ohne Peptid) enthielt, übermittelt. Wenn die korrigierte Aktivität einer bestimmten Kinase mindestens fünfmal so hoch war wie die Messung des Platten-*Backgrounds* (FlashPlate® HTS PLUS-Platte), konnte ein Wert des *Activity ratios* >3 als signifikant gewertet werden.

5.4. Bioinformatische Analysen

Für die bioinformatische Analyse des GRHL2-Proteins wurden verschiedene frei zugängliche Programme eingesetzt. Zur Identifizierung möglicher PEST-Sequenzen wurde das Programm ePESTfind (<https://emboss.bioinformatics.nl/cgi-bin/emboss/epestfind>) verwendet, die Untersuchung der GRHL2-Proteinstruktur bezüglich geordneter und ungeordneter Sequenzabschnitte erfolgte mithilfe des Programms PrDOS (<http://prdoss.hgc.jp/cgi-bin/top.cgi>).

Zur Identifizierung von Kinasen, die möglicherweise GRHL2 modifizieren könnten, wurden u.a. die folgenden Programme verwendet:

Programm	URL
GPS 5.0	http://gps.biocuckoo.cn/
PhosphoNET	http://www.phosphonet.ca/
Scansite 4.0	https://scansite4.mit.edu/#home
ScanProsite	https://prosite.expasy.org/scanprosite/
PhosphoMotif Finder	http://www.hprd.org/PhosphoMotif_finder
NetPhorest 2.1	http://www.netphorest.info/

Die Promotor-Analyse wurde in Zusammenarbeit mit Herrn Malik Alawi (Bioinformatik Facility des UKE) durchgeführt. Dazu wurde die Promotor-Sequenz von GRHL2 (NCBI *Reference Sequence*: NM_024915.3) im *UCSC Genome Browser* (<https://genome.ucsc.edu/>) heruntergeladen. Für die weitere Analyse wurde der Bereich 2 kb *up-* und *downstream* des GRHL2 Transkriptionsstartpunkts (TSS) (101490439 - 101494439) ausgewählt und auf experimentell ermittelte *ChIP-Peaks* hin überprüft, die aus dem *ReMap human atlas* (<http://remap.univ-amu.fr/>) entnommen wurden. Parallel hierzu wurden die 537 für Homo

Methoden

sapiens bekannten Transkriptionsfaktor-Motive aus der Jaspar-Datenbank (<http://jaspar.genereg.net/>) dahingehend analysiert, ob sie in dem eingegrenzten Bereich liegen. Nur Motive, auf die das zutraf, wurden für die weitere Analyse berücksichtigt. Anschließend wurde für jeden TF überprüft, ob es zu den jeweiligen *ChIP-Peaks* ein entsprechendes Motiv gibt. Abschließend wurde anhand der entsprechenden Positionen untersucht, ob *ChIP-Peak* und Motiv überlappen.

6. Ergebnisse

Im Rahmen dieser Arbeit wurde eine große Anzahl rekombinanter DNA-Konstrukte generiert, deren Herstellung und Charakterisierung nicht im Detail beschrieben werden. Im Anhang finden sich Tabellen, die die Expressionsplasmide (Tabelle 9-4), Oligonukleotide zur Amplifikation von cDNA (Tabelle 9-5) oder für die Mutagenese (Tabelle 9-6) auflisten. Die Identität jedes einzelnen Konstruktes wurde unter Verwendung der in Tabelle 9-7 gelisteten Oligonukleotide mittels DNA-Sequenzierung überprüft. Die Überprüfung der Funktionalität erfolgte durch transiente Transfektion in HEK293T-Zellen und anschließender Immunoblot-Analyse.

6.1. Posttranslationale Regulation des Transkriptionsfaktors GRHL2

Die Phosphorylierung von Proteinen stellt einen wichtigen Mechanismus der Regulation der Expression und Aktivität von Proteinen dar, wobei der reversiblen Phosphorylierung an Serin/Threonin-Resten unmittelbar vor einem Prolin (Ser/Thr-Pro) eine herausragende Bedeutung beizumessen ist. Eine Prolin-gerichtete Phosphorylierung kann durch eine große Familie von Prolin-gerichteten Kinasen, die u.a. auch die Cyclin-abhängigen Kinasen (CDKs) und Mitogen-aktivierten Proteinkinasen (MAPKs) mit einschließt, bewirkt werden (Pinna & Ruzzene, 1996). Es gab bereits Hinweise darauf, dass andere Mitglieder der Grainyhead-Familie von Transkriptionsfaktoren, wie z.B. das grainyhead-Protein in *Drosophila* oder GRHL3 in Säugetierzellen durch den MAPK-Signalweg modifiziert und in ihrer Aktivität reguliert werden (M. Kim & McGinnis, 2011; Krzywinska et al., 2018). Da umfassende Vorarbeiten der eigenen Arbeitsgruppe darauf hindeuteten, dass es sich bei GRHL2 möglicherweise um ein Phosphoprotein handeln könnte (Frey, 2013), sollte im Rahmen dieser Arbeit die Möglichkeit einer Prolin-gerichteten Phosphorylierung von GRHL2 als neuartiger Mechanismus der Regulation der Expression oder Aktivität des Transkriptionsfaktors GRHL2 untersucht werden.

6.1.1. GRHL2 enthält eine mögliche Phosphorylierungsstelle an Position T²¹¹

Eine Analyse der GRHL2-Proteinsequenz führte zur Identifizierung von insgesamt nur drei Ser/Thr-Pro-Motiven als mögliche Akzeptorstellen für Prolin-gerichtete Kinasen, nämlich die Reste T¹⁶⁴, T²¹¹ und S⁵⁵⁷. Um eine Phosphorylierung dieser Reste genauer zu untersuchen, wurden Expressionskonstrukte generiert, die für GRHL2-Mutanten kodieren, bei denen die jeweiligen Aminosäuren mittels zielgerichteter Mutagenese durch Alanin ausgetauscht wurden (GRHL2 (T164A), GRHL2 (T211A) und GRHL2 (S557A)). Nach transienter Transfektion der Expressionsplasmide (# 1-4) in HEK293T-Zellen wurde die Expression der GRHL2-Mutanten im Vergleich zur wildtypischen Form mittels Immunoblot-Analyse untersucht. Die Mutanten GRHL2 (T164A) und GRHL2 (S557A) zeigten dabei keinen Unterschied im Vergleich zum

wildtypischen Protein, wohingegen die Mutante GRHL2 (T211A) ein deutlich verändertes Bandenmuster von geringerer Intensität aufwies (Abb. 6-1 A).

Als Ursache für das geringere Expressionsniveau der GRHL2 (T211A)-Mutante konnte ein transkriptioneller Effekt aufgrund der Tatsache ausgeschlossen werden, dass alle getesteten Expressionskonstrukte unter der Regulation desselben exogenen Promotors stehen. Daher kam eine differentielle Extrahierbarkeit oder eine reduzierte Proteinstabilität im Vergleich zur wildtypischen Form von GRHL2 als Ursache in Betracht. Um die erste Möglichkeit experimentell zu verifizieren, wurden jeweils Zellextrakte unter nativen (NP40-Lysispuffer) und denaturierenden (SDS-Lysispuffer) Bedingungen hergestellt und anschließend die GRHL2-Expression mittels Immunoblot-Analyse unter Verwendung eines GRHL2-spezifischen Antikörpers analysiert (Abb. 6-1 B). Unter beiden experimentellen Bedingungen konnte ein eindeutiger Unterschied im Expressionsniveau von GRHL2 (WT) und der GRHL2 (T211A)-Mutante beobachtet werden. Daraus konnte geschlossen werden, dass eine differentielle Extrahierbarkeit der Proteine höchstwahrscheinlich nicht als Ursache für den beobachteten Expressionsunterschied der GRHL2-Proteine anzusehen ist.

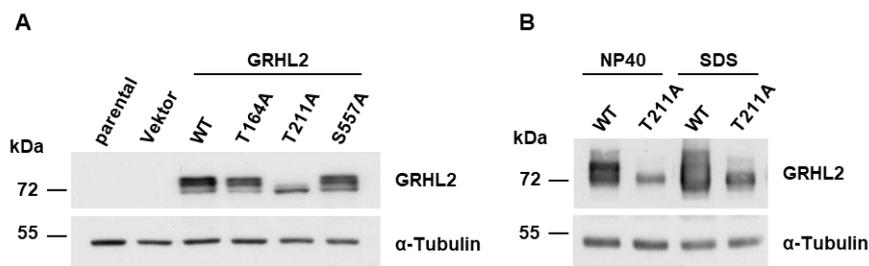


Abbildung 6-1: Der Aminosäureaustausch gegen Alanin an Position T²¹¹ beeinflusst die Stabilität des GRHL2-Proteins. (A) HEK293T-Zellen wurden mit Expressionsplasmiden, die für GRHL2 (WT) oder die Mutanten GRHL2 (T164A), GRHL2 (T211A), GRHL2 (S557A) kodieren, transient transfiziert. Der Nachweis der GRHL2-Proteinexpression erfolgte durch Immunoblot-Analyse mittels eines GRHL2-spezifischen Antikörpers. Der Nachweis von α-Tubulin diente als Ladekontrolle. (B) HEK293T-Zellen wurden mit Expressionsplasmiden, die für GRHL2 (WT) oder GRHL2 (T211A) kodieren, transient transfiziert. Die Herstellung der Zellextrakte erfolgte unter nativen (NP40) oder denaturierenden Bedingungen (SDS). Der Nachweis der GRHL2-Proteinexpression erfolgte durch Immunoblot-Analyse mittels eines α-GRHL2-Antikörpers. Der Nachweis von α-Tubulin diente als Ladekontrolle.

6.1.2. Identifizierung eines eine PEST-Sequenz enthaltenen Degrons in GRHL2

Um zu untersuchen, ob eine erhöhte metabolische Instabilität der GRHL2 (T211A)-Mutante das im Vergleich zum wildtypischen GRHL2-Protein geringere Expressionsniveau bedingen könnte, wurde ein differentielles Proteinabbau als mögliche Ursache in Betracht gezogen. Obwohl es verschiedene Wege des Proteinabbaus in Zellen gibt (Correa Marrero & Barrio-Hernandez, 2021; Dikic, 2017; Varshavsky, 2019), wurde das Hauptaugenmerk auf den Ubiquitin-vermittelten proteasomalen Abbau als den vielleicht wichtigsten Regulator des Proteinhaushalts in Zellen gerichtet (Correa Marrero & Barrio-Hernandez, 2021; D. H. Lee & Goldberg, 1998). Oft

spielen beim proteasomalen Abbau sogenannte PEST-Sequenzen eine große Rolle. Diese bestehen aus mindestens zehn Aminosäuren und weisen einen besonders großen Anteil an Prolin (P), Glutamat (E), Aspartat (D), Serin (S) und Threonin (T) auf. Aminosäuren wie Lysin (K) oder Arginin (R), die eine positive Ladung tragen, flankieren die PEST-Sequenzen, sind selbst aber nicht Teil des Abbau-Signals (Rechsteiner & Rogers, 1996; Rogers et al., 1986). Obwohl die genaue Bedeutung der PEST-Sequenzen noch nicht vollständig geklärt ist, deutet die Anwesenheit einer PEST-Sequenz in einem Protein auf die Anwesenheit eines Degrons und eine erhöhte Instabilität durch einen gesteigerten proteasomalen Abbau hin.

Für die Identifizierung möglicher PEST-Sequenzen innerhalb eines Proteins wurde das frei zugängliche bioinformatische Programm ePESTfind (https://emboss.bioinformatics.nl/cgi-bin/emboss/pepfind?_pref_hide_optional=1) verwendet. Dieses basiert auf einem Algorithmus, der in der Proteinsequenz nach Abschnitten sucht, die mindestens zwölf Aminosäuren lang sind, von positiven AS flankiert werden und einen hohen Anteil der Aminosäuren P, E, D, S und T besitzen. Dieser Anteil wird bei der Berechnung eines sogenannten PEST-Score als Massenprozent-Wert (MP) ausgedrückt. Angelehnt an die Methode von Kyte und Doolittle wird außerdem der Hydrophobizitätsindex der Sequenz bestimmt (Kyte & Doolittle, 1982). Der für die Bewertung einer möglichen PEST-Sequenz relevante PEST-Score ergibt sich aus folgender Gleichung:

$$\text{PEST-Score} = 0,55 \times \text{MP} - 0,5 \times \text{Hydrophobizitätsindex}$$

Die Werte können im Bereich von -45 bis +50 liegen. Dabei gilt, je höher der Wert, umso größer ist die Wahrscheinlichkeit, dass das betreffende Protein metabolisch instabil ist. Sequenzabschnitte mit einem PEST-Score über dem Schwellenwert von +5 werden als signifikant eingestuft und sollten experimentell verifiziert werden.

In Tabelle 6-1 ist das Ergebnis dieser Analyse für die GRHL2-Sequenz dargestellt. Insgesamt konnten elf mögliche PEST-Sequenzen identifiziert werden, darunter eine Sequenz, die mit einem Score von +6,88 als einzige den *Threshold* von +5 überschreitet und damit in der Bewertung der Wahrscheinlichkeit, dass es sich tatsächlich um eine PEST-Sequenz handelt, mit „hoch“ eingestuft wird (Sequenz 7). Die Sequenz erstreckt sich von Position 209-221, wobei Position R²⁰⁹ und K²²¹ die flankierenden, basischen Aminosäuren darstellen.

Tabelle 6-1: Identifizierung möglicher PEST-Motive innerhalb der GRHL2-Proteinsequenz mit Hilfe des ePESTfind-Programms.

	Sequenz	Position (AS)	Score	Bewertung
1	RLVALVPMPDPPFNTR	10-26	-12,57	niedrig
2	KSYLENPLTAATK	37-49	-13,93	niedrig
3	KTVPVNLSLNQDH	118-130	-17,89	niedrig
4	REQYSISFPESAIIPVSGITVVK	136-159	-10,78	niedrig
5	KAEDFTPVFMAPPVH	159-173	-13,01	niedrig
6	RVVIFEQTQYDVPSLATH	183-200	-15,39	niedrig
7	RSTPDSTYSESK	209-221	+6,88	hoch
8	KQGEPMTYLNK	261-272	-19,33	niedrig
9	KGLPLMIQIDTYSYNNR	385-401	-21,77	niedrig
10	HSQPVLFIPDVH	475-486	-23,22	niedrig
11	RPMEEEFGPVPSK	516-528	+1,17	niedrig

Dieses Ergebnis ist deshalb besonders interessant, weil diese potenzielle PEST-Sequenz auch den die Proteinstabilität beeinflussenden Rest T²¹¹ beinhaltet.

PEST-Sequenzen liegen meist in ungeordneten Regionen von Proteinen (Singh et al., 2006). Um zu überprüfen, ob dies auch für die in GRHL2 identifizierte PEST-Sequenz zutrifft, wurde das frei zugängliche Programm PrDOS (*Protein DisOrder prediction System*; <http://prdos.hgc.jp/cgi-bin/top.cgi>) eingesetzt, das einen Sequenzabschnitt auf charakteristische Merkmale ungeordneter Proteinabschnitte, wie beispielsweise einen hohen Anteil hydrophiler, geladener Aminosäuren, hin untersucht und gleichzeitig einen Abgleich mit Proteinsequenzen, bei denen die geordneten und ungeordneten Sequenzabschnitte bekannt sind, durchführt (Ishida & Kinoshita, 2007).

In Abb. 6-2 ist das Ergebnis der Analyse für GRHL2 dargestellt. Dabei ist die Wahrscheinlichkeit, dass sich ein Rest in einem ungeordneten Sequenzabschnitt befindet gegen die einzelnen Aminosäurepositionen aufgetragen. Ein Wahrscheinlichkeits-Wert größer 0,5 wurde als Schwellenwert gesetzt und indiziert einen ungeordneten Zustand des betreffenden Sequenzabschnitts. In Orange dargestellt ist der Bereich, in dem sich die PEST-Sequenz innerhalb der Aminosäuresequenz des GRHL2-Proteins befindet. Es ist deutlich, dass die PEST-Sequenz im Gegensatz zu den in grau dargestellten funktionellen Domänen für Transaktivierung, DNA-Bindung und Dimerisierung in einem ungeordneten Abschnitt lokalisiert ist.

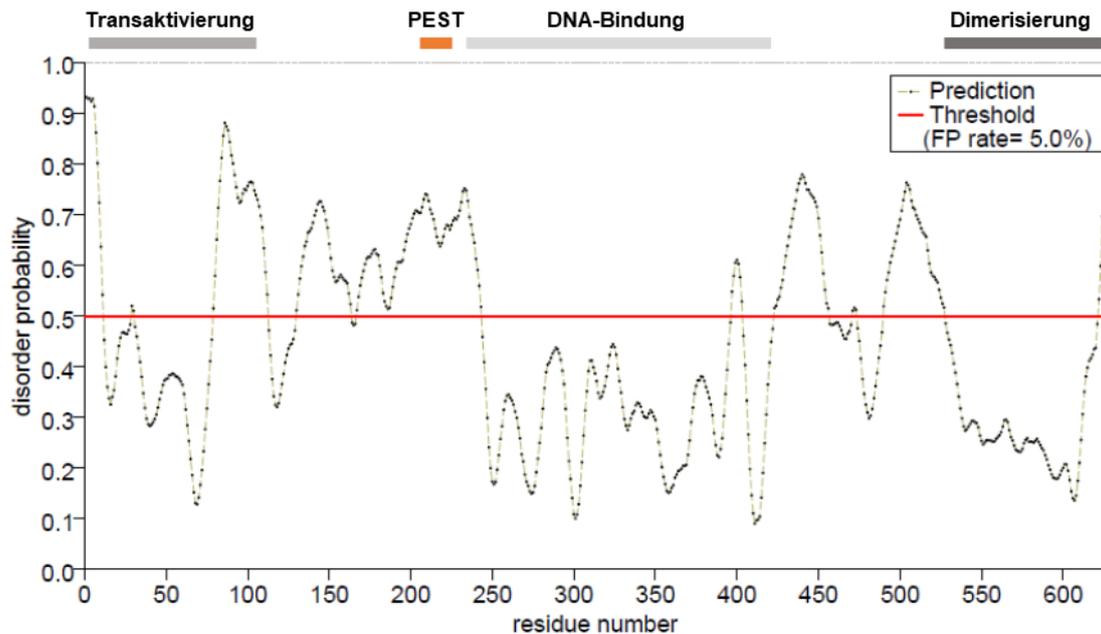


Abbildung 6-2: Identifizierung möglicher geordneter und ungeordneter Sequenzabschnitte innerhalb des GRHL2-Proteins mithilfe des Programms PrDOS. Die GRHL2-Proteinstruktur wurde mithilfe des Programms PrDOS bezüglich der Verteilung geordneter und ungeordneter Sequenzabschnitte untersucht. Auf der x-Achse ist die Aminosäureposition, auf der y-Achse die Wahrscheinlichkeit, dass ein Sequenzabschnitt eine ungeordnete Struktur bildet, dargestellt. Ein Wert über 0,5 indiziert einen ungeordneten Zustand des betreffenden Sequenzabschnitts (<http://prdos.hgc.jp/cgi-bin/result.cgi?ppid=343686p1d1608284815>). Die Position der PEST-Sequenz innerhalb eines ungeordneten (*disordered*) Sequenzabschnittes sowie die Lokalisation der drei funktionellen Domänen von GRHL2 sind angezeigt.

Dieses Ergebnis unterstützt die Annahme, dass GRHL2 eine für die Regulation der Proteinstabilität bedeutsame PEST-Sequenz besitzen könnte.

PEST-Sequenzen allein regulieren aber nicht den Abbau von Proteinen, sondern sind nur Teil eines größeren Sequenzabschnitts, der als Degron bezeichnet wird (Guharoy et al., 2016). Um experimentell zu ermitteln, ob GRHL2 ein den proteosomalen Abbau begünstigendes Degron enthält, wurden die in Abb. 6-3 A abgebildeten EGFP (*enhanced green fluorescent protein*)-Fusionskonstrukte generiert. EGFP ist ein sehr stabiles Protein mit einer Halbwertszeit von etwa 26 h (Corish & Tyler-Smith, 1999). Durch die Fusion mit einem Degron kann die Halbwertszeit dieses Reporterproteins aber deutlich reduziert werden, was als Nachweis von Degrons in Proteinen dienen kann. Die EGFP-Fusionsproteine enthielten neben einem N-terminalen HA-Tag die PEST-Sequenz von GRHL2 (AS S²¹⁰-F²²⁰) allein oder aber mit N- und C-terminal flankierenden Sequenzen unterschiedlicher Länge (10 bis 75 AS). Als Positivkontrolle wurde das C-terminale, eine PEST-Sequenz enthaltende Degron des c-Fos-Proteins (AS 309-380) genetisch mit den Sequenzen des EGFP fusioniert. Von diesem Fusionsprotein ist bekannt, dass es eine im Vergleich zum EGFP-Protein drastisch reduzierte Halbwertszeit bzw. Stabilität aufweist (Ferrara et al., 2003).

Ergebnisse

HEK293T-Zellen wurden mit den beschriebenen Expressionskonstrukten (# 5-14) transient transfiziert und die Zellextrakte einer Immunoblot-Analyse mittels eines HA-Antikörpers unterworfen. Das in Abb. 6-3 B dargestellte Ergebnis zeigt, dass die PEST-Sequenz allein nicht ausreichend ist, um EGFP zu destabilisieren. Erst die Inklusion einer steigenden Anzahl flankierender AS führt zu einem graduell zunehmenden Abbau von EGFP. Ist die PEST-Sequenz mit 60 bzw. 70 weiteren AS flankiert, ist der Effekt vergleichbar mit dem, der durch Fusion des Degrons von c-Fos mit EGFP erzielt wird. Der zugehörige α -Tubulin-Nachweis stellt sicher, dass der Effekt nicht auf ungleiche Ladung zurückzuführen ist.

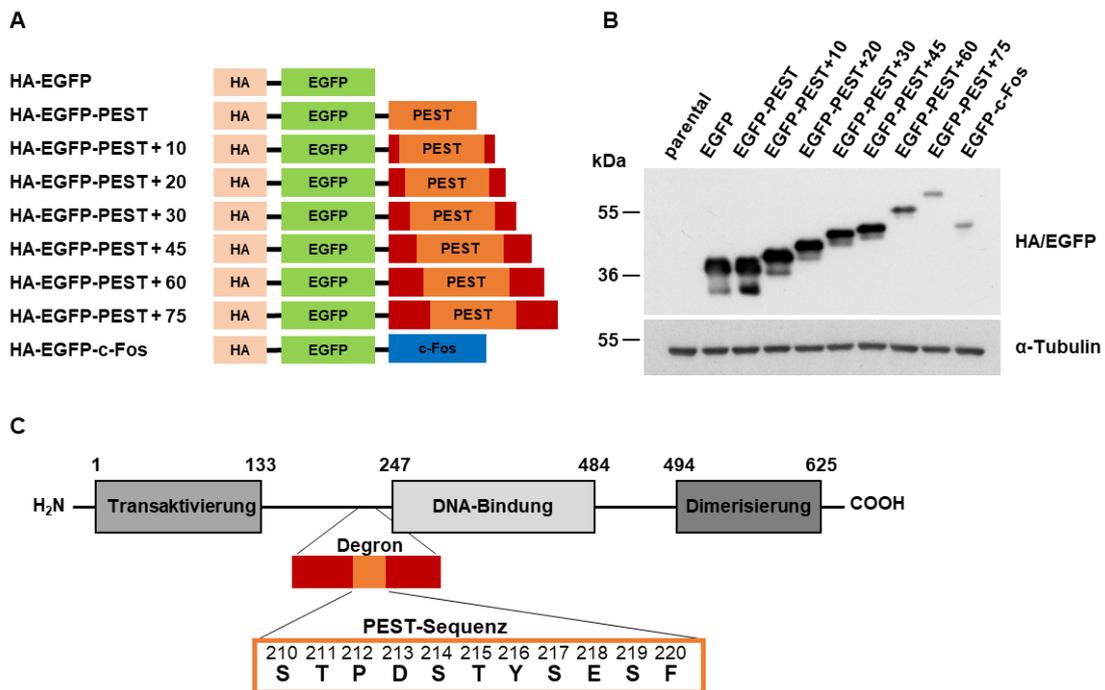


Abbildung 6-3: Lokalisation der PEST-Sequenz von GRHL2 innerhalb eines Degrons. (A) Schematische Darstellung der verwendeten Expressionskonstrukte, die für HA-getaggte EGFP-GRHL2-Fusionsproteine kodieren (Erläuterungen siehe Text). (B) Expressionskonstrukte, die für HA-getaggte EGFP-GRHL2-Fusionsproteine kodieren, wurden transient in HEK293T-Zellen transfiziert. Die Expression der Fusionsproteine wurde durch Immunoblot-Analyse mittels eines Antikörpers, der spezifisch die HA-Sequenz erkennt, detektiert. Der Nachweis von α -Tubulin diente als Ladekontrolle. (C) Schematische Darstellung der Lokalisation des eine PEST-Sequenz enthaltenden Degrons innerhalb des GRHL2-Proteins.

Dieses Ergebnis erlaubt die Schlussfolgerung, dass die Proteinsequenz des Transkriptionsfaktors GRHL2 ein Degron enthält, das eine PEST-Sequenz mit dem phosphorylierbaren Rest T²¹¹ beinhaltet und in einem ungeordneten Sequenzabschnitt N-terminal zur DNA-Bindungsdomäne lokalisiert ist (Abb. 6-3 C).

6.1.3. Mutationen innerhalb der PEST-Sequenz beeinflussen die Stabilität des GRHL2-Proteins.

PEST-Sequenzen beinhalten häufig eine Vielzahl phosphorylierbarer Reste wie Serin, Threonin oder Tyrosin. In der PEST-Sequenz des GRHL2-Proteins kommen für eine Phosphorylierung die Reste S²¹⁰, T²¹¹, S²¹⁴, T²¹⁵, Y²¹⁶, S²¹⁷ und S²¹⁹ in Frage. Um zu untersuchen, ob andere Reste außer T²¹¹ durch Phosphorylierung modifiziert werden und dadurch die Stabilität des Proteins beeinflussen könnten, wurde eine zielgerichtete Mutagenese durchgeführt, bei der jede Aminosäure innerhalb der PEST-Sequenz gegen Alanin ausgetauscht wurde. So wurden die elf in Abb. 6-4 A aufgelisteten Expressionskonstrukte generiert und für die transiente Transfektion von HEK293T-Zellen eingesetzt (# 1, 3, 14-23).

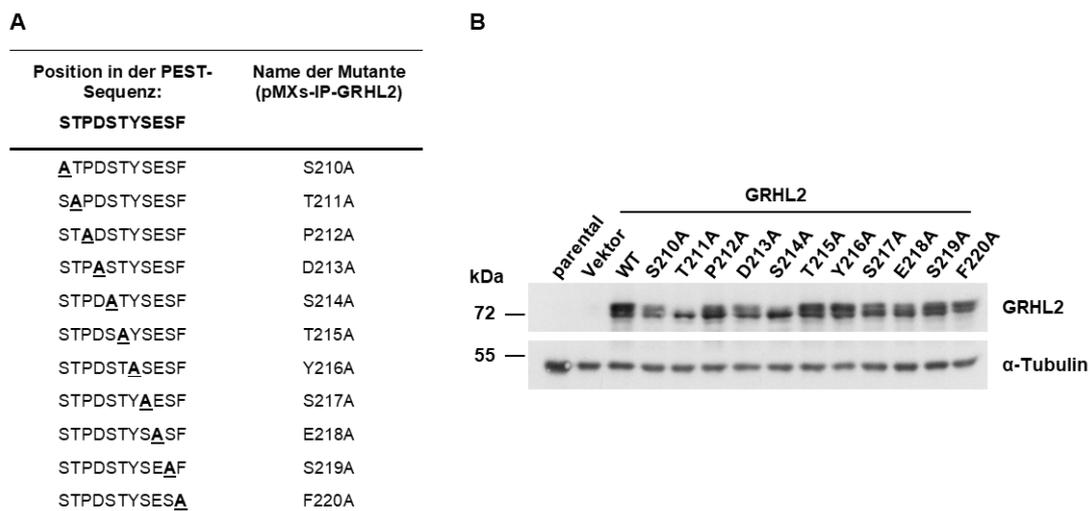


Abbildung 6-4: Mutationsanalyse der PEST-Sequenz des GRHL2-Proteins. (A) Tabellarische Auflistung der verwendeten Expressionskonstrukte, die für GRHL2-Mutanten kodieren, bei denen je eine Aminosäure innerhalb der PEST-Sequenz gegen Alanin ausgetauscht wurde. (B) HEK293T-Zellen wurden mit Expressionsplasmiden, die für GRHL2 (WT) oder GRHL2-Mutanten, bei denen einzelne Aminosäuren innerhalb der PEST-Sequenz jeweils gegen Alanin ausgetauscht wurden, transient transfiziert. Der Nachweis der GRHL2-Proteinexpression erfolgte durch Immunoblot-Analyse mittels eines GRHL2-spezifischen Antikörpers. Der Nachweis von α -Tubulin diente als Ladekontrolle.

Die Zellextrakte wurden in einer Immunoblot-Analyse unter Anwendung eines GRHL2-spezifischen Antikörpers auf ihre GRHL2-Expression hin untersucht. Die in Abb. 6-4 B dargestellten Ergebnisse zeigen, dass neben der Mutante GRHL2 (T211A) auch die Mutanten GRHL2 (S210A) und GRHL2 (S214A) deutlich veränderte Bandenmuster im Vergleich zum wildtypischen GRHL2 aufwiesen. Die Expression der acht weiteren untersuchten Mutanten zeigt keine Auffälligkeiten.

Um zu untersuchen, ob die beobachteten Effekte bei den GRHL2-Mutanten S210A, T211A und S214A abhängig vom Expressionsniveau sind, wurden HEK293T-Zellen mit niedriger (0,75 μ g) und hoher DNA-Menge (3,0 μ g) der entsprechenden Expressionsplasmide (# 1, 3, 14, 17)

transient transfiziert und die Lysate einer Immunoblot-Analyse unter Verwendung des GRHL2-spezifischen Antikörpers unterworfen (Abb. 6-5 A). Der Einfluss der jeweiligen Mutationen auf die GRHL2-Proteinexpression erwies sich als konzentrationsabhängig. So zeigte sich, dass bei niedrigen DNA-Konzentrationen die GRHL2 (S210A)-Mutante ein geringeres Expressionsniveau als die GRHL2 (T211A)-Mutante (33% vs. 67%) im Vergleich zum wildtypischen Protein aufwies. Dieses Verhältnis drehte sich aber beim Einsatz höherer DNA-Mengen für die Transfektion um (36 % vs. 29%). Auffällig war in beiden Fällen, dass die Mutation an Position S²¹⁴ zu einem leichten Anstieg in der GRHL2-Expression auf einen Wert von ca. 1,2 führt (Abb. 6-5 B).

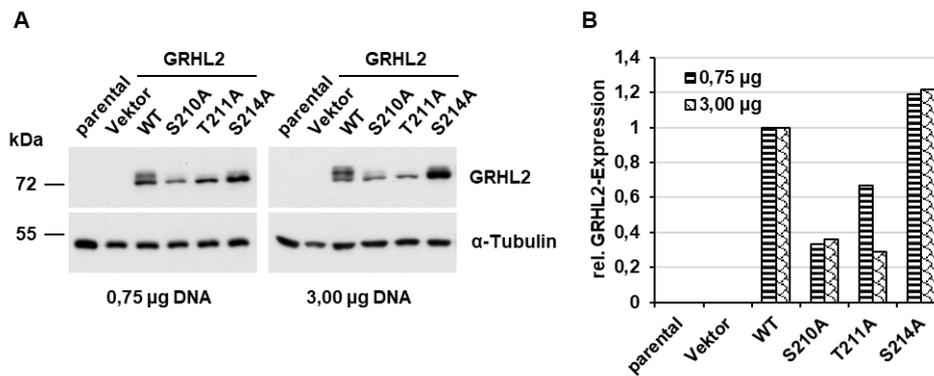


Abbildung 6-5: Mutationen innerhalb der PEST-Sequenz beeinflussen die Expression von GRHL2. (A) HEK293T-Zellen wurden mit Expressionsplasmiden, die für GRHL2 (WT) oder die Mutanten GRHL2 (S210A), GRHL2 (T211A), GRHL2 (S214A) kodieren, transient transfiziert. Hierzu wurden niedrige (0,75 µg) oder hohe Mengen (3,00 µg) Plasmid-DNA verwendet. Für die Immunoblot-Analyse wurde ein GRHL2-spezifischer Antikörper verwendet. Der Nachweis von α-Tubulin diente als Ladekontrolle. (B) Die Quantifizierung der Intensität der mittels Immunoblot-Analyse erhaltenen Signale erfolgte mit Hilfe der ImageJ-Software. Die Intensität der für das GRHL2 (WT)-Protein erhaltenen Signale wurde jeweils auf 1 normiert.

Die Ergebnisse deuteten darauf hin, dass es möglicherweise drei unterschiedliche phosphorylierbare Reste innerhalb der PEST-Sequenz gibt, die die Expression von GRHL2 positiv oder negativ beeinflussen könnten.

6.1.4. GRHL2 wird an drei Positionen innerhalb der PEST-Sequenz phosphoryliert

Um herauszufinden, ob die Reste S²¹⁰, T²¹¹ und T²¹⁴ tatsächlich phosphoryliert vorliegen, sollte durch Herstellung von Phospho-spezifischen Antikörpern der Nachweis der Phosphorylierung an diesen Stellen des Proteins erbracht werden. Dazu wurde zunächst jeweils ein geeignetes Peptid (S²¹⁰: YLKDDQRSTPDSTYSES; T²¹¹: YLKDDQRSTPDSTYSES; S²¹⁴: DQRSTPDSTYSESFKDA), das den relevanten Rest in zentraler Position enthielt, in phosphorylierter und nicht-phosphorylierter Form synthetisiert. Für die Immunisierung von

Kaninchen wurde jeweils das Phospho-Peptid verwendet. Die Antikörper-haltigen Seren wurden unter Verwendung der phosphorylierten und anschließender Verwendung der nicht phosphorylierten Peptide chromatographisch aufgereinigt. Die nach dieser Positiv- und Negativ-Selektion erhaltenen Antikörper konnten nun bezüglich ihrer Reaktivität und Spezifität charakterisiert werden.

Hierzu wurden HEK293T-Zellen mit Expressionsplasmiden, die für GRHL2-WT (# 1) oder die GRHL2-Mutanten S210A (# 14), T211A (# 3) und S214A (# 17) kodieren, transient transfiziert. Die Lysate wurden einer Immunoblot-Analyse unter Verwendung des Phosphorylierungs-unabhängigen GRHL2-spezifischen Antikörpers oder der jeweiligen Phospho-spezifischen Antikörper unterworfen. Die in Abb. 6-6 A dargestellten Ergebnisse lassen erkennen, dass alle Phospho-spezifischen Antikörper eine starke Reaktivität im wildtypischen GRHL2-Protein zeigten, wohingegen ihre Reaktivität in der jeweiligen Mutante stark abnahm bzw. komplett verloren ging. Die Detektion von GRHL2 diente dabei als Nachweis der GRHL2-Expression in den entsprechenden Proben. Dieses Ergebnis bestätigt die Annahme, dass die drei untersuchten Reste phosphoryliert werden.

Eine weitere Untersuchung der Phosphorylierungen wurde mittels Dephosphorylierung des wildtypischen GRHL2-Proteins durch Lambda-Phosphatase durchgeführt. Dazu wurden HEK293T-Zellen mit einem His₆-getaggten GRHL2 (WT)-Expressionskonstrukt (# 24) transient transfiziert. Über eine Ni-NTA-Matrix erfolgte die Anreicherung der getaggtten Proteine. Diese wurden, wie in Abb. 6-6 B dargestellt, in An- oder Abwesenheit eines Phosphatase-Inhibitors für 30 min mit Lambda-Phosphatase inkubiert. Als Kontrolle dienten unbehandelte oder ausschließlich mit Phosphatase-Inhibitor behandelte Proteine. In Immunoblot-Analysen wurden die drei Phospho-spezifischen Antikörper eingesetzt. Die Resultate zeigten, dass alle Phospho-spezifischen Antikörper mit unbehandelten, mit Phosphatase-Inhibitor behandelten oder mit einer Kombination aus Phosphatase-Inhibitor und Lambda-Phosphatase behandelten Proben jeweils starke Signale ergaben. Bei Proben, die ausschließlich mit Lambda-Phosphatase behandelt wurden und bei denen somit davon auszugehen ist, dass die Proteine weitestgehend dephosphoryliert vorlagen, war kaum Reaktivität zu beobachten (Abb. 6-6 B). Diese Ergebnisse belegten, dass es gelungen ist, Phospho-spezifische Antikörper gegen die phosphorylierbaren Reste S²¹⁰, T²¹¹ und T²¹⁴ zu generieren.

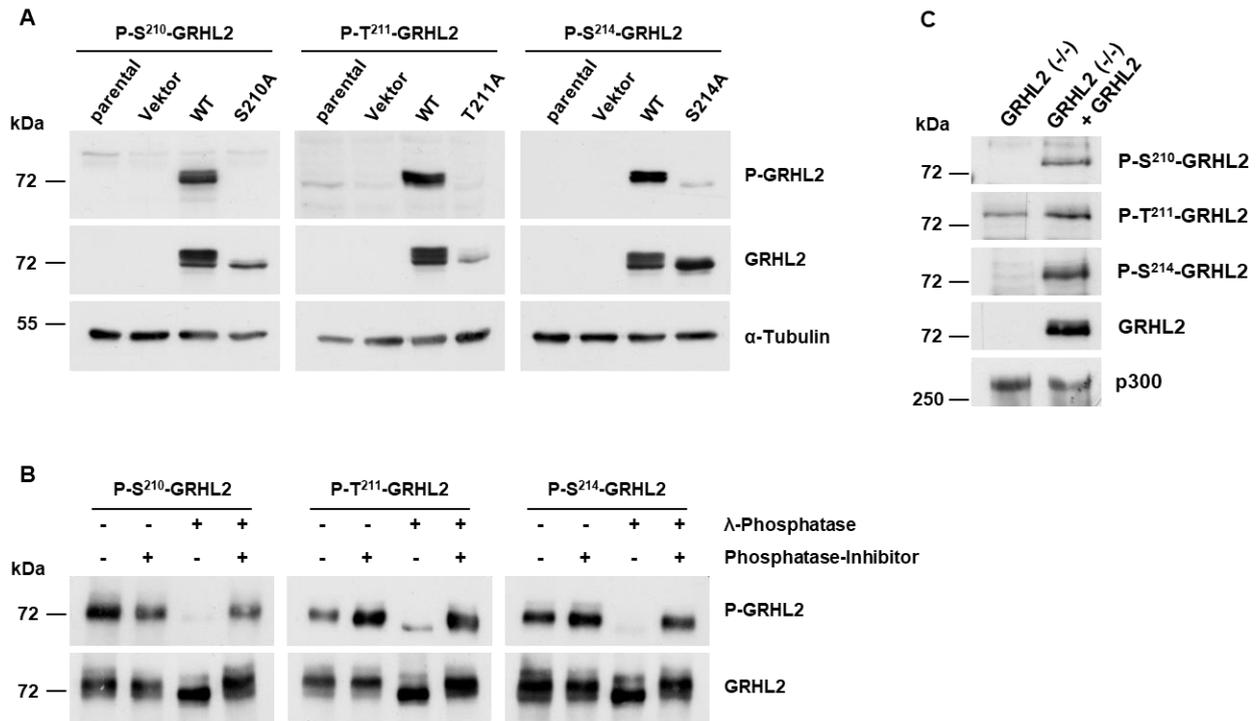


Abbildung 6-6: Nachweis der Phosphorylierung von GRHL2 durch Herstellung und Charakterisierung Phospho-spezifischer Antikörper. (A) HEK293T-Zellen wurden mit Expressionsplasmiden, die für GRHL2 (WT) oder die Mutanten GRHL2 (S210A), GRHL2 (T211A), GRHL2 (S214A) kodieren, transient transfiziert. Für die Immunoblot-Analyse wurden gegen die phosphorylierten Reste S210, T211 und S214 gerichtete Antikörper oder ein phosphorylierungsunabhängiger, GRHL2-spezifischer Antikörper verwendet. Der Nachweis von α -Tubulin diente als Ladekontrolle. (B) HEK293T-Zellen wurden mit einem Expressionsplasmid, das für His₆-getaggtetes GRHL2-Protein kodiert, transient transfiziert. Anschließend wurden die GRHL2-Proteine mittels einer Nickel-NTA-Matrix angereichert. Die Matrix-gebundenen GRHL2-Proteine wurden mit λ -Phosphatase in An- oder Abwesenheit eines Phosphatase-Inhibitors inkubiert. Für die Immunoblot-Analyse wurden gegen die phosphorylierten Reste S210, T211 und S214 gerichtete Antikörper oder ein phosphorylierungsunabhängiger, GRHL2-spezifischer Antikörper verwendet. (C) Der Nachweis der Phosphorylierung von GRHL2 an S210, T211 und S214 unter physiologischen Bedingungen erfolgte unter Verwendung von GRHL2-defizienten MDA-MB-468 Zellen (GRHL2 (-/-)) und Derivaten, bei denen die Expression von GRHL2 mittels Gentransfer induziert wurde (GRHL2 (-/-) + GRHL2). In einer Immunoblot-Analyse wurden Kernextrakte und gegen die phosphorylierten Reste S210, T211 und S214 gerichtete Antikörper oder ein phosphorylierungsunabhängiger, GRHL2-spezifischer Antikörper verwendet. Der Nachweis des nukleären Proteins p300 diente als Ladekontrolle.

Um herauszufinden, ob die identifizierten Phosphorylierungsstellen innerhalb der PEST-Sequenz des GRHL2-Proteins auch unter physiologischen Bedingungen von den Phospho-spezifischen Antikörpern erkannt werden können, wurde ein in der Arbeitsgruppe vorhandenes Mammakarzinom-Zellsystem eingesetzt. Dieses verfügt über einen mittels *Transcription activator-like effector nucleases* (TALEN) herbeigeführten GRHL2-Knockout (GRHL2 (-/-)) in MDA-MB-468-Zellen und Derivaten, bei denen mittels retroviralem Gentransfer eine GRHL2-Expression auf physiologischem Level wieder induziert wurde (GRHL2 (-/-) + GRHL2). In einer Immunoblot-Analyse wurden Kernextrakte der beiden Zelllinien auf Signale der gegen P-S²¹⁰-GRHL2, P-T²¹¹-GRHL2 und P-S²¹⁴-GRHL2 gerichteten Phospho-spezifischen Antikörper hin untersucht. Abb. 6-6 C ist zu entnehmen, dass in der Zelllinie, in der die Expression von GRHL2

mittels Gentransfer wiederhergestellt wurde, nicht aber in den *Knockout*-Zellen alle drei Antikörper spezifische Signale erzeugten.

Es lässt sich zusammenfassen, dass es gelungen ist, Phospho-spezifische Antikörper gegen die Reste S²¹⁰, T²¹¹ und T²¹⁴ zu generieren und zu charakterisieren. Mit Hilfe dieser Antikörper gelang der Nachweis von drei Phosphorylierungsstellen innerhalb der PEST-Sequenz des GRHL2-Proteins.

6.1.5. Phosphorylierungen innerhalb der PEST-Sequenz beeinflussen die Halbwertszeit des GRHL2-Proteins

Die Resultate lassen den Schluss zu, dass Phosphorylierungen innerhalb der PEST-Sequenz die Stabilität des GRHL2-Proteins beeinflussen. Um diesen möglichen Zusammenhang näher zu untersuchen, wurde die Halbwertszeit des wildtypischen und der mutierten GRHL2-Proteine nach Cycloheximid-Behandlung bestimmt. Cycloheximid ist ein Antibiotikum, welches die Proteinbiosynthese inhibiert (Obrig et al., 1971). In behandelten Zellen kann man so im zeitlichen Verlauf den Proteinabbau beobachten. HEK293T-Zellen wurden dazu mit den jeweiligen Expressionsplasmiden, die für GRHL2 (WT), GRHL2 (S210A), GRHL2 (T211A) und GRHL2 (S214A) kodieren (# 1, 3, 14, 17), transient transfiziert. Am Tag nach der Transfektion wurden die Zellen für verschiedene Zeitspannen zwischen 0,5 und 6 h mit 50 µg/ml Cycloheximid behandelt. Als Kontrolle dienten jeweils unbehandelte Zellen. Die Zellextrakte wurden in einer Immunoblot-Analyse auf ihre GRHL2-Expression hin untersucht.

Die in Abb. 6-7 A dargestellten Ergebnisse zeigen, dass es bei wildtypischem GRHL2 und den drei GRHL2-Mutanten durch die Inhibition der Proteinneusynthese zu einer zeitabhängigen, differentiellen Abnahme des Proteinexpressionsniveaus kommt. Eine Quantifizierung der in drei unabhängigen Experimenten ermittelten Expressionswerte ergab eine Halbwertszeit von 2,75 h für das wildtypische GRHL2-Protein (Abb. 6-7 B). Für die Mutanten GRHL2 (S210A) und GRHL2 (T211A) konnte im Vergleich zum wildtypischen GRHL2-Protein jeweils eine deutlich reduzierte Halbwertszeit von ca. 1,5 h ermittelt werden (Abb. 6-7 C, D). Damit werden diese beiden GRHL2-Mutanten fast doppelt so schnell abgebaut wie das wildtypische GRHL2-Protein. Für die GRHL2 (S214A)-Mutante hingegen wurde eine im Vergleich zum GRHL2 (WT)-Protein erhöhte Halbwertszeit von ca. 3,75 h ermittelt (Abb. 6-7 E).

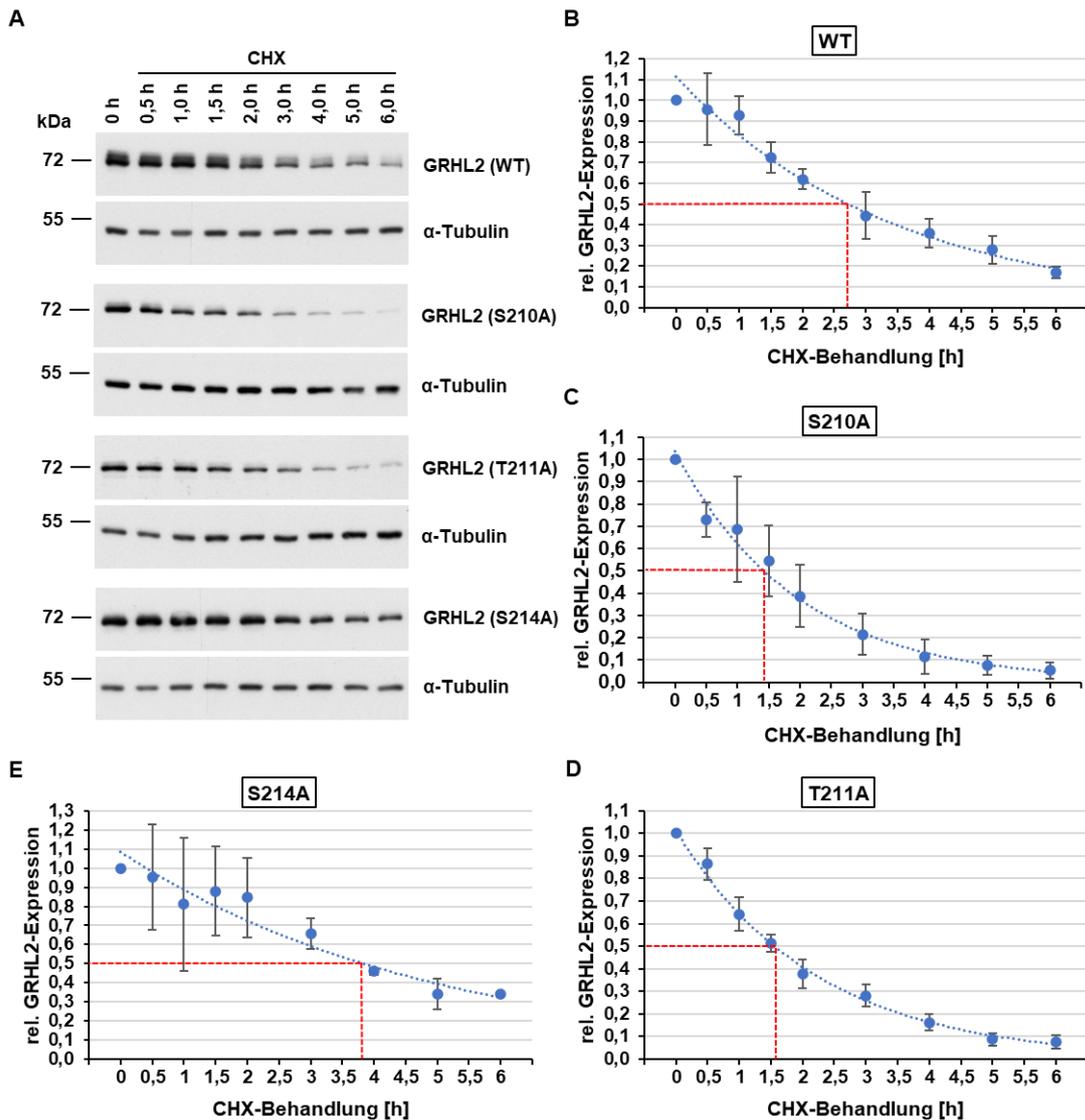


Abbildung 6-7: Bestimmung der Halbwertszeiten des wildtypischen GRHL2 und der Mutanten GRHL2 (S210A), (T211A) und (S214A). (A) HEK293T-Zellen wurden mit Expressionsplasmiden, die für GRHL2 (WT) oder die Mutanten GRHL2 (S210A), GRHL2 (T211A), GRHL2 (S214A) kodieren, transient transfiziert und mit dem Proteinsyntheseinhibitor Cycloheximid (CHX; 50 µg/ml) für die jeweils angegebenen Zeiten behandelt. Für die Immunoblot-Analyse wurde ein GRHL2-spezifischer Antikörper verwendet. Der Nachweis von α-Tubulin diente als Ladekontrolle. (B-E) Zur Bestimmung der Halbwertszeit der GRHL2-Proteine wurde eine Quantifizierung der Immunoblot-Signale je dreier unabhängiger Experimente mittels der ImageJ-Software durchgeführt. Die Halbwertszeit lässt sich anhand der roten Markierungen ablesen.

Diese Ergebnisse der Halbwertszeit-Bestimmung von wildtypischem GRHL2 und den Mutanten S210A, T211A und S214A zeigten somit erstmals, dass die Stabilität des GRHL2-Proteins posttranslational reguliert wird, wobei Phosphorylierungen an den Positionen S²¹⁰ und T²¹¹ eine Stabilisierung, an Position S²¹⁴ hingegen eine Destabilisierung induzieren.

6.1.6. Identifizierung von Kinasen, die GRHL2 innerhalb der PEST-Sequenz phosphorylieren

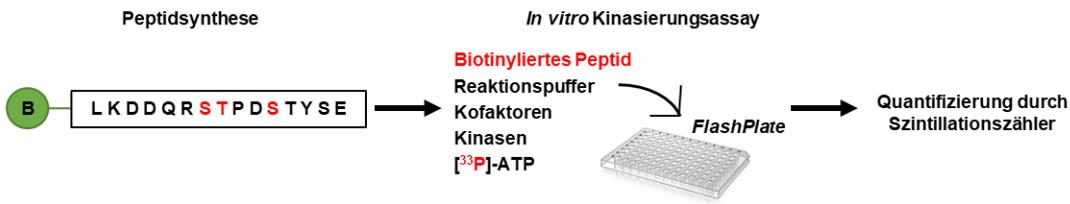
Die Identifizierung von drei Phosphorylierungsstellen innerhalb einer PEST-Sequenz, die die Stabilität und damit Aktivität des GRHL2-Proteins regulieren könnten, führte zur Frage nach der Identität der für diese posttranslationalen Modifizierungen verantwortlichen Kinasen. Aufgrund der enormen Größe des humanen Kinoms mit etwa 550 verschiedenen Kinasen (Manning et al., 2002), wurden zwei experimentell unterschiedliche, aber komplementäre Ansätze verfolgt.

6.1.6.1. Identifizierung von Kinasen mittels *KinaseFinder Screening*.

Mittels eines *Screening*-Verfahrens wurde versucht, Kandidaten-Kinasen zu identifizieren, die für eine Modifikation von GRHL2 innerhalb der PEST-Sequenz verantwortlich sein könnten.

Das Prinzip eines sogenannten *KinaseFinder Screenings* bestand, wie in Abb. 6-8 A illustriert, zunächst aus der Herstellung eines biotinylierten, die PEST-Sequenz enthaltenden Peptids (Biotin-Ahx-LKDDQRSTPDSTYSE-NH₂), das an Streptavidin-beschichtete FlashPlate® PLUS-Platten gebunden wurde. Insgesamt wurden in *in vitro* Kinasierungsassays 245 Serin/Threonin-Kinasen dahingehend getestet, ob sie in der Lage sind, an dem eingesetzten Peptid in Anwesenheit entsprechender Reaktionspuffer, Kofaktoren und [γ -³³P]-ATP, Phosphorylierungen herbeizuführen. Nach Beendigung der Reaktion und einigen Waschschrritten wurde die Inkorporation von radioaktivem ³³Pi und damit die Aktivität der verschiedenen Kinasen mittels eines Szintillationszählers bestimmt. Die Rohdaten wurden wie unter Abschnitt 5.3.10 beschrieben z.B. durch Abzug von *Background*-Werten bereinigt. Der Tabelle 9-13 (Anhang) sind die finalen Werte zu entnehmen. In Abb. 6-8 B ist eine graphische Darstellung der erhaltenen Kinase-Aktivitäten [cpm] der 245 eingesetzten Kinasen dargestellt, wobei jeder Peak eine spezifische Kinase repräsentiert. Die Auswertung der erhaltenen Daten ergab nach Abzug aller *Background*- und Kontrollwerte keinen eindeutigen Hinweis auf eine Kinase, die GRHL2 innerhalb des eingesetzten Peptids phosphorylieren könnte. Insgesamt wurde das Peptid von den Kinasen nicht sehr gut als Substrat akzeptiert, so dass bei hohen *Background*-Daten den gemessenen Werten nur eine beschränkte Aussagekraft beizumessen war. Somit bleibt festzuhalten, dass mit Hilfe dieses experimentellen Ansatzes keine Kandidaten-Kinasen für die Phosphorylierung innerhalb der PEST-Sequenz des GRHL2-Proteins identifiziert werden konnten.

A



B

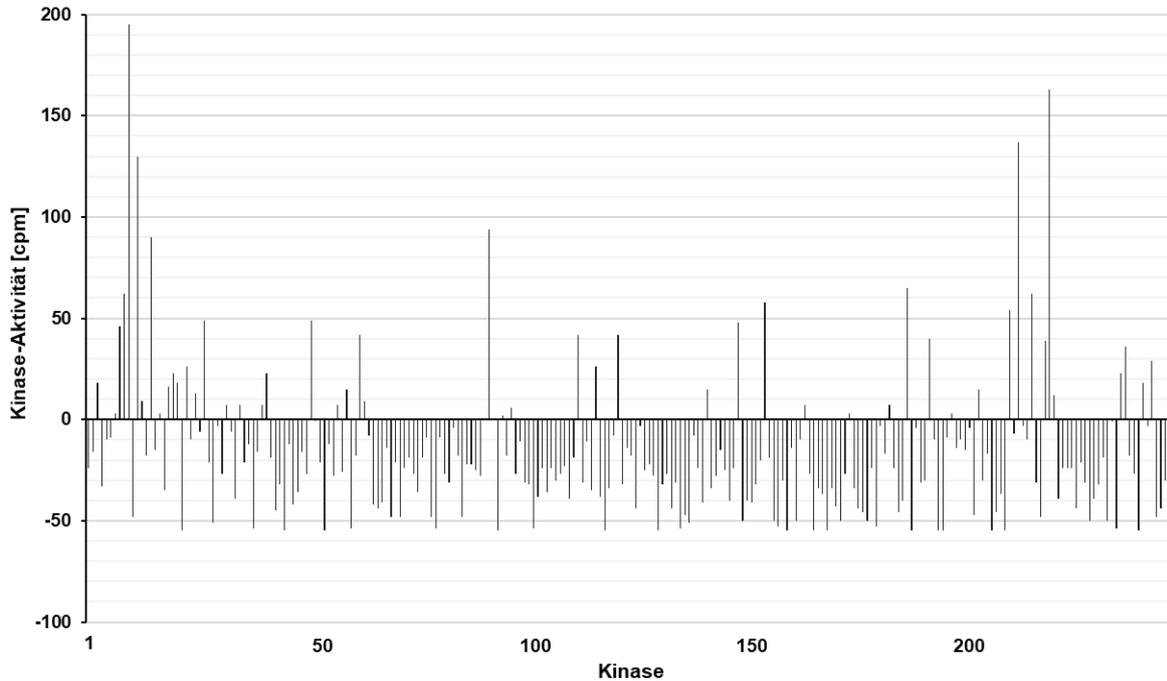


Abbildung 6-8 Graphische Darstellung der Ergebnisse des „Kinase Finder Screenings“. (A) Schematische Darstellung des Versuchsablaufs eines „Kinase Finder Screenings“. Ein „Kinase Finder Screening“ wurde in Zusammenarbeit mit der Fa. ProKinase mit einem synthetischen Peptid, das die PEST-Sequenz von GRHL2 enthält, durchgeführt. Insgesamt wurden 245 Serin/Threonin-Kinasen in Hinblick auf ihre Fähigkeit, die PEST-Sequenz von GRHL2 in einem *in vitro*-Assay in Anwesenheit von ATP und notwendiger Kofaktoren zu phosphorylieren, untersucht (Erläuterungen siehe Text). (B) Abgebildet ist das Ergebnis der Kinase-Aktivität [cpm]-Messung der 245 Kinasen.

6.1.6.2. Identifizierung von Kinasen durch pharmakologische Inhibition von Kandidaten-Kinasen

In einem parallel durchgeführten Ansatz wurde versucht, durch bioinformatische Analysen Kandidaten-Kinasen für die Phosphorylierung des GRHL2-Proteins innerhalb der PEST-Sequenz zu identifizieren und diese dann durch den gezielten Einsatz von Inhibitoren experimentell zu verifizieren. Bei den computergestützten Analysen, die u.a. auch bioinformatische Ressourcen wie PhosphoNET (<http://www.phosphonet.ca/>) oder GPS 5.0 (<http://gps.biocuckoo.cn/index.php>) mit einschlossen, wurden zahlreiche Kinasen identifiziert, die möglicherweise in die Phosphorylierung der Reste S²¹⁰, T²¹¹ und S²¹⁴ involviert sein könnten. Um die Auswahl möglicher Kinasen weiter einzuschränken, wurden durch Literaturrecherche

Kinasen mit ausschließlich extranukleärer Lokalisation oder einer Gewebsverteilung, die nicht der vorwiegend epithelialen Verteilung des GRHL2-Proteins entsprachen, ausgeschlossen. Die verbliebenen Kandidaten-Kinasen wurden durch den Einsatz von gegen sie gerichtete Inhibitoren untersucht. Dazu wurden jeweils Immunoblot-Analysen und qRT-PCR-Analysen durchgeführt. Dabei wurden die Inhibitoren sowohl unter physiologischen Bedingungen in Mammakarzinomzelllinien eingesetzt als auch in HEK293T-Zellen mit überexprimierten GRHL2-Proteinen in Hinblick auf ihre Fähigkeit, die Expression von GRHL2 zu beeinflussen, getestet. In Tab. 6-2 ist eine Auswahl der getesteten Inhibitoren mit ihren primären *Targets* aufgeführt.

Tabelle 6-2: Verwendete Kinase-Inhibitoren.

Inhibitor	Primäres Ziel	Inhibitor	Primäres Ziel
BIO	GSK3 α/β	A64 trifluoroacetate	HIPK2
CHIR99021	GSK3 α/β	ML-7	MLCK
TBB	CK2	KN-62	CaMK II
TBCA	CK2	CID755673	PKD1/2/3
PF-670462	CK1 δ/ϵ	MEK2206	PKB (AKT)
IC261	CK1 δ/ϵ	Roscovitine	CDK1/2/5
SR3029	CK1 δ	PD0332991 isethionate	CDK4/6
PF-4800567 hydrochloride	CK1 ϵ	Leucettine L41	DYRKs
PD98059	MEK1	BIRB-796	p38 MAPK

GSK3 α/β : Glycogen-Synthase-Kinase 3 α/β ; CK2: Casein-Kinase 2; CK1 δ/ϵ : Casein-Kinase 1 δ/ϵ ; HIPK: *Homeodomain-interacting protein kinase* 2; MLCK: *Myosin light-chain kinase*; CaMK II: *Ca²⁺/calmodulin-dependent protein kinase*; PKD1/2/3: Protein-Kinase D 1/2/3; PKB: Protein-Kinase B; CDK: *Cyclin-dependent kinases*; DYRK: *Dual specificity tyrosine-phosphorylation-regulated kinase*; p38 MAPK: *p38 mitogen-activated protein kinases*

Zusammenfassend lassen sich die erzielten Ergebnisse dahingehend beschreiben, dass die meisten Inhibitoren keinen nennenswerten Effekt auf die GRHL2-Expression erzeugten. In einigen Fällen (z.B. TBB, CID755673 und PD0332991 isethionate) konnte durch qRT-PCR-Analysen nachgewiesen werden, dass die Inhibitoren die Expression von GRHL2 transkriptionell und nicht posttranslational beeinflussten.

Eine interessante Ausnahme bildete der gegen die Casein-Kinase 1 (CK1)-Isoformen δ und ϵ gerichtete Inhibitor PF-670462 (Abb. 6-9). GRHL2-exprimierende HEK293T-Zellen wurden für 24 h mit steigenden Konzentrationen zwischen 1 und 50 μ M behandelt. Die in einer Immunoblot-Analyse untersuchte GRHL2-Proteinexpression wies eine deutliche, konzentrationsabhängige Abnahme auf, wohingegen die GRHL2 mRNA-Expression, die mittels qRT-PCR ermittelt wurde, unverändert war. Dieses Ergebnis deutet auf eine mögliche posttranslationale Regulation der GRHL2-Expression durch CK1-Isoformen hin.

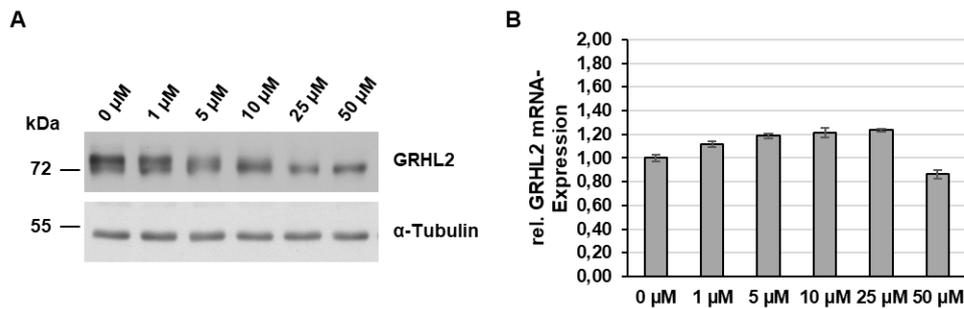


Abbildung 6-9: Posttranslationaler Effekt auf die GRHL2-Expression nach Stimulation mit PF-670462. Mit dem GRHL2-WT-Expressionskonstrukt transient transfizierte HEK293T-Zellen wurden für 24 h mit verschiedenen Konzentrationen (0-50 µM) PF-670462 stimuliert. (A) Zellextrakte wurden in einer Immunoblot-Analyse mit einem GRHL2-spezifischen Antikörper untersucht, dabei diente α-Tubulin als Ladekontrolle. (B) Mittels qRT-PCR wurde die GRHL2 mRNA-Expression ermittelt. RPLP0 diente als Referenzgen. Angezeigt ist jeweils der Mittelwert der relativen GRHL2-Expression aus einem im Triplikat durchgeführten Experiment mit zugehöriger Standardabweichung, wobei die DMSO-Kontrolle auf 1,0 normiert wurde.

Um das Ergebnis zu bestätigen, wurden Experimente mit weiteren, ebenfalls gegen CK1δ/ε gerichteten Inhibitoren (IC261, SR3029, PF-4800567 hydrochloride) durchgeführt. Diese Inhibitoren induzierten allerdings keine signifikanten Veränderungen in der Menge des GRHL2-Proteins unter vergleichbaren Versuchsbedingungen, so dass von einer Kreuzreaktivität des Inhibitors PF-670462 auszugehen ist und die GRHL2-Stabilität nicht durch CK1δ/ε, sondern durch eine noch nicht bekannte PF-670462-sensitive Kinase reguliert wird.

Obwohl keine Kinase durch pharmakologische Intervention identifiziert werden konnte, bestätigen diese Befunde die Existenz eines posttranslationalen Regulationsmechanismus der GRHL2-Expression. Ferner bildet die Identifizierung des PF-670462-Inhibitors einen Ansatzpunkt für die Identifizierung der Kinase, die GRHL2 innerhalb der PEST-Sequenz phosphoryliert.

6.2. Transkriptionelle Regulation des Transkriptionsfaktors GRHL2

In dem Bemühen neue Mechanismen der Regulation der Expression und/oder Aktivität des Transkriptionsfaktors GRHL2 in Mammakarzinomzellen zu identifizieren, wurden kultivierte Tumorzellen zur Induktion unterschiedlichster Signalwege mit verschiedenen Agenzien (z.B. dem Differenzierungsagens all-trans-Retinsäure (ATRA)), behandelt. Interessanterweise konnte nach Behandlung mit dem Phorbol-ester Phorbol-2-myristat-3-acetat (PMA), einem potenten Stimulator von Mitgliedern der Proteinkinase C (PKC)-Familie, eine Reduktion der GRHL2-Proteinmenge beobachtet werden. Eine mögliche Suppression der GRHL2-Expression durch PKC stellt einen neuen Regulationsmechanismus dar, der weiter untersucht wurde.

6.2.1. PMA induziert eine Suppression der GRHL2-Expression in Mammakarzinomzellen

Es wurden insgesamt acht unterschiedliche Mammakarzinomzelllinien, die die unterschiedlichen, hauptsächlichen Subtypen des Mammakarzinoms (Luminal A und B, Her2+, Basal A) repräsentieren, für Stimulationsexperimente ausgewählt, wobei Mammakarzinomzelllinien des Subtyps Basal B, die kein GRHL2 exprimieren (Werner et al., 2013) nicht berücksichtigt wurden. Die Zellen wurden für 1 h mit PMA (100 nM) stimuliert und nach einem Mediumwechsel weitere 6h für die RNA-Isolation oder 8 h für die Herstellung von Zellextrakten inkubiert. Von den acht getesteten Zelllinien sprachen fünf Zelllinien eindeutig auf die Stimulation an: in T47-D und ZR-75-1-Zellen (Luminal A), SKBR-3 (HER2+) sowie MDA-MB-468 und BT-20 (Basal A) konnte eine Reduktion der GRHL2-Proteinmenge beobachtet werden. In den Zelllinien BT-474 und MDA-MB-361 (Luminal B) und MDA-MB-453 (HER2+) waren keine signifikanten Effekte zu beobachten (Abb. 6-10 A). Die Ergebnisse der qRT-PCR-Analyse bestätigen die mittels Immunoblot-Analyse erhaltenen Daten, indem in den responsiven Zelllinien ebenfalls eine Abnahme der GRHL2 mRNA-Expression zu verzeichnen war (Abb. 6-10 B). Diese Ergebnisse ließen den Schluss zu, dass GRHL2 durch Stimulation mit PMA in Mammakarzinomzellen transkriptionell herunterreguliert wird.

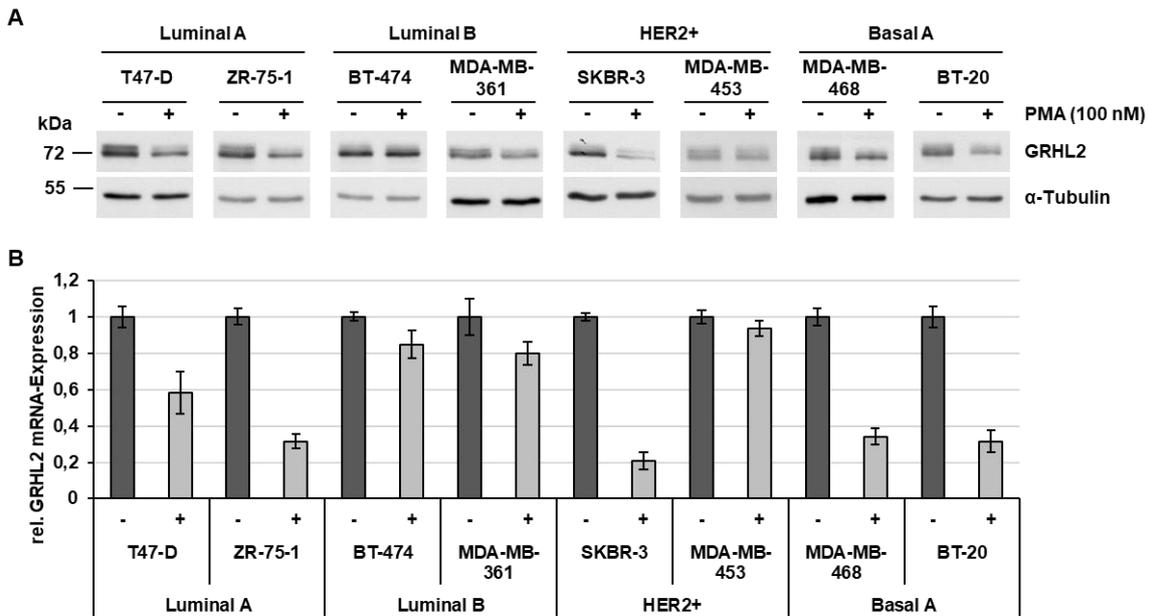


Abbildung 6-10: Stimulation verschiedener Mammakarzinomzelllinien mit PMA. (A) Mammakarzinomzelllinien, die jeweils unterschiedliche Subtypen von Mammakarzinomen (Luminal A, Luminal B, HER2+, Basal A) repräsentieren, wurden für 1 h entweder mit DMSO (-) oder 100 nM PMA (+) behandelt. Nach einem Mediumwechsel folgte eine Inkubation für weitere 8 h. Mittels Immunoblot-Analyse mit einem GRHL2-spezifischen Antikörper wurde die GRHL2-Proteinexpression nachgewiesen. Der Nachweis von α-Tubulin diene als Ladekontrolle. (B) Mammakarzinomzelllinien wurden für 1 h mit PMA (100 nM) stimuliert (+). Nach einem Mediumwechsel folgte eine Inkubation für weitere 6 h. Als Negativkontrolle diene jeweils die Behandlung mit dem Lösungsmittel DMSO (-). Mittels qRT-PCR wurde die GRHL2 mRNA-Expression ermittelt. RPLP0 diene als Referenzgen. Angezeigt ist jeweils der Mittelwert der relativen GRHL2-Expression aus einem im Triplikat durchgeführten Experiment mit zugehöriger Standardabweichung, wobei die DMSO-Kontrolle stets auf 1,0 normiert wurde.

Um diese neuartigen Befunde zu erhärten, wurden exemplarisch in den responsiven Zelllinien T47-D und ZR-75-1 eine mögliche Konzentrations- und Zeitabhängigkeit der PMA-induzierten Herunterregulation der GRHL2-Expression untersucht. Die in Abb. 6-11 A dargestellten Ergebnisse der Immunoblot-Analyse zeigen für beide Zelllinien mit steigender PMA-Konzentration (0 - 100 nM) eine graduelle Abnahme der GRHL2-Proteinmenge. Eine Quantifizierung der erhaltenen Signale ergab, dass bei einer PMA-Konzentration von 100 nM in T47-D-Zellen eine maximale Abnahme der GRHL2-Proteinmenge auf ca. 40 %, in ZR-75-1-Zellen sogar auf ca. 20 % zu beobachten war (Abb. 6-11 B).

Für die Untersuchung der Zeitabhängigkeit der PMA-induzierten Herunterregulation der GRHL2-Expression wurde für 1 h einheitlich eine Konzentration von 100 nM PMA eingesetzt und eine anschließende Inkubationszeit von 0 bis 8 h gewählt. Die in Abb. 6-11 C dargestellten Resultate belegen eine kontinuierliche Abnahme der GRHL2-Proteinmenge mit steigender Inkubationszeit. Eine Quantifizierung der erhaltenen Signale ergab, dass nach 8 h Inkubationszeit eine maximale Abnahme der GRHL2-Proteinmenge auf ca. 50 % (T47-D) bzw. ca. 30 % (ZR-75-1) zu beobachten war (Abb. 6-11 D). Die Ergebnisse dieser Experimente zeigten damit eine deutliche Konzentrations- und Zeitabhängigkeit der Abnahme der GRHL2-Expression nach PMA-Stimulation.

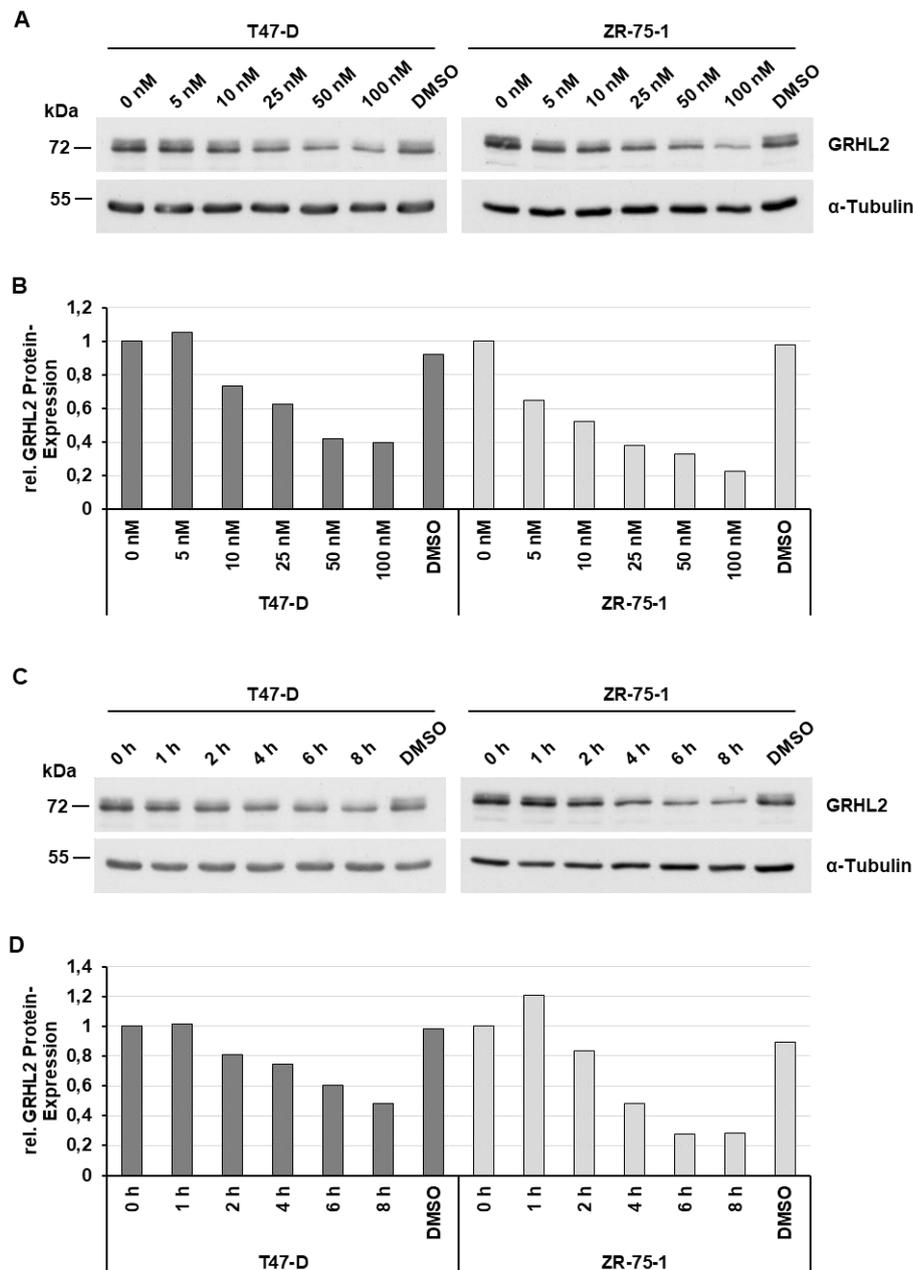


Abbildung 6-11: Konzentrations- und Zeitabhängigkeit der Abnahme der GRHL2-Expression nach PMA-Stimulation. (A) T47-D- und ZR-75-1-Zellen wurden für 1 h mit steigenden Konzentrationen (0-100 nM) PMA stimuliert. Nach einem Mediumwechsel erfolgte eine Inkubation für weitere 8 h. Der Nachweis der GRHL2-Proteinexpression erfolgte durch Immunoblot-Analyse mittels eines GRHL2-spezifischen Antikörpers. Die Detektion von α -Tubulin diente als Ladekontrolle. (B) Quantifizierung der durch die Immunoblot-Analyse erhaltenen Signale mit Hilfe der Image J Software. (C) T47-D- und ZR-75-1-Zellen wurden für 1 h mit PMA (100 nM) stimuliert. Nach einem Mediumwechsel erfolgte eine Inkubation für verschiedene Zeitspannen (0-8 h). Der Nachweis der GRHL2-Proteinexpression erfolgte durch Immunoblot-Analyse mittels eines GRHL2-spezifischen Antikörpers. Die Detektion von α -Tubulin diente als Ladekontrolle. (D) Dargestellt ist die mit Hilfe der Image J Software durchgeführte Quantifizierung der mittels Immunoblot-Analyse erhaltenen Signale.

Um zu untersuchen, ob die PMA-induzierte Herunterregulation der GRHL2-Expression ein transienter oder langandauernder Effekt ist, wurden T47-D und ZR-75-1-Zellen jeweils für 12 und 24 h mit PMA (100 nM) stimuliert. Die in Abb. 6-12 dargestellten Ergebnisse einer Immunoblot-Analyse belegen, dass eine Langzeitstimulation mit PMA auch zu einer

andauernden Herunterregulation der GRHL2-Proteinexpression, die sich zudem zeitabhängig noch geringfügig verstärkte, führte.

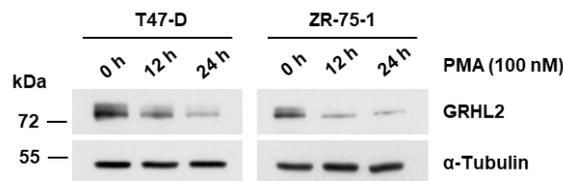


Abbildung 6-12: Langzeitstimulation von T47-D und ZR-75-1 mit PMA. T47-D- und ZR-75-1-Zellen wurden je für 12 und 24 h mit PMA (100 nM) stimuliert. Durch Immunoblot-Analyse wurde die GRHL2-Proteinexpression mittels eines GRHL2-spezifischen Antikörpers dargestellt. Der Nachweis von α -Tubulin diente als Ladekontrolle.

Zusammenfassend lässt sich festhalten, dass diese Ergebnisse auf eine spezifische Herunterregulation der GRHL2-Expression nach Stimulation durch Phorbolester hindeuten.

6.2.2. Pharmakologische Inhibition der PMA-induzierten Herunterregulation der GRHL2-Expression

PMA ist ein potenter Aktivator von Mitgliedern der Proteinkinase C (PKC)-Familie, die die klassischen PKCs (*conventional* PKCs; cPKC) mit den vier Isoformen α , β 1, β 2 und γ , die neuartigen PKCs (*novel* PKCs; nPKC) mit den Isoformen δ , ϵ , η und θ und die nicht PMA-abhängigen atypischen PKCs (*atypical* PKCs; aPKC) mit den Isoformen ζ und ι umfassen. Da PKC-Isoformen meist unterschiedliche biologische Funktionen in Zellen regulieren (Isakov, 2018; Kaleli et al., 2020; Marrocco et al., 2019; Parker et al., 2021), war es von besonderem Interesse herauszufinden, welche der acht, durch PMA-aktivierbaren PKC-Isoformen (klassisch oder neuartig) die transkriptionelle Herunterregulation der GRHL2-Expression bewirkt.

Deshalb wurde versucht, durch den gezielten Einsatz von Inhibitoren (Gö6976 und Gö6983), die spezifisch bestimmte PKC-Isoformen inhibieren, die Liste möglicher PKC-Isoformen, die die GRHL2-Expression regulieren könnten, einzugrenzen. Die in Abb. 6-13 A gezeigten Ergebnisse zeigen, dass der Inhibitor Gö6976 in einer Konzentration von 100 nM nicht dazu in der Lage war, die durch PMA induzierte Herunterregulation der GRHL2-Expression in zwei unterschiedlichen Mammakarzinomzelllinien (T47-D und ZR-75-1) zu blockieren. Ein ganz anderes Bild ergab sich beim Einsatz des Inhibitors Gö6983 in einer Konzentration von 2 μ M. Dieser Inhibitor verhinderte nahezu vollständig die PMA-induzierte Reduktion in der GRHL2-Proteinexpression in beiden Modellsystemen (Abb. 6-13 B).

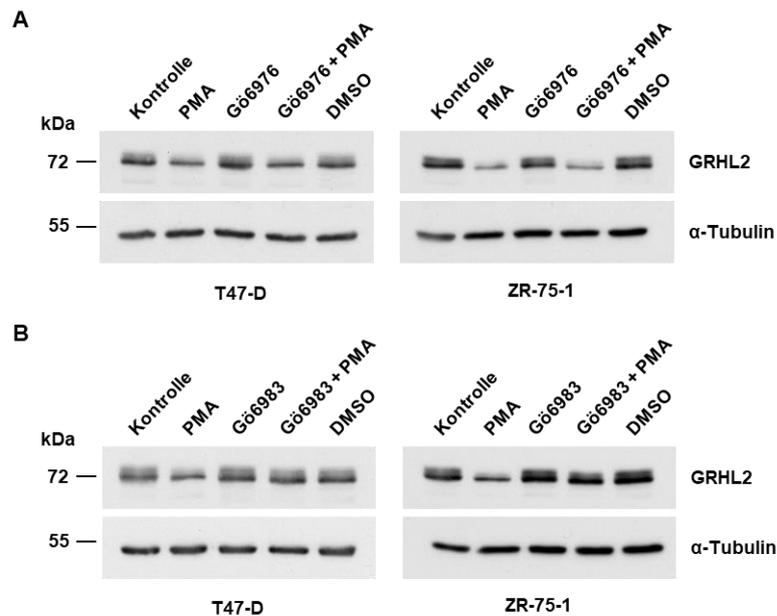


Abbildung 6-13: nPKCs beeinflussen das GRHL2-Expressionsniveau. (A) T47-D- und ZR-75-1-Zellen wurden jeweils für 1 h mit PMA (100 nM) behandelt und nach Mediumwechsel für weitere 8 h inkubiert. Wurde Gö6976 (100 nM) eingesetzt, fand eine Vorbehandlung für 1 h statt. Als Negativkontrolle dienten unbehandelte Zellen (Kontrolle) und mit dem Lösungsmittel DMSO behandelte Zellen. Der Nachweis der GRHL2-Proteinexpression erfolgte durch Immunoblot-Analyse mittels eines GRHL2-spezifischen Antikörpers. Die Detektion von α -Tubulin diente als Ladekontrolle. (B) T47-D und ZR-75-1-Zellen wurden für 1 h mit PMA (100 nM) behandelt und nach Mediumwechsel für weitere 8 h inkubiert. Dort wo Gö6983 (2 μ M) eingesetzt wurde, wurde für 1 h vorbehandelt. Als Negativkontrolle dienten unbehandelte Zellen (Kontrolle) und mit dem Lösungsmittel DMSO behandelte Zellen. Der Nachweis der GRHL2-Proteinexpression erfolgte durch Immunoblot-Analyse mittels eines GRHL2-spezifischen Antikörpers. Der Nachweis von α -Tubulin diente als Ladekontrolle.

Da der PKC-Inhibitor Gö6983 die cPKCs und nPKCs blockiert, der PKC-Inhibitor Gö6976 aber präferentiell nur die cPKCs inhibiert, musste aus diesen Experimenten geschlossen werden, dass sehr wahrscheinlich ein Mitglied der nPKC-Subfamilie mit den PKC-Isoformen δ , ϵ , η , θ die Reduktion der GRHL2-Expression vermittelt.

6.2.3. Untersuchung der Expression der nPKC-Isoformen in Mammakarzinomzelllinien

Die bisher erzielten Ergebnisse ließen den Schluss zu, dass die Herabregulation der GRHL2-Expression nach Stimulation mit PMA möglicherweise durch ein Mitglied der nPKC-Subfamilie, die die PKC-Isoformen δ , ϵ , η und θ umfasst, bewirkt wird. Eine Möglichkeit, die Anzahl der Kandidaten-Kinasen weiter einzuschränken, bestand in der Analyse der Expression der PKC-Isoformen in den responsiven Mammakarzinomzelllinien T47-D und ZR-75-1 mittels Immunoblot-Analyse unter Verwendung Isoform-spezifischer Antikörper. In beiden Zelllinien konnten die Isoformen PKC δ , PKC ϵ und PKC η nachgewiesen werden, wohingegen der Nachweis der PKC θ -Expression nicht gelang (Abb. 6-14 A). Der fehlende Nachweis einer PKC θ -Expression basierte aber nicht auf einer mangelnden Reaktivität des verwendeten

Antikörpers, weil dieser spezifisch die PKC θ -Isoform in Jurkat-Zellen, die als Positivkontrolle eingesetzt wurden, erkannte (Abb. 6-14 B).

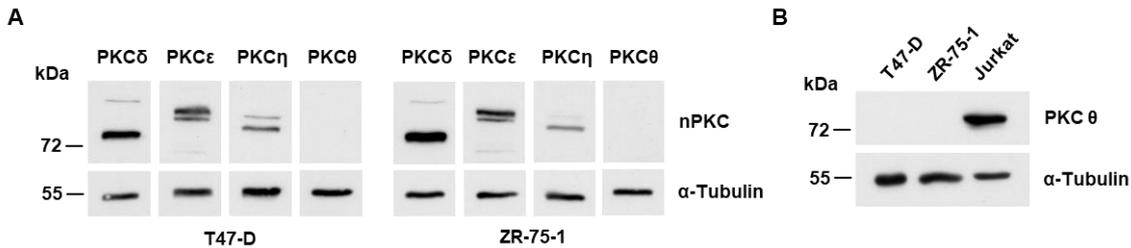


Abbildung 6-14: Untersuchung der Expression der nPKC-Isoformen in den Mammakarzinomzelllinien T47-D und ZR-75-1. (A) Mit Hilfe von Isoform-spezifischen Antikörpern wurde die Expression von PKC δ , PKC ϵ , PKC η und PKC θ mittels Immunoblot-Analyse untersucht. Der Nachweis der Expression des α -Tubulins diente als Ladekontrolle. (B) Zur Überprüfung der Reaktivität des PKC θ -Antikörpers wurde neben T47-D- und ZR-75-1-Zellextrakten ein Zellextrakt von Jurkat-Zellen als Positivkontrolle für die Immunoblot-Analyse eingesetzt. Der Nachweis von α -Tubulin diente als Ladekontrolle.

6.2.4. Regulation der GRHL2-Expression durch PKC δ

Da die PMA-sensitiven Mammakarzinomzelllinien die drei nPKC-Isoformen PKC δ , PKC ϵ und PKC η , nicht aber PKC θ exprimierten, kamen auch nur diese PKC-Isoformen als Mediatoren der PMA-induzierten Reduktion der GRHL2-Expression in Mammakarzinomzellen in Frage. Um zu ermitteln, welche der drei PKC-Isoformen in diesen Prozess involviert sein könnte, wurde ein siRNA-basierter Ansatz zum PKC-Isoform spezifischen *Knockdown* (KD) verfolgt. Hierzu war es zunächst einmal notwendig, siRNAs zu identifizieren, die einen effizienten KD der PKC-Isoformen herbeiführen. Als Modellsystem wurden T47-D-Zellen verwendet, die mit Isoform-spezifischen siRNAs mittels Elektroporation transfiziert wurden. Fünf Tage nach Transfektion wurden Zellextrakte hergestellt und RNA isoliert. Die Ergebnisse der Immunoblot-Analysen der Proteinexpression der jeweiligen PKC-Isoformen und die Resultate der qRT-PCR-Analysen sind in Abb. 6-15 dargestellt. Die erhaltenen Daten belegen, dass es gelungen ist, einen effizienten KD aller drei nPKC-Isoformen mittels siRNAs in T47-D-Zellen zu erzielen. So konnte die nPKC mRNA-Expression auf ca. 33% (PKC δ), 27% (PKC ϵ) bzw. 16% (PKC η) reduziert werden.

Im nächsten Schritt wurde das Experiment unter diesen optimierten Bedingungen wiederholt und die Zellen entweder mit DMSO oder PMA (100 nM) behandelt. Die parentalen Zellen zeigten wie erwartet eine Herabregulation der GRHL2-Proteinexpression nach PMA-Stimulation. Auch die Zellen mit einem PKC ϵ - bzw. PKC η -KD zeigten diesen Effekt deutlich. Interessanterweise konnte in Zellen mit PKC δ -KD eine Herunterregulation von GRHL2 signifikant blockiert werden (Abb. 6-15 C).

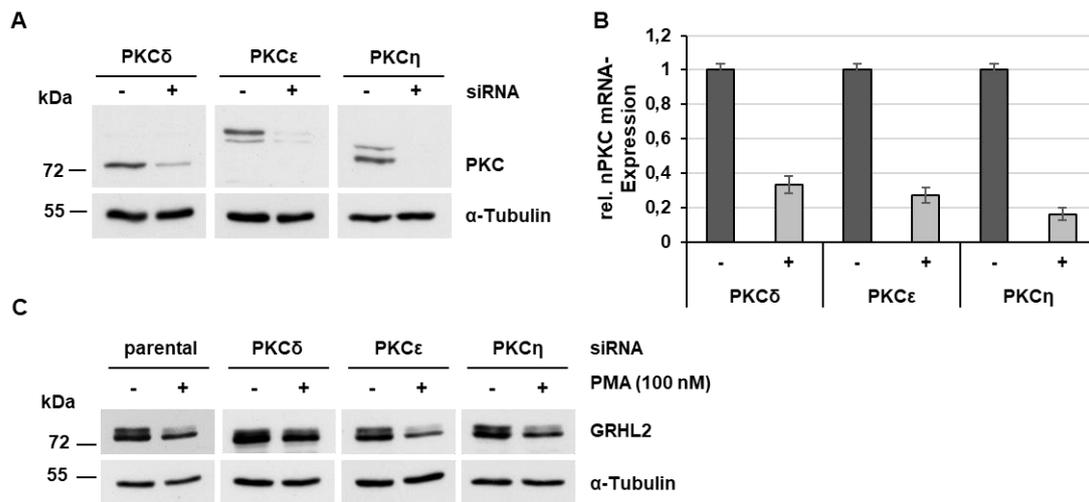


Abbildung 6-15: siRNA-vermittelter nPKC-Knockdown in T47-D-Zellen mit anschließender PMA-Stimulation. (A) T47-D-Zellen wurden mit gegen PKCδ, PKCε und PKCη gerichteten siRNAs transient transfiziert. Fünf Tage nach Transfektion der Zellen wurden Zellextrakte unbehandelter (-) und siRNA-behandelter (+) Zellen hergestellt und einer Immunoblot-Analyse mittels nPKC-Isoform-spezifischer Antikörper unterzogen. Der Nachweis von α-Tubulin diente als Ladekontrolle. (B) T47-D-Zellen wurden mit siRNAs, die gegen PKCδ, PKCε und PKCη gerichtet sind, transient transfiziert. Mittels qRT-PCR wurde fünf Tage nach der Transfektion mit Isoform-spezifischen Primern die jeweilige mRNA-Expression in parentalen (-) und transfizierten (+) Zellen bestimmt. Als Referenzgen diente RPLP0. Angezeigt ist jeweils der Mittelwert der relativen PKCδ-Expression aus einem im Triplikate durchgeführten Experiment mit zugehöriger Standardabweichung, wobei die parentale Kontrolle stets auf 1,0 normiert wurde. (C) T47-D-Zellen wurden mit siRNAs gegen PKCδ, PKCε und PKCη transient transfiziert. Fünf Tage nach Transfektion erfolgte eine Behandlung parentaler und transfizierter Zellen mit PMA (100 nM) für 1 h. Nach einem Mediumwechsel wurden die Zellen für weitere 8 h inkubiert (+). Mit dem Lösungsmittel DMSO behandelte Zellen dienten jeweils als Kontrolle (-). Ein Nachweis der GRHL2-Proteinexpression fand unter Verwendung eines GRHL2-spezifischen Antikörpers mittels Immunoblot-Analyse statt. Der Nachweis von α-Tubulin diente als Ladekontrolle.

Obwohl diese Ergebnisse auf eine Beteiligung der PKCδ-Isoform an der Regulation der GRHL2-Expression durch PMA hindeuteten, wurden zusätzliche Experimente zur weiteren Absicherung dieser Hypothese durchgeführt. Es wurden Untersuchungen nicht nur an T47-D-, sondern auch an ZR-75-1 Zellen durchgeführt und dabei eine zweite PKCδ-spezifische siRNA (PKCδ-2) eingesetzt. Die Ergebnisse der Immunoblot-Analysen zeigten, dass beide gegen PKCδ gerichteten siRNAs einen deutlichen KD der PKCδ-Isoform herbeiführten, wobei sich die siRNA PKCδ-1 in beiden Zelllinien als effizienter erwies (Abb. 6-16 A). Die Ergebnisse der qRT-PCR-Analyse bestätigten diesen Befund und ergaben eine Reduktion der PKCδ mRNA-Expression auf 27 % (PKCδ-1) und 34 % (PKCδ-2) in ZR-75-1 Zellen bzw. 30 % (PKCδ-1) und 47 % (PKCδ-2) in T47-D-Zellen (Abb. 6-16 B).

Sowohl in ZR-75-1- als auch in T47-D-Zellen zeigte sich nach PMA-Stimulation der parentalen Zellen eine Herabregulation der GRHL2-Proteinexpression. In Zellen mit einem durch siRNA PKCδ-2 herbeigeführten PKCδ-KD zeigte sich ebenfalls ein Effekt auf die GRHL2-Proteinexpression, wohingegen dieser bei Zellen mit einem durch siRNA PKCδ-1 herbeigeführten KD ausblieb (Abb. 6-16 C, D).

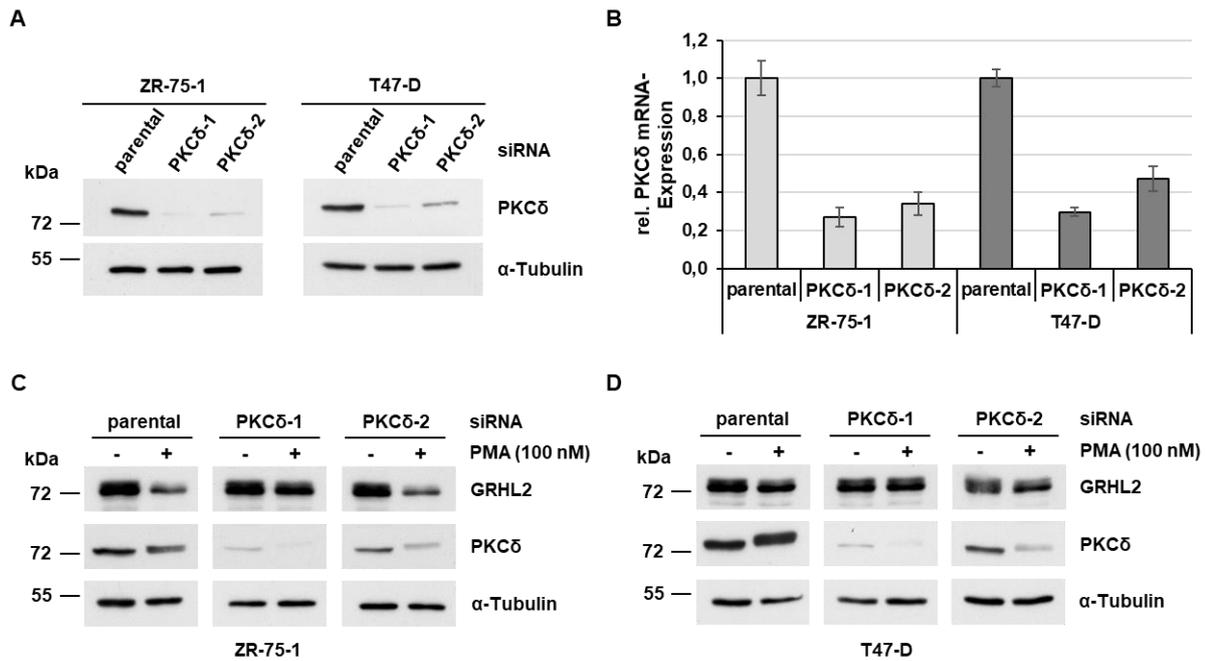


Abbildung 6-16: siRNA-vermittelter PKCδ-Knockdown in ZR-75-1- und T47-D-Zellen mit anschließender PMA-Stimulation. (A) ZR-75-1 und T47-D-Zellen wurden mit den gegen PKCδ gerichteten siRNAs PKCδ-1 und PKCδ-2 transient transfiziert. Fünf Tage nach der Transfektion wurde die PKCδ-Proteinexpression mithilfe eines α-PKCδ-Antikörpers mittels Immunoblot-Analyse untersucht. Der Nachweis von α-Tubulin diente als Ladekontrolle. (B) ZR-75-1 und T47-D-Zellen wurden mit den gegen PKCδ gerichteten siRNAs PKCδ-1 und PKCδ-2 transient transfiziert. Fünf Tage nach Transfektion wurde die Menge an PKCδ mRNA durch eine qRT-PCR-Analyse bestimmt. RPLP0 diente als Referenzgen. Angezeigt ist jeweils der Mittelwert der relativen PKCδ mRNA -Expression aus einem im Triplikat durchgeführten Experiment mit zugehöriger Standardabweichung, wobei die Werte der parental Zellen jeweils auf 1,0 normiert wurde. (C)/(D) ZR-75-1 und T47-D-Zellen wurden mit den siRNAs PKCδ-1 und PKCδ-2 transient transfiziert. Fünf Tage nach Transfektion erfolgte eine PMA-Stimulation (100 nM) von parental und transfizierten Zellen für 1 h (+). Nach einem Mediumwechsel folgte eine Inkubation für weitere 8 h. Mit dem Lösungsmittel DMSO behandelte Zellen dienten als Kontrolle (-). Die Expression von GRHL2, PKCδ und α-Tubulin (Ladekontrolle) wurde mittels Immunoblot-Analyse untersucht.

Diese Ergebnisse ließen den Schluss zu, dass ein sehr guter KD der PKCδ-Expression eine notwendige Voraussetzung für eine Inhibition der PMA-induzierten Herunterregulation der GRHL2-Expression zwingend notwendig ist. Deshalb wurden ZR-75-1- und T47-D-Zellen mit einem Gemisch aus vier verschiedenen PKCδ-spezifischen shRNAs lentiviral transduziert. Fünf Tage nach Infektion wurden Zellextrakte hergestellt und RNA isoliert. Die Immunoblot-Analyse zeigte einen deutlichen KD der PKCδ-Proteinexpression in beiden Zellsystemen. Die qRT-PCR-Analyse bestätigte dieses Ergebnis und zeigte einen Rückgang der PKCδ mRNA-Expression auf ca. 32 % (ZR-75-1) bzw. 22 % (T47-D) (Abb. 6-17 A, B).

In beiden Zelllinien zeigte sich nach PMA-Behandlung (100 nM) der parental Zellen erwartungsgemäß eine Reduktion des GRHL2-Proteinniveaus. Dieser Effekt war auch in den mit *non-target control* (NTC)-shRNA transduzierten Zellen, nicht aber in Zellen mit einem PKCδ-KD zu beobachten (Abb. 6-17 C, D).

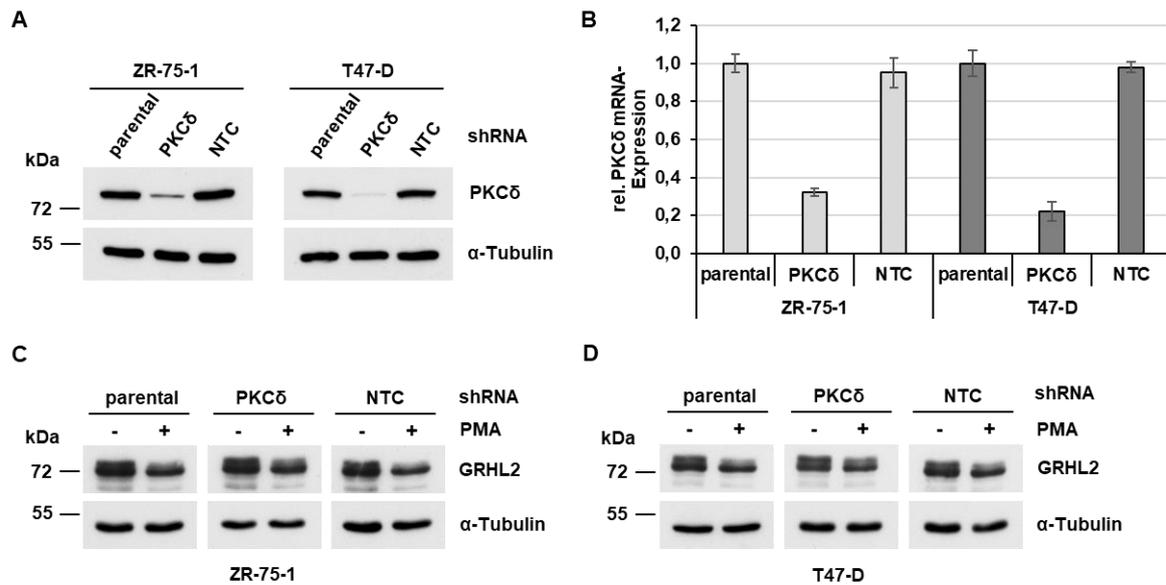


Abbildung 6-17: shRNA-vermittelter *Knockdown* der PKC δ -Expression in ZR-75-1- und T47-D-Zellen mit anschließender PMA-Stimulation. (A) ZR-75-1- und T47-D-Zellen wurden mit einem lentiviralen Überstand, der vier unterschiedliche, gegen PKC δ gerichtete shRNAs oder eine *non-target control* (NTC)-shRNA (Kontrolle) enthielt, transduziert. Fünf Tage nach Infektion wurden Zellextrakte hergestellt und die Expression von PKC δ in den lentiviral-transduzierten Zellen mittels Immunoblot-Analyse untersucht. Dabei diente der Nachweis von α -Tubulin als Ladekontrolle. (B) ZR-75-1 und T47-D-Zellen wurden mit einem lentiviralen Überstand, der gegen PKC δ gerichtete shRNAs oder eine NTC-shRNA enthielt, transduziert. Fünf Tage nach Transduktion wurde die Menge an PKC δ mRNA durch eine qRT-PCR-Analyse bestimmt. RPLP0 diente als Referenzgen. Angezeigt ist jeweils der Mittelwert der relativen PKC δ mRNA-Expression aus einem im Triplikat durchgeführten Experiment mit zugehöriger Standardabweichung, wobei die Werte der parentalen Zellen jeweils auf 1,0 normiert wurden. (C)/(D) Parentale und lentiviral-transduzierte ZR-75-1 oder T47-D-Zellen wurden fünf Tage nach Infektion für 1 h mit PMA (100 nM) stimuliert (+). Nach einem Mediumwechsel erfolgte eine Inkubation für weitere 8 h. Als Negativkontrolle dienten mit DMSO behandelte Zellen (-). In einer Immunoblot-Analyse wurde mithilfe eines GRHL2-spezifischen Antikörpers die GRHL2-Proteinexpression untersucht. Ein α -Tubulin-Nachweis diente als Ladekontrolle.

Die Ergebnisse deuten darauf hin, dass eine Stimulation mit dem Phorbol ester PMA zu einer PKC δ -abhängigen, transkriptionellen Herunterregulation der GRHL2-Expression in Mammakarzinomzellen führt.

6.2.5. Identifizierung PKC δ -abhängiger Transkriptionsfaktoren mit möglichen Bindungstellen in der Promotor-Region des GRHL2-Gens

Um PKC δ -abhängige Transkriptionsfaktoren, die in der Promotor-Region des GRHL2-Gens binden und die Expression von GRHL2 transkriptionell regulieren könnten, zu identifizieren, wurde eine ausgedehnte Analyse der Promotor-Region des GRHL2-Gens durchgeführt (siehe Ausführungen in Abschnitt 5.4.). Transkriptionsfaktoren, für die eine Überlappung zwischen *ChIP-Peak* und Motiv in dem festgelegten Bereich 2 kb *up* und *downstream* des

Ergebnisse

Transkriptionsstartpunkts (TSS) (101490439 - 101494439) von GRHL2 (Version: NM_024915.3) vorhergesagt wurde, sind in Tabelle 6-3 aufgelistet.

Tabelle 6-3: Ergebnis der bioinformatischen Analyse des GRHL2-Promotors.

TF	Peak relativ zu TSS Start/Endposition	Motiv Start/Endposition
SP1	-1088/-711	101491776/101491785
YY1	-972/-585	101491729/101491740
MYC	-828/-685	101491787/101491798
CEBPB	-791/-198	101491908, 101491908, 101491908/ 101491917, 101491918, 101491917
CEBPG	-682/-390	101491908, 101491908/101491917, 101491917
E2F1	-552/2206	101493111, 101493932, 101493557, 101492590,101493060, 101493661/101493121, 101493942, 101493567, 101492600, 101493070, 101493671
ETV6	-544/685	101492084/101492093
YY1	-422/428	101492661/101492672
ZEB1	-367/173	101492353, 101492323, 101492354/101492361, 101492331, 101492364
ELK1	-140/417	101492576/101492585
TCF7L2	71/589	101492700/101492713
EGR1	90/296	101492590/101492603
NRF1	294/560	101492804/101492814
YY1	647/1786	101493284/101493295
KLF9	678/1129	101493312/101493324
E2F6	759/1433	101493439, 101493738/101493449, 101493748
EGR1	775/1259	101493428, 101493455, 101493377, 101493453,101493375, 101493441, 101493398/101493441, 101493468, 101493390, 101493466, 101493388, 101493454, 101493411
ZBTB7A	794/1731	101493944, 101493369, 101494010, 101493310/101493956, 101493380, 101494022, 101493321
RFX5	1181/1735	101494019, 101494073/101494033, 101494087
EGR1	1409/1649	101493908, 101493881, 101493991, 101493945, 101493877/ 101493921, 101493894, 101494004, 101493958, 101493890
ZBTB33	1426/1593	101493956, 101493927/101493970, 101493941
NR3C1	1479/1614	101493983/101493999
SP1	1480/1616	101493882, 101493881, 101493914, 101493992,101493997, 101493914, 101493998, 101493911, 101493997/101493891, 101493891, 101493924, 101494001, 101494007,101493923, 101494007, 101493921, 101494006
E2F6	1580/1805	101494220, 101494229/101494230, 101494239

Es konnten insgesamt 18 verschiedene Transkriptionsfaktoren identifiziert werden, die möglicherweise an die Promotor-Region des GRHL2-Gens binden. Für die Transkriptionsfaktoren SP1, YY1 und EGR1 konnten sogar mehrere mögliche Bindungsstellen nachgewiesen werden. Interessanterweise konnte mit dem SP1-Transkriptionsfaktor auch ein

transkriptioneller Regulator identifiziert werden, dessen Aktivität durch die PKC δ beeinflusst wird (Kim et al., 2007; Tsai et al., 2011). Die Ergebnisse dieser Promotor-Analysen lieferten somit einen Ansatzpunkt für weitere Untersuchungen zur PKC δ -abhängigen Regulation der GRHL2-Expression in Mammakarzinomzellen.

7. Diskussion

Obwohl die molekularen Mechanismen der Tumormetastasierung nach wie vor nur unvollständig verstanden sind, ist in den letzten Jahren immer deutlicher geworden, dass das morphogenetische Programm der Epithelial-Mesenchymalen-Transition (EMT) eine herausragende Bedeutung bei der Streuung von Tumorzellen spielen könnte (Dongre & Weinberg, 2019; Jolly et al., 2017). Entsprechend sind Untersuchungen zu Molekülen oder Signalwegen, die die EMT induzieren oder inhibieren und dadurch den Metastasierungsprozess beeinflussen, von besonderem Interesse. Ein solcher molekularer Schalter stellt der bisher noch wenig charakterisierte Transkriptionsfaktor Grainyhead-like 2 (GRHL2) dar. GRHL2 werden sowohl EMT-supprimierende als auch onkogene Eigenschaften zugeschrieben (Cieply et al., 2013; Paltoglou et al., 2017; Werner et al., 2013), so dass die Identifizierung von Mechanismen, die die Expression oder Aktivität von GRHL2 regulieren, entscheidend zu einem besseren Verständnis der Rolle von GRHL2 bei der Progression und Metastasierung von Tumoren beitragen.

Im Rahmen dieser Arbeit ist es gelungen, zwei neuartige, sehr unterschiedliche Mechanismen der Regulation der GRHL2-Expression aufzudecken und molekular näher zu charakterisieren. Da es sich bei einem Mechanismus um einen posttranslationalen, bei dem anderen aber um einen transkriptionellen Regulationsmechanismus handelt, sollen diese beiden neuartigen Mechanismen der Regulation der Expression von GRHL2 in Mammakarzinomzellen im Folgenden getrennt voneinander betrachtet werden.

7.1. Identifizierung eines posttranslationalen Mechanismus der Regulation der GRHL2-Expression in Mammakarzinomzellen

In dieser Arbeit konnte erstmals nachgewiesen werden, dass die Expression von GRHL2 einer posttranslationalen Kontrolle unterliegt. So gelang die Identifizierung eines zwischen der Transaktivierungs- und DNA-Bindungsdomäne von GRHL2 lokalisierten Degrons, das die Stabilität und damit auch die Expression von GRHL2 in Tumorzellen reguliert. Damit konnte die Regulation der GRHL2-Proteinstabilität erstmalig als neues Regulationsprinzip nachgewiesen werden. Eine detaillierte molekulare Analyse ergab, dass das GRHL2-Degron eine sog. PEST-Sequenz (AS S²¹⁰ bis F²²⁰) enthält. PEST-Sequenzen bestehen aus mindestens zehn Aminosäuren und weisen einen besonders großen Anteil an Prolin (P), Glutamat (E), Aspartat (D), Serin (S) und Threonin (T) auf. Aminosäuren wie Lysin (K) oder Arginin (R), die eine positive Ladung tragen, flankieren die PEST-Sequenzen (Rechsteiner & Rogers, 1996; Rogers et al., 1986). Obwohl die Rolle der PEST-Sequenzen noch unvollständig verstanden ist, geht man davon aus, dass die Anwesenheit einer PEST-Sequenz auf das Vorhandensein eines Degrons und damit auf ein metabolisch-instabiles Protein hinweist (Rogers et al., 1986). Obwohl es

verschiedene Wege des Proteinabbaus in Zellen gibt, werden PEST-Sequenzen in allererster Linie mit dem Ubiquitin-vermittelten proteasomalen Abbau als den vielleicht wichtigsten Regulator des Proteinhaushalts in Zellen in Verbindung gebracht (Correa Marrero & Barrio-Hernandez, 2021; Dikic, 2017; Varshavsky, 2019; D. H. Lee & Goldberg, 1998). PEST-Sequenzen allein vermitteln nicht den proteosomalen Abbau von Proteinen. Vielmehr sind sie eher als Indikatoren für die Anwesenheit eines multi-modalen Degrons zu sehen (Guharoy et al., 2016). Neuere Untersuchungen deuten darauf hin, dass Degrons möglicherweise aus drei unterschiedlichen Komponenten bestehen: (1) einem primären Degron (Peptid-Motiv), das die Substraterkennung durch E3 Ubiquitin-Ligasen spezifiziert, (2) benachbarten ubiquitylierbaren Lysin-Resten und (3) einem strukturell-ungeordneten Segment, das die Entfaltung am 26S Proteasom initiiert (Guharoy et al., 2016). In Übereinstimmung mit dieser Modellvorstellung sind eigene Resultate zu sehen, die eindeutig belegen, dass die PEST-Sequenz von GRHL2 allein nicht dazu befähigt ist, ein überaus stabiles Reporterprotein, das *Enhanced Green Fluorescent Protein* (EGFP) (Corish & Tyler-Smith, 1999), zu destabilisieren. Vielmehr sind weitere, die GRHL2-PEST-Sequenz flankierende Segmente notwendig, um den Abbau eines Reporterproteins einzuleiten. Somit stehen die Befunde dieser Arbeit in Übereinstimmung mit der Vorstellung, dass Degrons multi-modal aufgebaut sind und darin enthaltene PEST-Sequenzen in erster Linie Indikatoren für die Anwesenheit eines Degrons innerhalb eines metabolisch-instabilen Proteins darstellen (Guharoy et al., 2016).

Neben der reinen Indikatorfunktion sind PEST-Sequenzen innerhalb von Degrons aber auch dadurch bedeutsam, dass sie eine große Anzahl phosphorylierbarer Reste (Serin, Threonin und Tyrosin) besitzen, die nach Modifikation durch Kinasen Strukturänderungen im Substrat erzeugen, die den Proteinabbau entweder fördern oder inhibieren können (García-Alai et al., 2006; Johnson & Lewis, 2001; Narayanan & Jacobson, 2009; Rechsteiner, 1990). Da es in der eigenen Arbeitsgruppe bereits erste Hinweise dafür gab, dass GRHL2 ein nukleäres Phosphoprotein darstellen könnte (Frey, 2013), wurde in dieser Arbeit die mögliche Phosphorylierung von GRHL2 innerhalb der PEST-Sequenz systematisch untersucht. So gelang der Nachweis, dass GRHL2 an mindestens drei unterschiedlichen Resten (S²¹⁰, T²¹¹ und S²¹⁴) phosphoryliert wird. Darüber hinaus konnten drei Phospho-spezifische Antikörper erzeugt werden, die als wichtige *Tools* für Forschungszwecke der eigenen oder anderer Arbeitsgruppen zur Verfügung stehen. Durch diese spezifischen, sehr reaktiven Antikörper konnte eindeutig nachgewiesen werden, dass GRHL2 ein Phospho-Degron enthält, welches in Abhängigkeit vom Phosphorylierungsstatus die Stabilität des Proteins positiv oder negativ regulieren kann. Um den Einfluss individueller Phosphorylierungsstellen (S²¹⁰, T²¹¹ und S²¹⁴) auf die Stabilität des GRHL2-Proteins bzw. dessen proteasomalen Abbau zu untersuchen, wurden Mutationsanalysen, aber auch Experimente mit dem Proteinbiosynthese-Inhibitor Cycloheximid durchgeführt. Hierbei erwies es sich, dass Phosphorylierungen an Position S²¹⁰ und T²¹¹ eher

stabilisierend wirken, während eine Modifikation an Position S²¹⁴ eher einen destabilisierenden Einfluss auf das GRHL2-Protein ausübt. Entsprechend waren signifikante Veränderungen in den experimentell ermittelten Halbwertszeiten im Vergleich zum wildtypischen GRHL2-Protein zu beobachten. Diese Ergebnisse lassen zweifelsfrei den Schluss zu, dass der Transkriptionsfaktor GRHL2 ein Phospho-Degron enthält, wobei der Einfluss individueller Phosphorylierungen innerhalb der PEST-Sequenz sich unterschiedlich auszuprägen scheint. Diese Befunde müssen aber auch mit großer Vorsicht betrachtet werden, weil eine Phosphorylierung an einer Stelle der PEST-Sequenz natürlich auch die Phosphorylierung unmittelbar benachbarter Reste positiv oder negativ beeinflussen kann. Auf Grund der Häufung der Phosphorylierungsstellen innerhalb der PEST-Sequenz ist es deshalb praktisch unmöglich, den Einfluss einzelner Modifikationen auf die Stabilität und Expression des GRHL2-Proteins zu bestimmen. Sinnvoller ist es deshalb, die beobachteten Effekte eher als kumulative Effekte anzusehen.

Die Ergebnisse dieser Arbeit zeigen erstmals und unzweifelhaft, dass die Expression von GRHL2 in Tumorzellen einem posttranslationalen Regulationsmechanismus unterliegt. Deshalb war es von besonderem Interesse, diejenigen Kinasen zu identifizieren, die GRHL2 innerhalb der PEST-Sequenz phosphorylieren. Derzeit sind ca. 550 Kinasen bekannt, die das Kinom einer Zelle ausmachen (Manning et al., 2002). Entsprechend schwierig stellt sich im Allgemeinen die Identifizierung von Kandidatenkinasen, die ein Protein an einer bestimmten Stelle phosphorylieren, dar. In dieser Arbeit wurden zwei unterschiedliche, aber komplementäre experimentelle Ansätze verfolgt. Einerseits sollten Kandidatenkinasen auf der Basis bioinformatischer Analysen ausgewählt und eine Beteiligung an der Phosphorylierung der Reste S²¹⁰, T²¹¹ und S²¹⁴ des GRHL2-Proteins mittels spezifischer Inhibitoren nachgewiesen werden. Andererseits wurde auch versucht, in unvoreingenommener Weise mit Hilfe des sog. *KinaseFinder Screenings* Kandidatenkinasen zu identifizieren. Zusammenfassend muss festgestellt werden, dass zwar eine Vielzahl von Kinasen als Kandidatenkinasen für die Phosphorylierung der Reste S²¹⁰, T²¹¹ und S²¹⁴ des GRHL2-Proteins ausgeschlossen werden konnten, aber gleichzeitig eine vielversprechende Kinase, die weitergehende Untersuchungen sinnvoll erscheinen lässt, nicht identifiziert werden konnte. Als eine wichtige Ursache hierfür ist sicher anzusehen, dass derzeit verfügbare, verschiedene Algorithmen für die Vorhersage von Kandidatenkinasen noch nicht ausreichend gut sind und entsprechend teilweise höchst widersprüchliche Resultate lieferten. Auf Grund der in dieser Arbeit gemachten Erfahrungen muss festgestellt werden, dass eine auf bioinformatischen Analysen basierende Auswahl an Kandidatenkinasen wenig Aussicht auf Erfolg hat. Im Falle des *KinaseFinder Screenings* hingegen sind vermutlich eher experimentelle Gründe Ursache dafür, dass keine als besonders aussichtsreich einzustufenden Kandidatenkinasen für die Phosphorylierung innerhalb der PEST-Sequenz von GRHL2 identifiziert werden konnten. Die eher geringen Einbauraten an

radioaktiv-markiertem ATP spiegeln vermutlich nur eine relativ geringe Akzeptanz des verwendeten, die PEST-Sequenz von GRHL2 enthaltenden Peptids durch die getesteten Kinasen wider. Obwohl nicht grundsätzlich ausgeschlossen werden kann, dass eine oder mehrere Kinasen, für die eine gegenüber dem Hintergrund erhöhte Einbaurrate ermittelt wurde, physiologisch bedeutsam sein könnten, ist die Wahrscheinlichkeit, dass sie tatsächlich GRHL2 innerhalb der PEST-Sequenz phosphorylieren, als eher gering einzustufen.

Dennoch lässt sich festhalten, dass es gelungen ist, einen neuartigen Mechanismus der Regulation der GRHL2-Expression in Tumorzellen, der auf einen phosphorylierungsabhängigen, proteasomalen Abbau des GRHL2-Proteins beruht, zu identifizieren. Proteinphosphorylierungen sind weit verbreitete, posttranslationale und reversible Modifikationen, die auch bei der Regulation des Metabolismus, der Transkription, der Differenzierung, Protein-Protein-Interaktion, Zellteilung oder der Apoptose eine wichtige Rolle spielen (Ardito et al., 2017; McCubrey et al., 2000; Nishi et al., 2011). Diese Art der Proteinregulation ermöglicht es, schnell auf Veränderungen in der Zelle oder ihrer Umgebung zu reagieren und hat dadurch Vorteile gegenüber anderen Regulationsmechanismen, wie z.B. der transkriptionellen Regulation der Genexpression (Gelens & Saurin, 2018). Die phosphorylierungsabhängige Regulation der GRHL2-Proteinstabilität bzw. Expression ist aber kein Sonderfall innerhalb der EMT- bzw. Metastasierungsforschung, weil z.B. etliche EMT-TFs ebenfalls über diesen Mechanismus reguliert werden (Díaz et al., 2014; Kang et al., 2021). Ein sehr prominentes Beispiel stellt die Phosphorylierung von Snail1 dar (Baulida et al., 2019). Die Stabilität des Proteins und damit seine Halbwertszeit können durch Phosphorylierung sowohl positiv als auch negativ beeinflusst werden. Snail1 ist mit einer Halbwertszeit von ca. 25 min ein sehr kurzlebiges Protein, das nach Ubiquitylierung vom 26S-Proteasomsystem schnell abgebaut wird (Díaz et al., 2014). An der Ubiquitylierung können verschiedene E3-Ligasen beteiligt sein, wobei das F-Box-Protein β -TrCP1 (*β -transducin-repeat containing protein*) das bekannteste Beispiel ist. β -TrCP1 erkennt die durch GSK-3 β (Glykogensynthase-kinase 3 β) phosphorylierten Reste S⁹⁶ und S¹⁰⁰ und bewirkt dann den proteasomalen Abbau von Snail1. Eine Phosphorylierung durch GSK-3 β erfordert allerdings eine vorherige „Priming“-Phosphorylierung an Rest S⁹², die entweder durch CK1 ϵ oder CK2 β erfolgt (Deshiere et al., 2013; Xu et al., 2010). Ein weiteres Beispiel für die Destabilisierung von Snail1 stellt die Phosphorylierung der Reste S¹⁰⁴ und S¹⁰⁷ durch GSK-3 β dar. Diese bewirken die Freilegung einer NES (*nuclear export sequence*; AS 132-143), die so an Exportin-1 binden kann und zu einem Transport von Snail1 ins Cytoplasma führt, wo das Protein proteasomal abgebaut wird (Domínguez et al., 2003; Zhou et al., 2004). Am C-Terminus sind zwei Phosphorylierungen bekannt, die zu einer Stabilisierung des Snail1-Proteins führen. Die durch TGF β aktivierte Lats2-Kinase (*large tumor suppressor kinase 2*) phosphoryliert Snail1 an Position T²⁰³, die durch p21 aktivierte Kinase PAK1 (*p21-activated kinase*) führt zu einer Phosphorylierung an Position S²⁴⁶.

Beide Modifikationen resultieren in einem längeren Verbleib des Transkriptionsfaktors im Nukleus und wirken somit dem proteasomalen Abbau im Cytoplasma entgegen (Z. Yang et al., 2005; Zhang et al., 2012).

Auch der EMT-TF Twist1 wird mittels Phosphorylierung in seiner Stabilität reguliert. Eine durch IL-6 induzierte Phosphorylierung an Position S¹⁸ und S²⁰ durch CK2 und auch die durch TGF- β induzierte Phosphorylierung an Position S⁶⁸ durch MAPKs resultieren beispielsweise in einer Stabilisierung des Proteins (Hong et al., 2011; Su et al., 2011). Diese Beispiele machen deutlich, von welcher außerordentlichen Bedeutung posttranslationale Regulationsmechanismen, hier insbesondere die Phosphorylierung, für die Stabilität und Expression von EMT-regulierenden TFs sind.

Aus den erhaltenen Ergebnissen konnte die in Abb. 7-1 illustrierte Arbeitshypothese für die phosphorylierungsabhängige Regulation von GRHL2 während der EMT abgeleitet werden. Demnach ist es denkbar, dass die Phosphorylierung der Positionen S²¹⁰ und T²¹¹, die das GRHL2-Protein stabilisieren, dessen EMT-Suppressor-Funktion fördert und damit zum Erhalt des epithelialen Phänotyps einer Zelle beiträgt. Kommt es zur Störung oder Inaktivierung derjenigen Signalwege, die die Phosphorylierung an den Resten S²¹⁰ und T²¹¹ von GRHL2 bedingen, wird eine durch eine E3-Ligase vermittelte Ubiquitylierung und ein proteasomaler Abbau des Proteins eingeleitet. Der Verlust des GRHL2-Proteins begünstigt eine EMT, Invasion und Metastasierung von Tumorzellen. Die Phosphorylierung an der Position S²¹⁴ von GRHL2 hingegen sollte eine gegenläufige Wirkung ausüben, weil diese die Stabilität erniedrigt und den Abbau des GRHL2-Proteins begünstigt. Prinzipiell denkbar ist, dass z.B. durch Veränderungen in der Mikroumgebung ausgelöste Signalwege einen molekularen *Switch* induzieren, der durch eine Phosphorylierung der Reste S²¹⁰/T²¹¹ oder S²¹⁴ gekennzeichnet ist und dadurch maßgeblich EMT, Invasion und Metastasierung reguliert. Deutlich wahrscheinlicher ist jedoch die Vorstellung, dass alle drei Phosphorylierungsstellen innerhalb der PEST-Sequenz von GRHL2 mehr oder weniger gleichzeitig phosphoryliert sind. Das relative Verhältnis stabilisierender (S²¹⁰ und T²¹¹) und destabilisierender Modifikationen (S²¹⁴) entscheidet dann darüber, welches Expressionsniveau des GRHL2-Proteins sich in Tumorzellen einstellt und ob eine EMT stattfindet. Zu beachten ist ferner, dass Phosphorylierungen innerhalb der PEST-Sequenz von GRHL2 auf Grund der extremen räumlichen Nähe der Phosphorylierungsstellen sehr wahrscheinlich auch direkten Einfluss auf mögliche Modifikationen in unmittelbarer Nachbarschaft haben, so dass beide Modellvorstellungen sicher nur eine grobe Vereinfachung darstellen.

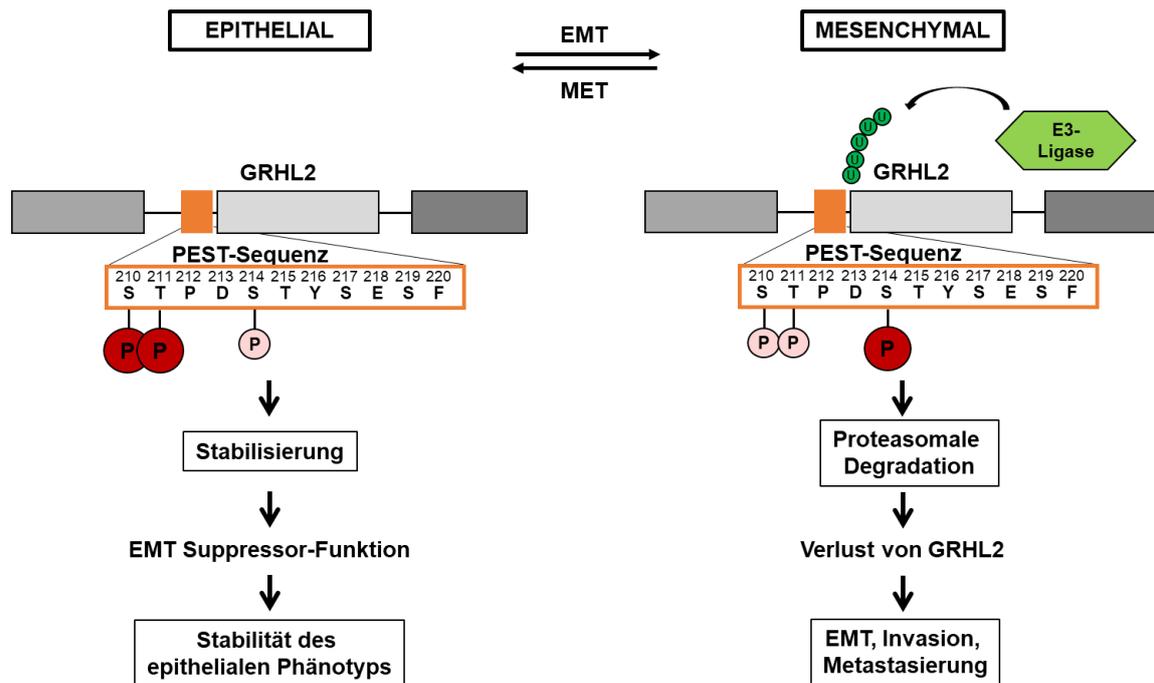


Abbildung 7-1: Schematische Darstellung der Arbeitshypothese. Erläuterungen siehe Text.

Obwohl der in dieser Arbeit erstmals beschriebene Regulationsmechanismus von großer Bedeutung für die Regulation der EMT bzw. Tumormetastasierung sein könnte, muss dies nicht zwangsläufig so sein. Vorstellbar ist ebenfalls, dass das in dieser Arbeit beschriebene regulatorische Prinzip auch die onkogenen Eigenschaften des GRHL2-Proteins modulieren könnte (Werner et al., 2013). Es ist anzunehmen, dass eine erhöhte Proteinstabilität bzw. Expression die GRHL2-abhängige Transkription wichtiger Zielgene, die die Proliferation von Zellen steuern (z.B. ERBB3) und damit die maligne Transformation fördert. Eine jüngst publizierte Arbeit von Cocce und Mitarbeitern bestätigt nicht nur die in dieser Arbeit erstmals beschriebene Existenz eines posttranslationalen Regulationsmechanismus, sondern weist sogar auf eine mögliche klinische Bedeutung dieses neuartigen Regulationsprinzips hin (Cocce et al., 2019). So konnte gezeigt werden, dass die GRHL2-Proteinexpression in Tamoxifen-resistenten MCF-7-Zellen im Vergleich zu Tamoxifen-sensitiven Zellen erhöht ist, während das mRNA-Niveau unverändert bleibt. Durch die funktionelle Kooperation von GRHL2 mit dem Transkriptionsfaktor FOXA1 wird eine Heraufregulation des Membranrezeptors LYPD3 und seines Liganden AGR2 induziert, die zu einer erhöhten Resistenz gegenüber endokrinen Therapien führt (Cocce et al., 2019).

Weitere Untersuchungen sind notwendig, um den hier erstmals beschriebenen Mechanismus der Regulation der GRHL2-Expression einem biologischen Prozess eindeutig zuordnen zu können. An dieser Stelle sei aber auch darauf hingewiesen, dass EMT, Metastasierung, onkogene Transformation und Resistenzbildung sich nicht notwendigerweise gegenseitig ausschließen,

so dass der hier beschriebene neuartige, posttranslationale Mechanismus der Regulation der Expression von GRHL2 in Tumorzellen weitreichende Bedeutung für Entstehung, Progression und Therapie von Tumoren haben könnte.

7.2. Identifizierung eines PKC δ -abhängigen, transkriptionellen Mechanismus der Regulation der GRHL2-Expression in Mammakarzinomzellen

Neben dem posttranslationalen Regulationsmechanismus konnte in dieser Arbeit auch ein neuartiger transkriptioneller Mechanismus der Regulation der GRHL2-Expression in Mammakarzinomzellen identifiziert werden. So konnte in ausgewählten Mammakarzinomzelllinien, die die unterschiedlichen, hauptsächlichen Subtypen des Mammakarzinoms (Luminal A und B, Her2+, Basal A) repräsentieren, nach Behandlung mit dem Phorbol-ester Phorbol-2-myristat-3-acetat (PMA), einem potenten Stimulator von Mitgliedern der Proteinkinase C (PKC)-Familie, eine Reduktion der GRHL2-Expression beobachtet werden. Mammakarzinomzelllinien des Subtyps Basal B, die kein GRHL2 exprimieren (Werner et al., 2013), wurden in diesen Untersuchungen nicht berücksichtigt. Die Ergebnisse belegen, dass der Effekt der Herunterregulation der GRHL2-Expression nahezu universell ist, indem fünf von acht untersuchten Zelllinien diesen Effekt zeigten. Interessanterweise war aber keine Abhängigkeit vom Mammakarzinom-Subtyp, den die verwendeten Mammakarzinomzellen repräsentieren, zu beobachten. Die Spezifität der Resultate wird auch dadurch unterstrichen, dass sich die beobachteten Effekte als zeit- und konzentrationsabhängig erwiesen. Eine detaillierte Analyse der GRHL2 mRNA- und Proteinexpression ergab, dass die Herunterregulation der GRHL2-Expression in Mammakarzinomzellen auf transkriptioneller Ebene erfolgt. Deshalb stellt die PMA-abhängige Suppression der GRHL2-Expression einen neuartigen Mechanismus der Regulation der GRHL2-Expression in Tumorzellen dar.

Proteinkinase C (PKC) ist eine Multigen-Familie, die für zehn unterschiedliche, Lipid-regulierte Isoformen mit Serin/Threonin-Kinaseaktivität kodiert (Basu, 1993; Newton, 1995, 2018). PKC-Isoformen spielen eine essenzielle Rolle in zahlreichen Signaltransduktionswegen, die beispielsweise Zellwachstum, Transkription, Transformation, Differenzierung, Apoptose und Autophagie regulieren (Blobe et al., 1994; De Servi et al., 2005; R. Guler et al., 2011; Y. Li et al., 2016; Murray et al., 1993; Page et al., 2002). Basierend auf ihrer Struktur und ihrer Kofaktor-Abhängigkeit werden PKC-Isoformen üblicherweise in drei unterschiedliche Gruppen eingeteilt: (1) klassische PKCs (cPKCs: α , β I, β II, γ), die durch Diacylglycerol (DAG) und Calcium aktiviert werden, (2) neuartige PKCs (nPKCs: δ , ϵ , η und θ), die durch DAG, aber nicht Calcium aktiviert werden, und (3) atypische PKCs (aPKCs: ζ , ι), die weder durch DAG noch durch Calcium aktiviert werden (Newton, 2018) (siehe Abb. 7.2). Jede dieser Isoformen enthält eine N-

terminale regulatorische Domäne und eine C-terminale katalytische Kinase-Domäne. Die regulatorische Domäne enthält eine Pseudosubstrat-Domäne (PS), die substratähnliche Sequenzen enthält und in autoinhibitorischer Weise mit der katalytischen Domäne interagiert und diese dadurch funktionell inaktiviert. Es wird angenommen, dass PKC-Aktivatoren, wie z.B. DAG, Phorbol ester und Calcium, diese intramolekulare Wechselwirkung aufheben. Die resultierende Konformationsänderung führt dazu, dass sich die Substratbindungsdomäne und die Pseudosubstrat-Domäne trennen und schließlich das Enzym aktiviert wird (Orr et al., 1992; Orr & Newton, 1994). DAG oder Phorbol ester binden an die regulatorischen Domänen C1a und C1b, die ausschließlich in den cPKCs und nPKCs vorhanden sind, während die atypische C1-Domäne (aC1) der aPKCs nicht auf diese Stimuli reagiert. Die C2-Domäne in cPKCs bindet Calcium und wirkt damit aktivierend, während die nC2-Domäne in nPKCs nicht auf Veränderungen in der Calciumionen-Konzentration anspricht (Newton, 2018). Die katalytische Domäne der drei PKC-Subtypen besteht je aus den beiden konservierten Domänen C3 und C4. C3 bindet ATP, C4 bindet die Substrate (Newton, 2018; Talman et al., 2016).

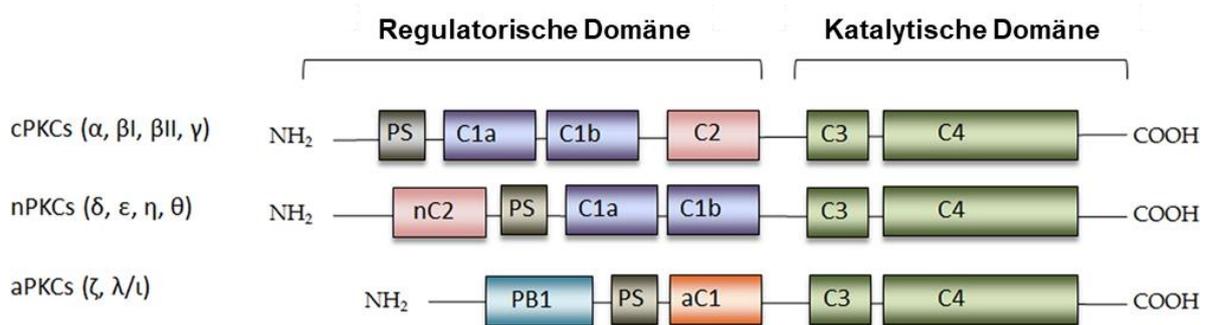


Abbildung 7-2: Struktur der PKC-Isoformen. Die Familie der PKCs wird in drei Subtypen (konventionell (cPKC), neuartig (nPKC), atypisch (aPKC)) unterteilt und besteht aus insgesamt 10 Isoformen. Details siehe Text. Modifiziert nach (Talman et al., 2016).

Die Identifizierung derjenigen PKC-Isoform, die die Suppression der GRHL2-Expression in Mammakarzinomzellen vermittelt, stellte eine experimentelle Herausforderung dar. Da die aPKCs nicht durch Phorbol ester aktiviert werden, konnte diese Subgruppe von PKC-Isoformen von vornherein als Kandidaten-Kinasen ausgeschlossen werden. Um die Liste möglicher PKC-Isoformen, die die beobachteten Effekte in Mammakarzinomzellen hervorrufen, weiter einzugrenzen, wurden gezielt Inhibitoren, die entweder alle PKC-Isoformen (Gö6983: cPKCs und nPKCs) oder nur die cPKCs (Gö6976) blockieren, eingesetzt. Die Resultate deuteten darauf hin, dass die relevante PKC-Isoform mit großer Wahrscheinlichkeit der Gruppe der nPKCs zuzuordnen ist. Nach Überprüfung der Proteinexpression der vier PKC-Isoformen (δ, ε, η und θ) in PMA-responsiven Mammakarzinomzelllinien konnte PKC θ ausgeschlossen werden, weil diese Isoform in keiner der untersuchten Zelllinien exprimiert war. *Knockdown*-Experimente mit siRNAs gegen die drei nPKC-Isoformen δ, ε und η zeigten, dass sich die PMA-induzierte Suppression der GRHL2-Expression in Mammakarzinomzellen spezifisch durch Inhibition von

PKC δ blockieren ließ. Aus diesen Experimenten konnte geschlussfolgert werden, dass die PMA-abhängige, transkriptionelle Repression der GRHL2-Expression durch die PKC δ -Isoform vermittelt wird. Da ein solcher Regulationsmechanismus bisher noch nicht in der Literatur beschrieben worden ist, tragen diese Befunde signifikant zu einem besseren Verständnis der Rolle von GRHL2 in der Entstehung und Progression von Tumoren dar.

Proteinkinase C δ ist eine ubiquitär exprimierte Kinase, die mit 676 AS ein Molekulargewicht von ca. 78 kDa aufweist (Kikkawa et al., 2002; Ono et al., 1987; Webb et al., 2000). Aufgrund ihrer Fähigkeit verschiedene Proteine zu phosphorylieren, ist sie in eine Vielzahl physiologischer Prozesse involviert. Über ihre *Downstream-Targets* kann PKC δ beispielsweise Einfluss auf Apoptose, Zellwachstum, Differenzierung, Proliferation, Transkription, hormonelle Regulation und Immunregulation nehmen (Brodie & Blumberg, 2003; Reto Guler et al., 2011; Jackson & Foster, 2004; Reyland, 2009). Diverse Wege zur Aktivierung von PKC δ durch externe Stimuli sind in der Literatur beschrieben (Kikkawa et al., 2002). Die Bindung verschiedener Liganden, beispielsweise an G-Protein-gekoppelte Rezeptoren (GPCR) oder Rezeptor-Tyrosinkinase (RTK), führt zur Aktivierung von Phospholipase C (PLC), die Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphat (PIP₂) in DAG und Inositol-1,4,5-trisphosphat (IP₃) spaltet. Zu den Liganden, die zu PLC-generiertem DAG führen, zählen etwa Wachstumsfaktoren, Hormone oder Insulin (Mackay & Twelves, 2007; Newton, 1995; Nishizuka, 1992; Salzer et al., 2016). DAG kann bei einer erhöhten Glucosekonzentration in der Zelle aber auch *de novo* aus Glucose gebildet werden (Ha et al., 2001; Inoguchi et al., 1994). Letztlich münden die meisten dieser Signalwege in einer erhöhten intrazellulären DAG-Konzentration, die zu einer Besetzung der C1a- und C1b-Domäne mit DAG und damit zu einer Aktivierung der Kinase führt.

Unabhängig von DAG wird PKC δ außerdem über Phosphorylierung aktiviert. Beispielsweise induziert oxidativer Stress eine Phosphorylierung von Tyrosinresten und damit eine Aktivierung der Kinase (Steinberg, 2015). Bei Entzündungsprozessen kann PKC δ durch Interleukin 6 (IL6) oder auch über Typ I Interferone (z.B. IFN α) aktiviert werden (Jain et al., 1999; Uddin et al., 2002). Apoptotische Signale führen zu einer Phosphorylierung der Reste Y³¹¹ und Y³³² und bewirken damit eine Spaltung von PKC δ durch Caspase-3. Hierdurch entsteht ein katalytisch aktives Fragment der Kinase (PKC δ -CF) (Steinberg, 2004). Eine aberrante Aktivierung von PKC δ wird mit verschiedenen Krankheitsbildern, wie Diabetes mellitus, Herzerkrankungen, neurodegenerativen Erkrankungen, Sepsis und Tumorerkrankungen in Zusammenhang gebracht (Yang et al., 2019).

Dabei ist die genaue Funktion der PKC δ -Isoform immer noch nicht hinreichend geklärt. So zeigt PKC δ unter unterschiedlichen physiologischen oder pathophysiologischen Bedingungen sogar gegensätzliche Eigenschaften. Dies gilt beispielsweise für ihre Rolle in Tumoren, wo sie je nach Aktivierung, Lokalisation, Stimulus und Tumorentität einerseits tumorsuppressiv und

andererseits tumorfördernd wirken kann. Die Entdeckung, dass PKC δ ein Rezeptor für Phorbolster darstellt, führte zunächst zu ihrer Beschreibung als Onkogen (Newton, 2018; Parker et al., 2021). Die Funktion als Onkogen zeigt sich etwa in einer erhöhten Expression im Pankreaskarzinom (Mauro et al., 2010) oder in Neutrophilen bei der chronisch myeloischen Leukämie (Balasubramanian et al., 2002). Auf der anderen Seite konnten auch tumorsuppressive Eigenschaften der Kinase nachgewiesen werden (Newton, 2018; Parker et al., 2021). Diese zeigen sich etwa darin, dass in fortgeschrittenen Blasenkarzinomen im Vergleich zu gesundem Blasengewebe oder Gewebe aus einem frühen Krankheitsstadium, ein erniedrigtes PKC δ -Proteinniveau vorliegt (Langzam et al., 2001; Varga et al., 2004). Außerdem korreliert eine erhöhte Expression der Kinase mit einer erhöhten Überlebenschance, beispielsweise im hepatozellulären Karzinom (Uhlen et al., 2017). Darüber hinaus ist bekannt, dass der Genlocus von PKC δ (Chromosom 3p21.1) in einer Region liegt, die in vielen Tumoren, unter anderem dem Mammakarzinom, aufgrund des Verlustes der Heterozygotie (LOH) fehlt (Huppi et al., 1994; Zabarovsky et al., 2002).

Die Komplexität der Rolle von PKC δ in Tumoren zeigt sich auch beim Mammakarzinom. Die Kinase fördert das Überleben von Mammakarzinomzelllinien durch die Inhibition bzw. Aktivierung verschiedener Signaltransduktionswege. Dazu gehören beispielsweise die Inhibition der *TNF-related apoptosis-inducing ligand* (TRAIL)-induzierten Caspase-Aktivierung oder die Aktivierung von Proteinkinase B (Akt) und NF- κ B (*nuclear factor 'kappa-light-chain-enhancer' of activated B-cells*) (Grossoni et al., 2007; Yin et al., 2010; Zhang et al., 2005). Interessanterweise steht PKC δ , ebenso wie GRHL2, funktionell im Zusammenhang mit dem Estrogenrezeptor α (ER α). So korrelieren erhöhte PKC δ mRNA-Mengen mit einer schlechteren Überlebensrate in Patientinnen mit ER-positiven Mammakarzinomen (Györfy et al., 2010; McKiernan et al., 2008). Dabei wird eine hohe PKC δ -Aktivität mit der Proliferation von Estrogen-abhängigen Mammakarzinomzellen in Verbindung gebracht (De Servi et al., 2005). Es wird vermutet, dass PKC δ über die Aktivierung des MAPK-Signalweges an der Phosphorylierung des ER beteiligt ist und darüber die transkriptionelle Aktivität des Rezeptors reguliert (Kato et al., 1995; Lahooti et al., 1998). In den Mammakarzinomzelllinien MCF-7 und HCC38 konnte gezeigt werden, dass umgekehrt auch PKC δ durch ER α 36, einer Variante des ER α , aktiviert wird (Chaudhri et al., 2012). Darüber hinaus ist PKC δ bei der Erlangung der Resistenz gegenüber endokriner Therapien des Mammakarzinoms von Bedeutung (Nabha et al., 2005; Reddy et al., 2005). Damit zeigt sich eine weitere Parallele zum Transkriptionsfaktor GRHL2, der ebenfalls zur Resistenzbildung gegenüber endokrinen Therapieansätzen beiträgt (Cocce et al., 2019). Neben der Rolle in Proliferation und Resistenzbildung ist die Kinase auch für die Migration und Invasion von Mammakarzinomzellen von Bedeutung (Kang, 2014). Somit lässt sich an dieser Stelle festhalten, dass es eine weitreichende Überlappung in den zellulären Prozessen, an denen

PKC δ und GRHL2 beteiligt sind, gibt. Prinzipiell erscheint damit ein möglicher funktioneller Zusammenhang zwischen beiden Molekülen plausibel.

In dieser Arbeit konnten Hinweise dafür gewonnen werden, dass die PKC δ -abhängige Suppression der GRHL2-Expression nicht vom Subtyp des Mammakarzinoms (Luminal A und B, Her2+, Basal A), den die verwendeten Zelllinien repräsentieren, abhängig ist. Da alle untersuchten Mammakarzinomzellen die PKC δ -Isoform exprimieren (Daten nicht gezeigt), ist zu vermuten, dass ein Nichtansprechen einiger Zelllinien wahrscheinlich auf die An- oder Abwesenheit bzw. den Aktivierungsstatus von *Downstream-Targets*, die als transkriptionelle Regulatoren die Expression von GRHL2 in Tumorzellen regulieren, zurückzuführen ist.

Bisher sind aber nur relativ wenige Transkriptionsfaktoren bekannt, die nachweislich die Expression von GRHL2 in Tumorzellen regulieren. Dazu zählt etwa ZEB1, das mit GRHL2 eine negative *Feedback*-Schleife bildet (Cieply et al., 2013; Werner et al., 2013). Außerdem ist eine positive, reziproke *Feedback*-Schleife zwischen GRHL2 und dem Lungentranskriptionsfaktor NK2-*homeobox 1* (Nkx2-1) in der Literatur beschrieben (Varma et al., 2012). In humanen Keratinozyten konnte eine reziproke *Feedback*-Schleife zwischen GRHL2 und p63 identifiziert werden (Mehrazarin et al., 2015). Von diesen drei bekannten Regulatoren der GRHL2-Expression wurde bisher ausschließlich p63 mit PKC δ in Verbindung gebracht. Ponassi et al. zeigten, dass PKC δ transkriptionell durch p63 reguliert werden kann (Ponassi et al., 2006). Aber auch für den für die Regulation von GRHL2 interessanteren umgekehrten Fall einer Regulation von p63 durch PKC δ gibt es Hinweise, die allerdings weiterer Untersuchung bedürfen (D. Zhang et al., 2017).

Da also keiner der bisher eindeutig als Regulatoren der GRHL2-Expression identifizierten Transkriptionsfaktoren einer PKC δ -abhängigen Regulation der Expression oder Aktivität unterliegt, wurden zu einem besseren Verständnis des PKC δ -abhängigen Signalweges ausgedehnte Analysen des GRHL2-Promotors durchgeführt. Zur Identifizierung PKC δ -abhängiger Transkriptionsfaktoren, die in der Promotor-Region des GRHL2-Gens binden und GRHL2 somit transkriptionell regulieren könnten, wurde die Region 2 kb *up* und *downstream* des TSS untersucht. Insgesamt kann das Ergebnis der Promotoranalyse als verlässlich betrachtet werden: Die Bindungsstelle von ZEB1, die von der eigenen Arbeitsgruppe schon in vorangegangenen Studien identifiziert und experimentell bestätigt werden konnte (Werner et al., 2013), ist auch in diesem Analyseergebnis zu finden und kann somit als Positivkontrolle angesehen werden. Die Untersuchung ergab insgesamt 18 Transkriptionsfaktoren, die GRHL2 möglicherweise in der Promotor-Region binden.

Einer dieser transkriptionellen Regulatoren ist der SP1-Transkriptionsfaktor. SP1 ist ein wichtiger Zink-Finger-Transkriptionsfaktor, der die Expression einer Vielzahl von Genen über Bindung an entsprechende, GC-reiche Promotoren positiv oder negativ reguliert (Beishline &

Azizkhan-Clifford, 2015; O'Connor et al., 2016). Eine Verbindung zwischen SP1 und PKC δ konnte in verschiedenen Arbeiten nachgewiesen werden. So zeigten Tsai et al., dass in Epstein-Barr-Virus (EBV)-positiven neuronalen Vorläuferzellen nach Stimulation mit dem Histonacetyltransferase (HADAC)-Inhibitor Trichostatin A (TSA), eine PKC δ -abhängige Phosphorylierung und damit Aktivierung von SP1 zu beobachten ist und zu einer Reaktivierung des lytischen Zyklus des Virus führt. Darüber hinaus konnte mittels Immunpräzipitation eine direkte Interaktion zwischen SP1 und PKC δ nachgewiesen werden (Tsai et al., 2011). Kim et al. postulieren, dass eine Stimulation von Kolonkarzinomzelllinien mit dem HADAC-Inhibitor Apicidin eine SP1-abhängige Expressionssteigerung von Cyclin D3 bewirkt und dass diese PKC δ -abhängig ist (Kim et al., 2007).

Ob mit dem SP1-Transkriptionsfaktor tatsächlich das gesuchte Bindeglied zwischen PKC δ und der transkriptionellen Herabregulation von GRHL2 gefunden wurde, müssen weitere Untersuchungen allerdings noch zeigen. Angesichts der Tatsache, dass die Analyse transkriptioneller Netzwerke Hinweise für eine Überrepräsentation SP1-bindender Elemente in Promotoren von PKC δ -regulierten Genen ergab (Caino et al., 2011) und der GRHL2-Promotor zwei SP1-Bindungsstellen im untersuchten Bereich aufweist, erscheinen weiterführende Untersuchungen einer möglichen PKC δ -abhängigen Regulation der GRHL2-Expression in Tumorzellen durch den SP1-Transkriptionsfaktor lohnenswert.

Grundsätzlich kann aber auch nicht ausgeschlossen werden, dass andere in dieser Promotoranalyse identifizierte Transkriptionsfaktoren einer PKC δ -abhängigen Regulation unterliegen und somit Teil des hier erstmals beschriebenen Signalweges einer PKC δ -abhängigen Regulation der GRHL2-Expression in Tumorzellen sind. Tatsächlich gibt es weitere Transkriptionsfaktoren, die durch PKC-Isoformen reguliert werden. Zu diesen zählen beispielsweise NF κ B, c-Fos, Jun, Stats (*Signal Transducers and Activators of Transcription*) und p53, wobei aufgrund teilweise überlappender Substraterkennung und Funktion nicht immer eindeutig geklärt ist, welche spezifische PKC-Isoform die Genexpression reguliert (Abou-Kandil et al., 2012; Aziz et al., 2007; Boyle et al., 1991; Garg et al., 2012; Garg et al., 2013; Parker et al., 2021; Satoh et al., 2004; Yoshida et al., 2006). Dennoch ist bekannt, dass PKC δ für die Phosphorylierung des S⁷²⁷-Restes von Stat1 verantwortlich ist und so die Interferon-abhängige Gentranskription durch Stat1 beeinflussen kann (Uddin et al., 2002). Auch Stat3 erfährt durch PKC δ eine Phosphorylierung an S⁷²⁷. Diese führt zu einer Reduktion der DNA-Bindungskapazität und damit zu einer Reduktion der transkriptionellen Aktivität des Transkriptionsfaktors (Jain et al., 1999). Garg und Mitarbeiter konnten in einer Prostatakarzinomzelllinie (LNCaP) durch die Untersuchung von PKC δ -regulierten Genen auf Transkriptionsfaktor-Bindungsstellen den Transkriptionsfaktor c-Rel als einen Hauptakteur identifizieren (Garg et al., 2013). Obwohl die aufgeführten PKC δ -abhängigen Transkriptionsfaktoren nicht zu den 18 in dieser Arbeit identifizierten, möglichen Regulatoren der

GRHL2-Genexpression zählen, ist es wichtig darauf hinzuweisen, dass die Liste der in dieser Arbeit identifizierten Transkriptionsfaktoren nur solche umfasst, für die ein *ChIP-Peak* und ein DNA-Bindungsmotiv im relevanten Sequenzbereich identifiziert werden konnte. Nicht berücksichtigt sind hingegen solche Transkriptionsfaktoren, für die zwar eine experimentell validierte Bindung im GRHL2-Promotor in Form eines *ChIP-Peaks*, nicht aber ein dazu passendes Bindungsmotiv gefunden werden konnte. Interessanterweise zählt hierzu u.a. auch der Transkriptionsfaktor JunD, der PKC δ -abhängig reguliert wird. Die in dieser Arbeit durchgeführte Promotoranalyse enthüllte eine Bindung von JunD an den GRHL2-Promotor in Form von *ChIP-Peaks* in unterschiedlichen Zellsystemen, ohne dass ein Bindungsmotiv im relevanten Bereich identifiziert werden konnte (Daten nicht gezeigt). Da einer experimentell ermittelten Bindung eines Transkriptionsfaktors an eine Promotorregion eine hohe Aussagekraft beizumessen ist, ist zu vermuten, dass Bindungsmotive im relevanten Bereich existieren, aber durch den in dieser Arbeit gewählten, bioinformatischen Ansatz nicht ausreichend erfasst wurden. Es ist also anzunehmen, dass eine verfeinerte Promotoranalyse, die mehr und andere Bindungsmotive von Transkriptionsfaktoren berücksichtigt und unterschiedliche Algorithmen nutzt, zu einer deutlich größeren Anzahl von möglichen, PKC δ -abhängigen Regulatoren (z.B. JunD) der GRHL2-Expression in Tumorzellen führt. Ferner ist zu berücksichtigen, dass nur die Region 2 kb *up* und *downstream* des TSS untersucht wurde. Diese letztlich willkürliche Eingrenzung der Promotorregion trägt ebenfalls zu einer verringerten Anzahl von möglichen Regulatoren der GRHL2-Expression in Tumorzellen bei. Unabhängig von einer möglichen Beteiligung dieser Transkriptionsfaktoren an der PKC δ -abhängigen Regulation der GRHL2-Expression können die Ergebnisse der Promotoranalyse somit als wichtige Grundlage für die Identifizierung weiterer transkriptioneller Mechanismen der Regulation der Expression von GRHL2 in Tumorzellen bilden.

Zusammenfassend lässt sich festhalten, dass es im Rahmen dieser Arbeit gelungen ist, zwei neuartige, aber völlig unterschiedliche Mechanismen der Regulation der Expression von GRHL2 in Tumorzellen zu identifizieren. Obwohl sicher weitere Untersuchungen notwendig sind, um die relevanten Signalwege weiter aufzuklären, stellen die erzielten Ergebnisse bereits eine gute Grundlage für weitere Untersuchungen dar und tragen zu einem besseren Verständnis der Rolle des Transkriptionsfaktors GRHL2 in Tumorzellen bei.

7.3. Ausblick

Die Identifizierung und Charakterisierung dreier bislang unbekannter Phosphorylierungsstellen (S²¹⁰, T²¹¹, S²¹⁴), die innerhalb einer neu entdeckten PEST-Sequenz mit degradativen Eigenschaften lokalisiert sind und je nach Phosphorylierungszustand die Expression und Stabilität des GRHL2-Proteins positiv oder negativ beeinflussen können, stellt einen großen Fortschritt in der Erforschung der posttranslationalen Regulation des Transkriptionsfaktors GRHL2 in Tumorzellen dar. Von herausragendem Interesse ist es sicher, die für die Phosphorylierung von GRHL2 verantwortlichen Signalwege bzw. Kinasen zu identifizieren, um zu erschließen, unter welchen Bedingungen die hier erstmals beschriebenen Regulationsmechanismen wirksam sind. Prinzipiell ist der Einsatz von *Screening*-Methoden möglich. So könnte ein erneutes *KinaseFinder Screening* durchgeführt werden. Da die Akzeptanz des in dieser Arbeit verwendeten Peptids durch die Kinasen aber sehr gering war, würde sich die Verwendung eines bakteriell-exprimierten, aufgereinigten, rekombinanten Proteins, das die PEST-Sequenz von GRHL2 enthält, anbieten. Ferner gibt es die Möglichkeit, mit siRNA-Bibliotheken, die das Kinom vollständig abdecken, zu arbeiten, weil ein *Knockdown* einer relevanten Kinase sich unmittelbar in einem veränderten GRHL2-Expressionsniveau widerspiegeln würde. Hier würde es sich anbieten, GRHL2 mit einem Reporter (z.B. Luciferase) gentechnisch zu fusionieren, so dass man quantifizierbare Resultate erhält. Obwohl es solche Technologieplattformen in den USA bereits gibt, war ein Zugang zu solchen fortgeschrittenen experimentellen Ansätzen im Rahmen dieser Arbeit leider nicht möglich. Am einfachsten ist es sicher, Tumorzellen unterschiedlichen Bedingungen (Stress, Hypoxie etc.) auszusetzen, um zu ermitteln, in welchem physiologischen oder pathophysiologischen Kontext der hier erstmals beschriebene Regulationsmechanismus von Bedeutung ist. Durch eine spezifische pharmakologische Inhibition möglicher relevanter Kinasen oder durch siRNA-vermittelte *Knockdown*-Experimente ließen sich dann Fortschritte bei der Identifizierung der relevanten Signalwege und Kinasen erzielen. Es ist zu vermuten, dass mit zunehmender Anzahl an Publikationen zum Transkriptionsfaktor GRHL2 dieser Regulationsmechanismus auch von anderen Arbeitsgruppen beobachtet wird. Ein regelmäßiges und intensives Literaturstudium ist also sinnvoll, damit auf der Basis des im Rahmen dieser Arbeit erworbenen Wissens eine detaillierte Analyse der molekularen Veränderungen erfolgen kann. Weitere Aspekte dieses neuartigen Regulationsmechanismus verdienen Aufmerksamkeit. So ist es sicher von großer Bedeutung den Abbauweg im Detail besser zu verstehen. Hierbei steht insbesondere die Frage, welche E3 Ligase die Degradation von GRHL2 bewirkt, im Vordergrund. Diese und weitere Untersuchungen erscheinen sinnvoll und notwendig, um die Regulation der GRHL2-Proteinstabilität und damit Expression in Tumorzellen besser zu verstehen.

Auch in Hinblick auf den zweiten, in dieser Arbeit erstmals beschriebenen Regulationsmechanismus, der auf einer PKC δ -vermittelten transkriptionellen

Herunterregulation der GRHL2-Expression in Tumorzellen beruht, gibt es einige offene Fragen. Obwohl die PKC δ -Isoform bereits eindeutig als die Kinase identifiziert werden konnte, die die PMA (Phorbol-2-myristat-3-acetat)-abhängige Suppression der GRHL2-Expression vermittelt, sind sicher weitere Experimente zur Absicherung dieses Befundes notwendig. Hilfreich könnte es sein, durch weitere siRNAs bzw. shRNAs oder aber durch eine gezielte pharmakologische Inhibition die Beteiligung dieser Kinase am Regulationsmechanismus experimentell nachzuweisen. Durch ektopische Expression katalytisch-aktiver oder dominant-negativer PKC δ -Mutanten in Tumorzellen ließe sich ebenfalls die Aktivität der PKC δ -Isoform gezielt manipulieren und die Beteiligung am untersuchten Signalweg nachweisen.

Von besonderem Interesse ist auch die Identifizierung der *Downstream-Targets* von PKC δ , die letztlich die transkriptionelle Suppression der GRHL2-Expression vermitteln. In einer Promotor-Analyse wurde SP1 bereits als ein vielversprechender Kandidat identifiziert. Weitere Untersuchungen, wie z.B. *Electrophoretic Mobility Shift Assay* (EMSA), *Chromatin immunoprecipitation* (ChIP) und auch Luciferase-Reporter-Assays müssten zunächst durchgeführt werden, um zu belegen, dass SP1 tatsächlich die GRHL2-Expression in Tumorzellen reguliert. Anschließend müsste durch pharmakologische Intervention oder aber durch Verwendung von siRNAs bzw. shRNAs die SP-1-Aktivität bzw.-Expression unterdrückt werden. Auf diese Weise ließe sich eine Beteiligung des transkriptionellen Regulators SP1 an der PKC δ -vermittelten Suppression der GRHL2-Expression in Tumorzellen experimentell darstellen.

Unabhängig davon, ob der Transkriptionsfaktor SP1 der entscheidende transkriptionelle Regulator der PKC δ -abhängigen Suppression der GRHL2-Expression ist, besteht ein fundamentales Interesse daran, die Bedingungen zu ermitteln, die zur Aktivierung der PKC δ -Isoform führen und damit den hier erstmals beschriebenen Signalweg auslösen. Hinsichtlich der Aktivierung von PKC-Isoformen gibt es bereits umfangreiche Studien, so dass es gelingen sollte, dieses neue Regulationsprinzip auch in einen konkreten biologischen Kontext einzubetten. Erst dann wird es möglich sein, die Bedeutung der in dieser Arbeit erstmals beschriebenen Regulationsprinzipien in Hinblick auf die Rolle von GRHL2 in der Entstehung und Progression von Tumoren vollständig zu erfassen.

8. Literaturverzeichnis

- Abou-Kandil, A., Chamias, R., Huleihel, M., Godbey, W. T., & Aboud, M. (2012). Differential role of PKC-induced c-Jun in HTLV-1 LTR activation by 12-O-tetradecanoylphorbol-13-acetate in different human T-cell lines. *PLoS One*, *7*(1), e29934. doi:10.1371/journal.pone.0029934
- Aceto, N., Bardia, A., Miyamoto, D. T., Donaldson, M. C., Wittner, B. S., Spencer, J. A., . . . Maheswaran, S. (2014). Circulating tumor cell clusters are oligoclonal precursors of breast cancer metastasis. *Cell*, *158*(5), 1110-1122. doi:10.1016/j.cell.2014.07.013
- Al-Hajj, M., Wicha, M. S., Benito-Hernandez, A., Morrison, S. J., & Clarke, M. F. (2003). Prospective identification of tumorigenic breast cancer cells. *100*(7), 3983-3988. doi:10.1073/pnas.0530291100 %J Proceedings of the National Academy of Sciences
- Alix-Panabières, C., & Pantel, K. (2021). Liquid Biopsy: From Discovery to Clinical Application. *11*(4), 858-873. doi:10.1158/2159-8290.CD-20-1311 %J Cancer Discovery
- Almeida, M. S., & Bray, S. J. (2005). Regulation of post-embryonic neuroblasts by Drosophila Grainyhead. *Mech Dev*, *122*(12), 1282-1293. doi:10.1016/j.mod.2005.08.004
- Ardito, F., Giuliani, M., Perrone, D., Troiano, G., & Lo Muzio, L. (2017). The crucial role of protein phosphorylation in cell signaling and its use as targeted therapy (Review). *Int J Mol Med*, *40*(2), 271-280. doi:10.3892/ijmm.2017.3036
- Attardi, L. D., & Tjian, R. (1993). Drosophila tissue-specific transcription factor NTF-1 contains a novel isoleucine-rich activation motif. *Genes Dev*, *7*(7b), 1341-1353. doi:10.1101/gad.7.7b.1341
- Auden, A., Caddy, J., Wilanowski, T., Ting, S. B., Cunningham, J. M., & Jane, S. M. (2006). Spatial and temporal expression of the Grainyhead-like transcription factor family during murine development. *Gene Expr Patterns*, *6*(8), 964-970. doi:10.1016/j.modgep.2006.03.011
- Aue, A., Hinze, C., Walentin, K., Ruffert, J., Yurtdas, Y., Werth, M., . . . Schmidt-Ott, K. M. (2015). A Grainyhead-Like 2/Ovo-Like 2 Pathway Regulates Renal Epithelial Barrier Function and Lumen Expansion. *J Am Soc Nephrol*, *26*(11), 2704-2715. doi:10.1681/asn.2014080759
- Aziz, M. H., Manoharan, H. T., Church, D. R., Dreckschmidt, N. E., Zhong, W., Oberley, T. D., . . . Verma, A. K. (2007). Protein kinase Cepsilon interacts with signal transducers and activators of transcription 3 (Stat3), phosphorylates Stat3Ser727, and regulates its constitutive activation in prostate cancer. *Cancer Res*, *67*(18), 8828-8838. doi:10.1158/0008-5472.Can-07-1604
- Babaei, G., Aziz, S. G., & Jaghi, N. Z. Z. (2021). EMT, cancer stem cells and autophagy; The three main axes of metastasis. *Biomed Pharmacother*, *133*, 110909. doi:10.1016/j.biopha.2020.110909
- Balasubramanian, N., Advani, S. H., & Zingde, S. M. (2002). Protein kinase C isoforms in normal and leukemic neutrophils: altered levels in leukemic neutrophils and changes during myeloid maturation in chronic myeloid leukemia. *Leukemia Research*, *26*(1), 67-81. doi:[https://doi.org/10.1016/S0145-2126\(01\)00098-4](https://doi.org/10.1016/S0145-2126(01)00098-4)
- Bardelli, A., & Pantel, K. (2017). Liquid Biopsies, What We Do Not Know (Yet). *Cancer Cell*, *31*(2), 172-179. doi:10.1016/j.ccell.2017.01.002
- Basu, A. (1993). The potential of protein kinase C as a target for anticancer treatment. *Pharmacol Ther*, *59*(3), 257-280. doi:10.1016/0163-7258(93)90070-t
- Baulida, Díaz, V. M., & Herreros, A. G. d. (2019). Snail1: A Transcriptional Factor Controlled at Multiple Levels. *J Clin Med*, *8*(6), 757. doi:10.3390/jcm8060757

- Beishline, K., & Azizkhan-Clifford, J. (2015). Sp1 and the 'hallmarks of cancer'. *FEBS J*, 282(2), 224-258. doi:<https://doi.org/10.1111/febs.13148>
- Bhatia, S., Wang, P., Toh, A., & Thompson, E. W. (2020). New Insights Into the Role of Phenotypic Plasticity and EMT in Driving Cancer Progression. *Front Mol Biosci*, 7, 71. doi:10.3389/fmolb.2020.00071
- Biggin, M. D., & Tjian, R. (1988). Transcription factors that activate the Ultrabithorax promoter in developmentally staged extracts. *Cell*, 53(5), 699-711. doi:10.1016/0092-8674(88)90088-8
- Blobe, G. C., Obeid, L. M., & Hannun, Y. A. (1994). Regulation of protein kinase C and role in cancer biology. *Cancer Metastasis Rev*, 13(3-4), 411-431. doi:10.1007/bf00666107
- Bocci, F., Gearhart-Serna, L., Boareto, M., Ribeiro, M., Ben-Jacob, E., Devi, G. R., . . . Jolly, M. K. (2019). Toward understanding cancer stem cell heterogeneity in the tumor microenvironment. *116*(1), 148-157. doi:10.1073/pnas.1815345116 %J Proceedings of the National Academy of Sciences
- Boglev, Y., Wilanowski, T., Caddy, J., Parekh, V., Auden, A., Darido, C., . . . Jane, S. M. (2011). The unique and cooperative roles of the Grainy head-like transcription factors in epidermal development reflect unexpected target gene specificity. *Developmental Biology*, 349(2), 512-522. doi:<https://doi.org/10.1016/j.ydbio.2010.11.011>
- Boyle, W. J., Smeal, T., Defize, L. H., Angel, P., Woodgett, J. R., Karin, M., & Hunter, T. (1991). Activation of protein kinase C decreases phosphorylation of c-Jun at sites that negatively regulate its DNA-binding activity. *Cell*, 64(3), 573-584. doi:10.1016/0092-8674(91)90241-p
- Bray, & Kafatos. (1991). Developmental function of Elf-1: an essential transcription factor during embryogenesis in Drosophila. *Genes Dev*, 5(9), 1672-1683. doi:10.1101/gad.5.9.1672
- Brodie, C., & Blumberg, P. M. (2003). Regulation of cell apoptosis by protein kinase c delta. *Apoptosis*, 8(1), 19-27. doi:10.1023/a:1021640817208
- Brouns, M. R., De Castro, S. C., Terwindt-Rouwenhorst, E. A., Massa, V., Hekking, J. W., Hirst, C. S., . . . Greene, N. D. (2011). Over-expression of Grhl2 causes spina bifida in the Axial defects mutant mouse. *Hum Mol Genet*, 20(8), 1536-1546. doi:10.1093/hmg/ddr031
- Burk, Schubert, J., Wellner, U., Schmalhofer, O., Vincan, E., Spaderna, S., & Brabletz, T. (2008). A reciprocal repression between ZEB1 and members of the miR-200 family promotes EMT and invasion in cancer cells. *9*(6), 582-589. doi:<https://doi.org/10.1038/embor.2008.74>
- Butz, H., Szabó, P. M., Nofech-Mozes, R., Rotondo, F., Kovacs, K., Mirham, L., . . . Yousef, G. M. (2014). Integrative bioinformatics analysis reveals new prognostic biomarkers of clear cell renal cell carcinoma. *Clin Chem*, 60(10), 1314-1326. doi:10.1373/clinchem.2014.225854
- Caino, M. C., von Burstin, V. A., Lopez-Haber, C., & Kazanietz, M. G. (2011). Differential regulation of gene expression by protein kinase C isozymes as determined by genome-wide expression analysis. *J Biol Chem*, 286(13), 11254-11264. doi:10.1074/jbc.M110.194332
- Carver, E. A., Jiang, R., Lan, Y., Oram, K. F., & Gridley, T. (2001). The mouse snail gene encodes a key regulator of the epithelial-mesenchymal transition. *Mol Cell Biol*, 21(23), 8184-8188. doi:10.1128/mcb.21.23.8184-8188.2001
- Celià-Terrassa, T., & Jolly, M. K. (2020). Cancer Stem Cells and Epithelial-to-Mesenchymal Transition in Cancer Metastasis. *Cold Spring Harb Perspect Med*, 10(7). doi:10.1101/cshperspect.a036905

- Cerami, E., Gao, J., Dogrusoz, U., Gross, B. E., Sumer, S. O., Aksoy, B. A., . . . Schultz, N. (2012). The cBio Cancer Genomics Portal: An Open Platform for Exploring Multidimensional Cancer Genomics Data. *2*(5), 401-404. doi:10.1158/2159-8290.CD-12-0095 %J Cancer Discovery
- Chaudhri, R. A., Olivares-Navarrete, R., Cuenca, N., Hadadi, A., Boyan, B. D., & Schwartz, Z. (2012). Membrane Estrogen Signaling Enhances Tumorigenesis and Metastatic Potential of Breast Cancer Cells via Estrogen Receptor- α 36 (ER α 36)*. *Journal of Biological Chemistry*, *287*(10), 7169-7181. doi:<https://doi.org/10.1074/jbc.M111.292946>
- Chen, Yi, J. K., Shimane, T., Mehrazarin, S., Lin, Y.-L., Shin, K.-H., . . . Kang, M. K. (2016). Grainyhead-like 2 regulates epithelial plasticity and stemness in oral cancer cells. *Carcinogenesis*, *37*(5), 500-510. doi:10.1093/carcin/bgw027
- Chen, A. F., Liu, A. J., Krishnakumar, R., Freimer, J. W., DeVeale, B., & Belloch, R. (2018). GRHL2-Dependent Enhancer Switching Maintains a Pluripotent Stem Cell Transcriptional Subnetwork after Exit from Naive Pluripotency. *Cell Stem Cell*, *23*(2), 226-238.e224. doi:10.1016/j.stem.2018.06.005
- Chen, W., Dong, Q., Shin, K. H., Kim, R. H., Oh, J. E., Park, N. H., & Kang, M. K. (2010). Grainyhead-like 2 enhances the human telomerase reverse transcriptase gene expression by inhibiting DNA methylation at the 5'-CpG island in normal human keratinocytes. *J Biol Chem*, *285*(52), 40852-40863. doi:10.1074/jbc.M110.103812
- Cheung, K. J., Padmanaban, V., Silvestri, V., Schipper, K., Cohen, J. D., Fairchild, A. N., . . . Ewald, A. J. (2016). Polyclonal breast cancer metastases arise from collective dissemination of keratin 14-expressing tumor cell clusters. *Proc Natl Acad Sci U S A*, *113*(7), E854-E863. doi:10.1073/pnas.1508541113
- Chiang, A. C., & Massagué, J. (2008). Molecular basis of metastasis. *The New England journal of medicine*, *359*(26), 2814-2823. doi:10.1056/NEJMra0805239
- Choi, S. Y., Jang, H., Roe, J. S., Kim, S. T., Cho, E. J., & Youn, H. D. (2013). Phosphorylation and ubiquitination-dependent degradation of CABIN1 releases p53 for transactivation upon genotoxic stress. *Nucleic Acids Res*, *41*(4), 2180-2190. doi:10.1093/nar/gks1319
- Chung, V. Y., Tan, T. Z., Tan, M., Wong, M. K., Kuay, K. T., Yang, Z., . . . Huang, R. Y. (2016). GRHL2-miR-200-ZEB1 maintains the epithelial status of ovarian cancer through transcriptional regulation and histone modification. *Sci Rep*, *6*, 19943. doi:10.1038/srep19943
- Cieply, B., Farris, J., Denvir, J., Ford, H. L., & Frisch, S. M. (2013). Epithelial-mesenchymal transition and tumor suppression are controlled by a reciprocal feedback loop between ZEB1 and Grainyhead-like-2. *Cancer Res*, *73*(20), 6299-6309. doi:10.1158/0008-5472.Can-12-4082
- Cieply, B., Riley, P. t., Pifer, P. M., Widmeyer, J., Addison, J. B., Ivanov, A. V., . . . Frisch, S. M. (2012). Suppression of the epithelial-mesenchymal transition by Grainyhead-like-2. *Cancer Res*, *72*(9), 2440-2453. doi:10.1158/0008-5472.Can-11-4038
- Cocce, K. J., Jasper, J. S., Desautels, T. K., Everett, L., Wardell, S., Westerling, T., . . . McDonnell, D. P. (2019). The Lineage Determining Factor GRHL2 Collaborates with FOXA1 to Establish a Targetable Pathway in Endocrine Therapy-Resistant Breast Cancer. *Cell Reports*, *29*(4), 889-903.e810. doi:<https://doi.org/10.1016/j.celrep.2019.09.032>
- Corish, P., & Tyler-Smith, C. (1999). Attenuation of green fluorescent protein half-life in mammalian cells. *Protein Engineering, Design and Selection*, *12*(12), 1035-1040. doi:10.1093/protein/12.12.1035 %J Protein Engineering, Design and Selection
- Correa Marrero, M., & Barrio-Hernandez, I. (2021). Toward Understanding the Biochemical Determinants of Protein Degradation Rates. *ACS omega*, *6*(8), 5091-5100. doi:10.1021/acsomega.0c05318

- De Servi, B., Hermani, A., Medunjanin, S., & Mayer, D. (2005). Impact of PKCdelta on estrogen receptor localization and activity in breast cancer cells. *Oncogene*, *24*(31), 4946-4955. doi:10.1038/sj.onc.1208676
- Deshiere, A., Duchemin-Pelletier, E., Spreux, E., Ciais, D., Combes, F., Vandembrouck, Y., . . . Filhol, O. (2013). Unbalanced expression of CK2 kinase subunits is sufficient to drive epithelial-to-mesenchymal transition by Snail1 induction. *Oncogene*, *32*(11), 1373-1383. doi:10.1038/onc.2012.165
- Díaz, V. M., Viñas-Castells, R., & García de Herreros, A. (2014). Regulation of the protein stability of EMT transcription factors. *Cell Adhesion & Migration*, *8*(4), 418-428. doi:10.4161/19336918.2014.969998
- Dikic, I. (2017). Proteasomal and Autophagic Degradation Systems. *Annu Rev Biochem*, *86*, 193-224. doi:10.1146/annurev-biochem-061516-044908
- Domínguez, D., Montserrat-Sentís, B., Virgós-Soler, A., Guaita, S., Grueso, J., Porta, M., . . . García de Herreros, A. (2003). Phosphorylation Regulates the Subcellular Location and Activity of the Snail Transcriptional Repressor. *23*(14), 5078-5089. doi:10.1128/MCB.23.14.5078-5089.2003 %J Molecular and Cellular Biology
- Dompe, N., Rivers, C. S., Li, L., Cordes, S., Schwickart, M., Punnoose, E. A., . . . Davis, D. P. (2011). A whole-genome RNAi screen identifies an 8q22 gene cluster that inhibits death receptor-mediated apoptosis. *108*(43), E943-E951. doi:10.1073/pnas.1100132108 %J Proceedings of the National Academy of Sciences
- Dongre, A., & Weinberg, R. A. (2019). New insights into the mechanisms of epithelial-mesenchymal transition and implications for cancer. *Nat Rev Mol Cell Biol*, *20*(2), 69-84. doi:10.1038/s41580-018-0080-4
- Dynlacht, B. D., Attardi, L. D., Admon, A., Freeman, M., & Tjian, R. (1989). Functional analysis of NTF-1, a developmentally regulated Drosophila transcription factor that binds neuronal cis elements. *Genes Dev*, *3*(11), 1677-1688. doi:10.1101/gad.3.11.1677
- Eckert, Mark A., Lwin, Thinzar M., Chang, Andrew T., Kim, J., Danis, E., Ohno-Machado, L., & Yang, J. (2011). Twist1-Induced Invadopodia Formation Promotes Tumor Metastasis. *Cancer Cell*, *19*(3), 372-386. doi:10.1016/j.ccr.2011.01.036
- Endo, H., & Inoue, M. (2019). Dormancy in cancer. *Cancer science*, *110*(2), 474-480. doi:10.1111/cas.13917
- Farris, J. C., Pifer, P. M., Zheng, L., Gottlieb, E., Denvir, J., & Frisch, S. M. (2016). Grainyhead-like 2 Reverses the Metabolic Changes Induced by the Oncogenic Epithelial-Mesenchymal Transition: Effects on Anoikis. *Mol Cancer Res*, *14*(6), 528-538. doi:10.1158/1541-7786.Mcr-16-0050
- Ferrara, P., Andermarcher, E., Bossis, G., Acquaviva, C., Brockly, F., Jariel-Encontre, I., & Piechaczyk, M. (2003). The structural determinants responsible for c-Fos protein proteasomal degradation differ according to the conditions of expression. *Oncogene*, *22*(10), 1461-1474. doi:10.1038/sj.onc.1206266
- Fidler, I. J. (2003). The pathogenesis of cancer metastasis: the 'seed and soil' hypothesis revisited. *Nat Rev Cancer*, *3*(6), 453-458. doi:10.1038/nrc1098
- Fischer, K. R., Durrans, A., Lee, S., Sheng, J., Li, F., Wong, S. T., . . . Gao, D. (2015). Epithelial-to-mesenchymal transition is not required for lung metastasis but contributes to chemoresistance. *Nature*, *527*(7579), 472-476. doi:10.1038/nature15748
- Frey, S. (2013). *Funktionelle Analyse des Transkriptionsfaktors „Grainyhead-like 2“ (GRHL2) und dessen pathophysiologische Relevanz beim humanen Mammakarzinom.* Universität Hamburg,
- Frisch, Farris, J. C., & Pifer, P. M. (2017). Roles of Grainyhead-like transcription factors in cancer. *Oncogene*, *36*(44), 6067-6073. doi:10.1038/onc.2017.178

- Frisch, Schaller, M., & Cieply, B. (2013). Mechanisms that link the oncogenic epithelial–mesenchymal transition to suppression of anoikis. *126*(1), 21-29. doi:10.1242/jcs.120907 %J Journal of Cell Science
- Gao, J., Aksoy, B. A., Dogrusoz, U., Dresdner, G., Gross, B., Sumer, S. O., . . . Schultz, N. (2013). Integrative Analysis of Complex Cancer Genomics and Clinical Profiles Using the cBioPortal. *6*(269), pl1-pl1. doi:10.1126/scisignal.2004088 %J Science Signaling
- Gao, X., Vockley, C. M., Pauli, F., Newberry, K. M., Xue, Y., Randell, S. H., . . . Hogan, B. L. (2013). Evidence for multiple roles for grainyhead-like 2 in the establishment and maintenance of human mucociliary airway epithelium.[corrected]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, *110*(23), 9356-9361. doi:10.1073/pnas.1307589110
- García-Alai, M. M., Gallo, M., Salame, M., Wetzler, D. E., McBride, A. A., Paci, M., . . . de Prat-Gay, G. (2006). Molecular Basis for Phosphorylation-Dependent, PEST-Mediated Protein Turnover. *Structure*, *14*(2), 309-319. doi:10.1016/j.str.2005.11.012
- Garg, R., Blando, J., Perez, C. J., Wang, H., Benavides, F. J., & Kazanietz, M. G. (2012). Activation of nuclear factor κ B (NF- κ B) in prostate cancer is mediated by protein kinase C epsilon (PKCepsilon). *J Biol Chem*, *287*(44), 37570-37582. doi:10.1074/jbc.M112.398925
- Garg, R., Caino, M. C., & Kazanietz, M. G. (2013). Regulation of Transcriptional Networks by PKC Isozymes: Identification of c-Rel as a Key Transcription Factor for PKC-Regulated Genes. *PLoS One*, *8*(6), e67319. doi:10.1371/journal.pone.0067319
- Gelens, L., & Saurin, A. T. (2018). Exploring the Function of Dynamic Phosphorylation-Dephosphorylation Cycles. *Dev Cell*, *44*(6), 659-663. doi:10.1016/j.devcel.2018.03.002
- Gonzalez, D. M., & Medici, D. (2014). Signaling mechanisms of the epithelial-mesenchymal transition. *Science signaling*, *7*(344), re8-re8. doi:10.1126/scisignal.2005189
- Gregory, P. A., Bert, A. G., Paterson, E. L., Barry, S. C., Tsykin, A., Farshid, G., . . . Goodall, G. J. (2008). The miR-200 family and miR-205 regulate epithelial to mesenchymal transition by targeting ZEB1 and SIP1. *Nat Cell Biol*, *10*(5), 593-601. doi:10.1038/ncb1722
- Gregory, P. A., Bracken, C. P., Smith, E., Bert, A. G., Wright, J. A., Roslan, S., . . . Goodall, G. J. (2011). An autocrine TGF-beta/ZEB/miR-200 signaling network regulates establishment and maintenance of epithelial-mesenchymal transition. *Mol Biol Cell*, *22*(10), 1686-1698. doi:10.1091/mbc.e11-02-0103
- Grossoni, V. C., Falbo, K. B., Kazanietz, M. G., de Kier Joffé, E. D. B., & Urtreger, A. J. (2007). Protein kinase C δ enhances proliferation and survival of murine mammary cells. *46*(5), 381-390. doi:<https://doi.org/10.1002/mc.20287>
- Guharoy, M., Bhowmick, P., Sallam, M., & Tompa, P. (2016). Tripartite degrons confer diversity and specificity on regulated protein degradation in the ubiquitin-proteasome system. *Nature Communications*, *7*(1), 10239. doi:10.1038/ncomms10239
- Guler, R., Afshar, M., Arendse, B., Parihar, S. P., Revaz-Breton, M., Leitges, M., . . . Brombacher, F. (2011). PKC δ regulates IL-12p40/p70 production by macrophages and dendritic cells, driving a type 1 healer phenotype in cutaneous leishmaniasis. *Eur J Immunol*, *41*(3), 706-715. doi:10.1002/eji.201040985
- Guler, R., Afshar, M., Arendse, B., Parihar, S. P., Revaz-Breton, M., Leitges, M., . . . Brombacher, F. (2011). PKC δ regulates IL-12p40/p70 production by macrophages and dendritic cells, driving a type 1 healer phenotype in cutaneous leishmaniasis. *41*(3), 706-715. doi:<https://doi.org/10.1002/eji.201040985>
- Gupta, G. P., & Massagué, J. (2006). Cancer Metastasis: Building a Framework. *Cell*, *127*(4), 679-695. doi:10.1016/j.cell.2006.11.001

- Györfy, B., Lanczky, A., Eklund, A. C., Denkert, C., Budczies, J., Li, Q., & Szallasi, Z. (2010). An online survival analysis tool to rapidly assess the effect of 22,277 genes on breast cancer prognosis using microarray data of 1,809 patients. *Breast Cancer Res Treat*, 123(3), 725-731. doi:10.1007/s10549-009-0674-9
- Ha, H., Yu, M. R., & Lee, H. B. (2001). High glucose-induced PKC activation mediates TGF-beta 1 and fibronectin synthesis by peritoneal mesothelial cells. *Kidney Int*, 59(2), 463-470. doi:10.1046/j.1523-1755.2001.059002463.x
- Hanahan, D., & Weinberg, R. A. (2011). Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell*, 144(5), 646-674. doi:10.1016/j.cell.2011.02.013
- Hay, E. D. (1968). *Organization and fine structure of epithelium and mesenchyme in the developing chick embryo*.
- Heidrich, Ačkar, L., Mossahebi Mohammadi, P., & Pantel, K. (2021). Liquid biopsies: Potential and challenges. *148(3)*, 528-545. doi:<https://doi.org/10.1002/ijc.33217>
- Helzer, K. T., Szatkowski Ozers, M., Meyer, M. B., Benkusky, N. A., Solodin, N., Reese, R. M., . . . Alarid, E. T. (2019). The Phosphorylated Estrogen Receptor α (ER) Cistrome Identifies a Subset of Active Enhancers Enriched for Direct ER-DNA Binding and the Transcription Factor GRHL2. *Mol Cell Biol*, 39(3), e00417-00418. doi:10.1128/MCB.00417-18
- Hoadley, K. A., Yau, C., Hinoue, T., Wolf, D. M., Lazar, A. J., Drill, E., . . . Laird, P. W. (2018). Cell-of-Origin Patterns Dominate the Molecular Classification of 10,000 Tumors from 33 Types of Cancer. *Cell*, 173(2), 291-304.e296. doi:10.1016/j.cell.2018.03.022
- Hong, Zhou, J., Fu, J., He, T., Qin, J., Wang, L., . . . Xu, J. (2011). Phosphorylation of serine 68 of Twist1 by MAPKs stabilizes Twist1 protein and promotes breast cancer cell invasiveness. *Cancer Res*, 71(11), 3980-3990. doi:10.1158/0008-5472.Can-10-2914
- Huppi, K., Siwarski, D., Goodnight, J., & Mischak, H. (1994). Assignment of the protein kinase C delta polypeptide gene (PRKCD) to human chromosome 3 and mouse chromosome 14. *Genomics*, 19(1), 161-162. doi:10.1006/geno.1994.1028
- Inoguchi, T., Xia, P., Kunisaki, M., Higashi, S., Feener, E. P., & King, G. L. (1994). Insulin's effect on protein kinase C and diacylglycerol induced by diabetes and glucose in vascular tissues. *Am J Physiol*, 267(3 Pt 1), E369-379. doi:10.1152/ajpendo.1994.267.3.E369
- Isakov, N. (2018). Protein kinase C (PKC) isoforms in cancer, tumor promotion and tumor suppression. *Seminars in Cancer Biology*, 48, 36-52. doi:<https://doi.org/10.1016/j.semcancer.2017.04.012>
- Ishida, T., & Kinoshita, K. (2007). PrDOS: prediction of disordered protein regions from amino acid sequence. *Nucleic Acids Res*, 35(Web Server issue), W460-464. doi:10.1093/nar/gkm363
- Jackson, D. N., & Foster, D. A. (2004). The enigmatic protein kinase Cdelta: complex roles in cell proliferation and survival. *Faseb j*, 18(6), 627-636. doi:10.1096/fj.03-0979rev
- Jacobs, J., Atkins, M., Davie, K., Imrichova, H., Romanelli, L., Christiaens, V., . . . Aerts, S. (2018). The transcription factor Grainy head primes epithelial enhancers for spatiotemporal activation by displacing nucleosomes. *Nature Genetics*, 50(7), 1011-1020. doi:10.1038/s41588-018-0140-x
- Jain, N., Zhang, T., Kee, W. H., Li, W., & Cao, X. (1999). Protein Kinase C δ Associates with and Phosphorylates Stat3 in an Interleukin-6-dependent Manner *. *Journal of Biological Chemistry*, 274(34), 24392-24400. doi:10.1074/jbc.274.34.24392
- Jeanes, A., Gottardi, C. J., & Yap, A. S. (2008). Cadherins and cancer: how does cadherin dysfunction promote tumor progression? *Oncogene*, 27(55), 6920-6929. doi:10.1038/onc.2008.343

- Johnson, L. N., & Lewis, R. J. (2001). Structural basis for control by phosphorylation. *Chem Rev*, 101(8), 2209-2242. doi:10.1021/cr000225s
- Jolly, M. K., Boareto, M., Huang, B., Jia, D., Lu, M., Ben-Jacob, E., . . . Levine, H. (2015). Implications of the Hybrid Epithelial/Mesenchymal Phenotype in Metastasis. *Front Oncol*, 5, 155. doi:10.3389/fonc.2015.00155
- Jolly, M. K., Mani, S. A., & Levine, H. (2018). Hybrid epithelial/mesenchymal phenotype(s): The 'fittest' for metastasis? *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Reviews on Cancer*, 1870(2), 151-157. doi:<https://doi.org/10.1016/j.bbcan.2018.07.001>
- Jolly, M. K., Tripathi, S. C., Jia, D., Mooney, S. M., Celiktas, M., Hanash, S. M., . . . Levine, H. (2016). Stability of the hybrid epithelial/mesenchymal phenotype. *Oncotarget*, 7(19).
- Jolly, M. K., Ware, K. E., Gilja, S., Somarelli, J. A., & Levine, H. (2017). EMT and MET: necessary or permissive for metastasis? , 11(7), 755-769. doi:<https://doi.org/10.1002/1878-0261.12083>
- Kaleli, H. N., Ozer, E., Kaya, V. O., & Kutlu, O. (2020). Protein Kinase C Isozymes and Autophagy during Neurodegenerative Disease Progression. *Cells*, 9(3), 553. doi:10.3390/cells9030553
- Kalluri, R., & Weinberg, R. A. (2009). The basics of epithelial-mesenchymal transition. *J Clin Invest*, 119(6), 1420-1428. doi:10.1172/JCI39104
- Kang. (2014). Protein Kinase C (PKC) Isozymes and Cancer. *New Journal of Science*, 2014, 231418. doi:10.1155/2014/231418
- Kang, Seo, J., Yoon, H., & Cho, S. (2021). The Post-Translational Regulation of Epithelial-Mesenchymal Transition-Inducing Transcription Factors in Cancer Metastasis. *Int J Mol Sci*, 22(7). doi:10.3390/ijms22073591
- Kang, X., Chen, W., Kim, R. H., Kang, M. K., & Park, N. H. (2009). Regulation of the hTERT promoter activity by MSH2, the hnRNPs K and D, and GRHL2 in human oral squamous cell carcinoma cells. *Oncogene*, 28(4), 565-574. doi:10.1038/onc.2008.404
- Kato, Endoh, H., Masuhiro, Y., Kitamoto, T., Uchiyama, S., Sasaki, H., . . . Chambon, P. (1995). Activation of the Estrogen Receptor Through Phosphorylation by Mitogen-Activated Protein Kinase. 270(5241), 1491-1494. doi:doi:10.1126/science.270.5241.1491
- Kelley, S. O., & Pantel, K. (2020). A New Era in Liquid Biopsy: From Genotype to Phenotype. *Clin Chem*, 66(1), 89-96. doi:10.1373/clinchem.2019.303339
- Kikkawa, U., Matsuzaki, H., & Yamamoto, T. (2002). Protein Kinase C δ (PKC δ): Activation Mechanisms and Functions. *The Journal of Biochemistry*, 132(6), 831-839. doi:10.1093/oxfordjournals.jbchem.a003294 %J The Journal of Biochemistry
- Kim, Lim, J. H., Lee, T.-J., Park, J.-W., & Kwon, T. K. (2007). Expression of cyclin D3 through Sp1 sites by histone deacetylase inhibitors is mediated with protein kinase C- δ (PKC- δ) signal pathway. *J. Cell. Biochem.*, 101(4), 987-995. doi:<https://doi.org/10.1002/jcb.21316>
- Kim, M., & McGinnis, W. (2011). Phosphorylation of Grainy head by ERK is essential for wound-dependent regeneration but not for development of an epidermal barrier. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 108(2), 650-655. doi:10.1073/pnas.1016386108
- Kokoszyńska, K., Ostrowski, J., Rychlewski, L., & Wyrwicz, L. S. (2008). The fold recognition of CP2 transcription factors gives new insights into the function and evolution of tumor suppressor protein p53. *Cell Cycle*, 7(18), 2907-2915. doi:10.4161/cc.7.18.6680
- Kotarba, G., Taracha-Wisniewska, A., & Wilanowski, T. (2020). Grainyhead-like transcription factors in cancer - Focus on recent developments. *Exp Biol Med (Maywood)*, 245(5), 402-410. doi:10.1177/1535370220903009

- Krstic, J., & Santibanez, J. F. (2014). Transforming Growth Factor-Beta and Matrix Metalloproteinases: Functional Interactions in Tumor Stroma-Infiltrating Myeloid Cells. *The Scientific World Journal*, 2014, 521754. doi:10.1155/2014/521754
- Krzywinska, E., Zorawski, M. D., Taracha, A., Kotarba, G., Kikulska, A., Mlacki, M., . . . Wilanowski, T. (2018). Threonine 454 phosphorylation in Grainyhead-like 3 is important for its function and regulation by the p38 MAPK pathway. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Cell Research*, 1865(7), 1002-1011. doi:<https://doi.org/10.1016/j.bbamcr.2018.04.010>
- Laemmli, U. K. (1970). Cleavage of Structural Proteins during the Assembly of the Head of Bacteriophage T4. *Nature*, 227(5259), 680-685. doi:10.1038/227680a0
- Lahooti, H., Thorsen, T., & Aakvaag, A. (1998). Modulation of mouse estrogen receptor transcription activity by protein kinase C delta %J Journal of Molecular Endocrinology. 20(2), 245-259. doi:10.1677/jme.0.0200245
- Lambert, A. W., Pattabiraman, D. R., & Weinberg, R. A. (2017). Emerging Biological Principles of Metastasis. *Cell*, 168(4), 670-691. doi:10.1016/j.cell.2016.11.037
- Lamouille, S., Xu, J., & Derynck, R. (2014). Molecular mechanisms of epithelial–mesenchymal transition. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 15(3), 178-196. doi:10.1038/nrm3758
- Langzam, L., Koren, R., Gal, R., Kugel, V., Paz, A., Farkas, A., & Sampson, S. R. (2001). Patterns of protein kinase C isoenzyme expression in transitional cell carcinoma of bladder. Relation to degree of malignancy. *Am J Clin Pathol*, 116(3), 377-385. doi:10.1309/1vkk-hwh7-yvjn-7uf7
- Lee, D. H., & Goldberg, A. L. (1998). Proteasome inhibitors: valuable new tools for cell biologists. *Trends Cell Biol*, 8(10), 397-403. doi:10.1016/s0962-8924(98)01346-4
- Lee, J.-Y., & Kong, G. (2016). Roles and epigenetic regulation of epithelial–mesenchymal transition and its transcription factors in cancer initiation and progression. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 73(24), 4643-4660. doi:10.1007/s00018-016-2313-z
- Li, X., Huo, X., Liu, K., Li, X., Wang, M., Chu, H., . . . Zhu, B. (2013). Association between genetic variations in GRHL2 and noise-induced hearing loss in Chinese high intensity noise exposed workers: a case-control analysis. *Ind Health*, 51(6), 612-621. doi:10.2486/indhealth.2012-0084
- Li, Y., Xu, M., Ding, X., Yan, C., Song, Z., Chen, L., . . . Yang, C. (2016). Protein kinase C controls lysosome biogenesis independently of mTORC1. *Nat Cell Biol*, 18(10), 1065-1077. doi:10.1038/ncb3407
- Liu, S., Cong, Y., Wang, D., Sun, Y., Deng, L., Liu, Y., . . . Wicha, Max S. (2014). Breast Cancer Stem Cells Transition between Epithelial and Mesenchymal States Reflective of their Normal Counterparts. *Stem Cell Reports*, 2(1), 78-91. doi:10.1016/j.stemcr.2013.11.009
- Longo, P. A., Kavran, J. M., Kim, M.-S., & Leahy, D. J. (2013). Chapter Eighteen - Transient Mammalian Cell Transfection with Polyethylenimine (PEI). In J. Lorsch (Ed.), *Methods in Enzymology* (Vol. 529, pp. 227-240): Academic Press.
- Ma, L., Young, J., Prabhala, H., Pan, E., Mestdagh, P., Muth, D., . . . Weinberg, R. A. (2010). miR-9, a MYC/MYCN-activated microRNA, regulates E-cadherin and cancer metastasis. *Nat Cell Biol*, 12(3), 247-256. doi:10.1038/ncb2024
- Mackay, H. J., & Twelves, C. J. (2007). Targeting the protein kinase C family: are we there yet? *Nat Rev Cancer*, 7(7), 554-562. doi:10.1038/nrc2168
- Mani, S. A., Guo, W., Liao, M.-J., Eaton, E. N., Ayyanan, A., Zhou, A. Y., . . . Weinberg, R. A. (2008). The Epithelial-Mesenchymal Transition Generates Cells with Properties of Stem Cells. *Cell*, 133(4), 704-715. doi:10.1016/j.cell.2008.03.027

- Manning, G., Whyte, D. B., Martinez, R., Hunter, T., & Sudarsanam, S. (2002). The protein kinase complement of the human genome. *Science*, *298*(5600), 1912-1934. doi:10.1126/science.1075762
- Marrocco, V., Bogomolovas, J., Ehler, E., Dos Remedios, C. G., Yu, J., Gao, C., & Lange, S. (2019). PKC and PKN in heart disease. *Journal of molecular and cellular cardiology*, *128*, 212-226. doi:10.1016/j.yjmcc.2019.01.029
- Mauro, L. V., Grossoni, V. C., Urtreger, A. J., Yang, C., Colombo, L. L., Morandi, A., . . . Puricelli, L. L. (2010). PKC Delta (PKCdelta) promotes tumoral progression of human ductal pancreatic cancer. *Pancreas*, *39*(1), e31-41. doi:10.1097/MPA.0b013e3181bce796
- McCubrey, J. A., May, W. S., Duronio, V., & Mufson, A. (2000). Serine/threonine phosphorylation in cytokine signal transduction. *Leukemia*, *14*(1), 9-21. doi:10.1038/sj.leu.2401657
- McKiernan, E., O'Brien, K., Grebenchtchikov, N., Geurts-Moespot, A., Sieuwerts, A. M., Martens, J. W. M., . . . Duffy, M. J. (2008). Protein kinase C δ expression in breast cancer as measured by real-time PCR, western blotting and ELISA. *British Journal of Cancer*, *99*(10), 1644-1650. doi:10.1038/sj.bjc.6604728
- Mehrazarin, S., Chen, W., Oh, J.-E., Liu, Z. X., Kang, K. L., Yi, J. K., . . . Kang, M. K. (2015). The p63 Gene Is Regulated by Grainyhead-like 2 (GRHL2) through Reciprocal Feedback and Determines the Epithelial Phenotype in Human Keratinocytes. *J Biol Chem*, *290*(32), 19999-20008. doi:10.1074/jbc.M115.659144
- Ming, Q., Roske, Y., Schuetz, A., Walentin, K., Ibraimi, I., Schmidt-Ott, K. M., & Heinemann, U. (2018). Structural basis of gene regulation by the Grainyhead/CP2 transcription factor family. *Nucleic Acids Res*, *46*(4), 2082-2095. doi:10.1093/nar/gkx1299
- Mlacki, M., Kikulska, A., Krzywinska, E., Pawlak, M., & Wilanowski, T. (2015). Recent discoveries concerning the involvement of transcription factors from the Grainyhead-like family in cancer. *Exp Biol Med (Maywood)*, *240*(11), 1396-1401. doi:10.1177/1535370215588924
- Mohammed, D'Santos, C., Serandour, A. A., Ali, H. R., Brown, G. D., Atkins, A., . . . Carroll, J. S. (2013). Endogenous purification reveals GREB1 as a key estrogen receptor regulatory factor. *Cell Rep*, *3*(2), 342-349. doi:10.1016/j.celrep.2013.01.010
- Mohammed, Russell, I. A., Stark, R., Rueda, O. M., Hickey, T. E., Tarulli, G. A., . . . Carroll, J. S. (2015). Progesterone receptor modulates ER α action in breast cancer. *Nature*, *523*(7560), 313-317. doi:10.1038/nature14583
- Murray, N. R., Baumgardner, G. P., Burns, D. J., & Fields, A. P. (1993). Protein kinase C isotypes in human erythroleukemia (K562) cell proliferation and differentiation. Evidence that beta II protein kinase C is required for proliferation. *J Biol Chem*, *268*(21), 15847-15853.
- Nabha, S. M., Glaros, S., Hong, M., Lykkesfeldt, A. E., Schiff, R., Osborne, K., & Reddy, K. B. (2005). Upregulation of PKC- δ contributes to antiestrogen resistance in mammary tumor cells. *Oncogene*, *24*(19), 3166-3176. doi:10.1038/sj.onc.1208502
- Narayanan, A., & Jacobson, M. P. (2009). Computational studies of protein regulation by post-translational phosphorylation. *Current Opinion in Structural Biology*, *19*(2), 156-163. doi:<https://doi.org/10.1016/j.sbi.2009.02.007>
- Newton, A. C. (1995). Protein kinase C: structure, function, and regulation. *J Biol Chem*, *270*(48), 28495-28498. doi:10.1074/jbc.270.48.28495
- Newton, A. C. (2018). Protein kinase C: perfectly balanced. *Crit Rev Biochem Mol Biol*, *53*(2), 208-230. doi:10.1080/10409238.2018.1442408

- Nieto, Huang, Ruby Y.-J., Jackson, Rebecca A., & Thiery, Jean P. (2016). EMT: 2016. *Cell*, 166(1), 21-45. doi:<https://doi.org/10.1016/j.cell.2016.06.028>
- Nieto, M. A., Sargent, M. G., Wilkinson, D. G., & Cooke, J. (1994). Control of cell behavior during vertebrate development by Slug, a zinc finger gene. *Science*, 264(5160), 835-839. doi:10.1126/science.7513443
- Nishi, H., Hashimoto, K., & Panchenko, A. R. (2011). Phosphorylation in protein-protein binding: effect on stability and function. *Structure (London, England : 1993)*, 19(12), 1807-1815. doi:10.1016/j.str.2011.09.021
- Nishizuka, Y. (1992). Intracellular signaling by hydrolysis of phospholipids and activation of protein kinase C. *Science*, 258(5082), 607-614. doi:10.1126/science.1411571
- Nüsslein-Volhard, C., Wieschaus, E., & Kluding, H. (1984). Mutations affecting the pattern of the larval cuticle in *Drosophila melanogaster* : I. Zygotic loci on the second chromosome. *Wilhelm Roux Arch Dev Biol*, 193(5), 267-282. doi:10.1007/bf00848156
- O'Connor, L., Gilmour, J., & Bonifer, C. (2016). The Role of the Ubiquitously Expressed Transcription Factor Sp1 in Tissue-specific Transcriptional Regulation and in Disease. *The Yale journal of biology and medicine*, 89(4), 513-525.
- Obrig, T. G., Culp, W. J., McKeehan, W. L., & Hardesty, B. (1971). The mechanism by which cycloheximide and related glutarimide antibiotics inhibit peptide synthesis on reticulocyte ribosomes. *J Biol Chem*, 246(1), 174-181.
- Ono, Y., Fujii, T., Ogita, K., Kikkawa, U., Igarashi, K., & Nishizuka, Y. (1987). Identification of three additional members of rat protein kinase C family: delta-, epsilon- and zeta-subspecies. *FEBS Lett*, 226(1), 125-128. doi:10.1016/0014-5793(87)80564-1
- Orr, J. W., Keranen, L. M., & Newton, A. C. (1992). Reversible exposure of the pseudosubstrate domain of protein kinase C by phosphatidylserine and diacylglycerol. *Journal of Biological Chemistry*, 267(22), 15263-15266. doi:10.1016/S0021-9258(19)49525-2
- Orr, J. W., & Newton, A. C. (1994). Intra-peptide regulation of protein kinase C. *Journal of Biological Chemistry*, 269(11), 8383-8387. doi:[https://doi.org/10.1016/S0021-9258\(17\)37205-8](https://doi.org/10.1016/S0021-9258(17)37205-8)
- Page, K., Li, J., Corbit, K. C., Rumilla, K. M., Soh, J. W., Weinstein, I. B., . . . Hershenov, M. B. (2002). Regulation of airway smooth muscle cyclin D1 transcription by protein kinase C-delta. *Am J Respir Cell Mol Biol*, 27(2), 204-213. doi:10.1165/ajrcmb.27.2.20010016oc
- Paltoglou, S., Das, R., Townley, S. L., Hickey, T. E., Tarulli, G. A., Coutinho, I., . . . Selth, L. A. (2017). Novel Androgen Receptor Coregulator GRHL2 Exerts Both Oncogenic and Antimetastatic Functions in Prostate Cancer. *Cancer Res*, 77(13), 3417-3430. doi:10.1158/0008-5472.Can-16-1616
- Pan, X., Zhang, R., Xie, C., Gan, M., Yao, S., Yao, Y., . . . Yu, B. (2017). GRHL2 suppresses tumor metastasis via regulation of transcriptional activity of RhoG in non-small cell lung cancer. *Am J Transl Res*, 9(9), 4217-4226.
- Papadopoulos, J. S., & Agarwala, R. (2007). COBALT: constraint-based alignment tool for multiple protein sequences. *Bioinformatics*, 23(9), 1073-1079. doi:10.1093/bioinformatics/btm076 %J Bioinformatics
- Park, S.-M., Gaur, A. B., Lengyel, E., & Peter, M. E. (2008). The miR-200 family determines the epithelial phenotype of cancer cells by targeting the E-cadherin repressors ZEB1 and ZEB2. *Genes Dev*, 22(7), 894-907. doi:10.1101/gad.1640608
- Parker, P. J., Brown, S. J., Calleja, V., Chakravarty, P., Cobbaut, M., Linch, M., . . . Watson, L. (2021). Equivocal, explicit and emergent actions of PKC isoforms in cancer. *Nature Reviews Cancer*, 21(1), 51-63. doi:10.1038/s41568-020-00310-4

- Pastushenko, I., & Blanpain, C. (2019). EMT Transition States during Tumor Progression and Metastasis. *Trends Cell Biol*, 29(3), 212-226. doi:<https://doi.org/10.1016/j.tcb.2018.12.001>
- Pastushenko, I., Brisebarre, A., Sifrim, A., Fioramonti, M., Revenco, T., Boumahdi, S., . . . Blanpain, C. (2018). Identification of the tumour transition states occurring during EMT. *Nature*, 556(7702), 463-468. doi:10.1038/s41586-018-0040-3
- Pattabiraman, D. R., Bierie, B., Kober, K. I., Thiru, P., Krall, J. A., Zill, C., . . . Weinberg, R. A. (2016). Activation of PKA leads to mesenchymal-to-epithelial transition and loss of tumor-initiating ability. 351(6277), aad3680. doi:10.1126/science.aad3680 %J Science
- Pećina-Slaus, N. (2003). Tumor suppressor gene E-cadherin and its role in normal and malignant cells. *Cancer Cell Int*, 3(1), 17. doi:10.1186/1475-2867-3-17
- Peinado, H., Olmeda, D., & Cano, A. (2007). Snail, Zeb and bHLH factors in tumour progression: an alliance against the epithelial phenotype? *Nature Reviews Cancer*, 7(6), 415-428. doi:10.1038/nrc2131
- Peters, L. M., Anderson, D. W., Griffith, A. J., Grundfast, K. M., San Agustin, T. B., Madeo, A. C., . . . Morell, R. J. (2002). Mutation of a transcription factor, TFCP2L3, causes progressive autosomal dominant hearing loss, DFNA28. *Hum Mol Genet*, 11(23), 2877-2885. doi:10.1093/hmg/11.23.2877
- Pifer, P. M., Farris, J. C., Thomas, A. L., Stoilov, P., Denvir, J., Smith, D. M., & Frisch, S. M. (2016). Grainyhead-like 2 inhibits the coactivator p300, suppressing tubulogenesis and the epithelial-mesenchymal transition. *Mol Biol Cell*, 27(15), 2479-2492. doi:10.1091/mbc.E16-04-0249
- Pinna, L. A., & Ruzzene, M. (1996). How do protein kinases recognize their substrates? *Biochim Biophys Acta*, 1314(3), 191-225. doi:10.1016/s0167-4889(96)00083-3
- Ponassi, R., Terrinoni, A., Chikh, A., Rufini, A., Lena, A. M., Sayan, B. S., . . . Candi, E. (2006). p63 and p73, members of the p53 gene family, transactivate PKCdelta. *Biochem Pharmacol*, 72(11), 1417-1422. doi:10.1016/j.bcp.2006.07.031
- Puisieux, A., Brabletz, T., & Caramel, J. (2014). Oncogenic roles of EMT-inducing transcription factors. *Nat Cell Biol*, 16(6), 488-494. doi:10.1038/ncb2976
- Pyrgaki, C., Liu, A., & Niswander, L. (2011). Grainyhead-like 2 regulates neural tube closure and adhesion molecule expression during neural fold fusion. *Dev Biol*, 353(1), 38-49. doi:10.1016/j.ydbio.2011.02.027
- Quan, Jin, R., Huang, A., Zhao, H., Feng, B., Zang, L., & Zheng, M. (2014). Downregulation of GRHL2 inhibits the proliferation of colorectal cancer cells by targeting ZEB1. *Cancer biology & therapy*, 15(7), 878-887. doi:10.4161/cbt.28877
- Quan, Xu, M., Cui, P., Ye, M., Zhuang, B., & Min, Z. (2015). Grainyhead-like 2 Promotes Tumor Growth and is Associated with Poor Prognosis in Colorectal Cancer. *J Cancer*, 6(4), 342-350. doi:10.7150/jca.10969
- Recasens, A., & Munoz, L. (2019). Targeting Cancer Cell Dormancy. *Trends in Pharmacological Sciences*, 40(2), 128-141. doi:10.1016/j.tips.2018.12.004
- Rechsteiner, M. (1990). PEST sequences are signals for rapid intracellular proteolysis. *Semin Cell Biol*, 1(6), 433-440.
- Rechsteiner, M., & Rogers, S. W. (1996). PEST sequences and regulation by proteolysis. *Trends Biochem Sci*, 21(7), 267-271.
- Reddy, K. B., Nabha, S., Glaros, S., & Meng, H. (2005). Overexpression of PKC-delta in mammary cells leads to anti-estrogen resistance: A new model for anti-estrogen resistance. 65(9 Supplement), 300-300.

- Reese, R. M., Harrison, M. M., & Alarid, E. T. (2019). Grainyhead-like Protein 2: The Emerging Role in Hormone-Dependent Cancers and Epigenetics. *Endocrinology*, *160*(5), 1275-1288. doi:10.1210/en.2019-00213
- Reyland, M. E. (2009). Protein kinase C isoforms: Multi-functional regulators of cell life and death. *Frontiers in bioscience (Landmark edition)*, *14*, 2386-2399. doi:10.2741/3385
- Riethdorf, S., Frey, S., Santjer, S., Stoupiet, M., Otto, B., Riethdorf, L., . . . Assmann, V. (2016). Diverse expression patterns of the EMT suppressor grainyhead-like 2 (GRHL2) in normal and tumour tissues. *Int J Cancer*, *138*(4), 949-963. doi:10.1002/ijc.29841
- Rifat, Y., Parekh, V., Wilanowski, T., Hislop, N. R., Auden, A., Ting, S. B., . . . Jane, S. M. (2010). Regional neural tube closure defined by the Grainy head-like transcription factors. *Dev Biol*, *345*(2), 237-245. doi:10.1016/j.ydbio.2010.07.017
- Roca, H., Hernandez, J., Weidner, S., McEachin, R. C., Fuller, D., Sud, S., . . . Pienta, K. J. (2013). Transcription factors OVOL1 and OVOL2 induce the mesenchymal to epithelial transition in human cancer. *PLoS One*, *8*(10), e76773. doi:10.1371/journal.pone.0076773
- Rogers, S., Wells, R., & Rechsteiner, M. (1986). Amino acid sequences common to rapidly degraded proteins: the PEST hypothesis. *234*(4774), 364-368. doi:10.1126/science.2876518 %J Science
- Ross-Innes, C. S., Stark, R., Teschendorff, A. E., Holmes, K. A., Ali, H. R., Dunning, M. J., . . . Carroll, J. S. (2012). Differential oestrogen receptor binding is associated with clinical outcome in breast cancer. *Nature*, *481*(7381), 389-393. doi:10.1038/nature10730
- Rudolph, M. J., & Gergen, J. P. (2001). DNA-binding by Ig-fold proteins. *Nature Structural Biology*, *8*(5), 384-386. doi:10.1038/87531
- Salzer, E., Santos-Valente, E., Keller, B., Warnatz, K., & Boztug, K. (2016). Protein Kinase C δ : a Gatekeeper of Immune Homeostasis. *Journal of clinical immunology*, *36*(7), 631-640. doi:10.1007/s10875-016-0323-0
- Sanger F, C. A. R. (1975). A Rapid Method for Determining Sequences in DNA by Primed Synthesis with DNA Polymerase *Journal of Molecular Biology*, *94*, 441-448
- Satoh, A., Gukovskaya, A. S., Nieto, J. M., Cheng, J. H., Gukovsky, I., Reeve, J. R., Jr., . . . Pandol, S. J. (2004). PKC-delta and -epsilon regulate NF-kappaB activation induced by cholecystokinin and TNF-alpha in pancreatic acinar cells. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*, *287*(3), G582-591. doi:10.1152/ajpgi.00087.2004
- Savagner, P., & Arnoux, V. (2009). [Epithelio-mesenchymal transition and cutaneous wound healing]. *Bull Acad Natl Med*, *193*(9), 1981-1991; discussion 1992.
- Scheel, C., & Weinberg, R. A. (2012). Cancer stem cells and epithelial–mesenchymal transition: Concepts and molecular links. *Seminars in Cancer Biology*, *22*(5), 396-403. doi:<https://doi.org/10.1016/j.semcancer.2012.04.001>
- Senga, K., Mostov, K. E., Mitaka, T., Miyajima, A., & Tanimizu, N. (2012). Grainyhead-like 2 regulates epithelial morphogenesis by establishing functional tight junctions through the organization of a molecular network among claudin3, claudin4, and Rab25. *Mol Biol Cell*, *23*(15), 2845-2855. doi:10.1091/mbc.E12-02-0097
- Shen, J., Lv, X., & Zhang, L. (2020). GRHL2 Acts as an Anti-Oncogene in Bladder Cancer by Regulating ZEB1 in Epithelial-Mesenchymal Transition (EMT) Process. *OncoTargets and therapy*, *13*, 2511-2522. doi:10.2147/OTT.S239120
- Shirra, M. K., & Hansen, U. (1998). LSF and NTF-1 Share a Conserved DNA Recognition Motif yet Require Different Oligomerization States to Form a Stable Protein-DNA Complex *. *Journal of Biological Chemistry*, *273*(30), 19260-19268. doi:10.1074/jbc.273.30.19260

- Simpson, C. D., Anyiwe, K., & Schimmer, A. D. (2008). Anoikis resistance and tumor metastasis. *Cancer Letters*, 272(2), 177-185. doi:<https://doi.org/10.1016/j.canlet.2008.05.029>
- Singh, G. P., Ganapathi, M., Sandhu, K. S., & Dash, D. (2006). Intrinsic unstructuredness and abundance of PEST motifs in eukaryotic proteomes. 62(2), 309-315. doi:<https://doi.org/10.1002/prot.20746>
- Steinberg. (2004). Distinctive activation mechanisms and functions for protein kinase Cdelta. *Biochem J*, 384(Pt 3), 449-459. doi:10.1042/bj20040704
- Steinberg. (2015). Mechanisms for redox-regulation of protein kinase C. 6(128). doi:10.3389/fphar.2015.00128
- Stone, R. C., Pastar, I., Ojeh, N., Chen, V., Liu, S., Garzon, K. I., & Tomic-Canic, M. (2016). Epithelial-mesenchymal transition in tissue repair and fibrosis. *Cell Tissue Res*, 365(3), 495-506. doi:10.1007/s00441-016-2464-0
- Su, Xie, T. X., Sano, D., & Myers, J. N. (2011). IL-6 stabilizes Twist and enhances tumor cell motility in head and neck cancer cells through activation of casein kinase 2. *PLoS One*, 6(4), e19412. doi:10.1371/journal.pone.0019412
- Sundararajan, V., Pang, Q. Y., Choolani, M., & Huang, R. Y. (2020). Spotlight on the Granules (Grainyhead-Like Proteins) - From an Evolutionary Conserved Controller of Epithelial Trait to Pioneering the Chromatin Landscape. *Front Mol Biosci*, 7, 213. doi:10.3389/fmolb.2020.00213
- Talman, Pascale, A., Jääntti, M., Amadio, M., & Tuominen, R. K. (2016). Protein Kinase C Activation as a Potential Therapeutic Strategy in Alzheimer's Disease: Is there a Role for Embryonic Lethal Abnormal Vision-like Proteins? , 119(2), 149-160. doi:<https://doi.org/10.1111/bcpt.12581>
- Tanaka, Y., Kanai, F., Tada, M., Tateishi, R., Sanada, M., Nannya, Y., . . . Omata, M. (2008). Gain of GRHL2 is associated with early recurrence of hepatocellular carcinoma. *J Hepatol*, 49(5), 746-757. doi:10.1016/j.jhep.2008.06.019
- Taube, J. H., Herschkowitz, J. I., Komurov, K., Zhou, A. Y., Gupta, S., Yang, J., . . . Mani, S. A. (2010). Core epithelial-to-mesenchymal transition interactome gene-expression signature is associated with claudin-low and metaplastic breast cancer subtypes. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 107(35), 15449-15454. doi:10.1073/pnas.1004900107
- Thankamony, A. P., Saxena, K., Murali, R., Jolly, M. K., & Nair, R. (2020). Cancer Stem Cell Plasticity - A Deadly Deal. *Front Mol Biosci*, 7, 79. doi:10.3389/fmolb.2020.00079
- Thiery, J. P., Duband, J. L., Rutishauser, U., & Edelman, G. M. (1982). Cell adhesion molecules in early chicken embryogenesis. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 79(21), 6737-6741. doi:10.1073/pnas.79.21.6737
- Ting, S. B., Wilanowski, T., Cerruti, L., Zhao, L. L., Cunningham, J. M., & Jane, S. M. (2003). The identification and characterization of human Sister-of-Mammalian Grainyhead (SOM) expands the grainyhead-like family of developmental transcription factors. *Biochem J*, 370(Pt 3), 953-962. doi:10.1042/bj20021476
- Torres-Reyes, L. A., Alvarado-Ruiz, L., Piña-Sánchez, P., Martínez-Silva, M. G., Ramos-Solano, M., Olimón-Andalón, V., . . . Jave-Suarez, L. F. (2014). Expression of transcription factor grainyhead-like 2 is diminished in cervical cancer. *Int J Clin Exp Pathol*, 7(11), 7409-7418.
- Traylor-Knowles, N., Hansen, U., Dubuc, T. Q., Martindale, M. Q., Kaufman, L., & Finnerty, J. R. (2010). The evolutionary diversification of LSF and Grainyhead transcription factors preceded the radiation of basal animal lineages. *BMC Evol Biol*, 10, 101. doi:10.1186/1471-2148-10-101

- Tsai, P. F., Lin, S. J., Weng, P. L., Tsai, S. C., Lin, J. H., Chou, Y. C., & Tsai, C. H. (2011). Interplay between PKC δ and Sp1 on histone deacetylase inhibitor-mediated Epstein-Barr virus reactivation. *J Virol*, *85*(5), 2373-2385. doi:10.1128/jvi.01602-10
- Uddin, S., Sassano, A., Deb, D. K., Verma, A., Majchrzak, B., Rahman, A., . . . Platanias, L. C. (2002). Protein Kinase C δ (PKC δ) Is Activated by Type I Interferons and Mediates Phosphorylation of Stat1 on Serine 727 *. *Journal of Biological Chemistry*, *277*(17), 14408-14416. doi:10.1074/jbc.M109671200
- Uhlen, M., Zhang, C., Lee, S., Sjöstedt, E., Fagerberg, L., Bidkhor, G., . . . Ponten, F. (2017). A pathology atlas of the human cancer transcriptome. *Science*, *357*(6352). doi:10.1126/science.aan2507
- Uv, A. E., Harrison, E. J., & Bray, S. J. (1997). Tissue-specific splicing and functions of the Drosophila transcription factor Grainyhead. *Mol Cell Biol*, *17*(11), 6727-6735. doi:10.1128/mcb.17.11.6727
- Van Laer, L., Van Eyken, E., Fransen, E., Huyghe, J. R., Topsakal, V., Hendrickx, J. J., . . . Van Camp, G. (2008). The grainyhead like 2 gene (GRHL2), alias TFPC2L3, is associated with age-related hearing impairment. *Hum Mol Genet*, *17*(2), 159-169. doi:10.1093/hmg/ddm292
- Vanharanta, S., & Massagué, J. (2013). Origins of metastatic traits. *Cancer Cell*, *24*(4), 410-421. doi:10.1016/j.ccr.2013.09.007
- Varga, A., Czifra, G., Tállai, B., Németh, T., Kovács, I., Kovács, L., & Bíró, T. (2004). Tumor grade-dependent alterations in the protein kinase C isoform pattern in urinary bladder carcinomas. *Eur Urol*, *46*(4), 462-465. doi:10.1016/j.eururo.2004.04.014
- Varma, S., Cao, Y., Tagne, J. B., Lakshminarayanan, M., Li, J., Friedman, T. B., . . . Ramirez, M. I. (2012). The transcription factors Grainyhead-like 2 and NK2-homeobox 1 form a regulatory loop that coordinates lung epithelial cell morphogenesis and differentiation. *J Biol Chem*, *287*(44), 37282-37295. doi:10.1074/jbc.M112.408401
- Varshavsky, A. (2019). N-degron and C-degron pathways of protein degradation. *Proc Natl Acad Sci U S A*, *116*(2), 358-366. doi:10.1073/pnas.1816596116
- Venkatesan, K., McManus, H. R., Mello, C. C., Smith, T. F., & Hansen, U. (2003). Functional conservation between members of an ancient duplicated transcription factor family, LSF/Grainyhead. *Nucleic Acids Res*, *31*(15), 4304-4316. doi:10.1093/nar/gkg644 %J Nucleic Acids Research
- Vona, B., Nanda, I., Neuner, C., Müller, T., & Haaf, T. (2013). Confirmation of GRHL2 as the gene for the DFNA28 locus. *Am J Med Genet A*, *161a*(8), 2060-2065. doi:10.1002/ajmg.a.36017
- Walentin, K., Hinze, C., Werth, M., Haase, N., Varma, S., Morell, R., . . . Schmidt-Ott, K. M. (2015). A Grhl2-dependent gene network controls trophoblast branching morphogenesis. *Development*, *142*(6), 1125-1136. doi:10.1242/dev.113829
- Wang, S., & Samakovlis, C. (2012). Chapter two - Grainy Head and Its Target Genes in Epithelial Morphogenesis and Wound Healing. In S. Plaza & F. Payre (Eds.), *Current Topics in Developmental Biology* (Vol. 98, pp. 35-63): Academic Press.
- Watanabe, K., Villarreal-Ponce, A., Sun, P., Salmans, M. L., Fallahi, M., Andersen, B., & Dai, X. (2014). Mammary morphogenesis and regeneration require the inhibition of EMT at terminal end buds by Ovol2 transcriptional repressor. *Dev Cell*, *29*(1), 59-74. doi:10.1016/j.devcel.2014.03.006
- Webb, B. L., Hirst, S. J., & Giembycz, M. A. (2000). Protein kinase C isoenzymes: a review of their structure, regulation and role in regulating airways smooth muscle tone and mitogenesis. *British journal of pharmacology*, *130*(7), 1433-1452. doi:10.1038/sj.bjp.0703452

- Werner, S., Frey, S., Riethdorf, S., Schulze, C., Alawi, M., Kling, L., . . . Assmann, V. (2013). Dual roles of the transcription factor grainyhead-like 2 (GRHL2) in breast cancer. *J Biol Chem*, 288(32), 22993-23008. doi:10.1074/jbc.M113.456293
- Werth, M., Walentin, K., Aue, A., Schönheit, J., Wuebken, A., Pode-Shakked, N., . . . Schmidt-Ott, K. M. (2010). The transcription factor grainyhead-like 2 regulates the molecular composition of the epithelial apical junctional complex. *Development*, 137(22), 3835-3845. doi:10.1242/dev.055483
- Wilanowski, T., Tuckfield, A., Cerruti, L., O'Connell, S., Saint, R., Parekh, V., . . . Jane, S. M. (2002). A highly conserved novel family of mammalian developmental transcription factors related to *Drosophila* grainyhead. *Mech Dev*, 114(1-2), 37-50. doi:10.1016/s0925-4773(02)00046-1
- Wilanowski, T., Tuckfield, A., Cerruti, L., O'Connell, S., Saint, R., Parekh, V., . . . Jane, S. M. (2002). A highly conserved novel family of mammalian developmental transcription factors related to *Drosophila* grainyhead. *Mech Dev*, 114(1), 37-50. doi:[https://doi.org/10.1016/S0925-4773\(02\)00046-1](https://doi.org/10.1016/S0925-4773(02)00046-1)
- Xiang, Deng, Z., Zhuang, X., Ju, S., Mu, J., Jiang, H., . . . Zhang, H. G. (2012). Grhl2 determines the epithelial phenotype of breast cancers and promotes tumor progression. *PLoS One*, 7(12), e50781. doi:10.1371/journal.pone.0050781
- Xiang, Fu, X., Ran, W., & Wang, Z. (2017). Grhl2 reduces invasion and migration through inhibition of TGF β -induced EMT in gastric cancer. *Oncogenesis*, 6(1), e284-e284. doi:10.1038/oncsis.2016.83
- Xu, Y., Lee, S. H., Kim, H. S., Kim, N. H., Piao, S., Park, S. H., . . . Ha, N. C. (2010). Role of CK1 in GSK3 β -mediated phosphorylation and degradation of Snail. *Oncogene*, 29(21), 3124-3133. doi:10.1038/onc.2010.77
- Yang, Antin, P., Berx, G., Blanpain, C., Brabletz, T., Bronner, M., . . . On behalf of the, E. M. T. I. A. (2020). Guidelines and definitions for research on epithelial–mesenchymal transition. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 21(6), 341-352. doi:10.1038/s41580-020-0237-9
- Yang, Langston, J. C., Tang, Y., Kiani, M. F., & Kilpatrick, L. E. (2019). The Role of Tyrosine Phosphorylation of Protein Kinase C Delta in Infection and Inflammation. 20(6), 1498.
- Yang, X., Vasudevan, P., Parekh, V., Penev, A., & Cunningham, J. M. (2013). Bridging cancer biology with the clinic: relative expression of a GRHL2-mediated gene-set pair predicts breast cancer metastasis. *PLoS One*, 8(2), e56195. doi:10.1371/journal.pone.0056195
- Yang, Z., Rayala, S., Nguyen, D., Vadlamudi, R. K., Chen, S., & Kumar, R. (2005). Pak1 Phosphorylation of Snail, a Master Regulator of Epithelial-to-Mesenchyme Transition, Modulates Snail's Subcellular Localization and Functions. 65(8), 3179-3184. doi:10.1158/0008-5472.CAN-04-3480 %J Cancer Research
- Yeung, K. T., & Yang, J. (2017). Epithelial-mesenchymal transition in tumor metastasis. *Mol Oncol*, 11(1), 28-39. doi:10.1002/1878-0261.12017
- Yin, S., Sethi, S., & Reddy, K. B. (2010). Protein kinase C δ and caspase-3 modulate TRAIL-induced apoptosis in breast tumor cells. *J Cell Biochem*, 111(4), 979-987. doi:10.1002/jcb.22786
- Yoshida, K., Liu, H., & Miki, Y. (2006). Protein kinase C delta regulates Ser46 phosphorylation of p53 tumor suppressor in the apoptotic response to DNA damage. *J Biol Chem*, 281(9), 5734-5740. doi:10.1074/jbc.M512074200
- Zabarovsky, E. R., Lerman, M. I., & Minna, J. D. (2002). Tumor suppressor genes on chromosome 3p involved in the pathogenesis of lung and other cancers. *Oncogene*, 21(45), 6915-6935. doi:10.1038/sj.onc.1205835

- Zaret, K. S., & Carroll, J. S. (2011). Pioneer transcription factors: establishing competence for gene expression. *Genes Dev*, 25(21), 2227-2241. doi:10.1101/gad.176826.111
- Zeisberg, M., & Neilson, E. G. (2009). Biomarkers for epithelial-mesenchymal transitions. *J Clin Invest*, 119(6), 1429-1437. doi:10.1172/jci36183
- Zhang, Liu, N., Zhang, J., Liu, S., Liu, Y., & Zheng, D. (2005). PKC δ protects human breast tumor MCF-7 cells against tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand-mediated apoptosis. *96*(3), 522-532. doi:<https://doi.org/10.1002/jcb.20535>
- Zhang, Liu, Y., Zhang, L., Yang, Z., Yang, L., Wang, X., . . . Zhu, Y. (2015). Associations of genetic variations in EYA4, GRHL2 and DFNA5 with noise-induced hearing loss in Chinese population: a case- control study. *Environmental Health*, 14(1), 77. doi:10.1186/s12940-015-0063-2
- Zhang, Rodriguez-Aznar, E., Yabuta, N., Owen, R. J., Mingot, J. M., Nojima, H., . . . Longmore, G. D. (2012). Lats2 kinase potentiates Snail1 activity by promoting nuclear retention upon phosphorylation. *31*(1), 29-43. doi:<https://doi.org/10.1038/emboj.2011.357>
- Zhang, D., Fu, M., Li, L., Ye, H., Song, Z., & Piao, Y. (2017). PKC- δ attenuates the cancer stem cell among squamous cell carcinoma cells through down-regulating p63. *Pathology - Research and Practice*, 213(9), 1119-1124. doi:<https://doi.org/10.1016/j.prp.2017.07.013>
- Zhang, J., & Ma, L. (2012). MicroRNA control of epithelial–mesenchymal transition and metastasis. *Cancer and Metastasis Reviews*, 31(3), 653-662. doi:10.1007/s10555-012-9368-6
- Zhou, B. P., Deng, J., Xia, W., Xu, J., Li, Y. M., Gunduz, M., & Hung, M.-C. (2004). Dual regulation of Snail by GSK-3 β -mediated phosphorylation in control of epithelial–mesenchymal transition. *Nat Cell Biol*, 6(10), 931-940. doi:10.1038/ncb1173

9. Anhang

9.1. Laborgeräte

Tabelle 9-1: Verwendete Laborgeräte

Gerätebezeichnung	Hersteller
Analysenwaage Sartorius BP610	MS Laborgeräte, Heidelberg
Analysenwaage Sartorius CP2245	MS Laborgeräte, Heidelberg
Biofuge pico Heraeus	Kendro, Langenselbold
Biophotometer 6131	Eppendorf AG, Hamburg
CFX96 Touch™ Real-Time System	Bio-Rad, München
CO ₂ -Inkubator Heracell 150	Kendro, Langenselbold
Einkanalpipetten 2,5 µl, 10 µl, 100 µl, 200 µl, 1000 µl	Eppendorf AG, Hamburg
Filmentwickler Curix 60	AGFA HealthCare GmbH, Bonn
Gelapparatur ComPhor L Mini/Midi	Bioplastics RV, Landgraaf (NL)
Gelapparatur Hoefer SE250	Amersham Biosciences, Buckinghamshire (UK)
Geldokumentationssystem GeneGenius 2	Syngene, Cambridge (UK)
Gießstand Hoefer	Amersham Biosciences, Buckinghamshire (UK)
Heizblock DRI-BLOCK® DB-2A	Techne, Staffordshire (UK)
Inverses Labormikroskop DM IL LED	Leica Mikrosysteme Vertrieb GmbH, Wetzlar
Kühlzentrifuge 5415R	Eppendorf AG, Hamburg
NanoDrop ND-1000	Thermo Fisher Scientific
Pipettierhilfe pipetus®	Hirschmann Laborgeräte, Eberstadt
Powersupply E143	Consort, Turnhout (BE)
Powersupply E835	Consort, Turnhout (BE)
Rollenmischer Stuart bSRT1	Bibby Scientific, Staffordshire (UK)
Schüttler	GmbH für Labortechnik, Burgwedel
<i>Semi-dry</i> Blotapparatur	Bio-Rad, München
Sicherheitswerkbank HeraSafe 150	Kendro, Langenselbold
Thermocycler Flexigene	Techne, Staffordshire (UK)
Tischschüttler Certomat R	B. Braun Biotech, Melsungen
Vortex-Genie 2	Scientific Industries, New York (USA)
Wärme- und Trockenschrank	Kendro, Langenselbold

Heraeus Function Line B12	
Wasserbad GFL-1003	GmbH für Labortechnik, Burgwedel
Zentrifuge Multifuge Heraeus 3S-R	Kendro, Langenselbold
Zentrifuge Rotofix 32	Hettich, Villingen-Schwenningen

9.2. Verbrauchsmaterialien

Tabelle 9-2: Verwendete Verbrauchsmaterialien

Name	Hersteller
6-Loch-Platte	Sarstedt, Nümbrecht
Einmalspritzen 5 ml	Cecton Dickinson, Heidelberg
<i>Hard-Shell® PCR Plate</i> (96-well, thin-wall)	Bio-Rad Laboratories
Immobilon®-P PVDF Blotting Membran (Porengröße: 0,45 µm)	EMD Millipore, Schwalbach
Klebefolie Microseal ®	Bio-Rad Laboratories
Kryoröhrchen	Thermo Fischer Scientific
Nitrozellulose Blotting Membran (Porengröße: 0.45 µm)	GE Healthcare, Dassel
Pipettenspitzen 10 µl, 200 µl, 1000 µl	Sarstedt, Nümbrecht
Protein LoBind Röhrchen (1,5 ml)	Eppendorf, Hamburg
Serologische Pipetten 2 ml, 5 ml, 10 ml	Sarstedt, Nümbrecht
Spritzenvorsatzfilter (Millex®-HV, Steril Filter Unit; Porengröße 0,45 µm)	EMD Millipore, Schwalbach
TC-Flasche T25, T75	Sarstedt, Nümbrecht
UV-transparente Einmalküvetten	Sarstedt, Nümbrecht
Whatman-Filter	GE Healthcare, Dassel
X-Ray Film Super RX	Fujifilm, Willich
Zentrifugenröhrchen 15 ml, 50 ml	Greiner Bio-One, Frickenhausen

9.3. Chemikalien

Tabelle 9-3: Verwendete Chemikalien, Reagenzien und Kits

Name	Hersteller
Ampicillin	Roth, Karlsruhe
Bacto-Agar	Becton Dickinson, Heidelberg
Bacto-Trypton	Becton Dickinson, Heidelberg
Big Dye [®] Terminator Cycle Sequencing Kit (Applied Biosystems)	Thermo Fisher Scientific
<i>Bovine serum albumin</i> (BSA)	Biomol, Hamburg
Bradford-Reagenz	Bio-Rad Laboratories
Brij35	Sigma-Aldrich
Bromphenolblau	Sigma-Aldrich
<i>DC Protein Assay Kit</i>	Bio-Rad Laboratories
Dimethylsulfoxid	SERVA, Heidelberg
Ethanol	Merck, Darmstadt
Ethylendiamintetraessigsäure	Sigma-Aldrich
<i>Fetal calf serum</i> (FCS)	Gibco [®] , Eggenstein
Hefeextrakt	Becton Dickinson, Heidelberg
Hyper Ladder I	BioLine, Hildesheim
Isopropanol	Merck, Darmstadt
LE Agarose	Genaxxon bioscience, Ulm
Lipofectamine [™] 3000 (Invitrogen)	Thermo Fisher Scientific
Luminol	Sigma-Aldrich
Methanol	J.T. Baker, Deventer (NE)
Milchpulver	Roth, Karlsruhe
Neon [™] Transfection System Kit (100 µl)	ThermoFisher Scientific (Invitrogen)
Nonident-P-40	Roche Diagnostics, Basel
<i>NucleoBond[®] Xtra Midi Kit</i>	Macherey-Nagel, Düren
<i>NucleoSpin[®] Gel and PCR clean-up Kit</i>	Macherey-Nagel, Düren
<i>NucleoSpin[®] Plasmid DNA Mini Kit</i>	Macherey-Nagel, Düren
<i>NucleoSpin[®] RNA Kit</i>	Macherey-Nagel, Düren
p-Cumarinsäure	Sigma-Aldrich
<i>Phosphate buffered saline</i> (PBS)	Gibco [®] , Eggenstein
Polybrene	Sigma-Aldrich
Polyethylenimin	Polysciences, Warrington (UK)
ProtoGel [®]	National Diagnostics, Hessisch Oldendorf

Puromycin	PAA Laboratories
<i>Sodiumdodecylsulfate</i> (SDS)	Roth, Karlsruhe
SYBRGreen/Rox qPCR Master Mix (2X)	Thermo Fisher Scientific
Tetramethylethylendiamin (TEMED)	Merck, Darmstadt
Tris-EDTA (pH 8,0)	Sigma-Aldrich
Tween-20	Sigma-Aldrich
Wasserstoffperoxid 30 %	Merck, Darmstadt

9.4. Expressionsplasmide

Tabelle 9-4: Verwendete Expressionsplasmide

Nr.	Code	Name	Primer <i>up</i>	Primer <i>do</i>	Abschnitt
1	P36	pMXs-IP-GRHL2-WT/SG-HAtag	1	2	6.1.1., 6.1.3.-6.1.6.
2	VA-193	pMXs-IP-GRHL2-T164A/SG-HAtag	1	2	6.1.1.
3	P37	pMXs-IP-GRHL2-T211A/SG-HAtag	1	2	6.1.1.
4	VA-194	pMXs-IP-GRHL2-S557A/SG-HAtag	1	2	6.1.1.
5	V38	phCMV2-HA-EGFP	3	4	6.1.2.
6	VA-40	phCMV2-HA-EGFP-PEST	5	6	6.1.2.
7	VA-13	phCMV2-HA-EGFP-PEST+10	7	8	6.1.2.
8	VA-14	phCMV2-HA-EGFP-PEST+20	7	8	6.1.2.
9	VA-15	phCMV2-HA-EGFP-PEST+30	9	10	6.1.2.
10	VA-16	phCMV2-HA-EGFP-PEST+45	11	12	6.1.2.
11	VA-37	phCMV2-HA-EGFP-PEST+60	13	14	6.1.2.
12	VA-38	phCMV2-HA-EGFP-PEST+75	15	16	6.1.2.
13	VA-17	phCMV2-HA-EGFP-c-Fos	17	18	6.1.2.
14	VA-75	pMXs-IP-GRHL2-S210A/SG-HAtag	1	2	6.1.3.-6.1.5.
15	VA-76	pMXs-IP-GRHL2-P212A/SG-HAtag	1	2	6.1.3.
16	VA-77	pMXs-IP-GRHL2-D213A/SG-HAtag	1	2	6.1.3.
17	62	pMXs-IP-GRHL2-S214A/SG-HAtag	1	2	6.1.3.-6.1.5.
18	58	pMXs-IP-GRHL2-T215A/SG-HAtag	1	2	6.1.3.
19	VA-78	pMXs-IP-GRHL2-Y216A/SG-HAtag	1	2	6.1.3.
20	VA-79	pMXs-IP-GRHL2-S217A/SG-HAtag	1	2	6.1.3.

21	63	pMXs-IP-GRHL2-E218A/SG-HAtag	1	2	6.1.3.
22	64	pMXs-IP-GRHL2-S219A/SG-HAtag	1	2	6.1.3.
23	VA-80	pMXs-IP-GRHL2-F220A/SG-HAtag	1	2	6.1.3.
24	VA-31	pMXs-IP-GRHL2-His ₆	1	19	6.1.4.

9.5. Oligonukleotide

Tabelle 9-5: Für die cDNA-Amplifikation verwendete Oligonukleotide

Nr.	Code	up/ do	Sequenz (5' → 3')	Enzym	Plasmid
1	GRHL2-13	up	GCGCATCGTAAGATCTGGATCAAA CATGTACAAGAGTCG	Bgl II	1-4, 14-24
2	GRHL2-12	do	GCGCTACAGCGGCCGCTTAAGCG TAATCCGGAACATCGTATGGGTAG GATCCGATTTCCATGAGCGTGACC TTGAAGC	Not I	1-4, 14-24
3	VA-EGFP-1	up	GCGCATCGGATCCGAGCAAGGGC GAGGAGCTGTTCACC	BamH I	5
4	VA-EGFP-2	do	GCGCATCGGATCCCTACCGTCGA CTGCAGAATTTCGAAGC	BamH I	5
5	VA-GRHL2-29	up	GCGCATCCTCGAGCAAGCGGGAA CAGTACAGCATCAGC	Xho I	6
6	VA-GRHL2-30	do	GCGCATCAAGCTTCTATTTGCTGA TGGGGTGTTCGAAGC	Hind III	6
7	VA-GRHL2-9	up	GCGCATCCTCGAGCCACAGCGCC TATCTCAAAGACG	Xho I	7
8	VA-GRHL2-10	do	GCGCATCAAGCTTCTAACTCCGAA ATTTCTCTGTGGCTGC	Hind III	7
9	VA-GRHL2-11	up	GCGCATCCTCGAGGACTCAGTAT GACGTGCCCTCGC	Xho I	9
10	VA-GRHL2-12	do	GCGCATCAAGCTTCTAATACATGT ACTCCTCAGCCCC	Hind III	9
11	VA-GRHL2-13	up	GCGCATCCTCGAGGGAAGAGCAA CGAGTGGTTATC	Xho I	10
12	VA-GRHL2-14	do	GCGCATCAAGCTTCTAGTACTGAA ATGTGCCACTTGATG	Hind III	10
13	VA-GRHL2-25	up	GCGCATCCTCGAGACCAGTTTTCA TGGCCCCACCTGTGC	Xho I	11

Anhang

14	VA-GRHL2-26	do	GCGCATCAAGCTTCTAGCCCTCC CCCTGCTTCTGACG	Hind III	11
15	VA-GRHL2-27	up	GCGCATCCTCGAGCATCCCGGTG TCGGGAATCACG	Xho I	12
16	VA-GRHL2-28	do	GCGCATCAAGCTTCTAGAGTGTTA TGGCATAGAACTGTCC	Hind III	12
17	VA-cFOS-1	up	GCGCATCCTCGAGGCCTCTGCAC AGTGGCTCCCTGG	Xho I	13
18	VA-cFOS-2	do	GCGCATCAAGCTTCCTCTAGGGA AGATGTGTTTCTCC	Hind III	13
19	VA-GRHL2-24	do	GCGCTACAGCGGCCGCTTAATGA TGATGATGATGATGGGATCCGATT TCCATGAGCGTGACCTTGAAGC	Not I	24

Tabelle 9-6: Für die Mutagenese verwendete Oligonukleotide

Mutation	Code	up/ do	Sequenz (5' → 3')
T164A	GRHL2 T164Aup	up	GGTGAAAGCTGAAGATTTTCGCACCAGTTTTTCATG GCCCCACC
	GRHL2 T164Ado	do	GGTGGGGCCATGAAAACCTGGTGCGAAATCTTCA GCTTTCACC
T211A	GRHL2 T211Aup	up	CTCAAAGACGACCAGCGCAGCGCTCCGGACAG CACATACAGCGAG
	GRHL2 T211Ado	do	CTCGCTGTATGTGCTGTCCGGAGCGCTGCGCTG GTCGTCTTTGAG
S557A	GRHL2 S557Aup	up	GCATTGATGTTGAAGGCTCCCACAGTGAAGG
	GRHL2 S557Ado	do	CCTTCACTGTGGGAGCCTTCAACATCAATGC
S210A	VA-GRHL2-41	up	CTATCTCAAAGACGACCAGCGCGCCACTCCGGA CAGCACATACAGC
	VA-GRHL2-42	do	GCTGTATGTGCTGTCCGGAGTGGCGCGCTGGTC GTCCTTTGAGATAG
P212A	VA-GRHL2-43	up	CAAAGACGACCAGCGCAGCACTGCGGACAGCA CATACAGCGAGAGC
	VA-GRHL2-44	do	GCTCTCGCTGTATGTGCTGTCCGCAGTGCTGCG CTGGTCGTCTTTG
D213A	VA-GRHL2-45	up	GACGACCAGCGCAGCACTCCGGCCAGCACATA CAGCGAGAGCTTC
	VA-GRHL2-46	do	GAAGCTCTCGCTGTATGTGCTGGCCGGAGTGCT GCGCTGGTCGTC

S214A	GRHL2 S214Aup	up	CGACCAGCGCAGCACTCCGGACGCCACATACA GCGAGAGCTTCAAGG
	GRHL2 S214Ado	do	CCTTGAAGCTCTCGCTGTATGTGGCGTCCGGAG TGCTGCGCTGGTCCG
T215A	GRHL2 T215Aup	up	CCAGCGCAGCACTCCGGACAGCGCATAACAGCG AGAGCTTCAAGGACG
	GRHL2 T215Ado	do	CGTCCTTGAAGCTCTCGCTGTATGCGCTGTCCG GAGTGCTGCGCTGG
Y216A	VA-GRHL2-47	up	GCAGCACTCCGGACAGCACAGCCAGCGAGAGC TCAAGGACGC
	VA-GRHL2-48	do	GCGTCCTTGAAGCTCTCGCTGGCTGTGCTGTCC GGAGTGCTGC
S217A	VA-GRHL2-49	up	GCGTCCTTGAAGCTCTCGCTGGCTGTGCTGTCC GGAGTGCTGC
	VA-GRHL2-50	do	GCTGCGTCCTTGAAGCTCTCGGCGTATGTGCTG TCCGGAGTGC
E218A	GRHL2 E218Aup	up	CTCCGGACAGCACATAACAGCGCGAGCTTCAAGG ACGCAGCCAC
	GRHL2 E218Ado	do	GTGGCTGCGTCCTTGAAGCTCGCGCTGTATGTG CTGTCCGGAG
S219A	GRHL2 S219Aup	up	CCGGACAGCACATAACAGCGAGGCCTTCAAGGAC GCAGCCACAG
	GRHL2 S219Ado	do	CTGTGGCTGCGTCCTTGAAGGCCTCGCTGTATG TGCTGTCCGG
F220A	VA-GRHL2-51	up	GACAGCACATAACAGCGAGAGCGCCAAGGACGC AGCCACAGAG
	VA-GRHL2-52	do	CTCTGTGGCTGCGTCCTTGGCGCTCTCGCTGTA TGTGCTGTC

Tabelle 9-7: Für die DNA-Sequenzanalyse verwendete Oligonukleotide

Nr.	Code	up/ do	Position	Sequenz
1	VA-GRHL2-17	up	711-733	CAAGATCACCTGGAGAATTCC
2	VA-EGFP-Seq	up		CCACTACCTGAGCACCCAGTCC

Tabelle 9-8: Für die quantitative *Realtime* PCR verwendete Oligonukleotide

Code	Up/do	Zielgen	Sequenz (5' → 3')
GRHL2-endo-f	up	GRHL2	CACACACCTTCACCTGCACAG
GRHL2-endo-r	do	GRHL2	TTTGATCCAATGAACTTGCTCC
GRHL2-exo-f	up	GRHL2	CATGCCTGATCTCCACTCACAG
GRHL2-exo-r	do	GRHL2	CTGCCACCTTCTCGTTCATCA
PKC δ -f	up	PRKCD	CAGACCAAGGACCACCTGTT
PKC δ -r	do	PRKCD	GCATAAACGTGGCACGGTA
PKC ϵ -f	up	PRKCE	GCCACTTCGAGGACTGGATTGAT
PKC ϵ -r	do	PRKCE	TCACCCGACGACCCTGAGAGA
PKC η -f	up	PRKCH	CAGCCCACCTACTGCTCTCACT
PKC η -r	do	PRKCH	GATGATGGCAGCGTTTATGGA
RPLP0-f	up	RPLP0	ACCCAGCTCTGGAGAAACTGC
RPLP0-r	do	RPLP0	TGAGGTCCTCCTTGGTGAACA

9.6. RNA-Interferenz

Tabelle 9-9: Verwendete siRNAs

siRNA	ON-TARGETplus	Zielgen	Sequenz	Hersteller
PKC δ -1	J-003524-08-0002	PRKCD	CCAAGGUGUUGAUGUCUGU	Dharmacon
PKC δ -2	J-003524-07-0002	PRKCD	CCAUGUAUCCUGAGUGGAA	Dharmacon
PKC ϵ	J-004653-06-0002	PRKCE	GUGGAGACCUCAUGUUUCA	Dharmacon
PKC η	J-004655-06-0002	PRKCH	GCACCUGUGUCGUCCAUA	Dharmacon

Tabelle 9-10: Verwendete shRNA-Expressionsplasmide

TRC-Referenznummer	Zielgen	Sequenz	Vektor	Bezugsquelle
TRCN0000272637	PRKCD	CCGGCAGAGCCTGTTGGGA TATATCCTCGAGGATATATC CCAACAGGCTCTGTTTTTG	pLKO.1	Sigma-Aldrich
TRCN0000272640	PRKCD	CCGGCAACAGCCGGGACAC TATATTCTCGAGAATATAGT GTCCCGGCTGTTGTTTTTG	pLKO.1	Sigma-Aldrich

TRCN0000010193	PRKCD	CCGGGGCCGCTTTGAACTC TACCGTCTCGAGACGGTAG AGTTCAAAGCGGCCTTTTT	pLKO.1	Sigma-Aldrich
TRCN0000010203	PRKCD	CCGGGCAGGGATTAAAGTG TGAAGACTCGAGTCTTCACA CTTTAATCCCTGCTTTTT	pLKO.1	Sigma-Aldrich

9.7. Antikörper

Tabelle 9-11: Verwendete Primärantikörper

Antigen	m*, p*	Spezies	Verdünnung	Hersteller
GRHL2	p	Kaninchen	1:2000	Werner <i>et al.</i> (Werner et al., 2013)
P-T ²¹¹ -GRHL2	p	Kaninchen	1:600	Eigene Herstellung, Davids Biotechnologie, Regensburg
P-S ²¹⁰ -GRHL2	p	Kaninchen	1:600	Eigene Herstellung, Davids Biotechnologie, Regensburg
P-S ²¹⁴ -GRHL2	p	Kaninchen	1:600	Eigene Herstellung, Davids Biotechnologie, Regensburg
Hämagglutinin (HA)	m	Kaninchen	1:2000	Sigma-Aldrich
PKC δ	m	Kaninchen	1:1000	Cell Signaling Technology
PKC ϵ	m	Kaninchen	1:1000	Cell Signaling Technology
PKC η	p	Kaninchen	1:1000	Boster Biological Technology
PKC θ	m	Kaninchen	1:1000	Cell Signaling Technology
p300	p	Kaninchen	1:1000	Cell Signaling Technology
α -Tubulin	m	Kaninchen	1:4000	Cell Signaling Technology

m*: monoklonal, p*: polyklonal

Tabelle 9-12: Verwendeter Sekundärantikörper

Antigen	Spezies	Konjugat	Verdünnung	Hersteller
Kaninchen	Ziege	Peroxidase	1:4000	Cell Signaling Technology

9.8. Ergebnis des KinaseFinder Screenings

Tabelle 9-13: Ergebnis des *KinaseFinder* Screenings

Nr.	Kinase	Korrigierte Kinase-Aktivität	Aktivitäts-Verhältnis	Nr.	Kinase	Korrigierte Kinase-Aktivität	Aktivitäts-Verhältnis
1	ACV-R1	-24	-0,46	124	MEK1 wt	-44	#DIV/0!
2	ACV-R1B	-16	-0,07	125	MEK2	-3	-0,07
3	ACV-R2A	18	0,10	126	MEK5	-25	-1,47
4	ACV-R2B	-33	-0,83	127	MEKK2	-22	-0,51
5	ACV-RL1	-10	-0,2	128	MEKK3	-28	-0,65
6	AKT1 aa106-480	-9	-0,24	129	MELK	-55	-13,75
7	AKT2 aa107-481	3	0,05	130	MINK1	-32	#DIV/0!
8	AKT3 aa106-479	46	0,82	131	MKK4	-27	-0,53
9	AMPK-alpha1	62	0,46	132	MKK6SDTD	-44	-1,10
10	ARK5	195	0,84	133	MKK7	-31	-0,61
11	ASK1	-48	-1,14	134	MKNK1	-54	-3,00
12	Aurora-A	130	0,76	135	MKNK2	-47	-3,36
13	Aurora-B	9	0,12	136	MLK4	-51	-12,75
14	Aurora-C	-18	-0,39	137	MST1	-8	-0,18
15	BMPR1	90	4,09	138	MST2	-24	-0,63
16	B-RAF VE	-15	-1,15	139	MST3	-41	-1,52
17	B-RAF wt	3	0,07	140	MST4	15	3,75
18	BRSK1	-35	-0,49	141	mTOR	-34	-2,83
19	BRSK2	16	0,25	142	MYLK	-28	-2,55
20	BUB1B	23	0,64	143	MYLK2	-15	-0,44
21	CAMK1D	18	0,19	144	MYLK3	-25	-0,93
22	CAMK2A	-55	-0,81	145	NEK1	-40	-0,75
23	CAMK2B	26	0,50	146	NEK11	-24	-1,14
24	CAMK2D	-10	-0,30	147	NEK2	48	0,36
25	CAMK2G	13	0,13	148	NEK3	-50	-1,61
26	CAMK4	-6	-0,06	149	NEK4	-40	-1,43
27	CAMKK1	49	0,28	150	NEK6	-41	#DIV/0!
28	CAMKK2	-21	-0,53	151	NEK7	-32	-32,00
29	CDC42BPA	-51	-2,43	152	NEK9	-20	-0,65
30	CDC42BPB	-3	-1,00	153	NIK	58	1,26
31	CDC7/DBF4	-27	-0,42	154	NLK	-19	-2,38
32	CDK1/CycA	7	0,14	155	p38-alpha	-50	-8,33
33	CDK1/CycE	-6	-0,21	156	p38-beta	-53	-0,40
34	CDK16/CycY	-39	-1,05	157	p38-delta	-30	-3,33
35	CDK1/CycB1	7	0,17	158	p38-gamma	-55	-4,58
36	CDK2/CycA	-21	-0,34	159	PAK1	-14	-0,50
37	CDK2/CycE	-12	-0,30	160	PAK2	-50	-3,33
38	CDK3/CycE	-54	-2,45	161	PAK3	-10	-0,21
39	CDK4/CycD1	-16	-0,62	162	PAK4	7	0,88
40	CDK4/CycD3	7	0,70	163	PAK6	-27	-0,61
41	CDK5/p25NCK	23	0,79	164	PAK7	-55	#DIV/0!
42	CDK5/p35NCK	-19	-0,21	165	PASK	-34	-0,59
43	CDK6/CycD1	45	-3,46	166	PBK	-37	-3,08
44	CDK6/CycD3	-32	-0,82	167	PDK1	-55	#DIV/0!
45	CDK7/CycH/MAT	-55	-2,50	168	PHKG1	-34	-1,89
46	CDK8/CycC	-12	-0,48	169	PHKG2	-43	-2,39
47	CDK9/CycK	-42	-0,76	170	PIM1	-50	-4,55
48	CDK9/CycT	-36	-1,29	171	PIM2	-27	-0,77
49	CHK1	-16	-0,70	172	PIM3	3	0,20
50	CHK2 (-27	-0,53	173	PKA	-34	-6,80
51	CK1-alpha1	49	0,45	174	PKC-alpha	-44	-0,85
52	CK1-delta	-1	-0,02	175	PKC-beta1	-46	#DIV/0!
53	CK1-epsilon	-21	-0,88	176	PKC-beta2	-50	#DIV/0!
54	CK1-gamma1	-55	-2,29	177	PKC-delta	-24	#DIV/0!
55	CK1-gamma2	-12	-0,40	178	PKC-epsilon	-53	#DIV/0!
56	CK1-gamma3	-28	-1,65	179	PKC-eta	-3	-0,27

57	CK2-alpha1	7	0,15	180	PKC-gamma	-17	-3,40
58	CK2-alpha2	-26	-0,40	181	PKC-iota	7	#DIV/0!
59	CLK1	15	0,10	182	PKC-mu	-24	-1,60
60	CLK2	-54	-1,80	183	PKC-nu	-46	-2,19
61	CLK3	-18	-4,50	184	PKC-theta	-40	#DIV/0!
62	CLK4	42	0,35	185	PKC-zeta	65	1,48
63	COT	9	0,26	186	PKC-zeta wt	-55	-55,00
64	DAPK1	-8	-0,15	187	PKMYT1	-4	-0,07
65	DAPK2	-42	-2,21	188	PKN3	-31	-1,48
66	DAPK3	-44	-1,00	189	PLK1	-30	-1,07
67	DCAMKL2	-41	-0,93	190	PLK3	40	0,89
68	DMPK	-14	-1,00	191	PRK1	-10	-0,29
69	DNA-PK	-48	-1,71	192	PRK2	-55	#DIV/0!
70	DYRK1A	-21	-0,39	193	PRKD2	-55	-1,96
71	DYRK1B	-48	#DIV/0!	194	PRKG1	-9	-0,47
72	DYRK2	-24	-0,41	195	PRKG2	3	0,10
73	DYRK3	-19	-0,41	196	PRKX	-14	-0,50
74	DYRK4	-27	-0,79	197	RAF1 DYDY	-10	-0,40
75	EEF2K	-36	-0,90	198	RIPK2	-15	-0,23
76	EIF2AK2	-19	-0,79	199	RIPK5	-4	-0,11
77	EIF2AK3	-9	-0,33	200	ROCK1	-47	-1,52
78	ERK1	-48	-48,00	201	ROCK2	15	0,27
79	ERK2	-54	-54,00	202	RPS6KA1	-30	-2,73
80	ERK7	-9	-0,08	203	RPS6KA2	-17	-17,00
81	GRK2	-27	-0,36	204	RPS6KA3	-55	#DIV/0!
82	GRK3	-31	-0,84	205	RPS6KA4	-46	-5,11
83	GRK4	-4	-0,11	206	RPS6KA5	-37	-2,06
84	GRK5	-18	-0,75	207	RPS6KA6	-55	-4,58
85	GRK6	-48	-12,00	208	S6K	54	1,26
86	GRK7	-22	#DIV/0!	209	S6K-beta	-7	-0,88
87	GSG2	-22	-0,40	210	SAK	137	0,32
88	GSK3-alpha	-25	-0,58	211	SGK1	-3	-0,07
89	GSK3-beta	-28	-2,00	212	SGK2	-10	-0,24
90	HIPK1	0	0,00	213	SGK3	62	0,83
91	HIPK2	94	1,38	214	SIK1	-31	-1,29
92	HIPK3	0	0,00	215	SIK2	-48	-2,09
93	HIPK4	-55	-1,62	216	SLK	39	1,70
94	HRI	2	0,02	217	SNARK	163	0,56
95	IKK-alpha	-18	-0,32	218	SNK	12	0,20
96	IKK-beta	6	0,14	219	SRPK1	-39	-0,91
97	IKK-epsilon	-27	-0,79	220	SRPK2	-24	-0,44
98	IRAK1	-11	-0,52	221	STK17A	-24	-0,35
99	IRAK4	-31	-1,72	222	STK23	-24	-0,35
100	JNK1	-32	-2,91	223	STK25	-44	-4,00
101	JNK2	-54	#DIV/0!	224	STK33	-21	-2,33
102	JNK3	-38	-4,75	225	STK39	-31	-1,00
103	LIMK1	-24	-0,51	226	TAOK2	-50	-10,00
104	LIMK2	-36	-0,97	227	TAOK3	-39	-0,44
105	LRRK G2019S	-24	-0,65	228	TBK1	-32	-0,54
106	LRRK2 I2020T	-30	-0,34	229	TGFB-R1	-19	-0,49
107	LRRK2 R1441C	-27	-0,22	230	TGFB-R2	-50	#DIV/0!
108	LRRK2 wt	-23	-0,37	231	TLK1	-1	-0,03
109	MAP3K1	-39	-0,75	232	TLK2	-54	-1,15
110	MAP3K10	-19	-0,24	233	TSF1	23	0,42
111	MAP3K11	42	0,36	234	TSK2	36	0,38
112	MAP3K7/MAP3KIP1	-31	-1,00	235	TSSK1	-18	-1,50
113	MAP3K9	-11	-0,09	236	TTBK1	-27	-0,73
114	MAP4K2	-35	-4,38	237	TTBK2	-55	-1,12
115	MAP4K4	26	0,42	238	TTK	18	0,33
116	MAP4K5	-38	-1,58	239	VRK1	-3	-0,05
117	MAPKAPK2	-55	-1,62	240	VRK2	29	0,49
118	MAPKAPK3	-34	-3,09	241	WEE1	-48	-2,82
119	MAPKAPK5	-8	-0,17	242	WNK1	-44	-11,00
120	MARK1	42	0,38	243	WNK2	-30	-0,40
121	MARK2	-32	-32,00	244	WNK3	-20	-0,48
122	MARK3	-14	-0,37	245	ZAK	10	0,15
123	MARK4	-18	-2,25				

Korrigierte Kinase-Aktivität: Gemessene Kinase-Aktivität abzüglich des Peptid-Backgrounds; Aktivitäts-Verhältnis: Verhältnis zwischen korrigierter Kinase-Aktivität und der Kinase-Aktivität ohne Peptid.

9.9. Sicherheit und Entsorgung

9.9.1. Sicherheit

Die in der Arbeit verwendeten Gefahrenstoffe sind in der nachfolgenden Tabelle aufgelistet. Gemäß dem „Global harmonisierten System zur Einstufung und Kennzeichnung von Chemikalien“ (GHS) sind für jede Substanz die entsprechenden Sicherheitskodierungen und Gefahrensymbole sowie die H- und P-Sätze aufgeführt.

Substanz	GHS-Kodierung	Gefahrensymbol	H-Sätze	P-Sätze
Acrylamid	GHS06/08		301, 312, 315, 317, 319, 332, 340, 350, 361f, 372	201, 281, 301+310, 302+352, 304+340, 305+351+338
Ampicillin	GHS07/08		315, 317, 319, 334, 335	261, 280, 305+351+338, 342+311
APS	GHS03/07/08		272, 302, 319, 335, 334, 317	280, 305+351+338, 302+352, 304+341, 342+311
Ethanol	GHS02		225	210, 240, 243, 280, 303+361+353
Isopropanol	GHS02/07		225, 319, 336	210, 233, 305+351+338
Luminol	GHS07		315, 319, 335	261, 305+351+338
Methanol	GHS02/06/08		225, 301, 311, 331, 370	243, 280, 301+310, 302+350, 304+340, 307+311
Nonidet P-40	GHS05/07/09		302, 318, 411	273, 280, 305+351+338
Polyethylenimin	GHS07/09		302, 317, 319, 411	273, 280, 305+351+338
Puromycin	GHS07		302	-

Salzsäure, 37%	GHS06/07		314, 335, 290	280, 301+330+331, 305+351+338
SDS	GHS02/06		228, 302, 311, 315, 319,335	210, 261, 280, 305+351+338
TEMED	GHS02/05/07		225, 302, 314, 332	243, 260, 280, 301+330+331, 303+361+353, 304+340

9.9.2. Entsorgung

Die Entsorgung erfolgte gemäß den bestehenden Richtlinien:

- S1- und S2-Abfall wurde vor der Entsorgung gesammelt und autoklaviert.
- Alkohole wurden in entsprechenden Behältern für die Entsorgung gesammelt.

Danksagung

An erster Stelle danke ich Herrn Prof. Dr. Klaus Pantel, dem Direktor des Instituts für Tumorbilogie, der es mir ermöglichte, meine Doktorarbeit an seinem Institut unter exzellenten Arbeitsbedingungen durchzuführen.

Ein ganz besonderer Dank gilt meinem Betreuer Herrn Dr. Volker Aßmann, der mir ein hochinteressantes und relevantes Promotionsthema bereitstellte und von dem ich in den letzten vier Jahren sehr viel lernen durfte. Er hat mich mit seiner außerordentlich engagierten und freundlichen Betreuung sowie seiner fachlichen Kompetenz unermüdlich unterstützt und motiviert. Ich möchte ihm außerdem für die sorgfältige Durchsicht dieser Arbeit danken.

Herrn Prof. Dr. Michael Kolbe aus dem Fachbereich Chemie der Universität Hamburg danke ich herzlich für seine Bereitschaft das Zweitgutachten der Dissertation zu übernehmen.

Besonders danken möchte ich auch Frau Sonja Santjer, die mich im Laboralltag von Anfang an mit ganzem Einsatz unterstützt hat und auf die ich mich immer verlassen konnte. Vielen Dank für alles!

Außerdem danke ich meinem Ehemann, meiner gesamten Familie und meinen Freunden für die bedingungslose Unterstützung und den Glauben an mich, wenn er mir einmal fehlte.

Eidesstattliche Versicherung

Hiermit versichere ich an Eides statt, die vorliegende Dissertation selbst verfasst und keine anderen als die angegebenen Hilfsmittel benutzt zu haben. Die eingereichte schriftliche Fassung entspricht der auf dem elektronischen Speichermedium. Ich versichere, dass diese Dissertation nicht in einem früheren Promotionsverfahren eingereicht wurde.

Hamburg, _____

Johanna Neu