

Aus dem Institut für Pharmakologie  
der Universitätsmedizin der Johannes Gutenberg-Universität Mainz

Analysen zur Funktionalität und Regulation einer neuen Isoform der induzierbaren  
Stickstoffmonoxid-Synthase (NOS2-2)

-

Untersuchung der Fähigkeit der NOS2-2 zur NO-Biosynthese und ihrer Regulation  
durch fünf spezifische Transkriptionsfaktoren

Inauguraldissertation  
zur Erlangung des Doktorgrades der Medizin  
der Universitätsmedizin  
der Johannes Gutenberg-Universität Mainz

Vorgelegt von

Paul Oswald Kohlhas  
aus Offenbach am Main

Mainz, 2022

Wissenschaftlicher Vorstand:

1. Gutachter:

2. Gutachter:

Tag der Promotion:

06. Dezember 2022

Eidesstattliche Erklärung:

Die vorgelegte Dissertation wurde von mir von Juni 2021 bis April 2022 am Institut für Pharmakologie der Universitätsmedizin der Johannes Gutenberg-Universität Mainz zur Erlangung des „Doktor der Medizin“ angefertigt.

Hiermit erkläre ich an Eides statt, dass ich die vorliegende Dissertation selbstständig und nur mit den angegebenen Hilfsmitteln angefertigt habe. Diese Dissertation wurde noch nicht als Prüfungsarbeit für eine andere Prüfung eingereicht. Zudem wurden bisher weder die gleiche noch Teile der Abhandlung als Dissertation bei einer anderen Fakultät oder einem anderen Fachbereich eingereicht.

Homburg, 25.10.2022

Paul Oswald Kohlhas

# Inhaltsverzeichnis

I.	Abkürzungsverzeichnis .....	IV
II.	Abbildungsverzeichnis .....	VI
III.	Tabellenverzeichnis.....	VII
1	Zusammenfassung .....	1
2	Abstract .....	2
3	Einführung.....	3
3.1	Bioaktives NO .....	3
3.2	NO-Synthasen und ihre Wirkungsbereiche .....	4
3.3	Die Struktur der NOS2 .....	6
3.4	NO in differenzierenden Zellen.....	8
3.5	Epigenetische Effekte des NO.....	12
3.5.1	NO und DNA-Methylierung.....	12
3.5.2	NO und Histonmodifikation .....	13
3.5.3	NO und <i>microRNAs</i> .....	14
3.6	Die Isoform NOS2-2 in differenzierenden Zellen.....	15
4	Zielsetzung .....	24
5	Material .....	25
6	Methoden.....	32
6.1	Zellbiologische Methoden.....	32
6.1.1	Kultivieren von Zellen.....	32
6.1.2	Kryokonservierung und Rekultivierung von Zellen.....	32
6.1.3	Bestimmung der Zellzahl und Aussaat.....	32
6.1.4	Transfektion von Zellen .....	33
6.1.5	Stimulation der Genexpression von Zellen .....	34
6.2	Molekularbiologische Methoden.....	34
6.2.1	DNA-Synthese mit PCR.....	34

6.2.2	Agarose-Gelelektrophorese .....	36
6.2.3	DNA-Extraktion aus Agarosegel.....	37
6.2.4	Aufreinigung von DNA .....	37
6.2.5	Photometrische Quantifizierung von Nukleinsäuren.....	37
6.2.6	Klonierung von DNA .....	38
6.2.7	Griess-Assay.....	42
6.3	RNA-Analysen .....	43
6.3.1	RNA-Extraktion aus Zellen.....	43
6.3.2	Reverse Transkription von RNA .....	43
6.3.3	Quantitative <i>Real-Time</i> -PCR.....	44
6.4	Proteinbiochemische Methoden .....	46
6.4.1	Proteinextraktion aus Zellen.....	46
6.4.2	Luciferase-Assay .....	46
7	Ergebnisse .....	47
7.1	Funktionalität der NOS2-2 .....	47
7.1.1	Transiente Transfektion von NOS2-1 und -2 .....	47
7.1.2	Stabile Transfektion von NOS2-1 und -2 .....	50
7.2	Induzierbarkeit der NOS2-2 durch Transkriptionsfaktoren.....	52
7.2.1	Transiente Transfektion von Tf-Expressionsklonen.....	54

8	Diskussion .....	56
8.1	Funktionalität der NOS2-2 .....	57
8.2	Induzierbarkeit der NOS2-2 durch Transkriptionsfaktoren.....	58
8.2.1	Bmi1 .....	58
8.2.2	LEF1 .....	59
8.2.3	Meis1b.....	60
8.2.4	PLAG1.....	60
8.2.5	Zpo1.....	62
8.3	Mögliche Ursachen der ausbleibenden Tf-Wirkung auf NOS2-2 .....	63
9	Fazit und Ausblick.....	65
10	Literaturverzeichnis.....	67
11	Danksagung .....	76
12	Lebenslauf .....	77

## I. Abkürzungsverzeichnis

ATP	Adenosintriphosphat
BGH	<i>bovine growth hormone</i>
BH4	(6R-)5,6,7,8-Tetrahydrobiopterin
Bmi1	<i>B cell-specific Moloney murine leukemia virus integration site 1</i>
bp	Basenpaare
cds	codierende Sequenz
cGMP	cyklisches Guanosinmonophosphat
CM	Zytokinmix
CMV	Cytomegalie Virus
CO	Kontrollgruppe
DEPC	Diethylcarbonat
DMEM	<i>Dulbecco's Modified Eagle Medium</i>
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	<i>desoxyribonucleic acid</i>
DNMT	DNA-Methyltransferase
dNTP	Desoxyribonukleosidtriphosphat
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
eNOS	endotheliale NO-Synthase
EpSC	epidermale Stammzelle
ESC	<i>embryonic stem cell</i>
FAD	Flavin-Adenin-Dinukleotid
FCS	<i>fetal calf serum</i>
FMN	Flavin-Mononukleotid
GAPDH	Glycerinaldehyd-Phosphat-Dehydrogenase
GIT	Guanidiniumisothiocyanat
HAT	Histon-Acetyltransferasen
HDAC	Histon-Deacetylasen
hESC	<i>human embryonic stem cells</i>
hiPSC	<i>human induced pluripotent stem cells</i>
hPSC	<i>human pluripotent stem cells</i>
HSPC	hämatopoetische Stammzelle
IFN	Interferon
IGF-II	<i>insulin like growth factor II</i>
IL	Interleukin
iNOS	induzierbare NO-Synthase
iPSC	<i>induced pluripotent stem cells</i>
kDa	Kilodalton
KDM	<i>Jumonji C domain Fe(II) <math>\alpha</math>-ketoglutarate-Proteinfamilie</i>
LB	<i>lysogeny broth</i>

LEF1	<i>Lymphoid enhancer binding factor 1</i>
LPS	Lipopolysaccharide
Meis1	<i>Myeloid ecotropic viral integration site 1</i>
MRE	<i>microRNA-recognition-site</i>
MSC	mesenchymale Stammzelle
NADPH <sub>2</sub>	Nikotinamid-Adenin-Dinukleotid-Phosphat
NaOH	Natriumhydroxid
NED	Naphthylethylendiamin
NF-κB	<i>Nuclear factor-κB</i>
NGF	<i>nerve growth factor</i>
nNOS	neuronale NO-Synthase
NO	Stickstoffmonoxid
NO <sub>2</sub> <sup>-</sup>	Nitrit
NOS	Stickstoffmonoxid-Synthase
NSC	neuronale Stammzelle
nt	Nukleotide
PBS	<i>phosphate-buffered saline</i>
PCR	Polymerase Kettenreaktion
PLAG1	<i>pleiomorphic adenoma gene 1</i>
PLB	<i>passive lysis buffer</i>
PLGF	<i>placental growth factor</i>
qRT-PCR	quantitative real-time-PCR
<i>RiPA</i>	Radioimmunpräzipitationspuffer
RNA	<i>ribonucleic acid</i>
RNS	<i>reactive nitrogen species</i>
rpk <sub>m</sub>	<i>Reads per kilobase of transcript per Million mapped reads</i>
RT	Reverse Transkriptase
SDS	<i>sodium dodecyl sulfate</i>
SPSB	<i>SPRY domain-containing SOCS box</i>
SRA	<i>Sequence Read Archive</i>
TAE	Tris-Acetat-EDTA
Tf	Transkriptionsfaktor
TNF-α	Tumornekrosefaktor α
uORF	<i>upstream open reading frame</i>
UTR	untranslatierte Region
VEGF	<i>Vascular endothelial growth factor</i>
ZNS	zentrales Nervensystem
Zpo1	<i>zinc finger elbow-related proline domain protein 1</i>

## II. Abbildungsverzeichnis

Abbildung 3-1: Katalyse der NOS .....	4
Abbildung 3-2: Struktur des NOS2-1-Transkripts und -Proteins.....	7
Abbildung 3-3: Struktur des NOS2-2-Transkripts. ....	7
Abbildung 3-4: Wirkungen von NO in verschiedenen Stammzellen .....	11
Abbildung 3-5: NO-vermittelte DNA-Methylierung .....	13
Abbildung 3-6: Expression der NOS2-Isoformen in Trophoblast-Stammzellen. ....	16
Abbildung 3-7: Expression der NOS2-Isoformen in zu Kardiomyozyten differenzierenden hESC und iPSC. ....	17
Abbildung 3-8: Expression der NOS2-Isoformen in zu Chondrozyten differenzierenden iPSC .....	18
Abbildung 3-9: Expression der NOS2-Isoformen in zu mesenchymalen Stromazellen differenzierenden hESC und iPSC .....	19
Abbildung 3-10: Expression der NOS2-Isoformen in zu Neuronen differenzierenden iPSC .....	20
Abbildung 3-11: NOS2 Expression in vier verschiedenen zu Neuronen differenzierenden iPSC .....	22
Abbildung 7-1: Schema der pcDNA4/TO-Konstrukte .....	48
Abbildung 7-2: Funktionalität des NOS2-2-Proteins .....	49
Abbildung 7-3: Funktionalität des NOS2-2-Proteins .....	51
Abbildung 7-4: Putativer NOS2-2-Promotor mit TF-Bindestellen .....	54
Abbildung 7-5: qRT-PCR-Auswertung der Tf-Transfektionen .....	55

### III. Tabellenverzeichnis

Tabelle 5-1: Laborgeräte .....	25
Tabelle 5-2: Verbrauchsmaterialien .....	26
Tabelle 5-3: Reagenzien .....	27
Tabelle 5-4: Puffer und Lösungen .....	28
Tabelle 5-5: Kits .....	29
Tabelle 5-6: Cytokine .....	30
Tabelle 5-7: Marker .....	30
Tabelle 5-8: Enzyme .....	30
Tabelle 5-9: Oligonukleotide .....	30
Tabelle 5-10: Zellen .....	31
Tabelle 5-11: Plasmide .....	31
Tabelle 6-1: Transfektionsansatz für 24-Well-Platte .....	34
Tabelle 6-2: PCR-Ansatz mit OneTaq® .....	35
Tabelle 6-3: Temperaturprogramm für PCR mit OneTaq® .....	35
Tabelle 6-4: PCR-Ansatz mit Q5® .....	36
Tabelle 6-5: Temperaturprogramm für PCR mit Q5® .....	36
Tabelle 6-6: Restriktionsansatz .....	39
Tabelle 6-7: Kinasierungsansatz mit T4®-PNK .....	39
Tabelle 6-8: Ligationsansatz mit T4®-Ligase .....	40
Tabelle 6-9: Temperaturprogramm für eine QuikChange®-PCR .....	40
Tabelle 6-10: RT-Ansatz mit M-MuLVRT® .....	44
Tabelle 6-11: Temperaturprogramm für RT mit M-MuLVRT® .....	44
Tabelle 6-12: qRT-PCR-Ansatz mit SYBR Green® .....	45
Tabelle 6-13: Temperaturprogramm qRT-PCR mit SYBR Green® .....	45

# 1 Zusammenfassung

Bioaktives Stickstoffmonoxid (NO) wird von Stickstoffmonoxid-Synthasen (NOS) gebildet und ist als Signalmolekül an sehr vielen physiologischen und pathologischen Prozessen beteiligt. So ist bekannt, dass NO über viele verschiedene, teilweise epigenetische Mechanismen auch die Differenzierung bzw. die Fähigkeit der Selbsterneuerung und den Erhalt der Pluripotenz von Stammzellen beeinflussen kann. Das Enzym, das in diesen Zusammenhängen typischerweise für die NO-Produktion verantwortlich ist, ist die vor allem aus dem Immunsystem bekannte induzierbare Stickstoffmonoxid-Synthase, genannt NOS2.

Im Immunsystem herrscht die klassische Isoform der induzierbaren NO-Synthase vor, genannt NOS2-1-Isoform. Die bioinformatische Analyse von RNA-Seq-Datenbanken erbrachte nun Hinweise darauf, dass während der Differenzierung von humanen embryonalen Stammzellen (hESC) bzw. induzierten pluripotenten Stammzellen (iPSC) zu verschiedenen spezifischen Gewebetypen (Kardiomyozyten, Chondrozyten, mesenchymalen Stromazellen, Neuronen und (Synzytio-)Trophoblastzellen) transient eine andere NOS2-Isoform exprimiert wird, die NOS2-2-Isoform. In dieser Arbeit wurde die NOS2-2 in Zellkultur exprimiert und mittels Griess-Assay auf die Fähigkeit zur NO-Produktion untersucht. Es konnte belegt werden, dass die NOS2-2 tatsächlich funktional im Sinne der Fähigkeit zur NO-Synthese ist und ihre transiente Expression mit einer transienten NO-Produktion einhergehen kann.

Die bioinformatische Analyse ergab weiterhin, dass das Transkript der NOS2-2 sich von dem der NOS2-1 durch ein alternatives erstes Exon unterscheidet, das an die Stelle der ersten beiden Exons der NOS2-1 tritt. Dies deutet darauf hin, dass die Expression der NOS2-2 einer alternativen Regulation unterliegt und durch einen eigenen Promotor gesteuert werden könnte. Von der AG Kleinert wurden fünf Transkriptionsfaktoren identifiziert, die in der putativen NOS2-2-Promotorregion Bindungsstellen besitzen und zugleich in allen RNA-Seq-Datensätzen, in denen das NOS2-2-Transkript vorlag, übereinstimmend herauf- oder herunterreguliert waren (Transkriptionsfaktoren: Bmi1, LEF1, Meis1b, PLAG1 und Zfp1). In dieser Arbeit wurden die Transkriptionsfaktoren in DLD1-Zellkultur exprimiert und ihre Wirkung auf die NOS2-2-Expression mittels qRT-PCR analysiert. Es zeigte sich kein signifikanter Zusammenhang zwischen der Expression der einzelnen Transkriptionsfaktoren und dem NOS2-2 Expressionsniveau. Weitere Arbeiten müssen zeigen, ob die Expression der Transkriptionsfaktoren unter anderen Versuchsbedingungen die NOS2-2-Expression berührt.

## 2 Abstract

Bioactive nitric oxide (NO) is formed by nitric oxide synthases (NOS) and is involved as a signaling molecule in countless physiological and pathological processes. It is known that NO can also influence the differentiation or the ability of self-renewal and the maintenance of pluripotency of stem cells via many different, partly epigenetic mechanisms. The enzyme that is typically responsible for NO production in these contexts is the inducible nitric oxide synthase, known primarily from the immune system and called NOS2.

The classic isoform of the inducible NO synthase, called the NOS2-1 isoform, predominates in the immune system. The bioinformatic analysis of RNA-seq databases now provided evidence that during the differentiation of human embryonic stem cells (hESC) or induced pluripotent stem cells (iPSC) into various specific tissue types (cardiomyocytes, chondrocytes, mesenchymal stromal cells, neurons and (syncytio-)trophoblast cells) another NOS2 isoform is transiently expressed, called the NOS2-2 isoform. In this work, NOS2-2 was expressed in cell culture and analyzed for its ability to produce NO using the Griess-assay. It could be proven that the NOS2-2 is actually functional in terms of the ability to synthesize NO and that its transient expression can be accompanied by a transient NO production.

The bioinformatic analysis further revealed that the transcript of NOS2-2 differs from that of NOS2-1 by an alternative first exon, which takes the place of the first two exons of NOS2-1. This indicates that the expression of NOS2-2 is subject to an alternative regulation and could be controlled by its own promoter. Kleinert identified five transcription factors that have binding sites in the putative NOS2-2 promoter region and were consistently up- or down-regulated in all RNA-Seq datasets in which the NOS2-2 transcript was present (transcription factors: Bmi1, LEF1, Meis1b, PLAG1 and Zpo1). In this work, the transcription factors were expressed in DLD1-cell culture and their effect on NOS2-2 expression was analyzed using qRT-PCR. There was no significant correlation between the expression of the individual transcription factors and the NOS2-2 expression level. Further work must show whether the expression of the transcription factors affects NOS2-2 expression under different experimental conditions.

## 3 Einführung

### 3.1 Bioaktives NO

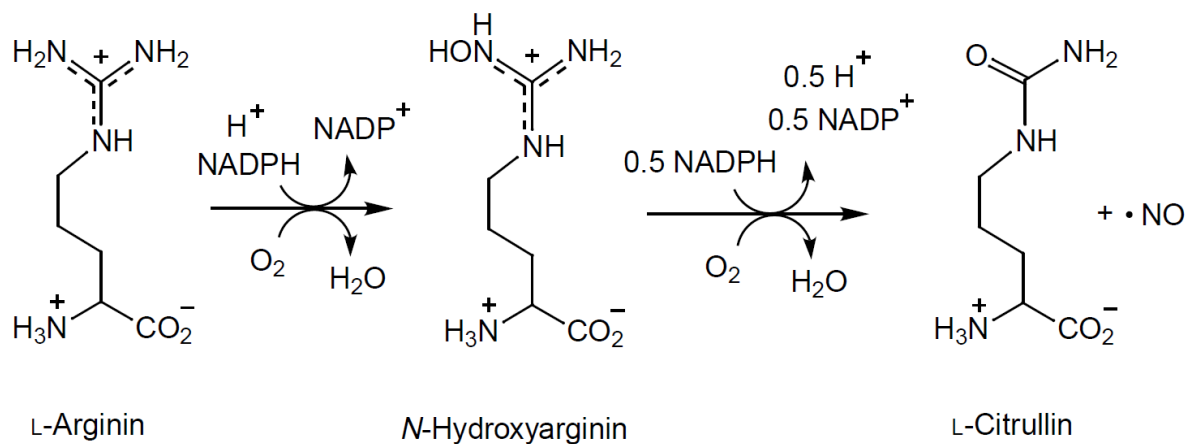
Stickstoffmonoxid (NO) ist ein zweiatomiges, bioaktives Gasmolekül, das in Organismen unterschiedliche physiologische Funktionen erfüllt. Die Vielfalt dieser Funktionen ergibt sich aus der Vielfalt der auf NO aufbauenden Reaktionen und somit letztlich aus der Einfachheit des Moleküls. Die Grundkategorien der Funktionen des NO sind Signalvermittlung und Zytotoxizität.

In der Signalvermittlung ist eine zentrale Zielstruktur des NO die lösliche Guanylatzyklase (Arnold 1977). Durch NO-Bindung stimuliert, produziert sie den *second messenger* 3'5'-zyklisches Guanosinmonophosphat (cGMP), welcher seinerseits die Aktivität von Ionen-Kanälen, Proteinkinasen, Phosphodiesterasen und anderen untergeordneten Strukturen moduliert (Paupardin-Tritsch 1986). Guanylatzyklase-vermittelte Signalwege reichen bis auf die Ebene der Genregulation (Gudi 1999). Unabhängig von diesen Signalwegen kann NO Proteine auch direkt modifizieren, etwa über Nitrosylierung von Aminosäuren. Über derartige Interaktionen ist NO auch an der direkten Aktivierung und Deaktivierung von Transkriptionsfaktoren beteiligt (Peunova 1993). Als kleines Gasmolekül diffundiert NO ungehindert durch das biologische System – von den NO-produzierenden Zellen ins umliegende Gewebe. Die Distanz, die NO von der produzierenden Zelle aus zurücklegen kann wurde mit bis zu 200 µm angesetzt (Lancaster 1997). Die Diffusionsfähigkeit ist somit eine wichtige Determinante der Funktionen des NO, wobei die Wirksamkeit von der spezifischen Antwort der Zielzellen und von ihrer Nähe zur NO-Quelle, also ihrer Position im NO-Konzentrationsgradient abhängt.

In höheren Konzentrationen treten die zytotoxischen Effekte von NO und seinen Metaboliten, den reaktiven Stickstoff-Spezies (RNS), in den Vordergrund. Diese hochreaktiven Moleküle sind in der Lage, sämtliche Zellbestandteile irreversibel zu schädigen (Pérez-Torres 2020). NO reagiert insbesondere mit Protein-gebundenem Eisen, das sich in vielen Schlüsselenzymen etwa der Zellatmung, des Energiestoffwechsels und der Replikation findet. Durch Reaktion mit NO werden diese Enzyme inaktiviert. In noch höheren Konzentrationen reagiert NO direkt mit DNA und erzeugt Strangbrüche. Im Immunsystem wird die Produktion von größeren Mengen NO somit zum Abwehrmechanismus. Jede sonstige Dysregulation, die mit erhöhter NO-Produktion einhergeht, wird zum pathogenen Mechanismus, wie weiter unten erläutert wird.

## 3.2 NO-Synthasen und ihre Wirkungsbereiche

Quellen des bioaktiven NO sind die Stickstoffmonoxid-Synthasen (NOS; EC 1.14.13.39). Die aktiven Formen dieser Enzyme sind Homodimere, deren Monomere aus ca. 1.100 bis 1.400 Aminosäuren bestehen. Die Molekülmassen liegen zwischen ca. 130 und 160 kDa. NOS katalysieren unter Verbrauch von molekularem Sauerstoff und NADP eine Fünf-Elektronen Oxidation der Guanidin-Gruppe des L-Arginins, sowie die anschließende Freisetzung von NO. L-Arginin wird dabei über N-Hydroxyarginin zu L-Citrullin umgesetzt (vgl. Abbildung 3-1). Jedes Monomer besitzt eine Häm-Gruppe, die das aktive Zentrum darstellt, sowie Bindestellen für NADP, FMN, FAD, Calmodulin und BH<sub>4</sub> (Groves 2000). Beim Menschen existieren drei Isoformen der NOS, die eine Homologie von 51 bis 57% aufweisen und sich in katalytischer Aktivität, Regulation und typischer Lokalisation unterscheiden (Förstermann 1994). Die Isoformen sind benannt nach den Geweben, aus denen sie zuerst gewonnen wurden. Im Verlauf der Erforschung der NOS-Isoformen stellte sich jedoch heraus, dass ihre Expression nicht grundsätzlich auf bestimmte Gewebe beschränkt ist und einzelne Zellen zugleich verschiedene Isoformen exprimieren können (Förstermann 1998). Dies eröffnete eine komplexere Sicht auf die Funktionen des NO.



**Abbildung 3-1: Katalyse der NOS**

*Im ersten Schritt erfolgt die Zwei-Elektronen Oxidation von L-Arginin zu N-Hydroxyarginin (NHA) durch O<sub>2</sub>. Im zweiten Schritt erfolgt die Drei-Elektronen Oxidation von NHA zu L-Citrullin und •NO. Abbildung nach Groves, 2000.*

Die neuronale NOS (nNOS) oder NOS1, deren Gen auf Chromosom 12 lokalisiert ist, wird konstitutiv vor allem im ZNS, aber auch in vielen anderen Zelltypen exprimiert. Die Wirkungen des NOS1-produzierten NO liegen vor allem im Bereich neuronaler Transmission, synaptischer Plastizität und zentraler Blutdruckregulation. So wird NO beispielsweise eine Rolle bei der Gedächtnisbildung, bzw. bei Langzeitpotenzierung und Langzeitdepression, sowie bei der zentralen Regulation des vaskulären Sympathikotonus zugeschrieben (Shibuki 1991; Togashi 1992). NOS1 ist außerdem verantwortlich für

die NO-Produktion in nitrergen Neuronen des autonomen Nervensystems, welche nicht-adrenerg und nicht-cholinerg eine Tonussenkung der glatten Muskulatur bewirken (Sheng 1992). Die Aktivität der NOS1 wird hauptsächlich über  $\text{Ca}^{2+}$ /Calmodulin und verschiedene Proteinkinasen reguliert (Nakane 1991).

Die endotheliale NOS (eNOS) oder NOS3, deren Gen auf Chromosom 7 liegt, wird konstitutiv in Endothelzellen exprimiert. Über den Guanylatzyklase-Signalweg bewirkt NO hier die lokale Dilatation der vaskulären glatten Muskulatur (Rapoport 1983). Gemeinsam mit dem NO aus der nitrergen Gefäßinnervation entsteht so ein wichtiges vasodilatatorisches System, das dem vasokonstriktorischen sympathischen- und dem Renin-Angiotensin-System ausgleichend gegenübersteht (Halbrügge 1991). Endotheliales NO, das ins Gefäßlumen gelangt, hemmt dort sowohl Thrombozytenaggregation als auch Leukozytenadhäsion (Alheid 1987; Kubes 1991). Außerdem wirkt NO auf glatte Gefäßmuskulatur antiproliferativ (Nakaki 1990). Insgesamt zeigt sich so die enorme vasoprotektive, bzw. direkte anti-atherosklerotische Bedeutung der physiologischen endothelialen NO-Produktion. Das Krankheitspotential ihrer Dysregulation lässt sich somit erahnen. Die basale NOS3-Aktivität kann durch verschiedene Rezeptor-Agonisten, sowie durch Scherkräfte des Blutflusses zusätzlich stimuliert werden (Lamontagne 1992). Wie bei der NOS1 erfolgt die Regulation auf Ebene der Enzym-Aktivität, etwa durch  $\text{Ca}^{2+}$ /Calmodulin.

Eine weitere Isoform, die in dieser Arbeit besonders betrachtet wird, ist die induzierbare NOS (iNOS) oder NOS2, deren Gen auf Chromosom 17 liegt. Sie unterscheidet sich von der neuronalen und endothelialen Form vor allem durch eine bis zu 1.000fach höhere NO-Produktion. Die erzeugten NO-Konzentrationen liegen im zytotoxischen Bereich und haben somit antimikrobielle, antiparasitäre, antivirale und antitumorale Effekte (Bogdan 2000). NOS2-Dysregulation ist aus dem gleichen Grund aber auch Bestandteil zahlreicher Pathomechanismen (s.u.). NOS2-Expression fand sich zuerst in Zellen des Immunsystems, etwa in aktivierten Makrophagen und Neutrophilen, ist aber auch in den meisten anderen Zelltypen nachweisbar. Ein anderer bedeutender Unterschied zu NOS1 und NOS3 liegt in der Regulation der NOS2. Reguliert wird durch transkriptionelle und post-transkriptionelle Mechanismen fast ausschließlich auf der Expressionsebene. So wird die Induzierbarkeit der NOS2-Expression durch Zytokine (z.B.  $\text{TNF-}\alpha$ , Interferon- $\gamma$ , Interleukine) oder bakterielle Lipopolysaccharide (LPS) vermittelt durch zahlreiche Zytokin- bzw. LPS-aktivierte Transkriptionsfaktoren, die wiederum die Aktivität des NOS2-Promotors modulieren. Eine zentrale Struktur der transkriptionellen Regulation stellt der Transkriptionsfaktor NF- $\kappa$ B dar, der durch aktivierende Zytokine, LPS oder oxidativen Stress aktiviert wird und die NOS2-Expression induziert. Andererseits wird er durch inhibierende Zytokine, Glukokortikoide oder Antioxidantien deaktiviert, was die NOS2-Expression vermindert (Kleinert 1996; Pautz 2010). Post-transkriptionelle Regulation findet auf Ebene der RNA-Prozessierung, des RNA-Exports, sowie mRNA- und Proteinstabilität statt. Regulation auf Ebene der Enzym-Aktivität ist zwar beschrieben, tritt in ihrer Bedeutung jedoch hinter den frühen Regulationen zurück. Es lässt sich also

etwas vereinfachend sagen: einmal exprimiert und in Anwesenheit von ausreichend Substrat und Kofaktoren ist die NOS2 bis zu ihrem Abbau aktiv.

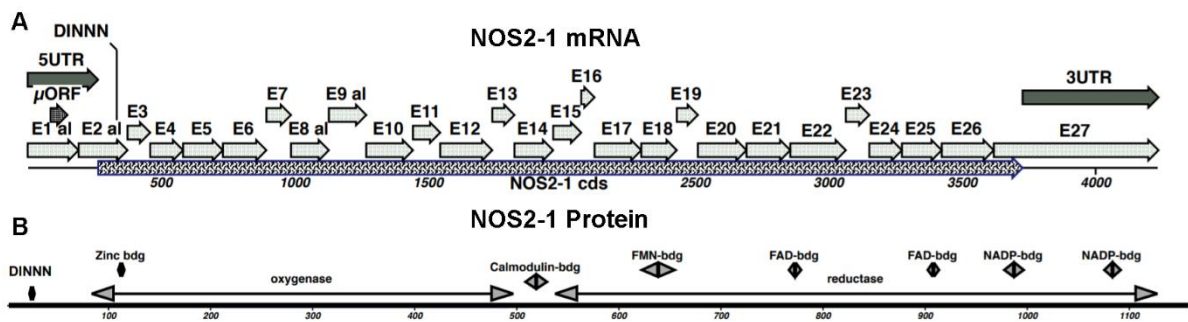
Wegen der hohen NO-Produktionsrate ist die Dysregulation der NOS2 besonders schädlich und mit zahlreichen Krankheiten assoziiert. So sind aufgrund reaktiver NOS2-Induktion erhöhte NO-Plasmakonzentrationen mitverantwortlich für den Blutdruckabfall mit konsekutivem Organversagen im septischen Schock (Thiemermann 1997). In der Synovialflüssigkeit von Patienten mit rheumatoider Arthritis finden sich erhöhte NO-Konzentrationen, die mit der Krankheitsaktivität korrelieren (Ueki 1996). NOS2-Induktion in Makrophagen steht in Zusammenhang mit entzündlicher Demyelinisierung bei multipler Sklerose (Bagasra 1995). Weitere Autoimmunerkrankungen mit NOS2-abhängigen Pathomechanismen sind u.a. Diabetes mellitus Typ 1, Asthma bronchiale, Lupus erythematodes, chronisch entzündlichen Darmerkrankungen und Psoriasis (Kröncke 1998). NOS2-Induktion scheint eine Rolle in der Pathogenese von neurodegenerativen Erkrankungen wie M. Alzheimer und M. Parkinson zu spielen (Vodovotz 1996). Desgleichen in destruktiven Prozessen in infarziertem und transplantiertem Gewebe (Haywood 1996; Lewis 1996). Die Rolle der NOS2 in der Tumorentwicklung ist komplex. So gibt es durch Immunzellen vermittelte NOS2-abhängige antitumorale Effekte. Allerdings kann in Tumorzellen gebildetes NO auch die Apoptose von Immunzellen und Neovaskularisation induzieren und so das Tumorwachstum fördern (Jenkins 1995).

Das in Differenzierungsprozessen als Signalmolekül wirkende NO wird wohl ebenfalls hauptsächlich von der NOS2 produziert. Auf diese Zusammenhänge wird in Kapitel 3.5 und 3.6 näher eingegangen.

### 3.3 Die Struktur der NOS2

Das humane NOS2-Gen ist auf Chromosom 17q11.2-q12 lokalisiert (genauer 27.756.766 bis 27.800.529). Es besteht aus 43.764 bp und beinhaltet 26 Introns und 27 Exons (Pautz 2010). Die Analyse von RNA-Seq-Datenbanken ergab, dass aus alternativer Verwendung der Exons drei verschiedene Transkripte hervorgehen, genannt NOS2-1 bis -3 (Gather 2022). Dabei ist NOS2-1 das hauptsächliche Transkript und entspricht der mRNA des klassischen funktionalen iNOS bzw. NOS2-Proteins (im Folgenden NOS2-1 genannt), wie es im vorigen Kapitel charakterisiert wurde. Das NOS2-1-Transkript enthält eine 5'-untranslatierte Region (UTR), die von Exon 1 und dem 5'-Teil des Exon 2 codiert wird. Dem Translationsstart im 3'-Teil des Exon 2 folgt die 4206 nt lange codierende Sequenz (cds) bis zum 5'-Teil des Exon 27, woran sich eine 3'-UTR bis zum Ende des Exon 27 anschließt. In der 5'-UTR befindet sich ein *upstream open reading frame* (uORF), der  $\mu$ ORF, dessen Stopcodon vor der ersten Exon-Exon-Verbindungsstelle liegt, und somit potenziell die nachfolgende Translation inhibiert. In Exon 2 befindet sich die Sequenz, die für das sog. DINNN-Motiv codiert, welches regulatorische

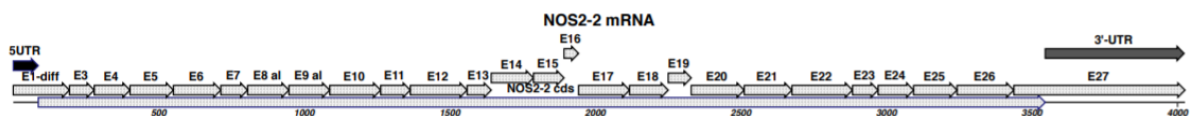
Wirkung auf der Ebene der Proteininstabilität der NOS2-1 besitzt. Im translatierten Protein stellt das N-terminale DINNN-Motiv eine Bindestelle für die Markerproteine SPSB1, SPSB2 und SPSB4 dar. Durch deren Bindung wird eine E3-Ubiquitin-Ligase rekrutiert, die das NOS2-1 Protein ubiquitiniert und so der Degradation im Proteasom zuführt (Kuang 2010; Nishiya 2011). Es folgen in 3'-Richtung die Oxygenase-Domäne, die das aktive Zentrum und die Dimer-Bindestelle enthält und die Reduktase-Domäne, mit Bindestellen für FMN, FAD und NADP (vgl. Abbildung 3-2).



**Abbildung 3-2: Struktur des NOS2-1-Transkripts und -Proteins.**

(A) Struktur des NOS2-1-Transkripts. Bestehend aus 27 Exons, bzw. 4206 nt. Dem 5'-UTR, der den  $\mu$ ORF enthält folgt ab Exon 2 die cds bis Exon 27. (B) Struktur des translatierten NOS2-1-Proteins. N-terminal liegt das für die Proteininstabilität relevante DINNN-Motiv. Es folgt die Oxygenase-Domäne mit aktivem Zentrum und Dimer-Bindestelle und die Reduktase-Domäne mit en Bindestellen für FMN, FAD und NADP. Nach Gather, 2022.

Im NOS2-2-Transkript fehlen Exon 1 und 2. Es beginnt stattdessen mit einem alternativen ersten Exon, dem Exon-1-diff. Das Transkript besteht insgesamt aus nur 26 Exons. Der 5'-Teil des Exon-1-diff enthält eine 5'-UTR. Im 3'-Teil beginnt die codierende Sequenz, die im 5'-Teil des Exon 27 endet. Daran schließt sich eine 3'-UTR bis zum Ende des Exon 27 an. Im NOS2-2-Transkript ist das DINNN-Motiv nicht codiert, was auf eine zumindest in dieser Hinsicht eingeschränkte Regulation der NOS2-2 auf der Ebene der Proteininstabilität hindeutet (Gather 2022).



**Abbildung 3-3: Struktur des NOS2-2-Transkripts.**

Das NOS2-2-Transkript besteht aus 26 Exons. Die Exons 1 und 2 des NOS2-1-Transkripts fehlen und sind durch ein alternatives Exon ersetzt (E1-diff). Das DINNN-Motiv ist nicht codiert. Nach Gather, 2022.

### 3.4 NO in differenzierenden Zellen

Differenzierung ist der Prozess der Entwicklung von stärker spezifischen Strukturen und Funktionen in Zellen, also die Herausbildung von Zelltypen. Im Fortgang der Entwicklung eines Organismus wird die Potenz der meisten Zellen, d.h. ihre Fähigkeit zu anderen Zelltypen zu differenzieren, geringer. Embryonale Stammzellen sind bis zum 8-Zell-Stadium totipotent, also in der Lage sich in sämtliche Zelltypen, einschließlich weiterer totipotenter Zellen zu differenzieren und somit ein ganzes Individuum hervorzubringen. In späteren Stadien sind die Embryonalzellen pluripotent, d.h. sie sind nur noch in der Lage zu Zelltypen der drei Keimblätter und der Keimbahn zu differenzieren. Am Ende dieser Entwicklung sind Zellen entweder unipotent, d.h. sie können durch Teilung nur noch den eigenen Zelltyp hervorbringen, oder multipotent, also in der Lage zu verschiedenen verwandten Typen zu differenzieren. Zur letzteren Gruppe gehören die adulten Stammzellen, wie beispielsweise hämatopoetische oder mesenchymale Stammzellen.

Die Eigenschaften der Stammzellen, wie ihre Fähigkeit zur Selbsterneuerung und die Pluripotenz werden durch ein komplexes Netzwerk aus intra- und extrazellulären Signalen erzeugt und aufrechterhalten. In den letzten Jahren betrat die Forschung das Feld der Induktion von Pluripotenz in ausdifferenzierten somatischen Zellen. Diese wird erreicht durch die kombinierte Expression bestimmter Transkriptionsfaktoren, bzw. Aktivierung von Genen, die aus dem Expressionsprofil embryonaler Stammzellen bekannt sind. In den wegweisenden Experimenten von Yamanaka und Takahashi waren vier Transkriptionsfaktoren nötig, um in Fibroblasten Pluripotenz zu erzeugen und sie zu sog. induzierten pluripotenten Stammzellen (iPSC) umzuwandeln (Yamanaka 2006; Takahashi 2007). In der Folge wurden auch Transkriptionsfaktoren entdeckt, die eine direkte Umwandlung von einem differenzierten Zelltyp in einen anderen induzieren, ohne dass die Zellen das undifferenzierte Stadium der iPSC durchlaufen müssen (Vierbuchen 2010). Dieser Vorgang wird als Transdifferenzierung oder direkte Reprogrammierung bezeichnet. Die Erzeugung von differenzierbaren iPSCs ist ein wegweisender Ansatz in der regenerativen Medizin, da durch ihre Verwendung zukünftig auf embryonale Stammzellen (ESCs) verzichtet werden könnte. ESCs werfen nicht nur ethische Probleme hinsichtlich ihrer Gewinnung auf, sondern führen als allogenes Transplantationsmaterial auch vermehrt zu Abstoßungsreaktionen. Mit der Erzeugung von pluripotenten Zellen aus patienteneigenem Gewebe könnte dies umgangen werden. Des Weiteren können iPSCs in der Erforschung von Krankheiten bzw. bei der Entwicklung neuer Arzneimittel von großem Nutzen sein. Um dieses Potential zu verwirklichen ist es wichtig, über genaue Kenntnisse der Prozesse sowohl bei der Erzeugung von iPSCs als auch bei ihrer Differenzierung zu verfügen. Diese genaue Kenntnis ist auch unerlässlich, um die Sicherheit bei der Transplantation zu gewährleisten. Denn in dem aus iPSCs erzeugten

Transplantationsgewebe können nicht- oder unspezifisch differenzierte Stammzellen verbleiben, die potenziell zu Stammzelltumoren entarten (Rodrigues 2013; Yamanaka 2020).

Es gibt nun viele Hinweise darauf, dass NO als Mediator in die Steuerungsprozesse während der Zelldifferenzierung eingebunden ist. So zeigte sich beispielsweise bei neuronalen Vorläuferzellen, dass der für die terminale Differenzierung entscheidende Wachstumsfaktor, *nerve growth factor* (NGF), seine Wirkungen über den Mediator NO entfaltet (Peunova 1995). NGF führt in diesen Zellen zur vermehrten Expression verschiedener NOS-Isoformen (offenbar vor allem NOS2). Das so produzierte NO hemmt in der Folge die DNA-Synthese und verändert die Aktivität verschiedener Gene, wodurch zunächst die Zytostase und schließlich die terminale Differenzierung eingeleitet werden. Unter Zugabe eines NOS-Hemmers verblieben die Zellen in einem undifferenzierten Stadium, während L-Arginin bzw. exogenes NO die Differenzierung einleitete. Ähnliche Zusammenhänge zwischen differenzierenden Wachstumsfaktoren und der Expression von NOS, bzw. der NO-Produktion zeigten sich auch in anderen Zellen, etwa in Endothel- und Neuroblastomzellen (Morbidelli 1996; Ghigo 1998). Dabei scheint es auf eine genaue Feinsteuerung der NO-Produktion anzukommen, denn andere Studien zeigten, dass zu hohe oder zu niedrige NO-Level schnell zum Zelltod, bzw. zu embryonaler Fehlentwicklung führen können (Tiboni 2014).

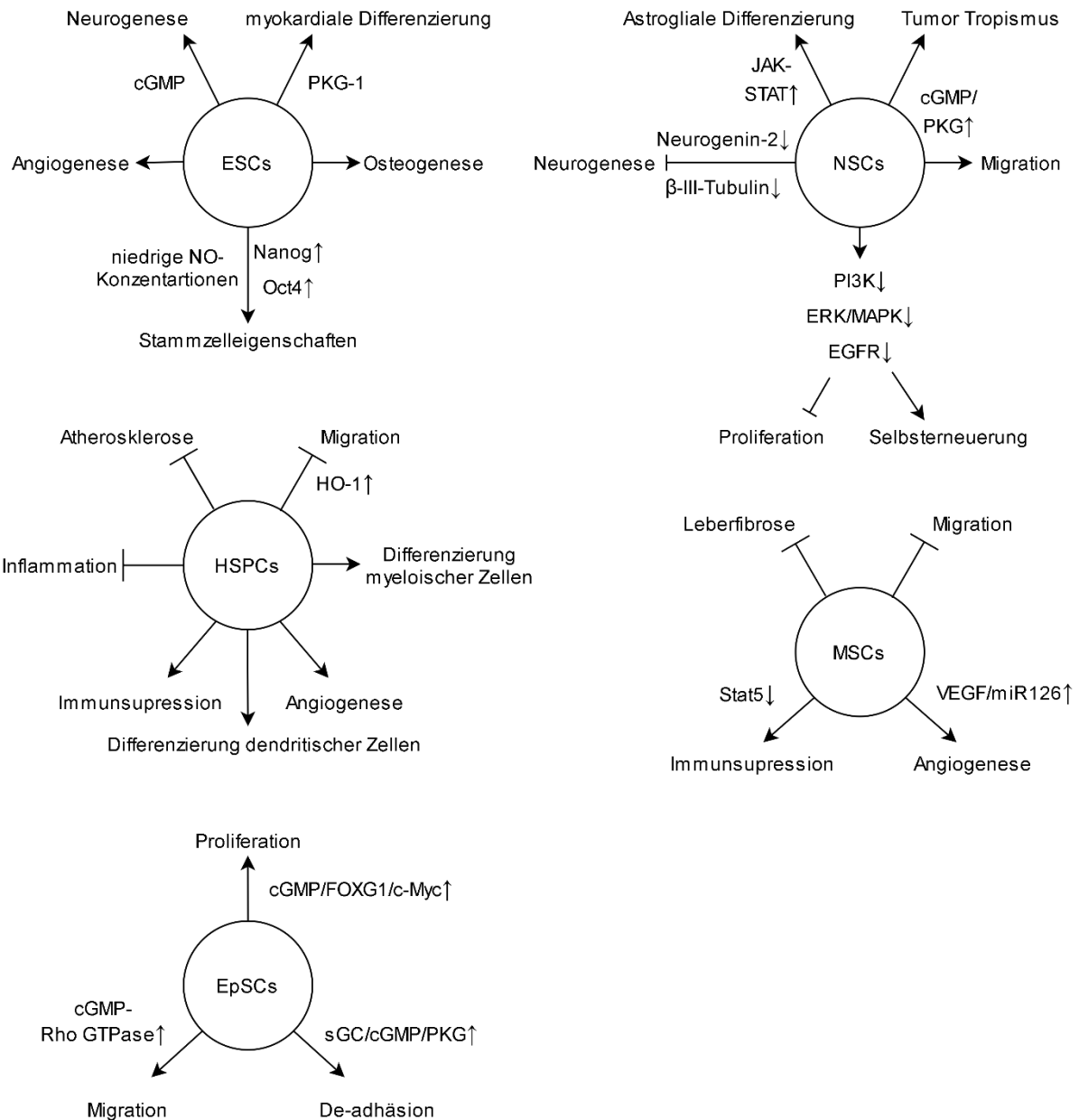
Auch in den Differenzierungsprozessen verschiedener Stammzellen spielt NO eine wichtige Rolle. So zeigte sich, dass niedrige NO-Konzentrationen die Differenzierung von hESCs verzögern können, während höhere Konzentrationen sie anregen. Dabei konnte man nachweisen, dass hohe NO-Level die Expression von Nanog und Oct4, zweier entscheidender differenzierungsbremsender Gene, herunterregulieren und somit die Differenzierung induzieren (Mora-Castilla 2010). Die Regulation der Gene wird von NO in diesem Fall durch kovalente Modifikationen am p53-Protein und an H3-Histonen herbeigeführt (vgl. Kapitel 3.5.2). Ein weiteres Beispiel für die Bedeutung des NO für die Differenzierung von ESCs ist die Herunterregulation von Sip1/ZEB2 (Rosati 2011). Dabei handelt es sich um ein Schlüsselprotein im Differenzierungsprozess von ESCs, dessen Repression mit der Differenzierung zu Geweben des Mesoderms und Endoderms in Verbindung steht. Die Regulation erreicht NO über die Induktion der Transkription von *microRNA*, namentlich der *microRNA*-200-Familie (vgl. Kapitel 3.5.3). Andere Studien konnten nachweisen, dass NO über den cGMP-Signalweg bzw. die Aktivierung der Proteinkinase G-1 die Differenzierung von ESCs zu peripheren Neuronen bzw. kardialen Gewebe induziert (Li 2010; Spinelli 2016).

In Studien zur Mobilisierung von hämatopoetischen Stammzellen/Progenitorzellen (HSPCs) aus dem Knochenmark ins periphere Blut zeigte sich deren Regulierbarkeit durch die NOS2 (Adamiak 2017). Erhöhte Expressionslevel der NOS2 führten über die Heraufregulierung der Häm-Oxygenase-1 zu einer verminderten Migration der HSPCs und umgekehrt. Die Verzögerung des Austrittszeitpunkts aus dem Knochenmark durch NO betrifft den Differenzierungsprozess der HSPCs mittelbar, insofern zumindest

die Entwicklung der myeloischen Zellen an das Verbleiben im Knochenmark gebunden ist. Eine andere Studie konnte den unmittelbaren Einfluss von NO auf die Differenzierung von HSPCs nachweisen: niedrige NO-Level während der Determinationsphase von CD34+-hämatopoetischen Stammzellen blockierten deren Differenzierung zu immunogenen dendritischen Zellen (Tiribuzi 2013). Die Zellen verbleiben in einem proliferativen Status und schließen die Differenzierung nicht ab. Dieses Ergebnis wird ergänzt durch eine Studie, die nachwies, dass die Inhibition der NOS zu einer Expansion der HSPCs im Knochenmark führen kann (Michurina 2004). NO scheint demnach sowohl in der Proliferation als auch in der Differenzierung von HSPCs eine wichtige Rolle als Regulator zu spielen.

Vergleichbares scheint für neuronale Stammzellen (NSCs) zu gelten. Hier fand man, dass hohe NO-Level die Proliferation von NSCs einschränken (Carreira 2014). Der Effekt konnte mit der NO-vermittelten hemmenden Nitrierung des *epidermal growth factor*-Rezeptors und der Hemmung des ERK/MAPK-Signalwegs in Zusammenhang gebracht werden. In die gleiche Richtung weisen Ergebnisse, welche die Herunterregulierung der für die Neuronendifferenzierung wichtigen Gene Neurogenin-2 und  $\beta$ -III-Tubulin durch hohe NO-Level belegen (Covacu 2006). Allerdings fand die gleiche Arbeitsgruppe auch einen begünstigenden Effekt des NO auf die Differenzierung von NSCs zu Astrogliazellen, der über den JAK-STAT-Signalweg vermittelt wird. Die pro-astrogliale Regulation könnte von Bedeutung für neuroregenerative Prozesse unter Entzündungsbedingungen mit hohen NO-Leveln sein. Hier erweist sich erneut die Ambivalenz der NO-Effekte.

Die Forschung zu den Wirkungen von NO auf die Entwicklung weiterer Stammzelllinien ist umfangreich. NO-vermittelte Effekte auf Migration, Immunsuppression und Angiogenese sind für Mesenchymale Stammzellen beschrieben; Effekte auf De-adhäsion, Migration und Proliferation für epidermale Stammzellen (Wang 2019). Eine Übersicht gibt Abbildung 3-4.



**Abbildung 3-4: Wirkungen von NO in verschiedenen Stammzellen**

Die Abbildung stellt eine Übersicht der Effekte von NO auf verschiedene Stammzelllinien dar. ESCs = embryonale Stammzellen; NSCs = neuronale SZ; HSPCs = hämatopoetische SZ/ Progenitorzelle; MSCs = mesenchymale SZ; EpSCs = epidermale SZ. Nach Wang, 2019.

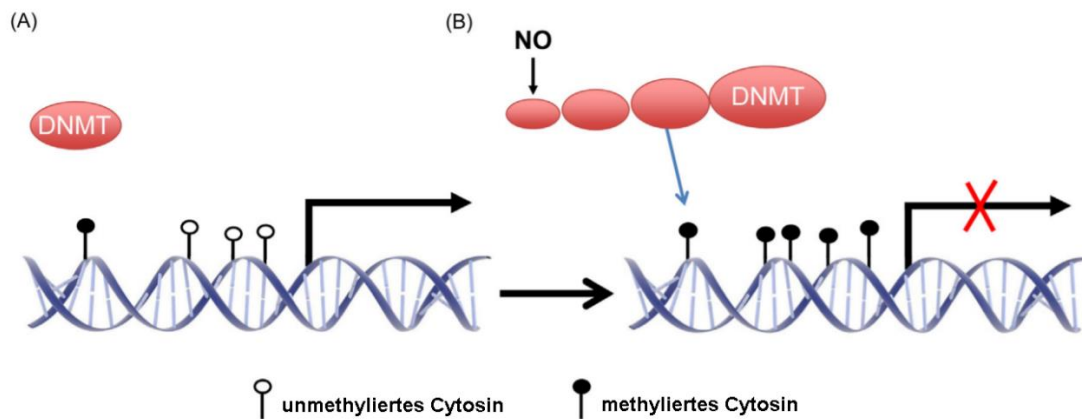
Insgesamt ergibt sich das Bild von NO als wichtigen Effektor der Proliferation und Differenzierung insbesondere von Stammzellen. Dabei sind die NO-Wirkungen komplex und weisen je nach Ausstattung der antwortenden Zelle in unterschiedliche Richtungen. Im Folgenden soll auf einige NO-vermittelte Mechanismen eingegangen werden, die grundlegende Bedeutung für Differenzierungsprozesse haben: die NO-vermittelten epigenetischen Mechanismen.

### 3.5 Epigenetische Effekte des NO

Epigenetik beschreibt die Regulation der Genexpression auf Chromatinebene durch Veränderung der Zugänglichkeit der DNA. Die maßgeblichen epigenetischen Mechanismen sind DNA-Methylierung, Modifikation von Histonen, Nukleosomenpositionierung und Veränderung der Zugänglichkeit durch *microRNA* und andere nicht-codierenden RNA. Zelldifferenzierung geht mit epigenetischen Veränderungen einher und Zelltypen werden in ihrem Differenzierungsstatus durch während der Differenzierung erworbene epigenetische Beschränkungen stabilisiert (Ozkul 2016). Die Destabilisierung des Differenzierungsstatus bei der Induktion von Pluripotenz oder bei Transdifferenzierung geht einher mit einer Veränderung oder Aufhebung jener epigenetischen Beschränkungen, also mit der Modifikation epigenetischer Plastizität (Silva 2008). Es lässt sich also sagen, dass die Grundlagen der Differenzierungsprozesse epigenetischer Natur sind. Im Folgenden sind die bekannten Rollen des NO bei verschiedenen epigenetischen Modifizierungsprozessen dargestellt.

#### 3.5.1 NO und DNA-Methylierung

Beim epigenetischen Prozess der DNA-Methylierung wird das Nukleotid Cytosin enzymatisch am 5'-C-Atom methyliert. Dies geschieht vornehmlich an sog. CpG-Inseln, also Stellen mit gehäuftem Vorkommen von Cytosin-Guanin-Sequenzmotiven. Eine vermehrte Methylierung ist assoziiert mit der Repression der entsprechenden Genabschnitte. Bis zu 70% der menschlichen Promotoren enthalten CpG-Inseln, die gewebespezifisch methyliert sind (Ignarro 2017). Es gibt einige Hinweise darauf, dass NOS2-Expression und NO-Produktion in Zusammenhang mit der DNA-Methylierung stehen. So konnte gezeigt werden, dass die Interleukin-1 $\beta$  stimulierte Expression der NOS2 und die dadurch erhöhte NO-Produktion mit der Aktivierung von DNA-Methyltransferase (DNMT) einhergeht (Hmadcha 1999). NO konnte direkt mit der DNMT-vermittelten epigenetischen Abschaltung von Genen mit CpG-reichen Promotorregionen in Zusammenhang gebracht werden. Außerdem ergaben Studien zu *Helicobacter pylori*, dass die Behandlung mit diesem Bakterium in menschlichen Krebszellen die NOS2-Expression (via NF $\kappa$ B) und die NO-Produktion stimuliert. Zugleich nimmt auch die DNA-Methylierung und die Aktivität von DNMTs signifikant zu. Sowohl NO-Produktion als auch DNA-Methylierung nehmen ab, wenn die Zellen mit einem NOS2-Inhibitor vorbehandelt werden. Möglicherweise ist die erhöhte NO-Produktion mittels der epigenetischen Abschaltung von Tumorsuppressorgenen entscheidend für die *H. pylori*-assoziierte Entstehung von Magenkarzinomen (Huang 2012).



**Abbildung 3-5: NO-vermittelte DNA-Methylierung**

(A) DNA-Methyltransferasen (DNMTs) methylieren Cytosin. Wenig methyliertes Cytosin in der Promotorregion führt zu Expression des nachfolgenden Gens. (B) Aktivierung der DNMTs durch NO führt zu vermehrter Methylierung der Promotorregion und zur Repression des nachfolgenden Gens. Nach Ignarro, 2017.

### 3.5.2 NO und Histonmodifikation

Die kleinste Verpackungseinheit des Chromatins ist das Nukleosom, in welchem der DNA-Strang 1,6-mal um einen basischen Proteinkern, den Histonkomplex gewunden ist. Der Histonkomplex ist ein Oktamer, bestehend aus je zwei Kopien der Histone H2A, H2B, H3 und H4. Am Oktamer lässt sich eine zentrale globuläre Domäne von den N-terminalen flexiblen Armen (*histone tails*) unterscheiden. Diese endständigen Arme sind Ziel spezifischer posttranslationaler Modifikationen, die auf verschiedene Weisen mit der DNA interagieren. So wird die Zugänglichkeit der DNA für die Transkription reguliert. Von den über 100 bekannten Histonmodifikationen sind die wichtigsten Acetylierung, Methylierung, Phosphorylierung und Ubiquitinierung (Ignarro 2017). Bei der Acetylierung findet die Übertragung oder Entfernung von Acetylgruppen auf Lysinreste von Histonen durch Histon-Acetyltransferasen (HAT) bzw. Histon-Deacetylasen (HDAC) statt. Die Acetylierung neutralisiert die positive Ladung des Lysins, was zu einer geringeren Wechselwirkung mit der negativ geladenen DNA führt. Es kommt zur Lockerung der DNA-Histon-Bindung und die DNA wird zugänglich für den Transkriptionsapparat.

Studien weisen nun darauf hin, dass NO die Acetylierungsrate von Histonen senkt. So zeigte sich etwa in Experimenten, in denen Entzündungen des Colons erzeugt und analysiert wurden, dass der Transkriptionsfaktor NFκB die Transkription des *intercellular adhesion molecule-1* (ICAM-1) induziert. Dies konnte auf die Deaktivierung von HDACs zurückgeführt werden, die zu einer vermehrten Acetylierung der ICAM-1-Promotorregion und zur Freigabe der dortigen NFκB-Bindestelle führte. Die Erhöhung der NO-Level führte dagegen zu einer vermehrten Expression der HDAC,

vermehrten Deacetylierung der ICAM-1-Promotorregion und schließlich in einer Herunterregulation von ICAM-1 (Li 2012).

In Muskelbiopsien von Patienten mit Duchenn'scher Muskeldystrophie fanden sich in Histonen dysregulierte Acetylierungsmuster, welche die Expression von proinflammatorischen Genen fördern. Mit NOS-Inhibitor behandelte Proben zeigten ebenfalls erhöhte Histon-Acetylierungsraten, wogegen die Erhöhung der NO-Level die Acetylierungsraten sinken ließ. Es konnte außerdem gezeigt werden, dass NO die bei Duchenn'scher Muskeldystrophie vorliegenden Acetylierungen auf das normale Maß reduzierte und darüber hinaus auch die Expression des pathologisch erniedrigten Dystrophins induzierte (Colussi 2009). Die Ergebnisse deuten darauf hin, dass NO eine bedeutende Rolle in die Steuerung der Histon-Acetylierung einnimmt. Die Steuerungstendenz geht mittels der Aktivierung von HDACs in Richtung Deacetylierung und somit Gen-Repression.

Eine weitere wichtige Histonmodifikation ist die Methylierung von Lysin- und Argininresten in *histone tails*. Die Methylierung kann sowohl positive als auch negative Effekte auf die Zugänglichkeit der DNA für die Transkription haben, wobei es auf die genaue Position und die Anzahl der Methylierungen pro Lysin/Arginin ankommt. Der Methylierungsstatus wird dynamisch durch die kombinierte Wirkung von Methyltransferasen und Demethylasen reguliert. Dabei gehören die Demethylasen hauptsächlich der *Jumonji C domain Fe(II)  $\alpha$ -ketoglutarate*-Proteinfamilie (KDM) an. Eine Studie konnte zeigen, dass NO direkt die Aktivität der KDM hemmt (Hickok 2013). Zellen die chemischen oder zellulären NO-Quellen ausgesetzt waren, zeigten einen globalen Anstieg der Histon-Methylierungsraten. Auch über diesen Mechanismus ist NO also direkt in epigenetische Regulationsprozesse eingebunden.

### 3.5.3 NO und *microRNAs*

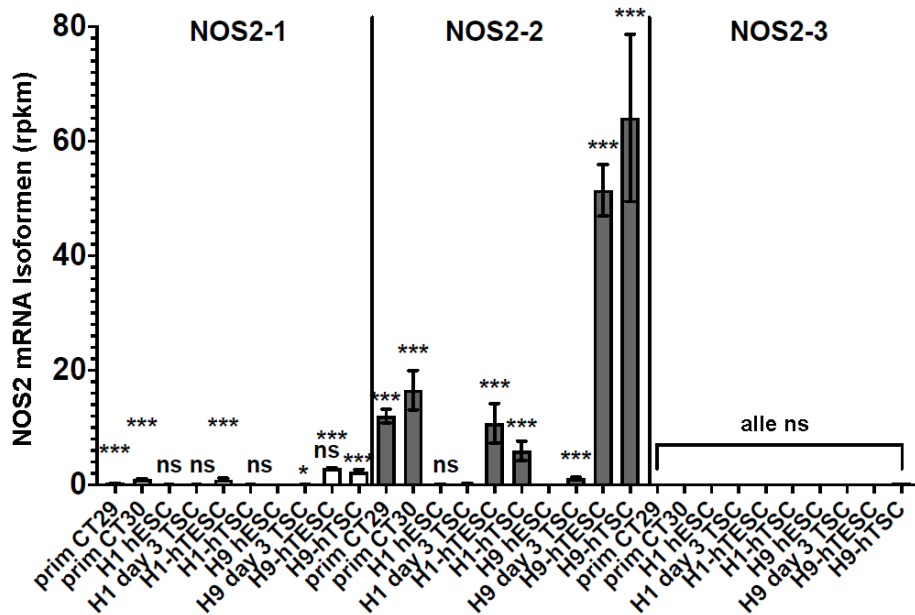
*MicroRNAs* sind kurze nicht-kodierende RNAs mit einer Länge von bis zu 23 nt. Sie regulieren die Expression von Genen hochspezifisch, indem sie an bestimmte Bereiche der 3'-UTR der mRNA (sog. *microRNA-recognition-sites*, MRE) von Zielgenen binden. Die vollständige Basenpaarung führt dabei zur Degradation, die unvollständige Basenpaarung zur Translationshemmung der Ziel-mRNA. Auf diese Weise wird bis zu 30% des proteincodierenden Genoms durch *microRNA* reguliert (Ignarro 2017). Neuere Studien weisen darauf hin, dass *microRNA* durch einen bisher unverstandenen Mechanismus auch zur Induktion von Genexpression führen kann (Valinezhad-Orang 2014). Es gibt nun einige Anzeichen dafür, dass NO im Zusammenhang mit der Regulation von *microRNA* steht. Bei der Analyse der Auswirkung von NO auf Brustkrebszellen zeigte sich, dass in Zellen, die für 24 h erhöhten NO-Leveln ausgesetzt waren, bis zu 45 Schlüssel-*microRNAs* herauf- und 72 herunterreguliert vorlagen (Vasudevan 2015). Bei Experimenten zur gezielten Differenzierung von mesenchymalen Stromazellen

zu Kardiomyozyten stellte sich NO als einer der unverzichtbaren Effektoren heraus, der zur Heraufregulation von für diesen Prozess wesentlichen *microRNAs* führte (Vecellio 2012). Ein weiteres Beispiel ist eine Studie, die zunächst zeigte, dass bei KRAS-mutierten Lungentumoren die Überexpression der NOS2 und anhaltende NO-Produktion positiv mit der Tumorgenese korrelieren. Anschließend konnte gezeigt werden, dass der NOS2-Knockout zur signifikanten Herunterregulation der für die Onkogenese entscheidenden *microRNA* (miR-21) führte, wodurch sich Tumorgenese und Tumorzellproliferation verringerten (Okayama 2013). Weitere Beobachtungen dieser Art belegen die Regulation von epigenetisch wirksamer *microRNA* durch NO.

### **3.6 Die Isoform NOS2-2 in differenzierenden Zellen**

Datenbankanalysen des *Human Protein Atlas* zeigten eine signifikante Expression der NOS2-mRNA (zunächst ohne Unterscheidung der Isoformen der Transkripte) im menschlichen Plazentagewebe, insbesondere in Zellen des Trophoblasts. Von Gather et al. durchgeführte Analysen von RNA-Seq-Datensätzen des *Sequence Read Archive* (SRA) dienten der genaueren Untersuchung der Expression der verschiedenen Isoformen der NOS2-mRNA (Gather 2022).

So zeigte sich etwa in einem Datensatz, der die Transkriptome der aus menschlicher Plazenta isolierten Trophoblast-Stammzellen CT29 und CT30 mit aus humanen embryonalen Stammzellen (hESC) differenzierten Trophoblast-Stammzellen H1- und H9-ESC vergleicht, hauptsächlich eine Expression der Isoform NOS2-2 (Mischler 2021) (vgl. Abbildung 3-6). Auch in RNA-Seq-Daten von aus Plazenta isolierten (Synzytio-)Trophoblastzellen und aus hESC differenzierten Synzytiotrophoblastzellen fand sich vorwiegend NOS2-2-Expression (Yabe 2016).

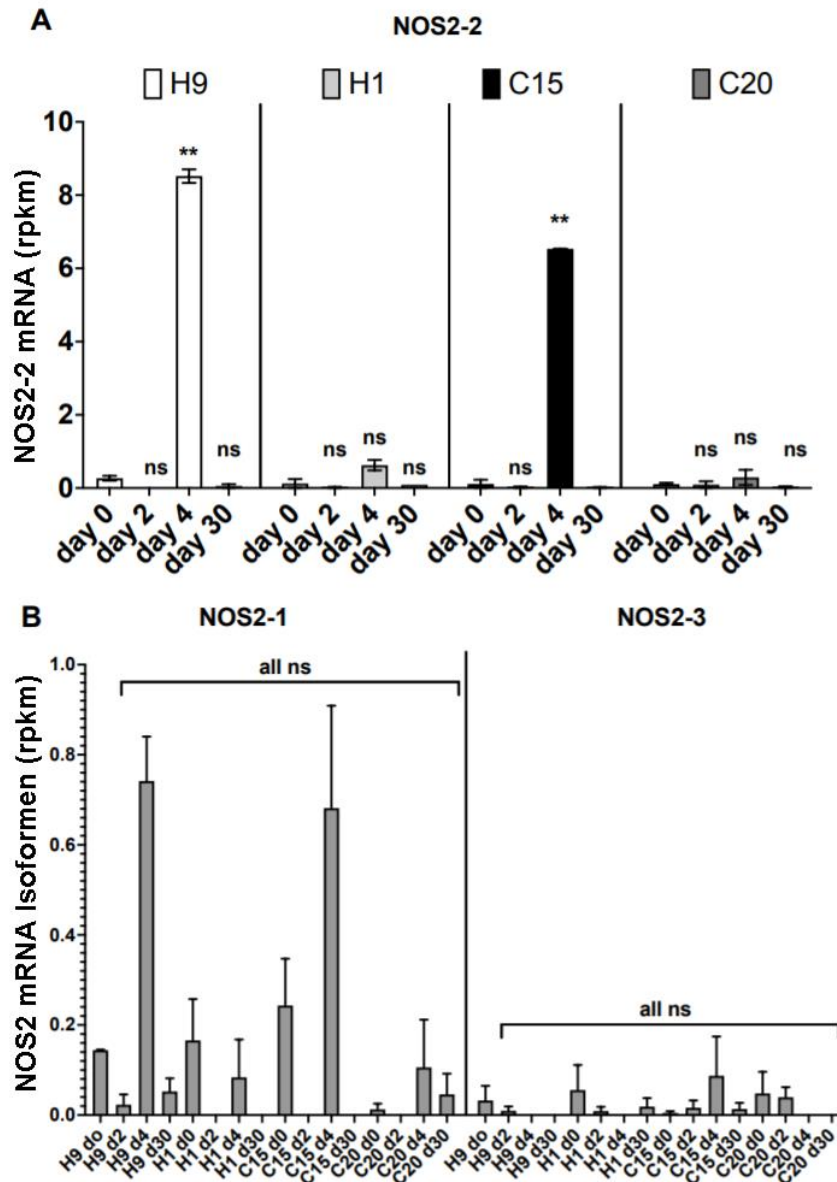


**Abbildung 3-6: Expression der NOS2-Isoformen in Trophoblast-Stammzellen.**

Gezeigt sind die auf NOS2-Isoform-Expression untersuchten RNA-Seq Daten von Mischler et al. (2021). In den aus menschlicher Plazenta gewonnenen Trophoblast-Stammzellen CT29 und CT30, sowie in den aus hESC differenzierten Trophoblast-Stammzellen H1- und H9-hTSC (ohne CD20-Expression) und H1- und H9-hTSC (mit CD20-Expression) findet sich hauptsächlich die Isoform NOS2-2. Mittlere  $\pm$ SEM der rpkm-Werte der NOS2 mRNA-Isoformen. \*\*\*  $p$ -Wert  $< 0,001$ ; ns  $p$ -Wert  $> 0,05$  gegen unbehandelte H9-ESC. Nach Gather 2022.

Die Daten weisen also auf eine spezifische Expression der NOS2-2-Isoform während der Differenzierung von Stammzellen hin. Weitere Untersuchungen der SRA-Datenbank richteten sich auf die Analyse der NOS2-Isoform-Expression im Zeitverlauf der Differenzierung von hESC und iPSC zu verschiedenen Zelltypen.

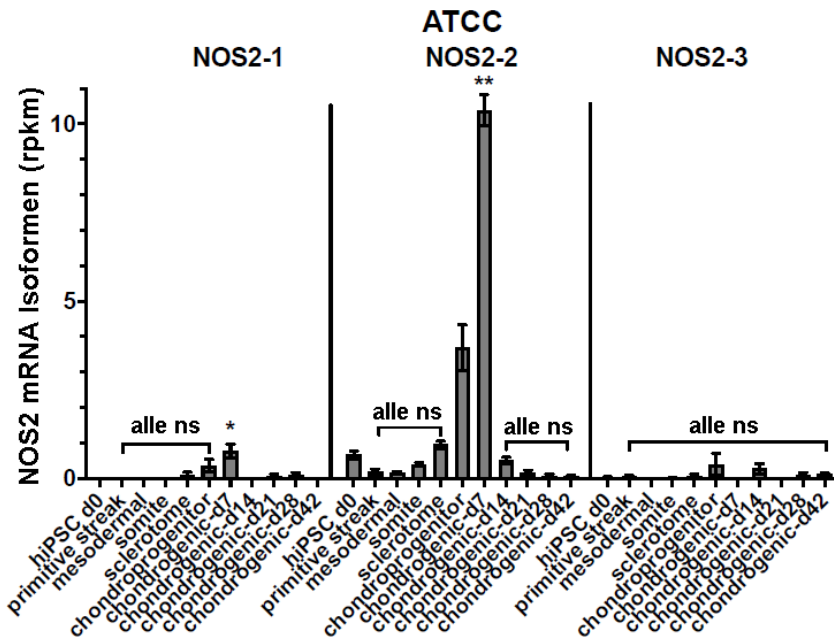
So etwa auf die Analyse der RNA-Seq-Daten von H1- und H9-ESC, sowie C15- und C20-iPSC, die zur Differenzierung zu Kardiomyozyten angeregt wurden (Liu 2017). Es zeigt sich, dass in H9-ESC und C15-iPSC am vierten Tag der Differenzierung die NOS2-2-Isoform im Gegensatz zu den anderen Isoformen in signifikantem Ausmaß exprimiert wird (vgl. Abbildung 3-7). Die Expression ist transient und bis zum dreißigsten Tag nicht mehr nachweisbar. In den H1-ESC und C20-iPSC ließ sich keine NOS2-2-Expression beobachten. Diesen Befund bestätigend zeigte sich auch in RNA-Seq-Daten von zu Kardiomyozyten differenzierenden CD34-iPSC am fünften Tag eine transiente NOS2-2-Expression (Zhang 2021).



**Abbildung 3-7: Expression der NOS2-Isoformen in zu Kardiomyozyten differenzierenden hESC und iPSC.**

Gezeigt sind die auf NOS2-Isoform-Expression untersuchten RNA-Seq Daten von Liu et al. (2017). Die zur Differenzierung zu Kardiomyozyten angeregten H9-ESC und C15-iPSC zeigen am vierten Tag eine signifikante transiente Expression der NOS2-2-Isoform (A) im Vergleich zu den anderen NOS2-Isoformen (B). Bei den H1-ESC und C20-iPSC lässt sich dagegen keine solche Expression beobachten. Mittlere  $\pm$ SEM der rpkm-Werte der NOS2 mRNA-Isoformen von Tag 0 bis 30. \*\*  $p$ -Wert  $< 0,01$ ; ns  $p$ -Wert  $> 0,05$  gegen Tag 0. Nach Gather 2022.

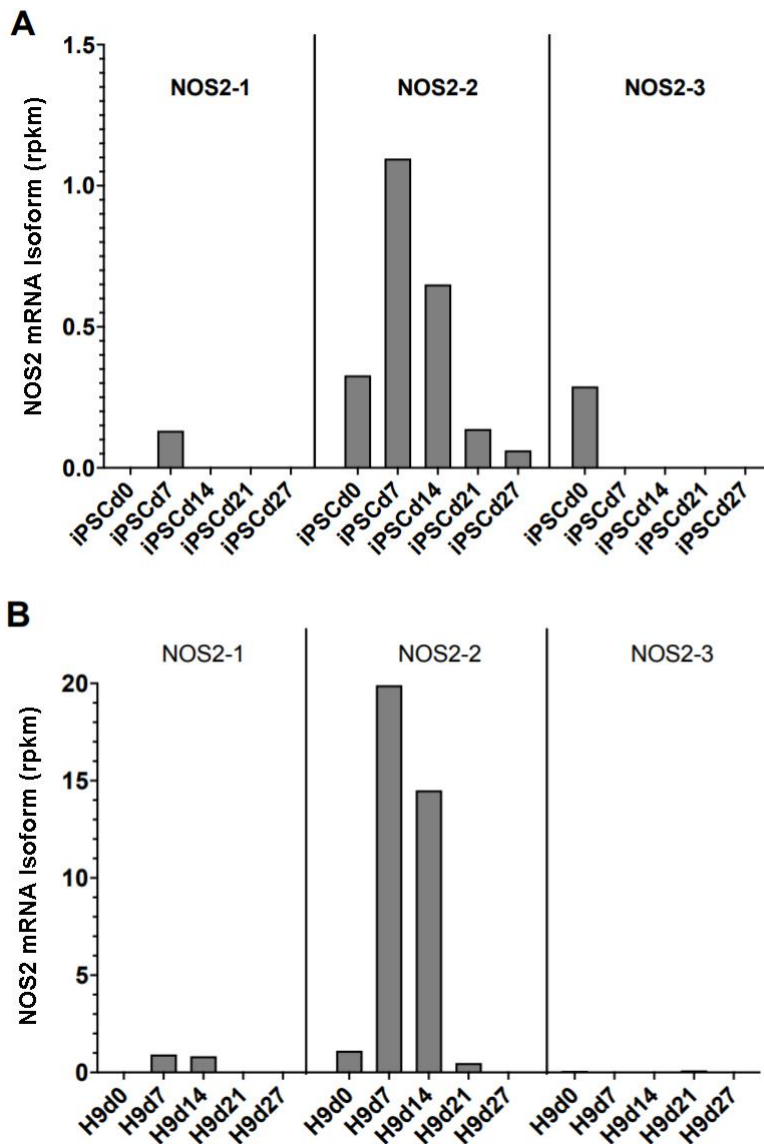
Ein weiterer Datensatz vergleicht die Transkriptome von drei verschiedenen iPSC-Linien (ATCC, BJFF und STAN), die zur Differenzierung zu Chondrozyten angeregt wurden (Wu 2021). Die bioinformatische Analyse von Gather et al. zeigte auch hier eine Expression der NOS2-2 (Gather 2022). Eine signifikante Expression gegenüber den anderen Isoformen lag allerdings nur in den von der ATCC-Linie stammenden Chondroprogenitorzellen an Tag 7 vor. (vgl. Abbildung 3-8).



**Abbildung 3-8: Expression der NOS2-Isoformen in zu Chondrozyten differenzierenden iPSC**

Gezeigt sind die auf NOS2-Isoform-Expression untersuchten RNA-Seq Daten von Wu et al. (2021). Die zur Differenzierung zu Chondrozyten angeregten ATCC-iPSC zeigen im Stadium der Chondroprogenitorzelle am siebten Tag eine signifikante transiente Expression der NOS2-2-Isoform gegenüber den anderen NOS2-Isoformen. Die iPSC-Linien BJFF und STAN (nicht gezeigt) exprimieren um das Chondroprogenitor-Stadium herum auch NOS2-2, jedoch nicht in signifikantem Ausmaß. Mittlere  $\pm$ SEM der rpkm-Werte der NOS2 mRNA-Isoformen von Tag 0 bis 42. \*\*  $p$ -Wert  $< 0,01$ ; ns  $p$ -Wert  $> 0,05$  gegen Tag 0. Nach Gather 2022.

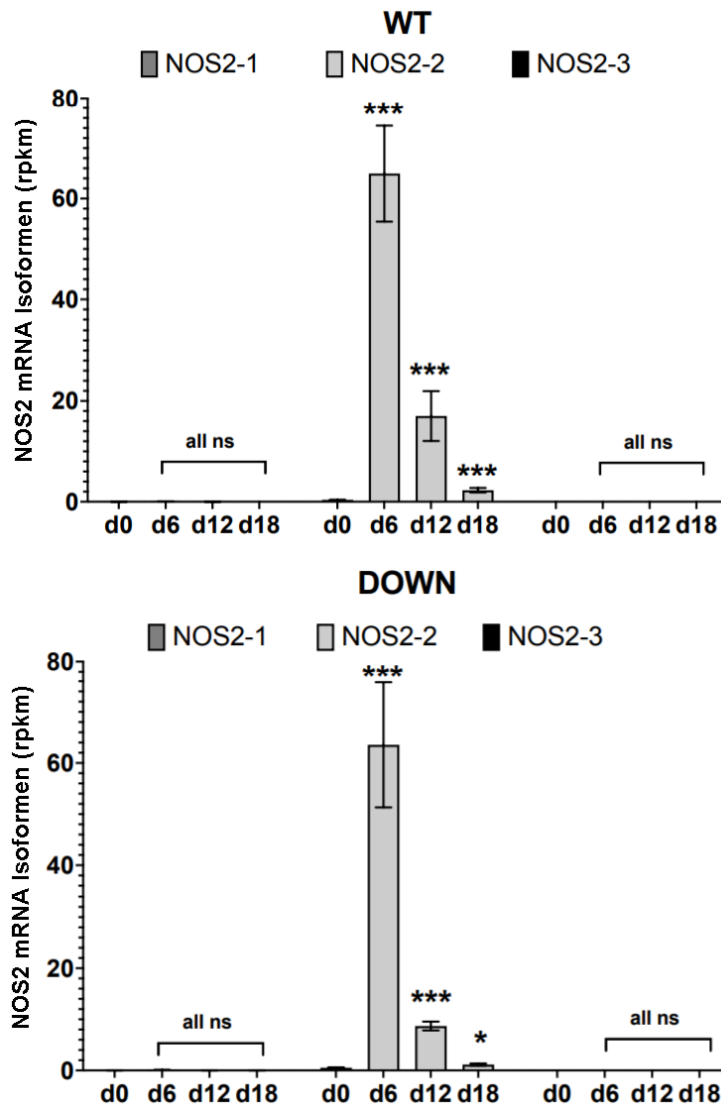
Ein weiterer Datensatz vergleicht die Transkriptome von H9-ESC und aus menschlichen Fibroblasten erzeugten iPSC, die zur Differenzierung zu mesenchymalen Stromazellen angeregt wurden (Luo 2020). Die Untersuchung auf die NOS2-Isoform-Expression zeigte auch hier transient erhöhte Werte für das NOS2-2-Transkript, mit einem Maximum am siebten Tag (vgl. Abbildung 3-9).



**Abbildung 3-9: Expression der NOS2-Isoformen in zu mesenchymalen Stromazellen differenzierenden hESC und iPSC**  
 Gezeigt sind die auf NOS2-Isoform-Expression untersuchten RNA-Seq Daten von Luo et al. (2020). Die zur Differenzierung zu mesenchymalen Stromazellen angeregten iPSC (A) und H9-ESC (B) exprimieren transient die NOS2-2-Isoform mit einem Maximum am siebten Tag. Dabei zeigen die iPSC ein wesentlich geringeres Expressionslevel. Gezeigt sind die rpkm-Werte aus Einzelexperimenten von Tag 0 bis 27. Nach Gather, 2022.

Zur Analyse der NOS2-Isoform-Expression während der Differenzierung von Stammzellen zu Neuronen wurde ein Datensatz herangezogen, der von gesunden Probanden gewonnene iPSC (WT) mit von Down-Syndrom-Patienten gewonnenen iPSC (DOWN) vergleicht (Hon 2017). Hier zeigte sich während der Differenzierung zu Neuronen eine gegenüber den anderen Isoformen signifikante transiente NOS2-2-Expression mit einem Maximum am sechsten Tag, wobei sich die Expressionslevel zwischen WT und DOWN nicht wesentlich unterschieden (vgl. Abbildung 3-10). Vergleichbare Ergebnisse ließen

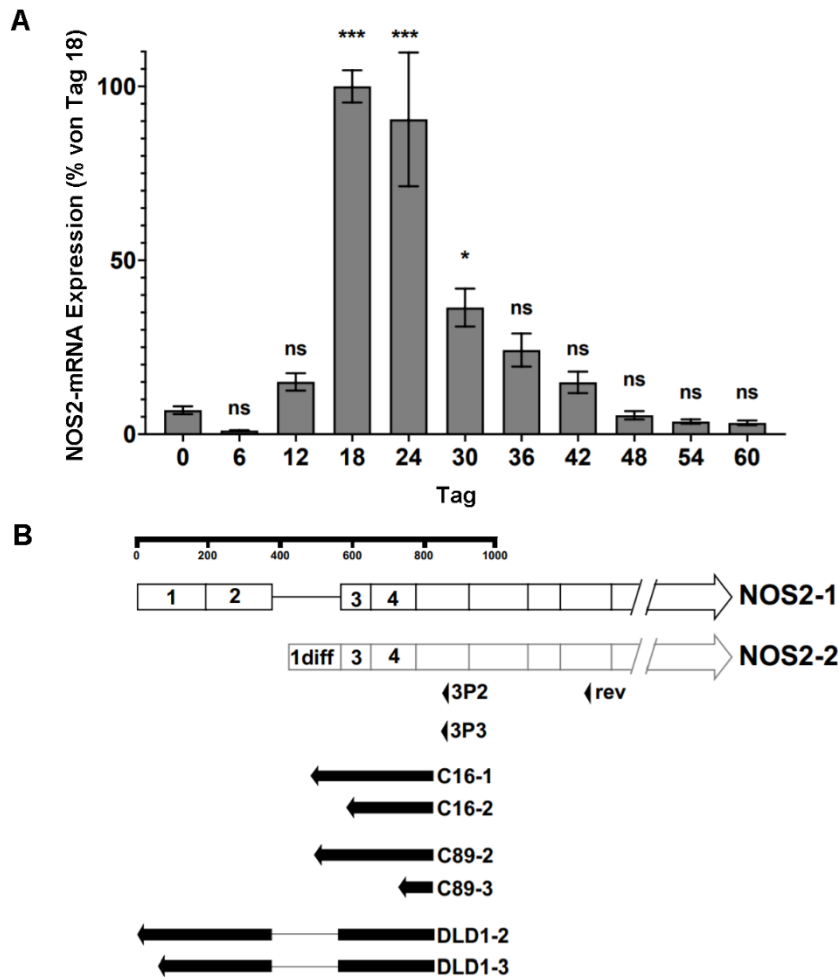
sich auch in Datensätzen von nach anderen Protokollen behandelten zu Neuronen differenzierenden hESC und iPSC beobachten (Gather 2022).



**Abbildung 3-10: Expression der NOS2-Isoformen in zu Neuronen differenzierenden iPSC**

Gezeigt sind die auf NOS2-Isoform-Expression untersuchten RNA-Seq Daten von Hon et al. (2017). Die iPSC wurden von gesunden Probanden (WT) und Down-Syndrom-Patienten (DOWN) gewonnen und zur Differenzierung in Neurone angeregt. Ab dem sechsten Tag zeigt sich eine gegenüber den anderen Isoformen signifikante transiente Expression des NOS2-2-Transkripts. Die Expressionslevel von WT und DOWN unterscheiden sich dabei nicht wesentlich. Mittlere  $\pm$ SEM der rpkm-Werte der NOS2 mRNA-Isoformen von Tag 0 bis 18. \*\* p-Wert < 0,001; ns p-Wert > 0,05 gegen Tag 0. Nach Gather, 2022.

Zur Bestätigung der bioinformatisch gewonnenen Erkenntnisse bei der Neuronendifferenzierung wurden weitere Experimente durchgeführt. Vier unterschiedliche menschliche iPSC-Linien wurden zur Differenzierung zu glutaminergen Neuronen angeregt (Gather 2022). Die RNA wurde zu verschiedenen Zeitpunkten (0 bis 60 Tage) isoliert und mittels qRT-PCR auf die Expression der NOS2 untersucht. Dabei zeigte sich eine transiente Induktion der NOS2-mRNA-Expression mit Maxima an den Tagen 18 und 24. Da die in der qRT-PCR verwendeten Primer nicht zwischen den Isoformen der NOS2-Transkripte unterschieden, wurden mit der an Tag 18 aus iPSC isolierten mRNA und der mRNA aus zytokinstimulierten DLD-1-Zellen 5'-RACE-Experimente angeschlossen. Während die von den zytokinstimulierten DLD-1-Zellen exprimierte mRNA die Exone 1 und 2 der NOS2-1 enthielt, zeigte sich, dass diese Exone bei der iPSC-mRNA durch das Exon-1-diff ersetzt war (vgl. Abbildung 3-11). Somit bestätigte sich erneut, dass während der Differenzierung von Stammzellen zu Neuronen das NOS2-2-Transkript exprimiert wird.



**Abbildung 3-11: NOS2 Expression in vier verschiedenen zu Neuronen differenzierenden iPSC**

*A: Zusammenfassung der NOS2-RNA-Expression von vier verschiedenen zu glutaminergen Neuronen differenzierenden iPSC (iLB-C16bm, iLB-C16bm-2, iLB-C89bf und iLB-C133bm) zu verschiedenen Zeitpunkten. Die Expression von NOS2-mRNA und 18S-rRNA wurde in der qRT-PCR ermittelt und auf 18S-rRNA normalisiert. Die relative NOS2-Expression an Tag 18 wurde auf 100% gesetzt. B: Zusammenfassung der Ergebnisse der 5'-RACE-Analyse mit Isoform-spezifischen Primern von an Tag 18 isolierter iPSC-RNA. Die Kontroll-RNA stammt aus zytokinstimulierten DLD-1-Zellen. Die PCR-Produkte wurden kloniert, sequenziert und mit den Sequenzen der NOS2-1 und -2 verglichen. Zu A: Mittlere  $\pm$ SEM von  $n=12$  RNAs pro Zeitpunkt. \*\*\*  $p$ -Wert  $< 0,001$ ; \* $p < 0,05$ , ns gegen iPSC an Tag 0. Nach Gather, 2022.*

Zusammenfassend lässt sich also sagen: die zielgerichtete bioinformatische Auswertung von Datensätzen wies erstmals darauf hin, dass während der Differenzierung von embryonalen und induzierten Stammzellen zu verschiedenen somatischen Zellen, ein Transkript der NOS2 auftritt, das sich von dem sonst hauptsächlich bekannten durch ein alternatives erstes Exon unterscheidet. Es ist außerdem ersichtlich, dass dieses Transkript zu bestimmten Zeitpunkten der Entwicklung transient erscheint und dass sein Expressionslevel dann signifikant höher liegt als das der anderen Isoformen. Im Verlauf verschwindet es dann wieder und es erscheint nicht bei sämtlichen Stammzell-Linien. Das tatsächliche Vorliegen des NOS2-2-Transkripts konnte schließlich durch die o.g. Experimente bestätigt werden.

## 4 Zielsetzung

Vieles ist über die Rolle des bioaktiven NO in der menschlichen Physiologie und Pathophysiologie bekannt. Als Signalmolekül ist es in sehr viele Regulationsmechanismen eingebunden, als zytotoxischer Effektor in wichtige Abwehrprozesse. Eine Dysregulation der NO-Produktion stößt pathologische Prozesse an und wird mit zahlreichen Krankheiten in Verbindung gebracht. Daher ist jede Erweiterung der Kenntnisse über die Prozesse des NO von Interesse und kann im Zweifel helfen, Krankheiten besser zu verstehen und zu bekämpfen.

Immer deutlicher zeigt sich auch die Bedeutung des NO in der Feinregulation der Zelldifferenzierung, insbesondere von Stammzellen. Datenanalysen wiesen darauf hin, dass in bestimmten differenzierenden Stammzellen eine Isoform der bekannten NOS2 (induzierbare NOS), die sog. NOS2-2 transient exprimiert wird. Ziel dieser Arbeit war es zu untersuchen, ob die NOS2-2 funktional im Sinne der Fähigkeit zur NO-Produktion ist. Dies würde darauf hindeuten, dass das transiente Erscheinen der NOS2-2 nicht zufällig, sondern potenziell bedeutsam für die jeweiligen Differenzierungsprozesse ist. Plasmide mit der NOS2-2-Sequenz wurden in Zellen transfiziert, zur Expression angeregt und die NO-Produktion quantifiziert.

Die bioinformatische Vorarbeit ergab weiterhin, dass das Transkript der NOS2-2 sich von dem der NOS2-1 vor allem durch ein alternatives erstes Exon unterscheidet, das an die Stelle der ersten beiden Exons der NOS2-1 tritt. Dies deutet darauf hin, dass die Expression der NOS2-2 durch einen eigenen vorgelagerten Regulationskomplex, einen eigenen Promotor, gesteuert werden könnte. Dieser NOS2-2-Promotor würde sich demnach von dem bekannten NOS2-1-Promotor unterscheiden. Seine Aktivität könnte z.B. weniger an die Bedürfnisse der Immunabwehr als vielmehr an die Signale der differenzierenden Zelle gebunden sein. Die bioinformatische Analyse identifizierte sieben Transkriptionsfaktoren, die in der putativen NOS2-2-Promotorregion binden können und zugleich während der transienten NOS2-2-Expression signifikante Regulation erfahren. Ziel dieser Arbeit war es, eine Auswahl dieser Transkriptionsfaktoren auf ihre Wirksamkeit hinsichtlich der NOS2-Expression zu untersuchen. Expressionsplasmide dieser Transkriptionsfaktoren wurden in Zellen transfiziert und die Entstehung von NOS2-mRNA mittels qRT-PCR gemessen.

## 5 Material

Die verwendeten Geräte und Materialien sind in den folgenden Tabellen aufgelistet.

**Tabelle 5-1: Laborgeräte**

<b>Funktion</b>	<b>Gerät</b>	<b>Bezeichnung</b>	<b>Hersteller</b>	
Elektrophorese	Gleichstromquelle für die Agarose-Gelelektrophorese	GPS 200/400	Pharmacia	
	Vertikal-Gelelektrophoresekammer	Mini-Protean 3 Cell	Bio-Rad	
Kühlung	+ 4° C-Kühlschrank	Profi line	Liebherr	
		Verschiedene Modelle	Bosch	
	- 20° C-Gefrierschrank	Protan Comfort	Liebherr	
	- 80° C-Gefrierschrank	Herafreeze	Heraeus	
Messung	Platten-Luminometer	Centro LB 960	Berthold	
	PCR-Gerät	MyCycler	Bio-Rad	
		MyiQ Cycler		
		CFX Connect		
	Spektrometer		NanoDrop 2000	NanoDrop
			Sunrise	Tecan
Präzisionswaage		Analytic AC120	Sartorius	
		Kern 444-35 N	Kern	
		Kern PCB		
Pipetten	Einkanalpipetten	0,510 µl	Brand / Eppendorf	
		10100 µl		
		1001000 µl		
	Mehrkanalpipette	Multipette Plus (0,510 µl)	Eppendorf	
Zellkultur	Pipettierhilfe	Pipetboy	IBS	
	Brutschrank	Hera Cell 150	Heraeus	
	Mikroskop	Leica DMIL	Leica	
	Sterile Werkbank	Herasafe	Heraeus	
	Zählkammer	Neubauer-Zählkammer	Labotec	
Zentrifugen	Kühlzentrifuge	MicroStar 17R	VWR	
		Megafuge 1.0R	Heraeus	
		Biofuge fresco		
		Avanti J-30 I	Beckmann	
	Tischzentrifuge	Biofuge 12	Heraeus	
		Galaxy Mini	Merck	
Sonstige Geräte	Autoklav	Laboklav	VWR	
	Bunsenbrenner	Fireboy eco	IBS	
	Eismaschine		Ziegra	
	Heizblock		Peqlab	
	Inkubationsschrank	B28	Binder	
	Magnetrührer	Ikamag RCT	IKA	

	Combimag RCT	
	Big-Squid Ikamag	
Mikrowelle		MDA
Schüttler	KS 250 Basic	IKA
	Innova 40	NBS
	DRS-12	NeoLab
UV-Transilluminator		Intas
Vakuumpumpe	Vacunsafe Comfort	IBS
Wasseraufbereitung	Milli-Q plus	Millipore
Wasserbad	Julabo TW20	Julabo

**Tabelle 5-2: Verbrauchsmaterialien**

<b>Artikel</b>	<b>Beschreibung</b>	<b>Hersteller</b>
Beschichtete Gewebekultur-Petrischale	Durchmesser: 9,4 cm; Wachstumsfläche: 58 cm <sup>2</sup>	Cellstar
Einweg-Auslaufpipetten	5 ml 10 ml 25 ml	Greiner
Kunststoff-Pipettenspitzen	0,5 – 10 µl 10 – 100 µl 100 – 1000 µl	Greiner / Sarstedt
Reaktionsgefäße	0,2 ml 1,5 ml 2,2 ml 5 ml	Peqlab / Sarstedt
Zellkulturflasche Filter Top	25 cm <sup>2</sup> (50 ml) 75 cm <sup>2</sup> (250 ml)	Greiner
Zellkulturplatten	6-Loch (Vertiefung 9,6 cm <sup>2</sup> ) 24-Loch (Vertiefung: 1,75 cm <sup>2</sup> )	Cellstar
Zellschaber	Steril, 24 cm	TPP
PCR-Gefäße	96-Loch für cDNA-Synthese 96-Loch für qRT-PCR 8-Loch-Streifen mit Deckel	Biozym Greiner Peqlab
Zentrifugenröhrchen	15 ml 50 ml	Greiner

**Tabelle 5-3: Reagenzien**

<b>Substanz</b>	<b>Hersteller</b>
Adenosintriphosphat	AppliChem
Agarose	Roth
Ammoniumchlorid	Sigma Aldrich
Ampicillin	Roth
Bromphenolblau	Sigma Aldrich
BSA (Bovines Serum Albumin, Fraktion V)	AppliChem
Calciumchlorid	Roth
Coelenterazin	PJK
Coenzym A-Trilithiumsalz-Dihydrat	AppliChem
DEPC (Diethylpyrocarbonat)	Sigma Aldrich
D-Luciferin	PJK
DMEM ( <i>Dulbecco's modified Eagle's Medium</i> )	Sigma Aldrich
DMSO (Dimethylsulfoxid)	Sigma Aldrich
dNTPs (dATP, dCTP, dGTP, dTTP)	Peqlab
EDTA (Ethyldiamintetraacetat)	AppliChem
Ethanol	AppliChem
FCS ( <i>fetal calf serum</i> )	PAA
GIT (Guanidiniumisothiocyanat)	Roth
Glycerin	Roth
Glycin	Roth
Isomylalkohol	AppliChem
Isopropanol	AppliChem
Kaliumchlorid	Roth
L-Glutamin	Sigma Aldrich
Natriumacetat	Roth
Natriumchlorid	Roth
NED (N-1-naphthylethyldiamindihydrochlorid)	Promega
PBS ( <i>phosphate buffered saline</i> )	GIBCO
Penicillin/Streptomycin, 100x	GIBCO
Phenol	Roth
PLB ( <i>passive lysis buffer</i> ), 5x	Promega
Pyruvat	Roth
Roti-safe	Roth
Salzsäure	Roth
SDS ( <i>sodium dodecyl sulfate</i> ) ultra pure	Roth
Sulfanilamid	Promega
Tetrazyklin	
TRIS (Trishydroxymethylaminomethan)	AppliChem
Trypanblau, 4%	Serva
Trypsin/EDTA-Lösung, 10x	PAA
Xylencyanolblau	AppliChem
Zeocin	Invitrogen

**Tabelle 5-4: Puffer und Lösungen**

<b>Name</b>	<b>Zusammensetzung</b>
DEPC-Wasser	DNA-Wasser mit 0,1 Vol% DEPC, autoklaviert
DNA-Wasser	Autoklaviertes und deionisiertes Wasser
DNA-Probenpuffer, 10x	50% Glycerin 0,1% Bromphenolblau 0,1% Xylencyanolblau in DNA-Wasser
dNTPs, 10 mM	10 mM dATP 10 mM dCTP 10 mM dGTP 10 mM dTTP in Wasser
Ethanol, 70%	70% Ethanol in DNA-Wasser
Ethanol, 80%	80% Ethanol in DEPC-Wasser
GIT-Puffer	4 M GIT 2 mM Natriumcitrat 0,5% Sarcosyl 0,1 M $\beta$ -Mecaptoethanol in DEPC-Wasser
LB-Medium	1% Bactotrypton 1% NaCl 0,5% Hefeextrakt in Wasser, autoklaviert
LB-Amp-Medium	LB-Medium 100 $\mu$ g/ml Ampicillin
Luciferase-Puffer, 2x	60 mM Tricin 0,2 mM EDTA 30 mM MgSO <sub>4</sub> 20 mM DTT in Wasser
Luciferase-Substrat	2x Luciferase-Puffer 12,5 mM D-Luciferin 27 $\mu$ M Coenzym A 100 mM ATP in Wasser
Maniatis I	50 mM Glucose 25 mM TRIS-HCL 10 mM EDTA in Wasser pH 8,8

Maniatis II	0,2 M NaOH 1% SDS in Wasser
Maniatis III	3 M KAc in Wasser pH 4,8
NaAc, 2 M	2 M NaAc in DEPC-Wasser
NaAc 3 M	3 M NaAc in DNA-Wasser
PLB, 1x	20% 5x PLB in Wasser
Renilla-Substrat	0,1 M NaCl 25 mM TRIS-HCL 1 mM CaCl <sub>2</sub> 0,9 µM Coelenterazin in Wasser pH 7,5
RNase A	0,73 mM RNase in Wasser
TAE-Puffer	400 mM TRIS 20 mM Na <sub>2</sub> -EDTA 1,142% AcOH in Wasser pH 8,0

**Tabelle 5-5: Kits**

<b>Name</b>	<b>Verwendung</b>	<b>Hersteller</b>
<i>Griess Assay Reagent System</i>	Griess-Assay	Promega
<i>High Capacity cDNA Reverse Transcription</i>	Reverse Transkription	Applied Biosystems
<i>M-MuLV Reverse Transcriptase</i>	Reverse Transkription	New England Biolabs
<i>OneTaq® 2X Master Mix</i>	Polymerase für PCR	
<i>Q5 High-Fidelity® DNA Polymerase</i>	Polymerase für PCR	
<i>Precision Plus® Master Mix SYBR Green</i>	SYBR Green PCR	PrimerDesign
<i>High Pure® Plasmid Filter Midiprep Kit</i>	Midi-Präparation	Invitrogen
<i>Monarch® DNA Gel Extraction Kit</i>	DNA-Aufreinigung	New England Biolabs
<i>Monarch® PCR &amp; DNA Cleanup Kit</i>	DNA-Aufreinigung	
<i>High Pure® PCR Product Purification Kit</i>	DNA-Aufreinigung	Roche
<i>GeneJuice®</i>	Transfektionsreagenz	Merck

**Tabelle 5-6: Cytokine**

<b>Name</b>	<b>Konzentration der Stammlösung</b>	<b>Hersteller</b>
Humanes rekombinantes TNF $\alpha$	50 $\mu$ g/ml	Miltenyi Biotec
Humanes rekombinantes IL1 $\beta$	10 $\mu$ g/ml	
Humanes rekombinantes IFN $\gamma$	100 $\mu$ g/ml	

**Tabelle 5-7: Marker**

<b>Name</b>	<b>Verwendung</b>	<b>Hersteller</b>
<i>1 kb Gene Ruler DNA Ladder</i>	Agarose-GE	Thermo Scientific
<i>Quick-Load 50 bp DNA Ladder</i>		New England Biolabs

**Tabelle 5-8: Enzyme**

<b>Substanz</b>	<b>Beschreibung</b>	<b>Hersteller</b>
CIAP (Alkaline Phosphatase)	5'-Dephosphorylierung	Roche
BamHI	Restriktionsenzym	New England Biolabs
DpnI		
EcoRI		
EcoRV		
HindIII		
PNK (T4 Polynukleotid-Kinase)	Kinasierung	
RNAse A	RNA-Verdau	Sigma
T4-DNA-Ligase	Ligation	New England Biolabs
XbaI	Restriktionsenzym	

**Tabelle 5-9: Oligonukleotide**

<b>Name</b>	<b>Sequenz</b>
Ex1-diff_5P	5'-GTACCGAGCTCGGATCTCGAGAGGCGCGTGGAGCCAGCGG-3'
Ex1-diff_3P	5'-GGTCATCCTGTGTCACTG-GACTGGCTCTGCGCGGGCAGC-3'
huGAPDH	5'-CCCATGTTTCGTCATGGGTGT-3'
huiNOS	5'-TGCAGACACGTGCGTTACTCC-3'
NOS2-1_5P	5'-GATCTCGAGGAGATGGCCTGTCCTTG-3'
NOS2-1_3P	5'-CCTCTAGAGCTTTGATTAAGTAAAATGC-3'

**Tabelle 5-10: Zellen**

<b>Name</b>	<b>Beschreibung</b>
DLD1	Humane Kolon-Adenokarzinomzellen
DLD1TR7	enthalten das Tet-On-Expressionssystem

**Tabelle 5-11: Plasmide**

<b>Name</b>	<b>Beschreibung</b>
pcDNA4TO	enthält CMV-Promotor vor Insertionsstelle
pcDNA4/TO-NOS2-1_cds_3UTR	enthält die cds der NOS2-1
pcDNA4/TO-NOS2-2_cds_3UTR	enthält die cds der NOS2-2
pGL3-control	für Klonierungen
pRLEF1 $\alpha$	Referenzplasmid mit der cDNA der <i>Renilla</i> -Luciferase
pFUGW-H1_mu_BMI1	enthält BMI1
pBABE-puro LEF1	enthält LEF1
pMSCV_mu_MEIS1B	enthält MEIS1b
pTetO-FUW-PLAGL1	enthält PLAG1
pUb6-Zpo1-V5/His	enthält Zpo1

## **6 Methoden**

### **6.1 Zellbiologische Methoden**

#### **6.1.1 Kultivieren von Zellen**

Alle Arbeiten zur Kultivierung eukaryotischer Zellen wurden unter sterilen Bedingungen durchgeführt. Verwendet wurden ausschließlich steril verpackte oder autoklavierte Materialien. Die Kultivierung erfolgte in Filter-Top-Zellkulturflaschen, Lochplatten oder Schalen, bei 37° C, 100% Luftfeuchtigkeit und Begasung mit 5% CO<sub>2</sub>. Kulturmedien und sonstige Substanzen wurden vor der Verwendung mindestens auf Raumtemperatur erwärmt. Standardmedium war 1x DMEM mit 4,5 g/L Glukose, 10% FCS, 1% Penicillin-Streptomycin mit Zusatz von Pyruvat. Die Zellkulturen wurden passagiert, sobald sie konfluent waren. Dazu wurden sie mit 1x PBS gewaschen, mit 5x Trypsin/EDTA vom Flaschenboden gelöst und 5 bis 10% der Zellen in frischem Medium subkultiviert.

#### **6.1.2 Kryokonservierung und Rekultivierung von Zellen**

Zur Kultivierung von Zellen wurde auf in flüssigem Stickstoff (-196° C) eingefrorene Zell-Aliquote aus der laboreigenen Zellbank zurückgegriffen. Diese wurden nach dem Auftauen im 37°-C-Wasserbad in 10 ml Nährmedium überführt und zentrifugiert (5 min, 1200 rpm, 4° C), um das Gefrierschutzmittel DMSO zu entfernen. Das Zellpellet wurde in Nährmedium resuspendiert und im Brutschrank inkubiert.

Zum Erhalt des laboreigenen Zellbestandes wurden Zellen regelmäßig kryokonserviert. Dazu wurden sie mit 1x PBS gewaschen und mit 5x Trypsin/EDTA vom Flaschenboden gelöst. Der einzufrierende Teil der Zellsuspension wurde zentrifugiert (s.o.) und das Zellpellet in 1 ml Einfrierlösung (FCS mit 10% DMSO) pro Aliquot suspendiert. Anschließend wurden die Aliquote in einer Isopropanol-Box langsam auf -80° C abgekühlt, bevor sie nach 24 h in flüssigem Stickstoff gelagert wurden.

#### **6.1.3 Bestimmung der Zellzahl und Aussaat**

Um Zellen für Experimente in genau bemessener Quantität auszusäen, muss zunächst die Lebendzellzahl bestimmt werden. Hierzu wurden Zellen wie in Kapitel 6.1.1 beschrieben gelöst und die Zellsuspension im Verhältnis 1:2 mit Trypanblau versetzt. Dieser Farbstoff passiert die intakte Zellmembran nicht und färbt somit nur abgestorbene Zellen. Das Gemisch wurde auf eine Neubauer-

Zählkammer aufgetragen und die Quadrate des Zählrasters unter dem Lichtmikroskop ausgezählt. Zur Bestimmung der Zellzahl pro Volumen Suspension kam folgende Formel zur Anwendung:

$$\text{Zellzahl/ml} = \sum_{i=1}^n x_i \cdot n^{-1} \cdot \text{Kammerfaktor} \cdot 3$$

Dabei entspricht  $n$  der Anzahl der ausgezählten Quadrate und  $i$  der Zellzahl in Quadrat  $i$ . Der Kammerfaktor beträgt  $10^4$ . Ausgesät wurde die Menge an Zellen, bei der abhängig vom Kulturgefäß erfahrungsgemäß Konfluenz am nächsten Tag zu erwarten war. Bei einer 6-Well-Platte beispielsweise  $3 \cdot 10^5$  Zellen pro Well.

#### **6.1.4 Transfektion von Zellen**

Mittels Transfektion wurde Plasmid-DNA transient oder stabil in Zellen eingebracht. Die zu transfizierenden Zellen wurden zunächst auf 24-Well-Zellkulturplatten ausgesät und 24 h in Standardnährmedium inkubiert. Um nach dieser Zeit mindestens 50%ige Konfluenz zu erreichen, wurden pro Well  $5 \cdot 10^4$  Zellen ausgesät und mit Nährmedium auf 0,5 ml Gesamtvolumen aufgefüllt. Die Zusammensetzung des Transfektionsgemischs ist in Tabelle 6-1 dargestellt. Das Transfektionsreagenz *GeneJuice*® wurde tropfenweise zu FCS-freiem Medium gegeben und für 5 min bei Raumtemperatur inkubiert. Nach Zugabe der zu transfizierenden DNA wurde erneut 15 min inkubiert, bevor der gesamte Transfektionsansatz den Zellen gleichmäßig zugesetzt wurde. Zur Kontrolle des Transfektionserfolges wurde bei transienten Transfektionen pRLEF1 $\alpha$  (Renilla-Luciferase) im Verhältnis 5:1 als Referenz beigegeben. Es folgte die Inkubation im Brutschrank für mindestens 24 h bis zur weiteren Verarbeitung. Die transient transfizierten Zellen konnten direkt weiterverarbeitet werden. So wurden sie etwa für die anschließende Stimulation der NOS2-Expression für weitere 24 h in FCS-freiem Medium inkubiert (vgl. Kapitel 6.1.5).

Die stabil zu transfizierenden Zellen wurden in frischem Vollmedium auf 10-cm-Schalen überführt. Nach weiteren 24 h Inkubation wurde Zeocin (0,2 mg/ml) als Selektionsantibiotikum zugegeben. Von nun an erfolgte der Mediumwechsel täglich, um die Selektion der transfizierten Zellen zu gewährleisten.

**Tabelle 6-1: Transfektionsansatz für 24-Well-Platte**

	einfache Transfektion	pRLEF1 $\alpha$ -Kotransfektion
FCS-freies Medium	25 $\mu$ l	25 $\mu$ l
<i>GeneJuice</i> ®	1,25 $\mu$ l	1,25 $\mu$ l
Plasmid	0,5 $\mu$ g	0,4 $\mu$ g
pRLEF1 $\alpha$	-	0,1 $\mu$ g

### 6.1.5 Stimulation der Genexpression von Zellen

Um die Expression proinflammatorischer Gene wie das der NOS2 anzuregen, wurden Zellen mit Zytokinen stimuliert. Die Stimulation der mit pCDNA4/TO-Plasmiden transfizierten Zellen erfolgte mit Tetrazyklin. In beiden Fällen wurden die Zellen zunächst in der G<sub>0</sub>-Phase synchronisiert, indem 18 h vor Beginn der Stimulation das Standardnährmedium durch FCS-freies Medium ersetzt wurde. Der Zytokinmix (CM) bestand aus TNF- $\alpha$  (37,5 ng/ml), IL-1 $\beta$  (3 ng/ml) und IFN- $\gamma$  (30 ng/ml) in FCS-freiem Medium. Die Stimulation mit Tetrazyklin erfolgte in einer Konzentration von 0,5  $\mu$ g/ml in FCS-freiem Medium. In den Kontrollgruppen (Co) wurde nur FCS-freies Medium zugegeben. Für RNA-Analysen wurde die Inkubation nach 6 h durch GIT-Puffer abgestoppt, für Protein-Analysen nach 8 h mit *RiPA*-Puffer und für *Luciferase*-Assays ebenfalls nach 8 h mit PLB. Für NO-Analysen mittels *Grieff*-Assay wurde der Überstand des Mediums nach 24 h entnommen.

## 6.2 Molekularbiologische Methoden

### 6.2.1 DNA-Synthese mit PCR

Mit der Methode der klassischen Polymerase-Kettenreaktion (PCR) lässt sich eine Ausgangs-DNA (*template*) vervielfältigen (Saiki 1988). Die Ausgangs-DNA wird zusammen mit zwei passend designten Oligonukleotid-Primern, Nukleotiden, Puffer und einer thermostabilen Taq-Polymerase im Thermocycler einem zyklischen Temperaturprogramm ausgesetzt. Dieses Programm beginnt mit einer Denaturierungsphase, in der sich der Doppelstrang der Ausgangs-DNA öffnet. In der anschließenden Annealingphase hybridisieren die Primer mit den Einzelsträngen. Es folgt die Elongationsphase, in welcher die Taq-Polymerase die Einzelstränge im Bereich zwischen den Primern zu Doppelsträngen

ergänzt. Dieser Ablauf wird zyklisch wiederholt, wobei die Menge der gewünschten Sequenz sich mit jedem Durchlauf verdoppelt.

Zu analytischen Zwecken, insbesondere zur Analyse von DNA-Fragmentlängen, wenn also eine gewisse qualitative Ungenauigkeit der Taq-Polymerase in Kauf genommen werden konnte, wurden PCRs mit dem *OneTaq*<sup>®</sup> Kit von *NEB*<sup>®</sup> durchgeführt (vgl. Tabelle 6-2, 6-3). Diese Polymerase besitzt keine *proofreading*-Funktion.

**Tabelle 6-2: PCR-Ansatz mit OneTaq<sup>®</sup>**

Substanz	V / $\mu$ l
<i>2x OneTaq<sup>®</sup> MM Standard Buffer</i>	12
<i>forward-Primer, 10 <math>\mu</math>M</i>	0,5
<i>reverse-Primer, 10 <math>\mu</math>M</i>	0,5
DNA	x*
H <sub>2</sub> O	ad 25*

\* die Volumina wurden für 200 ng DNA pro Ansatz angepasst.

**Tabelle 6-3: Temperaturprogramm für PCR mit OneTaq<sup>®</sup>**

Temperatur / ° C	Zeit / s	Funktion	
94	30	initiale Denaturierung	
94	30	Denaturierung	
T <sub>m</sub> (Primer)* - 5°	60	Hybridisierung	35x
72	60/kb	Synthese	
72	600	finale Elongation	
8	∞	Aufbewahrung	

\*T<sub>m</sub> = Schmelztemperatur des Primers

Zu präparativen Zwecken, wenn also das PCR-Produkt präpariert und weiterverarbeitet werden sollte, wurde das *Q5 High-Fidelity Kit*<sup>®</sup> von *NEB*<sup>®</sup> verwendet (vgl. Tabelle 6-4, 6-5). Diese Polymerase besitzt eine *proofreading*-Funktion und eignet sich somit für die Herstellung von fehlerfreier DNA zur anschließenden Klonierung.

**Tabelle 6-4: PCR-Ansatz mit Q5®**

Substanz	V / µl
<i>5x Q5® Reaction Buffer</i>	10
dNTPs, 10 mM	1
<i>forward-Primer</i> , 10 µM	2,5
<i>reverse-Primer</i> , 10 µM	2,5
DNA	x*
<i>Q5® High-Fidelity DNA-Polymerase</i>	0,5
<i>5x Q5® High GC Enhancer</i>	10
H <sub>2</sub> O	ad 50*

\* die Volumina wurden für 200 - 400 ng DNA pro Ansatz angepasst.

**Tabelle 6-5: Temperaturprogramm für PCR mit Q5®**

Temperatur / ° C	Zeit / s	Funktion	
95	180	initiale Denaturierung	
95	30	Denaturierung	
T <sub>m</sub> (Primer)** - 5°	30	Hybridisierung	36x
72	60/kb	Synthese	
72	300	finale Elongation	
8	∞		

\*\*T<sub>m</sub> = Schmelztemperatur des Primers

## 6.2.2 Agarose-Gelelektrophorese

Die Agarose-Gelelektrophorese ermöglicht die Auftrennung von DNA-Fragmenten nach ihren Längen. Das in TAE-Puffer gelöste Polysaccharid Agarose vernetzt sich zu einem Gel. Dabei steigt der Grad der Vernetzung mit der eingesetzten Agarosekonzentration. Bei Anlegen einer elektrischen Spannung wandern die im Gel platzierten negativ geladenen DNA-Moleküle Richtung Anode. Die Wanderungsgeschwindigkeit ist dabei abhängig von der Porengröße des Gels und der Größe der DNA-Fragmente: kleine Fragmente diffundieren schneller als große. Für kleine Fragmente (bis 1000 bp) wurden Agarosekonzentrationen von 1,5 bis 2%, für größere Fragmente 0,8 bis 2% gewählt. Die Auftrennung erfolgte in der horizontalen Gelkammer unter einer Spannung von bis zu 100 V. Zur späteren Sichtbarmachung der DNA wurden auf 100 ml Gel je 3 µl des mit DNA interkalierenden und

unter UV-Licht fluoreszierenden Farbstoffs *Roti Safe-GelStain*<sup>®</sup> von *Roth*<sup>®</sup> zugesetzt. Um einer zu starken Diffusion der DNA-Proben im Gel vor Anlegen der elektrischen Spannung entgegenzuwirken, wurde ihre Dichte erhöht, indem sie im Verhältnis 1:6 mit DNA-Ladepuffer versetzt wurden. Neben den Proben wurde als Standard 7 µl eines DNA-Längenmarkers (1 kb-*Ladder*) im Gel platziert.

### **6.2.3 DNA-Extraktion aus Agarosegel**

In der Gelelektrophorese aufgetrennte DNA wurde aus Agarosegel mit dem *Monarch Gel Extracion Kit*<sup>®</sup> von *NEB*<sup>®</sup> extrahiert. Dazu wurden die unter UV-Licht mit dem Skalpell ausgeschnittenen Gelstücke gewogen und mit 400 µl Gel-lösendem Puffer pro 100 mg Gel für 10 Minuten bei 55° C inkubiert. Anschließend wurde eine Elutionssäule über einem Auffanggefäß mit dem gelösten Gel zweimal mit 200 µl Waschpuffer und einmal trocken zentrifugiert (je 1 min, 13.000 rpm, 4° C). Der Filter der Elutionssäule wurde für 2 Minuten mit 8 µl H<sub>2</sub>O (vorgewärmt auf 50° C) inkubiert, und danach erneut zentrifugiert (s.o.). Konzentration und Reinheit der gewonnenen DNA konnte anschließend photometrisch bestimmt werden (vgl. Kapitel 6.2.5).

### **6.2.4 Aufreinigung von DNA**

Zur Aufreinigung von DNA wurde das *Monarch PCR & DNA Cleanup Kit*<sup>®</sup> von *NEB*<sup>®</sup> verwendet. Die Proben wurden im Verhältnis 5:1 mit *Binding*-Puffer verdünnt und in einer Elutionssäule über einem Auffanggefäß zentrifugiert (1 min, 13.000 rpm, 4° C). Anschließend wurden sie zweimal mit je 200 µl Waschpuffer zentrifugiert (s.o.). Der Filter der Elutionssäule wurde mit 8 µl H<sub>2</sub>O inkubiert und erneut zentrifugiert (s.o.). Konzentration und Reinheit des Produkts wurden nun photometrisch bestimmt (vgl. Kapitel 6.2.5) und die Proben wurden bis zur weiteren Verarbeitung bei -20° C gelagert.

### **6.2.5 Photometrische Quantifizierung von Nukleinsäuren**

Nach dem Lambert-Beer'schen Gesetz ist die Intensitätsabschwächung monochromatischen Lichts beim Durchgang durch eine absorbierende Substanz proportional zu deren Konzentration. Nach diesem Prinzip lässt sich mithilfe eines Spektrophotometers die Konzentration von Nukleinsäuren bestimmen. Das Absorptionsmaximum von DNA- und RNA-Molekülen liegt bei 260 nm, das von Proteinen bei etwa 280 nm und das von organischen Lösungsmitteln bei etwa 230 nm. Über die

Absorptionsverhältnisse von 260/280 nm bzw. 260/230 nm kann somit der Grad der Verunreinigung der Proben mit Proteinen (optimaler Quotient: >1,8) bzw. mit organischen Lösungsmitteln (optimaler Quotient: 2 – 2,2) ermittelt werden. Zum Einsatz kam das Spektrophotometer *NanoDrop-2000*® von *Peqlab*® und das dazugehörige gleichnamige Auswertungsprogramm.

## **6.2.6 Klonierung von DNA**

Unter Klonierung versteht man die identische Vervielfältigung von DNA. Dazu wird zunächst ein DNA-Fragment in einen Vektor integriert. In der klassischen Methode wird dies erreicht, indem sowohl ein geeignetes Plasmid als auch die zu klonierende DNA mit Restriktionsenzymen geschnitten und anschließend mit Ligationsenzymen miteinander verbunden werden. Eine Alternative stellt die *QuikChange*®-Methode dar. Hier werden Megaprimer erzeugt, welche die Zielsequenz und eine mit dem Plasmid überlappende Sequenz enthalten. Auf diese Weise werden in der nachfolgenden PCR Plasmide synthetisiert, welche die zu klonierende Sequenz enthalten. Die Plasmide werden in kompetente Bakterien transformiert und vervielfältigt. Im letzten Schritt werden die klonierten Zielsequenzen wieder extrahiert. In den folgenden Kapiteln werden die einzelnen für die Klonierung notwendigen Schritte näher dargestellt.

### **6.2.6.1 Restriktion von DNA**

Um zu klonierende DNA in Vektoren zu integrieren, müssen zunächst die Plasmide linearisiert und an allen Produkten komplementäre Enden erzeugt werden. Dies wird mit Restriktionsendonukleasen erreicht, welche in der Lage sind, spezifische DNA-Sequenzen zu erkennen und zu schneiden. Dabei resultieren je nach Enzym Schnittstellen mit glatten Enden (*blunt ends*) oder 5'- bzw. 3'-überhängenden Enden (*sticky ends*). Der Restriktionsansatz (vgl. Tabelle 6-6) wurde für 3 h bei enzymespezifischer Temperatur im Wasserbad inkubiert. Zur Kontrolle der erfolgreichen Restriktion wurden 2 µl des Ansatzes gemeinsam mit 6 µl DNA-H<sub>2</sub>O und 2 µl Auftragspuffer auf ein analytisches Gel aufgetragen und mit einem gleichermaßen restringierten aber unligierten Vektor verglichen.

**Tabelle 6-6: Restriktionsansatz**

Substanz	Menge
Restriktionspuffer	10 µl
Restriktionsenzym	20 - 60 U
zu klonierende DNA	30 µg
H <sub>2</sub> O	ad 100 µl

### 6.2.6.2 Kinasierung von DNA

Bevor zu klonierende DNA-Fragmente mittels Ligation in den Vektor integriert werden können, müssen sie kinasiert werden. Unter Kinasierung versteht man das Anfügen einer Phosphatgruppe am 5'-Ende der DNA mittels einer Polynukleotid-Kinase. Der Kinasierungsansatz (vgl. Tabelle 6-7) wurde mit der *T4*<sup>®</sup>-Polynukleotid-Kinase (*T4*<sup>®</sup>-PNK) von *NEB*<sup>®</sup> für 1 h bei 37°C im Wasserbad inkubiert.

**Tabelle 6-7: Kinasierungsansatz mit T4<sup>®</sup>-PNK**

Substanz	Menge / µl
10x PNK-Puffer	10
<i>T4</i> <sup>®</sup> -PNK	2
ATP, 10 mM	2
DNA	7
H <sub>2</sub> O	ad 100

### 6.2.6.3 Ligation von DNA

Als Ligation wird die enzymatische Integration der zu klonierenden DNA in den Vektor bezeichnet. Verwendet wurde die *T4*<sup>®</sup>-Ligase von *NEB*<sup>®</sup> (vgl. Tabelle 6-8: Ligationsansatz mit *T4*<sup>®</sup>-Ligase). Vektor und zu klonierende DNA wurden unter Berücksichtigung der Fragmentlängen im Verhältnis 1:3 eingesetzt und bei 16° C über Nacht inkubiert.

**Tabelle 6-8: Ligationsansatz mit T4®-Ligase**

Substanz	Menge / $\mu\text{l}$
T4-Ligase	1
10x Ligase-Puffer	2
Vektor / zu klonierende DNA	x*
H <sub>2</sub> O	ad 20

\* im Verhältnis 1:3. Ca. 500 ng Vektor-DNA.

#### 6.2.6.4 QuikChange® (Ligation-during-Amplification)

Die QuikChange®- oder Ligation-during-Amplification-Methode stellt eine weitere Möglichkeit der Integration eines DNA-Fragments in einen Vektor dar. Dazu wurden zunächst mittels PCR sog. Megaprimer synthetisiert, welche die einzuführende Sequenz enthielten und in 5'- und 3'-Richtung mit der Einfügestelle auf dem Plasmid überlappten. Mit den Megaprimern und dem Plasmid wurde eine PCR mit einer proofreading-Taq-Polymerase durchgeführt (vgl. Tabelle 6-9). Das PCR-Produkt wurde anschließend mit dem Restriktionsenzym DpnI inkubiert, welches spezifisch methylierte DNA schneidet. Die aus Bakterien stammende Plasmid-DNA liegt aufgrund des bakteriellen *dam*-Methylierungssystems in der Regel methyliert vor und wird im Gegensatz zum unmethylierten PCR-Produkt von DpnI abgebaut. Je 25  $\mu\text{l}$  des QuikChange®-Ansatzes wurden mit 10 U DpnI für 3 h im 37° C-Wasserbad inkubiert. Das Produkt konnte anschließend transformiert werden.

**Tabelle 6-9: Temperaturprogramm für eine QuikChange®-PCR**

Temperatur / ° C	Zeit / s	Funktion	
95	180	initiale Denaturierung	
95	30	Denaturierung	
T <sub>m</sub> (Primer)** - 5°	30	Hybridisierung	30x
72	720	Synthese	
72	600	finale Elongation	
8	$\infty$		

\*\*T<sub>m</sub> = Schmelztemperatur des Primers

### **6.2.6.5 Transformation von DNA in Bakterien**

Transformation bezeichnet das Einbringen von DNA in Bakterien. Im Rahmen der Klonierung wird Plasmid-DNA zur Vervielfältigung in Bakterien transformiert. Dazu wurden zunächst 100 µl einer Lösung kompetenter Bakterien (DH5α oder TOP10) mit 10 µl Ligations- bzw. 1 µl *QuikChange*-Ansatz für 30 min auf Eis inkubiert. Dieser Schritt dient der Anlagerung der Plasmid-DNA an die Bakterien. Es folgte ein „Hitzeschock“ für 30 s im 42° C-Wasserbad, wodurch sich die Permeabilität der Bakterienzellmembran erhöht. Nach erneuter Inkubation auf Eis für 5 min wurden 400 µl LB-Medium zugegeben und der Ansatz kam für 1 h bei 37° C in den Schüttelinkubator. In dieser Phase wird das Plasmid aufgenommen und exprimiert, sodass sich die auf ihm vorliegende Selektionsantibiotikaresistenz ausbildet. Schließlich wurde der Ansatz steril auf antibiotikahaltigen Agarplatten ausplattiert und für maximal 18 h bei 37° C im Brutschrank inkubiert. Gewachsene Kolonien sind resistent gegen das Selektionsantibiotikum und enthalten somit mit hoher Wahrscheinlichkeit das zu transformierende Plasmid. Zur Weiterverarbeitung (s.u.) wurden Flüssigkulturen der gewachsenen Kolonien angelegt. Dazu wurden die Kolonien mit einem sterilen Zahnstocher „gepickt“, in 3 ml LB-Medium überführt und für maximal 16 h im Bakterienschüttler inkubiert.

### **6.2.6.6 Präparation von Plasmid-DNA aus Bakterien**

Um zu überprüfen, ob die Transformation erfolgreich war, wird die potenziell vorhandene rekombinante Plasmid-DNA aus den transformierten Bakterien extrahiert und analysiert. Methode der Wahl ist die Extraktion durch alkalische Lyse (Birnboim 1979). Dabei werden die Bakterienzellen durch SDS lysiert und die nicht-plasmidische DNA durch pH-Veränderung mittels NaOH denaturiert. Mit Kaliumacetat werden nicht-plasmidische DNA, RNA und Proteine gefällt, sodass sich die Plasmid-DNA isolieren lässt. Ausgangsmaterial stellten die Flüssigkulturen von auf Selektions-Nährböden gewachsenen Bakterienkolonien dar (vgl. Kapitel 6.2.6.3). Je 3 ml der Flüssigkultur wurden zentrifugiert (1 min, 13.000 rpm, 4° C) und der Überstand abgesaugt. Das Pellet wurde mit 100 µl Maniatis I (vgl. Tabelle 5-4) gelöst und inkubiert (3 min, RT). Es folgte die Inkubation mit 200 µl Maniatis II (3 min), also mit SDS und NaOH und anschließend mit Maniatis III (3 min), also mit Kaliumacetat. Nach Zentrifugation (15 min, s.o.) wurde der Überstand in ein neues Reaktionsgefäß überführt, wobei nicht-plasmidische DNA und denaturiertes Protein sich außen an der Pipettenspitze niederschlugen. Die isolierte Plasmid-DNA selbst wurde anschließend durch Zugabe von 400 µl Isopropanol (-20° C) gefällt und nach erneuter Zentrifugation (2 min, 13.000 rpm, 21° C) mit 400 µl Ethanol (70%) gewaschen. Das in einer letzten Zentrifugation (5 min, s.o.) erhaltene Präzipitat wurde 15 min über Kopf getrocknet und in 50 µl DNA-H<sub>2</sub>O aufgenommen. Die so erhaltene Probe wurde nun photometrisch auf ihre Nukleinsäure-

Konzentration untersucht (vgl. Kapitel 6.2.5) und der weiteren Analyse durch PCR oder Restriktion zugeführt.

Wenn die Analysen auf eine erfolgreiche Transformation hinwiesen, wurde eine Kontrolle der transformierten Plasmide auf Sequenzebene durchgeführt. Dazu wurden 5 µl der Übernachtskultur in 5 ml LB-Medium erneut maximal 16 h im Bakterienschüttler inkubiert. Die Präparation der Plasmid-DNA für die Sequenzierung erfolgte mit dem *Monarch Plasmid Miniprep Kit*® von *NEB*®, nach den Angaben des Herstellers. Die Sequenzierung nach Sanger wurde von der *StarSEQ* GmbH in Mainz durchgeführt. Wenn die gewünschten Sequenzen vorlagen, konnte mittels Midi-Präparation eine größere Menge Plasmid-DNA für die Lagerung zur weiteren experimentellen Verwendung gewonnen werden. Dazu wurden zunächst 100 µl der Übernachtskultur in 100 ml LB-Medium erneut inkubiert (s.o.). Die Präparation erfolgte anschließend mit dem *HiPure Plasmid Filter Midiprep Kit*® von *Invitrogen*®, nach Angaben des Herstellers. Die Proben wurden bei -20° C gelagert.

### 6.2.7 Griess-Assay

Eine Möglichkeit die Bildung von NO zu quantifizieren ist die Messung von dessen primären stabilen Zerfallsprodukt Nitrit (NO<sub>2</sub><sup>-</sup>). Nitritkonzentrationen lassen sich mit dem Griess-Assay bestimmen, der auf zwei aufeinanderfolgenden Reaktionen beruht: im sauren Milieu reagiert zunächst das Nitrit-Ion mit Sulfanilamid zu einem Diazonium-Ion. Dieses reagiert anschließend mit N-1-naphthylethylendiamin (NED) in einer Azokupplung zu einem pink-roten Azofarbstoff, der eine Quantifizierung im Spektrophotometer erlaubt. Über eine Eichkurve lässt sich die ursprüngliche NO-Konzentration im Bereich zwischen ca. 0,1 und 100 µM indirekt ermitteln. Die Assays wurden mit dem *Griess Reagent System*® von *Promega*® nach dem Protokoll des Herstellers und mit dem *SpectraMax*®-Spektrophotometer von *Molecular Devices*® durchgeführt.

## 6.3 RNA-Analysen

### 6.3.1 RNA-Extraktion aus Zellen

Zur Gewinnung von RNA aus Zellen wurde die Methode der Extraktion mit Guanidiniumisothiocyanat (GIT) und Phenol-Chloroform angewendet (Chomczynski 1987). Es wurden ausschließlich RNase-freie Reaktionsgefäße verwendet und alle Lösungen wurden mit DEPC-H<sub>2</sub>O angesetzt. Die Zellen wurden zunächst 6 h nach Stimulation durch Zusatz von 200 µl GIT-Puffer lysiert. Es folgte die Ansäuerung mit 2 M Natrium-Acetat (10% des Git-Volumens) und Zugabe von H<sub>2</sub>O-gesättigtem Phenol (100% des GIT-Volumens). Die Denaturierung der Proteine, sowie die Trennung von DNA und RNA erfolgte durch Zusatz von Chloroform/Isomylalkohol (1:24, 50% des GIT-Volumens), das kräftig mit den Proben vermischt und 15 min auf Eis inkubiert wurde. Durch Zentrifugation (20 min, 13.000 rpm, 4° C) bildete sich eine die RNA enthaltende wässrige Phase, die in ein neues Reaktionsgefäß überführt, mit Isopropanol (150% des GIT-Volumens, -20° C) versetzt und zur Fällung mindestens 1 h bei -20° C gelagert wurde. Nach erneuter Zentrifugation (20 min, s.o.) wurde der Überstand abgossen und das Präzipitat mit 80%igem Ethanol (150% des GIT-Volumens, -20° C) versetzt. Nach nochmaliger Zentrifugation (5 min, s.o.) wurde das RNA-Präzipitat über Kopf getrocknet und anschließend in 30 µl DEPC-H<sub>2</sub>O aufgenommen.

### 6.3.2 Reverse Transkription von RNA

Das Enzym reverse Transkriptase (RT), das in bestimmten Viren vorkommt, ist in der Lage aus RNA komplementäre DNA zu synthetisieren. Diese Funktion wird genutzt um die RNA-Expression von Zellen zu analysieren. Die zu einem bestimmten Zeitpunkt in einer Zelle vorliegende RNA wird extrahiert und mittels reverser Transkriptase in *complementary DNA* (cDNA) umgeschrieben. Die anschließende Analyse der cDNA erlaubt somit Rückschlüsse auf die ursprüngliche RNA. Für die Experimente dieser Arbeit wurde das *M-MuLV Reverse Transcriptase Kit*® von *NEB*® verwendet. Es enthält die reverse Transkriptase des *Moloney murine leukemia virus*, welche ausgehend von Hexamerprimern und RNA einzelsträngige cDNA synthetisiert. Die aus den Zellen gewonnene RNA (vgl. Kapitel 6.3.1) wurde zunächst einheitlich auf eine Konzentration von 50 ng/µl verdünnt und dann im Thermocycler mit dem RT-Reaktionsansatz inkubiert (vgl. Tabelle 6-10, 6-11). Die Proben wurden bis zur weiteren Verarbeitung bei -20° C gelagert.

**Tabelle 6-10: RT-Ansatz mit M-MuLVRT®**

Substanz	V / $\mu$ l
<i>10x RT-Puffer</i>	2
<i>25x dNTP Mix</i> , 100 mM	0,8
<i>Hexa Oligos</i> , 10 pmol/ $\mu$ l	2
<i>M-MuLV Reverse Transkriptase®</i>	0,125
H <sub>2</sub> O	4,7
RNA, 50 ng/ $\mu$ l	10

**Tabelle 6-11: Temperaturprogramm für RT mit M-MuLVRT®**

Temperatur / ° C	Zeit / s	Funktion
25	600	Hybridisierung
37	7.200	reverse Transkription
85	5	Inaktivierung Transkriptase
12	$\infty$	Aufbewahrung

### 6.3.3 Quantitative *Real-Time*-PCR

Mit der Methode der quantitativen *Real-Time*-PCR (qRT-PCR) können Nukleinsäuren gleichzeitig amplifiziert und quantifiziert werden. Grundprinzip ist die Zugabe eines Fluoreszenzstoffes zur PCR, der mit der neu gebildeten DNA interkaliert und so ein mit der DNA-Menge korrelierendes Fluoreszenzsignal erzeugt (Higuchi 1992). In den frühen PCR-Zyklen, wenn eine exponentielle Vermehrung der DNA-Fragmente stattfindet, wird der *cycle-threshold*-Wert ( $C_T$ -Wert) als die Zykluszahl definiert, nach welcher sich das Fluoreszenzsignal gerade vom Hintergrund abhebt. Die Quantifizierung der Ausgangs-DNA erfolgt dann anhand des Vergleiches der  $C_T$ -Werte von bekannten und unbekanntem DNA-Mengen.

In den Experimenten dieser Arbeit wurden qRT-PCRs zum Zweck der Erstellung von mRNA-Expressionsprofilen durchgeführt. Analysiert wurden also mRNA-Proben, die mittels RT in cDNA umgeschrieben wurden. Verwendet wurde der Farbstoff *SYBR Green®* von *Primerdesign®*, der sequenzspezifisch an amplifizierte doppelsträngige DNA bindet und dann ein vom freien Farbstoff verschiedenes Emissionsmaximum besitzt (vgl. Tabelle 6-12, 6-13). Das Fluoreszenzsignal, bzw. der  $C_T$ -Wert der Proben wurden nach der  $2^{-\Delta\Delta C_T}$ -Methode auf die Werte des konstitutiv exprimierten Haushalts-Gens Glycerinaldehyd-Phosphat-Dehydrogenase (GAPDH) und auf eine Kontrollgruppe normiert (Livak 2001). Die Spezifität der genutzten Primer wird über eine Schmelzkurve ermittelt: die

Doppelstränge der spezifischen PCR-Produkte besitzen wegen der zahlenmäßig höheren Ausbildung von Wasserstoffbrückenbindungen eine höhere Schmelztemperatur als unspezifische PCR-Produkte. Beim Schmelzen der Doppelstränge löst sich auch teilweise der an die DNA gebundene Farbstoff und das Fluoreszenzsignal verändert sich entsprechend. Nach der eigentlichen qRT-PCR wird im Thermocycler ein schrittweises Temperaturprogramm mit Fluoreszenzmessung von 60° bis 95° C durchgeführt. Über die so ermittelten Schmelzkurven ist eine Unterscheidung der PCR-Produkte möglich.

**Tabelle 6-12: qRT-PCR-Ansatz mit SYBR Green®**

Substanz	V / $\mu$ l
<i>SYBR Green</i> ® Mastermix	10
<i>forward</i> -Primer	0,6
<i>reverse</i> -Primer	0,6
H <sub>2</sub> O	6,8
cDNA	2

**Tabelle 6-13: Temperaturprogramm qRT-PCR mit SYBR Green®**

Temperatur / ° C	Zeit / s	Funktion
95	300	Initiale Denaturierung
95	15	Denaturierung
60	60	Annealing und Elongation
95	30	terminale Denaturierung
60 bis 95	10	Schmelzkurve
8	$\infty$	Aufbewahrung

## 6.4 Proteinbiochemische Methoden

### 6.4.1 Proteinextraktion aus Zellen

Proteine mussten für Luciferase-Assays, Bradford-Assays und Western-Blot-Analysen aus Zellen isoliert werden. Die dafür zunächst nötige Lyse der Zellen wurde entweder mit *Passive Lysis Buffer* (PLB) oder mit *Radioimmunoprecipitation-Assay-Puffer* (RIPA) durchgeführt. Mit PLB wurden die Zellen für 30 min auf dem Schüttler inkubiert und für die weiteren Schritte bei -20° C eingefroren. Wenn RIPA-Puffer verwendet werden sollte, wurde dieser gemeinsam mit Protease-Inhibitor (im Verhältnis 1:10) und Phosphatase-Inhibitor (im Verhältnis 1:100) den Zellen zugegeben. Anschließend wurde das Lysat sonifiziert (acht Mal 30 s mit je 30 s Unterbrechung) und zentrifugiert (5 min, 16.000 x g). Der Überstand wurde bei -70° C eingefroren.

### 6.4.2 Luciferase-Assay

Für die Untersuchung nicht translaterter Bereiche des Genoms, also etwa von 3'-, 5'-UTRs oder Promotoren, eignet sich die Methode der Reportergeranalyse. Das Reporterger wird dabei vor oder nach dem zu untersuchenden Abschnitt kloniert. Dessen Expression wird somit an die Expression des Reporterger gekoppelt und lässt sich indirekt über die Analyse des Reporterger-Produkts bestimmen. Andererseits lässt sich durch die konstitutive Expression des ko-transfizierten Reporterger die Effizienz der Haupttransfektion abschätzen. Geeignete Reporterger sind die Luciferasegene des Leuchtkäfers (*Firefly*-Luciferase) und der Seefeder (*Renilla*-Luciferase). Die *Renilla*-Luciferase setzt ihr Substrat Coelenterazin unter Freisetzung von Lichtenergie zu Coelenteramid um. Diese Biolumineszenz kann im Spektrometer quantifiziert und mit der *Renilla*-Aktivität ins Verhältnis gesetzt werden.

Die Zellen wurden dazu zunächst in PLB lysiert. Die Lysate wurden in einer 96-Well-Platte mit je 100 µl *Renilla*-Luciferase-Substratpuffer versetzt (NaCl 0,1 M; Tris-Puffer 25 mM; CaCl<sub>2</sub> x 2 H<sub>2</sub>O 1mM; Coelenterazin 100 µM). Die Lichtemission wurde anschließend im Spektrometer gemessen. Sie ist proportional zur Expression des untersuchten Gens.

## 7 Ergebnisse

### 7.1 Funktionalität der NOS2-2

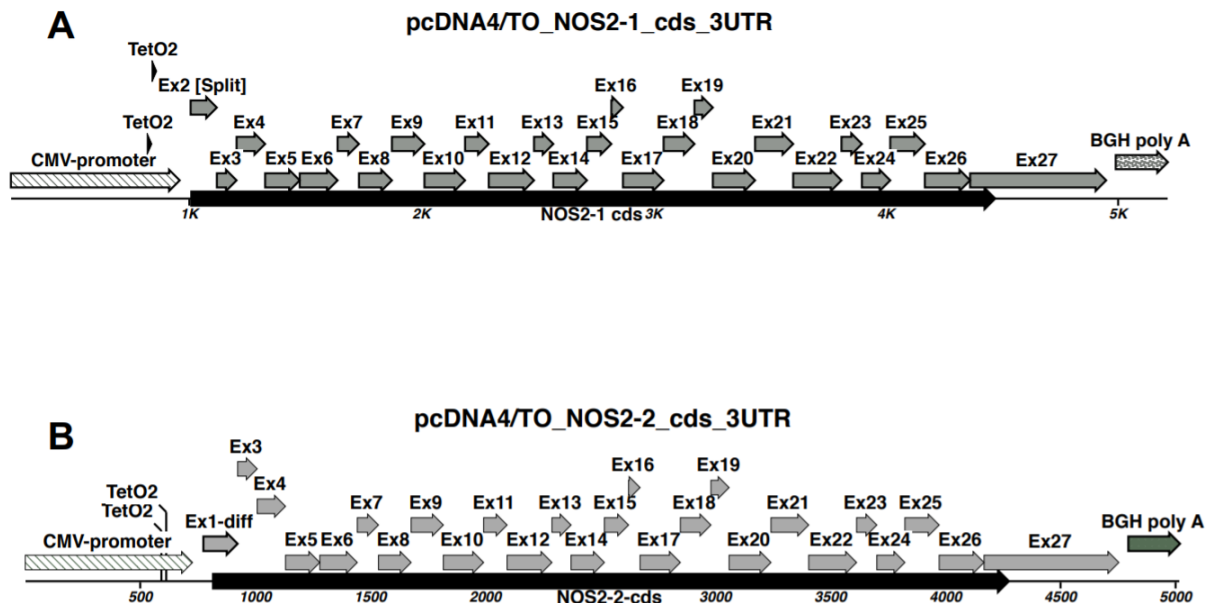
#### 7.1.1 Transiente Transfektion von NOS2-1 und -2

Das NOS2-2 Transkript liegt ausweislich der RNA-Seq-Daten im menschlichen Gewebe tatsächlich vor (z.B. transient während der Differenzierung von hPSCs zu Neuronen, Kardiomyozyten, Chondrozyten, mesenchymalen Stromazellen, Trophoblast- und Synzytiotrophoblastzellen oder während der Differenzierung von hiPSC zu kortikalen Neuronen, vgl. Kapitel 3.6). Gleiches gilt den Daten des *Human Protein Atlas* zufolge auch für das resultierende Translationsprodukt. Es schließt sich die Frage an, ob das NOS2-2-Protein auch funktional ist, d.h. ob es wie die NOS2-1 in der Lage ist, tatsächlich NO zu produzieren.

Um die Funktionalität der NOS2-2 hinsichtlich der Fähigkeit zur NO-Produktion zu analysieren, ist es zweckmäßig, das Enzym in der Zellkultur zu exprimieren, zur Aktivität zu stimulieren und das anfallende NO zu quantifizieren. Als Vergleichsgröße dient der unter gleichen Bedingungen erzeugte, NO-Output der NOS2-1. Eine vergleichbare NO-Produktion beider Zellkulturen lässt dann auf die Funktionalität der NOS2-1 schließen. Zu dieser Untersuchung wurden DLD-1\_TR7-Zellen mit pcDNA4/TO-Konstrukten transfiziert, welche jeweils die Sequenzen der NOS2-1 bzw. NOS2-2 enthielten. DLD-1\_TR7-Zellen enthalten das Tet-On-Expressionssystem, d.h. sie exprimieren konstitutiv einen Tetrazyklin-Repressor (Gossen 1992). Die zu transfizierenden pcDNA4/TO-Konstrukte enthalten dagegen einen CMV-Promotor, der vor den insertierten NOS2-1- bzw. NOS2-2-Sequenzen liegt und deren Transkription einleitet. Der CMV-Promotor wird in DLD-1\_TR7-Zellen durch den Tetrazyklin-Repressor blockiert, sodass keine Transkription stattfindet. In Anwesenheit von Tetrazyklin wird die Bindung des Repressors an die Operatoren innerhalb des CMV-Promotors verhindert, sodass dieser aktiv werden und die Transkription der Zielsequenzen einleiten kann. Die Expression der in das pcDNA4/TO-Konstrukt insertierten Sequenzen ist somit durch Tetrazyklin induzierbar. Das Tet-On-Expressionssystem kam zum Einsatz, da eine konstitutive Expression der NOS2-1 zytotoxische Effekte hat und das Wachstum der Zellkultur behindern würde.

Zur Herstellung eines pcDNA4/TO-Konstrukts das die cds und die 3'-UTR der humanen NOS2-1 enthält, wurden DLD-1-Zellen mit einem aus TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$  und IFN- $\gamma$  bestehenden Zytokinmix stimuliert und die RNA isoliert (vgl. Kapitel 6.1.5). Nach reverser Transkription wurde die cDNA als *template* für eine PCR mit den Oligonukleotid-Primern NOS2-1\_5P und NOS2-1\_3P eingesetzt. Die so synthetisierten DNA-Fragmente wurden mit den Restriktionsenzymen Xba I und Xho I geschnitten und anschließend in das Plasmid pcDNA4/TO kloniert (vgl. Kapitel 6.2.6). Das resultierende Plasmid war pcDNA4/TO-NOS2-1\_cds\_3UTR. Zur Erzeugung eines pcDNA4/TO-Konstrukts das die cds der humanen NOS2-2 enthält, mussten die ersten beiden Exons der NOS2-1-cds des Plasmids pcDNA4/TO-

NOS2-1\_cds\_3UTR durch das NOS2-2-spezifische Exon 1-diff ersetzt werden. Zu diesem Zweck wurde aus DLD-1-Zellen gewonnene genomische DNA als *template* für eine PCR mit den Oligonukleotid-Primern Ex1-diff\_5P und Ex1-diff\_3P verwendet. Das entstandene DNA-Fragment wurde als Megaprimmer in einer *QuikChange*®-Reaktion mit dem zuvor hergestellten Plasmid pcDNA4/TO-NOS2-1\_cds\_3UTR eingesetzt (vgl. Kapitel 6.2.6.4). Dadurch entstand das Plasmid pcDNA4/TO-NOS2-2\_cds\_3UTR (vgl. Abbildung 7-1).



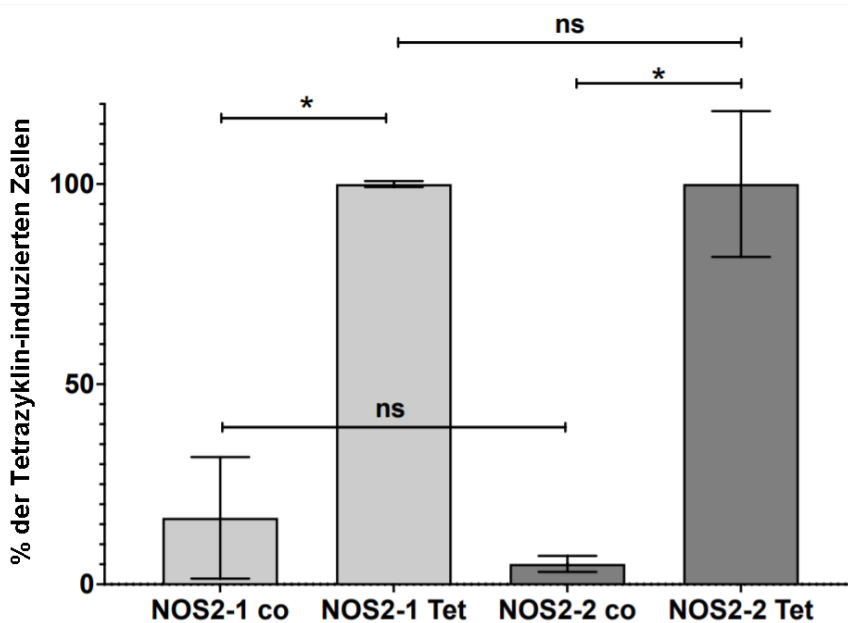
**Abbildung 7-1: Schema der pcDNA4/TO-Konstrukte**

Gezeigt ist das Schema der Konstrukte pcDNA4/TO-NOS2-1 bzw. -2\_cds\_3UTR, welche die Sequenzen für das NOS2-1 bzw. -2-Protein enthalten und in den Transfektionsexperimenten zum Einsatz kamen. A: pcDNA4/TO-NOS2-1\_cds\_3UTR. Dargestellt ist die Exon-Sequenz, die cds, sowie der für die Expression entscheidende CMV-Promotor und das BGH-polyA-Signal. Außerdem die Bindestellen des Tetrazyklin-Repressors (TetO). B: Exon 2 ist hier durch das Exon-1-diff ersetzt.

Die beiden so erhaltenen Konstrukte wurden nun nach dem *GeneJuice*®-Protokoll zunächst transient in DLD-1-TR7-Zellen transfiziert (vgl. Kapitel 6.1.4). Zur Normalisierung der Transfektions-Effizienz wurde jeweils das Plasmid pRLEF1 $\alpha$ , das eine für die *Renilla*-Luciferase codierende Sequenz enthält, ko-transfiziert. Die Aktivität der *Renilla*-Luciferase konnte im *Renilla*-Luciferase-Assay quantifiziert werden (vgl. Kapitel 6.4.2). Nach erfolgter Transfektion wurden die Zellen für 24 h mit 500 ng/ml Tetrazyklin inkubiert, wodurch mittels des Tet-On-Systems die Expression der NOS2-1, bzw. NOS2-2 induziert wurde (Gruppenbezeichnung: Tet). Eine Kontrollgruppe (co) erhielt kein Tetrazyklin, sondern wurde nur in FCS-freiem Medium inkubiert. Anschließend wurden die Überstände abgenommen und die Nitrit-Konzentrationen mit dem Griess-Assay bestimmt (vgl. Kapitel 6.2.7). Die verbleibenden Zellen wurden lysiert und dem *Renilla*-Luciferase-Assay zugeführt. Da Nitrit das primäre stabile

Zerfallsprodukt von NO darstellt, entsprechen die Nitrit-Konzentrationen annähernd den ursprünglichen NO-Konzentrationen und diese spiegeln mangels anderer NO- oder Nitrit-Quellen die NO-Produktion der NOS in den Zellen wider. Die gemessenen Nitrit-Konzentrationen wurden auf die Daten des *Renilla*-Luciferase-Assays normalisiert, wobei die Daten der induzierten Zellen auf 100% gesetzt wurden.

Es zeigte sich, dass die Nitrit-Anreicherung im Medium nach Induktion in den NOS2-1- und NOS2-2-transfizierten Zellen annähernd gleich hohe Werte erreichte (vgl. Abbildung 7-2).

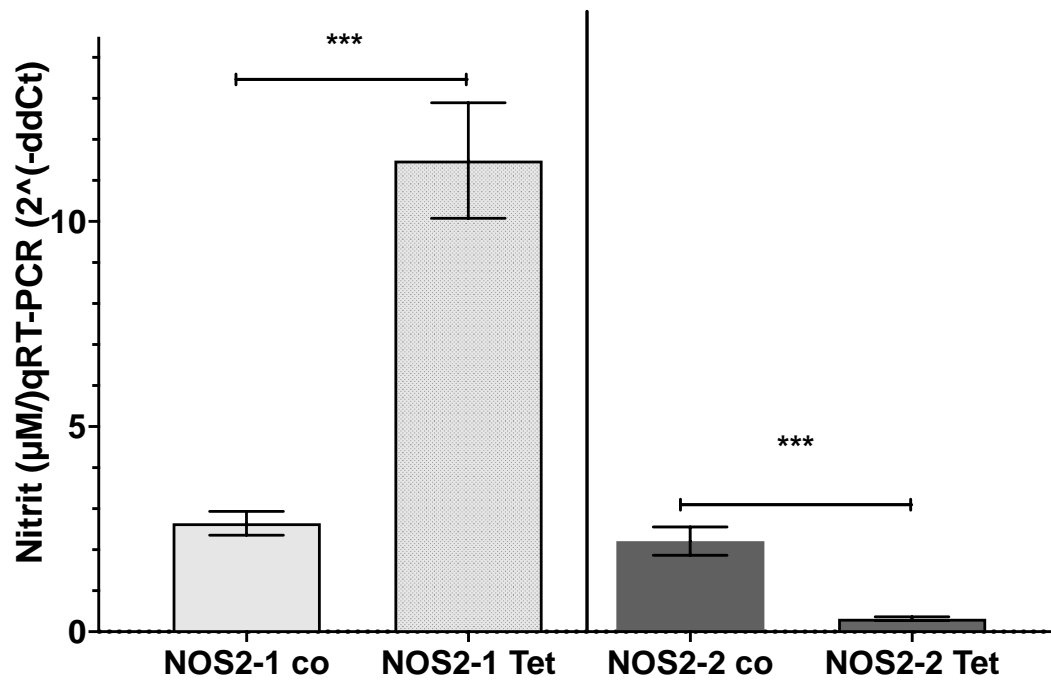


**Abbildung 7-2: Funktionalität des NOS2-2-Proteins**

Gezeigt ist die Zusammenfassung der Analyse der vier Transfektionsexperimente. DLD-1\_TR7-Zellen, die konstitutiv den Tetrazyklin-Repressor exprimieren, wurden transient mit den Plasmiden pcDNA4/TO-NOS2-1 bzw. -2\_cds\_3UTR transfiziert, die das NOS2-1 bzw. -2-Protein exprimieren. Um die Effizienz der Transfektion zu normalisieren, wurde das die *Renilla*-Luciferase exprimierende Plasmid pRL-EF1a ko-transfiziert. Anschließend wurden die Zellen für 24 h mit (Tet) oder ohne (co) 500 ng/ml Tetrazyklin inkubiert. Die Überstände wurden der Nitrit-Konzentrationsbestimmung im Griess-Assay zugeführt, die lysierten Zellen dem *Renilla*-Luciferase-Assay. Die Nitrit-Konzentrationen wurden auf die Luciferase-Daten normalisiert. Mittlere  $\pm$ SEM von n=8 Wells. \*\*\* p-Wert<0,001; \*p-Wert<0,05; ns nicht signifikant (one way anova mit Dunnett's post hoc test).

### 7.1.2 Stabile Transfektion von NOS2-1 und -2

Um den Nachweis der Funktionalität der NOS2-2 zu bekräftigen, sollten NOS2-1 und NOS2-2 nach der transienten Transfektion auch stabil in DLD-1\_TR7-Zellen eingebracht werden. Dazu wurden die Zellen erneut nach dem *GeneJuice*®-Protokoll mit den pcDNA4/TO-NOS2-1/2\_cds\_3UTR-Konstrukten transfiziert. Die Kotransfektion mit pRLEF1 $\alpha$  erübrigt sich bei der stabilen Transfektion, da hier durch den Einsatz eines Selektionsantibiotikums nur transfizierte Zellen überleben und letztlich vollständige Transfektionseffizienz gegeben ist. Das Plasmid pcDNA4/TO besitzt ein Zeocin-Resistenzgen, sodass die Zellen zum Zweck der Selektion nach 24 h in ein Medium überführt wurden, welches Zeocin (0,2 mg/ml) enthielt. Nach 14-tägiger Inkubation im Selektionsmedium konnte davon ausgegangen werden, dass nur noch Zeocin-resistente, also stabil mit pcDNA4/TO-NOS2-1/2\_cds\_3UTR transfizierte Zellen lebendig waren (vgl. Kapitel 6.1.4). Diese Zellen wurden nun analog zum vorherigen Versuch für 24 h mit 500 ng/ml Tetrazyklin inkubiert und somit zur Expression der NOS2-1 bzw. -2 stimuliert (Tet). Ebenso wurde eine Kontrollgruppe angelegt, die kein Tetrazyklin erhielt (co). Anschließend wurden die Überstände abgenommen und die enthaltenen Nitrit-Konzentrationen im Griess-Assay bestimmt. Zur Normierung wurde die NOS2-mRNA Expression in allen Ansätzen durch qRT-PCR bestimmt, wobei ein qRT-PCR-Primer-System gewählt wurde, dass die beiden Isoformen NOS2-1 und NOS2-2 nicht unterscheiden kann. Wie bei den transienten Transfektion konnte auch nach Tet-Behandlung bei den NOS2-1 Zellen eine signifikante Erhöhung der Nitritproduktion festgestellt werden. Bei den NOS2-2 Zellen ergab sich ein unerwartetes Ergebnis. Hier waren die Nitritwerte in den co-behandelten Zellen signifikant höher als in den Tet-behandelten Zellen.



**Abbildung 7-3: Funktionalität des NOS2-2-Proteins**

Gezeigt ist die Zusammenfassung der Analyse von 2 Experimenten mit stabil transfizierten DLD-1\_TR7-Zellen. Die Zellen wurden für 24 h mit (Tet) oder ohne (co) 500 ng/ml Tetrazyklin inkubiert. Die Überstände wurden der Nitrit-Konzentrationsbestimmung im Griess-Assay zugeführt, die Zellen wurden mit GIT-Puffer lysiert, die RNA isoliert und die NOS2 mRNA-Expression durch qRT-PCR bestimmt. Um die Nitriproduktion auf die jeweiligen mRNA-Expression zu normieren, wurden die gemessenen Nitritwerte durch die in qRT-PCR Analysen festgestellten mRNA Werte ( $2^{-(DDC(T))}$ -Werte) geteilt. Gezeigt sind die Mittelwerte  $\pm$ SEM von n=8 Wells. \*\*\* p-Wert<0,001, (two sides T-Test).

## 7.2 Induzierbarkeit der NOS2-2 durch Transkriptionsfaktoren

Der in der bioinformatischen Vorarbeit herausgearbeitete Umstand, dass sich das NOS2-2-Transkript vor allem durch ein alternatives erstes Exon (Exon-1-diff, vgl. Kapitel 3.3) von dem NOS2-1-Transkript unterscheidet, macht die Spekulation plausibel, dass sich in der vorgelagerten Introsequenz des NOS2-Gens ein NOS2-2-spezifischer Promotor befinden könnte. Dass das Exon-1-diff im Transkript der NOS2-1 nicht vorkommt, spricht für das Vorliegen eines eigenen Promotors und dagegen, dass das NOS2-2-Transkript lediglich durch alternatives Spleißen entsteht. So ist z.B. für die NOS1 der Mechanismus eines alternativen Promotors für die Transkription von alternativen ersten Exons beschrieben (Bros 2006). Auch ist die *upstream*-Region des Exon-1-diff reich an potenziellen Transkriptionsfaktor-Bindestellen. Eine von Gather et al. in einer bioinformatischen Analyse ermittelte Karte aller Transkriptionsfaktor-Bindestellen im Bereich des putativen NOS2-2-Promotors ist in Abbildung 7-4 dargestellt (Gather 2022). Im Anschluss untersuchte Gather et al. die RNA-Seq-Daten, die eine signifikante Expression der NOS2-2-mRNA aufwiesen (vgl. Kapitel 3.4) auf die in allen Datensätzen übereinstimmend herauf- oder herunterregulierten sonstigen Transkripte, wobei sich 102 Treffer fanden. Unter diesen fanden sich auch sieben Transkripte, die als Transkriptionsfaktoren zu identifizieren waren, welche im Bereich des putativen NOS2-2-Promotors mögliche Bindestellen besitzen. Es handelt sich um die Transkriptionsfaktoren: Bmi1, LEF1, Meis1b, PLAG1, Zpo1, ZNF436 und ZNF503. Auf ihre allgemeine Bedeutung wird in Kapitel 8.2 näher eingegangen.



#### **Abbildung 7-4: Putativer NOS2-2-Promotor mit TF-Bindestellen**

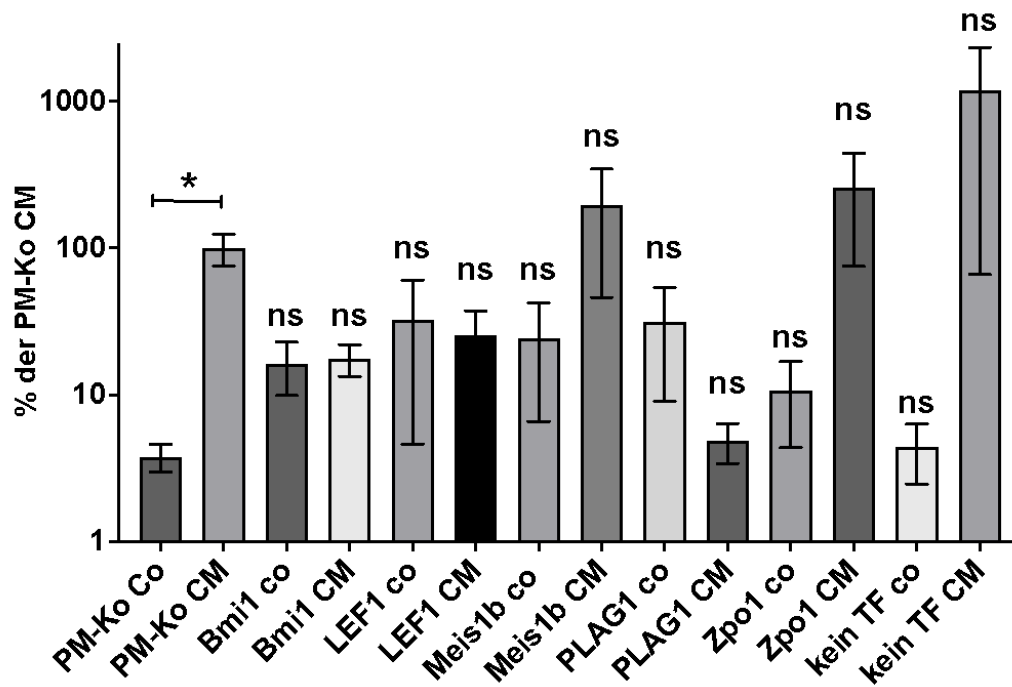
Gezeigt ist die dem Ex-1-diff vorgelagerte Region bis zum 3'-Ende des NOS2-1-Exon 2, die als Promotorregion für das NOS2-2-Transkript in Frage kommt mit den bioinformatisch ermittelten möglichen Bindestellen für Transkriptionsfaktoren. Die Bindestellen für Transkriptionsfaktoren, die in den NOS2-2-positiven RNA-Seq-Daten signifikant hoch- oder niederreguliert waren, sind orange dargestellt. Nach Gather, 2022.

Diese Transkriptionsfaktoren liegen also koinzident mit der Expression des NOS2-2-Transkripts in den entsprechenden differenzierenden Stammzellen herauf- oder herunterreguliert vor und besitzen passende Bindestellen. Deshalb ist es plausibel anzunehmen, dass sie auch in die Regulation des NOS2-2-Transkripts involviert, also Transkriptionsfaktoren eines möglichen NOS2-2-Promotors sein könnten. Um dies genauer zu untersuchen, wurden in der Zellkultur Transfektionsexperimente mit Transkriptionsfaktor-Expressionsklonen durchgeführt.

#### **7.2.1 Transiente Transfektion von Tf-Expressionsklonen**

Von *Addgene*® wurden Plasmide mit Expressionsklonen für die Überexpression der Transkriptionsfaktoren Bmi1, LEF1, Meis1b, PLAG1 und Zpo1 bezogen. Diese wurden nach dem *GeneJuice*®-Protokoll transient in DLD-1-Zellen transfiziert. Nach 24 h Inkubation im Transfektionsmedium und weiteren 24 h in FCS-freiem Medium erfolgte die Stimulation der Zellen (cm) mit einem Zytokingemisch (TNF- $\alpha$ : 37,5 ng/ml; IL-1 $\beta$ : 3 ng/ml und IFN- $\gamma$ : 30 ng/ml). Die Kontrollgruppen (co) erhielten keine Stimulation. Die RNA-Isolation erfolgte 24 h nach Stimulation mit GIT-Puffer und Phenol-Chloroform (vgl. Kapitel 6.3.1). Nach erfolgter reverser Transkription wurde die cDNA als *template* in die qRT-PCR eingesetzt. Als qRT-PCR-Primer kamen huNOS und huGAPDH zum Einsatz. Die  $C_T$ -Werte der NOS2 wurden nach der  $2^{-\Delta\Delta C_T}$ -Methode auf die  $C_T$ -Werte der GAPDH normalisiert, um die relative Expression der NOS2-mRNA zu erhalten. Eine Kontrollgruppe wurde mit dem Plasmid pGL3-control transfiziert. Die  $C_T$ -Werte dieser Gruppe nach Stimulation wurden in der Auswertung auf 100% gesetzt.

Das Ergebnis ist in Abbildung 7-5 dargestellt. Die transfizierten Zellreihen zeigten sämtlich Expressionsaktivität der NOS2, jedoch blieben die Bezüge auf die nicht-transfizierten Kontrollgruppen ohne Signifikanz.



**Abbildung 7-5: qRT-PCR-Auswertung der Tf-Transfektionen**

Gezeigt ist der Vergleich der auf huGAPDH normalisierten  $C_T$ -Werte aus der huNOS-qRT-PCR der verschiedenen Transkriptionsfaktoren nach transienter Transfektion in DLD-1-Zellen mit und ohne Zytokinstimulation. PM-Ko ist die mit pGL3-control transfizierte Kontrollgruppe, deren stimulierter Arm die Bezugsgröße darstellt. Die bei allen Transkriptionsfaktoren feststellbare NOS2-Expression zeigte keine signifikanten Unterschiede zwischen den stimulierten und nicht stimulierten Gruppen (außer in der PM-Ko-Gruppe). Gezeigt sind die Mittelwerte  $\pm$ SEM von  $n=8$  Wells. \*  $p$ -Wert  $< 0,01$ ; ns = nicht signifikant vs. PM-KO CM, (one way anova).

## 8 Diskussion

In der regenerativen Medizin und in der Grundlagenforschung werden hiPSCs zukünftig eine wichtige Rolle spielen. Ihre Fähigkeit zur unbegrenzten Teilung unter Erhalt von Pluripotenz und ihre Differenzierbarkeit zu allen Zelllinien der drei Keimblätter eröffnen weitreichende Möglichkeiten von entwicklungsbiologischen und pathologischen Studien, über Stammzelltherapien bis hin zum *tissue engineering*, also der künstlichen Konstruktion transplantierbaren Gewebes. Ansätze für den medizinischen Einsatz pluripotenter Stammzellen gibt es beispielsweise bei Diabetes mellitus Typ 1, Morbus Parkinson, altersabhängiger Makuladegeneration, Epikard- und Rückenmarkregeneration sowie zur Entwicklung von Vakzinen für die Tumorthherapie (Thomson 1998; Ilic 2017). Der Einsatz von hiPSCs könnte zudem die Verwendung von hESCs verdrängen und so bisher bestehende ethische Probleme bei der Gewinnung von pluripotenten Stammzellen überwinden. Diese ethischen Fragen – zurückzuführen auf den Zielkonflikt zwischen dem Schutz des ungeborenen Lebens und der Verpflichtung zum Heilen – haben bisher dazu geführt, dass der Umgang mit hESCs und somit auch der Fortschritt in ihrer Anwendung relativ eingeschränkt war. Die Etablierung von hiPSCs könnte diese Einschränkung fast gänzlich aufheben. Aus hiPSCs generierte Transplantate unterliegen außerdem einem wesentlich geringeren Abstoßungsrisiko, da die hiPSCs aus patienteneigenem Gewebe gewonnen werden können. Bei den weltweit bisher durchgeführten Transplantationen von aus hiPSCs erzeugtem Gewebe kam es auch ohne Immunsuppression nicht zu Transplantatabstoßungen (Madrid 2021). Die Gewinnung des nötigen Ausgangsmaterials ist einfach möglich, da sich hierfür z.B. Fibroblasten oder mononukleäre Zellen des peripheren Blutes eignen.

Der medizinische Einsatz von hiPSCs birgt allerdings auch Risiken. Die adulten somatischen Zellen, die zur Generation von hiPSCs gewonnen werden, haben in ihrer Lebenszeit Mutationen akkumuliert, die in der reprogrammierten pluripotenten Stammzelle fortbestehen (Young 2012). Dazu addieren sich Mutationen, die während der Vermehrung der hiPSC-Klone in der Zellkultur neu auftreten. Beide Arten von Mutationen werden durch die Klonierung fixiert, liegen also schließlich in allen Zellen des generierten Materials vor. Es ist unklar, in welchem Ausmaß dadurch therapeutische Ziele vereitelt, bzw. Forschungsergebnisse verfälscht werden können. Dies ist insbesondere von Bedeutung in der Forschungsarbeit mit krankheitsspezifischen hiPSC-Linien, in denen es auf die genaue molekulare und funktionale Ausstattung der zellulären Modelle ankommt. Hinzu kommen Probleme, die sich aus dem Prozess der Differenzierung ergeben. Nicht-uniforme Differenzierung kann dazu führen, dass sich im generierten Material Zellen in undifferenzierten bzw. unreifen Entwicklungsstufen befinden. Unspezifisch differenzierte Stammzellen sind dabei eine Gefahr, da sie durch fortgesetzte Proliferation zur Bildung von Stammzelltumoren neigen (Yamanaka 2020). Dieses Risiko kann außerdem von den zur Reprogrammierung eingesetzten Faktoren ausgehen, wenn diese auch nach der Differenzierung in den Zellen aktiv sind. Des Weiteren wurde beschrieben, dass hiPSCs bis zu einem gewissen Grad den epigenetischen Code ihres Ursprungsgewebes beibehalten, bzw. dass die epigenetische Transformation,

während der Reprogrammierung nicht einheitlich abläuft (Ohi 2011). Die Konsequenzen, die sich daraus für die Arbeit mit hiPSCs ergeben, sind bisher unklar.

Um das vielversprechende Potential der Stammzelltherapien zu verwirklichen und die Sicherheit im Umgang mit pluripotenten Stammzellen zu gewährleisten ist die Erweiterung der Kenntnis aller beteiligten Prozesse unerlässlich. Dies gilt insbesondere für die Prozesse der Differenzierung der hiPSCs in Zielzellen. Die Rollen des NO und der NOS2 in diesen Prozessen wurden im Theorieteil angedeutet (vgl. Kapitel 3.4 bis 3.6) und umfassen neben spezifischer Differenzierung auch Zellmigration, -überleben und die Steuerung der Sekretion regenerativer Faktoren (Wang 2019).

## **8.1 Funktionalität der NOS2-2**

Zum Verständnis der Rolle der NOS2-2 in den Prozessen der Differenzierung muss zunächst ausgemacht werden, ob der NOS2-2 über ihr Vorhandensein in differenzierenden Zellen als RNA und Translationsprodukt hinaus auch tatsächlich enzymatische Funktionalität zukommt. Den Ergebnissen zufolge ist dies der Fall (vgl. Kapitel 7.1). Die im Griess-Assay gemessenen Nitrit-Konzentrationen liegen bei NOS2-1- und NOS2-2-transfizierten Zellen in vergleichbaren Bereichen und deutlich über jenen der Kontrollgruppen. Wie oben erwähnt ist die Konzentration von Nitrit, als messbarem primärem Zerfallsprodukt des NO, mangels anderer Quellen direkt auf die NO-Produktion der Zellkulturen, also die Aktivität der NOS zurückzuführen. Die Aktivierung der transfizierten Plasmide im Tet-On-System erlaubt die isolierte Expression der auf den Plasmiden enthaltenen NOS2-Sequenzen mit Tetracyclin ohne etwa über eine Zytokinstimulation die endogenen NOS2 der Zellen zur Expression anzuregen. Die Messungen sind also frei von Überlagerungen aus endogener enzymatischer Aktivität. Das in der NOS2-2-transfizierten Gruppe gemessene Nitrit stammt demnach hauptsächlich vom NO der NOS2-2. Die Funktionalität der NOS2-2 hinsichtlich der NO-Synthese ist somit erwiesen.

Bemerkenswert ist, dass der NO-Output der NOS2-2 in etwa das Niveau der NOS2-1 erreicht. Daraus lässt sich schließen, dass die Unterschiede im Transkript der beiden Isoformen, insbesondere in ihren Anfangs-Exons, keine Unterschiede in der Synthese-Funktion bedingen. Dies könnte darauf hinweisen, dass die Bedeutung der Unterschiede auf der Ebene der Regulation liegen. So könnte die NOS2-2 durch von der NOS2-1 verschiedene Regulationsansätze auch in verschiedene zelluläre Prozesse eingebunden sein, insbesondere solche, die außerhalb des Immunsystems liegen. Eine solche Annahme wird auch von Auswertungen von RNA-Seq-Daten der NOS2-Isoformen impliziert. Hier zeigte sich bereits, dass in manchen Geweben deutlich mehr NOS2-2-mRNA als NOS2-1-mRNA vorliegt. Erstere wurde unter Ausschluss letzterer, also offenbar über eine spezifische Regulation erzeugt. Ob und welche

Differenzierungsmechanismen an dieser spezifischen Regulation ansetzen und wie diese im Detail funktioniert, müssen weitere Arbeiten zeigen.

## 8.2 Induzierbarkeit der NOS2-2 durch Transkriptionsfaktoren

Wie oben beschrieben, ermittelte Gather et al. die möglicherweise an der NOS2-2-Regulation beteiligten Transkriptionsfaktoren Bmi1, LEF1, Meis1b, PLAG1, Zpo1, ZNF436 und ZNF503. Diese besitzen in der putativen NOS2-2-Promotorregion eine Bindestelle und waren gleichzeitig in allen RNA-Seq-Datensätzen, in denen das NOS2-2-Transkript vorlag, übereinstimmend herauf- oder herunterreguliert (vgl. Kapitel 7.2). Die ersten fünf dieser Transkriptionsfaktoren (Bmi1, LEF1, Meis1b, PLAG1 und Zpo1) wurden in den Experimenten dieser Arbeit in Zellkultur überexprimiert und hinsichtlich ihrer Auswirkung auf die NOS2-Expression analysiert. Sie sollen im Folgenden kurz charakterisiert werden.

### 8.2.1 Bmi1

Der Transkriptionsfaktor Bmi1 (*B cell-specific Moloney murine leukemia virus integration site 1*. BMI1-Gen: ENSG00000168283. Synonym auch *Polycomb-Gruppe-RING-finger-protein 4* (PCGF4) oder *RING-finger-protein 51* (RNF51)) ist Teil der Polycomb-Gruppe und u.a. als epigenetischer Repressor von regulatorischen Genen bekannt, die in der Embryonalentwicklung und Selbsterneuerung von somatischen Stammzellen eine Rolle spielen (Cao 2005; Taherbhoy 2015). Aberrante Expression von Bmi1 wurde in Verbindung mit verschiedenen Krebsarten gebracht, zuerst mit akuter lymphatischer Leukämie (Alkema 1993). Bmi1 bildet über die Bindung an RING2/RING1b-Untereinheiten eine funktionale Ubiquitin-Ligase, den *Polycomb-repressive-complex 1* (PRC1). Diese ist in der Lage, Histone zu ubiquitinieren und über Chromatinveränderung die Expression von Genen zu unterdrücken oder DNA-Reparatur zu ermöglichen (Lin 2015). Eine prominente Rolle spielt ektopisch exprimiertes Bmi1 in verschiedenen Krebszellen bei der G2/M-Checkpointaktivierung. Hierdurch werden Chemotherapiewirkungen abgeschwächt, die auf einem G2/M-Arrest beruhen (Wei 2015). Der Umstand, dass Bmi1 seine Wirksamkeit typischerweise im Komplex mit weiteren Untereinheiten entfaltet, könnte ein Grund für die nicht-signifikante Wirkung des isoliert exprimierten Bmi1 auf die NOS2-Expression im Versuchsaufbau dieser Arbeit sein.

## 8.2.2 LEF1

LEF1 (*Lymphoid enhancer binding factor 1*. LEF1-Gen: ENSG00000138795. Synonym auch *T-cell transcription factor 10* (TCF10, bzw. TCF1ALPHA, TCF7L3)) ist ein sequenzspezifisch DNA-bindender Transkriptionsfaktor, der zur Familie der *High Mobility Group*-Proteine gehört und in die Vermittlung von Wnt-Signalen in den Zellkern eingebunden ist. Der Wnt-Signalweg spielt u.a. eine wichtige Rolle in der Embryogenese und Stammzellerhaltung (Differenzierung, Migration und Proliferation) und bei Fehlregulation in der Kanzerogenese (u.a. Pankreas-, Kolon-, Mammakarzinom, Melanom, Leukämie). LEF1 besitzt dabei eine kontextabhängig regulierende Funktion: in Abwesenheit von  $\beta$ -Catenin bindet LEF1 inhibitorisch an die sog. *Wnt-response-elements* der Zielgene. Die Aktivierung des Wnt-Signalwegs durch extrazelluläre Reize führt zur Hemmung des Abbaus von  $\beta$ -Catenin und zur dessen vermehrter Bindung an LEF1, wodurch sich die LEF1-Wirkung umkehrt und die Zielgene aktiviert werden (Arce 2006). Fehlregulierte LEF1-Expression fand sich als essenzieller kanzerogener Faktor in verschiedenen Krebsarten. So korreliert etwa eine erhöhte LEF1-Expression mit fortgeschrittenen Stadien von Pankreaskarzinomen (Jesse 2010). LEF1 führt dabei zu verringerter Zelladhäsion und durch Induktion von Zellzyklus-regulierenden Proteinen zu erhöhten Proliferationsraten der Tumorzellen. Das mutierte APC-Gen, das bei den meisten Formen der Kolonadenokarzinome nachweisbar ist, führt durch eine unangemessene Stabilisierung von  $\beta$ -Catenin über LEF1 zur Aktivierung von genetischen Proliferationsprogrammen in Darmepithelzellen (Clevers 2006). Ähnliche Wnt-Fehlregulationen sind für weitere Krebsarten beschrieben, etwa für myeloische und lymphatische Leukämien, malignes Melanom oder Mammakarzinome (Reya 2005). Die nicht-signifikante Wirkung des isoliert überexprimierten LEF1 auf die NOS2-Expression im Versuchsaufbau dieser Arbeit lässt sich möglicherweise dadurch erklären, dass sich die hochkomplexe Wirkungsweise von LEF1 erst in der Einbindung in die Wnt-Signalkaskade entfalten kann. Denkbar wäre beispielsweise, dass zumindest der Hauptligand,  $\beta$ -Catenin, in ausreichender Menge anwesend sein muss, um LEF1 in einen funktionalen Modus zu bringen. Bemerkenswert ist immerhin, dass das NOS2-2-Gen eine LEF1-Bindestelle besitzt und somit zumindest potenziell an den für die Stammzeldifferenzierung so bedeutenden Wnt-Weg angeschlossen ist.

### 8.2.3 Meis1b

Der Transkriptionsfaktor Meis1b (*Myeloid ecotropic viral integration site 1 b*. MEIS1-Gen: ENSG00000143995) gehört zu den Homöodomänen-Proteinen und innerhalb dieser zur TALE (*three amino acid loop extension*)-Unterfamilie. Das MEIS1-Gen gehört zu den homöotischen Genen, die innerhalb morphogenetischer Prozesse größere funktionell zusammenhängende Gengruppen regulieren. Insbesondere führen die unterschiedlichen Expressionslevel der homöotischen Gene während der Morphogenese zur Einteilung der Körperlängsachse in Segmente, in denen unterschiedliche Entwicklungsprogramme aktiviert werden. Die Wirkungsweise von Meis1b ist dabei stark kontextbedingt und typischerweise von der Komplexbildung mit anderen Homöodomänen-Proteinen abhängig. Zentrale Funktionen liegen in Stammzell- und Differenzierungsregulation und Kanzerogenese. So ist Meis1b beispielsweise ein zentraler Regulator des Zellzyklus in proliferierenden Kardiomyozyten (Mahmoud 2013). Hier wirkt Meis1b in einem Transkriptionsnetzwerk, in das zahlreiche weitere Zellzyklusgene und Hox-Gene eingebunden sind. Dysreguliertes Meis1b fand sich in verschiedenen Tumorgeweben, zuerst in myeloischen Leukämie-Zelllinien, aber auch im Prostatakarzinom, Neuroblastom und nicht-kleinzelligen Lungenkarzinom (Jiang 2021). Während hochreguliertes Meis1b die Proliferation der Neuroblastomzellen fördert, wirkt es proliferationshemmend in nicht-kleinzelligen Lungenadenokarzinomzellen (Geerts 2003; Li 2014). So zeigt sich auch bei diesem Transkriptionsfaktor die Abhängigkeit von der jeweiligen zellulären Umgebung, die in den Experimenten dieser Arbeit möglicherweise nicht in ausreichender Komplexität nachgebildet werden konnte.

### 8.2.4 PLAG1

Das Zinkfingerprotein PLAG1 (*Pleiomorphic adenoma gene 1*. PLAG1-Gen: ENSG00000181690. Teil der PLAG-Onkogenfamilie) ist ein Transkriptionsfaktor, der zuerst in Zellen des pleomorphen Adenoms der Speicheldrüse gefunden wurde. In diesen Zellen kommt es durch Chromosomenaberration zum Promotoraustausch zwischen dem PLAG1-Gen und verschiedenen ubiquitär exprimierten Genen, wie z.B. dem Gen für  $\beta$ -Catenin oder dem LIFR (*Leukemia inhibitory factor receptor*)-Gen (Kas 1997). Die kodierende Sequenz bleibt dabei erhalten und gerät durch die Aberration unter die Kontrolle starker Promotoren. In der Folge überexprimiertes PLAG1 aktiviert den Promotor des mitogenen IGF-II (*insulin like growth factor II*)-Gens, was als ein wesentlicher Faktor für die Entstehung der pleomorphen Adenome und anderer Tumoren identifiziert werden konnte und wahrscheinlich der zentrale Transaktivierungspfad von PLAG1 überhaupt ist (Voz 2000). Im weiteren Verlauf konnte gezeigt werden, dass die Chromosomenaberration, die zu fehlreguliertem PLAG1, bzw. IGF-II führt, auch das zentrale onkogene Ereignis in der Entstehung von Lipoblastomen ist (Hibbard 2000). Ein analoger

Mechanismus scheint auch bei der Entstehung des Hepatoblastoms vorzuliegen und kann offenbar – zumindest synergistisch – auch zur Entstehung der akuten myeloischen Leukämie beitragen (Zatkova 2004; Landrette 2005). Ektopisch exprimiertes PLAG1 fand sich auch in uterinen Leiomyomen und Leiomyosarkomen (Åström 1999). Andere durch PLAG1 transaktivierten Gene haben dabei teilweise auch anti-proliferative Wirkungen. Ein Beispiel ist das beim pleomorphen Adenom durch PLAG1 aktivierte apoptotische Bax-Gen. Solche ambivalenten Aktivierungen wurden als Erklärung für die günstigen pathologischen und prognostischen Merkmale des pleomorphen Adenoms herangezogen (Wang 2013). Die kanzerogene Kapazität der alleinigen PLAG1-Überexpression wurde im transgenen Mausmodell bestätigt (Declercq 2008).

Über die physiologischen Funktionen des PLAG1 ist weniger bekannt. Hohe Expressionsraten finden sich vor allem in fetalem Leber-, Nieren- und Lungengewebe, sowie in der embryonalen Hypophysenanlage, während sie in den entsprechenden adulten Geweben wieder absinken. In adultem Herz-, Eierstock-, Hoden-, Nebenhoden- und Samenleitergewebe ließ sich ebenfalls erhöhte PLAG1-Expression nachweisen. Zu diesem Bild fügt sich die Erkenntnis, dass PLAG1-defiziente Mäuse sowohl Wachstumsretardierung als auch verringerte Fruchtbarkeit zeigen (Hensen 2004). Beim Menschen konnte die intrauterine Wachstumsrestriktion in Zusammenhang mit durch *microRNA* herunterreguliertem PLAG1 gebracht werden (Tang 2013). Bei der systematischen Suche nach weiteren PLAG1-Zielen stellten sich Gene von Wachstumsfaktoren, Wachstumsfaktorrezeptoren und Wachstumsfaktor-bindenden Proteinen als die umfangreichsten Kategorien heraus. In Zusammenschau mit den Expressionsloci macht dies eine koordinative Rolle des PLAG1 bei der fetalen Zellproliferation als eine der Hauptfunktionen plausibel. So sind beispielsweise die Wachstumsfaktoren VEGF und PLGF, die beide als potente Mitogene für Endothelzellen bekannt sind, durch PLAG1 positiv reguliert (Voz 2004). Die Untersuchung der räumlichen Expressionsmuster von PLAG1 im Modelorganismus zeigte eine geringe ubiquitäre Expression, während der frühen Somitogenese, die im Fortschreiten dieses Prozesses in Zonen besonders aktiver Zellproliferation ansteigt – ein Muster, das dem anderer bekannter Proliferationsmarker ähnelt (Yu 2004). Bisher ist bekannt, dass die physiologische PLAG1-Aktivität transkriptionell, posttranskriptionell und durch *microRNAs* reguliert wird. So wird beispielsweise durch posttranskriptionelle Acetylierung die Transaktivierungsfunktion des PLAG1 aktiviert, während Deacetylierung, sowie die *SUMO*ylierung (die temporäre Anheftung des Ubiquitin-ähnlichen Modifikatorproteins *SUMO*) diese Funktion hemmen (Van Dyck 2004). Dass solche Mechanismen in der Versuchsanordnung dieser Arbeit nicht simuliert werden konnten, mag zur nicht-signifikanten PLAG1-Wirkung auf die NOS2-2-Expression beigetragen haben.

### 8.2.5 Zpo1

Der Zinkfinger-Transkriptionsfaktor Zpo1 (*zinc finger elbow-related proline domain protein 1* Zpo1-Gen: ENSG00000183779. Synonyme: ZNF703, NLZ1, ZNF503L, FLJ14299, Zpo1, ZEPP01, Noz1) gehört zur sog. NET/N1z-Familie atypischer Zinkfinger-Proteine. Die erste ausführlichere Beschreibung der Zpo1-Homologen erfolgte im Zusammenhang der frühen Embryogenese am Modellorganismus (Andreazzoli 2001). Hybridisierungsexperimente legten hier eine strukturierende Funktion während der Entwicklung des Neuroektoderms nahe. Es konnte u.a. gezeigt werden, dass Zpo1 über die Aktivierung von Histon-Deacetylasen die Repression von nicht-entwicklungsrelevanten Genen vermittelt (Nakamura 2008). Im weiteren Verlauf geriet Zpo1 bei der systematischen Suche nach Brustkrebs-Onkogenen in den Fokus (Adelaide 2007). Im Mausmodell zeigte sich Zpo1 als bedeutender Faktor für Tumorwachstum und Metastasierung bei Brustkrebs. Beim Menschen korreliert die Amplifikation des Zpo1-Locus (8p11-12) bei Mammakarzinomen mit erhöhter Proliferation, erhöhtem Tumorgrad und verringertem metastasenfreiem Überleben (Slorach 2011). So unterdrückt überexprimiertes Zpo1 beispielsweise die Transkription des Adhäsionsmoleküls E-Cadherin und reduziert so die Zell-Zell-Adhäsion. Weiterhin konnte gezeigt werden, dass die Überexpression von Zpo1 in primären Brustepithelzellen eine Verschiebung in der Verteilung von CD49f-positiven Zellen verursacht, die eine Vorläuferpopulation bei Brustkrebs vom Lumentyp darstellen (Holland 2011). Insgesamt weisen die Studienergebnisse darauf hin, dass Zpo1 in Mammakarzinomzellen Teil eines komplizierten Östrogen-regulierten Repressorkomplexes ist, der verschiedenen kanzerogenen Mechanismen unterhält (Spellman 2011). Weitere Studien identifizierten Zpo1 auch als Onkogen für Magenkarzinome: die Zpo1-Expressionsniveaus korrelierten sowohl mit der Tiefe der Tumordinvasion, der venösen Invasion und der Ausbildung von Lymphknotenmetastasen. Stummschaltung des Zpo1-Gens durch RNA-Interferenz hemmte dagegen signifikant die Zellproliferation und -migration (Yang 2014). Ein vergleichbarer Zusammenhang fand sich schließlich auch beim kolorektalen Adenokarzinom: Die Zpo1-Expression korrelierte signifikant mit der serösen Invasion, der Tumorgroße, dem pathologischen Grading und der Metastasierungsrate (Ma 2014). Hinweise auf Tumorgenese durch überexprimiertes Zpo1 liegen des Weiteren vor für nicht-kleinzellige Lungen-, papilläre und medulläre Schilddrüsen- Cholangio-, Ovarial- und Plattenepithelkarzinome (Xue-Liang 2015; Baykara 2016; Li 2016; Wang 2020; Yang 2020).

### 8.3 Mögliche Ursachen der ausbleibenden Tf-Wirkung auf NOS2-2

Was sind nun mögliche Erklärungen für das Ausbleiben einer signifikanten Wirkung der o.g. Transkriptionsfaktoren auf die Expression der NOS2-2? Grundsätzlich ist es denkbar, dass eine eigene Promotorregion für die NOS2-2 nicht existiert. Das NOS2-2-Transkript könnte etwa durch alternatives Splicen oder sonstige Modifikationen aus dem ursprünglichen NOS2-Transkript hervorgehen. Die transkriptionelle Regulation unterläge dann dem bekannten NOS2-1-Promotor. Hinzu käme eine unbekannte Regulationsebene für die Transkriptmodifikation. Die Koinzidenz der Bindestellen der Transkriptionsfaktoren und ihrer Herauf- bzw. Herunterregulation während der NOS2-2-Expression wären dann – zumindest in dieser Hinsicht – rein zufällig. Da sämtliche Transkriptionsfaktoren wie oben beschrieben in frühen Entwicklungsstadien exprimiert werden, ist es durchaus denkbar, dass sie in den untersuchten differenzierenden Stammzellen zufällig zeitgleich mit der NOS2-2 exprimiert werden, ohne diese zu regulieren. Dass die Transkriptionsfaktorbindestellen in der dem Exon-1-diff vorgelagerten Region zufällig, bzw. jedenfalls nicht mit Bezug auf die NOS2-2-Regulation bestehen, erscheint plausibel, wenn man die hohe Zahl der dort sonst noch bestehenden Transkriptionsfaktorbindestellen betrachtet (vgl. Abbildung 7-4).

Eine andere Erklärung für die nicht-signifikante Wirkung könnte in der unzureichenden Nachbildung der tatsächlichen Situation der differenzierenden Stammzellen liegen. Die Expression der Transkriptionsfaktoren erfolgte in DLD-1-Zellen (kolorektale Adenokarzinomzellen) und eben nicht in einer der in Frage stehenden Stammzellenlinien. Es kann davon ausgegangen werden, dass sich die Konditionen dieser beiden Zelltypen in sehr vielen Punkten unterscheiden. Von der Chromatininformation, über das Proteom bis zu gewebespezifischen Stimuli lassen sich zahlreiche Unterschiede denken, die der Nachbildung eines Stammzellprozesses in einer DLD-1-Zelle im Weg stehen. So wäre es beispielsweise denkbar, dass der Transport der überexprimierten Transkriptionsfaktoren zur richtigen Lokalisation im Zellkern abhängig von unbekanntem Faktoren ist, die in der DLD-1-Zelle fehlen. Gleiches gilt für möglicherweise notwendige Aktivierungen oder sonstige Modifikationen der Transkriptionsfaktoren. Die obenstehende Analyse der Transkriptionsfaktoren zeigte, dass diese in der Regel erst als Komplexe mit Partnermolekülen ihre Wirkung entfalten. Sie zeigte auch, dass ihre Wirkungen in Regelkreise eingebunden sind, deren Verzweigungen fein abgestimmt sein müssen, um zu funktionieren. Die einfache Überexpression eines isolierten Transkriptionsfaktors kann solche Synergien nicht nachbilden.

Wenn man davon ausgeht, dass der NOS2-2-Promotor existiert, liegt es nahe anzunehmen, dass mehrere der sieben identifizierten Transkriptionsfaktoren zeitgleich binden müssen, um die Transkription zu aktivieren und eine signifikante Beeinflussung der NOS2-2 zu erzeugen. Denkbar ist auch, dass dazu eine ganz bestimmte Kombination der Transkriptionsfaktoren notwendig ist. In dieser Arbeit konnten jeweils nur isolierte Transkriptionsfaktoren exprimiert werden. Die Untersuchung der unterschiedlichen Transkriptionsfaktor-Kombinationen muss in weiteren Arbeiten erfolgen.

Eine weitere Erklärung liegt ebenfalls im Versuchsaufbau dieser Arbeit: die Versuchsgruppen der transfizierten Zellkulturen wurden mit Zytokinen stimuliert, um die NOS2-Expression anzuregen. Möglicherweise wurde so eine schwache Wirkung der Transkriptionsfaktoren auf die Expression durch die starke Wirkung der Zytokine überlagert und unsichtbar gemacht. Dagegen war die isolierte Transkriptionsfaktorwirkung in den nicht-zytokinstimulierten Kontrollgruppen möglicherweise zu gering, um eine signifikante Menge RNA zu erzeugen. Zukünftige Arbeiten müssen diese Hindernisse ausräumen, um die offenen Fragen zur NOS2-2-Regulation umfänglich zu beantworten.

## 9 Fazit und Ausblick

Durch die NOS2 produziertes NO spielt wichtige Rollen in vielen physiologischen und pathologischen Prozessen, unter anderem auch bei Differenzierungsvorgängen von Stammzellen. Isoform-spezifische Analysen zeigten, dass es in hESCs und hiPSCs im Verlauf ihrer Differenzierung zu bestimmten Geweben zur transienten Expression der bisher weitgehend unbekanntes Isoform NOS2-2 kommt. Das Transkript der NOS2-2 zeichnet sich durch ein alternatives erstes Exon aus, was auf eine korrespondierende alternative Regulation der Transkription hindeutet.

In dieser Arbeit wurde zunächst die Funktionalität der NOS2-2 in Hinsicht auf ihre Fähigkeit zur NO-Biosynthese untersucht. Plasmide mit der NOS2-2-Sequenz wurden transient in DLD1-Zellen transfiziert und mittels Tet-on-Systems zur Expression gebracht. Die anschließende Analyse der NO-Produktion mittels Griess-Assay zeigte signifikant erhöhte NO-Produktionsraten, was die Fähigkeit der NOS2-2 zur NO-Produktion nahelegt. Dass die signifikante NO-Produktion in stabilen Transfektionsexperimenten nur für die NOS2-1 Isoform bestätigt werden konnte, liegt möglicherweise an Schwächen des Versuchsaufbaus. Dieser Widerspruch muss in weiteren Arbeiten untersucht werden, ggf. mit sensibleren Methoden zur NO-Quantifizierung.

Aus der Funktionalität der NOS2-2 ergibt sich die Annahme, dass das in Differenzierungsprozessen wirksame NO tatsächlich zumindest teilweise von jener Isoform produziert wird. Interessant ist nun, ob die NOS2-2 einer eigenen, von der NOS2-2-Regulation unterschiedenen Transkriptionsregulation unterworfen ist. Während die Expressionsstimuli der NOS2-1 immunsystembezogen sind, könnte die NOS2-2-Regulation auf Differenzierungsprozesse bezogen sein. Bioinformatische Vorarbeit von Gather et al. identifizierte sieben Transkriptionsfaktoren, welche sowohl in der putativen NOS2-2-Promotorregion eine Bindungsstelle besitzen, als auch koinzident mit der NOS2-2-mRNA herauf- oder herunterreguliert sind. In dieser Arbeit wurden fünf dieser Transkriptionsfaktoren (Bmi1, LEF1, Meis1b, PLAG1 und Zpo1) in entsprechenden Plasmiden in DLD1-Zellen transfiziert und zur Expression stimuliert. Ihre Auswirkung auf die NOS2-2-Expression wurde mittels qRT-PCR-Analysen untersucht. Es zeigte sich kein signifikanter Zusammenhang zwischen der Expression der Transkriptionsfaktoren und der Produktion von NOS2-2-mRNA.

Weitere Arbeiten müssen die Hindernisse ausräumen, die dem Nachweis dieser möglicherweise existierenden Signifikanz in diesem Versuchsaufbau im Weg standen. So müsste in erster Linie die *in vivo* tatsächlich vorliegende Komplexität im Experiment besser nachgebildet werden. Die Synergien der Transkriptionsfaktoren müssten untersucht werden, indem sie in den möglichen Kombinationen exprimiert werden. Des Weiteren müssten die Experimente an Stammzelllinien – im Idealfall an differenzierenden hESCs, bzw. hiPSCs – durchgeführt werden, um den epigenetischen Hintergrund, sowie die tatsächliche Zellumgebung der bekannten NOS2-2-Expression besser nachzubilden. Weitere

Bedingungen zukünftiger Arbeiten mögen sich aus der genaueren theoretischen Analyse der Regelkreise der Transkriptionsfaktoren und ihren Bezügen zu Differenzierungsprozessen ergeben.

Allgemein bleibt die Aufgabe der genaueren Charakterisierung der NOS2-2. Dazu gehört etwa die Klonierung und Aktivitätsanalyse der putativen NOS2-2-Promotorregion. Möglicherweise ließen sich hier weitere spezifische Regulationsmechanismen aufdecken. Mit bioinformatischen Methoden könnte nach weiteren Regulationsmechanismen und Expressionsorten der NOS2-2 gesucht werden, um neue mögliche Charakterisierungsansätze zu erschließen. Die Konzentration solcher Suchanstrengungen auf differenzierende Zellen erscheint vielversprechend.

Der Wert der genaueren Charakterisierung der NOS2-2 liegt im besseren Verständnis von Differenzierungsprozessen der Stammzellen. In der regenerativen Medizin ist dieses Verständnis besonders wichtig im Umgang mit hiPSCs. Diese aus autologem Gewebe durch Reprogrammierung erzeugten Stammzellen sind Grundbausteine vielversprechender neuer medizinischer Ansätze. Sie haben das Potential viele Probleme der bisherigen Stammzelltherapien mit hESCs zu umgehen. Zur Minimierung der Risiken, die hiPSC-Ansätze bergen und zu ihrer besseren Handhabbarkeit ist allerdings ein umfassendes Verständnis der komplexen zellulären Abläufe erforderlich. Mit dieser Arbeit wurde versucht, einen bescheidenen Beitrag zur Lösung dieser Aufgabe zu leisten. Weitere Arbeiten zur genaueren Erforschung der Rolle des NO und seiner Entstehung in diesen Zusammenhängen müssen folgen.

## 10 Literaturverzeichnis

**Adamiak, M., Abdelbaset-Ismail, A., Moore, J. B. t. et al.** (2017): Inducible Nitric Oxide Synthase (iNOS) Is a Novel Negative Regulator of Hematopoietic Stem/Progenitor Cell Trafficking. In: *Stem Cell Reviews and Reports*, 13 (1), S. 92-103.

**Adelaide, J., Finetti, P., Bekhouche, I. et al.** (2007): Integrated profiling of basal and luminal breast cancers. In: *Cancer research*, 67 (24), S. 11565-11575.

**Alheid, U., Frölich, J. C., Förstermann, U.** (1987): Endothelium-derived relaxing factor from cultured human endothelial cells inhibits aggregation of human platelets. In: *Thrombosis Research*, 47 (5), S. 561-571.

**Alkema, M. J., Wiegant, J., Raap, A. K. et al.** (1993): Characterization and chromosomal localization of the human proto-oncogene BMI-1. In: *Human molecular genetics*, 2 (10), S. 1597-1603.

**Andreazzoli, M., Broccoli, V., Dawid, I. B.** (2001): Cloning and expression of noz1, a zebrafish zinc finger gene related to *Drosophila* nocA. In: *Mechanisms of development*, 104 (1-2), S. 117-120.

**Arce, L., Yokoyama, N. N., Waterman, M. L.** (2006): Diversity of LEF/TCF action in development and disease. In: *Oncogene*, 25 (57), S. 7492-7504.

**Arnold, W. P., Mittal, C. K., Katsuki, S. et al.** (1977): Nitric oxide activates guanylate cyclase and increases guanosine 3':5'-cyclic monophosphate levels in various tissue preparations. In: *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 74 (8), S. 3203-3207.

**Åström, A.-K., Voz, M. L., Kas, K. et al.** (1999): Conserved mechanism of PLAG1 activation in salivary gland tumors with and without chromosome 8q12 abnormalities: identification of SII as a new fusion partner gene. In: *Cancer research*, 59 (4), S. 918-923.

**Bagasra, O., Michaels, F. H., Zheng, Y. M. et al.** (1995): Activation of the inducible form of nitric oxide synthase in the brains of patients with multiple sclerosis. In: *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 92 (26), S. 12041-12045.

**Baykara, O., Dalay, N., Kaynak, K. et al.** (2016): ZNF703 Overexpression may act as an oncogene in non-small cell lung cancer. In: *Cancer Medicine*, 5 (10), S. 2873-2878.

**Birnboim, H. C., Doly, J.** (1979): A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. In: *Nucleic acids research*, 7 (6), S. 1513-1523.

**Bogdan, C., Röllinghoff, M., Diefenbach, A.** (2000): Reactive oxygen and reactive nitrogen intermediates in innate and specific immunity. In: *Current Opinion in Immunology*, 12 (1), S. 64-76.

**Bros, M., Boissel, J.-P., Gödtel-Armbrust, U. et al.** (2006): Transcription of human neuronal nitric oxide synthase mRNAs derived from different first exons is partly controlled by exon 1-specific promoter sequences. In: *Genomics*, 87 (4), S. 463-473.

- Cao, R., Tsukada, Y., Zhang, Y.** (2005): Role of Bmi-1 and Ring1A in H2A ubiquitylation and Hox gene silencing. In: *Molecular Cell*, 20 (6), S. 845-854.
- Carreira, B. P., Morte, M. I., Santos, A. I. et al.** (2014): Nitric oxide from inflammatory origin impairs neural stem cell proliferation by inhibiting epidermal growth factor receptor signaling. In: *Frontiers in Cellular Neuroscience*, 8, S. 343.
- Chomczynski, P., Sacchi, N.** (1987): Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. In: *Analytical Biochemistry*, 162 (1), S. 156-159.
- Clevers, H.** (2006): Wnt/beta-catenin signaling in development and disease. In: *Cell*, 127 (3), S. 469-480.
- Colussi, C., Gurtner, A., Rosati, J. et al.** (2009): Nitric oxide deficiency determines global chromatin changes in Duchenne muscular dystrophy. In: *FASEB Journal*, 23 (7), S. 2131-2141.
- Covacu, R., Danilov, A. I., Rasmussen, B. S. et al.** (2006): Nitric oxide exposure diverts neural stem cell fate from neurogenesis towards astrogliogenesis. In: *Stem Cells*, 24 (12), S. 2792-2800.
- Declercq, J., Van Dyck, F., Van Damme, B. et al.** (2008): Upregulation of Igf and Wnt signalling associated genes in pleomorphic adenomas of the salivary glands in PLAG1 transgenic mice. In: *International journal of oncology*, 32 (5), S. 1041-1047.
- Förstermann, U., Boissel, J. P., Kleinert, H.** (1998): Expressional control of the ‘constitutive’ isoforms of nitric oxide synthase (NOS I and NOS III). In: *The FASEB Journal*, 12 (10), S. 773-790.
- Förstermann, U., Closs, E. I., Pollock, J. S. et al.** (1994): Nitric oxide synthase isozymes. Characterization, purification, molecular cloning, and functions. In: *Hypertension*, 23 (6 Pt 2), S. 1121-1131.
- Gather, F., Ihrig-Biedert, I., Kohlhas, P. et al.** (2022): A specific, non-immune system-related isoform of the human inducible nitric oxide synthase is expressed during differentiation of human stem cells into various cell types. In: *Cell Communication and Signaling*, 20 (1), S. 1-16.
- Geerts, D., Schilderink, N., Jorritsma, G. et al.** (2003): The role of the MEIS homeobox genes in neuroblastoma. In: *Cancer Letters*, 197 (1-2), S. 87-92.
- Ghigo, D., Priotto, C., Migliorino, D. et al.** (1998): Retinoic acid-induced differentiation in a human neuroblastoma cell line is associated with an increase in nitric oxide synthesis. In: *Journal of cellular physiology*, 174 (1), S. 99-106.
- Gossen, M., Bujard, H.** (1992): Tight control of gene expression in mammalian cells by tetracycline-responsive promoters. In: *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 89 (12), S. 5547-5551.
- Groves, J. T., Wang, C. C.** (2000): Nitric oxide synthase: models and mechanisms. In: *Current Opinion in Chemical Biology*, 4 (6), S. 687-695.

**Gudi, T., Hong, G. K., Vaandrager, A. B. et al.** (1999): Nitric oxide and cGMP regulate gene expression in neuronal and glial cells by activating type II cGMP-dependent protein kinase. In: *FASEB Journal*, 13 (15), S. 2143-2152.

**Halbrügge, T., Lütsch, K., Thyen, A. et al.** (1991): Role of nitric oxide formation in the regulation of haemodynamics and the release of noradrenaline and adrenaline. In: *Naunyn-Schmiedeberg's Archives of Pharmacology*, 344 (6), S. 720-727.

**Haywood, G. A., Tsao, P. S., von der Leyen, H. E. et al.** (1996): Expression of inducible nitric oxide synthase in human heart failure. In: *Circulation*, 93 (6), S. 1087-1094.

**Hensen, K., Braem, C., Declercq, J. et al.** (2004): Targeted disruption of the murine Plag1 proto-oncogene causes growth retardation and reduced fertility. In: *Development, Growth & Differentiation*, 46 (5), S. 459-470.

**Hibbard, M. K., Kozakewich, H. P., Dal Cin, P. et al.** (2000): PLAG1 fusion oncogenes in lipoblastoma. In: *Cancer Research*, 60 (17), S. 4869-4872.

**Hickok, J. R., Vasudevan, D., Antholine, W. E. et al.** (2013): Nitric oxide modifies global histone methylation by inhibiting Jumonji C domain-containing demethylases. In: *The journal of biological chemistry*, 288 (22), S. 16004-16015.

**Higuchi, R., Dollinger, G., Walsh, P. S. et al.** (1992): Simultaneous amplification and detection of specific DNA sequences. In: *Biotechnology* 10 (4), S. 413-417.

**Hmadcha, A., Bedoya, F. J., Sobrino, F. et al.** (1999): Methylation-dependent gene silencing induced by interleukin 1 $\beta$  via nitric oxide production. In: *The Journal of experimental medicine*, 190 (11), S. 1595-1604.

**Holland, D. G., Burleigh, A., Git, A. et al.** (2011): ZNF703 is a common Luminal B breast cancer oncogene that differentially regulates luminal and basal progenitors in human mammary epithelium. In: *EMBO molecular medicine*, 3 (3), S. 167-180.

**Hon, C. C., Ramilowski, J. A., Harshbarger, J. et al.** (2017): An atlas of human long non-coding RNAs with accurate 5' ends. In: *Nature*, 543 (7644), S. 199-204.

**Huang, F. Y., Chan, A. O. O., Rashid, A. et al.** (2012): Helicobacter pylori induces promoter methylation of E-cadherin via interleukin-1 $\beta$  activation of nitric oxide production in gastric cancer cells. In: *Cancer*, 118 (20), S. 4969-4980.

**Ignarro, L., Freeman, B. (Hrsg.)** (2017): Nitric Oxide – Biology and Pathobiology, 3. Aufl., Elsevier Academic Press, London.

**Ilic, D., Ogilvie, C.** (2017): Concise Review: Human Embryonic Stem Cells-What Have We Done? What Are We Doing? Where Are We Going? In: *Stem Cells*, 35 (1), S. 17-25.

**Jenkins, D. C., Charles, I. G., Thomsen, L. L. et al.** (1995): Roles of nitric oxide in tumor growth. In: *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 92 (10), S. 4392-4396.

**Jesse, S., Koenig, A., Ellenrieder, V. et al.** (2010): Lef-1 isoforms regulate different target genes and reduce cellular adhesion. In: *International Journal of Cancer*, 126 (5), S. 1109-1120.

**Jiang, M., Xu, S., Bai, M. et al.** (2021): The emerging role of MEIS1 in cell proliferation and differentiation. In: *American Journal of Physiology - Cell Physiology*, 320 (3), S. C264-c269.

**Kas, K., Voz, M. L., R ojer, E. et al.** (1997): Promoter swapping between the genes for a novel zinc finger protein and beta-catenin in pleiomorphic adenomas with t(3;8)(p21;q12) translocations. In: *Nature Genetics*, 15 (2), S. 170-174.

**Kleinert, H., Euchenhofer, C., Ihrig-Biedert, I. et al.** (1996): Glucocorticoids inhibit the induction of nitric oxide synthase II by down-regulating cytokine-induced activity of transcription factor nuclear factor-kappa B. In: *Molecular Pharmacology*, 49 (1), S. 15-21.

**Kröncke, K. D., Fehsel, K., Kolb-Bachofen, V.** (1998): Inducible nitric oxide synthase in human diseases. In: *Clinical and Experimental Immunology*, 113 (2), S. 147-156.

**Kuang, Z., Lewis, R. S., Curtis, J. M. et al.** (2010): The SPRY domain-containing SOCS box protein SPSB2 targets iNOS for proteasomal degradation. In: *Journal of Cell Biology*, 190 (1), S. 129-141.

**Kubes, P., Suzuki, M., Granger, D. N.** (1991): Nitric oxide: an endogenous modulator of leukocyte adhesion. In: *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 88 (11), S. 4651-4655.

**Lamontagne, D., Pohl, U., Busse, R.** (1992): Mechanical deformation of vessel wall and shear stress determine the basal release of endothelium-derived relaxing factor in the intact rabbit coronary vascular bed. In: *Circulation research*, 70 (1), S. 123-130.

**Lancaster, J. R., Jr.** (1997): A tutorial on the diffusibility and reactivity of free nitric oxide. In: *Nitric Oxide*, 1 (1), S. 18-30.

**Landrette, S. F., Kuo, Y. H., Hensen, K. et al.** (2005): Plag1 and Plag2 are oncogenes that induce acute myeloid leukemia in cooperation with Cbfb-MYH11. In: *Blood*, 105 (7), S. 2900-2907.

**Lewis, N. P., Tsao, P. S., Rickenbacher, P. R. et al.** (1996): Induction of nitric oxide synthase in the human cardiac allograft is associated with contractile dysfunction of the left ventricle. In: *Circulation*, 93 (4), S. 720-729.

**Li, J. T., Somasundaram, C., Bian, K. et al.** (2010): Nitric oxide signaling and neural stem cell differentiation in peripheral nerve regeneration. In: *Eplasty*, 10.

**Li, K., Wang, J., Han, J. et al.** (2016): Overexpression of ZNF703 facilitates tumorigenesis and predicts unfavorable prognosis in patients with cholangiocarcinoma. In: *Oncotarget*, 7 (46), S. 76108-76117.

**Li, Q., Sarna, S. K.** (2012): Nitric oxide modifies chromatin to suppress ICAM-1 expression during colonic inflammation. In: *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*, 303 (1), S. G103-110.

**Li, W., Huang, K., Guo, H. et al.** (2014): Meis1 regulates proliferation of non-small-cell lung cancer cells. In: *Journal of Thoracic Disease*, 6 (6), S. 850-855.

- Lin, X., Ojo, D., Wei, F. et al.** (2015): A Novel Aspect of Tumorigenesis-BMI1 Functions in Regulating DNA Damage Response. In: *Biomolecules*, 5 (4), S. 3396-3415.
- Liu, Q., Jiang, C., Xu, J. et al.** (2017): Genome-Wide Temporal Profiling of Transcriptome and Open Chromatin of Early Cardiomyocyte Differentiation Derived From hiPSCs and hESCs. In: *Circulation Research*, 121 (4), S. 376-391.
- Livak, K. J., Schmittgen, T. D.** (2001): Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method. In: *Methods*, 25 (4), S. 402-408.
- Luo, L., Zhou, Y., Zhang, C. et al.** (2020): Feeder-free generation and transcriptome characterization of functional mesenchymal stromal cells from human pluripotent stem cells. In: *Stem Cell Research*, 48, S. 101990.
- Ma, F., Bi, L., Yang, G. et al.** (2014): ZNF703 promotes tumor cell proliferation and invasion and predicts poor prognosis in patients with colorectal cancer. In: *Oncology Reports*, 32 (3), S. 1071-1077.
- Madrid, M., Sumen, C., Aivio, S. et al.** (2021): Autologous Induced Pluripotent Stem Cell-Based Cell Therapies: Promise, Progress, and Challenges. In: *Current Protocols*, 1 (3), S. e88.
- Mahmoud, A. I., Kocabas, F., Muralidhar, S. A. et al.** (2013): Meis1 regulates postnatal cardiomyocyte cell cycle arrest. In: *Nature*, 497 (7448), S. 249-253.
- Michurina, T., Krasnov, P., Balazs, A. et al.** (2004): Nitric oxide is a regulator of hematopoietic stem cell activity. In: *Molecular Therapy*, 10 (2), S. 241-248.
- Mischler, A., Karakis, V., Mahinthakumar, J. et al.** (2021): Two distinct trophoblast lineage stem cells from human pluripotent stem cells. In: *Journal of Biological Chemistry*, 296, S. 100386.
- Mora-Castilla, S., Tejedo, J. R., Hmadcha, A. et al.** (2010): Nitric oxide repression of Nanog promotes mouse embryonic stem cell differentiation. In: *Cell Death and Differentiation*, 17 (6), S. 1025-1033.
- Morbidelli, L., Chang, C.-H., Douglas, J. G. et al.** (1996): Nitric oxide mediates mitogenic effect of VEGF on coronary venular endothelium. In: *American Journal of Physiology-Heart and Circulatory Physiology*, 270 (1), S. H411-H415.
- Nakaki, T., Nakayama, M., Kato, R.** (1990): Inhibition by nitric oxide and nitric oxide-producing vasodilators of DNA synthesis in vascular smooth muscle cells. In: *European Journal of Pharmacology: Molecular Pharmacology*, 189 (6), S. 347-353.
- Nakamura, M., Choe, S.-K., Runko, A. P. et al.** (2008): Nlz1/Znf703 acts as a repressor of transcription. In: *BMC developmental biology*, 8 (1), S. 1-12.
- Nakane, M., Mitchell, J., Förstermann, U. et al.** (1991): Phosphorylation by calcium calmodulin-dependent protein kinase II and protein kinase C modulates the activity of nitric oxide synthase. In: *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 180 (3), S. 1396-1402.

- Nishiya, T., Matsumoto, K., Maekawa, S. et al.** (2011): Regulation of inducible nitric-oxide synthase by the SPRY domain- and SOCS box-containing proteins. In: *Journal of Biological Chemistry*, 286 (11), S. 9009-9019.
- Ohi, Y., Qin, H., Hong, C. et al.** (2011): Incomplete DNA methylation underlies a transcriptional memory of somatic cells in human iPS cells. In: *Nature Cell Biology*, 13 (5), S. 541-549.
- Okayama, H., Saito, M., Oue, N. et al.** (2013): NOS2 enhances KRAS-induced lung carcinogenesis, inflammation and microRNA-21 expression. In: *International journal of cancer*, 132 (1), S. 9-18.
- Ozkul, Y., Galderisi, U.** (2016): The Impact of Epigenetics on Mesenchymal Stem Cell Biology. In: *Journal of Cellular Physiology*, 231 (11), S. 2393-2401.
- Paupardin-Tritsch, D., Hammond, C., Gerschenfeld, H. M. et al.** (1986): cGMP-dependent protein kinase enhances Ca<sup>2+</sup> current and potentiates the serotonin-induced Ca<sup>2+</sup> current increase in snail neurones. In: *Nature*, 323 (6091), S. 812-814.
- Pautz, A., Art, J., Kleinert, H. et al.** (2010): Regulation of the expression of inducible nitric oxide synthase. In: *Nitric Oxide*, 23 (2), S. 75-93.
- Pérez-Torres, I., Manzano-Pech, L., Rubio-Ruíz, M. E. et al.** (2020): Nitrosative Stress and Its Association with Cardiometabolic Disorders. In: *Molecules*, 25 (11).
- Peunova, N., Enikolopov, G.** (1993): Amplification of calcium-induced gene transcription by nitric oxide in neuronal cells. In: *Nature*, 364 (6436), S. 450-453.
- Peunova, N., Enikolopov, G.** (1995): Nitric oxide triggers a switch to growth arrest during differentiation of neuronal cells. In: *Nature*, 375 (6526), S. 68-73.
- Rapoport, R. M., Draznin, M. B., Murad, F.** (1983): Endothelium-dependent relaxation in rat aorta may be mediated through cyclic GMP-dependent protein phosphorylation. In: *Nature*, 306 (5939), S. 174-176.
- Reya, T., Clevers, H.** (2005): Wnt signalling in stem cells and cancer. In: *Nature*, 434 (7035), S. 843-850.
- Rodrigues, G. M. C., Matos, A. F. S., Fernandes, T. G. et al.** (2013): Integrated Platform for Production and Purification of Human Pluripotent Stem Cell-Derived Neural Precursors. In: *Stem Cell Reviews and Reports*, 10, S. 151-161.
- Rosati, J., Spallotta, F., Nanni, S. et al.** (2011): Smad-Interacting Protein-1 and MicroRNA 200 Family Define a Nitric Oxide-Dependent Molecular Circuitry Involved in Embryonic Stem Cell Mesendoderm Differentiation. In: *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology*, 31 (4), S. 898-907.
- Saiki, R. K., Gelfand, D. H., Stoffel, S. et al.** (1988): Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. In: *Science*, 239 (4839), S. 487-491.

**Sheng, H., Schmidt, H. H., Nakane, M. et al.** (1992): Characterization and localization of nitric oxide synthase in non-adrenergic non-cholinergic nerves from bovine retractor penis muscles. In: *British Journal of Pharmacology*, 106 (4), S. 768-773.

**Shibuki, K., Okada, D.** (1991): Endogenous nitric oxide release required for long-term synaptic depression in the cerebellum. In: *Nature*, 349 (6307), S. 326-328.

**Silva, J., Smith, A.** (2008): Capturing pluripotency. In: *Cell*, 132 (4), S. 532-536.

**Slorach, E. M., Chou, J., Werb, Z.** (2011): Zeppol is a novel metastasis promoter that represses E-cadherin expression and regulates p120-catenin isoform expression and localization. In: *Genes & development*, 25 (5), S. 471-484.

**Spellman, P., Gray, J.** (2011): A new treasure in the breast cancer gene hunt. In: *Nature Medicine*, 17 (4), S. 422-423.

**Spinelli, V., Vona, A., Corti, F. et al.** (2016): Role of Nitric Oxide, Nitric Oxide Synthase, Soluble Guanylyl Cyclase, and cGMP-Dependent Protein Kinase I in Mouse Stem Cell Cardiac Development. In: *Stem Cells International*, 2016, S. 2868323.

**Taherbhoy, A. M., Huang, O. W., Cochran, A. G.** (2015): BMI1-RING1B is an autoinhibited RING E3 ubiquitin ligase. In: *Nature Communications*, 6, S. 7621.

**Takahashi, K., Yamanaka, S., Tanabe, K. et al.** (2007): Induction of pluripotent stem cells from adult human fibroblasts by defined factors. In: *Cell*, 131 (5), S. 861-872.

**Tang, Q., Wu, W., Xu, X. et al.** (2013): miR-141 contributes to fetal growth restriction by regulating PLAG1 expression. In: *PLoS One*, 8 (3), S. e58737.

**Thiemermann, C.** (1997): Nitric oxide and septic shock. In: *General Pharmacology*, 29 (2), S. 159-166.

**Thomson, J. A., Itskovitz-Eldor, J., Shapiro, S. S. et al.** (1998): Embryonic stem cell lines derived from human blastocysts. In: *Science*, 282 (5391), S. 1145-1147.

**Tiboni, G., Ponzano, A.** (2014): Nitric oxide and teratogenesis: an update. In: *Current pharmaceutical design*, 20 (34), S. 5443-5447.

**Tiribuzi, R., Crispoltoni, L., Tartacca, F. et al.** (2013): Nitric oxide depletion alters hematopoietic stem cell commitment toward immunogenic dendritic cells. In: *Biochimica et Biophysica Acta*, 1830 (3), S. 2830-2838.

**Togashi, H., Sakuma, I., Yoshioka, M. et al.** (1992): A central nervous system action of nitric oxide in blood pressure regulation. In: *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, 262 (1), S. 343-347.

**Ueki, Y., Miyake, S., Tominaga, Y. et al.** (1996): Increased nitric oxide levels in patients with rheumatoid arthritis. In: *Journal of Rheumatology*, 23 (2), S. 230-236.

- Valinezhad-Orang, A., Safaralizadeh, R., Kazemzadeh-Bavili, M.** (2014): Mechanisms of miRNA-Mediated Gene Regulation from Common Downregulation to mRNA-Specific Upregulation. In: *International Journal of Genomics*, 2014, S. 970607.
- Van Dyck, F., Delvaux, E. L., Van de Ven, W. J. et al.** (2004): Repression of the transactivating capacity of the oncoprotein PLAG1 by SUMOylation. In: *Journal of Biological Chemistry*, 279 (34), S. 36121-36131.
- Vasudevan, D., Hickok, J. R., Bovee, R. C. et al.** (2015): Nitric Oxide Regulates Gene Expression in Cancers by Controlling Histone Posttranslational Modifications. In: *Cancer Research*, 75 (24), S. 5299-5308.
- Vecellio, M., Meraviglia, V., Nanni, S. et al.** (2012): In vitro epigenetic reprogramming of human cardiac mesenchymal stromal cells into functionally competent cardiovascular precursors. In: *PloS one*, 7 (12), S. e51694.
- Vierbuchen, T., Ostermeier, A., Pang, Z. P. et al.** (2010): Direct conversion of fibroblasts to functional neurons by defined factors. In: *Nature*, 463 (7284), S. 1035-1041.
- Vodovotz, Y., Lucia, M. S., Flanders, K. C. et al.** (1996): Inducible nitric oxide synthase in tangle-bearing neurons of patients with Alzheimer's disease. In: *Journal of Experimental Medicine*, 184 (4), S. 1425-1433.
- Voz, M. L., Agten, N. S., Van de Ven, W. J. et al.** (2000): PLAG1, the main translocation target in pleomorphic adenoma of the salivary glands, is a positive regulator of IGF-II. In: *Cancer Research*, 60 (1), S. 106-113.
- Voz, M. L., Mathys, J., Hensen, K. et al.** (2004): Microarray screening for target genes of the proto-oncogene PLAG1. In: *Oncogene*, 23 (1), S. 179-191.
- Wang, B., Huang, C., Chen, L. et al.** (2019): The Emerging Roles of the Gaseous Signaling Molecules NO, H<sub>2</sub>S, and CO in the Regulation of Stem Cells. In: *ACS Biomaterials Science & Engineering*, 6 (2), S. 798-812.
- Wang, X., Gan, X., Liu, C. et al.** (2020): LINC00460 accelerates progression of ovarian cancer by activating transcriptional factor ZNF703. In: *Oncology Letters*, 19 (6), S. 4189-4194.
- Wang, Y., Shang, W., Lei, X. et al.** (2013): Opposing functions of PLAG1 in pleomorphic adenoma: a microarray analysis of PLAG1 transgenic mice. In: *Biotechnology Letters*, 35 (9), S. 1377-1385.
- Wei, F., Ojo, D., Lin, X. et al.** (2015): BMI1 attenuates etoposide-induced G2/M checkpoints via reducing ATM activation. In: *Oncogene*, 34 (23), S. 3063-3075.
- Wu, C. L., Dicks, A., Steward, N. et al.** (2021): Single cell transcriptomic analysis of human pluripotent stem cell chondrogenesis. In: *Nature Communications*, 12 (1), S. 362.
- Xue-Liang, J., Ming-Dong, W., Ya-Bi, Z. et al.** (2015): Upregulated long noncoding RNA SPRY4-IT1 contributes to increased cell viability by activating zinc finger 703 expression in esophageal squamous cell carcinoma. In: *Indian Journal of Cancer*, 52 Suppl 3, S. E164-167.

**Yabe, S., Alexenko, A. P., Amita, M. et al.** (2016): Comparison of syncytiotrophoblast generated from human embryonic stem cells and from term placentas. In: *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 113 (19), S. E2598-2607.

**Yamanaka, S.** (2020): Pluripotent Stem Cell-Based Cell Therapy-Promise and Challenges. In: *Cell Stem Cell*, 27 (4), S. 523-531.

**Yamanaka, S., Takahashi, K.** (2006): Induction of pluripotent stem cells from mouse embryonic and adult fibroblast cultures by defined factors. In: *Cell*, 126 (4), S. 663-676.

**Yang, G., Ma, F., Zhong, M. et al.** (2014): ZNF703 acts as an oncogene that promotes progression in gastric cancer. In: *Oncology Reports*, 31 (4), S. 1877-1882.

**Yang, X., Liu, G., Zang, L. et al.** (2020): ZNF703 is Overexpressed in Papillary Thyroid Carcinoma Tissues and Mediates K1 Cell Proliferation. In: *Pathology Oncology Research*, 26 (1), S. 355-364.

**Young, M. A., Larson, D. E., Sun, C. W. et al.** (2012): Background mutations in parental cells account for most of the genetic heterogeneity of induced pluripotent stem cells. In: *Cell Stem Cell*, 10 (5), S. 570-582.

**Yu, H.-H., Houart, C., Moens, C. B.** (2004): Cloning and embryonic expression of zebrafish neuropilin genes. In: *Gene expression patterns*, 4 (4), S. 371-378.

**Zatkova, A., Rouillard, J. M., Hartmann, W. et al.** (2004): Amplification and overexpression of the IGF2 regulator PLAG1 in hepatoblastoma. In: *Genes Chromosomes Cancer*, 39 (2), S. 126-137.

**Zhang, F., Qiu, H., Dong, X. et al.** (2021): Transferrin improved the generation of cardiomyocyte from human pluripotent stem cells for myocardial infarction repair. In: *Journal of Molecular Histology*, 52 (1), S. 87-99.

## **11 Danksagung**

An dieser Stelle möchte ich mich bei allen jenen herzlich bedanken, die mich bei der Anfertigung dieser Doktorarbeit unterstützt haben.

Ich möchte (...) für die freundliche Aufnahme in seine Arbeitsgruppe und die Vergabe der interessanten Aufgabenstellung herzlich danken. Ich bedanke mich für die jederzeit verfügbare Unterstützung, für die Geduld und für die gedankenreiche und ergiebige Vorarbeit. Außerdem danke ich (...) für die hilfreiche zusätzliche Betreuung. (...) danke ich für die ursprüngliche Vermittlung der Doktorandenstelle.

Des Weiteren bedanke ich mich herzlich für die geduldige und kompetente Einweisung in die Laborarbeiten bei (...). Sowie bei meinen lieben Doktoranden-Kollegen (...). Vielen Dank für die vielfältige Unterstützung und kollegiale Atmosphäre.

Ich danke meiner Familie für die umfassende liebevolle Unterstützung.

## 12 Lebenslauf

### Persönliche Daten:

Paul Oswald Kohlhas

Geboren am 9.11.1991 in Offenbach am Main

### Ausbildung und Beruf:

04.2022	Assistenzarzt in der Abteilung für Augenheilkunde des Universitätsklinikums des Saarlandes
06.2021 – 04.2022	Promotion am Institut für Pharmakologie der Universitätsmedizin der Johannes Gutenberg-Universität, bei Prof. Hartmut Kleinert
05.2021	Abschluss der ärztlichen Prüfung an der Johannes Gutenberg-Universität Approbation als Arzt
2020 – 2021	Praktisches Jahr in Wiesbaden und Mainz, mit dem Wahlfach Neurologie
2015 – 2020	Studium der Humanmedizin, Johannes Gutenberg-Universität Mainz
2012 – 2014	Studium der Rechtswissenschaften, Freie Universität Berlin Abschluss der juristischen Zwischenprüfungen
2012	Abitur an der Ludwig Geissler-Schule, Hanau