

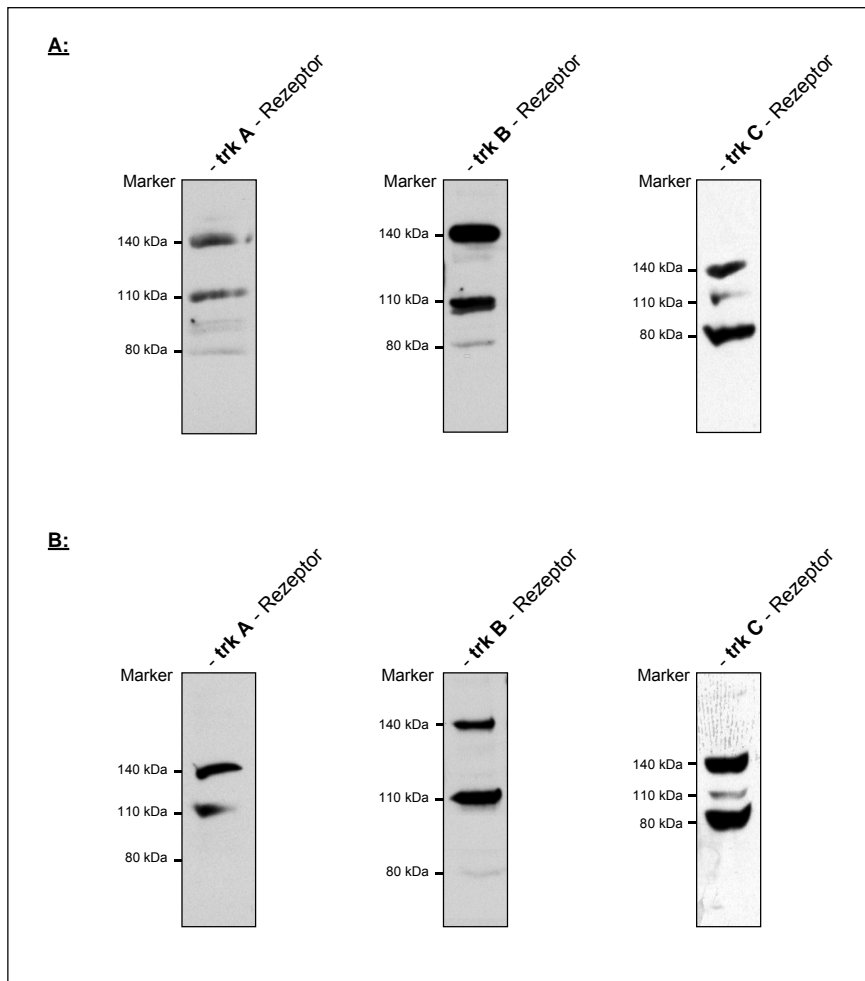
## 8 Ergebnisse

### 8.1 Neurotrophine als Mediatoren der *tPA* Genexpression

#### 8.1.1 Nachweis der Membranrezeptoren für Neurotrophine

Zur Analyse eines möglichen Einflusses von Neurotrophinen auf die Genexpression von *tPA* wurde zunächst untersucht, ob die eingesetzten neuronalen Zelllinien die den Neurotrophinen entsprechenden Trk-Rezeptoren tragen, welche eine transmembranäre Signalkaskade etablieren und so in die Genexpressionskontrolle eingreifen können.

Aus den unterschiedlichen Gewebetypen im menschlichen Gehirn wurden exemplarisch zwei Neuroblastomlinien (KELLY und SY5Y), eine Glioblastomlinie mit hoher *tPA* Aktivität (SNB-19, Gross et al. 1988) und eine Neuroepitheliomlinie mit nachgewiesener *tPA*-Aktivität (SK-N-SH, Gilbert und Wachsman 1982) gewählt und verwendet. Die Zellen wurden aufgeschlossen, die groben Zelltrümmer durch Zentrifugation abgetrennt und die Rezeptoren Trk A, B und C durch SDS-PAGE und Westernblotanalyse nachgewiesen. In den untersuchten Zelllinien wurden die Rezeptoren TrkA, B und C (für NGF, BDNF, NT-3 und NT-4) nur in den Linien SY5Y und SK-N-SH eindeutig nachgewiesen. In den Linien KELLY und SNB-19 konnte keiner der Trk-Rezeptoren zweifelsfrei nachgewiesen werden. Alle Neurotrophinrezeptoren zeigen bedingt durch ihre unterschiedlichen Glykosilierungszustände als Hauptformen eine 140 kDa, eine 110 kDa und eine unglykosilierte 80 kDa Bande (Produktinformation # GR24, Oncogene) im SDS-Page/Western Blot (**Abb. 5.1**).



**Abbildung 5.1:** SDS-Page und Western Blot der Zelllinien.

SY5Y (**A**) und SK-N-SH (**B**): Die vorwiegend auftretenden Glykosilierungsformen (140, 110 kDa und unglykosiliert 80 kDa) der Rezeptoren TrkA, B und C sind gezeigt, beide Linien tragen jeweils die Rezeptoren TrkA, B und C.

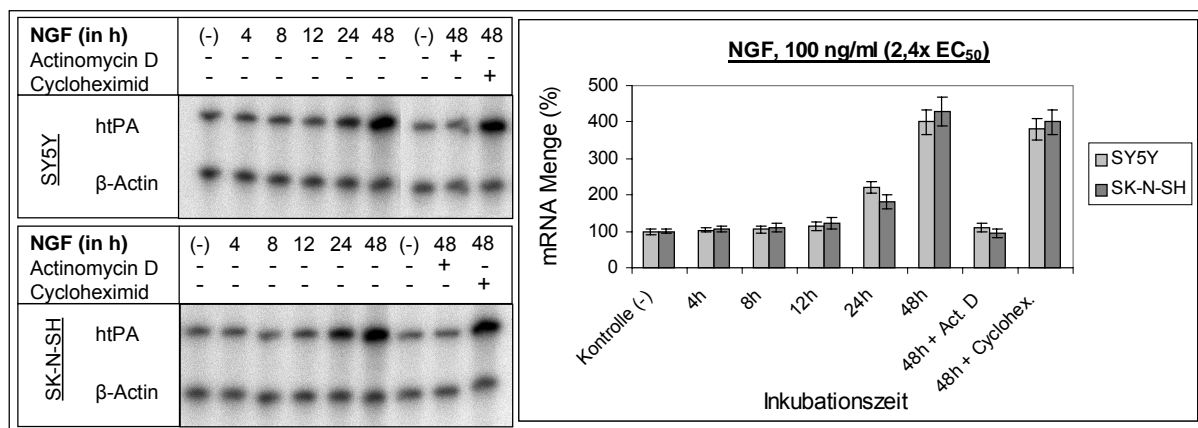
Da es nicht zweifelsfrei geklärt werden konnte, ob die Linien KELLY und SNB-19 Trk-Rezeptoren tragen, wurden die nachfolgenden Untersuchungen hinsichtlich der möglichen Wirkung von Neurotrophinen auf die Transkription von *tPA* auf die Zelllinien SY5Y (Neuroblastom) und SK-N-SH (Neuroepitheliom) beschränkt.

### 8.1.2 Die Wirkung von Neurotrophinen auf die Transkription von *tPA*

#### Ribonuklease Protektions Assays

Zur Klärung einer möglichen Wirkung von Neurotrophinen auf die Genregulation von *tPA* wurde zunächst untersucht, ob die Neurotrophine zu einer verstärkten Transkription und höheren Mengen an mRNA Transkript führen. Dazu wurden jeweils semikonfluente, nicht-

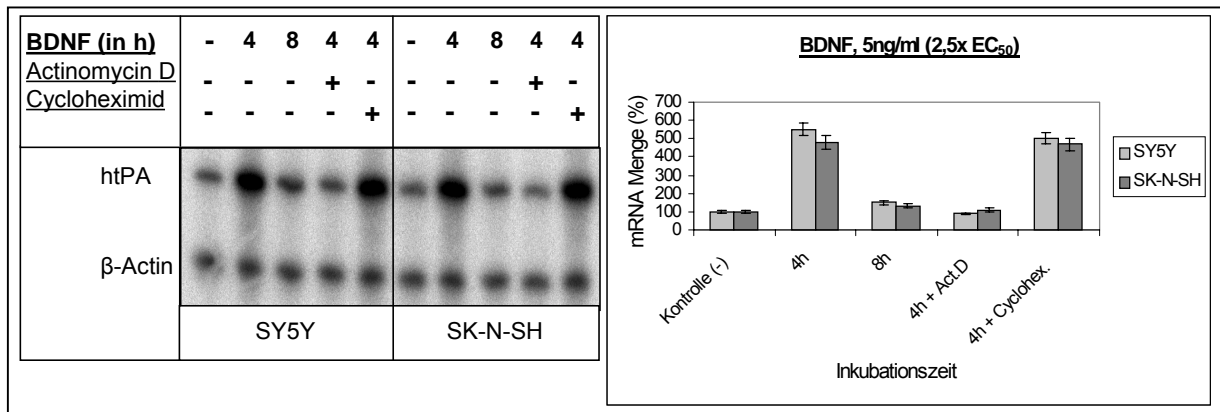
synchronisierte Zellen beginnend mit 100 ng/ml humanem NGF (NGF- $\beta$ , Sigma, # N4398) behandelt und zu unterschiedlichen Zeitpunkten geerntet, gezählt und jeweils in gleicher Zahl einem RNase Protektions Assay (RPA) unterworfen. Die Quantifizierung der mRNA erfolgte auf einem Phosphorimager, wobei die Menge der  $\beta$ -Actin mRNA zur Normalisierung der Messwerte herangezogen wurde. Es zeigte sich, dass NGF in beiden Linien erst spät (24 bis 48 h) zu einer verstärkten *tPA*-Transkription führt, die nach 48 h in etwa 4fach höheren mRNA Mengen ihre Spitze findet. Dabei ist die Transkription nicht von einer Neusynthese von Proteinen abhängig (Cycloheximid-Kontrolle) und die erhöhten mRNA Mengen basieren nicht auf einer erhöhten Stabilität der mRNA Transkripte (Actinomycin D-Kontrolle) wie **Abb. 5.2** zeigt.



**Abbildung 5.2:** Menge des mRNA Transkripts von *tPA* zu verschiedenen Zeitpunkten nach Applikation von 100 ng/ml NGF (2,4fache  $EC_{50}$ ).

Beide Zelllinien zeigen eine vergleichbare Reaktion hinsichtlich der in zeitlicher Abhängigkeit auftretenden mRNA Menge. Nach 24 h hat sich die mRNA Menge etwa verdoppelt, nach 48 h etwa vervierfacht (Phosphorimager-Analyse, Mittelwerte aus drei Experimenten).

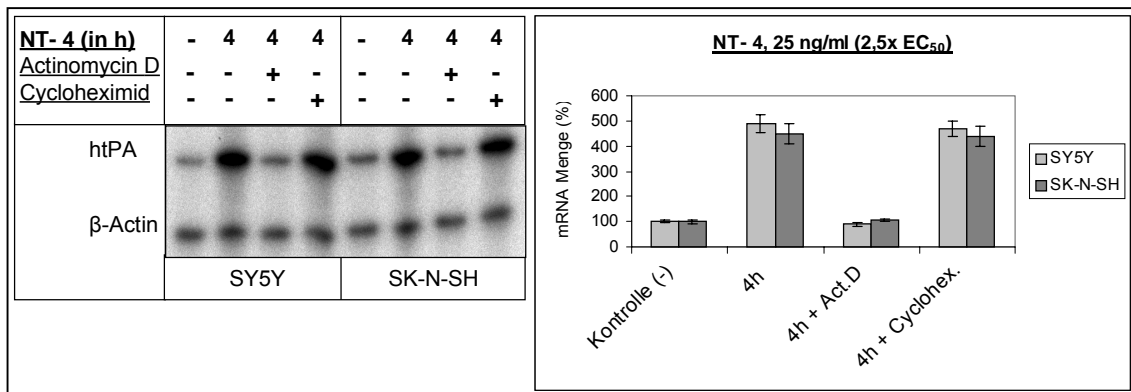
Im Gegensatz zu NGF zeigte sich bei den anderen Neurotrophinen eine zeitlich davon abweichende Reaktion hinsichtlich einer veränderten *tPA* Transkription. Wieder wurden nicht-synchronisierte, semikonfluente Zellen verwendet und BDNF (Sigma, # B3795) zu 5 ng/ml (2,5fache  $EC_{50}$ ) appliziert. Anschließend wurde zu verschiedenen Zeitpunkten geerntet, die Zellen gezählt und zu gleicher Zahl einem RPA unterworfen. Die *tPA*-RNA Menge nach BDNF-Stimulus war nach 4 h etwa 5fach erhöht und normalisierte sich nach 8 h. Auch hier waren erhöhte mRNA Mengen nicht die Folge einer erhöhten Transkriptstabilität und die Transkription benötigte keine Proteinneusynthese (**Abb. 5.3**).



**Abbildung 5.3:** Menge der *tPA* mRNA nach Applikation von 5 ng/ml BDNF (2,5fache EC<sub>50</sub>).

Beide Zelllinien zeigen vergleichbare Reaktionen auf BDNF, die maximale Transkriptmenge ist nach 4 h jeweils etwa 5fach über Normal und nach 8 h wieder auf Ausgangsniveau zurückgegangen (Phosphorimager-Analyse, Mittelwerte aus drei Experimenten).

Das Neurotrophin NT-4 (Sigma, # N1780) zeigte in beiden Zelllinien ein ähnliches Wirkungsverhalten wie BDNF. Nach Applikation von 25 ng/ml NT-4 (2,5fache EC<sub>50</sub>) auf semikonfluente, nicht-synchronisierte Zellen wurde in kurzer Zeit die Transkription von *tPA* induziert, wobei die mRNA Menge nach 4 h ihr Maximum bei der etwa 4,8fachen Transkriptmenge erreichte und in der Folge genau wie BDNF rapide auf den Ausgangswert (nach etwa 8h) abfiel. Auch hier war die Transkription unabhängig von einer Proteinneusynthese und nicht Folge einer erhöhten Transkriptstabilität (**Abb. 5.4**).



**Abbildung 5.4:** Veränderte Transkriptmenge von *tPA* nach Applikation von 25 ng/ml NT-4 (2,5fache EC<sub>50</sub>).

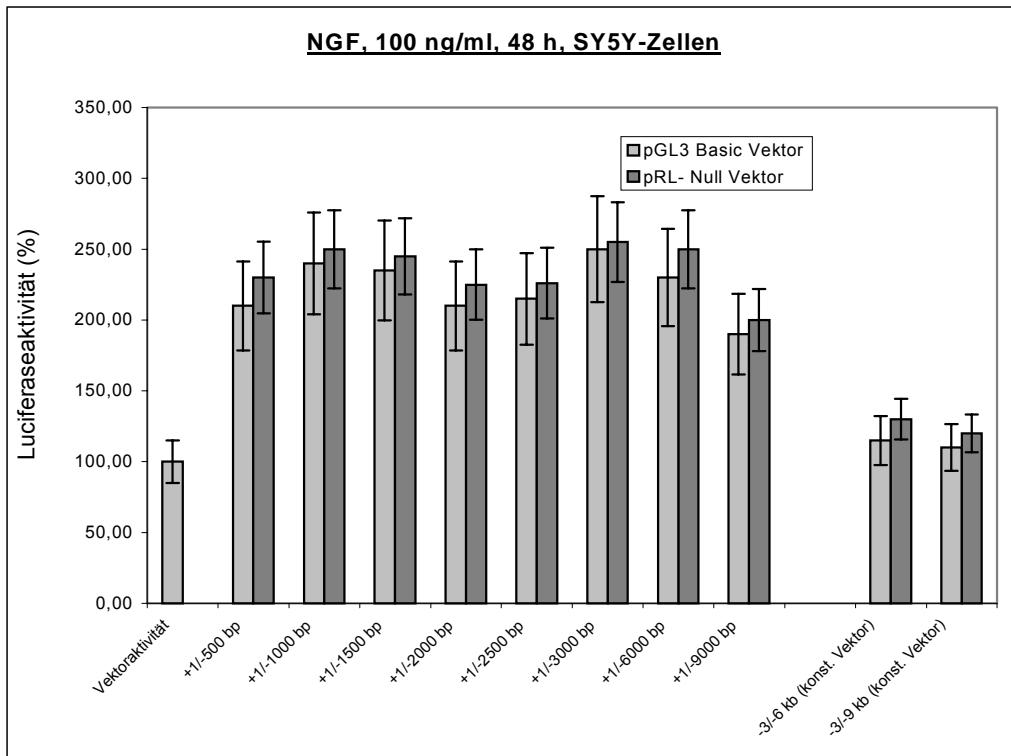
Beide Zelllinien zeigen eine ähnliche Reaktionen auf NT-4. Die Transkription wird von NT-4 induziert und die maximale Transkriptmenge liegt jeweils nach 4 h bei etwa 4,8fach über dem Normalwert (Phosphorimager-Analyse, Daten aus drei Experimenten gemittelt).

Die gezeigten Daten stammen aus Experimenten die jeweils dreimal wiederholt wurden und deren Messwerte gemittelt wurden. Dasselbe Experiment wurde auch mit dem zu der Zeit noch verbliebenen, kommerziell erhältlichen Neurotrophin NT-3 (Sigma, # N1905) durchgeführt (3 ng/ml, 2,5fache EC<sub>50</sub>), welches jedoch vollständig ohne Wirkung auf die *tPA* Transkription war. Zur Validierung dieses Befundes wurde das Experiment mit drei

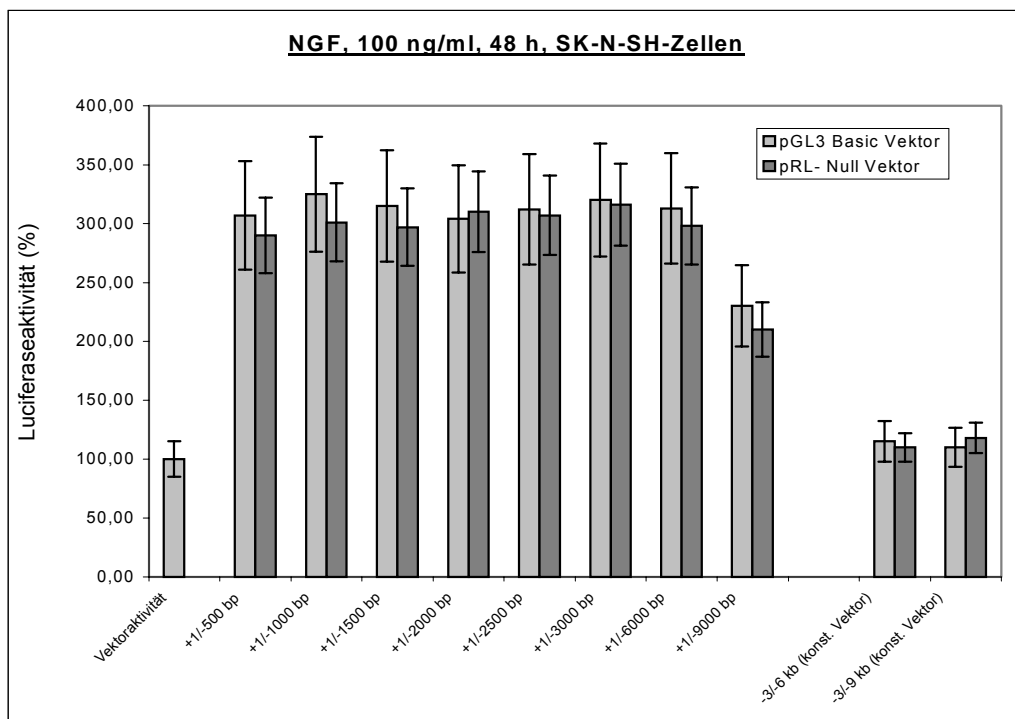
verschiedenen Produktchargen wiederholt, um die Möglichkeit einer inaktiven Produktcharge auszugrenzen. Versuchsweise wurde das Experiment mit NT-3 auch in den Zelllinien KELLY und SNB-19 durchgeführt, aber in ihnen zeigte NT-3 keine Wirkung auf die Transkription von *tPA*.

### Transaktivierungsassays

Im Anschluss an diese Experimente sollte überprüft werden, ob und wo mögliche cis-regulatorische, neurotrophinrelevante DNA Elemente im Promotorbereich lokalisiert sind. Zu diesem Zweck wurden sukzessiv verlängerte Promotorfragmente, beginnend mit den ersten 500 bp oberhalb des Transkriptionsstartpunkts „+1“, in je zwei Luciferase-Expressionsvektoren kloniert (pGL3-*Firefly* Luciferase und pRL-*Renilla* Luciferase Vektoren). Diese wurden dann in die Zelllinien SY5Y und SK-N-SH transfiziert, je 100000 Zellen/well auf 96-well Platten ausgesät (semikonfluent) und eine je 2,5fache EC<sub>50</sub> an Neurotrophin appliziert. Die Zellen wurden dann zu den Zeitpunkten der maximalen mRNA Transkriptmenge (s. RPA) lysiert, mit Reaktionssubstrat versetzt und die Luciferaseaktivität gemessen. Diese Messwerte wurden aus je 8 wells gemittelt, die Standardabweichung bestimmt und ins Verhältnis zu den Messwerten der mit dem jeweiligen Promotorkonstrukt transfizierten, aber unbehandelten Zellen gesetzt („Vektoraktivität“ = 100 %). Jedes Experiment wurde zweimal durchgeführt und die Werte statistisch gemittelt. Im Falle der NGF-Applikation zeigten die Zellen SY5Y eine 2,3 bis 2,5fache Induktion nach 48 h (**Abb. 5.5**) und die Zellen SK-N-SH eine 2,9 bis 3,2fache Induktion der Luciferaseaktivität nach 48 h (**Abb. 5.6**). In Abhängigkeit der in 5'-Richtung wachsenden Länge der Promotorkonstrukte zeigte sich jedoch keine im Rahmen der Messgenauigkeit signifikante Abhängigkeit der *tPA* Induktion von bestimmten Promotorregionen. Nur wenn die Promotorlänge von -6000 bp (5'-Ende) auf -9000 bp (5'-Ende) wuchs, zeigte sich ein dezenter Rückgang der Luciferaseaktivität auf knapp unter den 2fachen Kontrollwert im Falle der SY5Y Zellen (**Abb. 5.5**) und auf den 2,2fachen Kontrollwert im Fall der SK-N-SH Zellen (**Abb. 5.6**). Die Bereiche zwischen -3000 bis -6000 bp und -6000 bis -9000 bp zeigen im Rahmen der Messgenauigkeit nach Neurotrophinapplikation keine signifikante Induktion der Luciferaseaktivität. Für die NGF vermittelte Induktion zeigt sich, dass die ersten 3000 bp der 5'-Region des Promotors für die NGF-Induktion verantwortlich sind, dort jedoch kein im Transaktivierungsassay näher identifizierbarer Sequenzabschnitt die Ursache dafür war.



**Abbildung 5.5:** NGF Induktion von *tPA* durch NGF in SY5Y-Zellen nach 48 h. Verschieden lange Promotorfragmente reagieren auf NGF-Applikation mit einer 2,3 bis 2,5fachen Induktion der Luciferaseaktivität. Die Messwerte sind aus 16 Einzelmessungen (je acht Werte aus zwei Experimenten) statistisch gemittelt und die Standardabweichungen sind als Fehlerindikator angegeben.



**Abbildung 5.6:** NGF Induktion von *tPA* durch NGF in SK-N-SH-Zellen nach 48 h. Die gestaffelt länger werdenden Promotorfragmente reagieren auf NGF-Applikation mit einer 2,9 bis 3,2fachen Induktion der Luciferaseaktivität. Die Messwerte sind aus 16 Einzelmessungen (je acht Werte aus zwei Experimenten) statistisch gemittelt und die Standardabweichungen sind als Fehlerindikator angegeben.

Dieselben Versuche zur Induktionswirkung von BDNF und NT-4 zeigten ihrerseits auch eine über den gesamten Promotorbereich auftretende Induktion der Luciferaseaktivität, die jeweils zwischen dem 1,5 und 2,5fachen Referenzwert (transfizierte, aber unbehandelte Zellen) lagen, jedoch ebenfalls keinen Aufschluss über eine signifikante Präferenz eines Promotorbereichs hinsichtlich der Neurotrophinwirkung geben konnten (Daten nicht gezeigt).

Festzuhalten bleibt, dass die Neurotrophine NGF, BDNF und NT-4 die Transkription von *tPA* zeitabhängig stimulieren, während NT-3 keinen Effekt zu irgendeinem Zeitpunkt zeigt. Diese Resultate korespondieren mit den in der SDS-PAGE/Western Blot-Analyse nachgewiesenen Rezeptoren TrkA (für NGF) und TrkB (für BDNF und NT-4), während der TrkC-Rezeptor zwar in den untersuchten Zelllinien nachgewiesen wurde, sein Ligand NT-3 jedoch ohne Wirkung auf die Expression von *tPA* bleibt, also keine Signalkaskade über den TrkC-Rezeptor etabliert. Im Falle von NGF sind die ersten 3000 bp oberhalb des Transkriptionsstarts für die Wirkung des Neurotrophins essentiell wichtig, für BDNF und NT-4 konnte im Transaktivierungsassay keine für ihre Induktionswirkung verantwortliche Promotorregion eingegrenzt werden. Für eine nähere Eingrenzung von regulatorischen Regionen auf dem Promotor, die für die von Neurotrophinen vermittelte Induktion verantwortlich zeichnet, ist die Technologie der Transaktivierungsassays aber von ihrer Grundkonzeption her wenig geeignet, da sie relativ insensitiv, weil wenig akkurat, und in der Anwendung nicht sehr flexibel ist (näheres s. Diskussion).

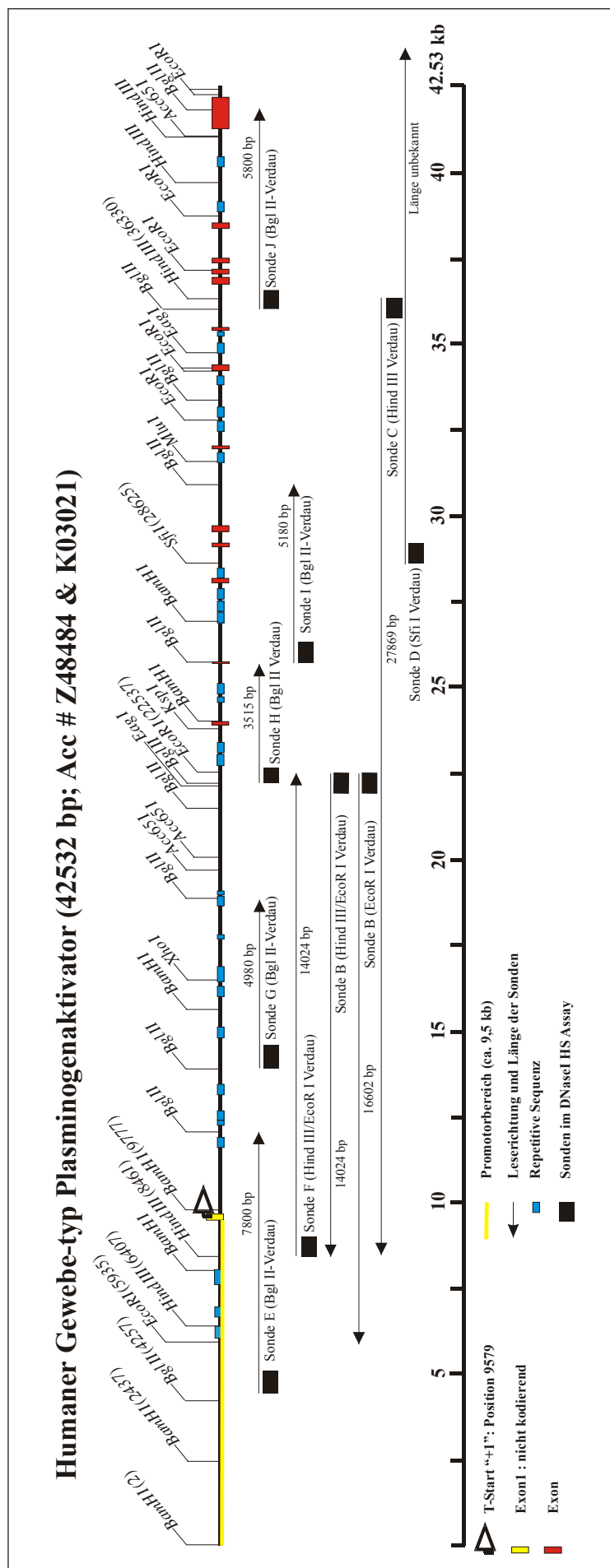
## **8.2 Analyse des *tPA* Gens auf genomischer Ebene**

Zur systematischen Analyse der neuronalen Genregulation von *tPA* war es wichtig diese Untersuchung auf die Gesamtlänge des Gens in seiner genomischen Organisation auszudehnen, da der Promotor zwar grundsätzlich die Expression steuert, dabei aber mit Enhancer- oder Inhibitorelementen in Wechselwirkung tritt, die seine Aktivität maßgeblich beeinflussen. Diese regulatorischen DNA-Elemente befinden sich oft nicht in unmittelbarer Nähe des basalen Promotorbereichs, sondern liegen oft mehrere Kilobasen ober- oder unterhalb desselben und gelangen wegen der dreidimensionalen Organisation der DNA im Chromatin leicht in die räumliche Nähe ihrer jeweiligen Wechselwirkungspartner.

### 8.2.1 DNaseI Hypersensitivitäts-Assays auf der genomischen *tPA* Sequenz

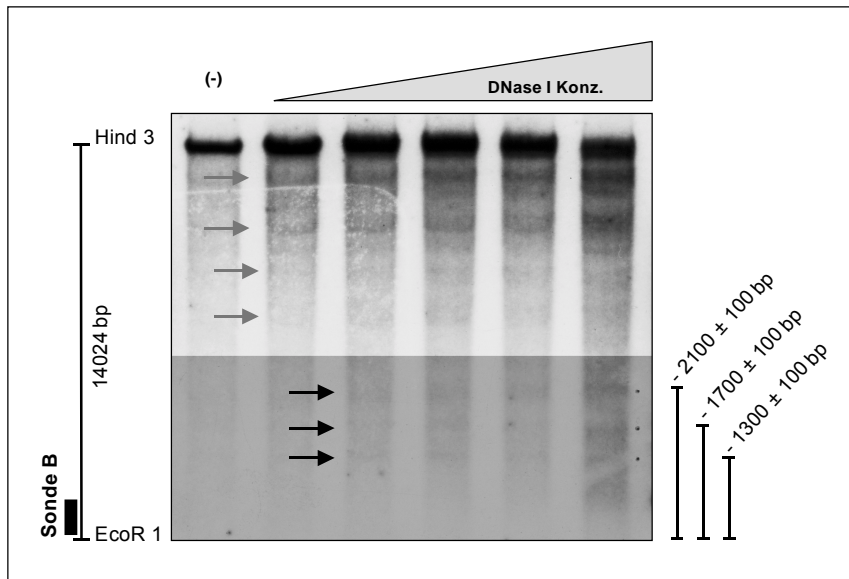
Wie bereits eingangs erläutert, benötigt ein regulatorisches Protein zunächst sterischen Zugang zu seiner Zielsequenz (responsives DNA-Element), welches normalerweise durch die dichte Packung der DNA im Chromatin unzugänglich ist. Öffnet sich der Zugang zu einer solchen Region, so ist die DNA dort, im Gegensatz zur nukleosomal verpackten DNA, besonders sensitiv gegenüber einem „milden“ Abbau durch Nukleasen wie DNaseI. Man sagt dann, dass diese Region „hypersensitiv“ ist. Um diese regulatorischen DNA-Elemente zu finden bedient man sich des DNaseI Hypersensitivitäts-Assays (DHA). Dieser wird zunächst an unbehandelten, nicht synchronisierten Zellen durchgeführt und kann bei Bedarf auch an mit Mediatoren behandelten Zellen angewendet werden. In dieser Untersuchung wurden unbehandelte Zellen gewählt, weil zu Beginn erst allgemein aktive, regulatorische DNA-Elemente gesucht werden sollten (s. Diskussion) Dazu wurden zunächst die Sonden A-J generiert, deren Positionen sich unmittelbar neben einer geeigneten Restriktionsschnittstelle auf der genomischen DNA-Sequenz befinden und die Detektion und Positionierung von DNaseI hypersensitiven Stellen möglich machen. Im Vorfeld der Experimente zeigte sich bereits, dass die Sonde A leider eine nicht spezifische Sequenz besaß und zur Analyse der Region oberhalb Position 6407 (entspricht -3172 bp, vgl. Anhang) ungeeignet war. Überhaupt stellte sich diese Region als nicht analysierbar heraus, da sich keine geeignete Kombination aus Restriktionsschnittstellen und sich anschließenden, eindeutig genspezifischen SONDENSEQUENZEN finden ließ (näheres s. Diskussion). Die genomische Organisation von *tPA* sowie die verwendeten Kombinationen aus Sonden und Restriktionsschnittstellen sind in **Abb. 6.1** wiedergegeben. Die Ergebnisse der genomischen Sequenzanalyse hinsichtlich hypersensitiver, regulatorischer Regionen sind in den **Abb. 6.2** bis **6.9** dargestellt und in **Tab. 4.1** zusammengefasst.





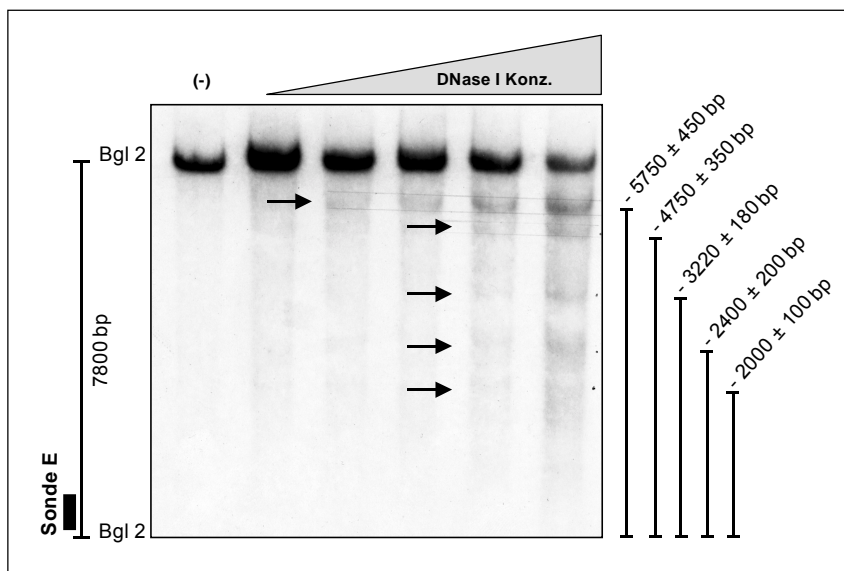
**Abbildung 6.1:** Genomische Organisation von *tPA* und die im DHA verwendeten Sonden B-J.

Die genomische Sequenz stammt von der *NCBI GenBank* (Promotor: #Z48484, Gen: #K03021). Positionsangaben vgl. Anhang, T-Start „+1“ liegt bei 9579.



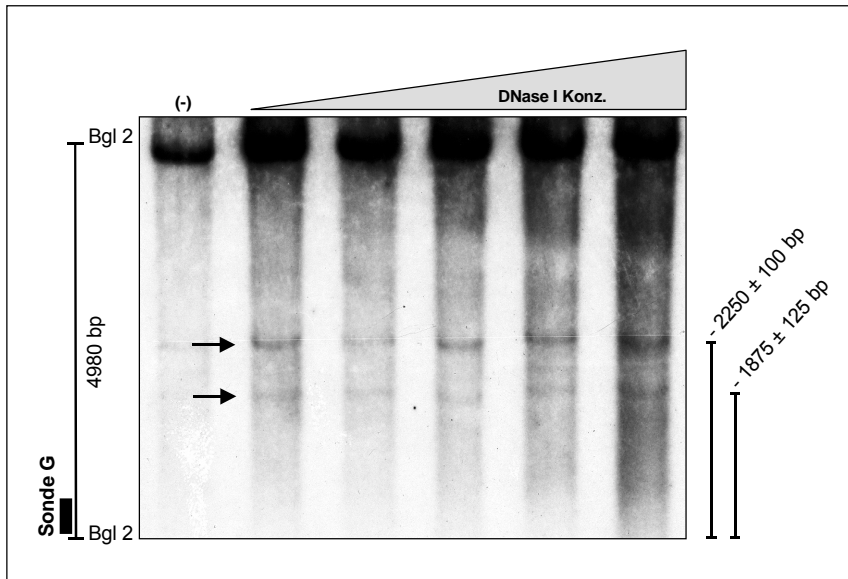
**Abbildung 6.2:** DHA in KELLY Zellen mit Sonde B.

Genomische DNA wurde *in vivo* mit DNase I verdaut und mit EcoR I und Hind III geschnitten und in einem Southern Blot detektiert. Schwarze Pfeile markieren die durch Hypersensitivität entstandenen Banden bzw. die hypersensitiven Positionen. Graue Pfeile zeigen hypersensitive Banden, deren korrespondierende Positionen mit der verwendeten Sonde wegen der hohen Messgenauigkeit in diesem Längenbereich nicht genau bestimmt werden konnte und mit anderen, nähergelegenen Sonden erfasst wurden.



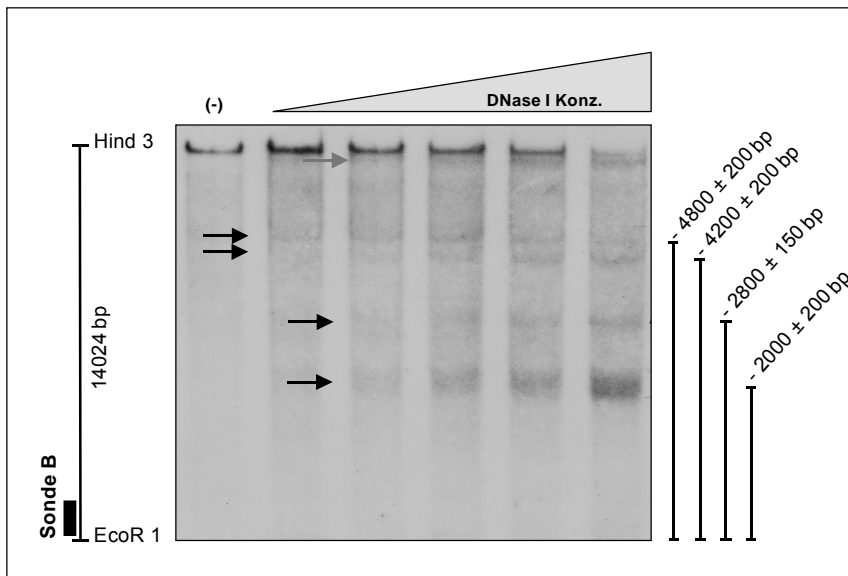
**Abbildung 6.3:** DHA in KELLY Zellen mit Sonde E.

Genomische DNA wurde *in vivo* mit DNase I verdaut und mit Bgl II geschnitten und in einem Southern Blot detektiert. Schwarze Pfeile markieren die durch Hypersensitivität entstandenen Banden bzw. die hypersensitiven Positionen.



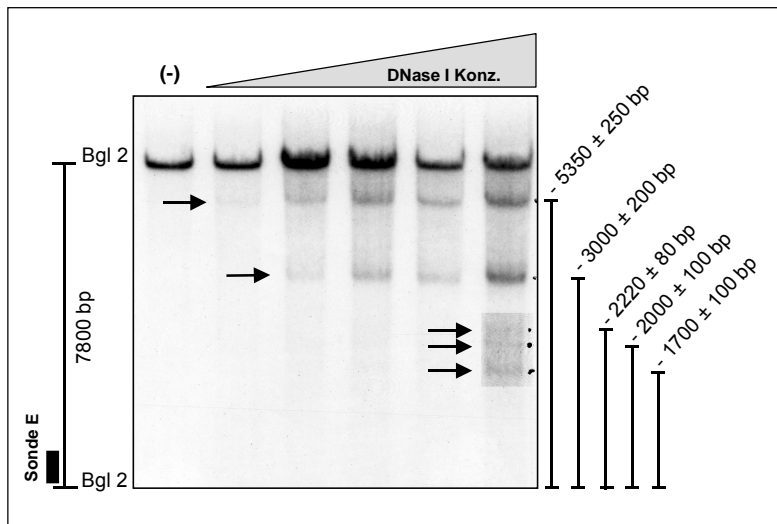
**Abbildung 6.4:** DHA in KELLY Zellen mit Sonde G.

Genomische DNA wurde *in vivo* mit DNaseI verdaut und mit Bgl II geschnitten und in einem Southern Blot detektiert. Schwarze Pfeile markieren die durch Hypersensitivität entstandenen Banden bzw. die hypersensitiven Positionen.



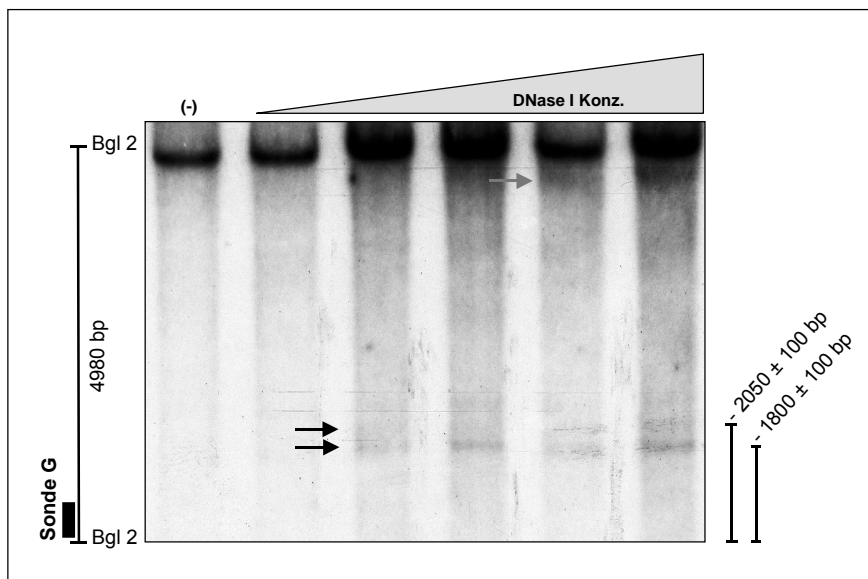
**Abbildung 6.5:** DHA in SNB-19 Zellen mit Sonde B.

Genomische DNA wurde *in vivo* mit DNaseI verdaut und mit EcoR I und Hind III geschnitten und in einem Southern Blot detektiert. Schwarze Pfeile markieren die durch Hypersensitivität entstandenen Banden bzw. die hypersensitiven Positionen. Der graue Pfeil zeigt eine hypersensitive Bande, deren korrespondierende Position mit der verwendeten Sonde wegen der hohen Messungengenauigkeit in diesem Längenbereich nicht bestimmt werden konnte und mit einer anderen, nähergelegenen Sonde bestimmt wurde.



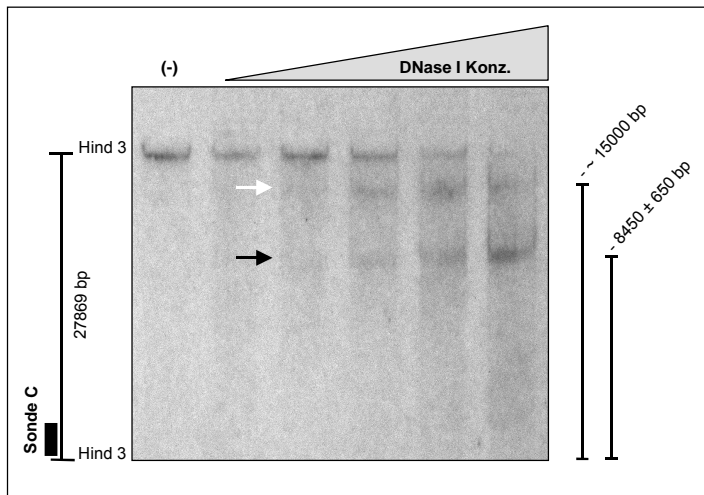
**Abbildung 6.6:** DHA in SNB-19 Zellen mit **Sonde E**.

Genomische DNA wurde *in vivo* mit DNaseI verdaut und mit Bgl II geschnitten und in einem Southern Blot detektiert. Schwarze Pfeile markieren die durch Hypersensitivität entstandenen Banden bzw. die Positionen hypersensitiver Regionen.



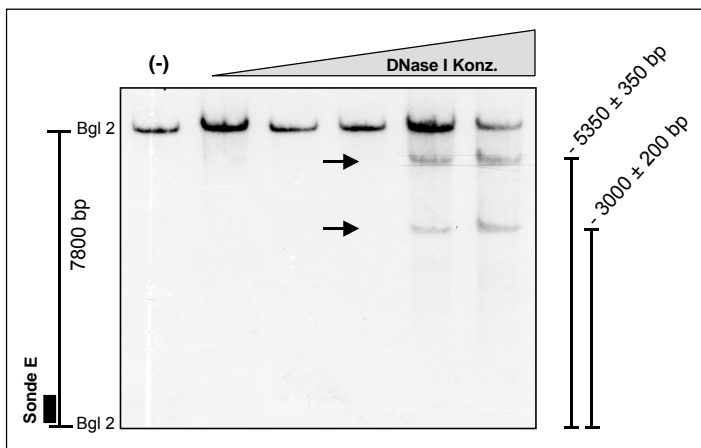
**Abbildung 6.7:** DHA in SNB-19 Zellen mit **Sonde G**.

Genomische DNA wurde *in vivo* mit DNaseI verdaut und mit Bgl II geschnitten und in einem Southern Blot detektiert. Schwarze Pfeile markieren die durch Hypersensitivität entstandenen Banden bzw. die hypersensitiven Positionen. Der graue Pfeil zeigt eine hypersensitive Bande, deren korrespondierende Position mit der verwendeten Sonde wegen der hohen Messungenauigkeit in diesem Längenbereich nicht mehr genau bestimmt werden konnte und mit einer anderen, nähergelegenen Sonde erfasst wurde.



**Abbildung 6.8:** DHA in SK-N-SH Zellen mit Sonde C.

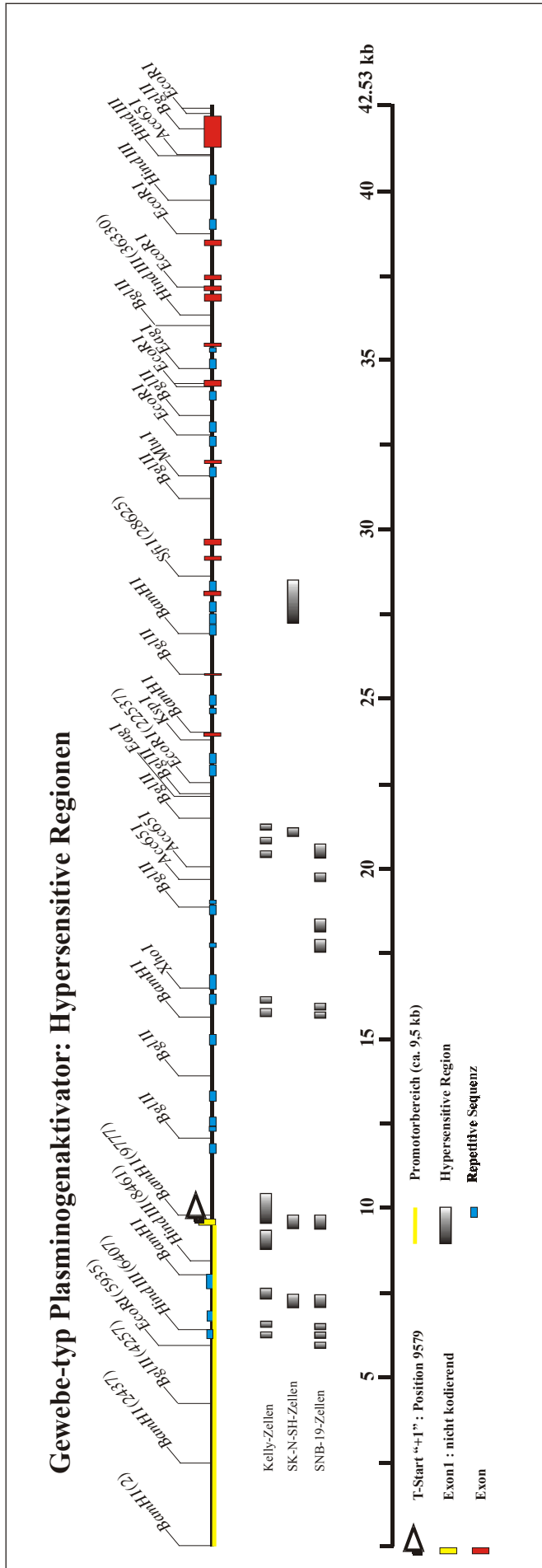
Genomische DNA wurde *in vivo* mit DNaseI verdaut und mit Hind III geschnitten und in einem Southern Blot detektiert. Der schwarze Pfeile markiert die durch Hypersensitivität entstandenen Bande bzw. die hypersensitive Positionen auf der genomischen Sequenz. Der weiße Pfeil zeigt eine hypersensitive Bande, deren korrespondierende Position mit der verwendeten Sonde wegen der hohen Messgenauigkeit in diesem Längenbereich nicht genau bestimmt werden konnte und mit anderen, nähergelegenen Sonde erfasst wurde.



**Abbildung 6.9:** DHA in SK-N-SH Zellen mit Sonde E.

Genomische DNA wurde *in vivo* mit DNaseI verdaut und mit Bgl II geschnitten und in einem Southern Blot detektiert. Schwarze Pfeile markieren die durch Hypersensitivität entstandenen Banden bzw. die hypersensitiven Positionen.

Die gefundenen DNaseI hypersensitiven Regionen erstrecken sich vom Promotor von Position 6257 (entspricht  $-3322$  bp oberhalb des Transkriptionsstarts) aus über das erste Intron bis in das dritte Intron bei Position 27880 (entspricht  $+18301$  bp) auf einer Gesamtlänge von mehr als 21 kb. Diese Ergebnisse unterstreichen eindrucksvoll die Bedeutung derjenigen Sequenzbereiche für die Transkriptionskontrolle, die nicht Teil des klassischen Promotorbereichs sind. Die genauen Positionen und Ausdehnungen der hypersensitiven Regionen sind in **Abb. 6.10** dargestellt und in **Tab. 4.1** zusammengefasst.



**Abbildung 6.10:** DNaseI hypersensitive Regionen im *tPA*-Gen.  
Die genauen Positionen der hypersensitiven Bereiche sind in Tab. 4.1 angegeben (nächste Seite).

<b>KELLY Zellen</b> (Neuroblastom)	<b>SNB 19 Zellen</b> (Glioblastom)	<b>SK-N-SH Zellen</b> (Neuroepitheliom)	<b>Verwendete Sonden</b>
6257 ± 100 bp	5957 ± 100 bp	7257 ± 200 bp	Sonde E
6657 ± 200 bp	6257 ± 100 bp	9607 ± 200 bp	
7477 ± 180 bp	6477 ± 80 bp		
9007 ± 350 bp	7257 ± 200 bp		
10007 ± 450 bp	9607 ± 250 bp		
15762 ± 125 bp	15687 ± 100 bp		Sonde G
16137 ± 100 bp	15937 ± 100 bp		
20437 ± 100 bp	17737 ± 200 bp		Sonde B
20837 ± 100 bp	18337 ± 200 bp		
21237 ± 100 bp	19737 ± 150 bp		
	20537 ± 200 bp		
		~ 21000 (nicht verif.)	Sonde C
		27880 ± 650 bp	

**Tabelle 4.1:** Auf dem *tPA*-Gen identifizierte, native DNaseI hypersensitive Regionen. Die Position in der genomischen Sequenz sind in bp angegeben (Transkriptionsstart bei Position 9579, s. Anhang) und die zu ihrer Detektion verwendeten Sonden (s. Material und Methoden) aufgelistet. Die durch Sonde C gefundene Region um Position 21000 wurde nicht näher eingegrenzt (s. Diskussion).

## 8.2.2 Analyse der hypersensitiven Regionen mit Hilfe von *in vivo* Footprinting

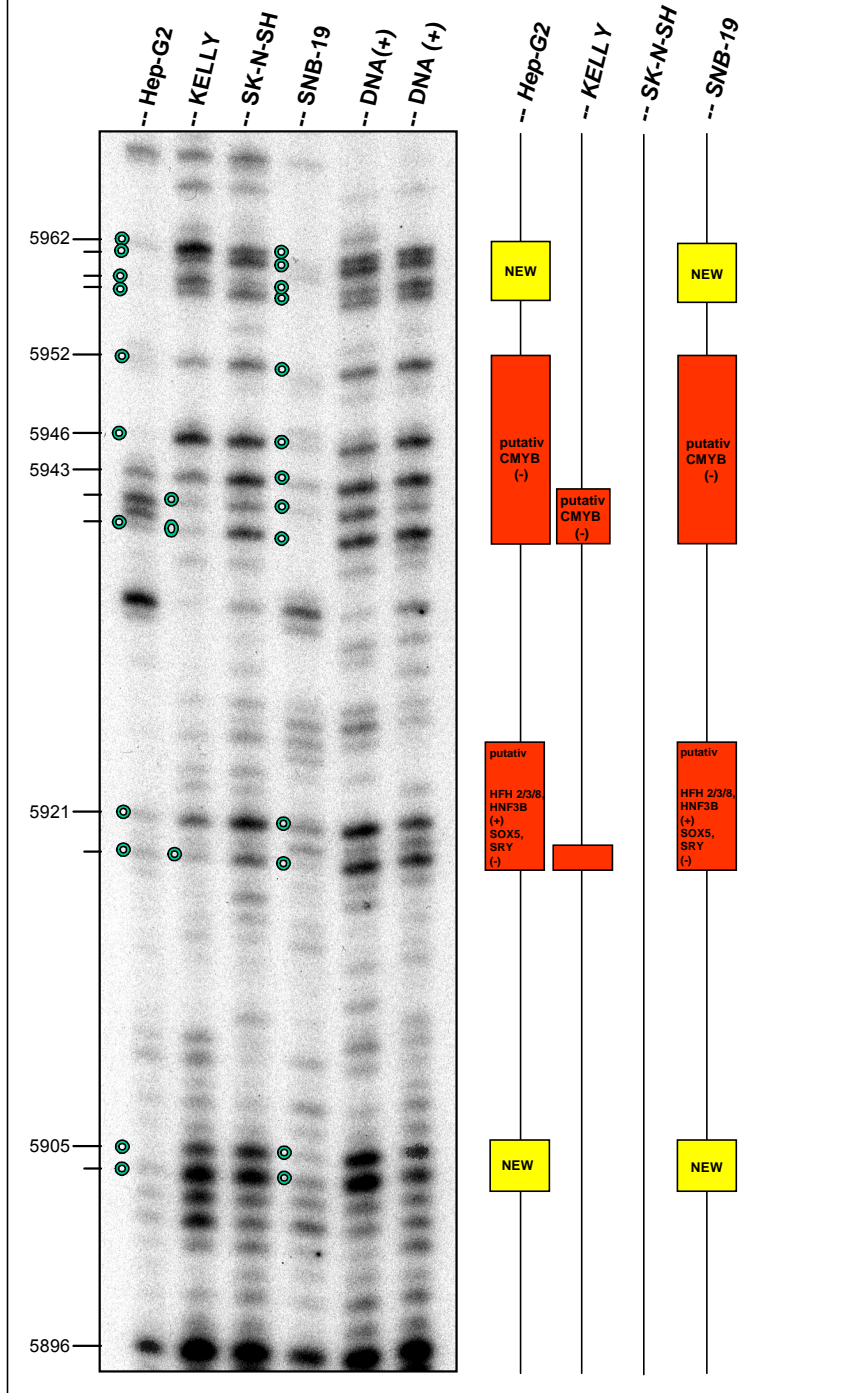
Zur Analyse der durch die DNaseI Hypersensitivitäten ermittelten Sequenzregionen hinsichtlich der Bindung von Transkriptionsfaktoren wurden *in vivo* Footprinting Experimente durchgeführt, die Aufschluss über die Besetzung der regulatorischen Sequenzabschnitte in den lebenden Zelle geben sollten. Neben den schon im DHA verwendeten Zelllinien wurde als Referenz die nichtneuronale und transkriptionell hochaktive Zelllinie Hep-G2 zusätzlich mituntersucht. Hep-G2 ist eine humane hepatozelluläre Karzinomlinie, die neben Plasminogen noch eine ganze Reihe weiterer Proteine exprimiert (Aden et al. 1979, Knowles et al. 1980) und der Vergleich mit ihr sollte erste Hinweise auf möglicherweise für die neuronale Expressionskontrolle spezifisch verantwortliche DNA-Elemente geben. Die *in vivo* Footprinting Experimente wurden mit den Oligonukleotidsätzen A-I durchgeführt und die Ergebnisse sind nachfolgend in den **Abb. 7.1** bis **7.9** wiedergegeben. Protektierte Basen bzw. Sequenzbereiche wurden mit dem *MatInspector V2.2* Programm basierend auf der *TransFac 4.0* Datenbank (Heinemeyer et al. 1998) analysiert, wobei die „core-similarity“ und die „matrix-similarity“ für Transkriptionsfaktoren zu >90 % gewählt wurden. Durch diese stark an den Consensus-Sequenzen orientierten Selektionskriterien sind die aus dem Sequenzinput resultierenden putativen Transkriptionsfaktoren mit hoher Wahrscheinlichkeit diejenigen DNA-bindenden Proteine, die für die Schutzwirkung im Methylierungsschritt des Experiments verantwortlich sind bzw.

sind zu mehr als 90 % diejenigen, die an die DNA-Elemente an diesen Positionen binden. Die Lage der responsiven DNA-Elemente ist in den Grafiken mit „+“ für den kodierenden Strang und „-“ für den nichtkodierenden Strang angegeben (s. Diskussion). Abschließend sind die gefundenen responsiven Elemente der putativen Transkriptionsfaktoren in **Tab. 4.2** und **4.3** jeweils nach Position auf der Gensequenz als auch nach dem jeweiligen Protein selbst geordnet aufgeführt.



## Footprint A (htPA-Promotor)

(Position : 5896-5961 bp, bzw. -3,68/-3,62 kb bezogen auf T-Start)

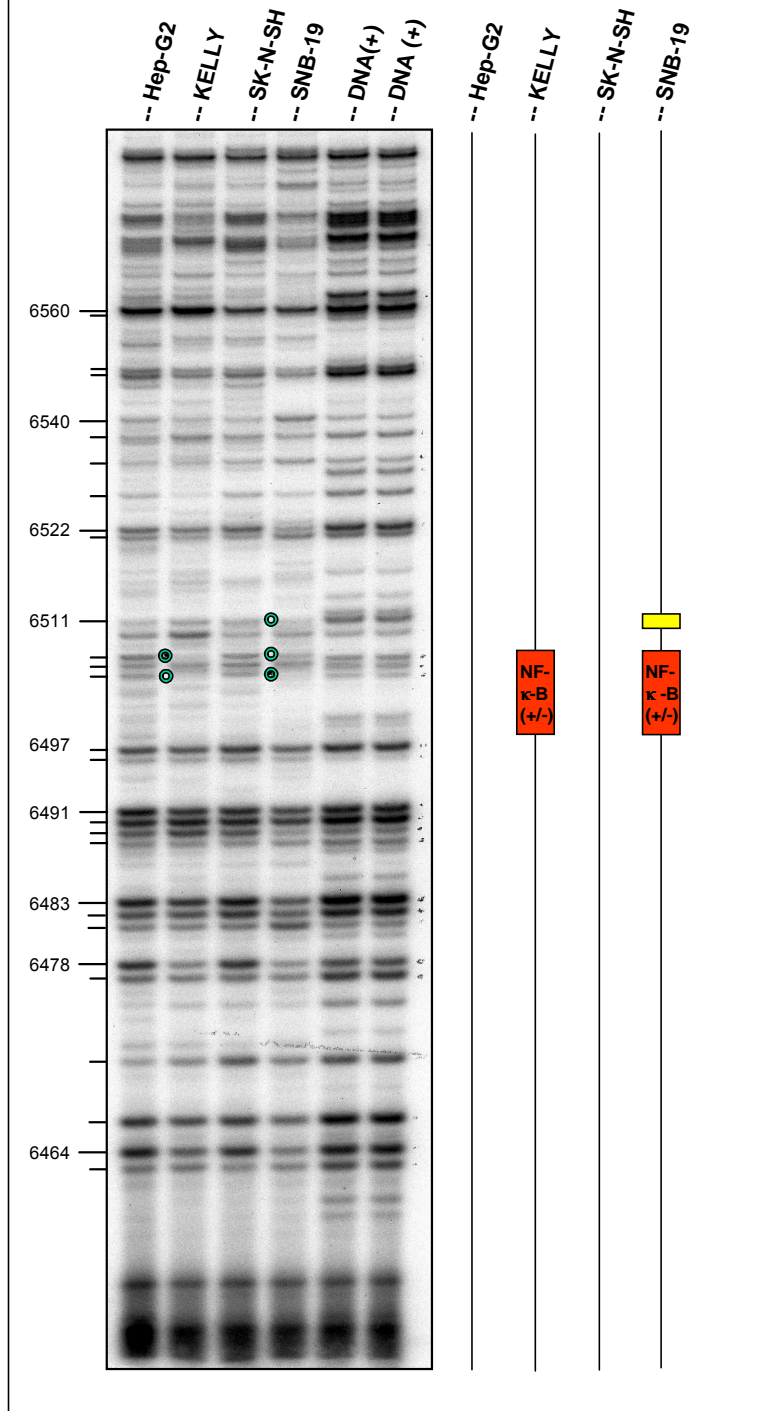


**Abbildung 7.1:** *In vivo* Footprint mit dem Oligonukleotidsatz A.

Gezeigt sind die jeweiligen methylierten Guanosinbasen an ihren korrespondierenden Positionen auf der genomischen Sequenz (Bandenpositionen durch Striche markiert). Geschützte Basen sind grün markiert. Der Transkriptionsstart liegt an Position 9579 (vgl. Anhang). Protektierte Basen oder Sequenzbereiche sind rot markiert, soweit sie in der Datenbank identifiziert werden konnten, und gelb gehalten („NEW“), sofern sich in der Datenbank keine Information über sie fand. Als Kontrolle dienten 2 unterschiedlich lang methylierte, „nackte“ Plazenta-DNA Proben („DNA(+“).

## Footprint B (htPA-Promotor)

(Position : 6498-6507bp, bzw. -3,08 kb bezogen auf T-Start)

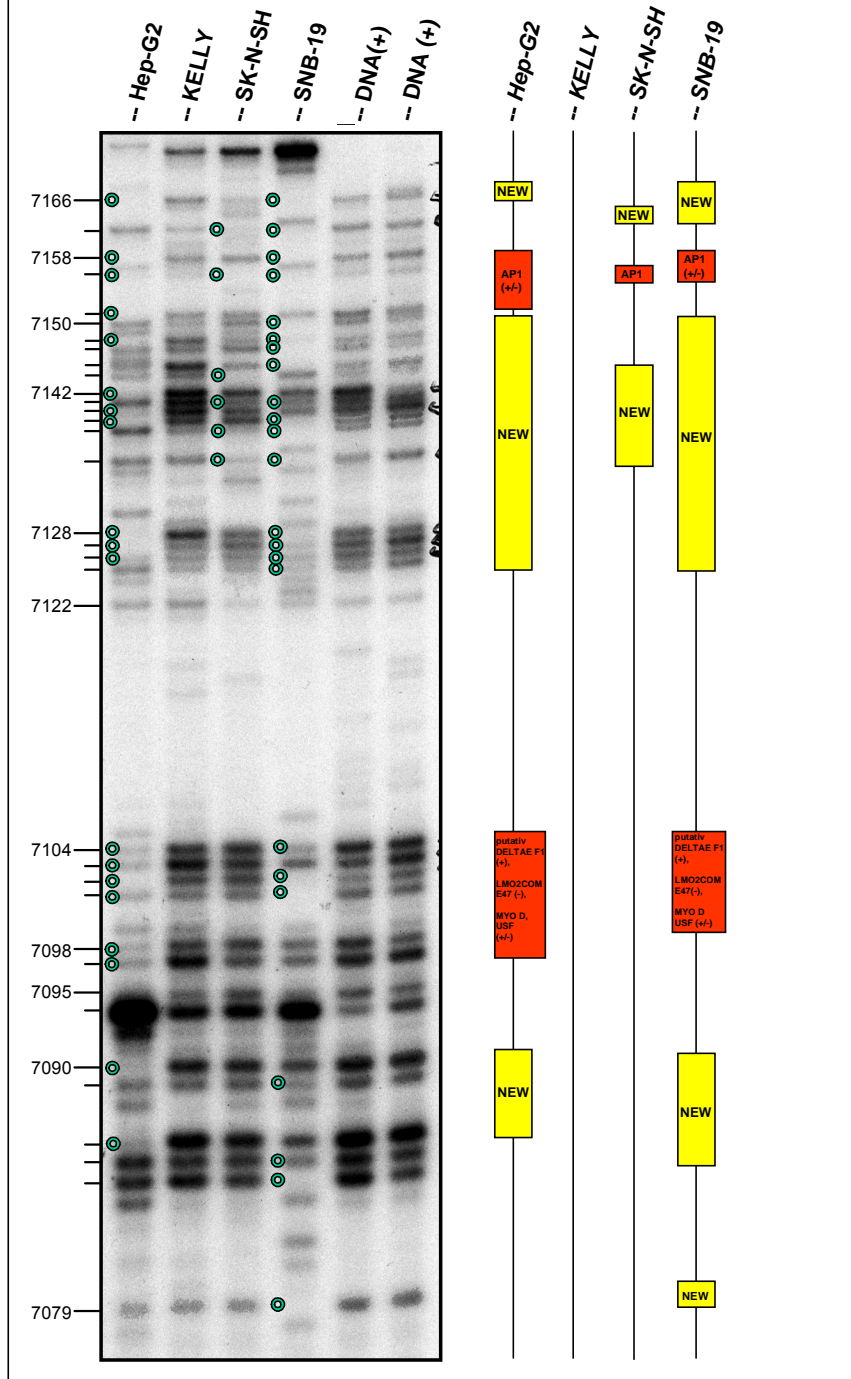


**Abbildung 7.2:** *In vivo* Footprint mit dem Oligonukleotidsatz B.

Gezeigt sind die jeweiligen methylierten Guanosinbasen an ihren korrespondierenden Positionen auf der genomischen Sequenz (Bandenpositionen durch Striche markiert). Geschützte Basen sind grün markiert. Der Transkriptionsstart liegt an Position 9579 (vgl. Anhang). Protektierte Basen oder Sequenzbereiche sind rot markiert, soweit sie in der Datenbank identifiziert werden konnten, und gelb gehalten („NEW“), sofern sich in der Datenbank keine Information über sie fand. Als Kontrolle dienten 2 unterschiedlich lang methylierte, „nackte“ Plazenta-DNA Proben („DNA(+“).

## Footprint C (htPA-Promotor)

(Position : 7079 -7166 bp, bzw. -2,50/-2,41 kb bezogen auf T-Start)

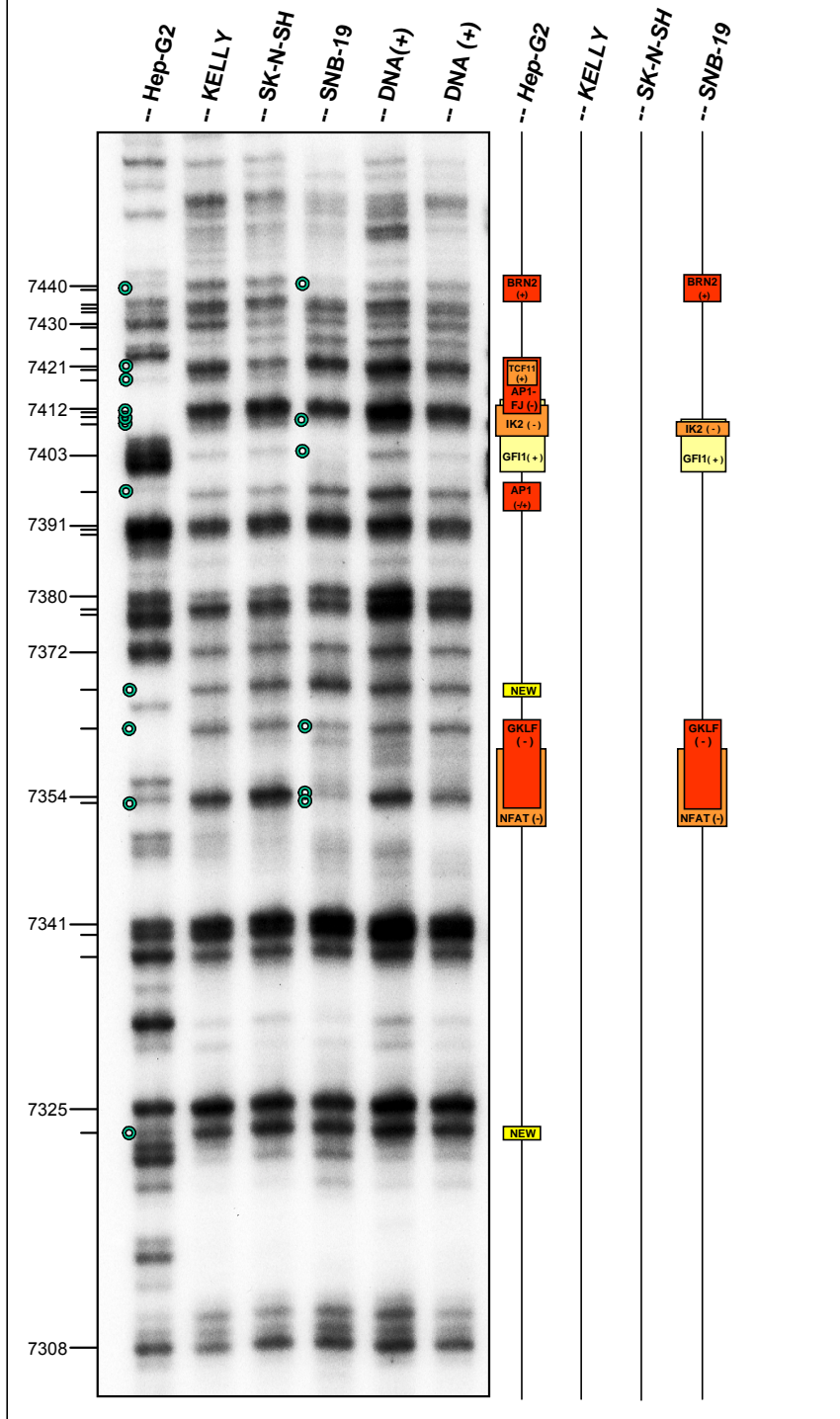


**Abbildung 7.3:** *In vivo* Footprint mit dem Oligonukleotidsatz C.

Gezeigt sind die jeweiligen methylierten Guanosenbasen an ihren korrespondierenden Positionen auf der genomischen Sequenz (Bandenpositionen durch Striche markiert). Geschützte Basen sind grün markiert. Der Transkriptionsstart liegt an Position 9579 (vgl. Anhang). Protektierte Basen oder Sequenzbereiche sind rot markiert, soweit sie in der Datenbank identifiziert werden konnten, und gelb gehalten („NEW“), sofern sich in der Datenbank keine Information über sie fand. Als Kontrolle dienten 2 unterschiedlich lang methylierte, „nackte“ Plazenta-DNA Proben („DNA(+“).

## Footprint D (htPA-Promotor)

(Position : 7308 -7440 bp, bzw. -2,27/-2,14 kb bezogen auf T-Start)

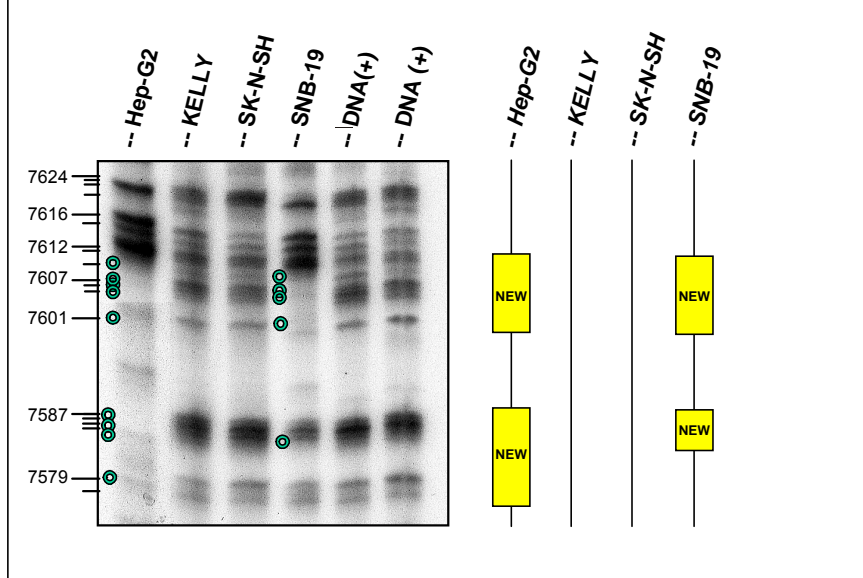


**Abbildung 7.4:** *In vivo* Footprint mit dem Oligonukleotidsatz D.

Gezeigt sind die jeweiligen methylierten Guanosenbasen an ihren korrespondierenden Positionen auf der genomischen Sequenz (Bandenpositionen durch Striche markiert). Geschützte Basen sind grün markiert. Der Transkriptionsstart liegt an Position 9579 (vgl. Anhang). Protektierte Basen oder Sequenzbereiche sind in Rottönen markiert, soweit sie in der Datenbank identifiziert werden konnten, und gelb gehalten („NEW“), sofern sich in der Datenbank keine Information über sie fand. Als Kontrolle dienten 2 unterschiedlich lang methylierte, „nackte“ Plazenta-DNA Proben („DNA(+“)“).

## Footprint E (htPA-Promotor)

(Position : 7577-7624 bp, bzw. -2,00/-1,95 kb bezogen auf T-Start)

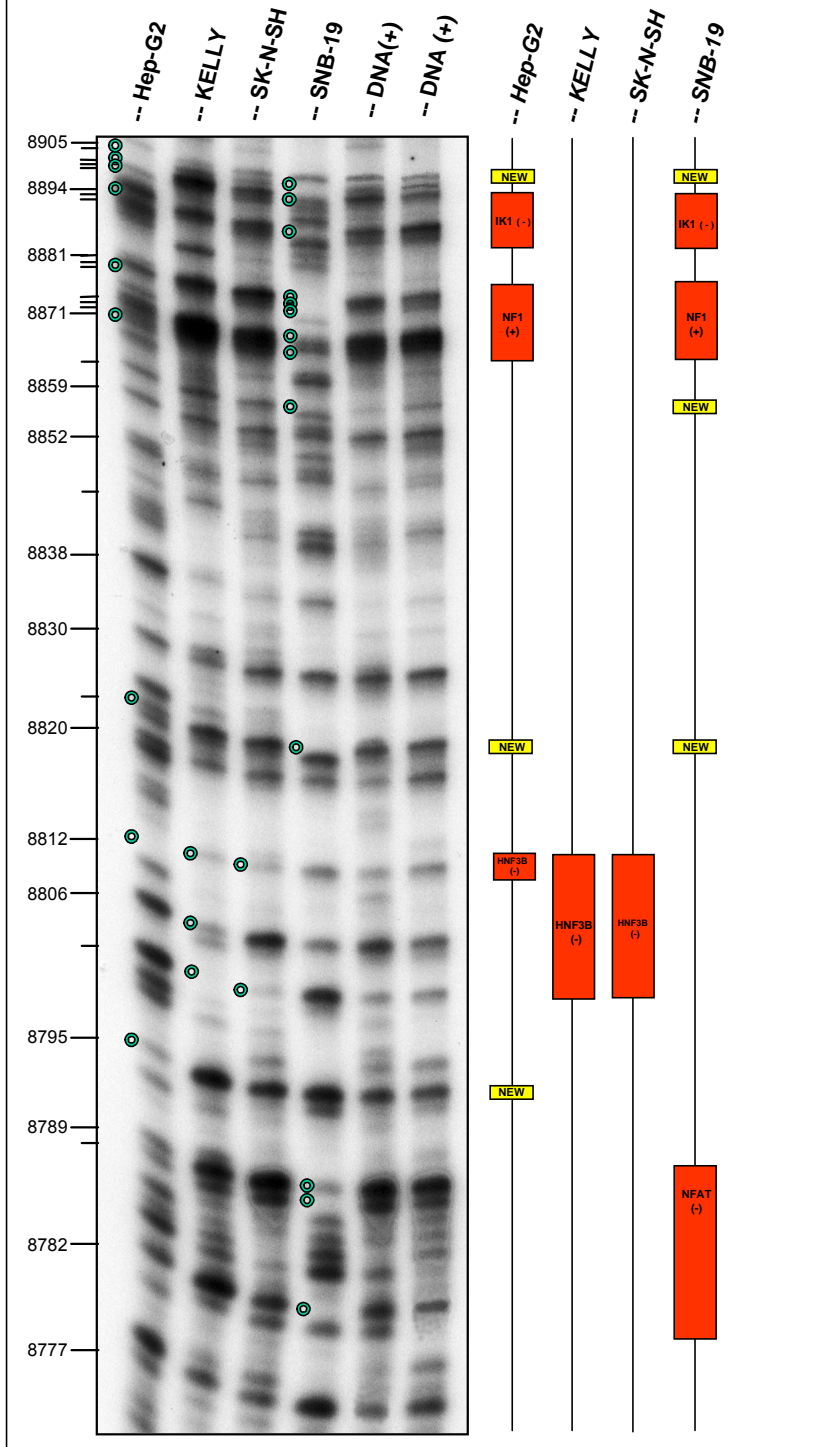


**Abbildung 7.5:** *In vivo* Footprint mit dem Oligonukleotidsatz E.

Gezeigt sind die jeweiligen methylierten Guanosenbasen an ihren korrespondierenden Positionen auf der genomischen Sequenz (Bandenpositionen durch Striche markiert). Geschützte Basen sind grün markiert. Der Transkriptionsstart liegt an Position 9579 (vgl. Anhang). Protektierte Basen oder Sequenzbereiche sind gelb gehalten („NEW“), für sie fand sich in der Datenbank keine Information hinsichtlich eines korrespondierenden Transkriptionsfaktors. Als Kontrolle dienten 2 unterschiedlich lang methylierte, „nackte“ Plazenta-DNA Proben („DNA(+“).

## Footprint F (htPA-Promotor)

(Position : 8777-8905 bp, bzw. -0,80/-0,67 kb bezogen auf T-Start)

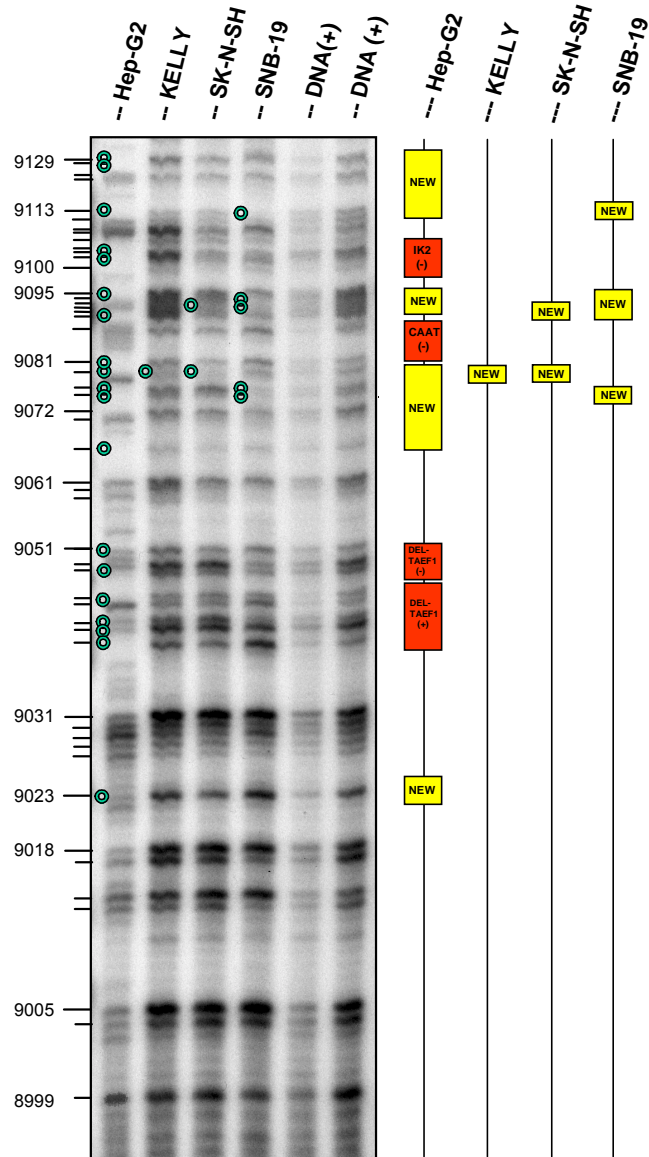


**Abbildung 7.6:** *In vivo* Footprint mit dem Oligonukleotidsatz F.

Gezeigt sind die jeweiligen methylierten Guanosenbasen an ihren korrespondierenden Positionen auf der genomischen Sequenz (Bandenpositionen durch Striche markiert). Geschützte Basen sind grün markiert. Der Transkriptionsstart liegt an Position 9579 (vgl. Anhang). Protektierte Basen oder Sequenzbereiche sind rot markiert, soweit sie in der Datenbank identifiziert werden konnten, und gelb gehalten („NEW“), sofern sich in der Datenbank keine Information über sie fand. Als Kontrolle dienten 2 unterschiedlich lang methylierte, „nackte“ Plazenta-DNA Proben („DNA(+“)“).

## Footprint G (htPA-Promotor)

(Position : 8999-9129 bp, bzw. -0,58/-0,45 kb bezogen auf T-Start)

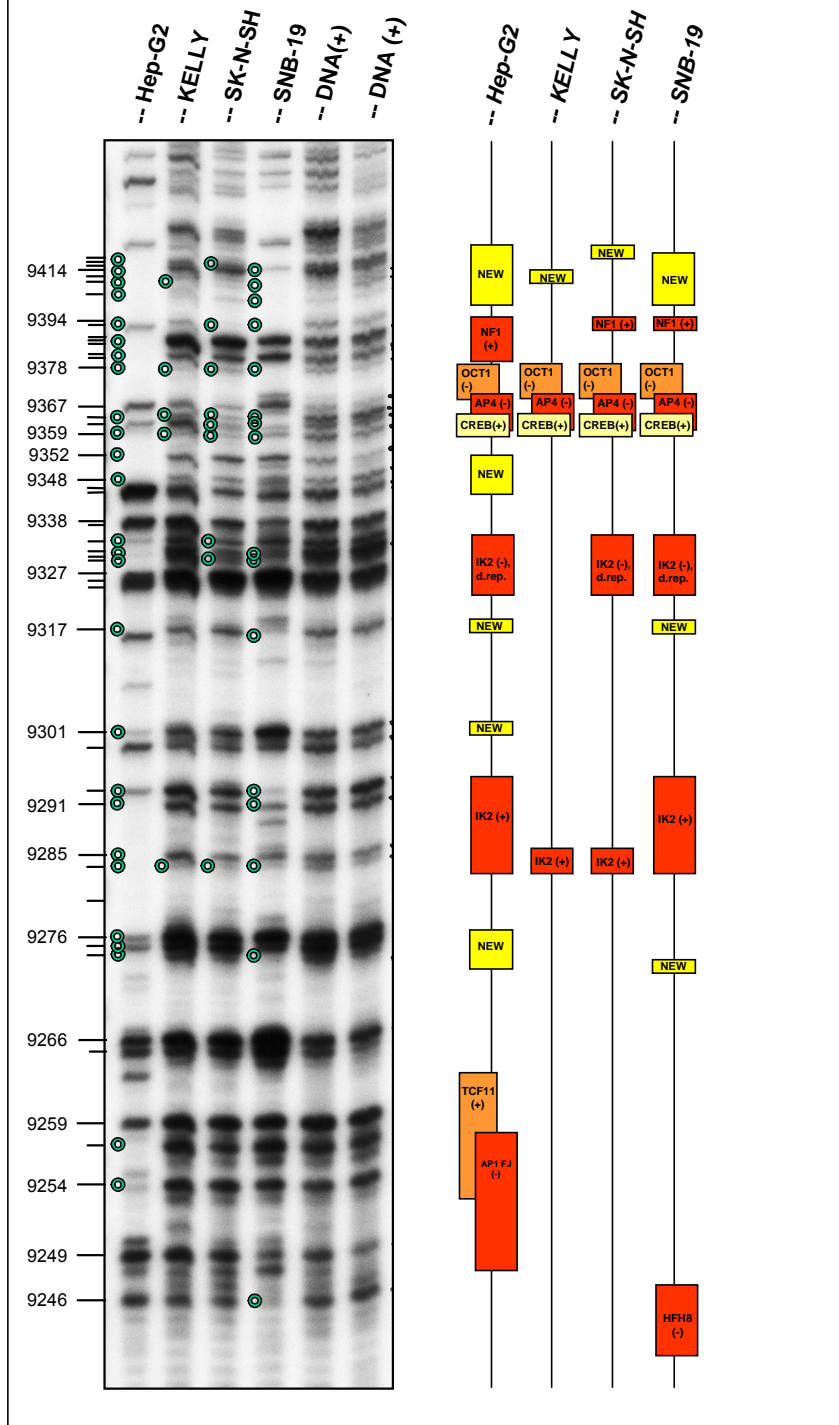


**Abbildung 7.7:** *In vivo* Footprint mit dem Oligonukleotidsatz G.

Gezeigt sind die jeweiligen methylierten Guanosinbasen an ihren korrespondierenden Positionen auf der genomischen Sequenz (Bandenpositionen durch Striche markiert). Geschützte Basen sind grün markiert. Der Transkriptionsstart liegt an Position 9579 (vgl. Anhang). Protektierte Basen oder Sequenzbereiche sind rot markiert, soweit sie in der Datenbank identifiziert werden konnten, und gelb gehalten („NEW“), sofern sich in der Datenbank keine Information über sie fand. Als Kontrolle dienten 2 unterschiedlich lang methylierte, „nackte“ Plazenta-DNA Proben („DNA(+“).

## Footprint H (htPA-Promotor)

(Position : 9246-9414 bp, bzw. -0,33/-0,16 kb bezogen auf T-Start)



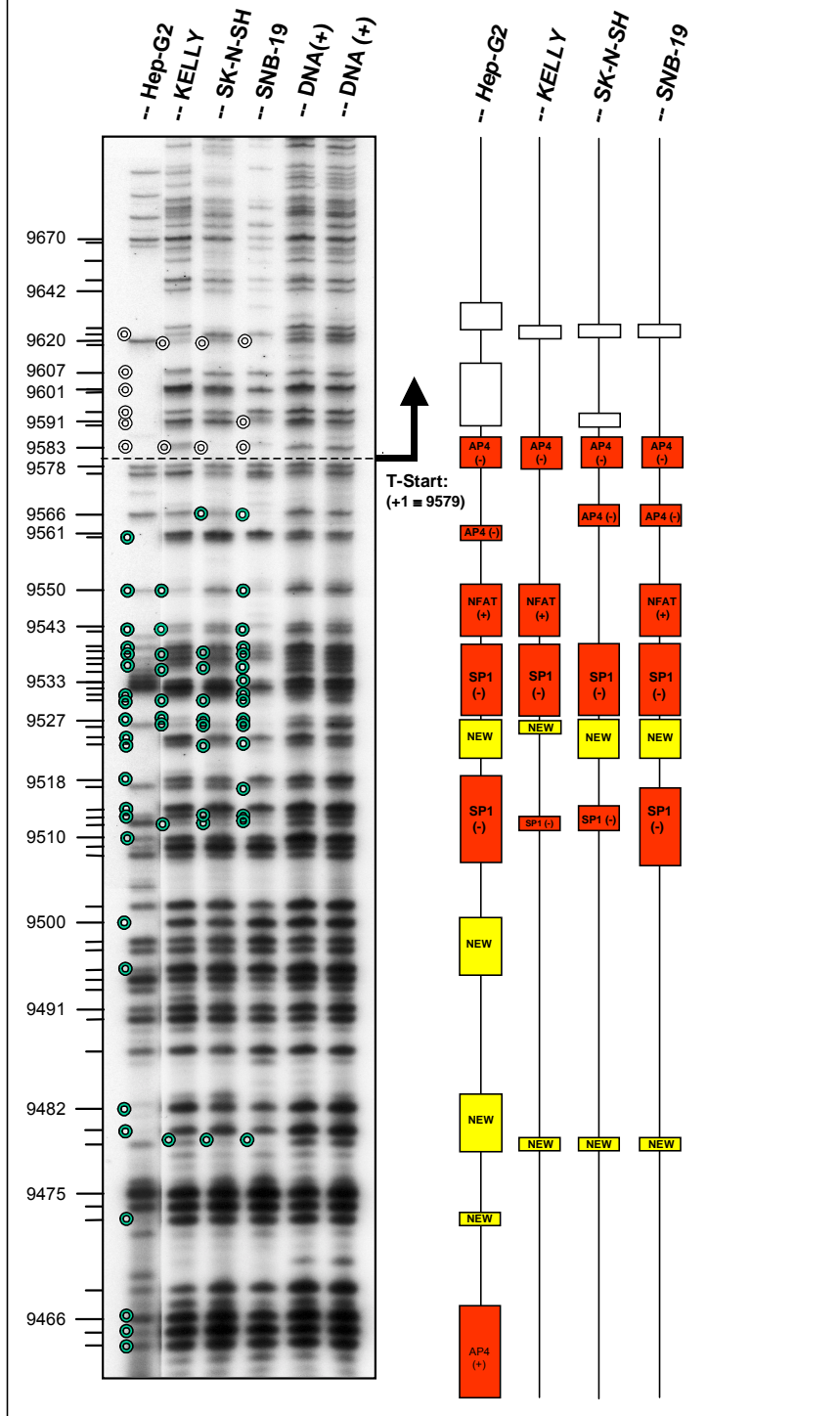
**Abbildung 7.8:** *In vivo* Footprint mit dem Oligonukleotidsatz H.

Gezeigt sind die jeweiligen methylierten Guanosinbasen an ihren korrespondierenden Positionen auf der genomischen Sequenz (Bandenpositionen durch Striche markiert). Geschützte Basen sind grün markiert. Der Transkriptionsstart liegt an Position 9579 (vgl. Anhang). Protektierte Basen oder Sequenzbereiche sind rötlich/orange markiert, soweit sie in der Datenbank identifiziert werden konnten, und gelb gehalten („NEW“), sofern sich in der Datenbank keine Information über sie fand. Als Kontrolle dienen 2 unterschiedlich lang methylierte, „nackte“ Plazenta-DNA Proben („DNA(+“).



## Footprint I (htPA-Promotor)

(Position : 9464-9670 bp, bzw. -0,02/+0,09 kb bezogen auf T-Start)



**Abbildung 7.9:** *In vivo* Footprint mit dem Oligonukleotidsatz I.

Gezeigt sind die jeweiligen methylierten Guanosenbasen an ihren korrespondierenden Positionen auf der genomischen Sequenz (Bandenpositionen durch Striche markiert). Geschützte Basen sind grün markiert und weiß unterhalb (3') des Transkriptionsstarts. Der Transkriptionsstart liegt an Position 9579 und ist mit einem Pfeil markiert (vgl. Anhang). Protektierte Basen oder Sequenzbereiche sind rot markiert, soweit sie in der Datenbank identifiziert werden konnten, und gelb gehalten („NEW“), sofern sich in der Datenbank keine Information über sie fand. Als Kontrolle dienten 2 unterschiedlich lang methylierte, „nackte“ Plazenta-DNA Proben („DNA(+“).

Nachfolgend sind die Ergebnisse der *in vivo* Footprint-Experimente nach Analyse durch die *TransFac*-Datenbank dargestellt (Tab. 4.2).

Position	Sequenz (5' nach 3')	Strang	Transkriptionsfaktor	Hep-G2	KELLY	SK-N-SH	SNB-19
<b>Footprint A</b>							
5902	gtcctg	+	unbekannt	+	-	-	+
5919	ctcatTGTttgtgtg	+	HNF 3B	+	+	-	+
5919	acaaACAAt gag	-	SRY	+	+	-	+
5920	caaaCAAT ga	-	SOX 5	+	+	-	+
5921	catTGTttgtgt	+	HFH 2	+	+	-	+
5921	catTGTttgtgtg	+	HFH 3	+	+	-	+
5921	catTGTttgtgtg	+	HFH 8	+	+	-	+
5939	aaca gcacca GTT Gtgtg	-	CMYB	+	+	-	+
5957	ta ccaccat	+	unbekannt	+	-	-	+
<b>Footprint B</b>							
6498	GGGGatt ccc	+/-	NF-kappa-B (cons./p50)	-	+	-	+
6498	ggggatt CCC	+	NF-kappa-B (p65)	-	+	-	+
<b>Footprint C</b>							
7079	ttcga	+	unbekannt	-	-	-	+
7083	ta ccacat cctg	+	unbekannt	+	-	-	+
7090	gggG CAGgtggcagg	-	E 47	+	-	-	+
7092	tgccA CCTg cc	+	DELTAEF1	+	-	-	+
7092	gggCAGGtgcca	-	LMO2COM	+	-	-	+
7093	gcCA CCTg cc	+/-	MYOD	+	-	-	+
7094	cCA CCTg c	+	USF	+	-	-	+
7123	agccccgttctctgccccgccacctccat	+	unbekannt	+	-	+	+
7152	aTGA CTCat	+/-	AP 1 (cons.)	+	-	+	+
7160	tg cattctg	+	unbekannt	+	-	+	+
<b>Footprint D</b>							
7321	ttcacag	+	unbekannt	+	-	-	-
7347	aaaa gGAAAaaa	-	NFAT	+	-	-	+
7353	aaca gaaaaAA GG	-	GKLF	+	-	-	+
7365	ttc tt	+	unbekannt	+	-	-	-
7391	ctTGA Ctaaaa	+	AP 1	+	-	-	-
7392	ttga ctaaAAT Caagg ctcccatt	+	GFI 1	+	-	-	+
7405	caat GGG Agcct	-	IK 2	+	-	-	+
7411	ggTGACaat gg	-	AP 1 (FJ)	+	-	-	-
7416	GT CAcc ttatcag	+	TCF 11	+	-	-	-
7433	cccatg ccTAATtctg	+	BRN 2	+	-	-	+
<b>Footprint E</b>							
7575	agct caggg cccc tg	+	unbekannt	+	-	-	+
7598	tg caaa ccc tctcc	+	unbekannt	+	-	-	+
<b>Footprint F</b>							
8782	ccct gGAAAta g	-	NFAT	-	-	-	+
8793	ggcat	+	unbekannt	+	-	-	-
8802	ttcagTATTt gcttg	-	HNF 3B	+	+	+	-
8821	ttcgg	+	unbekannt	+	-	-	+
8861	ggcat	+	unbekannt	-	-	-	+
8865	tgtTGG Cccc aagg ccc t	+	NF 1	+	-	-	+
8886	ccca GG GAatata	-	IK 1	+	-	-	+
8897	ggcccactcaa	+	unbekannt	+	-	-	+
<b>Footprint G</b>							
9021	agcaa	+	unbekannt	+	-	-	-
9036	gggcACCTcct	+	DELTAEF1	+	-	-	-
9048	gctcACCT gcgg	-	DELTAEF1	+	-	-	-
9064	ggctgttctctg ccttctcag	+	unbekannt	+	+	+	+
9080	ggtagCCACT ga	-	CAAT	+	-	-	-
9091	ccccc tga	+	unbekannt	+	-	+	+
9097	gtgc GGG Agctc	-	IK 2	+	-	-	-
9111	ca caaaglttccaat cctt	+	unbekannt	+	-	-	+

Fortsetzung und Legende siehe nächste Seite.

Position	Sequenz (5' nach 3')	Strang	Transkriptionsfaktor	Hep-G2	KELLY	SK-N-SH	SNB-19
<b>Footprint H</b>							
9236	aa <b>g</b> TGTTataat	-	HFH 8	-	-	-	+
9247	<b>ga</b> T <b>G</b> ACaagaa	-	AP 1 (FJ)	+	-	-	-
9252	GT <b>CA</b> t <b>c</b> acaggt	+	TCF 11	+	-	-	-
9272	gt <b>ccc</b> tt	+	unbekannt	+	-	-	+
9283	gc <b>ct</b> GGGA <b>c</b> act	+	IK 2	+	+	+	+
9297	gact <b>c</b> laa	+	unbekannt	+	-	-	-
9314	att <b>ct</b> ta	+	unbekannt	+	-	-	+
9320	aa <b>gt</b> <b>GGG</b> AtGGGA <b>c</b> ctt	-	IK 2 (direct repeat)	+	-	+	+
9346	tg <b>c</b> gatt <b>c</b> aa	+	unbekannt	+	-	-	-
9356	TGA <b>CATCA</b>	+	CREB (CRE-like)	+	+	+	+
9362	ca <b>CA</b> <b>GC</b> cg <b>tg</b>	-	AP 4	+	+	+	+
9366	ct <b>g</b> attATTCacagc	-	OCT 1	+	+	+	+
9380	gc <b>ct</b> TGG <b>Ccc</b> gaag <b>cc</b> agg	+	NF 1	+	-	+	+
9401	gg <b>ct</b> gtg <b>c</b> tg <b>ctt</b> <b>cc</b> a <b>cc</b>	+	unbekannt	+	+	+	+
<b>Footprint I</b>							
9457	ctCAG <b>Ct</b> <b>ccc</b>	+	AP 4	+	-	-	-
9471	gg <b>cc</b> ctg	+	unbekannt	+	-	-	-
9477	gt <b>cc</b> actg	+	unbekannt	+	+	+	+
9490	cct <b>c</b> cgcca <b>c</b> ac	+	unbekannt	+	-	-	-
9505	gg <b>ct</b> g <b>GGC</b> Gggtt	-	SP 1	+	+	+	+
9521	gg <b>cc</b> accga	+	unbekannt	+	+	+	+
9528	a <b>ggg</b> GG <b>TG</b> ggg <b>tc</b>	-	SP 1	+	+	+	+
9541	gc <b>ct</b> gAAA <b>c</b> tt	+	NFAT	+	+	-	+
9560	ca <b>CA</b> <b>G</b> Ctcc <b>gg</b>	-	AP 4	+	-	+	+
9578	ct <b>CA</b> <b>G</b> Ctctg	-	<b>AP 4 (T-Start)</b>	+	+	+	+

**Tabelle 4.2:** Darstellung der durch *in vivo* Footprinting identifizierten putativen Transkriptionsfaktoren.

Geschützte Basen sind grün gekennzeichnet, die Positionsangabe bezeichnet die Lage auf der genomischen Sequenz (Transkriptionsstart +1 bei 9579, s. Anhang). Die Sequenzen der responsiven DNA-Elemente sind in 5'→3' Richtung angegeben. Die Positionsangaben kennzeichnen die jeweils erste aufgeführte Base für Elemente auf dem kodierenden Strang („+“) bzw. das 3'-Ende der Elemente auf dem Gegenstrang („-“). Für identifizierte putative Transkriptionsfaktoren ist die Matrix (Homologie >90 %) in kleinen Buchstaben und die „Core“-Region (Homologie >90 %) in Großbuchstaben notiert.

Dieselbe Tabelle ist nachfolgend noch einmal, alphabetisch nach putativen Transkriptionsfaktoren geordnet, angegeben (**Tab. 4.3**, nächste Seite).

<u>Position</u>	<u>Sequenz (5' nach 3')</u>	<u>Strang</u>	<u>Transkriptionsfaktor</u>	<u>Hep-G2</u>	<u>KELLY</u>	<u>SK-N-SH</u>	<u>SNB-19</u>
7391	ctGA Ctaaaa	+	AP 1	+	-	-	-
7152	aTGA CTCAt	+/-	AP 1 (cons.)	+	-	+	+
7411	ggTGACaatgg	-	AP 1 (FJ)	+	-	-	-
9247	gaT GACaagaa	-	AP 1 (FJ)	+	-	-	-
9362	caCA GCcgtg	-	AP 4	+	+	+	+
9457	ctCAGCt ccc	+	AP 4	+	-	-	-
9560	caCA GCtccgg	-	AP 4	+	-	+	+
9578	ctCA GCtctg	-	AP 4 (T-Start)	+	+	+	+
7433	cccatg ccTAAItctg	+	BRN 2	+	-	-	+
9080	ggtagCCAct ga	-	CAAT	+	-	-	-
5939	aaca gcaacca GTTGtgtg	-	CMYB	+	+	-	+
9356	TGA CATCA	+	CREB (CRE-like)	+	+	+	+
7092	tgccA CCTgccc	+	DELTAEF1	+	-	-	+
9036	gggcACCTcct	+	DELTAEF1	+	-	-	-
9048	gctcACCT gcgg	-	DELTAEF1	+	-	-	-
7090	gggGCAggtggcagg	-	E 47	+	-	-	+
7392	ttgactaaAAT Caagg ctcccatt	+	GFI 1	+	-	-	+
7353	aaca gaaaaAA GG	-	GKLF	+	-	-	+
5921	catTGTtgtgt	+	HFH 2	+	+	-	+
5921	catTGTtgtgtg	+	HFH 3	+	+	-	+
5921	catTGTtgtgtg	+	HFH 8	+	+	-	+
9236	aaGTGTTtataat	-	HFH 8	-	-	-	+
5919	ctcatTGTtgtgtg	+	HNF 3B	+	+	-	+
8802	ttcaGTATTt gctt g	-	HNF 3B	+	+	+	-
8886	ccca GGGAatata	-	IK 1	+	-	-	+
7405	caat GGG Agcct	-	IK 2	+	-	-	+
9097	gtgc GGG Agctc	-	IK 2	+	-	-	-
9283	gcttGGGA cact	+	IK 2	+	+	+	+
9320	aaGTGGAtGGAcctt	-	IK 2 (direct repeat)	+	-	+	+
7092	gggCA GGtgca	-	LMO2COM	+	-	-	+
7093	gcCA CCTgccc	+/-	MYOD	+	-	-	+
8865	tgtTGG Cccc aagg ccc t	+	NF 1	+	-	-	+
9380	gctTGG Ccc gaag ccagg	+	NF 1	+	-	+	+
7347	aaaa gGAAAAaa	-	NFAT	+	-	-	+
8782	ccctgGAAAta g	-	NFAT	-	-	-	+
9541	gcttgGAAA ctt	+	NFAT	+	+	-	+
6498	ggggatt CCC	+	NF-kappa-B (p65)	-	+	-	+
6498	GGGGatt ccc	+/-	NF-kappa-B (cons./p50)	-	+	-	+
9366	ctgattATTCacagc	-	OCT 1	+	+	+	+
5920	caaaCAAT ga	-	SOX 5	+	+	-	+
9505	ggctgGGCGggtt	-	SP 1	+	+	+	+
9528	agggGG TGgggtc	-	SP 1	+	+	+	+
5919	acaaACAAt gag	-	SRY	+	+	-	+
7416	GTCAcc ttatcag	+	TCF 11	+	-	-	-
9252	GTCAc acaggt	+	TCF 11	+	-	-	-
7094	cCACCTgc	+	USF	+	-	-	+

Fortsetzung und Legende siehe nächste Seite.

Position	Sequenz (5' nach 3')	Strang	Transkriptionsfaktor	Hep-G2	KELLY	SK-N-SH	SNB-19
5902	gtcctg	+	unbekannt	+	-	-	+
5957	taccaccat	+	unbekannt	+	-	-	+
7079	ttcga	+	unbekannt	-	-	-	+
7083	taccatcctg	+	unbekannt	+	-	-	+
7123	agcccctgttctctgccccgccacctccat	+	unbekannt	+	-	+	+
7160	tgattctg	+	unbekannt	+	-	+	+
7321	ttcacag	+	unbekannt	+	-	-	-
7365	ttctt	+	unbekannt	+	-	-	-
7575	agctcagggcccctg	+	unbekannt	+	-	-	+
7598	tgcaaacctctcc	+	unbekannt	+	-	-	+
8793	ggcat	+	unbekannt	+	-	-	-
8821	ttcgg	+	unbekannt	+	-	-	+
8861	ggcat	+	unbekannt	-	-	-	+
8897	ggcccactcaa	+	unbekannt	+	-	-	+
9021	agcaa	+	unbekannt	+	-	-	-
9064	ggctggctcgtccttctcag	+	unbekannt	+	+	+	+
9091	cccctga	+	unbekannt	+	-	+	+
9111	cacaaagtgtccaatcctt	+	unbekannt	+	-	-	+
9272	gtccctt	+	unbekannt	+	-	-	+
9297	gactctaa	+	unbekannt	+	-	-	-
9314	attctta	+	unbekannt	+	-	-	+
9346	tgcgattcaa	+	unbekannt	+	-	-	-
9401	ggctgtgctgcttcacc	+	unbekannt	+	+	+	+
9471	ggccctg	+	unbekannt	+	-	-	-
9477	gtccactg	+	unbekannt	+	+	+	+
9490	cctccgccacac	+	unbekannt	+	-	-	-
9521	ggccaccga	+	unbekannt	+	+	+	+

**Tabelle 4.3:** Alphabetisch geordnete Darstellung der Ergebnisse aus den *in vivo* Footprint-Experimenten. Geschützte Basen sind grün gekennzeichnet, die Positionsangabe bezeichnet die Lage auf der genomischen Sequenz (Transkriptionsstart +1 bei 9579, s. Anhang). Die Sequenzen der responsiven DNA-Elemente sind in 5'→3' Richtung angegeben. Die Positionsangaben kennzeichnen die jeweils erste aufgeführte Base für Elemente auf dem kodierenden Strang („+“) bzw. das 3'-Ende der Elemente auf dem Gegenstrang („-“). Für identifizierte putative Transkriptionsfaktoren ist die Matrix (Homologie >90 %) in kleinen Buchstaben und die „Core“-Region (Homologie >90 %) in Großbuchstaben notiert.

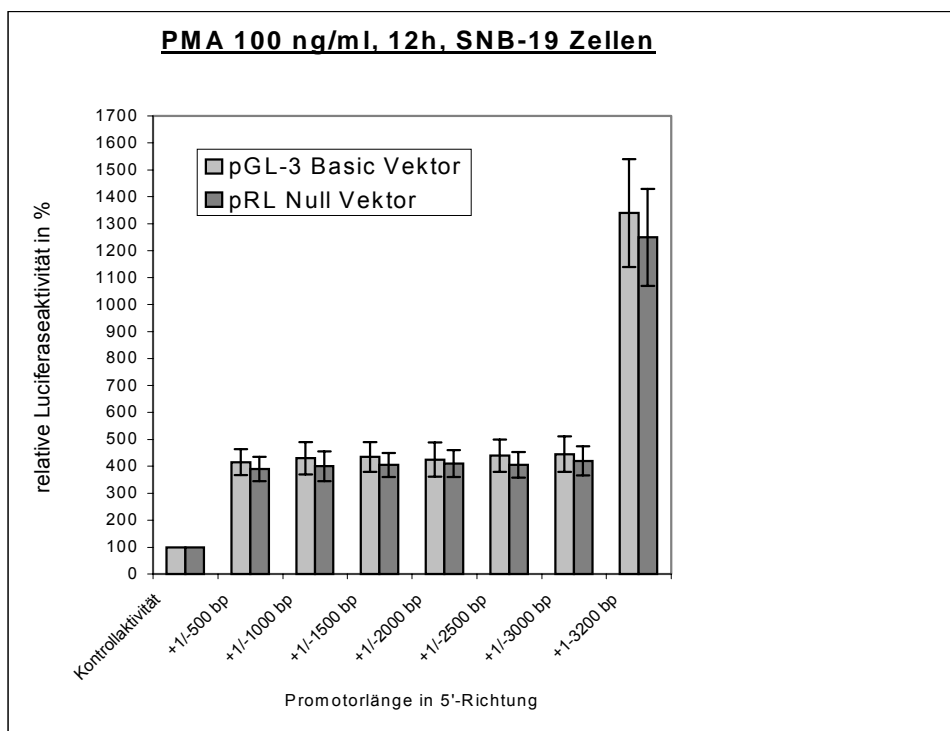
### 8.3 Phorbolster induziert *tPA* über ein NF-κB responsives DNA-Element

Die zuvor durchgeführten Footprint-Experimente zeigten neben einer Fülle anderer Ergebnisse einen geschützten Bereich etwa 3080 bp oberhalb des Transkriptionsstarts (Position 6498-6508, Transkriptionsstart „+1“ bei Position 9579, s. Anhang). Der Footprint an dieser Stelle ist nur relativ schwach ausgeprägt und der vor der Methylierung geschützte Sequenzabschnitt entspricht mit leichter Abänderung der NF-κB Erkennungssequenz (*TransFac* Datenbank-Analyse) bzw. den Bindungssequenzen der Untereinheiten der NF-κB Homo- oder Heterodimere, p50 und p60 („CORE“- und Matrixübereinstimmung in % gegenüber den *TransFac*-Sequenzen):

TPA-Sequenz:

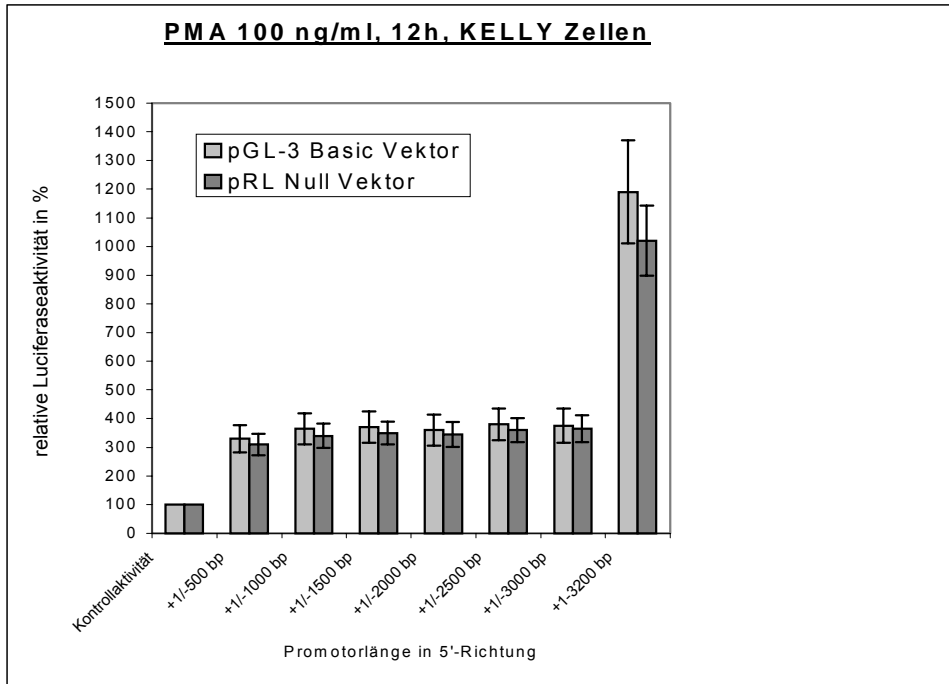
NF-κB (p50):	5'- <u>G G G G</u> a t t c c c	core: 100 %, matrix: 100 %
NF-κB (p65):	5'- g g g g a t <u>C C C</u>	core: 90 %, matrix: 91 %
NF-κB:	5'- <u>G G G G</u> a t t c c c	core: 90 %, matrix: 96 %

NF- $\kappa$ B responsive Sequenzen wurden bisher vor allem in Genen gefunden, die in Verbindung mit Akutphasereaktionen, Regulation der Immunantwort und viralen Replikationsmechanismen stehen. NF- $\kappa$ B wird zudem durch diverse Mediatoren, wie z. B. TNF, IL-1 und 6, Lipopolysacchariden und Phorbolster stimuliert und liegt normalerweise praktisch inaktiv im Zytoplasma vor (Review: Thanos & Maniatis 1995). Zur Untersuchung der Funktionalität der vorliegenden NF- $\kappa$ B Erkennungssequenz wurden deshalb Induktionsexperimente mit PMA (Phorbol-12-myristat-13-acetat) durchgeführt. Sukzessiv verlängerte Promotorkonstrukte wurden in die Zelllinien KELLY und SNB-19 transfiziert, welche *in vivo* eine schwache Besetzung des Sequenzabschnitts zeigten. Den Zellen wurde anschließend 100 ng/ml PMA appliziert, die Zellen nach 12 h lysiert und die Luciferaseaktivität gemessen. Beide Zelllinien zeigen zunächst eine von der Promotorlänge unabhängige allgemeine Induktion auf den ca. 3,5fachen (KELLY Zellen, **Abb. 8.2**) bzw. 4fachen (SNB-19 Zellen, **Abb. 8.1**) Referenzwert (unbehandelte Zellen). Erst wenn das Promotorkonstrukt auch obige NF- $\kappa$ B Erkennungssequenz beinhaltet (Übergang vom 3000 bp zum 3200 bp langem Promotorfragment), steigt die Luciferaseaktivität auf etwa das 10 bis 12fache (KELLY Zellen, **Abb. 8.2**) bzw. das 12,5 bis 13,4fache Niveau (SNB-19, **Abb. 8.1**). Die Region zwischen -3000 bis -3200 bp des Promotors trägt also PMA responsive Sequenz, die für einen enormen Zuwachs der Induktion verantwortlich ist.



**Abbildung 8.1:** PMA induziert *tPA* in SNB-19 Zellen.

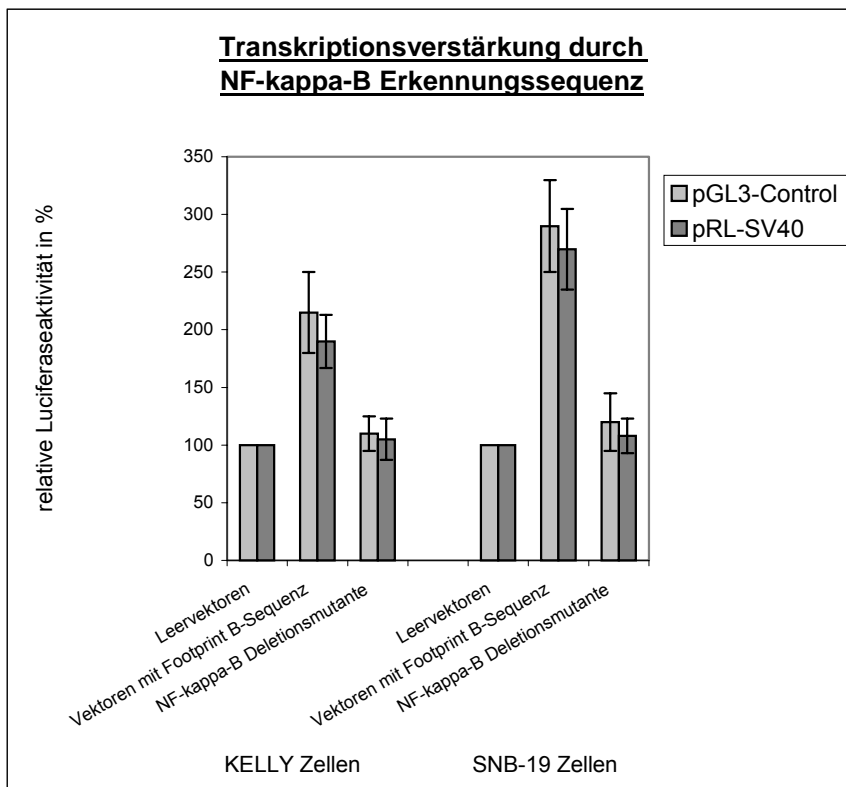
Länger werdende Promotorfragmente wurden in *Firefly*- (pGL3 Basic) und *Renilla* (pRL Null)-Luciferase Vektoren kloniert und mit PMA behandelt. Die Region zwischen -3000 bis -3200 bp oberhalb des Transkriptionsstarts (+1) ist für eine deutliche Steigerung der allgemeinen PMA-Induktion verantwortlich. Messwerte aus 2 Versuchen, je 8fach, statistisch gemittelt mit Standardabweichung.



**Abbildung 8.2:** PMA induziert *tPA* in KELLY Zellen.

Länger werdende Promotorfragmente wurden in *Firefly*- (pGL3 Basic) und *Renilla* (pRL Null)-Luciferase Vektoren kloniert und mit PMA behandelt. Die Region zwischen -3000 bis -3200 bp oberhalb des Transkriptionsstarts (+1) ist für eine deutliche Steigerung der allgemeinen PMA-Induktion verantwortlich. Messwerte aus 2 Versuchen, je 8fach, statistisch gemittelt mit Standardabweichung.

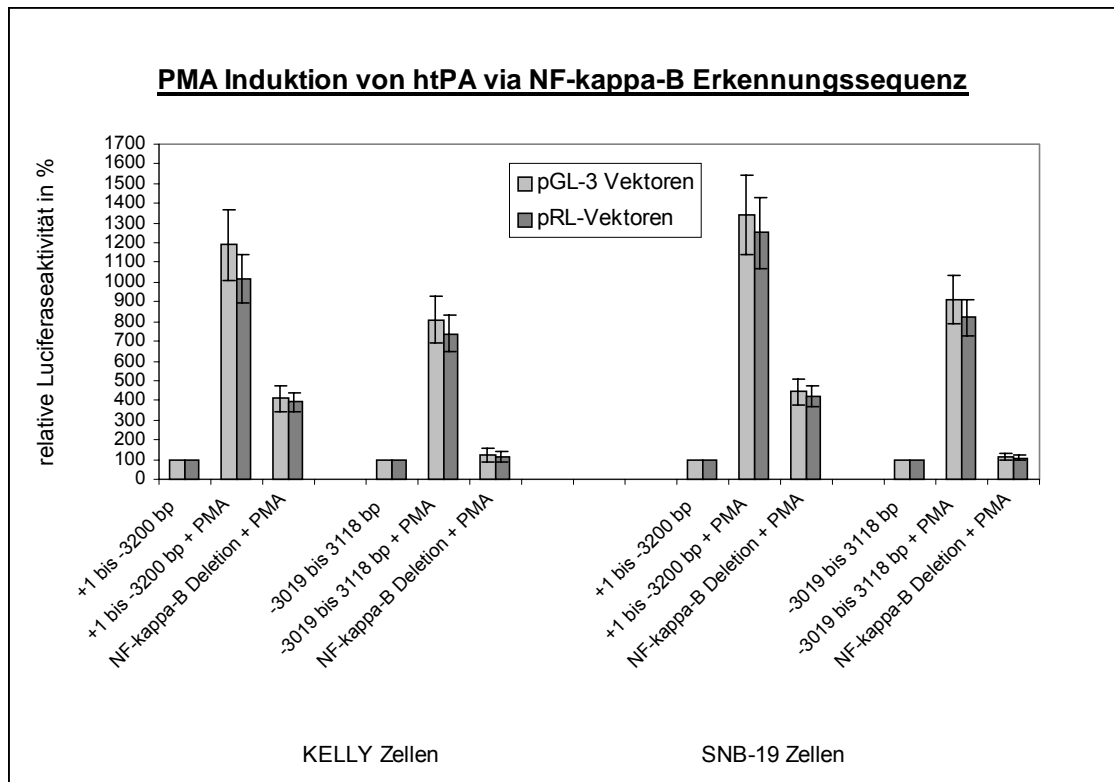
Weiterführend wurde der im Footprint B untersuchte, putative NF- $\kappa$ B Sequenzbereich zwischen Position 6461 und 6560 (entspricht -3118/ -3019 bp, T-Start „+1“ bei Position 9579, s. Anhang) in die konstitutiv aktiven Luciferasevektoren pGL3-Control und pRL-SV40 kloniert, außerdem die NF- $\kappa$ B Erkennungssequenz mit dem *QuickChange™ Site-Directed Mutagenesis Kit* (Stratagene) eliminiert (NF- $\kappa$ B Deletionsmutanten) und diese Konstrukte in Transaktivierungsassays in KELLY und SNB-19 Zellen auf Enhancereigenschaften (**Abb. 8.3**) bzw. ihre Reaktion auf PMA-Applikation hin untersucht (**Abb. 8.4**).



**Abbildung 8.3:** Die NF- $\kappa$ B Erkennungssequenz besitzt eine Enhanceraktivität. Die Luciferaseaktivität der konstitutiv aktiven Reportergenvektoren steigt in Zusammenarbeit mit dem im Footprint B untersuchten Sequenzabschnitt und fällt wieder auf Ausgangsniveau bei den NF- $\kappa$ B Deletionsmutanten. Messwerte aus 2 Versuchen, jeweils 8fach, statistisch gemittelt mit Standardabweichung.

Die NF- $\kappa$ B Erkennungssequenz an Position 6498 (entspricht  $-3081$  bp, s. Anhang) zeigt eine signifikante Verstärkung der konstitutiven Luciferaseaktivität der beiden Reportergenvektoren in den Zelllinien Kelly und SNB-19, wie im Vergleich mit den Deletionsmutanten deutlich wird. Auf eine Untersuchung eines revers klonierten Sequenzabschnitts wurde wegen der Natur der NF- $\kappa$ B Erkennungssequenz verzichtet (s. Diskussion).





**Abbildung 8.4:** PMA Induktion von *tPA* wird durch die NF- $\kappa$ B Erkennungssequenz an Position 6498 vermittelt. Vollpromotorfragmente (+1 bis -3200 bp) wurden in die Vektoren pGL3-Basic bzw. pRL-Null, das Promotorfragment -3019 bis -3118 bp in die konstitutiv aktiven Vektoren pGL3-Control und pRL-SV40 kloniert. Den Deletionsmutanten fehlt die NF- $\kappa$ B Erkennungssequenz (entspricht -3081 bp oberhalb des Transkriptionsstarts „+1“, s. Anhang), PMA wurde zu 100 ng/ml und 12 h appliziert, bevor die Zellen lysiert und die Luciferaseaktivität gemessen wurde. Messwerte aus 2 Versuchen, jeweils 8fach, statistisch gemittelt mit Standardabweichung.

Die Transaktivierungsversuche mit 100 ng/ml PMA (12h) zeigen deutlich, dass die gesteigerte Induktion von *tPA* (bis über den 10fachen Referenzwert hinaus) in den transfizierten Zellen von der NF- $\kappa$ B Erkennungssequenz abhängig ist. Ohne diese fällt die Luciferaseaktivität der 3200 bp langen Vollpromotorkonstrukte wieder auf den Wert ab, den alle verwendeten Promotorkonstrukte mit einer gleichen oder kürzeren Promotorlänge als 3000 bp zeigten (etwa 3,5 bis 4facher Referenzwert, vgl. **Abb. 8.4**) Bei den aus dem im Footprint B untersuchten Sequenzabschnitt bestehenden Reportergenkonstrukten (Fragment: -3019 bis -3118 bp) geht die Induktionswirkung des PMA durch die Deletion der NF- $\kappa$ B Erkennungssequenz vollständig auf den Referenzwert der unbehandelten, transfizierten Zellen zurück (**Abb. 8.4**).

Das im Footprint B identifizierte NF- $\kappa$ B responsive DNA-Element hat Enhancereigenschaften und ist verantwortlich für die stark erhöhte Induktionswirkung von PMA auf *tPA*. Aufgrund der hohen Sequenzhomologie zu bekannten NF- $\kappa$ B responsiven DNA-Elementen von mehr