

als 90 % ist es höchstwahrscheinlich der Transkriptionsfaktor NF- κ B selbst, der regulatorisch in die neuronale Expressionskontrolle von *tPA* eingreift.

9 Diskussion

Die eingangs erwähnten Ergebnisse aus der Entschlüsselung des menschlichen Genoms haben gezeigt, dass zur Schaffung komplexer Säugetierorganismen bedeutend weniger Gene notwendig sind als zuvor geschätzt. Ein zwangsläufiger Schluss aus dieser Erkenntnis ist, dass die transkribierten Gene in einer viel komplexeren Wechselwirkung miteinander stehen müssen als bisher vermutet, wobei in Abhängigkeit von der betrachteten Situation dieselben Proteine wahrscheinlich mehrfache, unterschiedliche Funktionen ausüben. Daraus wiederum folgt, dass auch die Transkriptionskontrolle der einzelnen Gene eher komplex denn simpel und den jeweiligen Gegebenheiten angepasst sein muss. Die verbreitete Ansicht, dass wenige Transkriptionsfaktoren ein oder mehrere vorhandene responsive Elemente erkennen und im Kontakt mit ihm ihre Wirkung entfalten, ist unabhängig von den obigen Erkenntnissen schon in den letzten Jahren sukzessive erweitert und vertieft worden. Der Schlüssel zur Funktionsweise der Genexpressionsregulation und ihrem Verständnis liegt in der dreidimensionalen, regelmäßigen Organisation der DNA im Chromatin und den regulatorischen Vorgängen, die diese Struktur beeinflussen (Cheung, Allis & Sassone-Corsi 2000). Sie gilt es bei der Erforschung der Transkriptionskontrolle eines Gens grundsätzlich zu berücksichtigen und in die experimentelle Planung miteinzubeziehen.

9.1 Experimentelle Methodik

Um Ergebnisse im Sinne einer realistischen Aussage zur Transkriptionskontrolle gewinnen zu können, bieten sich nur *in vivo* Experimente an, bei deren Durchführung die genomische Integrität der DNA erhalten bleibt. Zu diesen Experimenten gehören die in dieser Arbeit verwendeten Methoden des *in vivo* DNaseI Hypersensitivitätsassays und des *in vivo* Footprinting. Zwar werden beide Experimente an Zellen in der Zellkultur durchgeführt, doch gilt es zu bedenken, dass diese Zellen im Vergleich zu jenen im lebenden Organismus nur hinsichtlich metabolischer Abläufe (z. B. die Reaktion auf Mediatoren) unterschiedlich sein können, was auf einen unnatürlichen Zellkontext zurückzuführen ist. Betrachtet man aber die

Vorgänge auf der Ebene genomischer DNA, so sind kultivierte Zellen identisch zu denen im lebenden Gewebe. An der dreidimensionalen Struktur der DNA-Organisation ändert sich bei ihnen nichts durch die Kultivierung. Die Experimente können daher *in vivo* relevante Ergebnisse liefern, solange nicht in der Weise in den Haushalt der Zelle eingegriffen wird, als dass sich in der Folge die genom. Struktur der DNA und die Prozesse zu ihrer Regulierung ändern.

9.1.1 Der DNaseI Hypersensitivitätsassay

Der DNaseI Hypersensitivitätsassay diente in vorliegender Arbeit als erste Identifikationshilfe für transkriptionell aktive, d. h. regulatorisch wichtige DNA Sequenzbereiche des *tPA* Gens. Bei diesem Experiment diffundieren geringste Mengen von DNaseI in die zuvor permeabilisierten Zellen und in den Kern. Dort gelangt das Enzym nur in regulatorisch bedeutenden, transkriptionell aktiven Bereichen, das bedeutet in Bereichen einer ohnehin aufgelockerten Chromatinstruktur (zwischen den Nukleosomen), an die DNA und kann diese dort schneiden. DNA in direktem Kontakt mit den Histonen ist bei den gewählten Konzentrationen und den kurzen Zeitfenstern vor dem Abbau geschützt (Noll 1974, Fritton 1984, Jantzen 1987, Asenbauer 1996, Asenbauer 1999). DNase ist zudem ein in Säugerzellen natürlich vorkommendes Enzym und andere experimentelle Protokolle verwenden nach Permeabilisierung sogar nur die endogen vorkommende DNase, um regulatorisch wichtige Sequenzabschnitte zu identifizieren. Die experimentellen Grundvoraussetzungen innerhalb der Zelle stimmen in dieser Hinsicht mit der Situation von Zellen in einem lebenden Organismus überein. Die Genauigkeit der Positionsbestimmung einer DNaseI sensitiven Stelle auf dem DNA Strang hängt nachfolgend wesentlich von der Entfernung zur vorher definierten Restriktionsschnittstelle ab. Da Agarosegele um etwa 1 % verwendet werden, liegen unter Berücksichtigung der Auftrennungsfähigkeit von Agarose die Längenbereiche für eine grobe Positionsbestimmung ($\pm 1000-2000$ bp) bei bis zu 12 kb. Für eine brauchbare, d. h. exaktere Eingrenzung müssen die Fragmente erfahrungsgemäß jedoch unter 5 kb liegen, da nur hier noch eine Auflösung von $\leq \pm 200-400$ bp erreicht werden kann. Unter Idealbedingungen (Verhältnis von Größenmarker zu Fragmentlänge) können manchmal Bereiche bis auf ± 100 bp eingegrenzt werden. Aufgrund des experimentellen Aufbaus werden auf diese Weise nur Bereiche identifiziert, die *in vivo* relevant sind, da die regelmäßige Organisation in einer Chromatin/Nukleosomenstruktur beim Experiment erhalten

bleibt (vgl. Transaktivierungsassay). Problematisch, weil der Methode immanent, kann sich eine Situation darstellen, in der sich zu einer gewählten Restriktionsschnittstelle kein unmittelbar benachbarter, sequenzspezifischer Sondenabschnitt findet, weil der gewählte Bereich möglicherweise eine mehrdeutige Sequenz beinhaltet (Situation im Bereich oberhalb der Bgl II Schnittstelle bei Position 4257: In diesem Bereich konnte keine passende Kombination aus geeigneten Restriktionsschnittstellen und benachbarten, eindeutig sequenzspezifischen Sondenabschnitten gefunden werden. Dieser Bereich konnte deswegen nicht analysiert werden.). Zu diesem Zweck wurden die gewählten Sonden auch gegen genomische DNA testhybridisiert, die vorher mit unterschiedlichen Restriktionsenzymen verdaut, über ein Agarosegel aufgetrennt und auf eine Membran geblottet wurde. Nur diese Vorexperimente zeigten, ob sich mit der gewählten Sonde der beabsichtigte Sequenzzielbereich eindeutig identifizieren ließ. Aus diesem Grund wurden die Sonden auch aus „random-priming“ Nonameren synthetisiert, welche über den Sondenbereich von etwa 400-600 bp mehrere kürzere gelabelte Sondenstücke ergaben, so dass sich ein möglicherweise auftretendes Fehlhybridisieren nur mit deutlich geringerer Intensität auf dem entwickelten Film dargestellt hätte (leicht an der Negativkontrolle erkennbar). Das Experiment war damit doppelt gegen eventuelle falschpositive Ergebnisse abgesichert. Die einzig verbleibende Quelle für mögliche Falschpositive blieben in der DNA-Präparationsphase eventuell auftretende Scherbrüche der genomischen DNA nach dem DNaseI Verdau. Hier galten daher die präparativen Vorsichtsmaßnahmen im Umgang mit genomischer DNA und das Vermeiden dieser Scherbrüche ließ sich nach der Präparation einfach anhand der Negativkontrolle und einem Lauf über ein Agarosegel bestätigen (nicht gezeigt), der jeweils die Integrität der genomischen DNA aufzeigen musste.

9.1.2 *In vivo* Footprinting

Nach der Eingrenzung der regulatorisch wichtigen DNA-Sequenzbereiche im DNaseI Hypersensitivitätsassay auf wenige hundert Basen, erfolgt in diesen Bereichen die eigentliche Identifizierung von regulatorischen Transkriptionsfaktoren über die Detektion der von ihnen auf dem genomischen DNA-Strang bedeckten Bereiche („footprints“), der jeweils nur einige wenige Basenpaare umfasst. Auch dieses Experiment macht sich zu Nutze, dass die Vorgänge auf der Ebene genomischer DNA sowohl in der Zellkultur als auch im lebenden Gewebe unverändert gleich bleiben, die gewonnenen Daten also *in vivo* Relevanz behalten.

Dimethylsulfat (DMS) in geringer Konzentration diffundiert als kleines Molekül (Ausdehnung etwa 10 Å) in die Zelle und dort in den Kern, wo es statistisch gleichmäßig die 7N Position von Guanosinen 5-6 mal stärker methyliert als die 3N Positionen von Adenosinen (Maxam & Gilbert 1977, Lawley & Brookes 1963). Aus sterischen Gründen, die von der DNA-Helixstruktur herrühren (Durchmesser der Helix: 20 Å), kann nur an diesen Stickstoffatomen methyliert werden. Die methylierten Purine hydrolysieren schnell und spalten sich von der Desoxyribose ab. Im zweiten Schritt wird mit Piperidin genau an diesen Stellen das Phosphatrückgrad gespalten und es kommt zum Einzelstrangbruch, der im weiteren Verlauf des Experiments mit einem Satz von Gegenstrangprimern identifiziert werden kann. Man beachte, dass sich mit den gewählten „nested“ Primern jeweils nur Einzelstrangbrüche, das heißt Guanosine, auf dem Gegenstrang identifizieren lassen. Erkennungssequenzen, die gar keine C/G Basenpaar enthalten, lassen sich also weder auf dem kodierenden, noch auf dem nichtkodierenden Strang nachweisen (z. B. die **Core**-Region von BRN2, „cacatctg**TAAT**ccca“). Bei diesen äußerst selten vorkommenden Situationen liegen aber jeweils C/G Basenpaare in unmittelbarer Nachbarschaft der Core-Region, die der Transkriptionsfaktor, sofern er denn zum Zeitpunkt der Methylierung Kontakt zur DNA hatte, oftmals mit abdeckt und schützt. Im Autoradiogramm sieht man auf diese Weise ein charakteristisches Bandenmuster aller im Sequenzzielbereich vorkommenden Guanosine und manchmal auch die schwachen Banden der Adenosine, die erfahrungsgemäß oftmals in unmittelbarer Nachbarschaft zu einem geschützten Guanosin stärker entwickelt sind („hypersensitive Adenosine“). Die im Vergleich zur vollständig methylierten, weil vorher präparierten, „nackten“ DNA auftretenden Lücken (footprints) markieren die Bereiche, in denen eine Protein-DNA Kontakt durch einen Transkriptionsfaktor die Guanosine vor der Methylierung geschützt hat. Man detektiert also die Stellen, an denen der DNA-Strang nicht gebrochen wurde. Das beinhaltet zwangsläufig, dass es in diesem Experiment nicht zu falschpositiven Ergebnissen kommen kann, da man ja nur diejenigen Stellen „sieht“, die nicht chemisch modifiziert oder versehentlich durch Scherbrüche gespalten wurden. DMS hingegen ist so klein, dass nur die DNA-Helix selbst ein sterisches Hindernis darstellt, nicht jedoch die viel größeren Proteine oder andere Bestandteile im Zellinneren. Außerdem würde sich eine fehlgeschlagene Methylierungsreaktion sofort dahingehend bemerkbar machen, dass sich kein vernünftiges, identifizierbares G-Bandenmuster entwickeln würde. Durch die nachgeschaltete PCR-Amplifizierung lassen sich diese geschützten DNA-Regionen auch in unsynchronisierten Zellpopulationen von geringer Zahl nachweisen. Man muss sowieso bedenken, dass die Transkription ein dynamischer Prozess ist, bei dem die wirksam

werdenden Transkriptionsfaktoren einem ständigen „Kommen und Gehen“ unterliegen und nur jeweils ein geringer Teil der Zellpopulation zum Zeitpunkt der Methylierung gerade die entsprechenden Transkriptionsfaktoren auf der DNA gebunden hat. Erfahrungsgemäß werden aber nicht alle Guanosine, die innerhalb eines geschützten Bereichs liegen, zwangsläufig vor der Methylierung geschützt. Es kommt auch vor, dass nicht einmal die Guanosine der Core-Region immer vollständig geschützt sind. Andererseits kann es aber auch vor, dass auch Guanosine der Erkennungssequenzmatrix geschützt werden. Die Methylierung wird beim Kontakt eines Transkriptionsfaktors auch nicht immer auf beiden Strängen verhindert. Identifiziert man eine Footprint auf dem einen Strang bedeutet das nicht zwangsläufig, dass er mit den Gegenprimern auch auf dem anderen Strang zu identifizieren ist. Grund hierfür liegt in der dreidimensionalen Struktur des Protein-DNA Komplexes und der Art und Weise wie ein Transkriptionsfaktor in die DNA-Helix „greift“ und welche Bindungsmotive er dafür verwendet (Leucin-Zipper, Zink-Finger etc.). In der sich anschließenden LM-PCR muss lediglich auf die richtigen PCR-Bedingungen geachtet werden und hier vor allem darauf, dass der Amplifizierungsschritt nicht zu viele Zyklen besitzt, weil am Ende sonst wieder alle Guanosine sichtbar sind und die Footprints des Anteils derjenigen Zellen, die im Methylierungsschritt gerade den entsprechenden Transkriptionsfaktor gebunden hatten, nicht mehr sichtbar sind.

9.1.3 Der Transaktivierungsassay

Hinsichtlich einer möglichen *in vivo* Relevanz der hieraus gewonnenen Ergebnisse ist der Transaktivierungsassay differenziert und immer für den Einzelfall zu betrachten. Bei Untersuchungen von Signaltransduktionswegen und generell bei metabolischen Problemstellungen kommt die *in vitro* Grundkonzeption häufig zum tragen. Es ist bei kultivierten Zellen häufig beobachtet worden, dass sich ihre Eigenschaften durch die Immortalisierung oder die lange Kultivierung deutlich ändern, einige sogar ganz verschwinden können. PC12 Zellen beispielweise beginnen schon nach wenigen Passagen deutlich unterschiedliche Subklone zu bilden. Betrachtet man zudem den experimentellen Grundaufbau des Versuchsablaufs, so bieten sich zwei Möglichkeiten, die Ziel-DNA in die Zelle zu schleusen. Erstens durch elektrische Entladung in einem ladungsträgerfreien Zellmedium (Elektroporation) oder durch diverse Transfektionsreagenzien, die oft auf Basis von amphiphilen Aminen die DNA durch Verschmelzen mit der Zellmembran in die Zelle

schleusen. Im ersten Fall ist die Transfektionseffizienz relativ gering, da durch den Stromschlag je nach Versuchsbedingungen 70-90 % der Zellpopulation zerstört werden und die überlebenden Zellen durch die Transfektion einem enormen biochemischen Stress ausgesetzt sind. Bei den Transfektionsreagenzien liegt die Transfektionseffizienz zwar deutlich höher (bis zu 70 %), jedoch spielen hier Faktoren wie Zellart, Zelldichte, Wachstumsphase, Serumadditive, Vektorfunktion und Anzahl der Zellpassagen eine wichtige Rolle (vgl. *FuGENE 6™*, Instruction Manual, Roche) und viele der in der Vergangenheit verwendeten Reagenzien hatten toxische Eigenschaften. Die Ergebnisse der Transaktivierungsassays sind als Folge davon mit deutlichen Schwankungen behaftet und die Fehlertoleranz ist meistens > 10 %. Subtile Veränderungen lassen sich daher nur schwer feststellen. Beim Blick auf die Art und Weise der DNA-Organisation in der transfizierten Zelle wird der *in vitro* Charakter dieses Versuchstyps sogar sehr deutlich. Das transfizierte DNA-Plasmid wird in der Zelle episomal verpackt. Das bedeutet, dass die Ziel-DNA zwar auch nukleosomal organisiert wird, jedoch ist die Anordnung der Nukleosomen nicht regelmäßig wie im Genom (Cheung , Allis & Sassone-Corsi 2000) sondern bei jeder Transfektion zufällig und unregelmäßig. In der Folge können so Transkriptionsfaktoren an DNA-Elemente binden, die ihnen bei der genomischen Organisationsform sterisch gar nicht zugänglich wären. Führen die so zugänglichen responsiven Elemente nun zu einer Aktivierung oder Repression des Reportergens, erhält man Ergebnisse mit artifiziellem Charakter. Erschwerend kommt hinzu, dass die Ergebnisse bei einer wiederholten Transfektion manchmal nicht reproduzierbar sind, weil die dann auftretende episomale Verpackung des DNA-Plasmids eine andere sein kann, diese dann andere DNA-Sequenzbereiche zugänglich werden lässt und diejenigen aus dem vorangegangenen Experiment nun unzugänglich sein können. Hinsichtlich der Untersuchung der Transkriptionskontrolle von Genen ist diese Art von Experiment also wenig verlässlich und bietet wegen möglicher falschpositiver Signale nur zusätzliche Hinweise bzw. bestätigt nur bereits gewonnene Erkenntnisse.

9.2 Neurotrophine regulieren die *tPA* Transkription

Die durch SDS-PAGE und Western-Blot als Träger der Trk-Rezeptoren identifizierten Zelllinien SK-N-SH und SY5Y wurden für die Untersuchung des Einflusses von Neurotrophinen auf die *tPA* Transkription deshalb ausschließlich herangezogen, weil es für

die Wirkung von Neurotrophinen bis jetzt kein einfaches Kontrollexperiment gibt, das als Positivkontrolle hätte dienen können. Zuwenig ist noch immer über die spezifischen Funktionen und über die Zielgene von Neurotrophinen bekannt (Review: Kaplan & Miller 2000). Beide Zelllinien zeigten in der Ribonuklease Protektionsassay vergleichbare Reaktionen auf die Applikation von Neurotrophinen. NGF stimuliert die Transkription von *tPA* erst nach über 12 h auf bis zur 4fachen Transkriptmenge nach 48 h (**Abb. 5.2**), während BDNF (**Abb. 5.3**) und NT-4 (**Abb. 5.4**) schon innerhalb von 4 h eine maximale Transkription von 4,8 (NT-4) bis etwa 5fach (BDNF) über dem Normalwert induzieren, die jeweils wieder rapide auf Normalniveau fällt (8 h) Diese Wirkung war jeweils konzentrationsabhängig und zeigte ab einer Applikationskonzentration vom Doppelten der EC_{50} einen maximalen Effekt (Daten nicht gezeigt). Für NT-3 konnte weder konzentrationsabhängig noch zeitlich abhängig ein Effekt beobachtet werden. Die Versuche zeigten weiterhin, dass die beobachteten Wirkungen der Neurotrophine auf eine verstärkte Transkription und eine erhöhte mRNA Transkriptmenge zurückzuführen sind und nicht von einer *de novo* Proteinsynthese oder möglicherweise veränderten Stabilitätseigenschaften von bereits vorhandenem mRNA Transkript abhängig sind (vgl. Actinomycin D und Cycloheximid Kontrollen). Der Ribonuklease Protektionsassay wurde anstelle der Northernblottechnologie deswegen gewählt, weil er neben einer erhöhten Sensitivität die experimentell problematischen Schritte der RNA-Isolierung und den damit verbundenen Risiken der Degradierung derselben ausschließt und so zur Verlässlichkeit der gewonnenen Daten beiträgt (s. Material und Methoden).

Auffallend ist die zeitliche Diskrepanz mit der NGF einerseits und BDNF/NT-4 andererseits ihre Wirkung entfalten. Für NGF wurde schon früher, besonders im Zusammenhang mit seiner Bedeutung für die Zelldifferenzierung und dem Auswachsen von Neuriten von PC12 Zellen eine erst spät eintretende Wirkung beschrieben (Ginty et al. 1991, Smith et al. 1991, Damon et al. 1990, Brugg et al. 1988, Levi et al. 1988). Sieht man die späte Wirkung auf *tPA* zudem im Licht einer Beteiligung an Differenzierungsprozessen und neuronalem Zellwachstum, an denen sowohl NGF (Lewin & Barde 1996, Edwards et al. 1989) als auch *tPA* (s. Einleitung) beteiligt sind, so erscheint es vernünftig einen Zusammenhang in dieser Richtung zu vermuten. Die Frage, wie NGF genau die Transkription von *tPA* reguliert, konnte in dieser Arbeit nicht befriedigend beantwortet werden. Die Transaktivierungsassays mit sukzessiv verlängerten Promotorbereichen zeigten hier keinen besonders auf NGF-Applikation sensitiven Bereich, lediglich eine von der Promotorlänge unabhängige 2,5 bis

3fache Induktion der Luciferaseaktivität konnte gemessen werden. Die Daten zeigen außerdem, dass vermutlich der proximale Promotorbereich bis -3000 bp für die Induktionswirkung von NGF verantwortlich ist (**Abb. 5.5 & 5.6**), was wiederum den Schluss nahe liegt, dass eher allgemein auftretende Transkriptionsfaktoren, z. B. *AP-1* oder *SP-1*, und nicht spezifische NGF-responsive Elemente hier wirksam sind. So ist bereits beschrieben worden dass NGF z. B. die Expression von *SP-1* (Yan et al. 1997), *c-Jun* (Wu et al. 1989) und *c-Fos* (Kruijer et al. 1985, Curran & Morgan 1985) stimulieren kann. Die letzten Jahre haben gezeigt, dass NGF seine Wirkung vom TrkA-Rezeptor aus hauptsächlich über zwei Signaltransduktionswege vermittelt. Zum einen ist das die *Ras/PI-3K/Akt* Signalkaskade, die durch Inhibierung von apoptotisch aktiven Proteinen wie *Forkhead* und *Bad* hauptsächlich für das Überleben der Neuronen verantwortlich ist und zum anderen der *Ras/Raf/MEK/MAPK* Signaltransduktionsweg, der neben der Induktion von anti-apoptotischen Proteinen wie *Bcl-2* und *CREB* verantwortlich für synaptische Plastizität, long-term Potentiation (LTP) und für die Phosphorylierung und damit Regulation einer großen Zahl von Proteinfaktoren ist (Review: Kaplan & Miller 2000). Möglicherweise ist das der Grund dafür, dass in den Transaktivierungsassays keine spezifisch NGF responsive Region identifiziert werden konnte. Neben den Trk-Rezeptoren gibt es auch noch den zweiten Bindungsrezeptor, $p75^{NTR}$, über den NGF und die anderen Neurotrophine wirken können. Interessanterweise kann dieser Rezeptor für sich allein genommen die Apoptose von Neuronen via *JNK* induzieren (Itoh et al. 1991) - in der vorliegenden Arbeit fand sich jedoch niemals ein experimenteller Hinweis auf eine mögliche apoptotische Wirkung -, aber in Wechselwirkung mit den Trk-Rezeptoren dieselben beeinflussen und so auch trophische Effekte auf Neuronen haben (s. Einleitung). Andere Autoren berichten, dass $p75^{NTR}$ in Verbindung mit NGF den Transkriptionsfaktor NF- κ B in unterschiedlichen Zellen induziert (Carter et al. 1996, Ladiwalla et al. 1998, Kimpinski et al. 1999) und auf diesem Weg zum Überleben neuronaler Zellen beiträgt (Maggirwar et al. 1998, Hamanoue et al. 1999). Der *tPA* Promotor besitzt bei -3081 bp ein funktionelles NF- κ B responsives Element (s. Diskussion dort). Zwar konnte im Transaktivierungsassay diesbezüglich keine gesteigerte Sensitivität hinsichtlich NGF oder anderen Neurotrophinen beobachtet werden, jedoch kann dies auch an den eingangs diskutierten analytischen Mängeln, die Transaktivierungsassays mit sich bringen, liegen. Möglicherweise spielt dieses NF- κ B responsive Element eine wichtige Rolle bei der Induktion von *tPA* durch NGF. Über den spezifischen Wirkungsweg, auf dem NGF in den Experimenten *tPA* induziert hat, kann nach aktueller Kenntnislage leider nicht abschließend geurteilt werden. Da jedoch der $p75^{NTR}$ -Rezeptor auch bedeutend für das axonale Wachstum ist, wo er im Zusammenspiel mit NGF

und BDNF dieses ohne eine Einflussnahme von Trk-Rezeptoren steuert (Yamashita et al. 1999, Anton et al. 1994), und *tPA* aufgrund seiner proteolytischen Eigenschaften für diese Art von Prozessen essentiell wichtig ist, lässt sich nicht unbegründet spekulieren, dass die durch Neurotrophine vermittelte *tPA* Induktion eventuell auch über $p75^{\text{NTR}}$ vermittelt wird. Hier liegt einer der interessantesten, weiterführenden Ansätze bei der zukünftigen Erforschung der Genregulation von *tPA* durch NGF.

Hinsichtlich der kurzen Zeit von nur 4h, nach der BDNF und NT-4 ihre Wirkung entfalten (**Abb. 5.3 & 5.4**), kann man *tPA* wohl als ein frühes („early“) responsives Gen dieser Neurotrophine betrachten, wobei die Bedeutung dieses Sachverhalts aber unklar bleibt. Beiden Neurotrophinen wurde in den letzten Jahren eine Rolle in der Neurogenese und der Entwicklung verschiedener Hirnareale zugewiesen (z. B. Gao et al. 1995, Memberg & Hall 1995, Enokido et al. 1999) und für BDNF in jüngster Zeit sogar eine Bedeutung beim Morbus Parkinson postuliert (Nagatsu et al. 2000, Murer et al. 2001). Beide Neurotrophine zeigen in den Ribonuklease Protektionsassay bezüglich *tPA* ein vergleichbares Verhalten sowohl hinsichtlich der zeitlich abhängigen Induktion als auch hinsichtlich ihrer Konzentrationsabhängigkeit, die wie bei NGF bei einer doppelten EC_{50} maximal wird (Daten nicht gezeigt). Ein identisches Wirkungsverhalten auf *tPA* ist vor dem Hintergrund des gleichen Bindungsrezeptors, nämlich TrkB (Kaplan & Miller 1997), nicht überraschend und unterstreicht die unterschiedliche Wirkung dieser Neurotrophine im Vergleich zu NGF, das hauptsächlich an den TrkA-Rezeptor bindet und auf die *tPA* Expression erst spät wirkt. Auch für NT-4 und BDNF konnte in den Transaktivierungsassays keine spezifisch responsive Region auf dem *tPA* Promotor identifiziert werden (Daten nicht gezeigt). Hierfür gilt das bereits für NGF (s. o.) Gesagte. Interessanterweise korrelieren die erhobenen Daten aber gut mit Ergebnissen, die aus Primärkulturen von kortikalen Neuronen der Maus gewonnen werden konnten. Die Autoren konnten innerhalb von drei Stunden mit BDNF, NT-3 und NT-4 die *tPA* Transkription induzieren, wobei die Transkription bei BDNF und NT-4 auf das ~ 8fache und bei NT-3 Applikation auf das 4fache anstieg (Fiumelli et al. 1999). Diese Werte liegen um etwa den Faktor 1,5 über den in dieser Arbeit gemessenen Werten, korrelieren also gut. Die Autoren konnten jedoch für NGF keine Effekte beobachten, während in dieser Arbeit wiederum keine Induktion durch NT-3 beobachtet werden konnte. Fiumelli et al. beschreiben die NT-3 Induktion in ihren Versuchen nur als ~ 50 % so hoch wie die durch BDNF und NT-3. Der Grund für diese Diskrepanz der Ergebnisse liegt möglicherweise in der unterschiedlichen Natur der verwendeten Zellsysteme (Mausprimärkulturen einerseits und

humane, immortalisierte Neuronzellen andererseits). Leider ließ sich aus dieser Veröffentlichung heraus nicht feststellen, warum NGF in den Mauszellen keinen Effekt zeigte. Die in vorliegender Arbeit durchgeführten Experimente zeigen, dass sich die Wirkung von NGF erst vergleichsweise spät entfaltet. Es ist also unklar, ob in den Experimenten dieser Autoren NGF wirklich ohne Wirkung war oder ob möglicherweise nur der Beobachtungszeitraum in ihren Experimenten zu kurz gewählt war.

Eine physiologische Relevanz der vorliegenden Befunde ist z. B. in einigen trophischen Effekten zu sehen, die in der neuronalen Entwicklung auf BDNF zurückzuführen sind. BDNF reguliert beispielsweise das dendritische Wachstum im sich entwickelnden visuellen Kortex (McAllister et al. 1997) und hat Auswirkungen auf die Synaptogenese von Mossy-Fibrillen (Scharfman et al. 1999), auf deren Wachstum auch *tPA* Einfluss nimmt (Wu et al. 2000), wobei sich BDNF dafür möglicherweise des durch *tPA* aktivierten Plasminogen/Plasmin-Systems bedient. In dieselbe Richtung weisen auch kürzlich über NT-4 gewonnene Erkenntnisse, nach denen NT-4 in der Maus das axonale Wachstum der Ganglienzellen stimuliert und neuroprotektiv auf sie wirkt (Cui et al. 2000). Sowohl BDNF als auch NT-4 fördern zudem das Überleben und das Auswachsen der Neuriten von pontozerebralen Mossy-Fibrillneuronen (Rabacchi et al. 1999). Die vorliegenden Ergebnisse sind auch hinsichtlich der neurostrukturellen Reorganisation, der sogenannten synaptischen Plastizität schlüssig, bei der eine Beteiligung von *tPA* schon nachgewiesen wurde (Seeds et al. 1995, Black et al. 1990). Unterstützt wird diese Sichtweise durch die Koinduktion von *tPA* und BDNF Transkription während der long-term Potentiation (LTP) (Dragunow et al. 1993, Qian et al. 1993) und der Tatsache, dass sowohl *tPA*- als auch BDNF-Nullmutanten dieselben Beeinträchtigungen in der LTP zeigen (Korte et al. 1995, Huang et al. 1996, Patterson et al. 1996).

Neueste Daten legen zudem den Schluss nahe, dass Neurotrophine eine vielversprechende Möglichkeit bieten den pathologischen Verläufen bei neurodegenerativen Erkrankungen entgegenzuwirken. Beispielsweise zeigt sich der Level von BDNF in postmortalen Alzheimergehirnen stark erhöht (Durany et al. 2000), was die Autoren dahingehend interpretieren, dass der Verlust der Neuronen durch BDNF Überexpression verlangsamt und/oder kompensiert werden soll. Die Applikation von Neurotrophinen hat auch bei einem Rattenmodell von Morbus Huntington protektive Effekte für striatale Neuronen gezeigt (Perez-Navarro et al. 2000) und vor den Hintergrund der erst kürzlich postulierten neuroprotektiven Rolle von *tPA* in Morbus Alzheimer (Tucker et al. 2000) zeigen die in

vorliegender Arbeit gewonnen Daten möglicherweise einen ersten Zusammenhang dahingehend, dass Neurotrophine ihre vielfältigen Wirkungen unter anderem über *tPA* vermitteln.

Die Neurotrophine NGF, BDNF und NT-4 induzieren die *tPA* Expression in unterschiedlicher, zeitlicher Abhängigkeit. Spezifische, neurotrophin-responsive Regionen auf dem *tPA* Promotor konnten nicht identifiziert werden, jedoch ist eine physiologische Relevanz der Befunde in Prozessen der neurozellulären Reorganisation zu sehen. Für eine darüber hinausgehende Beteiligung der Genregulation von *tPA* durch Neurotrophine an neurodegenerativen Erkrankungen wie Parkinson oder Alzheimer gibt es zwar erste Hinweise, jedoch kann zum gegenwärtigen Zeitpunkt darüber nur spekuliert werden.

9.3 Eine funktionelle NF- κ B Erkennungssequenz reguliert die Transkription von *tPA*

Die Footprint-Analysen zeigten in den neuronalen Zelllinien KELLY und SNB-19 jeweils einen schwach geschützten Bereich 3081 bp oberhalb des Transkriptionsstarts (**Abb. 7.2**, Position 6498, vgl. Anhang). Der Sequenzabgleich mit der *TransFac*-Datenbank bestätigte ein für die Mitglieder der Rel/NF- κ B Familie (p65, c-REL, RelB, p50, p52) responsives DNA-Element mit einer Übereinstimmung von 90-100 % (s. Footprint B). Die Tatsache, dass der Footprint im Vergleich zu vielen anderen in dieser Arbeit gefunden nur schwach ausgeprägt ist, korreliert mit den Erkenntnissen über die Rel/NF- κ B Familie, nach denen die verschiedenen Mitglieder, an ihre Inhibitoren gebunden, fast ausschließlich im Zytosol vorliegen und erst nach Aktivierung in den Kern wandern (Review: Foo & Nolan 1999), um dort als Homo- oder Heterodimere an die DNA zu binden. NF- κ B wird durch eine Reihe von Substanzen stimuliert (Thanos & Maniatis 1995, Baeuerle & Baltimore 1996) und für die weiteren Untersuchungen in dieser Arbeit wurde PMA (Phorbol-12-myristat-13-acetat) als ein besonders starkes Stimulans verwendet, mit dem schon früher NF- κ B in Neuronzellen induziert worden ist (Körner et al. 1994). Die sukzessive Verlängerung der Promotor-Reportergenkonstrukte in den Transaktivierungsassays zeigte bei PMA Applikation beim Übergang von -3000 bp auf -3200 bp einen sehr starken Anstieg der Reportergenaktivität (**Abb. 8.1**, **Abb. 8.2**). Hatte PMA vom Transkriptionsstart aus gesehen den Promotor bis zu einer Länge von -3000 bp etwa 4fach stimuliert, so stieg die Reportergenaktivität bei der weiteren Verlängerung um 200 bp auf das über 13fache (SNB-19, **Abb. 8.1**) bzw. das 10-

12fache (KELLY, **Abb. 8.2**) an, bezogen auf die unbehandelten Konstrukte. Auch unbehandelt konnte die vor die konstitutiv aktiven Vektoren pGL3-Control und pRL-SV40 klonierte NF- κ B Erkennungssequenz die Aktivität derselben um den Faktor 2-2,5 steigern (**Abb. 8.3**), was die Enhancereigenschaft dieses Sequenzabschnitts zeigt. Aufgrund des fast punktsymmetrischen Aufbaus der Erkennungssequenz (bezogen auf den Gegenstrang, NF- κ B bindet nur die GC reichen Ränder der Erkennungssequenz) konnte auf ein reverses Klonieren in die andere Richtung verzichtet werden, was normalerweise erst die Enhancereigenschaften bestätigt. Der unmittelbar vor die konstitutiv aktiven Reporter-genvektoren pGL3-Control und pRL-SV40 klonierte Promotorbereich aus dem Footprint B (**Abb. 7.2**) (inklusive der NF- κ B Erkennungssequenz) konnte die Reporter-genaktivität nach Applikation von PMA allein auf den 7-8fachen (KELLY) bzw. 8-9fachen Wert (SNB-19) der Leervektoren induzieren (**Abb. 8.4**). Deletionsmutanten der NF- κ B Sequenz zeigten weder die vorher beobachtete Enhancereigenschaften, noch zeigten sie die enorme Steigerung der Reporter-genaktivität bei der Applikation von PMA, weder in den Volllänge-promotor- (Rückgang auf die etwa 4fache, sequenzlängenunspezifische Induktion) noch in den konstitutiv aktiven Reporter-genkonstrukten (**Abb. 8.4**, Rückgang auf Leervektoraktivität). PMA wirkt unter anderem dadurch, dass es Proteinkinase C aktiviert (Schrezenmeier et al. 1986), ein Enzym, das vielfältige Wirkungen auf eine große Zahl von an der Transkription beteiligten Faktoren hat. Phorbol-ester bewirkt so z. B. eine Stimulation von AP-1 (Angel et al. 1987, Lee et al. 1987), dessen Erkennungssequenz viermal in den ersten 2000 bp des *tPA* Promotor vorhanden ist (**Tab. 4.3**) und was möglicherweise mit der Grund für die scheinbar sequenzlängenunspezifische Stimulation der *tPA*-Reporter-genkonstrukte bis zu einer Promotorlänge von -3000 bp ist. Die Daten aus den durchgeführten Transaktivierungsassays können wegen der bereits angesprochenen analytischen Probleme dieses Experimenttyps nicht allein gültige Aussagen zur Genregulation von *tPA* machen, jedoch basierend auf den Ergebnissen des *in vivo* Footprints zeigen die Daten insgesamt, dass sich -3081 bp oberhalb des Transkriptionsstarts eine *in vivo* funktionelle NF- κ B Erkennungssequenz befindet, die durch PMA stimulierbar ist. Vermutlich ließe sich der Footprint noch deutlicher zeigen, wenn die Zellen vorher noch mit PMA behandelt würden, aber da das *in vivo* Footprint-Experiment keine falsch-positiven Ergebnisse produzieren kann (s. Diskussion dort), ist die Aussagekraft der hier gewonnenen Daten zweifelsfrei gegeben. Ob es sich bei dem Transkriptionsfaktor, der letztlich zu einem Footprint geführt hat, aber wirklich um einen Vertreter der Rel/NF- κ B handelt, kann zukünftig nur ein Gelsupershift (EMSA) mit den entsprechenden Antikörpern klären, obwohl sich auch hier wieder eine *in vitro/in vivo* Relevanzproblematik ergibt. Die

Induktion durch PMA und die sehr hohe Sequenzhomologie zu publizierten NF- κ B Erkennungssequenzen von 90-100 % machen es aber äußerst wahrscheinlich, dass NF- κ B der in diesem Fall wirksame Transkriptionsfaktor ist.

NF- κ B wurde zuerst als Schlüsselregulator im Immunsystem identifiziert, wo er als Transkriptionsfaktor die Expression von Zytokinen reguliert und Lymphozyten aktiviert (Gerondakis et al. 1998, Review: Hatada et al. 2000). Die letzten Jahre haben aber gezeigt, dass NF- κ B auch bei anderen wichtigen Prozessen, wie z. B. der Apoptose und der Zelldifferenzierung eine bedeutende Rolle spielt (Foo & Nolan 1999, Gugasyan et al. 2000, Foehr et al. 2000, Guttridge et al. 2000, Denk et al. 2000). Als besonders interessant stellt sich NF- κ B als Regulator von *tPA* im Zusammenhang mit den Signalwegen über *RAGE* (Receptor for advanced glycation end products) heraus. *RAGE* ist ein Multiliganden-Rezeptor (Schmidt et al. 1992, Neeper et al. 1992), der neben β -Amyloid Peptiden das 30 kDa Protein Amphoterin/HMG1 bindet und so NF- κ B aktiviert (Yan et al. 1994 & 1996, Hori et al. 1995). Amphoterin wurde schon früh als bedeutend in Prozessen des neuronalen Auswachsens von kortikalen Neuronen im sich entwickelnden Gehirn erkannt (Hori et al. 1995, Rauvala et al. 1987 & 1988) und wechselwirkt mit *tPA* und Plasminogen an der Zelloberfläche von Neuronen, wo es *tPA* und Plasminogen stark aktiviert (Parkkinen et al. 1991 & 1993).

Auf der anderen Seite wurde HMG1 aber auch als Koaktivator für NF- κ B beschrieben, der zwischen den Dimerpartnern das AT reiche Zentrum der NF- κ B Erkennungssequenz besetzt (Thanos & Maniatis 1992). Amphoterin und *RAGE* sind mit *tPA* an den äußersten Enden wachsender Neuriten kolokalisiert (Hori et al. 1995, Parkkinen et al. 1993) und die Unterbrechung des Amphoterin/*RAGE* Signaltransduktionswegs in Mutanten mit deletierter zytoplasmatischer Domäne von *RAGE* unterbindet die Aktivierung von NF- κ B, verhindert neuritisches Wachstum (Huttunen et al. 1999) und unterdrückt die Metastase und das Wachstum von Tumoren (Taguchi et al. 2000). Da diese Prozesse auf einer proteolytischen Aktivität von Enzymen wie *tPA* basieren, ist die zukünftige Erforschung der Regulation von *tPA* über die Steuerung durch Amphoterin/*RAGE* und NF- κ B besonders interessant hinsichtlich eines möglichen therapeutischen Nutzens in der Krebstherapie.

Eine weitere, nicht minder interessante Fragestellung ergibt sich aus den Tatsachen, dass an *RAGE* bindende β -Amyloid Peptide auch NF- κ B zu aktivieren vermögen (Yan et al. 1996) und proinflammatorische Signaltransduktionswege regulieren, die zur Aktivierung von

Mikrogliazellen bei Morbus Alzheimer führen (Du et al. 1997, Meda et al. 1995). Aggregierte β -Amyloid Peptide aktivieren auch *tPA* im neuronalen Gewebe von Alzheimer Patienten (Tucker et al. 2000) und aktivierte Mikrogliazellen exprimieren *tPA* (Tsirka et al. 1995). Möglicherweise ist die auf dem *tPA* Promotor liegende NF- κ B Erkennungssequenz in diesem Zusammenhang von besonderer Bedeutung und ist möglicherweise für die Expression von *tPA* und die daraus resultierenden neuroprotektiven Effekte bei Morbus Alzheimer (Tucker et al. 2000) verantwortlich.

Der *tPA* Promotor besitzt 3081 bp oberhalb des Transkriptionsstarts (**Abb. 7.2**) eine funktionelle NF- κ B Erkennungssequenz mit einer Sequenzhomologie von 90-100 % verglichen mit den publizierten Erkennungssequenzen der Mitglieder der Rel/NF- κ B Familie. Diese Erkennungssequenz besitzt Enhancereigenschaften und lässt sich durch Phorbolster stark stimulieren. Ihr kommt in Verbindung mit dem Amphoterin/RAGE Signaltransduktionsweg und der sich daraus ergebenden Rolle beim neuronalen Wachstum, Tumorstadium/-metastase sowie einer neuroprotektiven Wirkung des *tPA*/Plasminogen-Systems bei Morbus Alzheimer ein besonderes Interesse zu, und es unterstreicht die Bedeutung ihrer zukünftigen, genaueren Untersuchung.

9.4 Erkennungssequenzen multipler Transkriptionsfaktoren

Neben der näher untersuchten NF- κ B Erkennungssequenz zeigten die *in vivo* Footprints eine Reihe anderer geschützter DNA-Sequenzbereiche, die mit den Erkennungssequenzen verschiedener Transaktivierungsfaktoren übereinstimmen (core-similarity ≥ 90 %, matrix-similarity ≥ 85 %). Die identifizierten Erkennungssequenzen der Transkriptionsfaktoren sind im Ergebnisteil alphabetisch (**Tab. 4.3**) und nach Positionen auf dem *tPA*-Promotor aufgelistet (**Tab. 4.2**).

Oberhalb des Transkriptionsstarts befinden sich vier AP-1 Erkennungssequenzen. AP-1 ist ein für die Expressionskontrolle vieler Gene bedeutender nukleärer Transkriptionsfaktor, der entweder aus zwei *Jun*-Peptiden oder einem *Jun/Fos* Heterodimer bestehen kann. Seine Bildung wird beispielsweise durch Phorbolster stimuliert (Angel et al. 1987, Lee et al. 1987) und durch Glukokortikoide herunterreguliert (Jonat et al. 1990).

Des Weiteren sind vier AP-4 Erkennungssequenzen im unmittelbar proximalen Promotorbereich vorhanden, wobei eine den direkten Transkriptionsstart markiert. AP-4 wird ubiquitär exprimiert und ist vor allem für seine synergistische Wechselwirkung mit AP-1 bekannt (Mermod et al. 1988) sowie z. B. als Ligand für E-Box Elemente des Immunoglobulin- κ Promotors (Aranburu et al. 2001).

Brn2 ist ein Faktor, der für Zellen neuronalen Ursprungs wichtig ist, die Oxitocin, Arginin-Vasopressin und das Corticotropin-releasing Hormon (CRH) sekretieren (Acampora et al. 1999).

NF-1 erkennt neben seinen Erkennungssequenzen auch die CAAT Box (Jones et al. 1987) und ist schon früh als bedeutend für die Kontrolle viraler Promotoren beim Menschen erkannt worden (z. B. Hennighausen et al. 1986), ist aber auch bei menschlichen Genen, wie z. B. dem Wachstumshormogen regulatorisch aktiv (Courtois et al. 1990). Die NF-1 Sequenz an Position 9380 (-199 bp) wurde schon *in vitro* für *tPA* der Ratte beschrieben (Ohlsson et al. 1993) und ist damit auch für den Menschen *in vivo* bestätigt, was vorher *in vitro* nicht gelungen war (Holmberg et al. 1995).

Die geschützte Erkennungssequenz des proto-Onkogens c-MyB (CMYB) ist im Licht der proteolytischen Aktivität von *tPA* und seiner Bedeutung in Prozessen der Matrix-Degradierung und Zellmigration besonders interessant. C-MyB bindet sequenzspezifisch an DNA und ist in T-Lymphozyten verantwortlich für die G1/S Transition (Venturelli D et al. 1990).

Die CREB-like Sequenz an Position 9356 beinhaltet die bereits erwähnte G→A Substitution in der Konsensussequenz TGACGTCA (Holmberg et al. 1995) und ihr Footprint ist, obwohl ihre Funktionalität im menschlichen Gewebe *in vitro* als schwach beschrieben wurde (Ohlsson et al. 1993, Holmberg et al. 1995), in allen getesteten Zelllinien stark ausgeprägt (**Abb. 7.8**), was auf eine relativ starke Wechselwirkung von DNA und Transkriptionsfaktor schließen lässt.

Die drei identifizierten Delta-EF1 Erkennungssequenzen liegen innerhalb der ersten 2500 bp oberhalb des Transkriptionsstarts. Delta-EF1 wurde als Repressor der durch E2 Boxen

(CACCTG) regulierten Genexpression von verschiedenen Basic Helix-Loop-Helix Aktivatoren identifiziert (Sekido et al. 1994).

Der Faktor E47 ist bekannt aus der Transkriptionskontrolle des Immunoglobulins (schwere Kette) in Keimzellen und hyperphosphoryliert MyoD bei Assoziation mit demselben (Schlissel et al. 1991).

Der Transkriptionsfaktor Gfi-1 fungiert als Repressor der Transkription und wurde zuerst in der Ratte beschrieben (Zweidler-McKay et al. 1996).

GKLF (gut-enriched Kruppel-like factor) ist ein kürzlich entdeckter Zink-Finger Transkriptionsfaktor, der bei der Entwicklung des Darms regulatorisch wirksam wird und in Verbindung mit der Entstehung und Entwicklung von Darmtumoren gebracht wird (Ton-That et al. 1997). Er ist bei Zellen, die in im Wachstumszyklus arretiert sind überexprimiert und nahezu undetektierbar in proliferierenden Zellen (Shields JM et al. 1996), was im Lichte der Bedeutung von *tPA* für Prozesse der Metastasis und Zellmigration (s. o.) besonders interessant ist.

Die Footprints der HFH Transkriptionsfaktorfamilie zeigen als Gemeinsamkeit keine geschützte Core-Basen, was aber hinsichtlich der Relevanz dieser Ergebnisse keinen Schluss zulässt (s. Experimentelle Methodik). HFH Transkriptionsfaktoren wurden zunächst bei der Regulation von Genen in der Leber identifiziert und sind in der Embryogenese von *Drosophila* und *Xenopus* von Bedeutung (Clevence et al. 1993) ähnlich der Rolle von *tPA* in der Humanen Embryogenese (Theuring et al. 1995). Zu den leberspezifischen Transkriptionsfaktoren wird auch die HNF-3 Gruppe von Transkriptionsfaktoren gezählt (Lai et al. 1990), die in den Footprint-Experimenten ebenfalls keine geschützte Core-Base zeigte.

Die Familie der Ikaros-Transkriptionsfaktoren (IK-1 & IK-2) ist als essentiell für die Entwicklung von Lymphozytenabkömmlingen beschrieben worden (Molnar et al. 1994) und zeigt im Footprint (an Position 9320 befindet sich ein sog. „direct repeat“) auch deutlich geschützte Core-Basen, was auf eine deutliche Relevanz für die Transkriptionskontrolle von *tPA* hinweist.

LMO2COM, das auch unter den Synonymen LIM-only protein 2, RBTN2, Rhombotin-2 und TTG-2 bekannt ist, wurde schon im Zusammenhang mit der erythroiden Differenzierung als regulatorisch bedeutend identifiziert (Osada et al. 1995).

Der myogene Transkriptionsfaktor MyoD ist im Zusammenhang mit myc-homologen Erkennungssequenzen bei der Differenzierung von Fibroblasten in Myoblasten schon früh als bedeutend erkannt worden (Tapscott et al. 1988).

NFAT (nuclear factor of activated T-cells) ist ein Transkriptionsfaktor, der bei der Aktivierung von T-Zellen eine bedeutende Rolle spielt (Northrop et al 1994). Eines der NFAT responsiven Elemente (**Abb. 7.6**, Position: 8782, bzw. -797 bp) liegt auf dem Gegenstrang genau sechs Basenpaare unterhalb einer NFAT Erkennungssequenz auf dem kodierenden Strang, die aufgrund des Primerdesigns (Primer hybridisieren nur gegen den Gegenstrang, s. *in vivo* Footprinting in Material und Methoden) nicht im Footprint-Experiment identifiziert wurde. Beide NFAT Elemente bilden ein punktsymmetrisches „inverted repeat“ und für die erste NFAT Erkennungssequenz (kodierender Strang) wurde gerade kürzlich eine Verantwortlichkeit für die Gewebespezifität der Expression von *tPA* in der medialen *Habenula* bei transgenen Mäusen postuliert (Hong et al. 2001, im Druck). Die deutlich geschützten Basen dieses „inverted repeat“ machen die *in vivo* Relevanz von *tPA* als Target von NFAT hinsichtlich der gewebespezifischen Expression von *tPA* deutlich. Weiterhin ist NFAT auch im Zusammenhang mit Calcineurin vermittelter Reaktionen des Immunsystems und im *Hippocampus* für die synaptische Aktivität, für die Steuerung axonalen Wachstums und beim Lernen und der Erinnerungsbildung von Bedeutung (Review: Crabtree 2000). In diesem Licht ist die weitere Untersuchung der NFAT Erkennungssequenzen, deren *in vivo* Relevanz in der vorliegenden Arbeit bewiesen wurde, und ihr Einfluss auf die *tPA* Expression von gesteigertem Interesse.

Oct-1 (octamere binding factor) ist Bestandteil der Polymerase II und III Systeme und wurde bereits intensiv untersucht (Murphy et al. 1989, LeBowitz et al. 1988). Der Footprint zeigt keine geschützten Core-Basen, sondern nur ein Guanosin in der Erkennungssequenzmatrix. SOX-5 wurde als ein für die Spermatogenese wichtiger Transkriptionsfaktor zuerst in post-meiotischen Keimzellen entdeckt, wobei die höchsten Level in den sog. Runden Spermatiden gefunden wurden (Denny et al. 1992).

Zwei deutlich geschützte SP-1 Footprints (**Abb. 7.9**) befinden sich innerhalb der ersten 100 bp oberhalb des Transkriptionsstarts und bestätigen *in vivo* vormals *in vitro* gewonnene Ergebnisse (Medcalf et al. 1990, Darrow et al. 1990) über eine Interaktion dieser GC-reichen DNA-Abschnitte mit nukleären Faktoren. SP-1 kann zudem auch eine hochspezifisch kooperative Wirkung zusammen mit NF- κ B erzielen (Majello et al. 1994). Untersuchungen, ob dies auch der Fall bei der *tPA* Expression ist, wurden im Rahmen dieser Arbeit nicht durchgeführt, zeigen aber eine interessante Richtung für zukünftige Forschungen auf.

SRY (sex-determining region Y gene product oder testis-determining factor) spielt bei der Ausprägung des sexuellen Phänotyps eine Rolle (Pontiggia et al. 1994), zeigte im Footprint aber nur geschützte Matrixbasen und kein deutlichen Footprint der Core-Basen.

TCF11 gehört zu der Familie der TCF Transkriptionsfaktoren, die im Zusammenhang mit der Transkription in T-Lymphozyten beschrieben wurde und der den T-Zellrezeptor *Calpha* aktiviert (Van de Wetering et al. 1991).

USF (upstream stimulatory factor) ist ein Transkriptionsfaktor, der mit den Faktoren TFII-I und TFIID interagiert (Sawadogo 1988, Roy et al. 1991).

Neben den in der *TransFac 4.0*-Datenbank identifizierbaren Erkennungssequenzen ergaben die Footprint-Experimente auch noch eine Reihe von unbekanntem Sequenzabschnitten, die in der vorliegenden Arbeit mit „NEW“ bezeichnet wurden (gelb hinterlegt, z. B. Footprint E, **Abb. 7.5**). Die Fülle der Daten zeigt, dass die Transkription von Genen viel komplexer gesteuert wird als in der Vergangenheit vermutet werden konnte. Damit unterstützen die Ergebnisse in dieser Arbeit die Schlussfolgerungen über die Komplexität der Wechselwirkungssysteme in der Biologie des menschlichen Körpers, die sich aus der kürzlich abgeschlossenen Entschlüsselung des menschlichen Genoms ergeben (*Nature* 15. Feb. 2001 und *Science* 16. Feb. 2001).

Die große Zahl an mit der DNA wechselwirkenden Proteine mag überraschen, ist jedoch im Licht einer genaueren Betrachtung im Rahmen des Erwarteten, wenn man beispielsweise die komplexe transkriptionelle Kontrolle der Immunoglobulin-Gene durch eine Vielzahl von Transkriptionsfaktoren als Vergleich heranzieht (Staudt LM & Lenardo MJ 1991, **Abb. 9.1**)

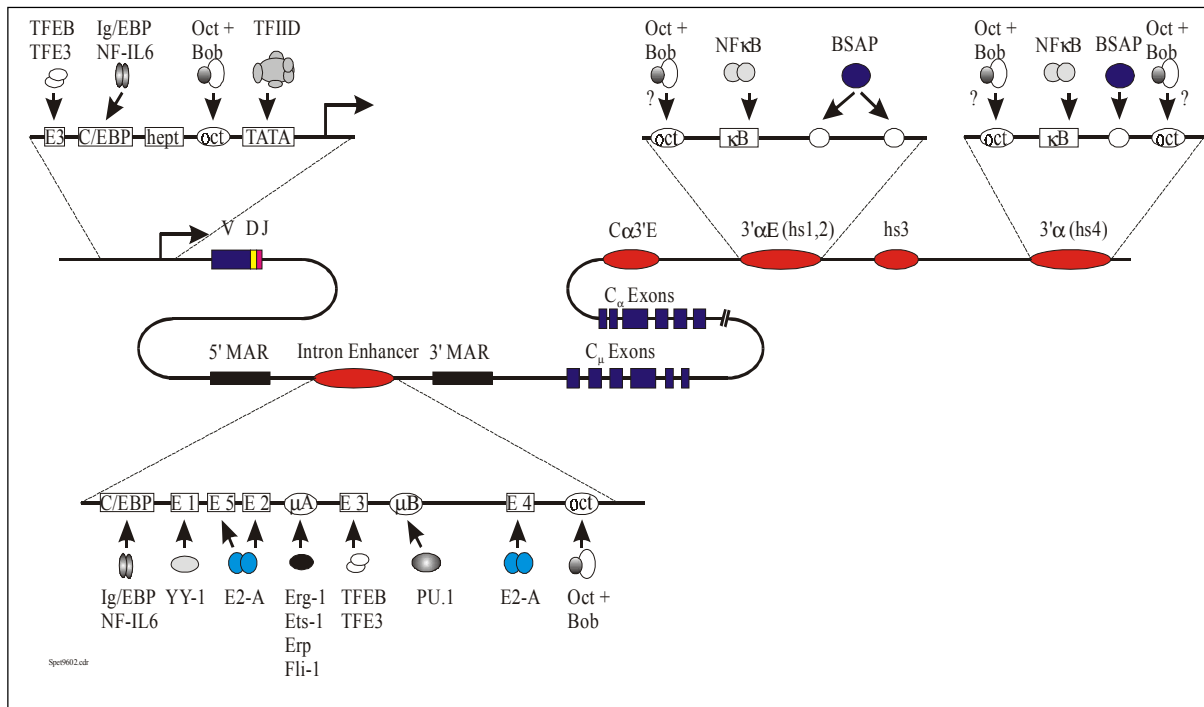


Abbildung 9.1: Transkriptionelle Kontrolle des Immunglobulin-μ Gens (schwere Kette).
 Mit freundlicher Genehmigung von Prof. H. G. Klobeck, Adolf-Butenandt-Institut, LMU München.

Die Transkriptionskontrolle von *tPA* ist komplex gesteuert. In vorliegender Arbeit wurden von den DNaseI hypersensitiven DNA-Regionen aus Kapazitätsgründen nur diejenigen näher untersucht, die im Bereich des Promotors lagen. Die Untersuchung der regulatorischen Regionen im ersten und dritten Intron bleibt daher der nachfolgenden Forschung überlassen.

Neben einigen Repressor-Erkennungssequenzen (Delta-EF1 und Gfi-1) innerhalb der ersten 2500 bp oberhalb des Transkriptionsstarts zeigen die Ergebnisse die Interaktionen einer Reihe von Erkennungssequenzen wahrscheinlich mit den jeweiligen Transkriptionsfaktoren (prognostiziert aus den hohen Core- und Matrix-Homologien von > 90 % bzw. > 85 %). Vorangegangene *in vitro* Ergebnisse (z. B. CREB-like, NF-1, SP-1) konnten *in vivo* bestätigt werden und eine Reihe bisher unbekannter Erkennungssequenzen weisen eine vorher nicht beobachtete DNA/Protein-Wechselwirkung mit eindeutiger *in vivo* Relevanz auf. Viele der identifizierten Erkennungssequenzen korrespondieren mit Transkriptionsfaktoren, die in der Entwicklung und Differenzierung von Zellpopulationen eine wichtige Rolle spielen und die Bedeutung der *tPA* Expressionskontrolle in vielen Bereichen der humanen Zellbiologie unterstreichen.