

Aus dem Institut für Immunologie der Ludwig-Maximilians-Universität München

Vorstand: Prof. Dr. rer. nat. Thomas Brocker

Die genomische Organisation und transkriptionelle Regulation des Transkriptionskorepressors Nab2

Dissertation

zum Erwerb des Doktorgrades der Medizin

an der Medizinischen Fakultät der

Ludwig-Maximilians-Universität zu München

Vorgelegt von
Marco Gerlinger

aus
Ochsenfurt

2006

Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät
der Universität München

1. Berichterstatter:	Prof. Dr. Judith P. Johnson. PhD
2. Berichterstatter:	Prof. Dr. P.B. Becker
Mitberichterstatter:	Priv. Doz. Dr. S. Schnittger Priv. Doz. Dr. U. Wintergerst
Dekan:	Prof. Dr. med. D. Reinhardt
Tag der mündlichen Prüfung:	26.01.2006

1	EINLEITUNG	1
1.1	DAS MELANOM	1
1.2	DER TRANSKRIPTIONELLE KOREPRESSOR NAB2	1
1.3	DIE NAB2-EXPRESSION IM MELANOM	6
1.4	GRUNDPRINZIPIEN DER GENREGULATION	7
1.5	ZIELSETZUNG DER ARBEIT	12
2	MATERIAL	14
2.1	MATERIAL UND BEZUGSQUELLEN	14
2.1.1	<i>Zelllinien</i>	14
2.1.2	<i>Bakterienstämme</i>	14
2.1.3	<i>λ-Phagen-Bibliothek</i>	14
2.1.4	<i>Enzyme</i>	14
2.1.5	<i>Nukleinsäuren</i>	15
2.1.5.1	Plasmide	15
2.1.5.2	Primer	15
2.1.5.3	Sonstige Nukleinsäuren und Oligonukleotide	17
2.1.6	<i>Chemikalien</i>	17
2.1.7	<i>Radiochemikalien</i>	18
2.1.8	<i>Kommerzielle Analysensysteme und vorgefertigte Lösungen</i>	19
2.1.9	<i>Verbrauchsmaterial</i>	19
2.1.10	<i>Geräte</i>	19
2.2	MEDIEN	21
2.2.1	<i>Zellkulturmedien für humane Zelllinien</i>	21
2.2.2	<i>E. coli-Medien</i>	21
2.3	ALLGEMEINE PUFFER UND LÖSUNGEN	21
3	METHODEN	25
3.1	ARBEITEN MIT ZELLLINIEN	25
3.1.1	<i>Zellkultur</i>	25
3.1.2	<i>Kryokonservierung und Auftauen von menschlichen Zelllinien</i>	25
3.1.3	<i>Stimulation der Zellen mit Phorbol ester</i>	26
3.1.4	<i>Transiente Transfektion humaner Zelllinien</i>	26
3.1.5	<i>Reporterassays</i>	27
3.1.5.1	Transfektion von Luziferase-Reporterplasmiden	27
3.1.5.2	Bestimmung der Luziferaseaktivität in transfizierten Zelllinien	27
3.1.5.3	Normalisieren der Luziferaseassays durch eine Proteinbestimmung	28
3.1.5.4	Berechnung der relativen Luziferaseaktivität	28
3.1.5.5	Der Dual-Luciferase-Reporter-Assay™	29
3.2	ARBEITEN MIT <i>ESCHERICHIA COLI</i>	29
3.2.1	<i>Kultivierung von E. coli</i>	29
3.2.2	<i>Transformation von E. coli durch Elektroporation</i>	30
3.3	ARBEITEN MIT <i>λ-PHAGEN</i>	31
3.3.1	<i>Herstellung kompetenter E. coli für die Infektion mit λ-Phagen</i>	31
3.3.2	<i>Kultivierung von λ-Phagen auf 150 mm und 90 mm Kulturplatten</i>	31
3.3.3	<i>Konzentrationsbestimmung der λ-Phagen-Stammlösung</i>	32

3.4	MOLEKULARBIOLOGISCHE METHODEN	32
3.4.1	<i>Bearbeiten von Nukleinsäuren</i>	32
3.4.1.1	Phenol/Chloroform-Extraktion von DNS	32
3.4.1.2	Fällung von DNS mit Ethanol oder Isopropanol	33
3.4.1.3	Konzentrationsbestimmung von DNS/RNS-Lösungen	33
3.4.1.4	Isolierung von Nukleinsäuren	33
3.4.1.4.1	Mini-Präparation von Plasmid-DNS aus <i>E. coli</i>	33
3.4.1.4.2	Maxi-Präparation von Plasmid-DNS aus <i>E. coli</i>	34
3.4.1.5	Isolation von RNS aus humanen Zelllinien	35
3.4.1.6	Amplifikation von DNS mit der Polymerase-Kettenreaktion	37
3.4.1.7	Einfügen von DNS-Mutationen mit der Polymerase-Kettenreaktion	37
3.4.1.8	Restriktionsverdau von DNS	38
3.4.1.9	Dephosphorylierung linearer DNS-Fragmente	38
3.4.1.10	Ligation von DNS-Fragmenten	39
3.4.1.11	Agarose-Gelelektrophorese von Nukleinsäuren	39
3.4.1.12	Isolation von DNS aus Agarosegelen	40
3.4.2	<i>Klonierungen</i>	40
3.4.3	<i>Primerextensionsversuche</i>	42
3.4.3.1	Primerdesign für die Primerextensionsversuche	42
3.4.3.2	Radioaktive Markierung von Oligonukleotid-Primern mit ³² Phosphat	42
3.4.3.3	Die Primerextensionreaktion	43
3.4.3.4	Sequenzierung von DNS nach der Didesoxymethode	43
3.4.3.5	Auftrennung von DNS auf einem Polyacrylamidgel	44
3.4.4	<i>Southern-Blot</i>	45
3.4.4.1	Gelelektrophorese und Blotten der DNS	46
3.4.4.2	Herstellung der DNS-Sonde für Southern-Blot und λ -Phagen-Screening	46
3.4.4.3	Radioaktive Markierung der Hybridisierungssonde mit ³² Phosphat	47
3.4.4.4	Reinigen radioaktiv markierter DNS mit <i>NucTrap-Säulen</i> TM	47
3.4.4.5	Hybridisierung von Nukleinsäure-tragenden Membranen	48
3.4.5	<i>Screening der λ-Phagen-Bibliothek</i>	49
3.4.5.1	Herstellen von Abklatschmembranen von Phagenkulturen	49
3.4.5.2	Identifizierung und Isolierung von Phagenplaques	50
3.4.5.3	Herstellen größerer Mengen Phagenstammlösung	50
3.4.5.4	Präparation von λ -Phagen-DNS	51
3.5	COMPUTERANALYSEN	51
3.5.1	<i>Sequenzalignment von DNS-Sequenzen</i>	51
3.5.2	<i>CpG-Insel-Suche</i>	52
3.5.3	<i>Identifizierung putativer Promotoren und cis-regulatorischer Elemente</i>	52
3.5.4	<i>Nukleinsäuresequenz-Bearbeitung und Primerdesign</i>	52
4	ERGEBNISSE	53
4.1	ISOLIERUNG UND CHARAKTERISIERUNG DES HUMANEN NAB2-GENS	53
4.1.1	<i>Isolierung der genomischen Nab2-DNS aus einer λ-Phagen-Bibliothek</i>	53

4.1.2	<i>Southern-Blot-Analyse und Umklonierung der isolierten λ-Phagen-DNS</i>	53
4.1.3	<i>Sequenzierung der humanen Nab2-Klone</i>	55
4.1.4	<i>Die genomische Organisation des Nab2-Gens</i>	57
4.1.5	<i>Vergleich mit den Sequenzdaten aus dem Humangenomprojekt</i>	58
4.2	IN SILICO ANALYSE DER 5'-UNTRANSLATIERTEN REGION DES NAB2-GENS	59
4.2.1	<i>Identifizierung putativer Promotorregionen</i>	59
4.2.2	<i>Kartierung der 5'-Enden von ESTs und cDNS auf dem genomischen Klon</i>	61
4.2.3	<i>Identifizierung potentieller Bindestellen für Transkriptionsfaktoren</i>	62
4.2.4	<i>Zusammenfassung der in silico Analyse</i>	64
4.3	TRANSKRIPTIONSSTARTPUNKT-BESTIMMUNG DURCH PRIMER-EXTENSIONSANALYSEN	64
4.4	EXPERIMENTELLER NACHWEIS DER PROMOTORAKTIVITÄT DER NAB2-5'-REGION UND EINGRENZUNG DES PROMOTORS DURCH VERKÜRZUNGEN VOM 5'-ENDE	67
4.5	EXPERIMENTELLE ANALYSE DER REGULATION DES NAB2-PROMOTORS	71
4.5.1	<i>Vergleich der basalen Aktivität des Nab2-Promotors in Melanom- und Kolonkarzinomzelllinien mit dem Dual-Luciferase-Reporter-Assay™</i>	71
4.5.2	<i>Identifizierung der Nab2-Promotorelemente für die PMA-Induktion</i>	73
4.5.3	<i>Bedeutung des Egr1/-222-Elementes für die Induzierbarkeit von Nab2</i>	74
5	DISKUSSION	78
5.1	LOKALISATION UND CHARAKTERISIERUNG DER NAB2-TRANSKRIPTIONSSTARTPUNKTE UND DER NAB2-KERN-PROMOTORREGION	78
5.2	DIE AUSDEHNUNG UND BASALE AKTIVITÄT DES NAB2-PROMOTORS	84
5.3	DIE INDUKTION DES NAB2-PROMOTORS	88
5.4	SCHLUSSFOLGERUNG	92
6	ZUSAMMENFASSUNG	94
7	LITERATURVERZEICHNIS	96
8	LEBENS LAUF	106
9	DANKSAGUNG	108

Abkürzungen

Abb.	Abbildung
AP2	Aktivierungsprotein-2
AS	Aminosäure
ATG	Startkodon der Translation
ATP	Adenosintriphosphat
bp	Basenpaar
BSA	Rinder-Serumalbumin
cAMP	cyclisches Adenosin Monophosphat
cDNS	komplementäre Desoxyribonukleinsäure
CIP	intestinale Kälberphosphatase
cpm	gezählte radioaktive Zerfälle pro Minute
CREB/ATF6	Aktivierender Transkriptionsfaktor 6
ddNTPs	Di-Desoxyribonukleotide
dest.	destilliert
DPE	<i>Downstream</i> -Promotorelement
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNS	Desoxyribonukleinsäure
dNTPs	Desoxyribonukleotide
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
ESTs	<i>Expressed-Sequence-Tags</i>
HCl	Salzsäure
FasL	Fas-Ligand
FCS	fötales Kälberserum
g	Gramm
<i>g</i>	Erdbeschleunigung
Inr	Initiator
Kap.	Kapitel
kbp	Kilobasenpaar
kDa	Kilodalton
LB	<i>E. coli</i> -Medium
M	Molar
MED-1	Multiples-Startstellen-Element-1

Min	Minute
mM	Millimolar
mRNS	<i>messenger</i> RNS (Boten Ribonukleinsäure)
m/v	Masse pro Volumen (Gewichtsprozent)
Na	Natrium
NCD	<i>Nab-Conserved-Domain</i>
NF κ B	Nukleärer Faktor kappa B
NGF	Nervenwachstumsfaktor
OD	optische Dichte
PBS	<i>phosphate buffered saline</i>
PCR	Polymerase-Kettenreaktion
PDGF-A	Plättchenwachstumsfaktor-A
PEG	Polyethylenglykol
PFU	Plaque-bildende Einheiten
PMA	Phorbol-12-Myristat-13-Acetat
RREB1	Ras-bindendes Element 1
RT	Raumtemperatur
Sek	Sekunde
Sp1	Spezifitätsprotein-1
Std	Stunde
Tab.	Tabelle
TGF β	Transformierender Wachstumsfaktor β
TK	Thymidinkinase
tRNS	transfer RNS
U	Einheiten
Upm	Umdrehungen pro Minute
UTR	untranslatierte Region
v/v	Volumen pro Volumen (Volumenprozent)
w/v	Gewichtsprozent pro Volumen

Abkürzungen der Nukleotide

A	Adenin
C	Cytosin
G	Guanin
T	Thymin
U	Uracil
Y	Pyrimidin (C oder T)

1 Einleitung

1.1 Das Melanom

Hautkrebserkrankungen sind die häufigsten Krebserkrankungen beim Menschen (Hall et al., 1999). Besonders die Inzidenz des kutanen Melanoms, eines malignen Tumors der sich aus Melanozyten entwickelt, steigt steil an. Die konservative Therapie dieser Erkrankung hat dagegen über viele Jahre hinweg kaum Fortschritte gemacht (Tsao and Sober, 2005), so dass die Prognose für fortgeschrittene Melanome weiterhin sehr schlecht ist (McMasters et al., 1999). Trotz der enormen medizinischen Bedeutung dieses Tumors ist bis jetzt relativ wenig über die regulatorischen Signalwege und Netzwerke bekannt, deren Dysregulation zur malignen Transformation der Melanozyten führt. Dies ist umso erstaunlicher, weil die Vorläuferläsionen des Melanoms, die so genannten melanozytären Dysplasien, im Vergleich zu anderen Tumorentitäten gut zugänglich sind und in der Vergangenheit histopathologisch genau analysiert wurden. Dabei konnte z.B. eine sehr gute Korrelation der Tumordicke mit dem klinischen Verlauf gezeigt werden (Clark et al., 1984). Für die Entwicklung neuer therapeutischer Ansätze kann das Verständnis der für die Tumorentstehung wichtigen regulatorischen Signalwege von großer Bedeutung sein. Dies illustriert beispielsweise der Einsatz des Tyrosinkinaseinhibitors Imatinib-Mesylat (Glivec™) der das BCR-ABL-Fusionsprotein inhibiert und in der Therapie der chronisch myeloischen Leukämie eingesetzt wird (Druker et al., 2001).

1.2 Der transkriptionelle Korepressor Nab2

Das evolutionär hoch konservierte Gen Nab2 (NGFI-A *binding protein 2*) / Mader (*Melanoma associated delayed early response gene*) ist in Melanomen im Vergleich zu benignen Melanozyten stark überexprimiert (Kirsch et al., 1996). Die Expression des Nab2-Proteins konnte immunhistochemisch in 37 von 42 untersuchten (88%) Melanomen, aber nur in einem von sechs untersuchten benignen Nävi und nie in normalen epidermalen Melanozyten *in situ* nachgewiesen werden. Karzinome zeigen dagegen wesentlich seltener eine Überexpression von Nab2 (Magenkarzinom: 36% positiv, kolorektales Karzinom: 8% positiv) (Kramer, 2000). Nab2 ist damit eines der wenigen bekannten Gene, die mit der Transformation zum Melanom assoziiert sind.

Die Nab2-cDNS (GenBank Zugriffsnummer: NM_005967) konnte aus humanen cDNS-Bibliotheken isoliert und sequenziert werden. Die Analyse der davon abgeleiteten Aminosäuresequenz zeigte, dass es sich dabei um ein Protein mit 525 Aminosäuren und einem errechneten Molekulargewicht von 56,6 kD handelt. Außerdem konnte die Spleissvariante drop8 (GenBank Zugriffsnummer: AJ011081) identifiziert werden. Das Nab2-Protein hat 22 potentielle Phosphorylierungsstellen (Kramer, 2000). Außerdem konnten zwei potentielle nukleäre Lokalisationssignale und zwei prolinreiche Domänen mit mehreren S(T)PXX-Motiven (Suzuki, 1989) identifiziert werden. Diese Motive sind typischerweise in genregulatorischen Proteinen zu finden. Immunhistochemische Untersuchungen von Geweben und Zelllinien ergaben, dass es sich bei Nab2 um ein nukleäres Protein handelt (Kirsch et al., 1996).

Die Nab2-mRNS und das Nab2-Protein werden spezifisch in Melanomen überexprimiert, allerdings konnte auch in allen bislang mit der reversen Transkriptase-PCR getesteten humanen Zelllinien und Geweben eine geringe Menge Nab2-mRNS detektiert werden. Die Behandlung von Zellen mit Serum, Wachstumsfaktoren, Phorbol ester oder Stress führt zu einem schnellen und transienten Anstieg des Nab2-mRNS-Spiegels in allen getesteten Zelllinien (Kirsch et al., 1996; Svaren et al., 1996). Der mRNS-Spiegel erreicht zwei Stunden nach der Induktion sein Maximum (ca. das 10fache der Ausgangsmenge) und fällt innerhalb von sechs bis acht Stunden nach Induktion wieder auf den basalen mRNS-Spiegel ab. Voraussetzung für die Induktion der Nab2-mRNS ist eine intakte Proteinsynthese. Diese Kinetik klassifiziert Nab2 als *delayed early response*-Gen. Die Transkription dieser Gene benötigt die Proteinprodukte von *immediate early response*-Genen, die nach der Stimulation erst synthetisiert werden müssen (Lau and Nathans, 1991).

Die im Melanom beobachteten konstitutiv hohen Nab2-mRNS- und Proteinspiegel deuten darauf hin, dass das normalerweise streng durch Signale aus der Umgebung der Zelle regulierte Gen Nab2 in diesen Tumoren grundsätzlich dysreguliert ist. Diese Dysregulation scheint sehr charakteristisch für Melanome zu sein, so dass sie möglicherweise im Zusammenhang mit den besonderen Eigenschaften dieser Tumorentität, wie z.B. der frühen Metastasierung oder der hohen Chemotherapieresistenz im Vergleich zu Karzinomen (Tsao and Sober, 2005) steht.

Nab2 wurde in einem *Yeast-Two-Hybrid-Screening* als Egr1 (*Early Growth Response Gene 1*) / NGFI-A (*Nerve-Growth-Factor-Induced-Protein-A*) bindendes Protein identifiziert (Svaren et al., 1996). Weitere Untersuchungen zeigten, dass Nab2 außerdem an Egr2 und an Egr3 binden kann (Svaren et al., 1998). Diese beiden Gene gehören zur selben Zinkfinger-Transkriptionsfaktorfamilie wie Egr1.

Wie auch Nab2 kann Egr1 in allen Geweben durch eine Vielzahl externer Stimuli wie Wachstumsfaktoren (z.B. Nerven-Wachstumsfaktor (NGF)), Phorbol ester oder Stress induziert werden (Gashler and Sukathme, 1995). Es spielt eine wichtige Rolle bei der Transkriptionsinduktion vieler Gene (Adamson and Mercola, 2002; Liu et al., 2002; Milbrandt, 1987).

Die Transfektion von dominant negativen Egr1-Varianten zeigte, dass Egr1 für die Induktion von Apoptose durch erhöhte intrazelluläre Kalziumspiegel essentiell ist (Muthukkumar et al., 1995; Nair et al., 1997). Die Apoptoseinduktion über diesen Weg ist z.B. wichtig für die Rezeptor-induzierte Apoptose von Lymphozyten bei Entzug von Wachstumsfaktoren. Weitere Experimente haben gezeigt, dass die Kalzium-induzierte Apoptose nur durch die Egr1 vermittelte trans-Aktivierung des p53-Promotors möglich ist. Auch die p53 vermittelte Induktion der replikativen Seneszenz in primären kultivierten Zellen benötigt die Egr1-Expression (Krones-Herzig et al., 2003).

Dass Egr1 auch bei der Entstehung und Progression von Tumoren eine Rolle spielt, konnte an der humanen Fibrosarkomzelllinie HT1080 gezeigt werden. Diese Zelllinie exprimiert sehr wenig Egr1. Die experimentelle Überexpression von Egr1 durch die Transfektion dieser Zelllinie führt zur Verringerung der Wachstumsrate und der Tumorigenität *in vitro* und *in vivo* (Huang et al., 1995). Weiterhin konnte gezeigt werden, dass die Egr1-Expression eine erhöhte TGF β -Synthese hervorruft und die Expression des anti-apoptotischen Gens Bcl-2 verringert. Beides führt zu einem verringerten Tumorstadium (Huang et al., 1998; Liu et al., 1996). Dagegen war in dem gleichen Modellsystem der Verlust der Egr1-Expression mit dem gegenteiligen Effekt assoziiert: Proliferation und Tumorigenität stiegen an. Egr1 kann durch die Induktion von p21^{cip1}, einem Inhibitor der für die Zellzyklusprogression notwendigen Cyclin-abhängigen Kinasen, auch den Zellzyklus und damit die Zellproliferation hemmen (Ragione et al., 2003). Egr1 reguliert außerdem die Expression bestimmter Adhäsionsmoleküle (Liu et al., 1999). Deswegen könnte der Verlust von Egr1 auch

zum Anker-unabhängigen Wachstum von Zellen, einem typischen Kennzeichen von Tumoren (Hanahan and Weinberg, 2000), führen. Eine Verbindung zwischen Egr1-Verlust und der Tumorentstehung wird auch durch Beobachtungen in akuten myeloischen Leukämien vermutet. In diesen ist oft eine Region der genomischen zellulären DNS deletiert, die das Egr1-Gen enthält (LeBeau et al., 1993). Auch die stark verminderte Egr1-Expression in nicht-kleinzelligen Bronchialkarzinomen deutet darauf hin (Levin et al., 1995). Gegen einen simplen Zusammenhang zwischen niedriger Egr1-Expression und der Tumorentwicklung sprechen aber die Ergebnisse von Expressionsanalysen im Prostatakarzinom. Diese weisen in der Regel eine Egr1-Überexpression auf und die Egr1-Expression korreliert in diesen Tumoren mit dem Dedifferenzierungsstatus der Karzinomzellen (Eid et al., 1998). Außerdem haben Egr1 *knockout*-Experimente in Mäusen zu einer verringerten Fertilität der Weibchen (Lee et al., 1996; Topilko et al., 1998), aber nicht zu einer erhöhten Tumorzinzidenz geführt. In einem Prostatakarzinom-Mausmodell konnte bei gleichzeitiger Egr1-Defizienz auch eine verzögerte Progression von der intraepithelialen Neoplasie zum invasiven Prostatakarzinom gezeigt werden (Abdulkadir et al., 2001). Kürzlich haben zwei Studien an humanen Kolonkarzinomen und Magenkarzinomen gezeigt, dass Egr1 in diesen beiden Entitäten überexprimiert ist und das Ausmaß der Überexpression mit dem klinischen Stadium und somit mit der Progression dieser Tumoren korreliert (Kobayashi et al., 2002; Tsunoda et al., 2003). Diese Ergebnisse zeigen also, dass der Verlust von Egr1 alleine nicht für die Tumorentstehung ausreicht und der Transkriptionsfaktor nur ein Teil eines komplexen Regulationssystems ist.

Nab2 und das davor identifizierte Nab1 sind Korepressoren der Egr1-Wirkung (Svaren et al., 1996; Russo et al., 1995). Durch die Bindung an die hoch konservierte R1-Domäne des Egr1-Proteins inhibieren sie dessen transkriptionelle Aktivität an Egr1-stimulierbaren Promotoren. In den Nab1- und Nab2-Proteinen dienen die hoch konservierten *Nab-Conserved-Domains* 1 und 2 (NCD1 und NCD2) als Binderegion für Egr1 (Svaren et al., 1996). Mutationen dieser konservierten Domänen können zu einem Funktionsverlust und sogar zu dominant negativen Varianten durch Dimerisierung mit den Wildtyp-Nab-Proteinen führen (Svaren et al., 1998).

Im Gegensatz zu Nab1, das konstitutiv exprimiert ist, wird die Nab2-Expression durch die selben Stimuli induziert wie Egr1. Bemerkenswert ist, dass der Anstieg des Egr1-Spiegels immer von einer gesteigerten Transkription von Nab2 gefolgt wird (z.B.

Silverman et al., 1999; Qu et al., 1998). Wahrscheinlich ist Nab2 deswegen der wichtigste negative Regulator von Egr1. Kürzlich konnte gezeigt werden, dass die experimentelle Überexpression von Egr1 in der Maus-Neuroblastomzelllinie Neuro-2a ausreicht um einem Anstieg der Nab2-Expression herbeizuführen (Ehrenguber et al., 2000). Die physiologische Funktion von Nab2 in der Wachstums- und Differenzierungsregulation ist deswegen wahrscheinlich die Hemmung der Egr1-Aktivität im Rahmen einer negativen Rückkoppelungsschleife (z.B. Qu et al., 1998). So könnte Nab2 eine übermäßige Egr1-Aktivität nach externer Stimulation verhindern. Die Überexpression von Nab2, wie sie in Melanomen zu beobachten ist, könnte dazu führen, dass Egr1 seine Kontrollfunktion an vielen Zielgenen verliert. Kompliziert wird der Zusammenhang von Egr1 und Nab2 allerdings durch eine kürzlich identifizierte aktivierende Wirkung von Nab2 auf Egr1 am Fas-Liganden- (FasL) und am Luteinisierungshormon- β -Promotor (Sevetson et al., 2000). Bislang ist nicht bekannt, wie viele Promotoren Egr1-Bindestellen enthalten an denen die Egr1-Aktivität durch Nab2 gesteigert werden kann und welche Merkmale eines Promotors zu dieser Eigenschaft führen.

Mehrere Studien konnten einen Einfluss veränderter Nab2-Expressionsspiegel auf die Egr1-Funktion zeigen. Eine konstitutive Überexpression von Nab2 in PC12-Zellen verhindert die Egr1-abhängige NGF-induzierte Differenzierung (Qu et al., 1998). Außerdem konnte an humanen Zelllinien, die Nab2 stabil überexprimieren, gezeigt werden, dass die mit einem Egr1-induzierbaren Reportergenkonstrukt gemessene Egr1-Aktivität durch die Präsenz hoher Nab2-Spiegel abnimmt. Die Transfektion dieses Reporterkonstruktes in Karzinom- und Melanomzelllinien zeigte außerdem, dass die Egr1-Aktivität in den meisten Melanomzelllinien tatsächlich reduziert ist (Zimmermann, 2000).

Durch seine Interaktionsmöglichkeiten mit weiteren Transkriptionsfaktoren der Egr-Familie, hat Nab2 auch Einfluss auf andere wichtige Signalwege. Es inhibiert Egr2, das für die Gehirnentwicklung und die Myelinisierung peripherer Nerven wichtig ist (Schneider-Maunoury et al., 1993; Topilko et al., 1994) und Egr3, das bei der Aktivierung des FasL-Promotors (Li-Weber, 1999) und der Ausbildung von Muskelspindeln (Tourtellotte and Milbrandt, 1998) eine Rolle spielt. Egr2 und Egr3 werden ebenfalls hauptsächlich durch Wachstumsfaktoren induziert. Eine deregulierte Nab2-Expression könnte also auch die Funktion weiterer

Transkriptionsfaktoren beeinträchtigen und darüber die Differenzierung und Proliferation von Zellen über mehrere Wege beeinflussen.

Diese Charakteristika von Egr1 und Nab2 lassen Rückschlüsse auf die Bedeutung der Nab2-Überexpression in Melanomen zu. Durch die Hemmung der tumorsupprimierenden Aktivität von Egr1 könnte Nab2 zur malignen Transformation von Melanozyten beitragen. Die Inaktivierung von Egr1, das normalerweise durch eine Vielzahl extrazellulärer Stimuli induziert wird und so dazu beiträgt die Zelle an veränderte Umgebungsbedingungen anzupassen, würde die adäquate Reaktion von Zellen auf ihre Umgebung stören. Eine solche Unabhängigkeit von den Umgebungsbedingungen ist eine typische Eigenschaft von Tumorzellen. Schließlich würde auch der pro-apoptotische Effekt von Egr1 durch Nab2 gehemmt. Auch die Apoptoseresistenz gehört zu den typischen Eigenschaften von Tumorzellen (Hanahan and Weinberg, 2000).

1.3 Die Nab2-Expression im Melanom

Um die Bedeutung der Überexpression von Nab2 im Melanom zu verstehen ist es wichtig, sowohl die Funktion von Nab2 in dieser Tumorentität als auch die Ursachen für die Überexpression zu identifizieren.

Die Überexpression eines Proteins kann auf vier verschiedenen Ebenen der Genexpression verursacht werden: 1. Auf der Transkriptionsebene durch eine gesteigerte Produktion der mRNA im Zellkern. 2. Auf der Posttranskriptionsebene, durch gesteigerten mRNA-Export aus dem Zellkern oder eine erhöhte Halbwertszeit der mRNA. 3. Auf der Translationsebene durch die Regulation des Translationsprozesses (Dever, 2002). 4. Auf der Posttranslationsebene kann schließlich die Halbwertszeit des Proteins variiert werden (Lodish, 1999; Wagener, 1999).

In Melanomzellen ist nicht nur die Nab2-Proteinmenge, sondern auch die Nab2-mRNA-Menge stark erhöht. Außerdem ist die Nab2-mRNA-Halbwertszeit in Melanomzelllinien im Vergleich zu Kolonkarzinomzelllinien, die Nab2 nicht überexprimieren, unverändert (Kramer, 2000). Diese Ergebnisse zeigen, dass die Überexpression von Nab2 in Melanomen durch eine gesteigerte Transkription verursacht wird.

Dies könnte durch eine Veränderung der genomischen DNS-Abschnitte, welche die Nab2-Expression kontrollieren, verursacht sein. Beispielsweise sind Mutationen im Promotor, oder auch die Fusion des kodierenden Genanteiles an einen hochaktiven Promotor denkbar. Auch die Amplifikation des Gens ist möglich, so dass betroffene Zellen mehr als die bei einem diploiden Chromosomensatz typischen zwei Kopien des Gens enthalten. Andererseits kann die Überexpression aber auch durch eine gesteigerte Transkription an einem genetisch normalen Genlocus verursacht werden. Die Hypomethylierung genregulatorischer DNS-Abschnitte oder die Dysregulation von Transkriptionsfaktoren könnte zum Beispiel dazu führen. Im Folgenden werden kurz die grundlegenden Prinzipien der Genregulation erläutert, die für das Verständnis dieser Zusammenhänge wichtig sind.

1.4 Grundprinzipien der Genregulation

Mit Ausnahme mitochondrialer Gene werden proteinkodierende Gene in Eukaryoten von der DNS-abhängigen-RNS-Polymerase-II transkribiert (Lewin, 2000). Die Transkription wird durch das komplexe Zusammenspiel von cis-Elementen und trans-Elementen reguliert (Kadonaga, 2004). Als cis-Elemente werden regulatorische DNS-Sequenzen in der Umgebung des regulierten Gens bezeichnet. An diese können trans-Elemente, das sind lösliche Protein-Faktoren, binden und dadurch der Polymerase-II den Weg zum Transkriptionsstartpunkt weisen oder sie aktivieren. Trans-Elemente werden auch als Transkriptionsfaktoren bezeichnet. Die jeweils aus mehreren cis-Elementen zusammengesetzten (Kadonaga, 2004) regulatorischen DNS-Regionen werden in den Promotor, sowie *Enhancer* und *Silencer* eingeteilt (Strachan and Read, 1996). Der Promotor ist die regulatorische DNS-Region, welche die Transkription initiieren kann. Der Promotor eines Gens liegt üblicherweise innerhalb von 1.000 bp stromaufwärts vom Translationsstartpunkt (Zhang, 1998). Als *Enhancer* wird eine Gruppe von cis-Elementen bezeichnet, die die Transkription verstärken kann. Entsprechend kann ein *Silencer* die Transkription unterdrücken. Ein kleiner Abschnitt des Promotors, der so genannte Kernpromotor, spielt eine Schlüsselrolle für die Transkription (Novina and Roy, 1996). Er enthält den Transkriptionsstartpunkt und eine DNS-Region an die die Transkriptionsmaschinerie bindet. Die Transkriptionsmaschinerie wird aus multiplen Untereinheiten, den so

genannten allgemeinen Transkriptionsfaktoren und der eigentlichen DNS-abhängigen RNS-Polymerase-II, aufgebaut.

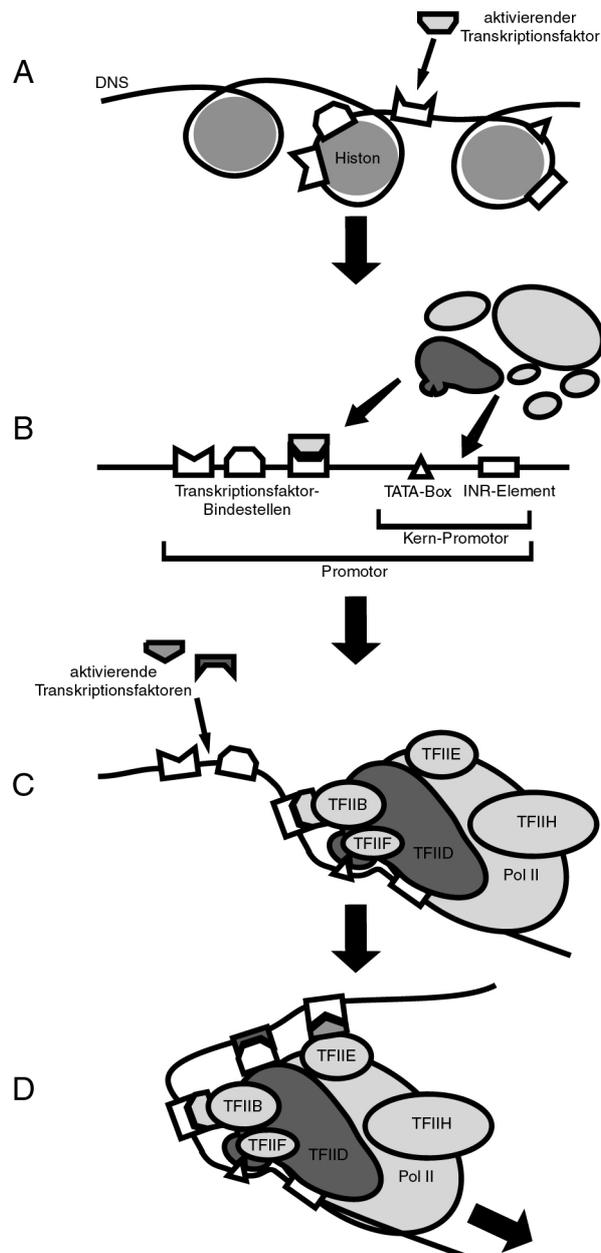


Abb. 1: Schematische Darstellung der Transkriptionsregulation an einem TATA-Box- und Inr-Element-Promotor. **A:** Die Anlagerung eines speziellen Transkriptionsfaktors an die kompaktierte DNS löst eine Verlagerung der Histone aus. Daran sind Chromatin-remodellierende-Proteine beteiligt, die nicht dargestellt sind. **B:** Die DNS befindet sich nun im permissiven Zustand, in dem sie für alle Transkriptionsfaktoren zugänglich ist. Allgemeine Transkriptionsfaktoren (TFIID, TFIIB, TFIIE, TFIIF) und die Polymerase-II (Pol II) können an den Kernpromotor binden. Der bereits an die DNS gebundene spezielle Transkriptionsfaktor begünstigt diese Anlagerung durch Interaktion mit TFIIB. **C:** Die Polymerase-II-Maschinerie ist vollständig an den Promotor gebunden. Zwei weitere spezielle Transkriptionsfaktoren binden an den Promotor. **D:** Die DNS-gebundenen Transkriptionsfaktoren geben der Polymerasemaschinerie durch direkte Interaktion das Startsignal für die Transkription. (Abbildung modifiziert nach Lemon and Tjian, 2000; Werner, 1999).

Der Kernpromotor liegt für alle von der Polymerase-II transkribierten Gene stromaufwärts vom Initiationskodon, meist innerhalb von 500 bp (Smale and Kadonaga, 2003). Vom Kernpromotor muss der Minimalpromotor unterschieden werden. Das ist der kleinste Sequenzabschnitt eines Promotors, der gerade noch in der Lage ist die Transkription zu initiieren. Er enthält in der Regel den Kernpromotor und meistens noch weiter stromaufwärts gelegene Promotorabschnitte.

Enhancer und *Silencer* können in unmittelbarer Nachbarschaft des Promotors liegen, aber auch bis zu mehreren 100 kbp von diesem entfernt (Levine and Tjian, 2003). Es sind auch Fälle bekannt, in denen *Enhancer* oder *Silencer* innerhalb der Introns eines Gens liegen (Lewin, 2000).

Chromosomale DNS liegt nicht nackt im Zellkern vor, sondern ist durch die als Histone bezeichneten Proteine im Chromatin organisiert. Darin ist die DNS um Nukleosomenkerne gewickelt, von denen jeder aus acht Histonen besteht (Richmond and Davey, 2003). Die im Chromatin kompaktierte DNS ist für die sehr große Transkriptionsmaschinerie nicht zugänglich und auch die meisten Transkriptionsfaktoren können unter diesen Bedingungen nicht an die DNS binden. Die Transkription ist in diesem Zustand also nicht möglich (Han and Grunstein, 1988). Er wird deswegen auch als restriktiver Grundzustand des Chromatins bezeichnet.

Die Organisation der chromosomalen DNS im Chromatin stellt das erste Hindernis für die Transkription eines Gens dar. Um den Promotor eines derart inaktivierten Gens für die Transkriptionsmaschinerie zugänglich zu machen, müssen bestimmte Transkriptionsfaktoren, die sich auch an kompaktierte DNS anlagern können, an die DNS binden. Diese Transkriptionsfaktoren rekrutieren dann so genannte Histon-modifizierende- und Chromatin-remodellierende-Proteine (Fry and Peterson, 2002), welche zu einer Lockerung der DNS-Nukleosomen-Bindung oder zur Verlagerung von Nukleosomen führen und damit die DNS zugänglich machen (Aalfs and Kingston, 2000) (Abb. 1 A und 1 B). Der so erreichte Zustand wird als permissiver Zustand für die Transkription eines Gens bezeichnet.

Die Polymerase-II-Transkriptionsmaschinerie ist ein Multiproteinkomplex mit einem Molekulargewicht von mehr als vier Megadalton (White, 2001). Sie besteht aus der eigentlichen DNS-abhängigen-RNS-Polymerase-II und den allgemeinen Transkriptionsfaktoren TFIID, TFIIB, TFIIE, TFIIIF und TFIIH (Woychik and Hampsey,

2002; Cosma, 2002). Die Anlagerung der Polymerase-II-Maschinerie an den Kernpromotor wird durch sequenzspezifische Bindung an die DNS, oft unter mithilfe bereits DNS-gebundener Transkriptionsfaktoren ermöglicht (Abb. 1 B). Am genauesten ist dieser Vorgang für die sequenzspezifische Bindung an die beiden klassischen Kernpromotorelemente, die TATA-Box und das Initiator-Element (Inr-Element) untersucht worden. Die TATA-Box ist nach ihrem typischen Sequenzabschnitt benannt und liegt 25 bis 30 bp stromaufwärts vom Transkriptionsstartpunkt (Breathnach and Chambon, 1981; Smale and Kadonaga, 2003). Die Konsensussequenz ist T A T A ^A/_T A A ^G/_A (Patikoglou et al., 1999). Diese Sequenz wird von der TATA-bindenden Untereinheit des allgemeinen Transkriptionsfaktors TFIID erkannt, woraufhin sich die gesamte Polymerasemaschinerie an die DNS anlagern kann. Die TATA-Box ist häufig in sehr streng regulierten Genen mit einer hohen maximalen Expressionsstärke zu finden (Smale and Baltimore, 1989; Azizkhan et al., 1993). Promotoren mit diesem Element haben typischerweise nur einen Transkriptionsstartpunkt. Die TATA-Box kann also die Polymerasemaschinerie sehr präzise auf dem Promotor positionieren.

Ein Inr-Element kann sowohl alleine, als auch zusammen mit einer TATA-Box im Kernpromotor vorkommen (Smale and Baltimore, 1989; Smale and Kadonaga, 2003). Es handelt sich dabei um ein sehr häufiges Kernpromotorelement mit der Konsensussequenz Y Y A N ^A/_T Y Y, dessen erstes Adenosin mit dem Transkriptionsstartpunkt übereinstimmt (Javahery et al., 1994). Funktionell hat das Inr-Element große Ähnlichkeit mit der TATA-Box, da es wie diese den Transkriptionsstartpunkt präzise festlegt. Wie die TATA-Box wird auch das Inr-Element von TFIID erkannt und gebunden (Smale and Kadonaga, 2003).

Ein weiteres Kernpromotorelement ist das so genannte *Downstream*-Promotor-Element (DPE), das nur in Promotoren mit Inr-Element vorkommt. Das DPE hat die Konsensussequenz ^A/_G G ^A/_T ^C/_T ^G/_A/_C und liegt genau 27 bis 31 bp stromabwärts von dem durch das Inr-Element definierten Transkriptionsstartpunkt. Auch an dieses Kernpromotorelement bindet TFIID (Burke et al., 1998; Kadonaga, 2002).

Neben Promotoren, die eines oder mehrere dieser Kernpromotorelemente aufweisen, wurde eine Vielzahl von Promotoren charakterisiert, die keines der bekannten Elemente enthalten. Diese werden als TATA- und Inr-lose Promotoren bezeichnet (Butler and Kadonaga, 2002; Smale and Kadonaga, 2003; Smale, 1997).

Sie liegen typischerweise in CpG-Inseln, das sind DNS-Abschnitte, die eine Vielzahl der ansonsten im Genom unterrepräsentierten CpG-Dinukleotide enthalten (Cross and Bird, 1995). Solche CpG-Inseln erstrecken sich über 0,5-2 kbp und sind 5' vom kodierenden Bereich mancher Gene lokalisiert (Butler and Kadonaga, 2002). Ein typisches Kennzeichen TATA- und Inr-loser Promotoren ist die Transkriptionsinitiation von vielen verschiedene Startpunkten aus. Ein solches Transkriptionsstartareal kann sich über mehr als 100 bp erstrecken (O'Hanlon and Miller, 2002; Song et al., 2001). Experimentell konnten in TATA- und Inr-losen Promotoren bislang keine spezifischen Sequenzelemente identifiziert werden, welche die Anlagerung der Polymerase-II-Maschinerie vermitteln. Allerdings enthalten die Promotoren in CpG-Inseln meist mehrere Bindestellen für den ubiquitären Transkriptionsfaktor Sp1 (Colgan and Manley, 1995; Chen et al., 1997). Die Transkriptionsstartstellen liegen oft 40-80 bp stromabwärts von diesen Sp1-Bindestellen (Suzuki et al., 2001). Deswegen wird vermutet, dass Sp1 die Transkriptionsmaschinerie in dieser Promotorklasse an die richtige Position dirigiert (Smale and Kadonaga, 2003). Weil die experimentelle Bestimmung der Transkriptionsstartpunkte und der Promotorausdehnung in TATA- und Inr-losen Promotoren schwierig ist und diese Promotoren nur wenige typische Konsenselemente besitzen, ist diese Promotorklasse bislang schlecht charakterisiert und das Verständnis ihrer Regulation ist lückenhaft (Lin et al., 2001).

Im Gegensatz zum Kernpromotor, der vor allem Bindestellen für allgemeine Transkriptionsfaktoren enthält, binden die stromaufwärts vom Kernpromotor gelegen Promotorabschnitte, wie auch *Enhancer* und *Silencer*, vorwiegend spezielle Transkriptionsfaktoren (Kadonaga, 2004). Diese Faktoren können transkriptionssteigernd, wie auch transkriptionssupprimierend wirken und werden demnach als Aktivatoren, beziehungsweise als Repressoren bezeichnet. Transkriptionsfaktoren vollziehen nach der Anlagerung an ihre Erkennungssequenz in der genomischen DNS eine Konformationsänderung. In der Regel können sie erst dadurch ihre Wirkung entfalten (Alvarez et al., 2003). Wie oben beschrieben, kann die Anlagerung eines Transkriptionsfaktors das Chromatin in den permissiven Zustand überführen oder auch die Polymerasemaschinerie an den Kernpromotor dirigieren (Abb. 1 A-B). Weitere Aktivatoren können sich dann an ihre Erkennungssequenzen anlagern (Abb. 1 C) und über direkten oder durch ein weiteres Protein vermittelten Kontakt mit der Polymerase-II-Maschinerie wird eine

Phosphorylierungsreaktion ausgelöst (Abb. 1 D). Dabei werden mehrere Phosphatgruppen an die C-terminale Domäne der RNS-Polymerase-II angelagert, woraufhin diese beginnt über die DNS zu gleiten und einen neuen RNS-Strang zu synthetisieren (Lewin, 2000).

Aktivatoren und Repressoren werden in der Regel präzise reguliert, um sicher zu stellen, dass in jedem Gewebe und in jeder Zelle nur die benötigten Gene transkribiert werden. Die Regulation solcher Transkriptionsfaktoren erfolgt sowohl durch die Regulation ihrer Synthese als auch durch die Regulation ihrer Degradation. Dies sind jedoch langsame Prozesse, die unzureichend sind wenn ein Transkriptionsfaktor Signale mit hoher Geschwindigkeit übertragen soll. Deswegen wird die Aktivität vieler Transkriptionsfaktoren zusätzlich durch kovalente Modifizierungen, wie zum Beispiel durch Phosphorylierung oder durch Botenstoffe wie z.B. Kalzium oder cAMP reguliert (Lodish, 1999).

Die Aktivität von Aktivatoren und Repressoren kann außerdem durch Kofaktoren, so genannte Koaktivatoren und Korepressoren moduliert werden. So kann zum Beispiel ein Aktivator (z.B. Egr1) durch einen an ihn gebundenen Korepressor (z.B. Nab2) unterdrückt werden.

Ein weiterer Mechanismus der Genregulation ist die DNS-Methylierung (Bird, 2002). Das Cytosin in einem CpG-Dinukleotid kann durch Methyltransferasen methyliert werden, was dazu führt, dass das entsprechende Gen nicht mehr transkribiert werden kann (Bird, 2002). In Tumorzellen konnte vielfach ein veränderter Methylierungszustand von Tumorsuppressorgenen und Onkogenen nachgewiesen werden. Tumorsuppressorgene sind dabei oft hypermethyliert und damit inaktiviert, Onkogene oft hypomethyliert und transkriptionell aktiv (Feinberg and Tycko, 2004; Herman and Baylin, 2003).

1.5 Zielsetzung der Arbeit

Nab2 wurde als Gen identifiziert, das in Melanomen im Vergleich zu normalen Melanozyten und benignen Nävi auf der Transkriptionsebene stark überexprimiert ist. Alle anderen bisher untersuchten Tumorentitäten zeigten dagegen keine Nab2-Überexpression. Nab2 scheint also für das Melanom eine besondere Bedeutung zu haben. Um die Grundlagen für das Verständnis der Dysregulation von Nab2 im

Melanom zu schaffen, sollte in der vorliegenden Arbeit die transkriptionelle Regulation der Nab2-Expression detailliert untersucht werden.

Zuerst sollte die genomische Nab2-DNS mit einem mindestens 1.000 bis 2.000 bp langen Abschnitt der 5'-untranslatierten Region aus einer genomischen DNS-Bibliothek isoliert werden. Um den Nab2-Promotor zu charakterisieren, sollte als nächstes der Transkriptionsstartpunkt durch Primerextensionsversuche bestimmt werden. Im Folgenden sollte die 5'-untranslatierte Region in Reporterplasmide kloniert und 5'-Verkürzungsvarianten hergestellt werden. In transienten Transfektionsversuchen in Melanom- und Nicht-Melanomzelllinien sollten dann die 5'- und 3'-Grenzen der Nab2-Promotorregion identifiziert werden.

Nab2 lässt sich *in vitro* durch den Phorbol-12-Myristat-13-Acetat (PMA), einem Aktivator der Proteinkinase-C, induzieren. In Transfektionsversuchen mit den Verkürzungskonstrukten sollte deswegen ein Teil der transfizierten Zellen PMA stimuliert werden, während der andere Teil nicht mit PMA behandelt wird. Der Vergleich der Transkriptionsaktivität mit und ohne PMA-Induktion sollte es ermöglichen, die *cis*-Elemente, die diese Induktion vermitteln zu identifizieren.

Als letztes sollte durch Transfektionsexperimente der Promotorkonstrukte in Melanom und Nicht-Melanomzellen untersucht werden, ob die Überexpression von Nab2 in Melanomen durch eine konstitutive Aktivierung des Nab2-Promotors durch bestimmte Transkriptionsfaktoren vermittelt wird. Die Identifizierung eines solchen Transkriptionsfaktors könnte dann als Startpunkt für die Analyse der stromaufwärts gelegenen regulatorischen Elemente und womöglich einer Signalkaskade, welche die Nab2-Überexpression vermittelt, dienen.

2 Material

2.1 Material und Bezugsquellen

2.1.1 Zelllinien

humanes Melanom: Mel888[&], MelJuso^{*}, SbCl₂[&]
 humanes Kolonkarzinom: Colo320, Kato III

Herkunft der Zelllinien: ohne Markierung: ATCC, Manassas, USA
^{*} Institut für Immunologie, München
[&] M.BarEli, Houston, USA

2.1.2 Bakterienstämme

Name	Herkunft
JM101	(Messing et al., 1977)
KW251	Promega, Madison, USA
XL1-Blue MRF	Stratagene, La Jolla, USA

Tab. 2.1: Verwendete *E. coli*-Stämme

2.1.3 λ -Phagen-Bibliothek

Name	Klonierungsvektor	DNS-Ursprung	Herkunft
CL202	LambdaGEM-11	humane Leukozyten	Promega, Madison, USA

Tab. 2.2: Verwendete genomische DNS-Bibliothek in λ -Phagen

2.1.4 Enzyme

DNaseI	Roche (Boehringer), Mannheim
DNS-Polymerase (<i>E. coli</i>)	Roche (Boehringer), Mannheim
Klenow-DNS-Polymerase	New England Biolabs, Frankfurt
Kälberdarm-Phosphatase (CIP)	Roche (Boehringer), Mannheim
PfuTurbo™-Polymerase	Stratagene, La Jolla, USA
Restriktionsenzyme	New England Biolabs, Frankfurt
	Roche (Boehringer), Mannheim
RNaseA (Rinderpankreas)	Roche (Boehringer), Mannheim
T4-Polynukleotidkinase	New England Biolabs, Frankfurt
T4-DNA-Ligase	New England Biolabs, Frankfurt
T4 DNS-Polymerase	Roche (Boehringer), Mannheim
Taq-Polymerase	Quiagen, Hilden
SuperScript-II™-reverse Transkriptase	Life Technologies, Karlsruhe

2.1.5 Nukleinsäuren

2.1.5.1 Plasmide

Plasmidname	Herkunft/Referenz
4B7	s. Kap. 4.1.3
Egr1/PCB6 (aus <i>R. norvegicus</i>)	(Milbrandt, 1987)
pBlueskript-II SK+	Invitrogen, Leek, Niederlande
pcDNA3	Invitrogen, Leek, Niederlande
pCMVNAB2	(Svaren et al., 1996)
pGL3Basic	Promega, Madison, USA
pRL-TK	Promega, Madison, USA

Tab. 2.3: Verwendete Plasmide

2.1.5.2 Primer

Die Sequenzierprimer stammen von Metabion, Martinsried; alle weiteren Primer sind von MWG-Biotech, Ebersberg.

Name	Sequenz 5' → 3'
MG 6	AGAAGACGTGGAGGGAG
MG 8	TATTACGGAGAGTGGAGC
MG 10	GGCCCTCCACTGAAGAAG
MG 12	CCTGAGTCTATGTACCC
MG 14	CAGACACTGATGGACGAG
MG 17	GCTCTAGAACTAGTGGAT
MG 18	CCATTCCCATGTGTGTG
MG 37	CGAGCTGGCATCAGTG
MG 40	CAGTCCGCTCGCTTTC
MG 41	GTTTCTGAGAGCGACC
MG 42	CACAGAACGACCTCG
MG 43	ACCGAGAAGGGCAGC
MG 45	CTGCCGAGCTGCTCC
MG 47	CAGGTCGGTGCTGGTC
MG 48	CACCAACCCTGGCTTG
MG 50	CACGAGGTGAGAACC

Tab. 2.4: Sequenzierprimer für den Sinnstrang des Klons 4B7

Name	Sequenz 5' → 3'
MG 4	CAGACTCTCAGAATCAG
MG 5	AAGGCGCTCTGTGCATGGAC
MG 7	AATAAGAGCGTGTGTGTC
MG 9	TTTCAGCTTCTTCAGTGG
MG 11	TGTCCATCCAGACTCTCCC
MG 13	TGCTGCAGGATGTGTC
MG 15	TTTCACGCTGCTCCTG
MG 16	AGACGGAGTCTCGCTC
MG 19	CGCGGCTTAGAGACTGGG
MG 31	GTGCAGGGCGGGCTTG

MG 38	CAGATCTACACTAGGACC
MG 39	GCGTGTGATTAGAC
MG 44	CATGTTGGTCAGGCTG
MG 46	CTGTGCAGGGCGGGCTTG
MG 49	GGGAAAGCGAGCGGAC

Tab. 2.5: Sequenzierprimer für den Gegensinnstrang des Klons 4B7

Name	Sequenz 5' → 3'
SP6	ATTTAGGTGACACTATAG
T3	AATTAACCCCTCACTAAAGGG
T7	TAATACGACTCACTATAGG
RVprimer3	CTAGCAAAATAGGCTGTCCC
GLprimer2	CTTTATGTTTTTGGCGTCTTCC

Tab. 2.6: Sequenzierprimer für Vektoren

Name	Sequenz 5' → 3'
Extensionsprimer 1	CCAGGCTCTGTCCCTCCCTCCACGTCTTCTCTC
Extensionsprimer 2	CACCCTCCCCGGCTGCGCTTGCCGCCTCTC

Tab. 2.7: Primer für die Primerextensionsversuche

Charakteristika des Extensionsprimers 1: GC-Gehalt 63,6%, komplementär zu Position -135 bis -103 des genomischen Nab2-Klons 4B7 und damit zur 5'-untranslatierten Region der bekannten Nab2-cDNS

Charakteristika des Extensionsprimers 2: GC-Gehalt 76,7%, komplementär zu Position -203 bis -174 des genomischen Nab2-Klons 4B7 und damit zur genomischen DNS 5' vom Ende der bekannten Nab2-cDNS

Name	Sequenz 5' → 3'
KpnI -1100	caaggtaccGGCGGGGGCTAAGCTCCT
KpnI -700	caaggtaccCTGCAGAGCCCCACGC
KpnI -500	caaggtaccCGTCCGTGCGCTTCTGTG
KpnI -400	caaggtaccCAAGAGGGCCGGCTGTG
KpnI -300	cacgggtaccCTCGGTCACCTCGGTCCC
KpnI -200	cgaggtaccCTCTCCAGTCTCTAAGC
KpnI -100	caaggtaccCGGCAGCCAGCGCAGCTC
KpnI -93	caaggtaccCAGCGCAGCTCCGGGCC
KpnI -82	caaggtaccCGGGCCTCGCTCCCTGTGC
KpnI -69	caaggtaccCTGTGCGTCTGCGGGG
KpnI -50	caaggtaccCGGAGGCGCGGAGAGGC
KpnI -34	caaggtaccGCAAGCGCAGCCGGGG
KpnI -9	caaggtaccGGGGCAGAGGCACAGAC
KpnI +10	caaggtaccGCGCGGAGGCTCGGA
KpnI +60	caaggtaccCAGCGGTGGACACGGC
KpnI +86	caaggtaccGGAAGAGGGCAGCAC
KpnI +104	caaggtaccCAGCAGGCGCCGA
HindIII reverse	cgaaagcttGCTGCCCTTCTCGGTGCC

Tab. 2.8: Primer für die Herstellung der Nab2-Luziferase-Reporterkonstrukte. Primerabschnitte, die an die genomische Nab2-DNS binden sind in Großbuchstaben

dargestellt. Primerabschnitte, die zum generieren einer Restriktionsschnittstelle dienen, sind in Kleinbuchstaben dargestellt. Die Erkennungssequenzen für die aus der Primerbezeichnung ersichtlichen Restriktionsenzyme sind fett gedruckt.

Name	Sequenz 5' → 3'
Egr -222 mut fwd	CCCTGTGCGTCCT CTT GGGGCGGAGGCGC
Egr -222 mut rev	GCGCCTCCGCC CCCAAG AGGACGCACAGGG

Tab. 2.9: Primer für die Mutation der Egr1-Bindestelle an Position -222 des genomischen Nab2-Klones. Die durch diese Primer mutierten Nukleotide sind in Fettbuchstaben dargestellt.

2.1.5.3 Sonstige Nukleinsäuren und Oligonukleotide

Lachssperma-DNS (Na-Salz, TypIII)	Sigma, Deisenhofen
Desoxyribonukleotide (dNTPs)	Life Technologies, Karlsruhe
tRNS (aus <i>S. cerevisiae</i>)	Sigma, Deisenhofen
DNS-Größenstandards: - 100 bp Leiter	Life Technologies, Karlsruhe
- 1 kb Leiter	Life Technologies, Karlsruhe

2.1.6 Chemikalien

8-Hydroxychinolin	Merck, Darmstadt
Acrylamid (38%)/Bisacrylamid (2%)	Biorad, München
Agarose SeaKem LE	Biozym, Hess. Oldendorf
Agarose Typ I Low EEO	Biozym, Hess. Oldendorf
Aminosäuren	Sigma, Deisenhofen
Ammoniumperoxidsulfat	Merck, Darmstadt
Ampicillin (Natriumsalz)	Sigma, Deisenhofen
Azeton	Merck, Darmstadt
Bacti Agar	Remel, Lenexa, USA
Borsäure	Merck, Darmstadt
Bromphenolblau	Sigma, Deisenhofen
Chloroform	Merck, Darmstadt
Diethylpyrocarbonat (DEPC)	Roth, Karlsruhe
N,N'-Dimethylformamid	Merck, Darmstadt
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Merck, Darmstadt
Dithiothreitol (DTT)	Sigma, Deisenhofen
Essigsäure (100%, 96%)	Merck, Darmstadt
Ethylazetat	Sigma, Deisenhofen
Ethylendiamintetraacetat (EDTA)	Merck, Darmstadt
Ethanol, p. a.	Merck, Darmstadt
Ethanol, 99%, vergällt	Biesterfeld Graen & Co.KG, München
Ethidiumbromid	Sigma, Deisenhofen
Ficoll 400	Sigma, Deisenhofen
Fötale Kälberserum (FCS)	Biochrom KG, Berlin
Gelatine	Sigma, Deisenhofen
L-Glutamin	Serva, Heidelberg
Glyzerin	Merck, Darmstadt
Harnstoff	Serva, Heidelberg
Hefeextrakt	Difco, Detroit, USA

HEPES	Sigma, Deisenhofen
Isopropanol	Merck, Darmstadt
Kaliumazetat	Merck, Darmstadt
Kaliumchlorid	Merck, Darmstadt
Kaliumdihydrogenphosphat	Merck, Darmstadt
Kalziumchlorid	Merck, Darmstadt
Laurylsulfat (SDS)	Sigma, Deisenhofen
Maltose	Sigma, Darmstadt
Magnesiumchlorid	Merck, Darmstadt
Magnesiumsulfat	Merck, Darmstadt
2-Mercaptoethanol	Merck, Darmstadt
Methanol, reinst	Roth, Karlsruhe
Methanol, p. a.	Merck, Darmstadt
Methylenblau	Sigma, Deisenhofen
Mineralöl (PCR)	Sigma, Deisenhofen
Natriumazetat	Sigma, Deisenhofen
Natriumchlorid	Roth, Karlsruhe
Natriumkarbonat	Merck, Darmstadt
Natriumzitat	Merck, Darmstadt
Natriumdihydrogenphosphat	Merck, Darmstadt
Natriumhydrogenkarbonat	Merck, Darmstadt
Natriumhydroxid	Merck, Darmstadt
Natriumpyruvat	Serva, Heidelberg
Passiv-Lysepuffer™	Promega, Madison, USA
PEG 6000	Merck, Darmstadt
Penizillin	Sigma, Deisenhofen
Phenol	Merck, Darmstadt
Phorbol-12-Myristat-13-Azetat (PMA)	Sigma, Deisenhofen
Polyvinylpyrolidon	Sigma, Deisenhofen
Q-Soultion™	Quiagen, Hilden
Repell-Silan	Sigma, Deisenhofen
Rinderserumalbumin (BSA)	Sigma, Deisenhofen
Salzsäure, 25%, 37%	Roth, Karlsruhe
Streptomycin	Sigma, Deisenhofen
N,N,N',N'-Tetramethylethylendiamin (TEMED)	Sigma, Deisenhofen
Trishydroxymethylaminomethan (Tris)	Merck, Darmstadt
Trypanblau	Sigma, Deisenhofen
Tryptikase Pepton	Becton Dickinson, Cockeysville, USA
Trypton	Difco, Detroit, USA
Zufallsprimer-Lösung (6mere Zufallsprimer)	Amersham-Pharmacia, Freiburg
Xylencyanol	Sigma, Deisenhofen

2.1.7 Radiochemikalien

Adenosin 5'-triphosphat [γ - ^{32}P], 3000 Ci/mmol	NEN, Boston, USA
Deoxyadenosin 5'-triphosphat [α - ^{32}P], 3000 Ci/mmol	Amersham, Freiburg

2.1.8 Kommerzielle Analysesysteme und vorgefertigte Lösungen

Dual-Luciferase-Reporter-Assay™	Promega, Madison, USA
FuGENE-6™ Transfektionsreagenz	Roche (Boehringer), Mannheim
JETstar™ Plasmid Purification System	Genomed, Bad Oeyenhausen
JETSorb™ DNA Isolierungskit	Genomed, Bad Oeyenhausen
JETquick™ spin column-Säulen	Genomed, Bad Oeyenhausen
Luciferase Assay System™	Promega, Madison, USA
Proteinassay	Biorad, München
RNeasy™-Mini-Kit	Quiagen, Hilden
RPMI-1640 Medium	Biochrom-KG, Berlin
Sequenase™-2.0-DNA-Sequenzierkit	Usb, Cleveland, USA

2.1.9 Verbrauchsmaterial

Eppendorf™-Reaktionsgefäße (1.5ml, 2ml)	Eppendorf, Hamburg
Faltenfilter	GLW, Würzburg
Kanülen	Braun, Melsungen
Kryoröhrchen (2 ml)	Greiner, Frickenhausen
Kulturflaschen 150 cm ² , 75 cm ² 25 cm ²	Greiner, Frickenhausen Sarstedt, Nümbrecht
Lochplatten mit flachem Boden	
24-Loch, transparent	Greiner, Frickenhausen
96-Loch, transparent	Greiner, Frickenhausen
96-Loch, Lumitrac 200, weiß	Greiner, Frickenhausen
MF-Dialysemembran (0,025 µm Poren, 13 mm)	Millipore, Bedford, USA
Nitrozellulosemembran BA85 (82 mm, 132 mm)	Schleicher & Schüll, Dassel
NucTrap purification columns	Stratagene, Heidelberg
Parafilm	Neenah, USA
PCR-Reaktionsgefäße (0.2 ml)	Biozym, Hess. Oldendorf
Pipettenspitzen	Sarstedt, Nümbrecht
Pipettenspitzen, gestopft	Biozym, Hess. Oldendorf
Plastikküvetten zur OD-Bestimmung	Sarstedt, Nümbrecht
Plastikpetrischalen (90mm, 150mm)	Greiner, Frickenhausen
Röntgenfilm CEA X-Ray 90	Linhart, München
Spritzen	Becton&Dickenson, San Jose, USA
Sterilfilter Minisat (0,2 µm)	Sartorius, Göttingen
Whatman 3mm Papier	GLW, Würzburg
Zahnstocher	Schlecker, München
Zentrifugenröhrchen	
50 ml (PP)	Greiner, Frickenhausen
15 ml (PP), 15 ml (PS)	Greiner, Frickenhausen

2.1.10 Geräte

Elektrophoresekammern für Agarosegele	Amersham Pharmacia, Freiburg
für Polyacrylamidgele	Bethesda Research Laboratories, Neu Isenburg

Elisa-Lesegerät Easy Reader EAR 400 AT	SLT Instrumente, Grödig, Österreich
Filmentwicklergerät Airclean 200	Protec, Deutschland
Filmkassetten (Cevamatic)	Agfa-Gevaert, München
Fotometer	
Spektralfotometer U-3200	Hitachi, Tokio, Japan
Ultraspec 3000	Amersham Pharmacia, Freiburg
Geldokumentation	Intas, Göttingen
Gene-Pulser	BioRad, München
Heizblock	Eppendorf, Hamburg
Hybridisierungsöfen	Bachofen, Reutlingen
Inkubationsschränke	
Steri Cult 200	Forma Scientific, Ohio, USA
B5060	Heraeus, Hanau
Trockeninkubator (37°C)	Ehert, Emdingen
Luminometer (Victor 1420)	Wallac, Turku, Finnland
Magnetrührer	Heidolph, Kelheim
Mikropipetten (Gilson-Pipetman)	Abimed, Düsseldorf
Mikroskope	
Diavert	Leitz, München
Dialux 20	Leitz, München
Netzgeräte	
Electrophoresis Power Supply	Amersham Pharmacia, Freiburg
Labornetzgerät EA3003 Macrodrive 1	LKB, Uppsala, Schweden
Labornetzgerät 2297 Macrodrive	LKB, Uppsala, Schweden
Powersupply	Desaga, Heidelberg
Neubauer Zählkammer	Merck, Darmstadt
PCR-Gerät (Robocycler Gradient 96)	Stratagene, Heidelberg
pH-Elektrode	Ingold, Steinbach
pH-Meter PHM 62	Radiometer, Kopenhagen, DK
Push Column Beta Shield Device	Stratagene, Heidelberg
Rollmischer Mixer 5	Denley, GB
Schüttelinkubator CH-4103 (37°C)	Infors AG, Bottmingen
Sterilwerkbank «Laminar Flow»	Büttner-Schilde-Haas AG, Bottmingen
Trockenofen für Polyacrylamidgele	Memmert, Deutschland
UV-Transilluminator	Bachofen, Reutlingen
UV-Stratalinker 2400	Stratagene, Heidelberg
Vortex-Genie	Scientific Instruments, Hawthorne, USA
Waagen	
Präzisionswaage HL32	Mettler, Gießen
Portable Waage	Sartorius, Göttingen
Wasserbad	GLW, Würzburg
Zentrifugen	
Zellzentrifuge Rotanta 46 RC	Heraeus Christ, Hanau
Ultrazentrifuge Sorvall RC-5B	DuPont, Wilmington, USA
Tischzentrifuge 5415	Eppendorf, Hamburg

2.2 Medien

2.2.1 Zellkulturmedien für humane Zelllinien

Zellkulturmedium (Medium): RPMI 1640 supplementiert mit
5% FCS
1 mM Natriumpyruvat
2 mM L-Glutamin
100 U/ml Penicillin
100 U/ml Streptomycin

Einfrüermedium: RPMI 1640 supplementiert mit
25% FCS
20% DMSO
1 mM Natriumpyruvat
2 mM L-Glutamin
100 U/ml Penicillin
100 U/ml Streptomycin

2.2.2 *E. coli*-Medien

LB-Medium: 10 g/l Trypton
5 g/l Hefeextrakt
10 g/l NaCl
autoklavieren

LB-Agar-Platten: LB-Medium und 15 g/l Bacti Agar,
autoklavieren

LB-Glyzerin: LB-Medium und 30% (m/v) Glyzerin, autoklavieren

Bodenagarose für Phagenkultur: 10 g/l Tryptikase Pepton
5 g/l NaCl
15g/l low EEO Agarose
autoklavieren

Wachstumsagarose für Phagenkultur:
10 g/l Tryptikase Pepton
5 g/l NaCl
7g/l low EEO Agarose
autoklavieren

Antibiotikahaltige Medien wurden nach dem Autoklavieren und Abkühlen auf ca. 60°C mit 50 µg/ml Ampicillin versetzt.

2.3 Allgemeine Puffer und Lösungen

Ampicillinlösung: 100 mg/ml Ampicillin
in H₂O, sterilfiltriert

<u>DNS-Auftragspuffer (Agarosgel):</u>	50% (m/v) Glycerin 0,4% (m/v) Bromphenolblau 0,4% (m/v) Xylencyanol in TE
<u>DNS-Auftragspuffer (Polyacrylamidgel):</u>	80% deionisiertes Formamid 10 mM EDTA (pH 8,0) 0,25% (m/v) Bromphenolblau 0,25% (m/v) Xylencyanol
<u>1% (m/v) BSA-PBS:</u>	0,5 g BSA auf 50 ml PBS sterilfiltrieren
<u>Denaturierungslösung:</u>	1,5 M NaCl 0,5 M NaOH
<u>Denhardts (100fach):</u>	2% BSA 2% Ficoll 400 2% Polyvinylpyrrolidon
<u>EDTA-PBS:</u>	1 mM Na ₂ -EDTA in PBS, autoklavieren
<u>DNS-Hybridisierungslösung:</u>	6fach SSC 5fach Denhardts 0,5% SDS 100 µg/ml Lachssperma (kurz vor dem Mischen zur Denaturierung auf 95°C erhitzt und auf Eis abgekühlt)
<u>Lachssperma-DNS:</u>	10 mg/ml Lachssperma-DNA TypIII-Natriumsalz in H ₂ O über Nacht bei RT lösen DNS durch 20-mal aufziehen durch eine 18er-Kanüle scheren 10 Min bei 100°C denaturieren, aliquotieren, bei -20°C aufbewahren, vor Gebrauch 5 Min bei 95°C erhitzen
<u>Maltoselösung:</u>	20g Maltose gelöst in 100 ml H ₂ O sterilfiltrieren
<u>Na-Azetat pH 5,2:</u>	408,01 g NaCH ₃ OOx3H ₂ O auf 800 ml mit H ₂ O auffüllen pH 5,2 mit 100% CH ₃ OOH auf 1l auffüllen, autoklavieren
<u>Neutralisierungslösung:</u>	1,5 M NaCl 0,5 M Tris-HCl (pH 8,0)

Oligomarkierungspuffer-Grundlage:

250 mM Tris-HCl (pH 8)
25 mM MgCl₂
50 mM β-Mercaptoethanol
100 μM dCTP
100 μM dTTP
100 μM dGTP
in TM lösen

Oligomarkierungspuffer mit Zufallsprimern:

50 μl HEPES (pH 6,6)
50 μl Oligomarkierungspuffer-Grundlage
14 μl Zufallsprimer-Lösung

PBS pH 7,2:

2,7 mM KCl
1,5 mM KH₂PO₄
137 mM NaCl
8 mM Na₂HPO₄

PEG-SM-NaCl:

20% (m/v) PEG 6000
2 M NaCl
gelöst in SM, autoklaviert

PMA-Lösung:

1 mg PMA (Phorbol-12-Myrestate-13-Acetate)
in 250 μl Ethylazetat lösen (4 mg/ml)
in 12,5 μl (50 μg) aliquotieren
vor Gebrauch 30 Min unter Abzug abdampfen
lassen
Aufnahme in 50 μl Azeton (1 mg/ml)
in 5 ml Medium tropfen (10 μg/ml)
1:1000 verdünnen (10 ng/ml),
ca. 7 Tage bei 4°C aufbewahrbar

RNase-A-Lösung:

10 mg/ml RNase A in H₂O
15 mM NaCl
10 mM Tris-HCl (pH 8,0)

SM:

5,8 g/l NaCl
2g/l MgSO₄·x7 H₂O
0,05 M Tris-HCl (pH 7,5)
0,01% Gelatine
autoklavieren

SSC:

3 M NaCl
0,3 M Natriumzitat
pH 7,0
autoklavieren

<u>20x SSPE:</u>	3 M NaCl 0,2 M NaH ₂ PO ₄ 0,02 M EDTA pH 7,4 autoklavieren
<u>STE:</u>	100 mM NaCl 20 mM Tris-HCl (pH 7,5) 10 mM EDTA
<u>10x TBE:</u>	900 mM Tris Base 900 mM Borsäure 20 mM EDTA pH 8,0 autoklavieren
<u>TM:</u>	0,05 M Tris-HCl (pH 7,5) 2g/l MgSO ₄ ·7H ₂ O autoklavieren
<u>Tris pH 8,0:</u>	10 mM Tris mit HCl auf pH 8,0 einstellen und autoklavieren
<u>Tris-gesättigtes Phenol:</u>	dest. Phenol mit 8-Hydroxychinolin versetzten und mit Tris Puffer pH 8,8 äquilibrieren

3 Methoden

3.1 Arbeiten mit Zelllinien

3.1.1 Zellkultur

Menschliche Zelllinien wurden in einem Inkubator bei 37°C, 6% CO₂ und 90% Luftfeuchtigkeit kultiviert. Das Zellkulturmedium wurde mit 5% FCS supplementiert, das vor Anwendung für 30 Min auf 56°C erhitzt wurde, um Komplementproteine und Viren zu inaktivieren. Alle Arbeiten mit Zelllinien wurden an einer Sterilbank durchgeführt. Alle verwendeten Lösungen wurden autoklaviert oder durch einen 0,2 µm Filter sterilfiltriert. Zum Ablösen von adhärennten Zellen wurde zuerst das Medium abgesaugt und die Zellen dann mit einer 1 mM EDTA-PBS-Lösung überschichtet. Nach ca. 5-10 Min bei 37°C im Inkubator wurden die Zellen durch leichtes Klopfen auf die Kulturflasche abgelöst. Alle Zentrifugationsschritte wurden bei 400 g und Raumtemperatur für 7 Min durchgeführt.

3.1.2 Kryokonservation und Auftauen von menschlichen Zelllinien

Zur Kryokonservierung wurden mindestens 1×10^6 Zellen für 7 Min bei 400 g und Raumtemperatur abzentrifugiert. Danach wurden die Zellen in 0,75 ml Medium resuspendiert. Kurz vor der Überführung in den Gefrierschrank wurden dazu 0,75 ml Einfriermedium gegeben und die Zellen in ein 2 ml Kryoröhrchen mit Schraubdeckel überführt. Der Abkühlungsvorgang im -80°C Gefrierschrank soll möglichst langsam erfolgen, um die Bildung von für die Zellen schädlichen Kristallen zu minimieren. Deswegen wurden die Kryoröhrchen mit mehreren dicken Lagen Papierhandtüchern umwickelt und im -80°C Gefrierschrank für einen Tag gelagert. Erst dann wurden sie zur Langzeitlagerung in -196°C kalten, flüssigen Stickstoff überführt.

Im Gegensatz zum Abkühlvorgang soll das Auftauen möglichst schnell durchgeführt werden. Deshalb wurden die frisch aus dem flüssigen Stickstoff entnommenen Kryoröhrchen im 37°C Wasserbad so lange aufgetaut, bis nur noch ein kleiner Eisbrocken darin vorhanden war. Die Zellen wurden dann zu 5 ml vorgewärmtem Medium gegeben und abzentrifugiert. Danach wurden sie in frischem Medium resuspendiert und in Zellkulturflaschen überführt.

3.1.3 Stimulation der Zellen mit Phorbol ester

Phorbol ester, wie z.B. Phorbol-12-Myristat-13-Azetat (PMA), ähneln in ihrer Struktur dem natürlichen Aktivator 1,2-Diacylglycerin der zellulären Proteinkinase-C und wirken an diesem Enzym als artifizieller Aktivator. PMA ist einer der stärksten derzeit bekannten Tumor-Promotoren und induziert die Expression einer großen Zahl von Genen, darunter auch Egr1 und Nab2 (Gashler and Sukathme, 1995; Kirsch et al., 1996). Es wurde benutzt um diese Gene in Zelllinien zu induzieren.

Für die Primerextensionsversuche wurden in einer 75 cm² Kulturflasche 5x10⁶ Zellen ausgesät und nach 24 Std mit PMA in einer Endkonzentration von 10 ng/ml versetzt. Die Zellen wurden nach weiteren 4 Stunden geerntet und verarbeitet.

Für die Luziferaseversuche wurden die in 24-Lochplatten mit verschiedenen Reporterkonstrukten transfizierten Zellen 12 Std vor dem Ernten mit PMA in einer Endkonzentration von 10 ng/ml versetzt.

3.1.4 Transiente Transfektion humaner Zelllinien

Transiente Transfektionen wurden mit dem nicht-liposomalen Transfektionsreagenz *FuGENE-6*TM durchgeführt. Transfiziert wurden so die Plasmide pGL3 (mit verschiedenen Inserts), pRL-TK und Egr1/PCB6.

In einer 24-Lochplatte wurden 5-10x10⁴ Zellen in 1 ml Medium pro Loch ausgesät, so dass diese nach 24 Std Inkubation im Brutschrank eine Konfluenz von ca. 50-70 % erreicht hatten. Pro Loch wurden für die Transfektion 29 µl serumfreies RPMI 1640 mit 1 µl *FuGENE-6*TM gemischt und 5 Min bei RT inkubiert. Diese Mischung wurde dann auf 6 µl der zu transfizierenden DNS (50 ng/µl) getropft und weitere 15 Min bei RT inkubiert. Für die Kotransfektion zweier verschiedener Plasmide wurden ebenfalls 6 µl einer DNS-Lösung mit je 25 ng/µl von jedem der beiden Plasmide verwendet. Schließlich wurde der *FuGENE-6*TM-DNS-Komplex direkt zu den Zellen ins Medium gegeben. Nach 48 Std wurden die transfizierten Zellen dann geerntet und der Luziferaseversuch gestartet. Zum Erntezeitpunkt sollten die Zellen noch nicht vollständig konfluent sein.

3.1.5 Reporterassays

Reporterassays stellen eine einfache Möglichkeit dar, um regulatorische Genabschnitte zu untersuchen und zu charakterisieren. Dazu wird der zu untersuchende putative Promotor in einen Luziferase-Reportervektor vor das promotorlose Luziferase-Reportergen kloniert. Entsprechend der transkriptionellen Aktivität der einklonierten DNS-Sequenz unter den gewählten Bedingungen, wird das Reportergen transkribiert und translatiert und die Menge des Proteinproduktes kann mit einem speziellen Assay gemessen werden.

Luziferase-Reportergen-Systeme benutzen dazu vorwiegend das Luziferaseenzym aus dem Glühwürmchen (*Photinus pyralis*), welches das Substrat Luziferin unter Verbrauch des Kosubstrates ATP oxydiert. Bei dieser Reaktion wird sichtbares Licht emittiert, das von einem Luminometer gemessen werden kann. Typischerweise tritt in den ersten Sekunden der Reaktion ein so genannter Lichtblitz auf, der dann in ein Glimmen übergeht. Sowohl der Lichtblitz als auch das Glimmen sind proportional zur Menge der in der Reaktion vorhandenen Luziferase und damit proportional zur transkriptionellen Aktivität des einklonierten DNS-Fragmentes.

Um den Einfluss zufälliger Variationen zu minimieren wurden die Luziferaseassays für jedes Konstrukt grundsätzlich in Triplikaten durchgeführt und später der Mittelwert gebildet.

3.1.5.1 Transfektion von Luziferase-Reportergenplasmiden

Die Nab2-Reporterkonstrukte aus Kap. 3.4.2 wurden wie in Kap. 3.1.4 beschrieben transient in Zelllinien transfiziert, die bereits für 24 Std in 24-Lochplatten angezüchtet wurden.

3.1.5.2 Bestimmung der Luziferaseaktivität in transfizierten Zelllinien

48 Std nach der Transfektion wurde das Medium vorsichtig aus den 24-Lochplatten abgesaugt und die adhären Zellen zweimal mit 0,5 ml PBS gewaschen. Dann wurden 50 µl Passiv-Lysepuffer™ auf die Zellen gegeben und die Kulturplatte zur vollständigen Lyse der Zellen für 15 Min bei RT auf einen Schüttler gestellt. Das Lysat wurde in Eppendorf™-Reaktionsgefäße überführt und bei 14.000 Upm bei RT für 30 Sek in einer Tischzentrifuge abzentrifugiert um Zelldebris zu entfernen.

Schließlich wurden 10 µl des Lysats in eine weiße Lumitrac-200™ 96-Lochplatte gegeben und 100 µl des Luziferasesubstrates zugegeben. Danach wurde die Platte kurz geschüttelt und das Glimmen wurde nach 2 Min im Luminometer gemessen. Die Messzeit wurde auf 1 Sek pro Loch eingestellt.

3.1.5.3 Normalisieren der Luziferaseassays durch eine Proteinbestimmung

Trotz gleicher Zellzahl bei der Aussaat, kann die Zellzahl in verschiedenen Löchern beim Ernten des Luziferaseassays variieren. Dies hat einen Einfluss auf die gemessene Luziferaseaktivität. Um die Luziferaseaktivität verschiedener Löcher miteinander zu vergleichen, wurde deswegen die Proteinkonzentration in jedem Lysat bestimmt und die Luziferaseaktivität damit normalisiert.

Dazu wurde eine Proteinbestimmungsmethode nach Bradford (Bradford, 1976) benutzt. Diese Methode macht sich die Verschiebung des Absorptionsmaximums des Farbstoffes Coomassie-Brillantblau G-250 von 465 nm zu 595 nm bei Bindung an Proteine zunutze.

Die Bradford-Proteinbestimmung wurde mit dem *BioRad*™ Proteinassay durchgeführt. Dazu wurden 2 µl des Zellysates mit 150 µl des im Verhältnis 1:5 in H₂O verdünntem Proteinreagenz in einer durchsichtigen 96-Lochplatte versetzt und bei 595 nm im Elisa-Lesegerät gemessen. Die gemessenen ODs wurden mit den Messwerten einer Standardverdünnungsreihe mit Rinderserumalbumin verglichen um sie in absolute Proteinkonzentrationen umzurechnen.

3.1.5.4 Berechnung der relativen Luziferaseaktivität

Aus der Messung im Luminometer und der Proteinbestimmung wurde für jede Transfektion mit einem Luziferase-Reporterkonstrukt die Luziferaseaktivität relativ zur Luziferaseaktivität des in einem eigenen Loch transfizierten Leervektors pGL3Basic wie folgt berechnet:

$$\text{relative Luziferaseaktivität} = \frac{\text{Lichtemission (Reporterkonstrukt)} \times \text{Proteinkonzentration (pGL3Basic)}}{\text{Lichtemission (pGL3Basic)} \times \text{Proteinkonzentration (Reporterkonstrukt)}}$$

Grundsätzlich wurden Luziferaseversuche in Triplikaten durchgeführt und dann der Mittelwert der Ergebnisse gebildet.

3.1.5.5 Der *Dual-Luciferase-Reporter-Assay*TM

Weil die Messergebnisse bei Luziferaseversuchen nicht nur von der unterschiedlichen Zellzahl pro Kulturansatz, sondern auch von der in eukaryotischen Zellen mit einer großen Variabilität von Versuch zu Versuch und zwischen verschiedenen Zelllinien behafteten Transfektionseffizienz des Reporterplasmids abhängig sind, wurden *Dual-Luciferase-Reporter-Assays*TM benutzt. Bei diesen wird mit dem eigentlichen Reporterkonstrukt, das ein Glühwürmchen-Luziferasegen und das zu analysierende DNS-Fragment enthält, ein zweites Reporterplasmid kotransfiziert. Dieses enthält eine *Renilla*-Luziferase aus *Renilla reniformis* unter der Kontrolle eines in allen mammalia Zellen ungefähr gleich starken Promotors. Hierfür eignet sich zum Beispiel der Thymidinkinase (TK)-Promotor aus dem *Herpes simplex* Virus (Stewart, 1987; Wagner, 1985).

Die Transfektionseffizienz für diesen Vektor ist in jeder Transfektionsreaktion identisch mit der für das Glühwürmchen-Reporterkonstrukt. Die Aktivität des TK-Promotors ist in verschiedenen Zelllinien konstant, so dass die Lichtemission des *Renilla*-Luziferaseenzym Aufschluss über die Transfektionseffizienz gibt und zur Normalisierung der Transfektionseffizienz benutzt werden kann.

Der *Dual-Luciferase-Reporter-Assay*TM wurde zuerst genauso durchgeführt wie der normale Glühwürmchen-Assay (siehe Kap. 3.1.5.2), jedoch werden nach der ersten Messung weitere 100 µl des Substrates für die *Renilla*-Luziferase zugegeben und nach weiteren 2 Min wird ein zweites mal im Luminometer gemessen. Die erste Messung ergibt die Aktivität der Glühwürmchen-Luziferase, die zweite Messung die der *Renilla*-Luziferase.

Die Aktivität des untersuchten DNS-Fragmentes errechnet sich dann wie folgt:

$$\text{relative Luziferaseaktivität} = \frac{\text{Lichtemission (Glühwürmchen-Reporterkonstrukt)}}{\text{Lichtemission (Renilla-Reporterplasmid)}}$$

3.2 Arbeiten mit *Escherichia coli*

3.2.1 Kultivierung von *E. coli*

E. coli wurden über Nacht auf festem Nährmedium, so genannten LB-Platten, bei 37°C im Inkubator oder in flüssigem LB-Medium bei 200 Upm und 37°C auf dem Schüttelinkubator gezüchtet. Um plasmidtransformierte Bakterien unter selektiven Bedingungen anzuzüchten, wurden 50 µg/ml Ampicillin in das Wachstumsmedium

gemischt. Alle benutzten Plasmide enthalten ein Resistenzgen für Ampicillin. Für die Langzeitlagerung wurden 0,75 ml aus einer flüssigen Übernachtskultur mit 0,75 ml 30% Glycerin-LB-Medium vermischt und dann bei -80 °C gelagert. Auf Kulturplatten wurden *E. coli* bei 4°C bis zu einigen Wochen gelagert. Um eine Kultur aus der Langzeitlagerung anzulegen wurden *E. coli* unter ansonsten sterilen Bedingungen direkt aus dem gefrorenen Glycerinröhrchen auf LB-Platten ausgestrichen, über Nacht kultiviert und am nächsten Tag eine Kolonie von der Platte in flüssiges LB-Medium überführt. Das angeimpfte LB-Medium wurde dann erneut über Nacht inkubiert.

3.2.2 Transformation von *E. coli* durch Elektroporation

Da insbesondere bei der Mutagenese von Plasmid-DNS mit der Polymerase-Kettenreaktion nur eine geringe Anzahl von Kopien entsteht, wurde für die Transformation von Plasmiden eine Methode mit einer möglichst hohen Transformationseffizienz gewählt. Die Elektroporation zählt zu einer der effizientesten Methoden mit bis zu 10^9 Kolonie-bildenden Einheiten pro μg transfizierter DNS.

Zur Herstellung transformationskompetenter Bakterien wurden 500 ml LB-Medium im Verhältnis 1:100 mit einer frischen Übernachtskultur von *E. coli* in LB-Medium angeimpft und bis zu einer OD_{600} von 0,5 bis 1,0 bei 37°C und 200 Upm inkubiert. Die Bakterien wurden dann für 30 Min auf Eis abgekühlt und anschließend für 15 Min bei 4°C und 1.500 *g* pelletiert. Das Pellet wurde in 500 ml 4°C kaltem H₂O resuspendiert und abzentrifugiert, dann nochmals in 250 ml 4°C kaltem H₂O resuspendiert und wiederum abzentrifugiert. Danach wurden die Bakterienzellen in 10 ml kaltem 10%igen Glycerin resuspendiert und wieder zentrifugiert. Die nun transformationskompetenten Zellen wurden in 1 ml kaltem 10%igem Glycerin resuspendiert und in Aliquots zu je 50 μl in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -80°C aufbewahrt.

Direkt vor der Transformation wurden die transformationskompetenten Zellen langsam auf Eis aufgetaut. Dann wurden 40 μl der Bakterien in 10%igem Glycerin mit 5 μl eines Ligationsansatzes oder eines Plasmides gemischt, das bereits für 20 Min auf einer 0,025 μm Nitrozellulosemembran gegen 10% Glycerin dialysiert wurde. Die Bakterien-DNS-Mischung wurde für 5 Min auf Eis inkubiert und in eine auf Eis

vorgekühlte 0,2 cm Elektroporationsküvette überführt. Mit dem *Gene-Pulser*[™] (2,5 kV, 25 µF, 400 Ω) wurde ein Stromstoß durch die Küvette induziert. Dann wurden die Zellen unmittelbar mit 1 ml LB-Medium (ohne Ampicillin-Zusatz) aus der Küvette gespült und bei 37°C für 30 Min inkubiert. Während dieser Inkubation kann die auf dem transformierten Plasmid kodierte Antibiotikaresistenz exprimiert werden. Schließlich wurden sie auf einer LB-Platte mit Ampicillin ausplattiert.

3.3 Arbeiten mit *λ-Phagen*

λ-Phagen sind Viren, die *E. coli* infizieren und sich in diesen replizieren können. Diese kann man sich zunutze machen um besonders große DNS-Fragmente zu bearbeiten und zu amplifizieren.

Die benutzte *λ-Phagen*-Bibliothek CL202 enthält das gesamte, aus Leukozyten isolierte, fragmentierte Genom eines Menschen. Die Phagen können in vitro kultiviert werden indem der *E. coli* Stamm KW251 damit infiziert und dann auf Nährböden gezüchtet wird. Da *λ-Phagen* lytisch auf die Bakterien wirken, zeigen kreisrunde, Bakterien-freie Areale (so genannte „Plaques“) das Wachstum der Phagen an.

3.3.1 Herstellung kompetenter KW251 *E. coli* für die Infektion mit *λ-Phagen*

Die *E. coli*-Linie KW251 wurde direkt aus dem bei -80°C gelagerten Glycerolstock in 50 ml LB-Flüssigmedium gegeben. Das Wachstumsmedium mit den Bakterien wurde dann mit 0,2% Maltose versetzt, wodurch der *λ-Phagen*-Rezeptor der Bakterien induziert wird, und über Nacht bei 37°C im Schüttelinkubator kultiviert. Die Bakterien wurden bei 2.000 Upm bei 4°C für 20 Min in einer Kühlzentrifuge abzentrifugiert und das Pellet in 50 ml 0,01 M MgSO₄ resuspendiert. Diese Bakteriensuspension sollte eine OD₆₀₀ von 2 haben und kann bei 4°C für 2-3 Wochen aufbewahrt werden.

3.3.2 Kultivierung von *λ-Phagen* auf 150 mm und 90 mm Kulturplatten

(Angaben in Klammern gelten für 90 mm Kulturplatten)

80 ml (30 ml) der Bodenagarose wurden in Kulturplatten gegossen. Am nächsten Tag wurde die *λ-Phagen*-Bibliothek in SM-Puffer so verdünnt, dass 300 µl (100 µl)

SM ca. 25.000 (1.000) Plaque-bildende-Einheiten (*plaque-forming-units*, auch „pfu“) enthalten. 300 µl (100 µl) der Phagenlösung wurden mit 300 µl (100 µl) der kompetenten KW251 Bakterien gemischt und für 20 Min bei 37°C inkubiert. Zu dieser Suspension wurden zuerst 70 µl (30 µl) 1 M MgCl₂ gegeben und nach kurzem Mischen 7 ml (3 ml) Wachstumsagarose, die bei 45°C flüssig gehalten wurde. Die flüssige Agarose mit den Bakterien und den Phagen wurde dann in die vorbereiteten Kulturschalen mit der festen Bodenagarose gegossen. Die Platten wurden über Nacht bei 37°C inkubiert. Entsprechend der ausplattierten 25.000 pfu der *λ-Phagen* sollten nach Inkubation 25.000 Plaques auf der 150 mm Platte sichtbar sein. Für die eingesetzte Phagen-Bibliothek entspricht dies der optimalen Anzahl *λ-Phagen* pro 150 mm Platte, weil die Plaques bei dieser Dichte gerade nicht mit den Nachbarplaques konfluieren. Sie können somit gut einzeln identifiziert und bearbeitet werden.

3.3.3 Konzentrationsbestimmung der *λ-Phagen*-Stammlösung

1 µl aus der *λ-Phagen*-Stammlösung wurde 1:10.000, 1:100.000 und 1:1.000.000 in SM-Puffer verdünnt und aus jeder dieser Lösungen wurden 300 µl wie zuvor beschrieben auf 150 mm Kulturplatten ausplattiert. Nach Übernachtskultur wurde die Anzahl der Plaques auf der Platte (pfu) gezählt. Daraus wurde mit der folgenden Formel die Konzentration der pfu pro µl der Stammlösung berechnet:

$$\text{Konzentration der Stammlösung [pfu/}\mu\text{l]} = \frac{\text{pfu}}{\text{ausplattiertes Volumen} \times \text{Verdünnungsfaktor}}$$

3.4 Molekularbiologische Methoden

3.4.1 Bearbeiten von Nukleinsäuren

3.4.1.1 Phenol/Chloroform-Extraktion von DNS

Um Proteine und andere Verunreinigungen aus wässrigen DNS-Lösungen zu entfernen wurden diese einer Phenol/Chloroform-Extraktion unterzogen. Dazu wurde die DNS-Lösung mit einem gleichen Volumen an Phenol gemischt und gut geschüttelt. Zur Phasentrennung wurde die Probe bei 13.000 Upm und RT in einer Tischzentrifuge für 5 Min zentrifugiert. Die oben liegende wässrige Phase wurde

dann in ein neues Reaktionsgefäß überführt und mit einem gleichen Volumen Phenol/Chloroform gemischt. Die Probe wurde gut geschüttelt und wie zuvor zentrifugiert. Nach diesem Schritt wurde die wässrige Phase mit Ethanol gefällt.

3.4.1.2 Fällung von DNS mit Ethanol oder Isopropanol

Nukleinsäuren wurden aus wässrigen Lösungen durch eine Fällung von Salzen gereinigt und konzentriert. Dazu wurde zu einer wässrigen DNS-Lösung 1/10 des Volumens 3M Na-Azetat (pH 5,2) und das 2,5fache Volumen an eiskaltem Ethanol oder das 1fache Volumen Isopropanol zugegeben und gut durchmischt. Nach Fällung der DNS für 1 Std bei -20°C wurde das Präzipitat durch Zentrifugation bei 13.000 Upm und 4°C in einer Tischzentrifuge für 15 Min pelletiert. Um weitere Salze zu entfernen wurde das Pellet mit 70% Ethanol gewaschen und erneut zentrifugiert. Danach wurde der Niederschlag bei 37°C getrocknet und in einem kleinen Volumen H₂O gelöst.

3.4.1.3 Konzentrationsbestimmung von DNS/RNS-Lösungen

Zur Konzentrationsbestimmung wurde ein Spektrofotometer verwendet. Bei einer Wellenlänge von 260 nm und einer Schichtdicke von 1 cm entspricht ein Absorptionswert von 1 einer Konzentration von 50 µg/ml doppelsträngiger DNS oder 40 µg/ml RNS. Als Maß für die Reinheit der Nukleinsäurenlösung gilt der Quotient der Absorption bei den Wellenlängen 260 und 280 nm. Er sollte für reine DNS 1,8 und für reine RNS 1,8-2,0 betragen. Niedrigere Werte deuten auf eine Verunreinigung der Probe mit Proteinen, höhere Werte auf eine Verunreinigung mit Salzen oder Zuckern hin.

3.4.1.4 Isolierung von Nukleinsäuren

3.4.1.4.1 Mini-Präparation von Plasmid-DNS aus *E. coli*

Um sehr reine, kleine Mengen Plasmid-DNS vorwiegend für analytische Zwecke zu erhalten, wurden transformierte Bakterien über *JETquick*TM-*spin-column* Säulen verarbeitet. Das Protokoll beruht auf einer alkalischen Lyse der Bakterien und einer nachfolgenden säulenchromatographischen Reinigung.

1,5 ml einer *E. coli* Übernachtskultur wurden mit einer Tischzentrifuge bei 6.000 Upm und RT für 5 Min abzentrifugiert und in 210 µl der mitgelieferten Lösung G1 (50 mM Tris-HCl (pH 8,0), 10 mM EDTA, 100 µg/ml RNaseA) resuspendiert. Dann wurden 210 µl der Lösung G2 (200 mM NaOH, 1% SDS) zugegeben, gemischt und die Bakterien für den Lyseprozess 5 Min bei RT stehen lassen. Anschließend wurde durch 280 µl der Lösung G3 (Azetat, Guaninhydrochlorid) neutralisiert und für 10 Min bei 13.000 Upm bei RT der Bakteriendebris abgetrennt. Der Überstand wurde dann direkt auf eine *spin-column* gegeben und 1 Min bei 13.000 Upm durch diese hindurch zentrifugiert. Die Säule wurde einmal mit Lösung G4 (Ethanol, NaCl, EDTA, Tris-HCl) gewaschen, einmal leer zentrifugiert und die DNS mit 50 µl H₂O durch zweiminütiges Zentrifugieren in ein neues Eppendorf™-Reaktionsgefäß eluiert.

3.4.1.4.2 Maxi-Präparation von Plasmid-DNS aus *E. coli*

Um größere Plasmidmengen aus *E. coli* zu isolieren, wurde der Maxi-Präp-Kit *JETstar*™ verwendet, der auf dem gleichen Prinzip wie der Mini-Präp-Kit basiert. Maximal 300 ml, bei der Präparation von Plasmiden für Reporterassays aufgrund höherer Anforderungen an die DNS-Reinheit jedoch höchstens 100 ml Übernachtskultur von transformierten *E. coli* wurden für 10 Min bei 1.500 g und 4°C abzentrifugiert. Das Pellet wurde mit 10 ml der mitgelieferten Lösung E1 (50 mM Tris-HCl (pH 8,0), 10 mM EDTA, 100 µg/ml RNaseA) resuspendiert und mit 10 ml der Lösung E2 (200 mM NaOH, 1% SDS) versetzt. Dieser Bakterienlyse-Ansatz wurde für 5 Min bei RT inkubiert und mehrfach leicht durchgeschüttelt. Durch 10 ml der Lösung E3 (3,2 M Kaliumazetat/Essigsäure (pH 5,0)) wurde der Ansatz neutralisiert. Das Lysat wurde für 10 Min bei 15.000 g und RT abzentrifugiert und der klare Überstand auf die bereits mit Lösung E4 (600 mM Natriumchlorid, 100 mM Natriumazetat) äquilibrierte Säule gegeben. Nachdem die gesamte Lösung durch die Säule gelaufen ist, wurde sie mit 60 ml E5-Lösung (800 mM NaCl, 100 mM Na-Azetat) gewaschen und danach die DNS mit 15 ml E6-Lösung (1.250 mM NaCl, 100 mM Tris (pH 8,5)) eluiert. Dann wurde die Plasmid-DNS mit 10,5 ml Isopropanol gefällt und für 30 Min bei 4°C und 15.000 g abzentrifugiert. Das Pellet wurde in 70% Ethanol gewaschen und nach der Trocknung bei 37°C in 500 µl H₂O gelöst.

Nach der Präparation von Plasmid-DNS aus *E. coli* wurde grundsätzlich die Konzentration der in H₂O gelösten DNS durch fotometrische Messung bestimmt,

sowie die Identität des gewonnenen Plasmides durch einen Restriktionsverdau und Analyse auf einem Agarosegel festgestellt.

3.4.1.5 Isolation von RNS aus humanen Zelllinien

Das Arbeiten mit RNS ist schwierig, da überall im Laborumfeld RNasen, also hochaktive und sehr resistente RNS-abbauende Enzyme vorkommen. Deswegen wurde RNS nur an bestimmten, mit RNase-Inhibitoren behandelten Arbeitsplätzen und nur mit ebenso behandelten Geräten bearbeitet. Außerdem wurden alle Lösungen vor dem Autoklavieren mit dem RNase-Inhibitor Diethylpyrocarbonat versetzt. Es wurden immer Handschuhe getragen.

Zur RNS-Isolation wurde das *RNeasy-Mini-Kit*TM verwendet, das wie auch die Plasmid-Präparationskits auf einem säulenchromatographischen Prinzip beruht. Die humanen Zellen wurden in einer 75 cm² Kulturflasche bis zu einer Konfluenz von 70-90% wachsen lassen und geerntet. Sie wurden abzentrifugiert, einmal mit PBS gewaschen und in 350 µl des mitgelieferten RLT-1%-β-Mercaptoethanol-Lysepuffers aufgenommen. Durch mehrmaliges Hindurchdrücken durch eine G20-Kanüle wurden die Zellen lysiert und homogenisiert und nach Zugabe von 350 µl 70% Ethanol auf eine *RNeasy*TM-*spin-column* gegeben. Diese wurde für 15 Sek bei RT und 8.000 Upm in einer Tischzentrifuge zentrifugiert und danach einmal mit 700 µl RW1-Puffer und zweimal mit je 500µl RPE-Puffer gewaschen (jeweils 15 Sek Zentrifugation bei RT und 8.000 Upm). Die gesamt-RNS der lysierten Zellen wurde mit 50 µl nukleasefreiem H₂O von der Säule eluiert. Die Konzentration der RNS wurde spektrofotometrisch bestimmt.

3.4.1.6 Amplifikation von DNS mit der Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

Durch die Polymerase-Kettenreaktion oder PCR, können definierte DNS-Sequenzen aus einem komplexen Gemisch von DNS selektiv vervielfältigt werden. Dazu wurden zwei mindestens 13 bp lange Oligonukleotide (Primer), von denen einer zum 3'-Ende der gewünschten DNS-Sequenz und der andere zum Gegenstrang des 5'-Endes komplementär ist, von einer kommerziellen DNS-Synthesefirma bezogen. Die exponentielle Amplifikation der DNS wird durch multiple Zyklen von thermischer Strangtrennung der DNS, spezifische Bindung der Primer an die Einzelstrang-DNS

und DNS-Synthese durch die thermostabile *Taq*-DNS-Polymerase erreicht. Die PCR Reaktion wurde in 0,2 ml Reaktionsgefäßen in einem *Thermocycler* durchgeführt. Ein typischer Reaktionsansatz sah wie folgt aus:

- 1 µl DNS (50 ng/µl)
- 2 µl 10fach konzentrierter Reaktionspuffer (enthält MgCl₂)
- 4 µl Q-Solution™
- 1 µl 5'-Primer (10 pmol/µl)
- 1 µl 3'-Primer (10 pmol/µl)
- 0,2 µl dNTPs (je 10 mM/Nukleotid)
- 0,2 µl *Taq*-DNS-Polymerase (5 U/µl)
- 10,6 µl H₂O, Überschichtet mit Mineralöl

Die optimalen Bedingungen für die PCR-Reaktion wurden für jedes Primerpaar einzeln bestimmt. Dazu wurden für jedes Primerpaar 6 gleichartige Ansätze nach obiger Anleitung gemischt und im Gradienten-*Thermocycler* wurde für jeden dieser Ansätze eine andere Anlagerungstemperatur für die Primer (46, 50, 54, 58, 62 und 66°C), bei einem ansonsten für alle Proben identischen Programm eingestellt. Für 13-20 bp lange Primer und Amplifikation eines 1 kbp langen DNS-Fragmentes sah eine typische Reaktion wie folgt aus: 5 Min bei 95°C zur initialen kompletten Strangtrennung der DNS; 30 Zyklen mit 35 Sek bei 95°C (Strangtrennung), 45 Sek bei 46-66°C (Bindung der Primer an die Einzelstrang-DNS) und 1 Min bei 72°C (Synthese der DNS durch die Polymerase). Für die Amplifikation von DNS-Fragmenten von mehr als 1 kbp wurde die Zeit für die DNS-Synthese um 1 Min/kbp erhöht. Als letzter Schritt wurde noch einmal für 5 Min bei 72°C inkubiert um die Strangsynthese vollständig abzuschließen. Die so hergestellten DNS-Fragmente wurden dann in einer Gelelektrophorese überprüft. Es wurden nur diejenigen Ansätze aus der Gradienten-PCR zusammengemischt und weiterverarbeitet, die auf dem Gel eine deutlich sichtbare Bande mit der zu erwartenden Größe aufwiesen.

Für die Herstellung der DNS-Fragmente für die Luziferase-Reporterkonstrukte wurden statt 0,2 µl *Taq*-DNS-Polymerase 0,2 µl der *PFU-Turbo*™-DNS-Polymerase benutzt. Diese Polymerase hat im Vergleich zur *Taq*-Polymerase eine viel geringere Fehlerrate, was durch eine Korrekturlesefunktion der Polymerase ermöglicht wird. Das ist bei Reporterkonstrukten besonders wichtig, da schon einzelne Punktmutationen zu einer Störung der regulatorischen Abschnitte in einem Promotor führen können.

Die PCR wurde auch zum Testen von Plasmidtransformationen in Bakterien eingesetzt. Dazu wurden die Bakterienkolonien einzeln direkt von der Transformationsplatte mit einer sterilen Pipettenspitze gepickt und in einen PCR-Ansatz, der bis auf die Primer keine DNS enthielt, gegeben. Durch den initialen Inkubationsschritt bei 94°C wurden die Bakterien lysiert und die Plasmid-DNS in die Reaktionsmischung freigesetzt.

3.4.1.7 Einfügen von Mutationen mit der Polymerase-Kettenreaktion

Um Punktmutationen in putative cis-Elemente der Reporterkonstrukte einzufügen wurde eine PCR-basierte Mutagenesemethode gewählt. Diese beruht darauf, dass das zu mutierende Plasmid mit zwei komplementären Primern, welche mittig die gewünschte Punktmutation enthalten, in eine PCR-Reaktion gegeben werden. Darin werden die Plasmid-Einzelstränge getrennt, die Primer lagern sich an die Plasmid-Einzelstrang-DNS an und werden im Syntheseschritt verlängert. Somit entsteht eine, bis auf die eingebaute Punktmutation komplementäre Kopie jedes Plasmidstranges. Diese Vorgänge werden in 12 Zyklen wiederholt, wobei es im Gegensatz zur Standard-PCR nur zu einer linearen Amplifikation von DNS kommt. Dann wird der gesamte Ansatz mit dem Restriktionsenzym DpnI verdaut, das nur methylierte und hemimethylierte Doppelstrang-DNS schneidet. Die durch die PCR-Reaktion neu synthetisierten DNS-Stränge werden dabei nicht abgebaut, da sie keine Methylgruppen tragen. Solche sind nur an den DNS-Strängen des Matrizen-Plasmids enthalten, woran sie durch bakterielle Methylasen angelagert wurden. Abschließend werden die neu synthetisierten mutationstragenden Doppelstränge in *E. coli* transformiert. In den Bakterien fügen bakterielle Ligasen die Enden der DNS-Stränge zusammen und die mutierten Plasmide werden amplifiziert.

Die Reaktion wurde mit dem *QuickChange-Kit*TM folgendermaßen durchgeführt:

- 5 µl 10fach Reaktionspuffer
- 1 µl 4B7 Plasmid-DNS (5 ng/µl)
- 1,25 µl Mutationsprimer Egr-222 mut fwd (100 ng/µl)
- 1,25 µl Mutationsprimer Egr-222 mut rev (100 ng/µl)
- 1 µl dNTP-Mix
- 40,5 µl H₂O
- 1 µl PFU-TurboTM-DNS-Polymerase (2,5 U/µl)

Die Parameter für die PCR-Reaktion wurden wie folgt gewählt.

- 1 x 95°C für 30 Sek zur Denaturierung
- 12 x 95°C für 30 Sek zur Denaturierung
- 55°C für 1 Min zur Anlagerung der Mutationsprimer
- 68°C für 7 Min zur Elongation durch die DNS-Polymerase

Danach wurde 1 µl des methylierungsabhängigen Restriktionsenzym DpnI direkt in die Reaktion gegeben und für 1 Std bei 37°C inkubiert. Diese DNS-Lösung wurde dann wie in Kap. 3.2.2 beschrieben in *XL1-Blue MRF* transformiert. Nach dem Anzüchten der transformierten Bakterien wurde durch eine Mini-Präp Plasmid-DNS gewonnen und diese durch einen Restriktionsverdau und eine nachfolgende Gelelektrophorese auf das Vorhandensein des Inserts getestet. Außerdem wurde das gesamte Insert sequenziert um die Neumutation zu bestätigen und Mutationen an falscher Stelle auszuschließen. So wurden 2 mutierte Nab2-Reportergerkonstrukte in pGL3 hergestellt (Tab. 3.1).

Konstrukname	Mutation (mutierte Nukleotide sind fett dargestellt)	Matrizenkonstrukt (s. Tab. 3.2)
luc-245_{mut}	Egr1/-222: GCGGGGGCG > CTTGGGGCG	luc-245
luc-872_{mut}	Egr1/-222: GCGGGGGCG > CTTGGGGCG	luc-872

Tab. 3.1: Mutierte Nab2-Reporterkonstrukte. Die Namen der generierten Konstrukte sind in fetter Schrift angegeben und unter dieser Bezeichnung in der Arbeit verwendet.

3.4.1.8 Restriktionsverdau von DNS

Zum Schneiden von doppelsträngiger DNS an genau definierten Sequenzabschnitten wurden Typ II-Restriktionsendonukleasen benutzt. Pro µg DNS wurden 2 U Enzym in den Reaktionsmix gegeben, der außerdem grundsätzlich 100 µg/ml BSA und weitere vom Hersteller empfohlene Pufferzutaten enthielt. Der Verdau wurde bei der für das Enzym optimalen Temperatur für mindestens 1 Std durchgeführt.

3.4.1.9 Dephosphorylierung linearer DNS-Fragmente

Um die Religation linearisierter DNS mit kompatiblen Enden zu vermeiden, wurden 5'-terminale Phosphatgruppen mit alkalischer Phosphatase abgespalten. 1 µg DNS wurde mit 1 U intestinaler Kälberphosphatase (CIP=*cal*f *intestine phosphatase*) über 30 Min bei 30°C inkubiert, anschließende wurde nochmals 1 U CIP in die

Reaktionslösung gegeben und nochmals für 30 Min inkubiert. Durch eine Phenol/Chloroform-Extraktion wurde das Enzym dann inaktiviert und entfernt und die DNS anschließend mit Ethanol gefällt.

3.4.1.10 Ligation von DNS-Fragmenten

Doppelstrang-DNS mit glatten oder überhängenden kompatiblen Enden wurden mit der T4-DNS-Ligase kovalent verknüpft. Dazu wurden 50 ng linearisierter Vektor mit dem 5- bis 10fachen molaren Überschuss des einzuklonierenden DNS-Fragmentes, 1 U T4-DNS-Ligase und 1 µl 10fach-Ligasepuffer gemischt und der Reaktionsansatz mit H₂O auf 10 µl aufgefüllt. Der Ansatz wurde für 2 Std bei RT oder über Nacht bei 16°C inkubiert. Dann wurde der gesamte Ansatz für 20 Min auf einer Nitrozellulose-Dialysemembran mit 13 mm Durchmesser und einer Porenweite von 0,025 µm gegen 10% Glycerin dialysiert und anschließend in Bakterien transformiert.

3.4.1.11 Agarose-Gelelektrophorese von Nukleinsäuren

In einem Agarosegel können Nukleinsäuren durch das Anlegen einer elektrischen Spannung entsprechend ihrer Größe aufgetrennt und identifiziert werden. Außerdem kann das gewünschte DNS-Fragment aus dem Gel isoliert werden. Die Gele wurden aus erhitzter und damit verflüssigter 1,5%iger Agarose in einer Flachbettkammer mit 100 ml Volumen hergestellt. Dazu wurde Typ-II-Agarose in TBE-Puffer suspendiert und in der Mikrowelle so lange gekocht bis sie vollständig gelöst war. Nach Abkühlung auf ca. 50°C wurde die Agarose in die Gelkammer gegossen und ein spezieller Kamm eingesetzt um die Auftragstaschen zu formen. Das Gel wurde in einem TBE Laufpuffer mit 0,03 µg/ml Ethidiumbromid zum Sichtbarmachen der DNS verwendet. Die wässrigen DNS-Proben wurden 6:1 mit 6fach konzentriertem Auftragspuffer gemischt und in die Taschen pipettiert. Es wurde grundsätzlich ein Größenstandard mitlaufen gelassen. Die Elektrophorese wurde bei einer konstanten Spannung (5-10 V/cm Elektrodenabstand) durchgeführt. Danach konnte die DNS im UV-Durchlicht bei 254 nm sichtbar gemacht und so mit einer CCD-Kamera fotografiert werden.

3.4.1.12 Isolation von DNS aus Agarosegelen

Um DNS-Fragmente nach der gelelektrophoretischen Trennung aus dem Agarosegel zu isolieren, wurden sie durch UV-Licht sichtbar gemacht und die gewünschten Banden präzise aus dem Agarosegel ausgeschnitten. Die DNS-Extraktion aus dem Gel wurde dann mit dem *Jetsorb-Kit*TM durchgeführt. Das Grundprinzip bei diesem Kit besteht darin, die DNS nach Schmelzen der Agarose unter Hochsalzbedingungen an eine Silikatmatrix (Glasmilch) zu binden, diese Matrix mehrfach zu waschen um Verunreinigungen zu entfernen und dann die DNS unter Niedrigsalzbedingungen wieder zu eluieren. Pro 100 µg Gel wurden 300 µl des mitgelieferten Puffers A1 und 10 µl der Glasmilch zugegeben und für 15 Min bei 50°C inkubiert, um die Agarose zu schmelzen. Dann wurde für 30 Sek bei 13.000 Upm und RT in einer Tischzentrifuge zentrifugiert und der Überstand verworfen, einmal mit 300 µl Puffer A1 und zweimal mit 300 µl Puffer A2 (Ethanol, NaCl, Tris-HCl, EDTA) gewaschen. Nach nochmaligem Zentrifugieren wurde die Glasmilch bei RT getrocknet und die DNS in 30 µl H₂O durch 30 Min Inkubation bei 50°C eluiert. Nach einem letzten Abzentrifugieren wurde der klare Überstand, der die reine DNS enthielt, abgenommen und konnte direkt für Ligationen oder einen weiteren Restriktionsverdau eingesetzt werden.

3.4.2 Klonierungen

Als Ausgangspunkt aller Klonierungen des Nab2-Promotors wurde der längste, 7.391 bp lange, genomische Nab2-Klon 4B7 als Matrize verwendet. Dieser Klon wurde aus der genomischen Phagen-Bibliothek isoliert und ist im Kap. 4.1.3 beschrieben. Das Adenin des Startkodons der codierenden Nab2-Sequenz wurde mit +1 nummeriert und entspricht der Position 19.626.361 des humanen Chromosoms 12 (Genbank Zugriffsnummer:NT_029419).

Alle Nab2-Reporterkonstrukte enthalten Abschnitte der putativen Nab2-Promotorregion, die durch PCR-Reaktionen sukzessiv vom 5'-Ende verkürzt wurden. Die PCR wurde wie im Kap. 3.4.1.6 beschrieben durchgeführt. Die Sequenzen der benutzten Primer sind in Kap. 2.1.5.2 angegeben. Für alle Konstrukte wurde der gleiche 3'-Primer benutzt, der eine Schnittstelle für das Restriktionsenzym HindIII enthält. Alle 5'-Primer enthalten eine KpnI-Schnittstelle. Alle PCR-Produkte wurden mit Phenol/Chloroform und einer Ethanol-fällung aufgereinigt und mit den

Restriktionsenzymen HindIII und KpnI geschnitten. Der Vektor pGL3Basic wurde mit den gleichen Restriktionsenzymen geschnitten. Geschnittene PCR-Produkte und Vektoren wurden dann über eine Gelelektrophorese gereinigt und aus dem Gel extrahiert. Die Nab2-Fragmente wurden mit der T4-DNA-Ligase in den geschnittenen Vektor ligiert und dann in den *E. coli* Stamm *XL1-Blue MRF* transformiert. Durch Kultivierung der transformierten *E. coli* wurde die DNA amplifiziert, durch Mini- oder Maxi-Präps wieder extrahiert und mittels Restriktionsverdau und Gelanalyse sowie Sequenzierung bei einem kommerziellen Sequenzierservice auf Richtigkeit der Klonierung geprüft. So wurden 17 Verkürzungskonstrukte der 5'-untranslatierten Nab2-Region in pGL3 hergestellt (Tab. 3.2).

Konstruktname	5'-Primer	3'-Primer	Start	Ende	Insertgröße [bp]
luc-58	KpnI +104	HindIII reverse	-58	-22	37
luc-74	KpnI +86	HindIII reverse	-74	-22	53
luc-101	KpnI +60	HindIII reverse	-101	-22	80
luc-150	KpnI +10	HindIII reverse	-150	-22	129
luc-171	KpnI -9	HindIII reverse	-171	-22	150
luc-195	KpnI -34	HindIII reverse	-195	-22	174
luc-213	KpnI -50	HindIII reverse	-213	-22	192
luc-232	KpnI -69	HindIII reverse	-232	-22	211
luc-245	KpnI -82	HindIII reverse	-245	-22	224
luc-256	KpnI -93	HindIII reverse	-256	-22	235
luc-263	KpnI -100	HindIII reverse	-263	-22	243
luc-379	KpnI -200	HindIII reverse	-379	-22	358
luc-468	KpnI -300	HindIII reverse	-468	-22	447
luc-558	KpnI -400	HindIII reverse	-558	-22	537
luc-679	KpnI -500	HindIII reverse	-679	-22	658
luc-872	KpnI -700	HindIII reverse	-872	-22	851
luc-1272	KpnI -1100	HindIII reverse	-1272	-22	1251

Tab. 3.2: Nab2-Reporterkonstrukte. Die Namen der generierten Konstrukte sind in fetter Schrift angegeben und unter dieser Bezeichnung in der Arbeit verwendet. Luc-1272 ist das längst generierte Konstrukt, luc-58 das am weitesten von 5' verkürzte Konstrukt. Die Positionsangaben (Start/Ende) verstehen sich relativ zum A (=+1) des Startkodons der codierenden Nab2-Sequenz.

3.4.3 Primerextensionsversuche

Das Prinzip dieses Verfahrens zur Bestimmung des Transkriptionsstartpunktes eines Gens besteht darin, dass ein am 5'-Ende radioaktiv markiertes Oligonukleotid an zelluläre gesamt-RNS hybridisiert und als Primer für eine reverse Transkriptase-Reaktion benutzt wird. Die Elongation sollte dann durch die reverse Transkriptase bis zum 5'-Ende des mRNA-Moleküls ablaufen. Dieses Ende stimmt genau mit dem Transkriptionsstartpunkt überein. Als Spezifitätskontrolle wird die gleiche Reaktion auch mit tRNA anstatt mit zellulärer gesamt-RNS durchgeführt. Die Reaktionsprodukte werden dann auf einem denaturierenden Polyacrylamidgel analysiert. So kann dann die Länge des cDNA-Produktes ermittelt werden, aus der sich dann die Lokalisation des Transkriptionsstartpunktes ergibt. Um die genaue Größe der Elongationsprodukte feststellen zu können wurde auf dem Gel jeweils eine mit dem selben Primer durchgeführte radioaktive Sequenzierungsreaktion aufgetragen.

3.4.3.1 Primerdesign für die Primerextensionsversuche

Primer für einen Primerextensionsassay sollten möglichst innerhalb der bekannten cDNA eines Gens liegen, aber gleichzeitig so nahe wie möglich an dem erwarteten Transkriptionsstartpunkt. Dies soll artifizielle Strangabbrüche bei der reversen Transkriptase-Reaktion weitgehend vermeiden. Außerdem sollten die Primer mindestens 28 bis 30 Nukleotide lang sein, um eine ausreichend hohe Spezifität in Anbetracht der Präsenz der gesamten zellulären RNS in dieser Reaktion zu gewährleisten. Details zu den Extensionsprimern sind im Kap. 2.1.5.2 zu finden.

3.4.3.2 Radioaktive Markierung von Oligonukleotid-Primern mit ³²Phosphat

Die Primer für die Extensionsreaktion wurden mithilfe der T4-Polynukleotidkinase am 5'-Ende mit ³²Phosphat markiert. Die Reaktion wurde wie folgt angesetzt:

- 1 µl Primer (10 pmol/µl)
- 10 µl ATP [γ -³²P]
- 1 µl T4-Polynukleotidkinase (10 U/µl)
- 2 µl 10fach Reaktionspuffer
- 6 µl H₂O

Der Reaktionsansatz wurde für 45 Min bei 37°C inkubiert, anschließend wurde das Enzym durch Erhitzen auf 68°C für 10 Min inaktiviert und die DNS dann mit *NucTrap-Säulen*TM entsprechend dem Protokoll in Kap. 3.4.4.4 aufgereinigt.

3.4.3.3 Die Primerextensionreaktion

Die Zellen in einer zu 80-90% konfluenten 150 cm² Zellkulturflasche wurden 4 Std vor dem Ernten mit PMA stimuliert (s. Kap. 3.1.3), mit PBS/EDTA abgelöst, abzentrifugiert und der Überstand verworfen. Dann wurde mit dem *RNEasy-Mini-Kit*TM (s. Kap. 3.4.1.5) die totale RNS aus den geernteten Zellen präpariert. Der Reaktionsansatz für die Primerextension war folgendermaßen:

2 µl der Lösung mit dem radioaktiv markierten Extensionsprimer (s. Kap. 3.4.3.2) wurden zu 40-100 µg totaler RNS (bzw. tRNS in der Kontrollreaktion) in 22 µl wässriger Lösung gegeben, für 2 Min auf 95°C erhitzt und dann auf Eis abgekühlt. Dazu wurden 8 µl Erststrang-Puffer, 4 µl DTT (0,1 M) und 2 µl dNTP (10 mM) gegeben. Dann wurde der Ansatz für 10 Min auf 37°C erhitzt um die Anlagerung des Primers an die RNS zu ermöglichen. Der Ansatz wurde auf 47°C vorgewärmt und 2 µl der *SuperScript-II*TM-reversen Transkriptase (200 U/µl) zugegeben. Nach der Inkubation bei 47°C für 50 Min wurde die Transkriptase durch 15 Min Erhitzen auf 72°C inaktiviert.

Schließlich wurde die neu synthetisierte cDNS durch eine Phenol/Chloroform-Extraktion aufgereinigt und anschließend mit Ethanol gefällt. Die gefällte und getrocknete DNS wurde dann in 20 µl H₂O gelöst und zusammen mit der Sequenzierungsreaktion (s. Kap. 3.4.3.4) auf ein Polyacrylamidgel aufgetragen (s. Kap. 3.4.3.5).

3.4.3.4 Sequenzierung von DNS nach der Didesoxymethode

Für die Sequenzierungsreaktion zur Bestimmung des genauen Transkriptionsstartpunktes in den Primerextensionsversuchen, wurde die Didesoxymethode nach Sanger gewählt (Sanger et al., 1977). Sie wurde mit den Extensionsprimern und dem genomischen Nab2-Klon 4B7 als Matrize durchgeführt. Dazu wurde der *Sequenase*TM-2.0-DNA-Sequenzierkit benutzt. Die Reaktion wurde wie folgt durchgeführt:

Primeranlagerung an den genomischen Nab2-Klon 4B7:

- 5 µl 4B7 DNS-Lösung (2µg/µl)
- 2 µl H₂O
- 2 µl Sequenase™-Reaktionspuffer
- 1 µl Extensionsprimer (1 pmol/µl)

Dieser Ansatz wurde für 2 Min auf 65°C erhitzt und dann für 30 Min bei RT langsam abkühlen gelassen um die Anlagerung der Primer an die Matrizen-DNS zu ermöglichen. Danach wurde die DNS-Lösung auf Eis überführt.

Die Markierungsmischung für die radioaktive Markierung der Sequenzierprodukte wurde folgendermaßen verdünnt:

- 2 µl Markierungsmischung für dGTP (enthält dGTP, dCTP, dITP)
- 8 µl H₂O

Die Markierungsreaktion wurde so angesetzt:

- 10 µl der eiskalten DNS-Lösung mit dem angelagerten Primer
- 1 µl DTT (0,1 M)
- 2 µl verdünnte Markierungsmischung
- 0,5 µl dATP [α -³²P]
- 2 µl Sequenase™-DNS-Polymerase (1:8 in Sequenase™-Verdünnungspuffer)

Dieser Ansatz wurde gut gemischt und für 2 Min bei RT inkubiert. Danach wurden jeweils 3,5 µl davon zu je 2,5 µl der 4 verschiedenen, auf 37°C erhitzten Terminationsmischungen (ddGTP, ddATP, ddTTP, ddCTG) gegeben und für weitere 5 Min bei 37°C inkubiert. Schließlich wurden 4 µl der Stopp-Lösung in jedes der vier Reaktionsgefäße gegeben. Die vier Ansätze wurden zusammen mit der Primerextensionsreaktion auf einem denaturierenden Polyacrylamidgel aufgetrennt.

3.4.3.5 Auftrennung von DNS auf einem Polyacrylamidgel

Für die Auftrennung wurden denaturierende Polyacrylamidgele verwendet, die selbst DNS-Stränge mit nur einer Base Größenunterschied auftrennen können. Die 9%ige denaturierende Polyacrylamidlösung wurde wie folgt angesetzt:

- 9 ml Acrylamid (38%)/Bisacrylamid (2%)-Lösung
- 16,8 g Harnstoff
- 4 ml 10fach TBE

30 µl TEMED
300 µl APS 10% (m/v)

Die Lösung wurde sofort zwischen zwei 380 x 200 mm Glasplatten gegeben, von denen eine 30 Minuten vor dem Gießen des Gels mit *Repell*-Silan bestrichen wurde. Die Platten wurden von 0,4 mm Abstandshaltern auf Distanz gehalten. Dann wurde ein spezieller Kamm eingefügt um die Taschen für das Auftragen der DNS-Lösung zu formen. Nach mindestens 2 Std Polymerisation konnte das Gel benutzt werden.

Jeweils 20 µl der zu analysierenden DNS-Proben aus der Primerextensionreaktion bzw. aus der Sequenzierungsreaktion wurden mit 4 µl Auftragspuffer für Polyacrylamidgele gemischt und für 2 Min auf 95°C erhitzt um die DNS-RNS-Hybride bzw. die DNS-Stränge zu trennen. Anschließend wurden sie sofort auf Eis überführt. Jeweils 10 µl der Primerextensionsreaktion und 4 µl der Sequenzierungsreaktionen wurden auf das Gel aufgetragen, für 10 Min bei 400 V und für weitere 1,5 Std bei 1.100 V mit TBE als Laufpuffer laufen gelassen.

Schließlich wurde das Gel aus der Apparatur entnommen, und die Glasplatte die vorher mit dem *Repell*-Silan beschichtet wurde, durch leichten Zug vorsichtig gelöst. Das Gel wurde auf der anderen Glasplatte bei 37°C im Wärmeschrank getrocknet, in Frischhaltefolie gewickelt und auf einen Röntgenfilm gelegt. Auf der Rückseite des Röntgenfilms wurde eine Szintillationsfolie angebracht um das Signal zu verstärken. Nach Belichtung für 24 bis 48 Std bei -80°C wurde der Röntgenfilm in einem automatischen Röntgenfilmentwickler entwickelt.

3.4.4 Southern-Blot

Der Southern-Blot ist eine Methode zur Identifikation von DNS-Fragmenten, die eine bestimmte Nukleotidsequenz enthalten. Dazu wird das zu untersuchende DNS-Gemisch zuerst nach der Größe auf einem Agarosegel aufgetrennt und anschließend auf eine Nylonmembran übertragen. Durch die Hybridisierung der an Nylon gebundenen DNS mit einer markierten DNS-Sonde bekannter Sequenz können dann diejenigen DNS-Fragmente auf der Membran identifiziert werden, die eine der Sonde komplementäre Sequenz enthalten.

3.4.4.1 Gelelektrophorese und Blotten der DNS

Zuerst wurde das DNS-Gemisch, das aus einem Restriktionsverdau der λ -Phagen-DNS aus Kap. 3.4.5.4 stammte, auf einem 0,8%igen Agarosegel im elektrischen Feld aufgetrennt. Danach wurde das Gel zusammen mit einem Millimeter-Maßstab unter der CCD-Kamera fotografiert. Das Gel wurde dann für 20 Min in 0,25 N Salzsäure gebadet, einmal mit H₂O gewaschen, als nächstes für 40 Min in 0,5 N Natronlauge mit 1,5 M NaCl gebadet und erneut mit H₂O gewaschen und abschließend für 40 Min in 0,5 M Tris-HCl (pH 7,2) mit 3,0 M NaCl gebadet und nochmals mit H₂O gewaschen. Durch diese Schritte werden zuerst Strangbrüche in die DNS eingefügt, was später den Transfer von langen DNS-Fragmenten auf die Membran erleichtert. Dann wird die DNS denaturiert um die spätere Hybridisierung zu ermöglichen.

Das so behandelte Agarosegel wurde auf eine Nylonmembran gelegt und die DNS über Nacht durch einen geringen Flüssigkeitsstrom des 20fach SSC-Puffers, der durch das auf der Rückseite der Nylonmembran aufgebrachte Filterpapier aufrecht erhalten wurde, auf diese übertragen.

Die Nylonmembran wurde in 2fach SSC gewaschen, zwischen zwei Whatman-Papieren getrocknet und im *UV-Crosslinker* mit Licht der Wellenlänge 254 nm und 120.000 Mikrojoule/cm² bestrahlt, so dass die DNS kovalent an das Nylon gebunden wurde.

3.4.4.2 Herstellung der DNS-Sonde für Southern-Blot und λ -Phagen-Screen

Die DNS-Sonde für die Hybridisierung wurde durch Restriktionsverdau des Nab2-cDNS-Plasmides pCMVNAB2 mit den Restriktionsendonukleasen HindIII und PflMI hergestellt. Dieser Verdau lieferte 4 Fragmente, von denen das 505 bp lange Fragment eine 463 bp lange Sequenz vom 5'-Ende der Nab2-cDNS enthält (s. Abb. 3.1).

```

1  agcttgattc actatagggc tcgcgcggcc gcccgggcag gtCGCCGGAC CCTGCAGCCC AGACTCAAGC CCAGTGCCCG
81  AGCCATGGCA CTGCCTCGGA CGCTGGGGGA GCTGCAGCTG TACCGGGTCC TGCAGCGCGC CAACCTCCTT TCCTACTATG
161 AGACCTTCAT CCAGCAGGGA GGGGACGACG TGCAGCAGCT GTGTGAGGCG GGTGAGGAGG AGTTTCTGGA GATCATGGCA
241 CTGTGTGGCA TGGCCACCAA GCCCCTCCAT GTCCGGCGCC TGCAGAAGGC ACTGAGAGAG TGGGCCACCA ATCCAGGGCT
321 CTTCAGTCAA CCAGTGCCCTG CTGTTCCCGT CTCCAGCATC CCGCTCTTCA AGATCTCTGA GACTGCGGGT ACCCGGAAAG
401 GGAGCATGAG CAATGGGCAT GGCAGCCCAG GGGAAAAGGC AGGCAGTGCC CGCAGTTTFA GCCCCAAGAG CCCCTTGAA
481 CTTGGAGAGA AGCTATCACC ACTGC

```

Abb. 3.1: Sequenz der Hybridisierungssonde aus pCMVNAB2. Vektoranteile sind in Kleinbuchstaben dargestellt. Der Anteil aus der humanen Nab2-cDNS ist 463 bp lang und entspricht den Basenpaaren 215 bis 677 der Nab2-cDNS-Sequenz in der GenBank (Zugriffsnummer: HSU48361).

Dieses Fragment wurde über eine Gelelektrophorese identifiziert und durch eine Gelextraktion isoliert.

3.4.4.3 Radioaktive Markierung der Hybridisierungssonde mit ^{32}P Phosphat

Für die radioaktive Markierung der Sonde aus Kap. 3.4.4.2 wurde die Zufallsprimer-Markierungsmethode nach Feinberg und Vogelstein gewählt (Feinberg and Vogelstein, 1983). Dazu wurden 100 ng der doppelsträngigen 463 bp DNS-Hybridisierungssonde in 5 μl H_2O gelöst und für 5 Min auf 95°C erhitzt, so dass sich die beiden komplementären DNS-Stränge trennen. Durch rasches Abkühlen auf Eis wurde eine Wiederaneinanderlagerung der Stränge verhindert. Der Reaktionsansatz für die radioaktive Markierung wurde wie folgt gewählt:

- 10 μl Oligomarkierungs-Puffer (enthält hexamere Zufallsprimer)
- 2 μl BSA (10mg/ml)
- 5 μl DNS-Hybridisierungssonde (100 ng)
- 5 μl dATP [$\alpha\text{-}^{32}\text{P}$]
- 0,5 μl Klenow-DNS-Polymerase (6 U/ μl)
- mit H_2O auf 50 μl Gesamtvolumen aufgefüllt

Während der 3 Std Inkubationszeit bei RT konnten die Zufallsprimer an die DNS-Einzelstränge binden und durch die Klenow-DNS-Polymerase wurde daran in 5'-3'-Richtung der restliche Strang synthetisiert. Dabei wurden die ^{32}P Phosphat-haltigen und somit β -Strahlung emittierenden dATP [$\alpha\text{-}^{32}\text{P}$] in die neu synthetisierten Stränge inkorporiert.

Um nicht inkorporierte radioaktive dATPs abzutrennen, die in der Hybridisierungsreaktion eine hohe Hintergrundaktivität verursachen können, wurde die Probe über eine *NucTrap-Säule*TM aufgereinigt (Kap. 3.4.4.4).

3.4.4.4 Reinigen radioaktiv markierter DNS mit *NucTrap-Säulen*TM

Die *NucTrap-Säule*TM wurde mit 80 μl STE-Puffer vorgespült. Die Probe aus Kap. 3.4.4.3 bzw. die Extensionsprimer aus Kap 3.4.3.2 wurden mit 30 μl STE-Puffer verdünnt. Dann wurde sie auf die Säule gegeben, mithilfe einer Spritze durch die *NucTrap-Säule*TM gedrückt und in einem Reaktionsgefäß aufgefangen. In der Säule wurden alle nicht inkorporierten Nukleotide an die Säulenmatrix gebunden. Die

DNS-Stränge werden dagegen durchgelassen. Die Säule wurde einmal mit 80 µl STE nachgespült und auch die Spülflüssigkeit wurde aufgefangen. Die nun aufgereinigten, radioaktiv markierten DNS-Sonden bzw. Primer konnten dann bei -20°C für bis zu 4 Wochen gelagert werden.

3.4.4.5 Hybridisierung von Nukleinsäure-tragenden Membranen

Um DNS-Fragmente sequenzspezifisch auf einer Southern-Blot-Membran oder auf einer Phagen-DNS-tragenden Nitrozellulosemembran zu identifizieren, wurden diese Membranen mit radioaktiv markierten DNS-Sonden hybridisiert. Die Methode beruht darauf, dass ein einzelsträngiges DNS-Fragment bekannter Sequenz spezifisch an eine andere einzelsträngige DNS binden kann, wenn diese eine komplementäre Sequenz enthält.

Für die Hybridisierung wurde die Nylon- oder Nitrocellulosemembran mit 2fach SSC-Puffer benetzt und so in eine Hybridisierungs-Glasröhre gegeben, dass die DNS-tragende Seite der Membran zum Lumen hin wies. Dann wurden 100 µg/ml Lachssperma-DNS, die für 5 Min auf 95°C erhitzt und dann sofort auf Eis gegeben wurden, zu 40 ml DNS-Hybridisierungslösung gegeben und dies in die Glasröhre gefüllt. In dem auf 65°C vorgeheizten Hybridisierungssofen wurde die Röhre für 3 Std unter ständiger Rotation inkubiert. So kann die Lachssperma-DNS alle unspezifischen DNS-Bindestellen auf der Oberfläche der Membran besetzen und damit eine unspezifische Bindung der radioaktiven Hybridisierungssonde im nächsten Schritt vermeiden.

Die Hybridisierungslösung wurde dann durch 40 ml frische Lösung ersetzt, zu der die kurz zuvor für 5 Min auf 100°C aufgekochte und dann auf Eis überführte radioaktiv markierte Hybridisierungssonde gegeben wurde. Die Sonde musste eine Aktivität von mindestens 80×10^6 cpm haben. Die Membran wurde für weitere 16 Std im Hybridisierungssofen unter ständiger Rotation der Röhre bei 65°C inkubiert.

Nach Ende der Inkubationszeit wurde die Membran aus der Glasröhre genommen und je 2-mal für 15 Min in 3fach SSC mit 0,1% SDS, 1fach SSC mit 0,1% SDS, 0,3fach SSC mit 0,1% SDS und 0,1fach SSC mit 0,1% SDS gewaschen und danach auf Whatmanpapier getrocknet.

Die trockenen Membranen wurden dann in Frischhaltefolie gewickelt und zur autoradiographischen Detektion auf einen Röntgenfilm gelegt, auf dessen Rückseite zur Signalverstärkung eine Szintillationsfolie angebracht wurde. Der Röntgenfilm wurde über Nacht bei -80°C belichtet und anschließend in einem automatischen Röntgenfilmentwickler entwickelt.

3.4.5 Screening der λ -Phagen-Bibliothek

Um die auf Kulturplatten gezüchtete Phagenbibliothek CL202 nach der genomischen Nab2-DNS-Sequenzen zu durchsuchen, wurden die Oberflächen der Kulturplatten auf Nitrocellulosemembranen abgeklatscht. Die Membranen wurden dann mit der radioaktiv markierten 463 bp Nab2-DNS-Sonde hybridisiert. Durch eine Autoradiographie konnten dann Plaques identifiziert werden, welche die gesuchte Nab2-DNS enthielten. Durch einen Vergleich der Hybridisierungsmembran mit der zugehörigen Kulturplatte konnten die entsprechenden Plaques aufgesucht und vitale λ -Phagen zur weiteren Kultur und DNS-Isolation gewonnen werden.

3.4.5.1 Herstellen von Abklatschmembranen von Phagenkulturen

Die λ -Phagen wurden wie in Kap. 3.3 beschrieben in 150 mm Kulturplatten frisch, über Nacht kultiviert. Dann wurde eine Nitrocellulosemembran mit 132 mm Durchmesser direkt auf die Agaroseoberfläche gelegt und dort bei RT für 1 Min belassen. In diesem Schritt bindet die in den Phagenplaques enthaltene DNS an die Membran. Um eine zweite Membran von der selben Platte herzustellen wurde ebenso verfahren, es wurde lediglich die Kontaktzeit auf 1 Min 30 Sek verlängert. Während die Membranen auf der Platte lagen, wurden mit einer Nadel 3 Löcher durch die Membran in die Agarose gestochen. Dies erlaubte die Rekonstruktion der ursprünglichen Ausrichtung der Membran auf der Agarose nach der Hybridisierung.

Dann wurde die Membran vorsichtig mit einer Pinzette abgezogen und 1 Min in Denaturierungslösung, danach 5 Min in Neutralisierungslösung und schließlich kurz in 2fach SSPE gewaschen. Die Membran wurde auf Whatmanpapier getrocknet und dann für 2 Std bei 80°C gebacken, so dass die Nukleinsäuren fest an die Nitrocellulose binden konnten. Die Membranen konnten lichtgeschützt für mehrere Monate aufbewahrt werden.

3.4.5.2 Identifizierung und Isolierung von Phagenplaques

Um Phagenplaques, die die genomische Nab2-DNS enthielten, zu identifizieren, wurden je 2 Abklatschmembranen von zehn 150 mm Phagenkulturplatten hergestellt und entsprechend Kap. 3.4.4.5 mit der 463 bp Nab2-Hybridisierungsprobe (s. Abb. 3.1) durch radioaktive DNS-Hybridisierung *gescreent*. Es wurden nur Plaques auf der Platte aufgesucht und mit einer Pasteurpipette herausgestanzt, die auf beiden von einer Phagenkulturplatte stammenden Abklatschmembranen in der Autoradiographie positiv waren. Ein auf diese Weise gewonnener Agarosezylinder wurde in 1 ml SM, das mit 50 µl Chloroform versetzt wurde, gegeben und für 2 Std bei RT stehen gelassen. Diese neue Stammlösung, die im Idealfall bereits monoklonal war, wurde dann bis zur zweiten Hybridisierungsrunde bei 4°C aufbewahrt. Um die Klonalität zu testen wurden daraus Phagenkulturen auf zwei 150 mm Agaroseplatten hergestellt und auf Nitrocellulosemembranen übertragen. Die Membranen wurden wie beschrieben hybridisiert und falls alle Plaques in der Autoradiographie positiv waren, wurde aus der Stammlösung eine präparative Phagenkultur angelegt. Falls die Stammlösung noch durch negative Plaques verunreinigt war, wurde wiederum ein positiver Plaque ausgestanzt, eine neue Stammlösung daraus hergestellt und erneut hybridisiert, so lange bis alle Plaques auf der Platte in der Autoradiographie der Hybridisierungsmembran positiv erschienen.

3.4.5.3 Herstellen größerer Mengen Phagenstammlösung

Je 100 µl der aus einem einzelnen Plaque entsprechend Kap. 3.4.5.2 hergestellten Phagenstammlösung, wurden mit je 100 µl Bakteriensuspension gemischt und auf zwei 90 mm Agaroseplatten wie im Kap. 3.3 beschrieben ausplattiert. Nach Übernachtskultur bei 37°C wuchs auf beiden Platten ein konfluent Phagenrasen. Auf jede der beiden Platten wurden 3 ml SM-Puffer gegeben und für 2 Std bei RT inkubiert. Der SM-Puffer wurde in ein Reaktionsgefäß überführt und die Platten wurden nochmals mit 1 ml SM überschichtet und weitere 10 Min stehen gelassen. Der Puffer wurde abgenommen und zu dem vorher aufgehobenen Puffer gegeben. Dazu wurden 100 µl Chloroform gegeben und bei 4°C mit 4.000 g für 10 Min zentrifugiert. Dann wurde die wässrige Phase, in der die Phagen gelöst waren, vorsichtig in ein neues Reaktionsgefäß überführt. Diese Lösung wurde mit 0.3% Chloroform versetzt und konnte bei 4°C aufbewahrt werden.

3.4.5.4 Präparation von λ -Phagen-DNS

Um DNS aus λ -Phagen zu präparieren, wurden je 300 μ l der unverdünnten Stammlösung aus Kap. 3.4.5.3 wie im Kap 3.3 beschrieben auf zehn 150 mm Platten ausplattiert. Dies sollte zu einem konfluenten Phagenrasen führen. Nach Übernachtinkubation wurden je 10 ml SM-Puffer auf die Platten gegeben und diese für 2 Std bei RT auf dem Schüttler inkubiert. Danach wurde der Puffer vorsichtig von den Platten abgenommen, nochmals je 3 ml SM-Puffer auf die Platten gegeben und sofort wieder herunterpipettiert. Dann wurde der gesamte eingesetzte SM-Puffer zusammengegeben. Diese Lösung wurde dann bei 8.500 Upm und 4°C für 10 Min in einer Ultrazentrifuge zentrifugiert. Der Überstand wurde abgenommen, mit RNaseA und DNaseI in einer Endkonzentration von 1 μ g/ml versetzt und bei 37°C für 30 Min inkubiert. Dann wurde ein gleiches Volumen an PEG-SM-NaCl zu der Probe gegeben und diese für 1 Std in Eiswasser belassen. Nach der Zentrifugation bei 10.000 Upm bei 4°C für 20 Min ohne Bremse, wurde der Überstand vorsichtig abgegossen und das Pellet in 4 ml SM resuspendiert.

Die λ -Phagen in der Probe wurden durch Zugabe von 20 μ l 20% SDS und 40 μ l 500 mM EDTA für 15 Min bei 68°C lysiert. Durch eine Phenol/Chloroform-Extraktion und eine Ethanol-fällung konnte dann die in den Phagen enthaltene DNS für die Weiterverarbeitung isoliert werden.

3.5 Computeranalysen

3.5.1 Sequenzalignment von DNS-Sequenzen

Um Sequenzen mit Genbank-Sequenzen zu vergleichen, wurde eine *BLAST*-Suche am *NCBI* (Bethesda, USA) durchgeführt (<http://ncbi.nlm.nih.gov/BLAST>) (Altschul et al., 1990). Dazu wurde der *blastn*-Algorithmus benutzt, der auch ein *Alignment* der gefundenen homologen Sequenzen durchführt.

Um zwei bekannte DNS-Sequenzen miteinander zu vergleichen, wurde das *ALIGN*-Programm am *Institut de Génétique Humaine* (Montpellier, Frankreich) verwendet.

3.5.2 CpG-Insel-Suche

DNS-Sequenzen wurden mit dem *CpG-Islands-Plot*-Werkzeug aus der *EMBOSS-Software* (<http://www.ebi.ac.uk/emboss/cpgplot/>) (Rice et al., 2000) auf das Vorkommen von CpG-Inseln untersucht. Als Startparameter wurden GC Gehalt > 50%, beobachtete CpG/erwartete CpG > 0,60 und eine Mindestlänge für signifikante CpG-Inseln von 200 bp gewählt.

3.5.3 Identifizierung putativer Promotoren und cis-regulatorischer Elementen

Die Nab2-5'-Region wurde mit der *Genomatix-Software* (<http://www.genomatix.de>) auf Promotoren (*PromoterInspector*TM) und putative Transkriptionsfaktor-Bindestellen (*MatInspector-Professional*TM, Version 6.2.1) untersucht (Quandt et al., 1995; Scherf et al., 2000).

3.5.4 Nuleinsäuresequenz-Bearbeitung und Primerdesign

Dazu wurde die Software *Gene-Runner*TM, Version 3.05 von *Hastings Software* (New York, USA) benutzt.

4 Ergebnisse

4.1 Isolierung und Charakterisierung des humanen Nab2-Gens

4.1.1 Isolierung der genomischen Nab2-DNS aus einer λ -Phagen-Bibliothek

Da bisher nur die cDNS des Nab2-Gens bekannt war, musste die genomische Nab2-DNS isoliert und sequenziert werden. Dazu wurde die λ -Phagen-Bibliothek CI202, die humane genomische Leukozyten-DNS enthält, mit einem 463 bp großen Fragment aus dem offenen Leserahmen der Nab2-cDNS wie in Kap. 3.4.5 beschrieben durchsucht.

Mit der 463 bp Nab2-Sonde wurden ca. 250.000 Klone der DNS-Bibliothek *gescreent*. Dabei zeigten 14 Klone ein positives Signal. Sie wurden isoliert und in einer zweiten Runde erneut mit der 463 bp Sonde hybridisiert. Beim zweiten Durchgang lieferten nur noch vier der ursprünglich 14 Klone ein positives Signal. Nach einer dritten Hybridisierung mit der 463 bp Sonde waren zwei dieser Klone ohne weitere Verunreinigung durch negative Phagenplaques auf der Kulturplatte vorhanden. Diese beiden Klone wurden dann im präparativen Maßstab angezüchtet und die λ -Phagen-DNS isoliert. Die beiden Klone erhielten die Bezeichnungen m1 und m4.

4.1.2 Southern-Blot-Analyse und Umklonierung der isolierten λ -Phagen-DNS

λ -Phagen können als Vektoren DNS-Fragmente bis zu einer Größe von ca. 24 kbp (Sambrook and Russell, 2001) aufnehmen. Derart lange DNS-Stränge sind schwer zu bearbeiten. Deswegen sollte ein kleineres DNS-Fragment, das alle Nab2-Exons und -Introns sowie ungefähr 2.000 bp stromaufwärts vom bekannten cDNS-Ende enthält, in einen Plasmidvektor umkloniert werden. Die in diesem Konstrukt vorhandene 5'-untranslatierte Region sollte dann mit hoher Wahrscheinlichkeit auch den Promotor enthalten, der in der Regel innerhalb der ersten 1.000 bp stromaufwärts vom Translationsstartpunkt liegt (Zhang, 1998). Bei diesem Vorgehen zur Isolation der regulatorischen DNS-Abschnitte werden allerdings eventuell weiter stromaufwärts gelegene regulatorische Sequenzen, wie z.B. *Enhancer* oder *Silencer*, nicht berücksichtigt.

Um ein entsprechendes DNS-Fragment in den Phagenklonen m1 und m4 zu identifizieren, wurden sie jeweils mit den Restriktionsenzymen BamHI, EcoRI, HindIII und PstI verdaut. Der Klon m1 wurde zusätzlich mit PvuI verdaut. Nach der elektrophoretischen Auftrennung der verdauten DNS auf einem Agarosegel, wurde dieses in einem Southern-Blot mit der 463 bp Nab2-cDNS-Sonde analysiert (Abb. 4.1).

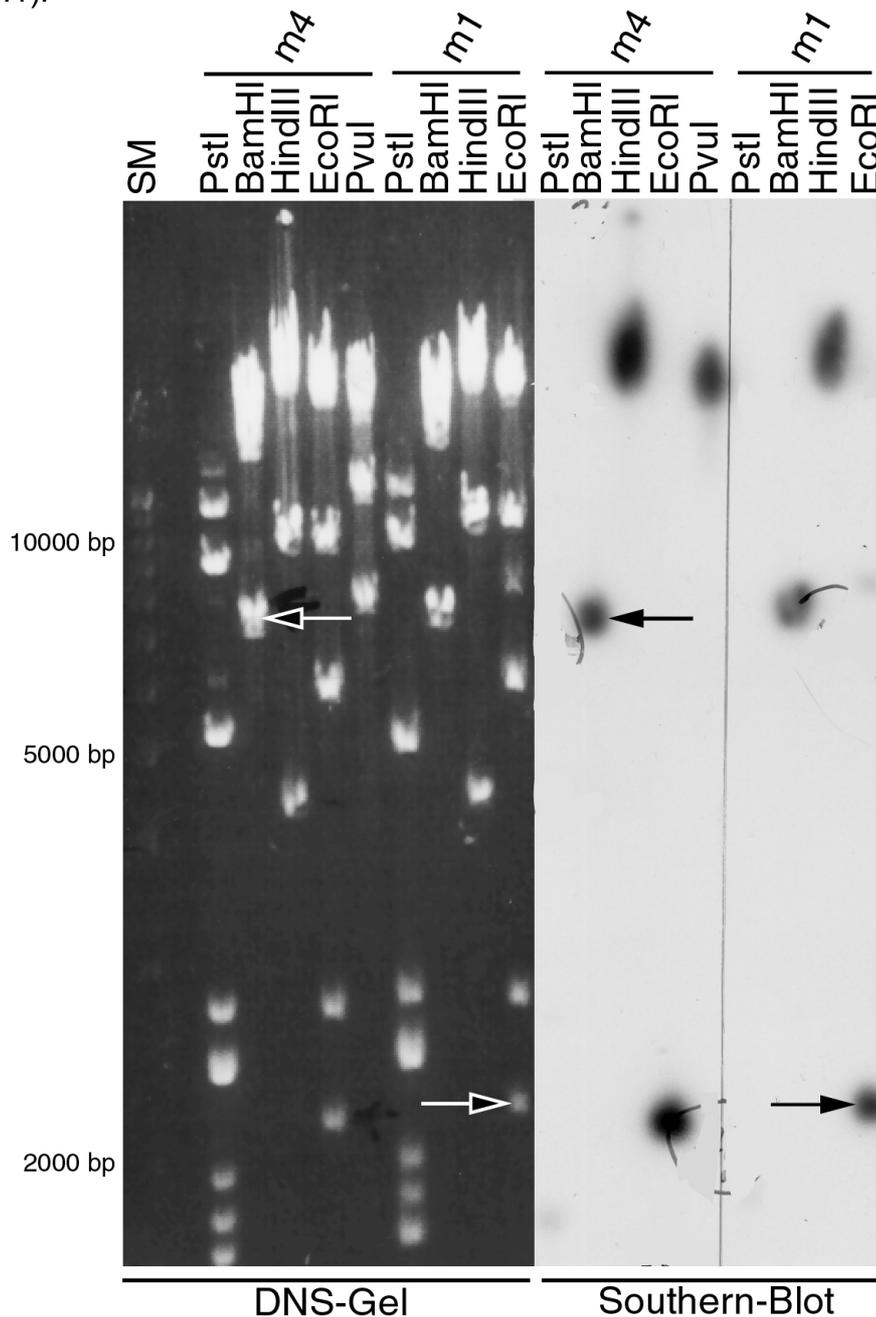


Abb. 4.1: DNS-Gel (links) und Southern-Blot-Autoradiographie (rechts) nach dem Verdau der Klone m1 und m4 mit Restriktionsenzymen. Die für die Subklonierung ausgewählten Banden sind mit einem Pfeil gekennzeichnet. SM = Standardmarker (2.000 bp – 12.000 bp, Bandenabstand 1.000 bp) .

Nach dem Verdau mit BamHI korrelierte eine ca. 7.500 bp große Bande im Agarosegel mit der einzig positiven Bande im Southern-Blot. Diese Bande aus dem Klon m4 wurde aus dem Gel extrahiert, in die BamHI-Restriktionsschnittstelle des Plasmidvektors *pBluescript-II SK+* ligiert und in *XL1-Blue MRF* Bakterien transformiert. Dieses neue Konstrukt erhielt die Bezeichnung 4B7. Außerdem war eine ca. 2.100 bp große Bande nach dem Verdau mit EcoRI im Southern-Blot stark positiv. Diese konnte aus dem Klon m1 in die EcoRI-Restriktionsschnittstelle von *pBluescript-II SK+* kloniert werden. Dieses Konstrukt erhielt die Bezeichnung 1E10.

4.1.3 Sequenzierung der humanen Nab2-Klone

Die Sequenzierung wurde mit den Primern T3 und T7 auf beiden Seiten des Inserts begonnen. Diese Primer binden an bekannte Sequenzabschnitte des *pBluescript-II*-Vektors und lassen die Sequenzierungsreaktion von dort aus in das Insert hinein laufen. Danach wurden speziell angefertigte Primer verwendet, die kurz vor dem 3'-Ende der jeweils vorhergehenden Sequenzreaktion liegen. So wurde sowohl der Sinn- wie auch der Gegensinnstrang der gesamten einklonierten DNS jeweils mindestens einmal durchsequenziert. Im Falle von Diskrepanzen zwischen den Sinn- und Gegensinn-Sequenzdaten wurde so oft sequenziert bis die Datenlage eindeutig war. Die mit BamHI aus dem Phagenklon m4 klonierte Sequenz des Nab2-Gens ist genau 7.391 bp lang (Abb. 4.2).

```

1      GGATCCAAAA TAACCTGAGG TGGGGGGGGA GGGGTCGCCC ACACCCCGTA CGGGGTCGGG AGCGTCCCCA GGGGAGCCCG
81     TCTAGCCGCA CCTTCCAGTT GCGGGGCGGG GGAAGTGGAG ACGGGACTCT GCTCGTTCCT ACCACCCCA CTGTGTTTGG
161    CGCTTAATAG GTTGGAGAAG AGGACCTGAG CAACTGAAAT CCTCCACCA ACAACGCGCT CCTTCTCCCC GGACCCACA
241    AGGCGGAAAG GTCTCCTCGC TAGGCCACAT TGTAAAACCA GCCCCGGTCC ACGGCCCTCA CGCCCCGCA TGCCCCACCC
321    CAGCCCCTCA GAAGTGC GGA CAGAGAGCG GGGCGGGGCT GAGATTCCGG ACTAGGGGAA ACCTCACCTG TGGCCAGTCC
401    GCTCGCTTTC CCCGGCCCC ACCCCCCCTC CTTTCCCTGG GGCTTAGAGT CTATGGGCCG GCGCCCTAGA GCCCCGCTC
481    CCCCCAACAG CCTTCCCAGC CGTGGGCGGG AGTGCAATGC GAACCATGATG GGGCTAGGAG AAACCAAAGG GGGAGACGGT
561    GGTGGGTTGC AGAGGCGGGG GCTAAGCTCC TTCAAGGCGC TCTCCTTCC AGCTCCGCGG CAGGAAGTCA CGTCGTAGGC
641    TCCCGACCTC TTACTCATCT TCCACTAGAC TCTCGGGCGA GGTCCCTAAT AGACGGCCCC AGGAAGGGTA TCGTCTTTGT
721    CACACAAAAT TCCAGGCAG GGCCTCATCC TCAGCAAACA GAGGACAAGT GGAGGAATCC CTGCCTGACC TACGCGCTGA
801    CAAAAGCCGA CGCGTCTAAT CAACACGCGC ACCTAAGTGG TGGCGTGCAG CATAACCCTC CCATTCCTGT TTCCCAAAT
881    TTCCAGGCTA GCATGGAGGC CTGGGTTTCT GAGAGCGACC CCTCAGATT ATTCCATTGG GGCTGAGGAG GGGCGCGGG
961    ATATCTAGGA GATCCCTGCA GAGCCCCACG CTCTCAGGCC CGCCTTAAGT GCACACTATA CGGGAGTCAG ATGCACGCAC
1041   AGGAGAAGCC GCACAGCCCA GCCTTCGCTA ACTTTTCCCG GCTCACTGCT AACATTACA CGTCCAGCAC CACAAGGCCT
1121   GAGTATGGGC AACGGGCGTC CCCGTAGTTG TTTAGGCGCG TGTGCACGTC CGTGCCTTTC TGTGTCTTTG TGTACTTGTG
1201   CGTGGTTGTG AAACCTCCTCT CTCAGCTCGG AGGGGTGGGG GAGAGAAGGA ATGTCCGCGG CGGGGCGCTC ACCTGGGTAC
1281   GTGGGCGCCA AGAGGGCCGG CTGTGCATCC GGCCTGGGCG GCACAGAACG ACCTCGCCCC GCGGCTGGG TCCCCAAGCC
1361   CGCCTGCAC AGCCGGGCGT CGGTCACTC GGTCCCAATC TCGGCGCCCC GGCTCTGAAT CCCCCTGCTC GCCTCTGCT
1441   CCACACCCCT TCCCCCCCC TCTCCGCTC TCCAGTCTC TAAGCCGCGG CGTCTCCGCG GCCGAGAGGC CCCAGCGCC
1521   CCCTCCCCCG CCCCCCGCC CACCCCGCTG CCCACGCTCT CCGGCGCTCG CCGCCGCTCA CCGGCGGAGC CAGGAGGCT
1601   CCGGCGCTCG CTCCTGTGTC GTCCTGCGGG GCGGAGGCG CGGAGAGGCG GCAAGCGCAG CCGGGGAGGG TGGGGGGGCA
1681   GAGGACAGCA CAGAGGCGCG GAGGCTCGGA GAGAGAAGAC GTGGAGGGAG GGACAGAGCC TGGACAGCGG TGGACACGGC
1761   ATCGTGC GCG GGAAGAGGG CAGCAGCAG CAGGCGCCGA GCGCCGGGCA CCGAGAAGGG CAGCCCGGGT GATCTCCGGC
1841   CGTCCATGCA CAGAGCGCTC TCCCCACAG CCGAGCAGCC GCGGGGCGGA GGGGACAGCG CCGCCCGGAC CCTGCAGCCC
1921   AAGCTCAAGT TAGTGGGCAA AGGAGGCGAG CCGGGAGTGG AGATGGGTGG AGCTGGACTT GGGAAATGGG TCCAGAGGGC
2001   GGAGGTCGAG GGGAGGACGT GGGGAAGCAG GACGGGGGTG GGGGTTGGAG ACTGATGGAA AAGGGGGTGC GTCTTCGAAT

```

2081 TAGGGGGCCC TGGGAGCAGG CAAGCATCTG ATGAAGCTGG ATATGAAAGA GTAGTACCCA AATCTCCATT CCTGGTTTAC
2161 TCTGTGGGCT CCATCTGGCC TAAGAGCCCC CTGCAAAGAA TGTGGGAGCC TCCAAGCACC AGGGGATGCC CTGGAGCTCG
2241 ACCCTGGCAT AGTGGGGAAG GTGGGGGGAC CTGAGTTCCT CTGAGTCCCT CGTTGGCACG GAGCGCGCGG GCGGCCGCTG
2321 CCTTTGAGTT AAAGGAGCAT CAGCGGGGGA AAGGGGGGGT GACGAGGGAG GCAGGGAGGC CTTAGGCGTT CCTTCCATA
2401 TCTGTCCCTT TATTCACAGA GCGGGGAGGG GAGTTTCAGT GTGCAGCCCC TTCATCAAGA GGCCTTGAGC CGCTCCCCCA
2481 CTCCACTTGA AGATGCGGGT GAAAAATATG GGAGAGGAGA GTAGCGGGGA GCCCCTGGG GGTTTTCGCC TACAGACGCT
2561 ACCCTGGTGG GAGTGTGTGT GGGCGGAACG GCCCCGGAGC AGAACAAATG CGCCCCCTCC CTTGCCACGG CCCCTGAGCT
2641 GAAGAAAAG GCTGACCGAG GAAGTGGGGA GTGTCACTGC TAGGAGAGGG GCCACTGAGG AGCACTGGGC AGCCTGGAAG
2721 GGTGAGAGG TTCTGAGGGG AGAGAGGAAG CGTGCCTTAA GAATGCTTAA CCAGGCCGGG CGGGCCCGGT GGCTCAGGCC
2801 TGTAATCCCA GCACTTTGGG AGGCTGAGGC GGTGGATCA CGAGGTCAGG AATTCGAGC CAGCCTGACC AACATGGTGA
2881 AACCCGTTTT CTACTAAAA TACAAAAAT AGCCGGGCAT GGTGGCGGGC GCCTGTAATC TCAGTACTA AGGAGGCTGA
2961 GGCAGGAGAA TCGTGTGAAC CCGGAGGCG GAGGTTGAG TGACAGCGCC ACTGCCTCC AGCCTGGGTG ACAGAGCGAG
3041 ACTCCGTCTC AAATAAATA ATAAATAAAT AAATAAATA ATGCTTAACC CCTGGGAAAA GCTGAGCGGA GAAGAGTAAG
3121 GCACCACCTG GCTCACTGAG TGGGAAAGCC AGGGAAGGTG CCACACCTC CCTTTTAGCC ACCTGGGGCT GTGGCCCCTT
3201 CACAGGGAAAT GAAGCTGGCC AGCAGCTGCC ACTGTGGGG AGACTGGGCT CCTACATTC ATTAGATTA GTGTACTTCA
3281 CTTCACTGTT GAGACTGCTG AGTGTTTAGA GGGGAAGTGA AGGATTGTGT TTTGGGGGAG ATTTGAGTTC AGCCATCCCA
3361 GGTCCGTGCT GGTCAAGCCT AGCGCTCAAG TTCTTCTGCT CCCAGACCAA AAAGATAAAA GCTGAAGATA AGGTTGTAAG
3441 ACGTTCGAG TCCTACAGAC ACAGGCCACT GACTTTTGGG GCTTCGGGCC AGTCTAGGAC GGCACTGGCT TGTCCATGCC
3521 TCTGAGCAG GCTGATTCTG AGACTCTGTA CTCAGACCTG GGCATCGGGC AGGATAGCAT CCAATGAGG GAGGGGAAG
3601 AAAGCAGGCA GGAAGAGGG AACAAATGTT AGTGTGGGT GTTACCAGT AGGGGGACTT GCACCCAGTG CCTCTCTCTT
3681 GTGCCCTCC TTCTCAGGCC CAGTGGCCGA GCCATGGCAC TGCTCGGAC GCTGGGGGAG CTGCAGCTGT ACCGGTCCCT
3761 GCAGCGCGCC AACTCTCTTT CTTACTATGA GACTTTTATC CAGCAGGGAG GGGACGACTT GCGAGCAGCT TGTGAGGGCG
3841 CTGAGGAGGA GTTTCTGGAG ATCATGGCAC TTGTGGCAT GCGCCACCAAG CCCCTCCATG TCCGCGCCTG CCAGAACTCA
3921 CTGAGAGAGT GGGCCACCAA TCCAGGGCTC TTAGTCAAC CAGTGCCTGC TGTTCCTGTC TCCAGATCC CGCTTTCAA
4001 GATCTCTGAG ACTCGGGTA CCCGAAAGG GAGCATGAGC AATGGGCATG GCAGCCAGG GGAAGGCA GGCAGTGGCC
4081 GCAGTTTTAG CCCCAAGAGC CCCCTTGAAC TTGGAGAGAA GTTATCACA CTGCTGGGG GACTTGGGG AGGGGACCCC
4161 CCGATCTGAG CAGCCCGGAG CACTCCAGAG TCGGACCTG GGGCAGGAG AGAAGAGGAG GCTGGCTCGC CCCCTTCTC
4241 CCCCCTGCA GGGGGAGGAG TCCCTGAGGG GACTGGGCT GGGGGGCTGG CAGCAGGTGG GACTGGGGGT GGTCCAGACC
4321 GACTGGAGCC AGAGATGGTA CGCATGGTGG TGGAAAGTGT GGAGAGGATC TTCCGGAGCT TCCCAAGGGG GGATGCTGGG
4401 GAGGTCACAT CCCTGCTAAA GCTGAATAAG AAGCTGGCAC GGAGCGTTGG GCACATCTTT GAGATGGAT ATAATGACAG
4481 CCAGAAGGAA GAGGAGATCC GCAAATACAG CATCATCTAT GGCCGTTTCG ACTCTAAGCG GCGGGAGGGC AAGCAGCTCA
4561 GCCTGCACGA GGTGAGAAC CCAGGCCCTC CTTAGATGTC CTTGACTTTC CTGTGACTTC CAGGTCTCCA GCGCGTTACC TCTGCGAGTT
4641 TCTACAGTCT CCGACTATCT TTCATTATCT CTTGACCAGG ACCCCAGGCC CTGATCCCCT CCCCAACAGG CCCCTACCCC
4721 AGCGGCCGCA GTGCTTCCAT CCTCAGCTGA GGGGAAAGCA GAGATACAGG CAGCACCCAG CTGTTTCACT CCTTGTCACT
4801 CAGGACCCCA CAGGAGAGGA GGAGGCCCG GGCATCTCTA GGAAGCTGTG GGTGCTGACC TCTGTCTTCC CACCTCAGAA
4881 AGTCCCCTAG TAGTGTCAA ACCAAAGCAA GCGCTGTATG GATGGGCCTC ATTTGTCAA TGGTGAAGGG GTGTGAGGAG
4961 GTCTGGTGAG GCAGCGGGGA AGTTCGAATT CTGACTCTCC TGGTGCCTC CCTCCACAG CTCACCATCA ACGAGGCTGC
5041 TGCCCAGTTC TGCCATGAGG ACAACACGCT CTTATTACGG AGAGTGGAGC TCTTCTCTTT GTCCCGCAA GTAGCCCGAG
5121 AGAGCACCTA TTTGTCTTCC TTGAAGGGCT CCAGGTGAGA CCCCTTCCC AGGTCCTTCC TGGACTGGAA TCCTGTCTAG
5201 GAGTTAGATC ATGTCTAAC CTTCAGCTCA GGCAGCTTGA GCGCTGCTTC CCGCCACCTT GGATGTGGCT CTTTGTGCCA
5281 AGTCAGCTTG TCTCAGGCTT GGTCTCTCCT CCCATCCATG TCGGGTCCC CCAACCCCT ACAACAATAG TGCTTGAAT
5361 AGAGACTCTT TCTCGGCCAG CTTCTTGGCA AAGGTTTTAA ATAACACATG CCTCTGGCTG GGTCTGTGTC TCTGCCAGTC
5441 GAGTGGCCCT CGTCAGCCTC ATCCATTTA TTTTACCATA TCTTTTCCAG CTTTACCCTG AAGAAGTGGG AGCCCTCCCA
5521 CTGAAGAAGC TGAACAAGA GGTATGTTTT TTTAGGGTCA TATTAGGGCA CTGGGGAGCC TGTCCCACTC ATCCCTCTTG
5601 GCAGGTCTTC ATTTCCCAT GTTGGGCATC CACAGGTTGG AGAACAGAGT CACCCTGAAA TCCAGCAGCC TCCCCAGGC
5681 CCTGAGTCCCT ATGTACCCCC ATACCGCCCC AGCCTGGAGG AGGACAGCGC CAGCCTGTCT GGGGAGAGTC TGGATTGGAC
5761 TTTGCAAGGT GAGTGTGCC T CAGAACACTT TTTCTTCTAT TGAGGGTGGG GGAGTAGGGG AGGGGGTGG GGGAGGAGTG
5841 AGCCAGGAGG GGTGAGGCG AACAGGCTG GGCAGCTTGA TGTCCCAAG CACCCCGCC ACTCAGGCC CACACAGCAA TTCTGTGTG
5921 TTGAGGGTGG GGGTTCATG GGTCTCAGCC CTTACCTGA CCAGTGCCCA TGCCACAGC TGTGGGGTCA TGTCCAAGGC
6001 TGACGCCGCC CCCTGCTGAC CTGCCTCTGG CATTGCCAGC CCATGGGCTA TGGAGCCGAC ACATCTGCA GCAGACACTG
6081 ATGGACGAGG GGCTGCGGCT CGCCCGCTC GTCTCCACG ACCCGTGGG CCGCTCAGC CCCTGTGTG CTGCGAAGCC
6161 ACCCTCTGCA GGTGAGGCG CACAGCTGC TGTCCCAAG CACCCCGCC ACTCAGGCC CACACAGCAA TTCTGTGTG
6241 CTGGGGCCAG GTGGGAGGAA GAGGGATATA GTCGTAGAG AGGGCAGTAG GATGGCTGGG CTCCAGCCAG CCAGGCCTTG
6321 GGGTGCAGAG AGGAGACCC TGCCGAGCTG CTTCCACCAT GGAAAGTCTG GTCCTAGTGT AGATCTGTAA AAGGGGAAT
6401 GGGGAATGGG GGACAGAGAA AAGAGGATGA AGGAGCAGGA AGGAGGAGCA TCAATAAGGG AAGCTCAGAT GGCACCTTCA
6481 CCAACCCAGG AGTGGGGAGC AGGCTAGGAG TTTGTGGTAT GGGGATGGG ATGCCAGCT TGAAGCAGAA GGAGCCAAA
6561 GCAGTGATGC TTTGTGTGTG GAAGGGGAA GAGGGAGTGG GCAGGCGGAG GGCCGGGAG CCGCTGGGCT GAGAGTGACG
6641 CAGCAGACAA AGCCACCAAC CCTGGCTTGG TATTTTTAAA CTGTGCGTGG GTGGGAAGTG GGGCGGGGA CTGGAAGGGG
6721 GGCTCTTCTT GAGGGAGGAG CTCGGAGGCT GGCTTCTGT TCTCCCTCTG ATTTGGCTAC CAAAAAATTT GGGGGGCCAT
6801 GGTAGAGTGG CCTGGGAGG GCTGGGAGG GGGCCAGGGA TGAGTGGGG TGGCAGAGCT TGGGAAGGGG GGAGGGGAGA
6881 GGTGAGAGCC AAACCACCCC CGCAGCTCCT GACAGAACCA GAAATTCAG CGCAACCGAG GAGGCGGGAG AGAAAGAGAG
6961 AGAGACAGAC AGAGACAGAG CTACGCACAG CCAGGGAGGG GAGGGGGCTC ACACACATGG GAATGGAACC CCCCATACAC
7041 ATGCAGTGGG CAGGAGGCAG TAATTCATA AACCTAACT GAGCCCATCT TCACAGCTTT CTTTGGCCCT GCTTCTGTTC
7121 CCAACCACCT CTGTCTGAC CAGTCAACC TGCACTTCC TAACCTGCCC CTTTTCCCT CAGAGTTCGA GGAAGGGCTG
7201 CTGGACAGAT GTCCTGCCCC AGGACCCCAT CCCGCGCTGG TGGAGGGTGG CAGGAGCAGC GTGAAAGTGG AGGCTGAGGC
7281 CAGCCGGCAG TGAGGGTGG ACTGGTGTCT TCAGACCAG GACCTCAGAC TCTGTGCTCA CACAGACCCC CACGCTCTCC
7361 ATCCCCGAA TCTAGTCACA ACCCTGGATC C

Abb. 4.2: Sequenz des genomischen Nab2-Klones 4B7. Gezeigt ist der Sinnstrang in 5'-3'-Richtung. Proteinkodierende Sequenzabschnitte sind fett dargestellt.

Der Klon 1E10 wurde ebenfalls sequenziert. Die darin enthaltene Nab2-Sequenz ist 2.147 bp lang und vollständig in der Sequenz von 4B7 enthalten (Abb. 4.3 C+D). Die

genomische Sequenz des Nab2-Gens war noch nicht beschrieben und wurde in der GenBank unter der Zugriffsnummer AF268380 hinterlegt.

4.1.4 Die genomische Organisation des Nab2-Gens

Der Vergleich der genomischen DNS-Sequenz mit der bekannten Nab2-cDNS-Sequenz (GenBank Zugriffsnummer: NM_005967) zeigte, dass sich das Nab2-Gen über eine ca. 7 kbp große Region erstreckt und aus 7 Exons und 6 Introns aufgebaut ist (Abb. 4.3 und Abb. 4.4). Alle Intron-Exon-Grenzen erfüllen die AG/GT-Regel (Breathnach et al., 1978). Die für die Interaktion mit Egr-Transkriptionsfaktoren notwendigen *Nab-Conserved-Domains* (NCDs) liegen in Exon 2 (NCD1 und ein 159 bp großer Teil von NCD2) und Exon 3 (der 111 bp große zweite Teil von NCD2). Der cDNS Klon drop8 (GenBank Zugriffsnummer: AJ011081) konnte als Spleissvariante von Nab2 identifiziert werden, der das Exon 6 fehlt. Drop8 kodiert damit eine Nab2-Variante, der 64 Aminosäuren aus der C-terminalen prolinreichen Region fehlen.

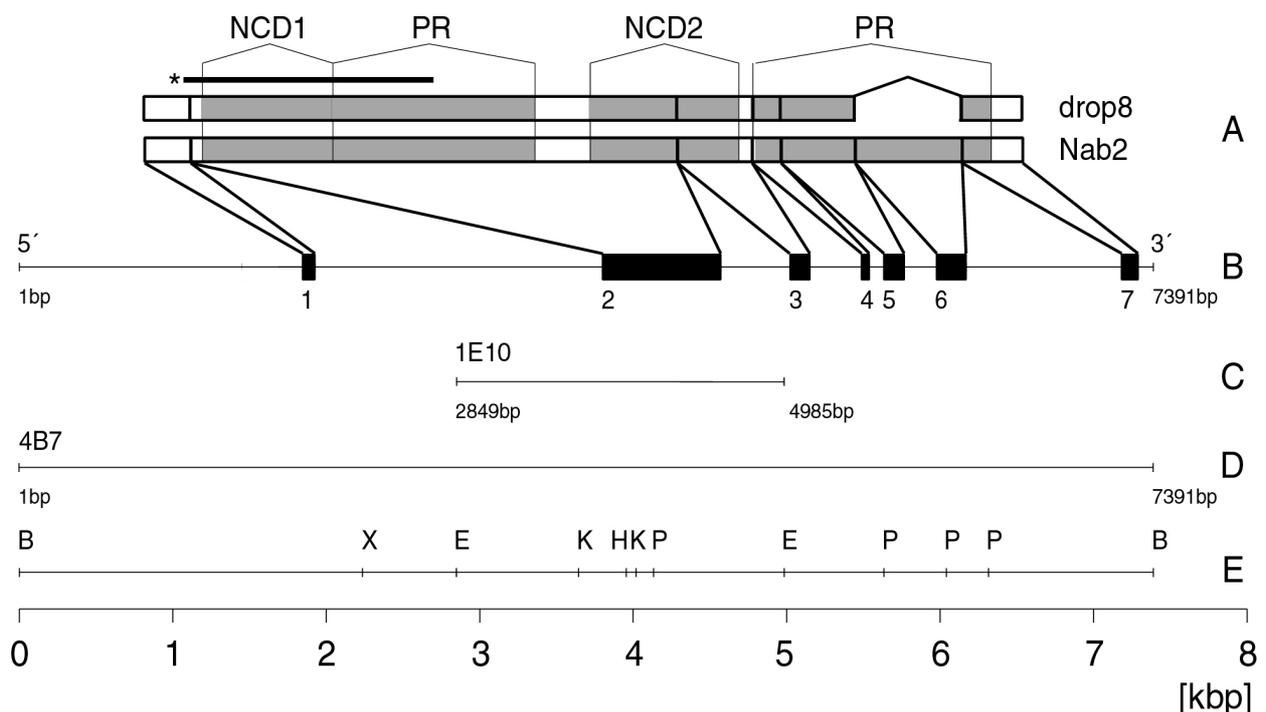


Abb. 4.3: Die genomische Organisation des Nab2-Gens. **A:** Nab2- und drop8-cDNS mit korrespondierender Proteinstruktur (NCD1 = *Nab-Conserved-Domain* 1; NCD2 = *Nab-Conserved-Domain* 2, PR = prolinreiche Region). Der durch einen Stern (*) gekennzeichnete Balken repräsentiert die 463 bp *Screening-Sonde*. **B:** Lokalisation der sieben Exons. **C+D:** Sequenzen der beiden genomischen Nab2-Klone 1E10 und 4B7. **E:** Restriktionskarte der genomischen Nab2 Region (B = BamHI; X = XbaI; E = EcoRI; K = KpnI; H = HindIII; P=PstI).

3' Spleiß-Akzeptor	Exon	5' Ende des Exons	Exongröße [bp]	3' Ende des Exons	Intron	5' Spleiß-Donor	Introngröße [bp]
	1		83	CCAGACTCAA	1	gt tagtgggc	1768
tcctttct cag	2	GCCCAGTGCC	874	CCTGCACGAG	2	gt gagaaccc	449
ccctccac ag	3	CTCACCATCA	134	AGGGCTCCAG	3	gt gagacccc	335
atctttt cag	4	GCTTCACCCT	52	GAAACAAGAG	4	gt atgttttc	94
gcatccac ag	5	GTTGGAGAAC	133	CATTTGCAGG	5	gt gagtgtgc	211
atgcccac ag	6	CTGTGGGGTC	192	CCTCTCGCAG	6	gt gaggcagc	1012
ttccctgc ag	7	AGTTCGAGGA	110		7		

Abb. 4.4: Intron-Exon-Struktur des Nab2-Gens. Exonsequenzen sind in Großbuchstaben, Intronsequenzen in Kleinbuchstaben dargestellt. AG- und GT-Dinukleotide nach der AG/GT-Regel sind fett dargestellt. Die Exons sind vom 5'-Ende aus durchnummeriert wie aus Abb. 4.3 B ersichtlich. Die Größenberechnung des ersten Exons beginnt mit dem Adenin des Startkodons an Position 1.846. Die Größenberechnung des siebten Exons endet mit dem Adenin im Stoppkodon an Position 7.293.

Der Klon 4B7 enthält außerdem einen 1.845 bp langen Abschnitt der 5'-untranslatierten Region des Nab2-Gens. Dieser Abschnitt ist damit ausreichend groß, um mit hoher Wahrscheinlichkeit den gesamten Promotor zu beinhalten. In dem nur 98 bp langen 3'-untranslatierten Abschnitt findet sich kein Poly-A-Signal (Lewin, 2000). Das Transkriptionende ist damit nicht in dem genomischen Klon enthalten.

4.1.5 Vergleich mit den Sequenzdaten aus dem Humangenomprojekt

Nachdem im Jahr 2000 das humane Genom vollständig sequenziert war, wurde die Sequenz des Klonen 4B7 durch eine *BLAST*-Suche (Altschul et al., 1990) mit der Sequenz des Humangenomprojektes verglichen. Die 7.391 bp lange Sequenz konnte dabei den Basen von Position 19.624.516 bis Position 19.631.895 der vorläufigen Sequenz des Chromosoms 12 (GenBank Zugriffsnummer: NT_029419, Version 10 vom 28.04.2003) zugeordnet werden. Das Adenin des Startkodons (ATG) der codierenden Nab2-Sequenz entspricht Position 19.626.361 der genomischen Sequenz von Chromosom 12. Das *Alignment* der Sequenz von 4B7 mit der genomischen Sequenz zeigt nur an 4 Stellen Unterschiede auf, die alle in Introns liegen und damit für die Analyse der transkriptionellen Regulation wahrscheinlich keine Bedeutung haben (Abb. 4.5).

Position auf 4B7 (vom 5'-Ende aus)	Position auf NT_029419.10 Hs1_2_29578	Nukleotid in 4B7	Nukleotid auf Chromosom 12, Humangenomprojekt	Intron (entsprechend Abb. 4.3)
zwischen 3.529 und 3.530	19.628.045	keines	T	1
3.531	19.628.047	G	C	1
6.389	19.630.905	A	G	6
zwischen 6.407 und 6.408	19.630.924	keines	G	6

Abb. 4.5: Vergleich der Nab2-Sequenz mit der Sequenz des Humangenoms aus dem Humangenomprojekt.

Bei diesen Unterschieden kann es sich zum einen um Polymorphismen handeln, zum anderen kommen in der gegenwärtigen Version des Humangenoms immer noch eine Vielzahl von Fehlern vor, die erst mit der zunehmenden Überarbeitung der Sequenzen korrigiert werden. In der Sequenz des Humangenomprojekts ist außerdem 632 bp stromabwärts vom 3'-Ende der 4B7-Sequenz ein Poly-A-Signal (A A T A A A) vorhanden.

4.2 *In silico* Analyse der 5'-untranslatierten Region des Nab2-Gens

Für die Analyse der 5'-untranslatierten Region des Nab2-Gens wurden die Basen des Klonen 4B7 vom Adenin des Startkodons (= Base 1.846 vom 5'-Ende aus gezählt) aus nummeriert. Dieses Adenin wurde als +1 bezeichnet. Die Positionsangaben weiter 5' gelegener Nukleotide tragen ein negatives Vorzeichen, die weiter 3' gelegener Nukleotide ein positives Vorzeichen.

4.2.1 Identifizierung putativer Promotorregionen

Als nächstes wurde die Sequenz des 5'-untranslatierten Teils des Klonen 4B7 mit der *PromoterInspector*TM-Software von *Genomatix*TM untersucht (Scherf et al., 2000). Damit sollte die Promotorregion genauer eingegrenzt werden. Die Analyse der 4B7-Sequenz bis unmittelbar vor das Nab2-Startkodon an Position +1 lieferte zwei putative Promotorregionen (Abb. 4.6). Die erste erstreckt sich von Position -1.513 bis -1.318 und liegt damit ca. 1,3 kbp stromaufwärts vom Beginn der kodierenden DNS. Die zweite vorhergesagte Promotorregion beginnt bei Position -705 und reicht bis -82. Damit liegt sie kurz vor der kodierenden DNS-Sequenz und damit in dem Bereich, in dem man den Promotor erwarten würde (Werner, 1999). Die

Wahrscheinlichkeit ist also hoch, dass es sich bei der Region von -705 bis -82 tatsächlich um die Promotorregion des Nab2-Gens handelt.

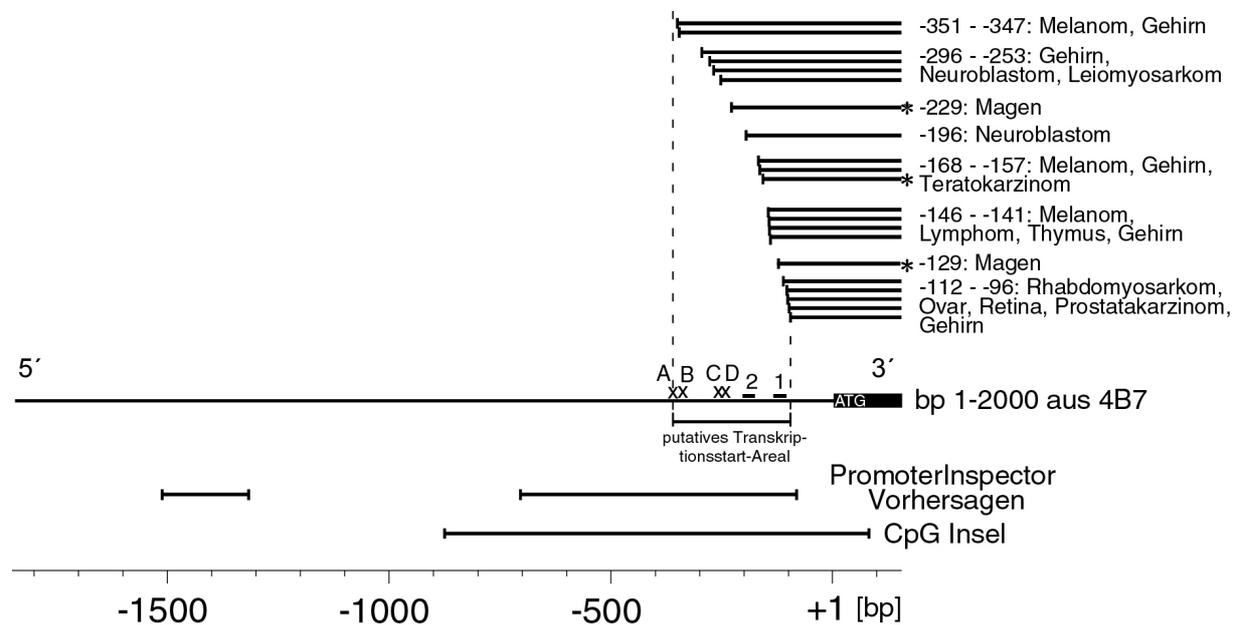


Abb. 4.6: *In silico* Analyse der Nab2-5'-Region. Gezeigt sind die Ergebnisse der Promotorsuche und der CpG-Insel-Suche. Die 5'-Enden der durch eine BLAST-Suche gefundenen Nab2-ESTs und -cDNS wurden auf die genomische Nab2-Sequenz kartiert. Das Ursprungsgewebe ist jeweils angegeben. 5'-Vollängen-Sequenzen sind durch einen Stern gekennzeichnet. Zur Orientierung sind die Transkriptionsstartpunkte aus den Primerextensionsversuchen (A-D) sowie die Lokalisationen des Extensionsprimers 1 (1) und des Extensionsprimers 2 (2) eingezeichnet. Dargestellt sind die ersten 2.000 bp vom 5'-Ende des genomischen Nab2-Klones 4B7 (entsprechend den Positionen -1.845 bis +155 vom Adenin des Startkodons).

Als nächstes wurde die gesamte Sequenz des Klones 4B7 mit dem *CpG-Insel-Plot*-Werkzeug aus der *EMBOSS-Software* (Rice et al., 2000) auf das Vorkommen von CpG-Inseln untersucht. Diese Analyse fand eine CpG-Insel, die sich von Position -876 bis +82 erstreckt (Abb. 4.6). Sie überlappt also mit dem ersten Exon von Nab2, wie es auch für die CpG-Inseln vieler anderer Gene typisch ist. Häufig befindet sich die regulatorische Region eines Gens in einer solchen CpG-Insel (Strachan and Read, 1996).

In silico Analysen genomischer DNS-Sequenzen haben allerdings eine sehr niedrige Sensitivität und Spezifität. Weil die Analyse von Nab2 aber sowohl mit dem CpG-Insel-Werkzeug als auch mit dem *PromoterInspector*TM, der Promotoren unabhängig von CpG-Inseln identifiziert, fast den selben DNS-Abschnitt gefunden hat, ist die

Wahrscheinlichkeit jedoch hoch, dass es sich dabei wirklich um die regulatorische Region von Nab2 handelt.

4.2.2 Kartierung der 5'-Enden von ESTs und cDNS auf dem genomischen Klon

Als nächstes wurde die 5'-untranslatierte Sequenz des 4B7-Klones in einer *BLAST*-Suche nach humanen *Expressed-Sequence-Tags* (ESTs) und cDNS eingesetzt und alle in den untranslatierten Bereich hineinreichenden EST- und cDNS-5'-Enden auf der Sequenz von 4B7 kartiert (Abb. 4.6). Diese Methode, deren Aussagekraft in umfangreichen Analysen an *Drosophila*-Promotoren (Ohler et al., 2002; Stapleton et al., 2002) nachgewiesen und bereits für mehrere humane Promotoren eingesetzt wurde, sollte einen Anhaltspunkt dafür geben, in welcher Region mit dem Transkriptionsstart des Nab2-Gens zu rechnen ist.

Einige der so gefundenen Sequenzen sind jedoch keine Vollängen-Klone, so dass aus den 5'-Enden nicht mit Sicherheit auf den Transkriptionsstart geschlossen werden kann. Deswegen wurden auch die Daten aus Vollängen-cDNS-Screeningprojekten berücksichtigt. Dazu wird unter anderem die sehr präzise *Oligo-Capping*-Methode eingesetzt. Sie modifiziert die Cap-Struktur der mRNS, die das charakteristische Kennzeichen des echten 5'-Endes eukaryotischer mRNS-Moleküle ist (Lewin, 2000). Dann können sehr spezifisch diejenigen mRNS, die die Modifikation enthalten, in cDNS umgeschrieben und sequenziert werden (Suzuki et al., 2000; Suzuki et al., 2002). Die so gefundenen Sequenzen sind in der Abbildung mit einem Stern markiert und ihre 5'-Enden repräsentieren mit sehr großer Wahrscheinlichkeit echte Transkriptionsstartpunkte.

Durch die Kartierung konnten fünf putative Transkriptionsstartregionen (Positionen -351 bis -347, -296 bis -253, -168 bis -157, -147 bis -141, -112 bis -96) mit jeweils mehreren Startpunkten gefunden werden, sowie drei putative Transkriptionsstartpunkte die einzeln liegen (Positionen -229, -196, -129). Insgesamt erstreckt sich damit der *in silico* identifizierte Transkriptionsstartbereich über 256 bp von Position -351 bis -96. Ein derart großes Transkriptionsstartareal wurde auch in einigen anderen CpG-Insel-Promotoren gefunden, beispielsweise im murinen Thymidilat-Synthase-Promotor (Geng and Johnson, 1993), im humanen *cdc25C*-Promotor (Körner et al., 1997) oder im humanen Histidyl-tRNS-Synthase-Lokus (O'Hanlon and Miller, 2002). Die Informationen aus der EST-Kartierung sind

außerdem wichtig, um die Region einzugrenzen, in der die Primer für die Primerextensionsversuche gewählt werden dürfen. Schließlich müssen die Transkriptionsstartpunkte stromaufwärts der Extensionsprimer liegen, um mit diesen detektiert werden zu können.

4.2.3 Identifizierung potentieller Bindestellen für Transkriptionsfaktoren

Die Sequenz der 5'-untranslatierten Region des Nab2-Gens wurde mit dem *MatInspector-Professional*TM auf Bindestellen für Transkriptionsfaktoren untersucht (Abb. 4.7). Von besonderem Interesse war, ob in der regulatorischen Nab2-Region klassische Kernpromotorelemente wie eine TATA-Box, ein Initiator-Element (Inr) oder ein *Downstream*-Promotorelement (DPE) vorkommen. Die Analyse mit dem *MatInspector*TM konnte weder eine TATA-Box noch Inr-Elemente identifizieren. Ein DPE liegt an Position -129 bis -123. Dieses Element ist jedoch nur für Inr-haltige Promotoren beschrieben und liegt dann genau 28 bis 32 bp stromabwärts von diesem (Kadonaga, 2002). Weil im Nab2-Promotor kein Inr-Element vorkommt hat das DPE wahrscheinlich keine Bedeutung. Die Nab2-5'-Region enthält außerdem zwei Konsensussequenzen des Multiplen-Startstellen-Elementes-1 (MED-1) (G C T C C^{G/C}) an den Positionen -236 und -248. Dieses Element liegt typischerweise 20-45 bp stromabwärts vom Initiationsfenster (Rudge and Johnson, 1999; Ince and Scotto, 1995a) in TATA- und Inr-losen Promotoren. Die Bedeutung von MED-1 ist umstritten, weil die Inaktivierung dieses Elementes im murinen Thymidilat-Synthase-Promotor keinen Effekt auf die Promotorfunktion hat (Rudge and Johnson, 1999). Bei den beiden MED-1-Elementen im Nab2-Promotor fällt allerdings auf, dass ihre Lokalisation sehr gut zu der Transkriptionsstartregion von Position -296 bis -253 passt. Zwei CAAT-Boxen sind an den Positionen -909 und -449 lokalisiert. Sie haben wahrscheinlich keine Bedeutung, weil funktionelle CAAT-Boxen in der Regel zwischen 70 bis 105 bp stromaufwärts vom Transkriptionsstartpunkt liegen (Suzuki et al., 2001). Mit zwölf Bindestellen ist die Konsensussequenz für den aktivierenden Transkriptionsfaktor Spezifitätsprotein-1 (Sp1) das am häufigsten vorhergesagte Element. Dies ist besonders interessant, weil Sp1-Elemente vorwiegend in TATA-losen CpG-Insel-Promotoren vorkommen und dort oft eine wichtige Funktion bei der Rekrutierung der Transkriptionsmaschinerie und für die basale Expression haben (Smale, 1997). Außerdem wurden 10 putative

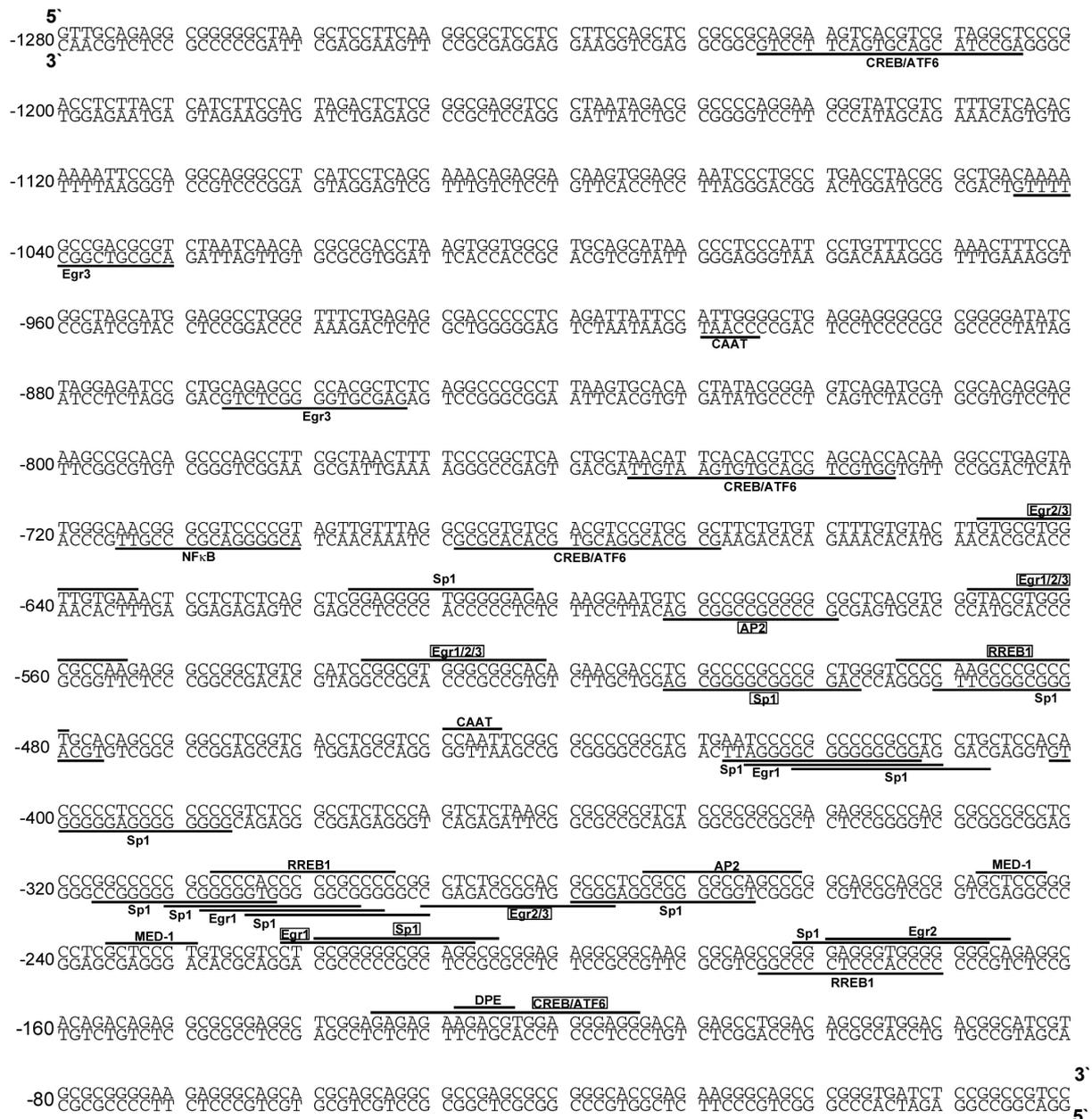


Abb. 4.7: Sequenz der Nab2-5'-Region von Position -1.280 bis -1. Die mit dem *MatInspector*TM gefundenen potentiellen Transkriptionsfaktor-Bindestellen sind durch eine Linie gekennzeichnet. Bindestellen, die im humanen und murinen Promotor konserviert sind, wurden eingerahmt. (CREB/ATF6 = Aktivierender Transkriptionsfaktor 6, CAAT = CAAT-Box, NF κ B = Nukleärer Faktor kappa B, AP2 = Aktivierungsprotein-2, Sp1 = Spezifitätsprotein-1, RREB1 = Ras-bindendes Element 1, MED-1 = Multiples-Startstellen-Element-1, DPE = distales Promotorelement)

Bindeelemente für Transkriptionsfaktoren aus der Egr-Familie gefunden. Diese starke Häufung ist ein Hinweis auf die Regulation von Nab2 durch die Egr-Transkriptionsfaktorfamilie. Schließlich wurden noch einige putative Bindestellen für die Transkriptionsfaktoren Aktivierender Transkriptionsfaktor 6 (CREB/ATF6), Nukleärer Faktor kappa B (NF κ B), Aktivierungsprotein-2 (AP2) und Ras-bindendes Element 1 (RREB1) gefunden. Einige Bindestellen, wie zum Beispiel die für Egr1 an

Position -222 und Egr1-3 an den Positionen -569 und -536 sind zwischen dem murinen und dem humanen Nab2-Promotor konserviert (Abb. 4.7). Dies deutet auf eine wichtige Funktion dieser Bindestellen hin.

4.2.4 Zusammenfassung der *in silico* Analyse

Die Identifikation von Promotoren durch *in silico* Analysen ist wegen der geringen Sensitivität und Spezifität der eingesetzten Algorithmen nicht sehr zuverlässig. Deuten jedoch mehrere, nach unabhängigen Kennzeichen von Promotorregionen suchende Algorithmen auf die selbe Region als potentiellen Promotor hin, so erhöht sich die Wahrscheinlichkeit enorm, dass es sich dabei um eine echte Promotorregion handelt. Die Computeranalyse der 5'-Region von Nab2 hat nur wenige Nukleotide stromaufwärts vom Ende der kodierenden Nab2-Sequenz eine putative Promotorregion, eine CpG-Insel und eine Vielzahl, in mehreren Gruppen zusammenliegender EST- und cDNS-5'-Enden gefunden. Die genauere Analyse mit dem *MatInspector*TM konnte in dieser Region keine TATA-Box und kein Inr-Element, dafür aber viele putative Sp1-Bindestellen identifizieren, die typischerweise in TATA-losen CpG-Insel-Promotoren zahlreich vorkommen. Zusammengenommen deuten diese Ergebnisse darauf hin, dass in der Region von Position -705 bis -82 mit hoher Wahrscheinlichkeit der Nab2-Promotor liegt und dass dieser zur Klasse der TATA- und Inr-losen CpG-Insel-Promotoren gehört.

4.3 Transkriptionsstartpunkt-Bestimmung durch Primerextensionsanalysen

Um den Transkriptionsstartpunkt experimentell zu bestimmen wurden Primerextensionsversuche durchgeführt. Dazu wurde ein Primer gewählt, der revers und komplementär in der Nähe des 5'-Endes der bekannter Nab2-cDNS-Sequenz bindet. Dieser wurde am 5'-Ende radioaktiv markiert und an die gesamt-RNS der stark Nab2 exprimierenden Zelllinie MelJuso sowie der nur wenig Nab2 exprimierenden Zelllinie Colo320 (Kramer and Johnson, 2001) hybridisiert. Die Primer wurden dann enzymatisch durch eine reverse Transkriptase elongiert und die Produkte wurden auf einem Polyacrylamidgel aufgetrennt.

Der Nab2 Extensionsprimer 1 bindet im Bereich der Basen 23 bis 56 in 3' Richtung vom Ende der bekannten Nab2-cDNS (NM_005967) (Position -135 bis -103 vom

ATG) (Abb. 4.6). Er ist 34 Basen lang und hat einen GC-Gehalt von 62 Prozent. Der Analyse mit dem Programm *Gene-Runner*TM zufolge bildet er keine starken Sekundärstrukturen aus. Trotz einer schrittweisen Erhöhung der Elongationstemperatur (von 42°C bis 47°C), um der Polymerase die Überwindung von Sekundärstrukturen in der RNS zu erleichtern, und dem Einsatz unterschiedlicher Anlagerungstemperaturen (Raumtemperatur, 30°C und 37°C) konnten mit diesem Primer keine reproduzierbaren Banden detektiert werden. Auch der Einsatz von RNS aus Zellen, die für vier Stunden vor der RNS-Extraktion mit dem Nab2-Induktor PMA stimulierten wurden, lieferte keine reproduzierbaren Ergebnisse. Die Sequenzierungsreaktion mit dem Extensionsprimer 1 war dagegen fehlerlos und zeigte, dass sowohl der Primer richtig synthetisiert wurde als auch die Anlagerung - zumindest an DNS - möglich war. Möglicherweise bilden sich aber innerhalb der Primerbindungsstelle oder direkt 5' davon starke Sekundärstrukturen in der RNS aus, die das Anlagern des Primers bzw. die Elongation durch die reverse Transkriptase unmöglich machten. Deswegen wurde ein zweiter Primer synthetisiert, der allerdings im Bereich von 46 bis 17 Basen stromaufwärts vom 5'-Ende der bekannten Nab2-cDNS liegt (Position -203 bis -174 vom Startkodon). Er liegt mit hoher Wahrscheinlichkeit 5' von mehreren Transkriptionsstartpunkten (Abb. 4.6). Deswegen muss davon ausgegangen werden, dass dieser Primer nur einen Teil der existierenden Transkriptionsstartpunkte detektiert. Die Platzierung näher am Extensionsprimer 1 war nicht möglich, weil dieser Bereich einen sehr hohem GC-Gehalt und wahrscheinlich starke Sekundärstrukturen aufweist.

Auch mit dem Extensionsprimer 2 waren beim Einsatz von RNS aus unstimulierten Zellen keine Banden zu sehen, deswegen wurde wiederum die RNS von PMA-stimulierten Zellen verwendet. Damit lieferte die Reaktion bei einer Anlagerungstemperatur von 23°C (Raumtemperatur) und einer Extensionstemperatur von 47°C gut reproduzierbare Banden (Abb. 4.8).

Die Autoradiographie lässt in der Primerextensionsreaktion eine Vielzahl von Banden erkennen, die über einen Bereich von mehr als 120 bp verstreut sind. Die stärksten Banden entsprechen dabei den Hauptinitiationsstellen für die Transkription. Diese zeigen ein Muster, das typisch für die Transkriptionsstartstellen in Promotoren mit mehreren Transkriptionsstartpunkten ist: Eine sehr aktive Startstelle ist jeweils von mehreren weniger aktiven Startpunkten umgeben, die nur wenige Nukleotide stromauf- und stromabwärts von den sehr aktiven Hauptstartpunkten liegen

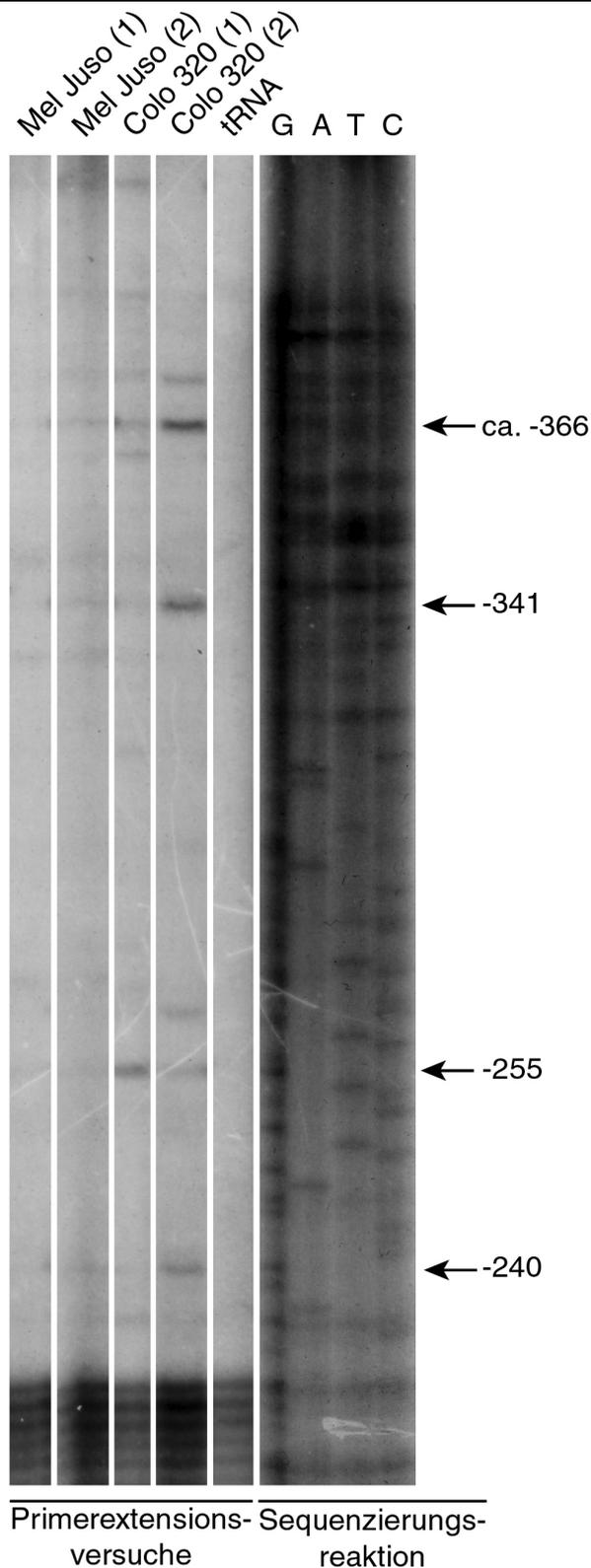


Abb. 4.8: Autoradiographie der Primerextensionsanalyse und der Sequenzierungsreaktion mit dem Extensionsprimer 2. Die Zellen wurden 4 Std vor dem Ernten mit PMA stimuliert. RNS-Mengen: MelJuso (1): 69µg, MelJuso (2): 99µg, Colo320 (1): 30 µg, Colo320 (2): 42µg, Negativkontrolle (tRNA): 60 µg. Primeranlagerung: 20 Min bei Raumtemperatur, Extension: 50 Min bei 47°C. Gezeigt ist ein repräsentatives Experiment aus vier durchgeführten Versuchen.

(Azizkhan et al., 1993; Ince and Scotto, 1995). In der Abbildung sind solche Transkriptionsstartpunkt-Cluster um die Positionen -240, -255, -341 sowie -366

lokalisiert. Sie wurden mit A, B, C, respektive D benannt (Abb. 4.6). Die durch die Bandenstärke repräsentierte Aktivität der verschiedenen Startpunkte variiert von Experiment zu Experiment leicht. Die dafür verantwortlichen Einflussfaktoren konnten nicht identifiziert werden.

Wegen der Positionierung des Extensionsprimers 2 relativ weit stromaufwärts vom Startkodon, kann die Existenz von weiter 3' gelegenen Transkriptionsstartpunkten aber nicht ausgeschlossen werden. Die Autoradiographie zeigt außerdem noch einige Banden sehr hohen Molekulargewichtes, deren Lokalisation nicht genau zugeordnet werden konnte. Sie repräsentieren eventuell noch weiter 5' gelegene Transkriptionsstartpunkte.

4.4 Experimenteller Nachweis der Promotoraktivität der Nab2-5'-Region und Eingrenzung des Promotors durch Verkürzungen vom 5'-Ende

Als nächstes sollte die 5'-untranslatierte Region von 4B7 durch Luziferase-Reporterexperimente auf das Vorkommen eines Promotors untersucht werden und gegebenenfalls die Ausdehnung der Promotorregion bestimmt werden. Dazu wurden verschiedene 5' verkürzte Varianten der 5'-untranslatierten Region mithilfe der PCR hergestellt. Durch die verwendeten Primer wurde jeweils am 5'-Ende eine HindIII- und am 3'-Ende eine KpnI-Restriktionsschnittstelle angefügt. Über diese Schnittstellen wurden die Verkürzungsvarianten in die HindIII- und KpnI-Schnittstellen des Luziferase-Reportervektors pGL3Basic kloniert. Das in diesem Vektor enthaltene Luziferasegen besitzt keinen eigenen Promotor. Die Luziferase kann deswegen nur transkribiert werden, wenn das eingefügte DNS-Fragment wenigstens einen Minimalpromotor enthält.

Je mehr verschiedene 5' verkürzte Konstrukte von einem putativen Promotor hergestellt werden, desto höher ist die Auflösung, mit der die Grenzen der Promotorregion und die Lokalisation wichtiger regulatorischer Elemente bestimmt werden können. Um den Nab2-Promotor möglichst genau zu charakterisieren, wurden 17 verschiedene Konstrukte hergestellt (Abb. 4.9). Sämtliche Konstrukte wurden sequenziert bevor sie für Messungen eingesetzt wurden, um Mutationen auszuschließen, die bei der Herstellung der Konstrukte in der PCR-Reaktion auftreten können.

Durch die Messung der Luziferaseaktivität verschiedener 5' verkürzter Konstrukte wurde zuerst die Ausdehnung des Promotors bestimmt. Das längste verwendete Luziferasekonstrukt, luc-1272, enthält die DNS-Sequenz von Position -1.272 bis -22 des 5'-untranslatierten Bereiches des Nab2-Gens. Weil die meisten Promotoren innerhalb von 1.000 bp stromaufwärts vom Translationsstartpunkt liegen, enthält dieses Konstrukt mit hoher Wahrscheinlichkeit den vollständigen Nab2-Promotor.

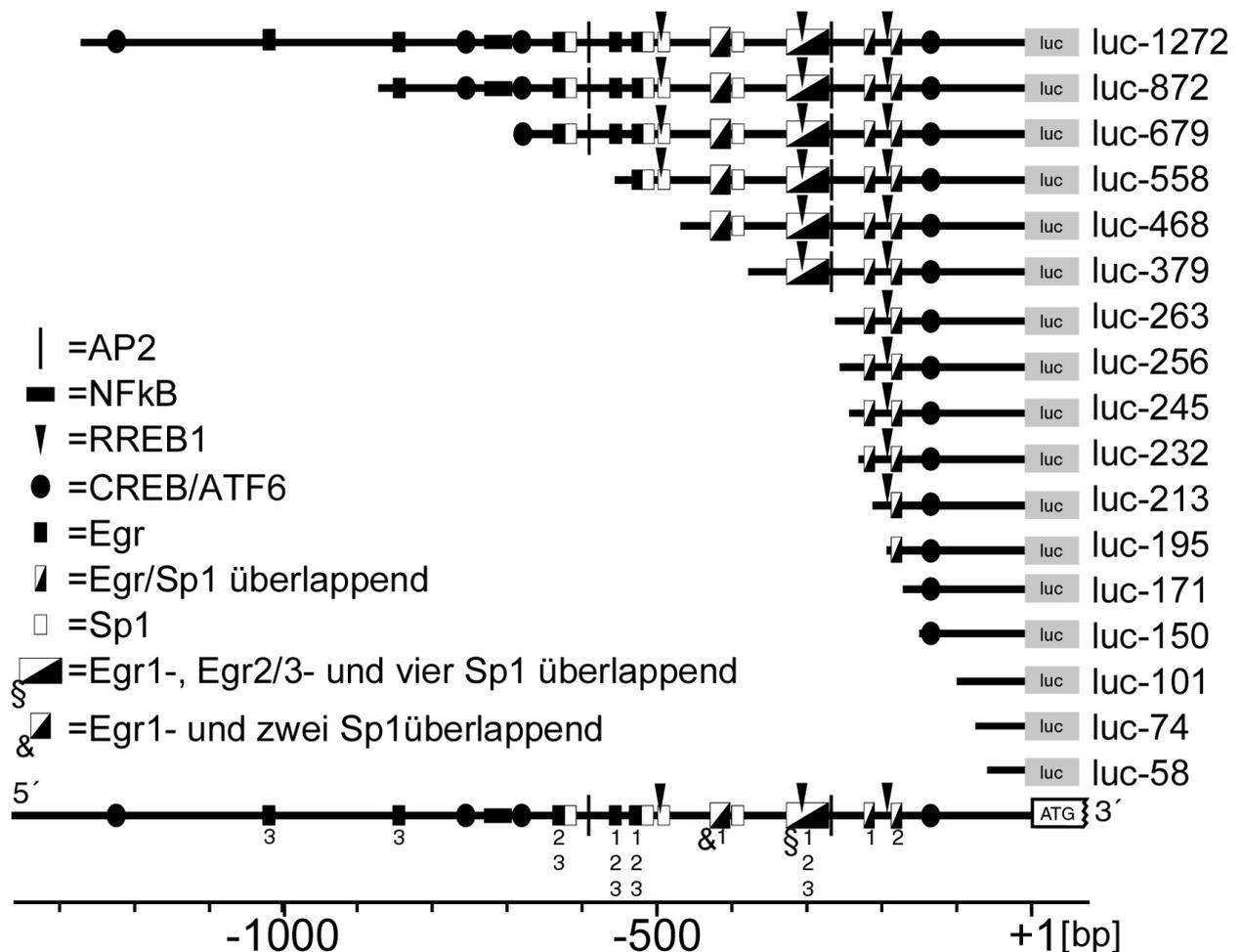


Abb. 4.9: Schematische Darstellung der Reporterkonstrukt-Inserts mit den jeweiligen putativen Transkriptionsfaktor-Bindestellen. Rechts von jedem Konstrukt ist die Bezeichnung angegeben. Unterhalb der Verkürzungskonstrukte ist die 5'-untranslatierte Region von 4B7 schematisch dargestellt. Die Abkürzungen der Transkriptionsfaktoren sind in der Legende zu Abb. 4.7 definiert. Die Ziffern an den Egr-Bindestellen zeigen deren jeweilige Spezifität (1 = Egr1, 2 = Egr2, 3 = Egr3).

Der Promotorbereich wird mit den 5' verkürzten Konstrukten wie folgt bestimmt: Das 5'-Ende des Promotors liegt dort, wo eine weitere Verkürzung des DNS-Fragmentes zu einer wesentlichen Verminderung im Vergleich zur maximalen gemessenen Promotoraktivität führt. Das ungefähre 3'-Ende ist dagegen dort, wo die Verkürzung des DNS-Fragmentes zu einem Abfall der Aktivität auf die des Leervektors führt. Das kürzeste noch aktive Konstrukt enthält den Minimalpromotor.

Die Konstrukte wurden mit *FuGENE-6*TM transient in Colo320 und Mel888 Zelllinien transfiziert und die Zellen nach 24 bis 48 Std geerntet und lysiert. Nach Zugabe des Luziferasesubstrates Luziferin kann die Aktivität des in der Zelle gebildeten Enzyms Luziferase durch das emittierte Licht gemessen werden. Die Lichtemission ist dabei proportional zur Menge der in der Zelle synthetisierten Luziferase und damit zur Aktivität des Promotors.

Abbildung 4.10 zeigt die Ergebnisse dieser Versuche. Die Konstrukte luc-679, luc-872 und luc-1272 sind in Colo320 wie auch in Mel888 Zelllinien ca. 300- bis 400-mal aktiver als der Leervektor pGL3Basic. Dies zeigt, dass die einklonierten Sequenzen einen sehr starken Promotor enthalten. Die maximale Aktivität wird schon vom Konstrukt luc-679 erreicht und steigt bei den längeren Konstrukten luc-872 und luc-1272 nicht weiter an. Der gesamte Promotor des Nab2-Gens ist demnach bereits in dem Sequenzabschnitt von Position -679 bis zum Translationsstartpunkt enthalten.

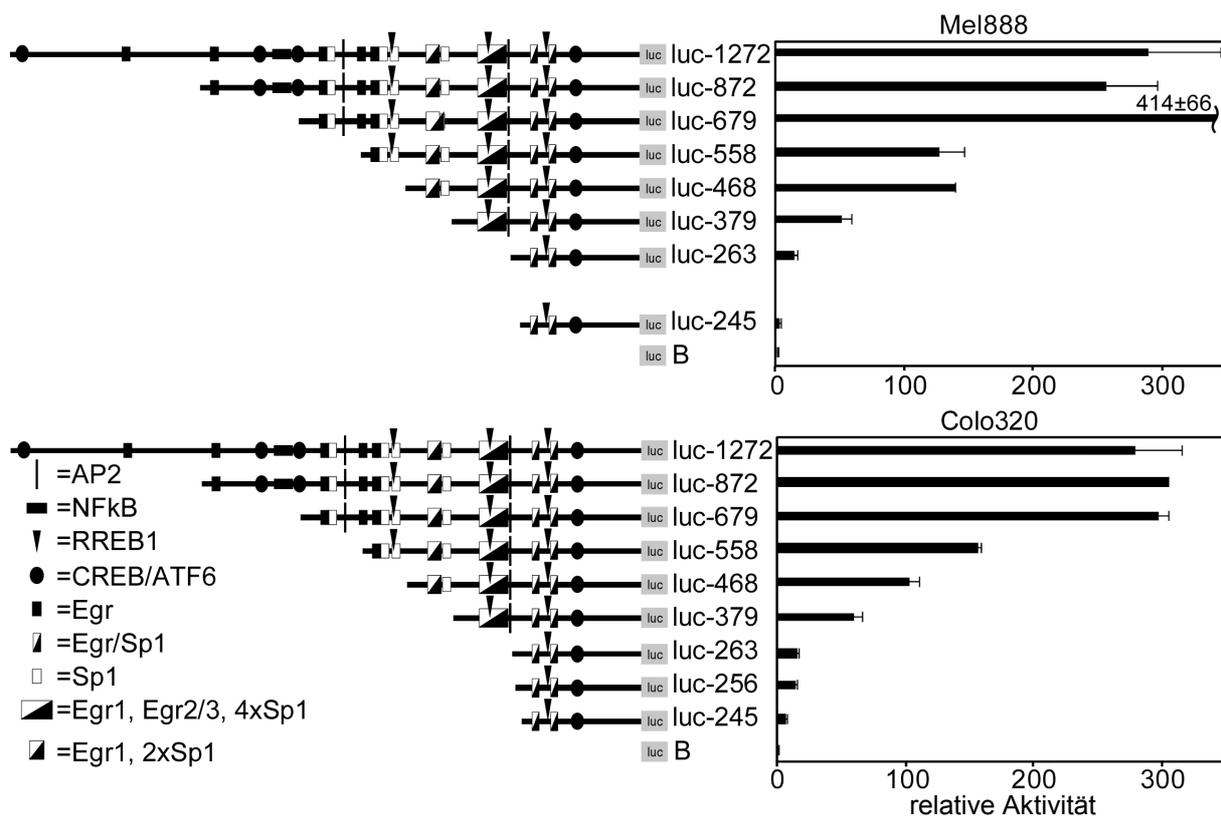


Abb. 4.10: Aktivität der Luziferase-Reporterkonstrukte in Mel888 und Colo320 relativ zur Aktivität von pGL3Basic (B). Aktivität von pGL3Basic = 1. Gezeigt sind Mittelwerte aus den in Triplikaten durchgeführten Versuchen. Das Konstrukt luc-872 wurde in diesem Versuch nur einmal in Colo320 transfiziert. Das Konstrukt 69 wurde in diesem Versuch nicht in Mel888 getestet. Gezeigt ist ein repräsentatives Experiment aus sechs durchgeführten Versuchen. Die Abkürzungen der Transkriptionsfaktoren sind in der Legende zu Abb. 4.7 definiert.

Als nächstes sollte das ungefähre 3'-Ende des Nab2-Promotors gesucht werden. Die Aktivität fiel von Konstrukt luc-679 (100% der Maximalaktivität) stetig bis zum Konstrukt luc-263 (ca. 5% der Maximalaktivität) ab. Dabei zeigte sich jeweils ein starker Aktivitätsabfall von Konstrukt luc-679 auf Konstrukt luc-558, von Konstrukt luc-468 auf luc-379 und von Konstrukt luc-379 auf luc-263. Dies spricht für die Präsenz starker, positiver regulatorischer Elemente in den Nab2-Regionen von -679 bis -558, -468 bis -379 und von -379 bis -263. Wie die *in silico* Analyse dieser drei Regionen zeigt, kommen in jeder potentielle Transkriptionsfaktor-Bindestellen für Sp1 sowie Egr1, Egr2 und Egr3 vor. Besonders interessant erscheint ein komplexer Sequenzabschnitt in der Region von -379 bis -263, der sich aus multiplen putativen Sp1- und Egr-Bindestellen zusammensetzt. Wie bereits erwähnt, sind Sp1-Bindestellen für die Funktion TATA-loser CpG-Insel Promotoren wichtig. Zum einen liegen häufig Transkriptionsstartpunkte stromabwärts von Sp1-Bindestellen, zum anderen sind Sp1-Bindestellen meist für die basale Expression (Khachigian et al., 1995; Liedtke et al., 2003) und für das Erreichen der maximalen Expressionsstärke bei Aktivierung notwendig (Croager et al., 2000). In diesen stark aktivierenden Regionen liegen außerdem zwei AP2-Bindestelle und eine RREB1-Bindestelle.

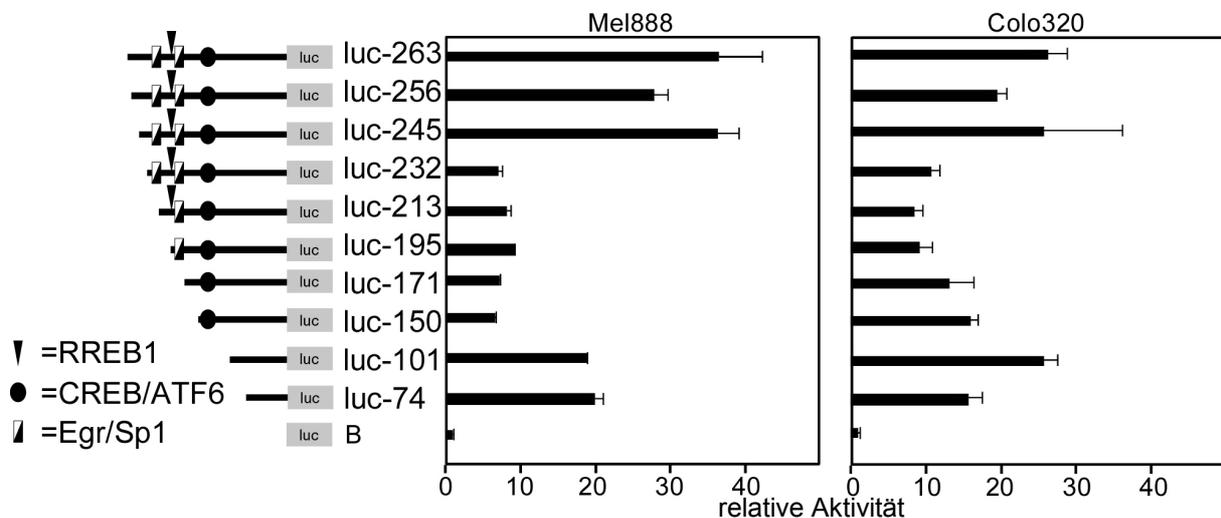


Abb. 4.11: Aktivität der kurzen Luziferasekonstrukte in Mel888 und Colo320 relativ zur Aktivität von pGL3Basic (B). Aktivität von pGL3Basic = 1. Repräsentatives Experiment aus acht durchgeführten Versuchen. Die Abkürzungen der Transkriptionsfaktoren sind in der Legende zu Abb. 4.7 definiert.

Das Konstrukt luc-263 ist nur noch ca. 15- bis 30-mal so aktiv wie der Leervektor. Wie in Abb. 4.11 zu sehen ist, nimmt dann die Aktivität zwischen Konstrukt luc-245 und luc-232 nochmals stark ab. Die *in silico* Analyse konnte in dieser nur 13 bp großen Region jedoch keine Transkriptionsfaktor-Bindestellen identifizieren. Weitere Verkürzungen zeigten dann eine konstante Aktivität, von ungefähr dem 10fachen des

Leervektors pGL3Basic. Überraschenderweise stieg die Aktivität jedoch bei den sehr kurzen Konstrukten luc-101 und luc-74 wieder leicht an, bevor sie mit dem Konstrukt luc-58 auf die Aktivität des Leervektors abfiel (Abb. 4.12).

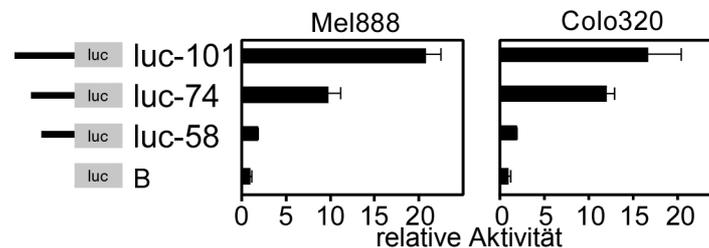


Abb. 4.12: Aktivität der kurzen Luziferasekonstrukte in Mel888 und Colo320 relativ zur Aktivität von pGL3Basic (B). Aktivität von pGL3Basic = 1. Repräsentatives Experiment aus drei durchgeführten Versuchen.

Die Aktivität des Konstrukt luc-74 liegt bei ca. 3% der maximalen Promotoraktivität bzw. der 10- bis 20fachen Aktivität des Leervektors. Das zeigt, dass bereits der DNS-Abschnitt von Position -74 bis zum Startkodon einen Minimalpromotor enthält. Erst 5' von Position -263 liegen dann mehrere positive regulatorische Regionen. Sie sind für die hohe basale Transkriptionsaktivität des gesamten Nab2-Promotors verantwortlich. Auffällig sind die sprunghaften Aktivitätszunahmen der Konstrukte luc-379, luc-468 und luc-679. In diesen Regionen liegen Egr-, Sp1-, AP2 sowie RREB1-Bindestellen. Das Konstrukt luc-679 erreicht dann bereits die maximale Aktivität. Der gesamte Nab2-Promotor liegt somit zwischen Position -679 und -58.

4.5 Experimentelle Analyse der Regulation des Nab2-Promotors

4.5.1 Vergleich der basalen Aktivität des Nab2-Promotors in Melanom- und Kolonkarzinomzelllinien mit dem *Dual-Luciferase-Reporter-Assay*TM

Nab2 ist in Melanomen und Melanomzelllinien stark überexprimiert, während Kolonkarzinome und Kolonkarzinomzelllinien eine, mit vielen Normalgeweben vergleichbare, niedrige Nab2-Expression zeigen. Die Aktivität der Luziferasekonstrukte in den Abbildungen 4.10, 4.11 und 4.12 zeigt aber für keines der Reporterkonstrukte eine eindeutig höhere Aktivität in Mel888 im Vergleich zu Colo320. Aus diesen Versuchen ergaben sich also keine Hinweise darauf, dass die Überexpression von Nab2 in Melanomen durch eine höhere Promotoraktivität verursacht wird.

Weil die Transfizierbarkeit verschiedener Zelllinien stark variiert und aus Versuchen an nur zwei Zelllinien auch keine allgemeingültigen Daten gewonnen werden können,

wurde als nächstes der *Dual-Luciferase-Reporter-Assay*TM benutzt, um die Konstrukte nochmals in drei Melanomzelllinien und zwei Kolonkarzinomzelllinien zu vergleichen. Das Dual-System ermöglicht die Kotransfektion der bisher verwendeten Reporterstrukture mit dem Kontrollkonstrukt pRL-TK. Dieses enthält das *Renilla*-Luziferasegen unter einem Thymidinkinase-Promotor aus dem *Herpes simplex* Virus. Dieser Promotor ist nicht gewebespezifisch reguliert und damit in den meisten Zelllinien gleich stark aktiv (Stewart, 1987; Wagner, 1985). Damit ist die Transkriptionsaktivität dieses Promotors nur von der Menge des in die Zelle gelangten Kontrollkonstruktes abhängig und diese ist wiederum proportional zur Menge des in konstantem Verhältnis transfizierten Glühwürmchen-Reporterkonstruktes. Wird also die Aktivität des Glühwürmchen-Konstruktes zu der des *Renilla*-Kontrollkonstruktes ins Verhältnis gesetzt, so entfällt der Einfluss der unterschiedlichen Transfektionseffizienzen in verschiedenen Zelllinien.

Auch mit dem sehr genauen *Dual-Luciferase-Reporter-Assay*TM konnte keine erhöhte Aktivität des Nab2-Konstruktes luc-679 in Melanomzelllinien (MelJuso, Mel888 und SbCl2) im Vergleich zu Kolonkarzinomzelllinien (Colo320 und Kato III) festgestellt werden (Abb. 4.13). Anhand der Versuche mit Reporterkonstrukten lässt sich die starke Überexpression von Nab2 in Melanomzelllinien also nicht durch eine stärkere Aktivierung des getesteten Nab2-Promotors durch trans-wirksame Elemente erklären.

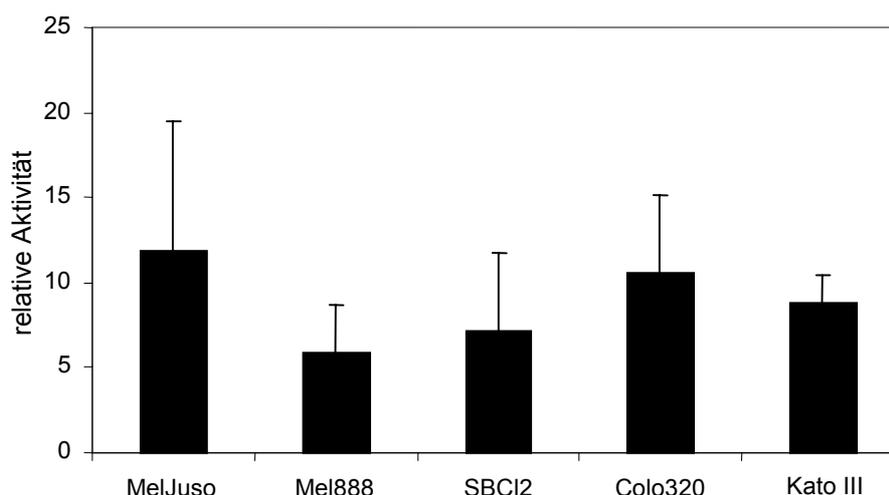


Abb. 4.13: Aktivität des Konstruktes luc-679 in verschiedenen Melanom- (MelJuso, Mel888 und SBCL2) und Kolonkarzinomzelllinien (Colo320 und Kato III). Die Aktivität des Konstruktes ist relativ zur Aktivität des in konstantem Verhältnis kotransfizierten pRL-TK *Renilla*-Luziferasekonstruktes angegeben. Gezeigt sind die Mittelwerte aus je 6 Versuchen (Mel888), 5 Versuchen (MelJuso, Colo320), 4 Versuchen (SbCl2) und 2 Versuchen (Kato III).

4.5.2 Identifizierung der Nab2-Promotorelemente für die PMA-Induktion

Nab2 ist durch viele exogene Faktoren wie Stress, Wachstumsfaktoren oder Serum transient induzierbar (Kirsch et al., 1996; Svaren et al., 1996). *In vitro* kann Nab2 auch durch Phorbolester wie PMA induziert werden. Diese Substanzen wirken über die Aktivierung der Proteinkinase-C. Die Kinetik der Nab2-Induktion durch PMA stimmt mit der durch physiologische Faktoren sehr präzise überein (Kirsch et al., 1996). Aufgrund dieser Ähnlichkeit ist die Wahrscheinlichkeit hoch, dass PMA den physiologischen Hauptinduktionsmechanismus auslöst. Das Verständnis dieses Induktionsmechanismus könnte wichtige Anknüpfungspunkte für die Identifizierung der Ursachen der Nab2-Überexpression im Melanom liefern.

Aus diesem Grund sollte als nächstes nach Promotorelementen gesucht werden, die bei der Nab2-Induktion durch PMA eine Rolle spielen. Dazu wurde die Aktivität der Nab2-Reporterkonstrukte in Gegenwart und Abwesenheit von PMA im Wachstumsmedium analysiert. So sollte untersucht werden, ob die Zunahme des Nab2-mRNS-Spiegels nach PMA-Stimulation auf eine erhöhte transkriptionelle Aktivität des Nab2-Promotors zurückzuführen ist. Durch die Analyse der PMA-Induzierbarkeit der einzelnen Verkürzungskonstrukte sollten dann die verantwortlichen cis-Elemente identifiziert werden.

Abb. 4.14 zeigt, dass die PMA-Stimulation zu einer Erhöhung der Aktivität der längeren Nab2-Reporterkonstrukte (Konstrukte luc-872 bis luc-232) auf ca. das 3fache der Grundaktivität in unstimulierten Zellen führt. Dies deutet darauf hin, dass der Anstieg der Nab2-mRNS-Expression bei PMA-Stimulation durch eine erhöhte Transkriptionsaktivität des Nab2-Promotors und nicht durch eine erhöhte mRNS-Halbwertszeit hervorgerufen wird.

Aus der Abbildung ist außerdem gut zu erkennen, dass das Konstrukt luc-232 sowohl in Mel888 als auch in Colo320 das kleinste durch PMA stimulierbare Konstrukt ist. Die geringfügige Aktivitätszunahme der Konstrukte luc-74 bis luc-213 in Mel888 bzw. die Aktivitätsabnahme in Colo320 in Gegenwart von PMA spiegeln wahrscheinlich keine transkriptionelle Regulation wider, sondern dürften im Bereich der Messungenauigkeit liegen. Darauf deuten die Ergebnisse aus mehreren Wiederholungen mit diesen Konstrukten hin, die kein eindeutiges Muster ergaben (Daten nicht gezeigt).

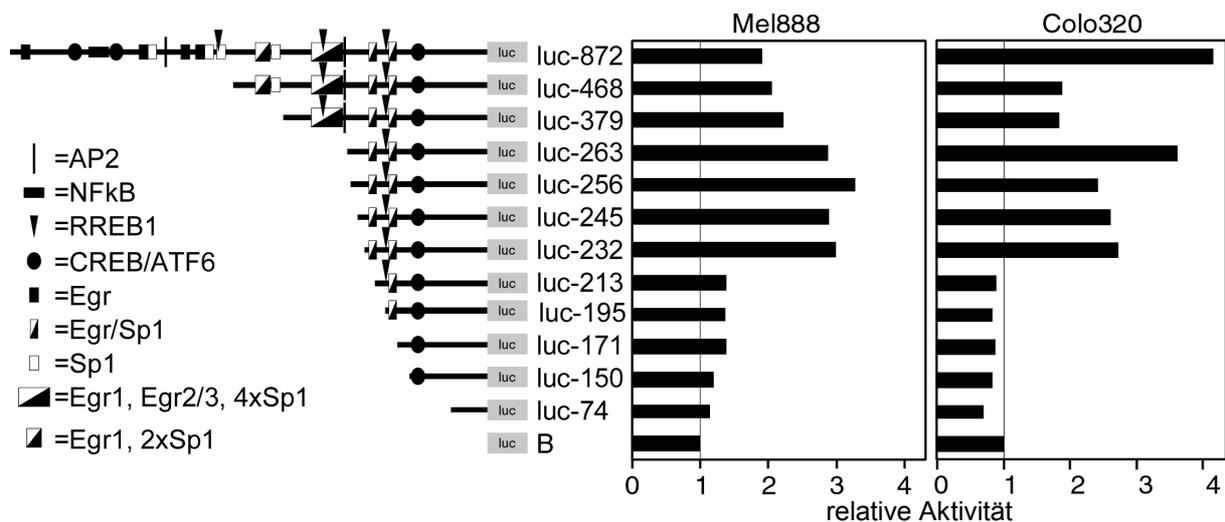


Abb. 4.14: Aktivitätszunahme der Nab2-Reporterkonstrukte bei Stimulation durch PMA relativ zum unstimulierten Konstrukt (unstimuliertes Konstrukt = 1). B = pGL3Basic. Repräsentatives Experiment aus fünf durchgeführten Versuchen. Die Abkürzungen der Transkriptionsfaktoren sind in der Legende zu Abb. 4.7 definiert.

Durch diese Versuche wird deutlich, dass das Konstrukt luc-232 Elemente enthält, die für die Induzierbarkeit von Nab2 durch PMA benötigt werden. Wenn nur 19 bp vom 5'-Ende dieses Konstruktes abgeschnitten werden (Konstrukt luc-213), geht die Induzierbarkeit verloren. Die Region von -232 bis -213 bp enthält also mindestens ein für die PMA-Induzierbarkeit verantwortliches cis-regulatorisches Element.

Wie aus den Abbildungen 4.7 und 4.9 ersichtlich, befinden sich dort eine Egr1-Konsensussequenz (Position -222 bis -207, im folgenden „Egr1/-222“), sowie eine überlappende Sp1-Konsensussequenz (Position -220 bis -205). Wegen der eng aneinander gekoppelten Expression von Egr1 und Nab2 liegt die Vermutung nahe, dass Egr1 den Nab2-Promotor unmittelbar aktiviert und dass das Egr1/-222-Element im Nab2-Promotor dafür relevant ist. Die direkte Induktion des eigenen Korepressors Nab2 durch Egr1 könnte damit Teil des bereits postulierten negativen Rückkoppelungs-Regelkreises von Egr1 sein (Ehrengruber et al., 2000).

4.5.3 Bedeutung des Egr1/-222-Elementes für die Induzierbarkeit von Nab2

Um die Bedeutung der Egr1-Konsensussequenz an Position -222 genauer zu untersuchen, wurde sie in den PMA-stimulierbaren Konstrukten luc-245, luc-468, luc-558 und luc-872 mutiert. Das kleinste PMA-stimulierbare Konstrukt luc-232 wurde nicht mutiert, weil die Egr1/-222-Bindestelle darin direkt an Vektoranteile angrenzt und die Mutationsprimer, die die Egr1-Bindestelle auf beiden Seiten noch überragen, daran nicht binden können. Durch die Mutation wurden drei Basen der Egr1-

Konsensussequenz verändert (Wildtyp-Konsensussequenz: G C G G G G C G, mutierte Sequenz: C T T G G G C G). Es wurde darauf geachtet die überlappende Sp1-Konsensussequenz durch das Einfügen der Mutation nicht zu zerstören. Die mutierten Konstrukte zeigten die selbe basale Aktivität wie die Konstrukte mit dem Wildtyp-Promotor (Abb. 4.15), die Induzierbarkeit durch PMA reduzierte sich jedoch deutlich (Abb. 4.16). Die Induzierbarkeit geht allerdings nicht vollständig verloren. Womöglich hat die mutierte Egr1/-222-Konsensussequenz noch eine geringe Restaktivität. Möglicherweise ist aber auch die Sp1-Bindestelle an Position -220 für die Rest-Induzierbarkeit verantwortlich. Die deutliche Abnahme der Induzierbarkeit durch die Mutation zeigt jedoch, dass die Egr1/-222-Bindestelle eine wichtige Funktion bei der Aktivierung des Promotors durch PMA erfüllt.

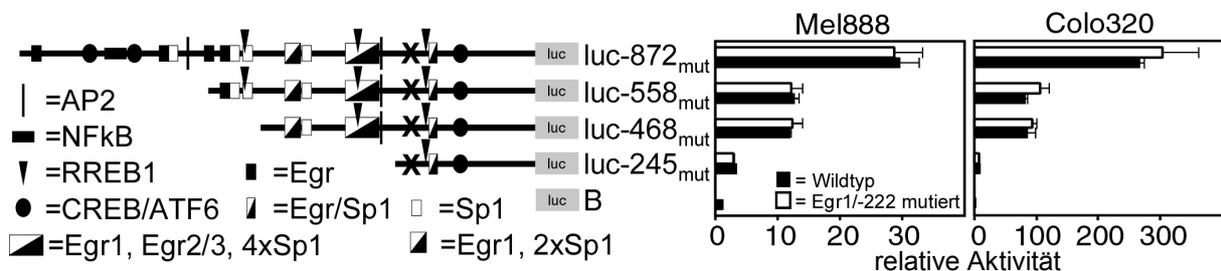


Abb. 4.15: Aktivität der Wildtyp-Nab2-Konstrukte und der Nab2-Konstrukte mit Egr1/-222-Mutation relativ zur Aktivität von pGL3Basic (B). Aktivität von pGL3Basic = 1. Repräsentatives Experiment aus drei durchgeführten Versuchen. Die Abkürzungen der Transkriptionsfaktoren sind in der Legende zu Abb. 4.7 definiert.

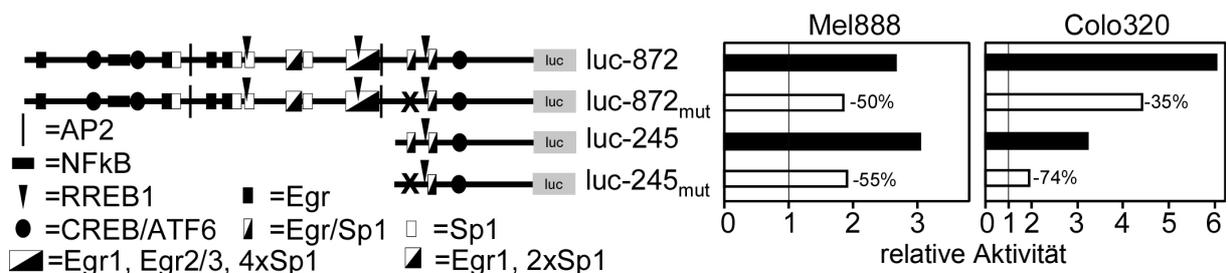


Abb. 4.16: Aktivität der Wildtyp-Nab2-Konstrukte (luc-245, luc-872) und der Nab2-Konstrukte mit Egr1/-222-Mutation (luc-245_{mut}, luc-872_{mut}) nach PMA-Stimulation relativ zu unstimulierten Konstrukten (unstimulierte Konstrukte = 1). Die Prozentzahlen geben die Abnahme des Aktivitätszuwachses bei Stimulation an. Repräsentatives Experiment aus drei durchgeführten Versuchen. Die Abkürzungen der Transkriptionsfaktoren sind in der Legende zu Abb. 4.7 definiert.

Um zu bestätigen, dass Egr1 an der Egr1/-222-Bindestelle aktiv ist und dass die eingefügte Mutation diese tatsächlich inaktiviert, wurden die Wildtyp-Nab2-Reporterkonstrukte sowie die mutierten Nab2-Reporterkonstrukte zusammen mit dem Egr1-Expressionsvektor Egr1/PCB6 (Milbrandt, 1987) kotransfiziert. Das von diesem Konstrukt kodierte Egr1 aus *Rattus norvegicus* ist zum humanen Egr1 hoch

konserviert und es ist bekannt, dass es auch an humanen Egr1-Bindestellen aktiv ist (Milbrandt, 1987).

Zuerst sollte untersucht werden, ob die PMA-stimulierbaren Konstrukte luc-232 und luc-872 durch die artifizielle Überexpression von Egr1 überhaupt beeinflusst werden können. Dazu wurden Kotransfektionen dieser Reporterkonstrukte mit verschiedenen Mengen des Egr1-Expressionskonstruktes durchgeführt (Abb. 4.17).

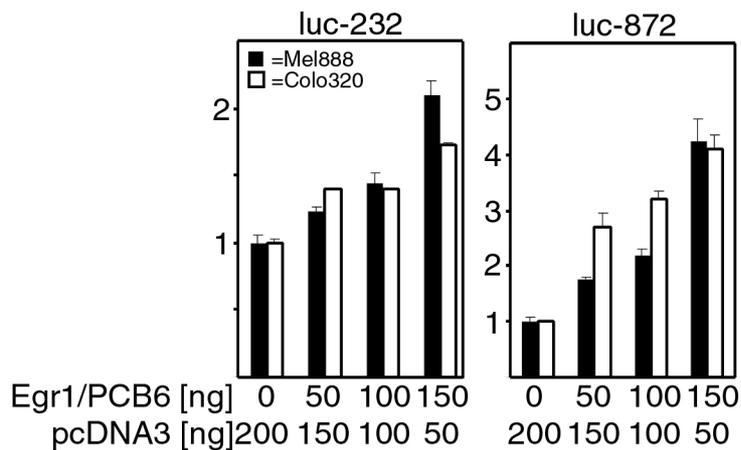


Abb 4.17: Kotransfektion der Konstrukte luc-232 und luc-872 mit verschiedenen Mengen des Egr1-Expressionskonstruktes Egr1/PCB6. Die Aktivität ist relativ zu den Konstrukten luc-232 und luc-872 bei Kotransfektion mit Leervektor alleine (=1) angegeben.

Die Ergebnisse zeigen, dass durch die Kotransfektion von Egr1 eine deutliche und dosisabhängige Aktivitätszunahme der Nab2-Reporterkonstrukte bis auf das ca. 4-5-fache der Grundaktivität auftritt. Der Nab2-Promotor ist also sowohl durch PMA als auch durch Egr1-Kotransfektion aktivierbar.

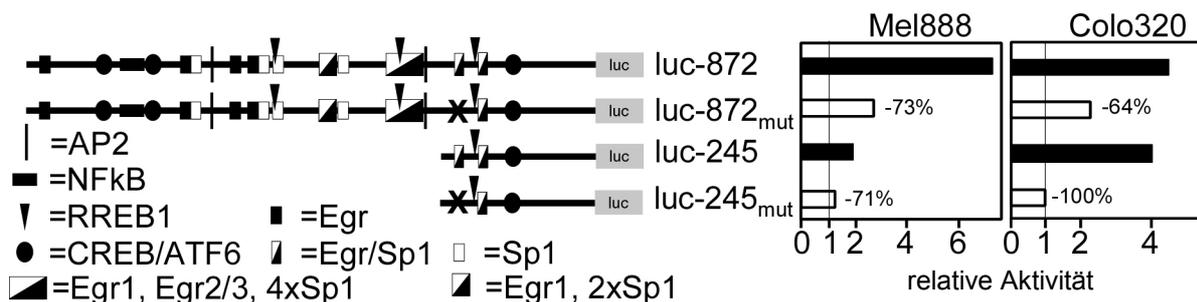


Abb 4.18: Aktivität der Wildtyp-Nab2-Konstrukte und der Nab2-Konstrukte mit Egr1/-222 Mutation nach Kotransfektion von 150 ng Egr1 relativ zur Aktivität dieser Konstrukte bei Kotransfektion mit Leervektor alleine (=1). Die Prozentzahlen geben die Abnahme des Aktivitätszuwachses bei Egr1-Kotransfektion an. Die Abkürzungen der Transkriptionsfaktoren sind in der Legende zu Abb. 4.7 definiert.

Die Kotransfektion von Egr1 mit den Wildtyp-Reporterkonstrukten und den Egr1/-222-mutierten Reporterkonstrukten (Abb. 4.18) zeigt deutlich, dass die Mutation von Egr1/-222 die Aktivierbarkeit des Konstruktes luc-245_{mut} durch Egr1 fast

vollständig verhindert. Dagegen ist das mutierte Konstrukt luc-872_{mut} in Mel888 und Colo320 weiterhin durch Egr1 aktivierbar, wenngleich weniger stark als das Wildtyp-Konstrukt. Diese Ergebnisse lassen darauf schließen, dass mindestens eine der weiter 5' liegenden Egr1-Bindestellen biologische Relevanz besitzt und dazu führt, dass die längeren Konstrukte trotz der Egr1/-222 Mutation noch durch Egr1 induzierbar sind. Die *MatInspector*TM-Analyse hat solche potentielle Bindestellen an den Positionen -568, -536, -426 und -311 gefunden (Abb. 4.7).

Diese Ergebnisse zeigen, dass die PMA-Induktion des Nab2-Promotors zum großen Teil über die Egr1/-222 Bindestelle vermittelt wird. Die Aktivierung dieser Bindestelle nach PMA-Induktion führt zu einer Steigerung der transkriptionellen Aktivität des Nab2-Promotors um ungefähr das 3fache im Vergleich zum Ruhezustand. Wird die Egr1/-222 Bindestelle mutiert, so ist der Promotor zwar noch durch PMA und Egr1 induzierbar, allerdings in wesentlich geringerem Maße. Dies deutet darauf hin, dass weitere Egr1-Bindestellen einen Verlust der Egr1/-222-Bindestelle teilweise kompensieren können und womöglich auch noch andere Transkriptionsfaktoren eine Rolle bei der PMA-Induktion spielen.

5 Diskussion

Bislang waren die genomische Nab2-Sequenz sowie die Lokalisation und die architektonischen und funktionellen Merkmale der regulatorischen Region des Nab2-Gens nicht bekannt. Die Identifikation wichtiger regulatorischer Elemente kann wesentlich zum Verständnis der Funktion des transkriptionellen Korepressors und der Ursachen der Überexpression im Melanom beitragen. Deswegen wurden in der vorliegenden Arbeit die regulatorische Nab2-Region genau charakterisiert und es konnte ein wichtiger Mechanismus der Nab2-Regulation identifiziert werden.

5.1 Lokalisation und Charakterisierung der Nab2-Transkriptionsstartpunkte und der Nab2-Kernpromotorregion

Bei allen eukaryotischen proteinkodierenden Genen enthält die DNS-Region stromaufwärts vom Translationsstart den Promotor sowie weitere regulatorische Elemente wie *Enhancer* oder *Silencer*. Zusammen regulieren diese Elemente die Transkription eines Gens in verschiedenen Geweben und unter verschiedenen Umgebungsbedingungen. Nur bei wenigen eukaryotischen Genen sind auch in Introns oder stromabwärts von der kodierenden Sequenz *Enhancer* oder *Silencer* gefunden worden (Lewin, 2000).

Um die regulatorische Region des Nab2-Gens zu identifizieren und detailliert zu untersuchen, wurde zunächst die genomische Nab2-DNS einschließlich 1.845 bp vom 5'-untranslatierten Bereich kloniert (Kap. 4.1). Als nächstes wurden in der 5'-Region die Transkriptionsstartpunkte und der Promotor des Nab2-Gens lokalisiert (Kap. 4.2).

Für die ersten Analysen wurde ein bioinformatischer Ansatz verwendet. Dieser identifizierte einen putativen Promotor, der sich von Position -705 bis -82 erstreckt und in einer CpG-Insel liegt. Bei der *in silico* Suche nach potentiellen Transkriptionsfaktor-Bindestellen und typischen Kernpromotorelementen konnten weder eine TATA-Box noch Inr-Elemente identifiziert werden (Abb. 4.7). Aufgrund dieser Charakteristika wurde der Nab2-Promotor in die Klasse der TATA- und Inr-losen CpG-Insel-Promotoren eingeordnet (Smale, 1997; Zhang, 1998). In der 5'-untranslatierten Region von Nab2 konnten außerdem 12 potenzielle Sp1-Bindestellen identifiziert werden. Multiple Sp1-Bindestellen kommen typischerweise

in TATA- und Inr-losen CpG-Insel-Promotoren vor (Smale, 1994; Smale and Kadonaga, 2003) und erfüllen darin gleich mehrere Funktionen. Sie sind wichtig für die Aufrechterhaltung eines nicht-methylierten Zustandes der CpG-Insel (Li et al., 2004; Macleod et al., 1994). Außerdem dirigieren sie die Anlagerung der basalen Transkriptionsmaschinerie und legen so auch die Lokalisation der Transkriptionsstartpunkte fest (Chen et al., 1997; Colgan and Manley, 1995). Schließlich spielen sie eine wichtige Rolle bei der Transkriptionsinitiation (Chen et al., 1997; Zenzie-Gregory et al., 1993) und bestimmen oftmals die Stärke der basalen Expression von TATA- und Inr-losen CpG-Insel-Promotoren (Khachigian et al., 1995; Liedtke et al., 2003; Smale, 1997). Sie können außerdem für die maximale Expressionsstärke bei Aktivierung eines Promotors wichtig sein (Croager et al., 2000).

Für lange Zeit wurden Promotoren dieser Klasse ausschließlich so genannten *Housekeeping*-Genen zugeschrieben (Cross and Bird, 1995). Das sind Gene, die ubiquitär oder nur in bestimmten Geweben konstant exprimiert werden und darüber hinaus nur einer geringen Regulation unterliegen. Nab2 ist in den meisten benignen Geweben mit Ausnahme des Zentralnervensystems und des Thymus nur gering oder gar nicht exprimiert, aber in allen bislang untersuchten Geweben durch exogene Stimuli transient sehr gut induzierbar (Kirsch et al., 1996; Svaren et al., 1996). Nab2 zählt also nicht zu den *Housekeeping*-Genen. Kürzlich wurden aber auch andere Nicht-*Housekeeping*-Gene identifiziert, die durch TATA- und Inr-lose CpG-Insel-Promotoren reguliert werden (Suzuki et al., 2001).

Ein häufiges Kennzeichen TATA- und Inr-loser CpG-Insel-Promotoren sind multiple Transkriptionsstartpunkte (Lin et al., 2001; Smale and Kadonaga, 2003). Die Kartierung der 5'-Enden von cDNS und ESTs aus der GenBank auf dem 5'-untranslatierten Bereich von Nab2 deutet tatsächlich auf die Existenz mehrere Transkriptionsstartpunkte beim Nab2-Promotor hin (Abb. 4.6). Dieser *in silico* Ansatz basiert allerdings auf cDNS und ESTs, von denen wahrscheinlich mehrere keine 5'-Vollängen-Sequenzen sind, sondern durch Strangsyntheseabbrüche entstandene Sequenzen mit artifizell zu kurzen 5'-Enden. Die Präsenz multipler Transkriptionsstartpunkte wird aber eindeutig durch Daten aus Transkriptionsstartpunkt-*Screenings* mit der *Oligo-Capping*-Methode (Suzuki et al., 1997; Suzuki et al., 2002) untermauert. Mit dieser wurden 3 verschiedene Transkriptionsstartpunkte gefunden, die ca. 100 bp weit auseinanderliegen

(Abb. 4.6). Eine große Zahl an EST-Sequenzen reicht außerdem weiter stromaufwärts als der am weitesten 5' gelegene Startpunkt, der durch die *Oligo-Capping*-Methode ermittelt wurde. Im Gegensatz zu verfrühten Strangabbrüchen sind artifiziell zu lange Sequenzen kaum erklärbar. Damit sind diese weit nach 5' reichenden cDNS und ESTs ein eindeutiges Zeichen für die Existenz weiterer Startpunkte. Die durchgeführten Primerextensionsversuche, in denen vier reproduzierbare Transkriptionsstartpunkt-*Cluster* identifiziert wurden, bestätigten ebenfalls die Existenz multipler Startpunkte (Abb. 4.6 und Abb. 4.8). Damit wurden die Daten aus der *in silico* Analyse experimentell untermauert.

Nab2 verfügt damit über ein Transkriptionsstartareal von über 250 bp Ausdehnung. Dieses liegt am 3'-Ende der vom *PromoterInspector*TM vorhergesagten Promotorregion. Interessant ist auch, dass fast alle Transkriptionsstartpunkte jeweils ca. 45 bis 55 bp stromabwärts von einer putativen Sp1-Bindestelle liegen. Dies deutet darauf hin, dass die Sp1-Bindestellen im Nab2-Promotor wie auch in anderen CpG-Insel-Promotoren für die Rekrutierung der basalen Transkriptionsmaschinerie und für die Festlegung der Startpunkte wichtig sind (Colgan and Manley, 1995; Chen et al., 1997).

Weil im Nab2-Promotor gut charakterisierte Kernpromotorelemente wie die TATA-Box oder das Inr-Element fehlen und stattdessen viele weit verstreute Transkriptionsstartpunkte vorliegen, ist es schwierig den Kernpromotor abzugrenzen (Lin et al., 2001; Smale and Kadonaga, 2003). Der Kernpromotor ist definiert als DNS-Sequenz, die die basale Transkriptionsmaschinerie bindet und an der die Transkription beginnt (Roeder, 1996; Smale and Kadonaga, 2003). Damit korreliert die Lokalisation der Transkriptionsstartpunkte gut mit dem eigentlichen Kernpromotor (Qiu, 2003). Im Nab2-Gen erstreckt er sich demnach ungefähr von Position -366 bis -96.

Auch die in den Reporterassays gewonnenen Daten deuten darauf hin, dass ungefähr in dieser Region der funktionelle Kernpromotor liegt. Dies wird deutlich, wenn man die Aktivitäten der Promotor-Verkürzungskonstrukte ausgehend vom Konstrukt luc-379 betrachtet (Abb. 4.10 und 4.11). Die Aktivität des Konstruktes luc-379 liegt weit über der Aktivität des Leervektors pGL3Basic. Dem folgt ein auffallend starker Aktivitätsabfall von Konstrukt luc-379 auf Konstrukt luc-263. Die Aktivität des Konstruktes luc-263 ist nur noch 15- bis 30-mal so hoch wie die des Leervektors und

viele der kürzeren Konstrukte zeigen eine Aktivität ungefähr gleicher Größenordnung. Mit dem Konstrukt luc-232 fällt die Transkriptionsaktivität auf das ca. 10- bis 15fache der Aktivität von pGL3Basic, bevor sie mit den Konstrukten luc-171 und luc-101 wieder auf das ca. 25fache von pGL3Basic steigt.

Die niedrige, aber sehr deutlich über dem Leervektor liegende Aktivität der Konstrukte luc-263 bis luc-74 entspricht damit der vom Kernpromotor zu erwartenden Aktivität. Da stromaufwärts von Position -263 weitere Transkriptionsstartpunkte (bis zur Position -366) vorkommen, reicht der Kernpromotor sicher noch deutlich in 5'-Richtung darüber hinaus. Allerdings überlappt in dieser Region wahrscheinlich ein starkes positives cis-regulatorisches Element mit dem 5'-Ende der Kernpromotor-Region und führt zur hohen Aktivität von luc-379. Der Aktivitätsabfall ab Konstrukt luc-232 könnte verschiedene Gründe haben. Möglich ist der Verlust von sehr aktiven Transkriptionsstartstellen (z.B. Transkriptionsstartpunkt-*Cluster* D; Abb. 4.6) oder auch einer positiven regulatorischen Region innerhalb des Kernpromotors. In Mel888 kann dann mit dem Konstrukt luc-101, in Colo320 mit dem Konstrukt luc-171 eine erneute Zunahme der Promotoraktivität beobachtet werden. Hier werden wahrscheinlich negative regulatorische Elemente abgeschnitten, die unter den gewählten experimentellen Bedingungen aktiv sind und die Transkriptionsaktivität weiter stromabwärts gelegener Transkriptionsstartpunkte unterdrücken. Es wäre denkbar, dass dieser Repressor unter anderen Bedingungen (z.B. während der Ontogenese) inaktiv ist und die Transkription dann vorwiegend vom proximalen Teil des Kernpromotors initiiert und kontrolliert wird. Ohnehin ist es wahrscheinlich, dass ein derart großes Promotorareal funktionell aus verschiedenen alternativen Promotoren aufgebaut ist, von denen jeder ein eigenes Expressionsprogramm kodiert das nur unter bestimmten Bedingungen aktiv ist (Landry et al., 2003; Levine and Tjian, 2003). Die Transkriptionsaktivität des kurzen Konstrukts luc-101 zeigt außerdem, dass die in der Abb. 4.6 postulierten Transkriptionsstartpunkte um die Position -101 herum keine durch vorzeitige Strangsynthese-Abbrüche hervorgerufenen Artefakte sind, sondern dass dort aktive Transkriptionsstartpunkte liegen müssen.

Die transkriptionelle Aktivität erlischt erst mit dem Konstrukt luc-58. Anhand der Reporter-gen-Daten kann das ungefähre 3'-Ende des Kernpromotors also etwas stromaufwärts von Position -58 lokalisiert werden. Dies ist etwas weiter 3' als die EST- und cDNS-Kartierung vermuten ließ. Kombiniert man die Ergebnisse aus der

Transkriptionsstartpunkt-Suche und aus den Reporteragenassays, so erstreckt sich der Nab2-Kernpromotor also ungefähr von Position -366 bis Position -58 (Abb. 5.1). Die Schwierigkeit der Definition des Nab2-Kernpromotors ergibt sich, weil das Kernpromotor-Konzept anhand experimenteller Daten von TATA- und Inr-haltigen Promotoren mit einem oder wenigen, eng lokalisierten Transkriptionsstartpunkten entwickelt wurde (Butler and Kadonaga, 2002; Smale and Kadonaga, 2003). Es ist deswegen nicht vollständig auf TATA- und Inr-lose CpG-Insel-Promotoren übertragbar.

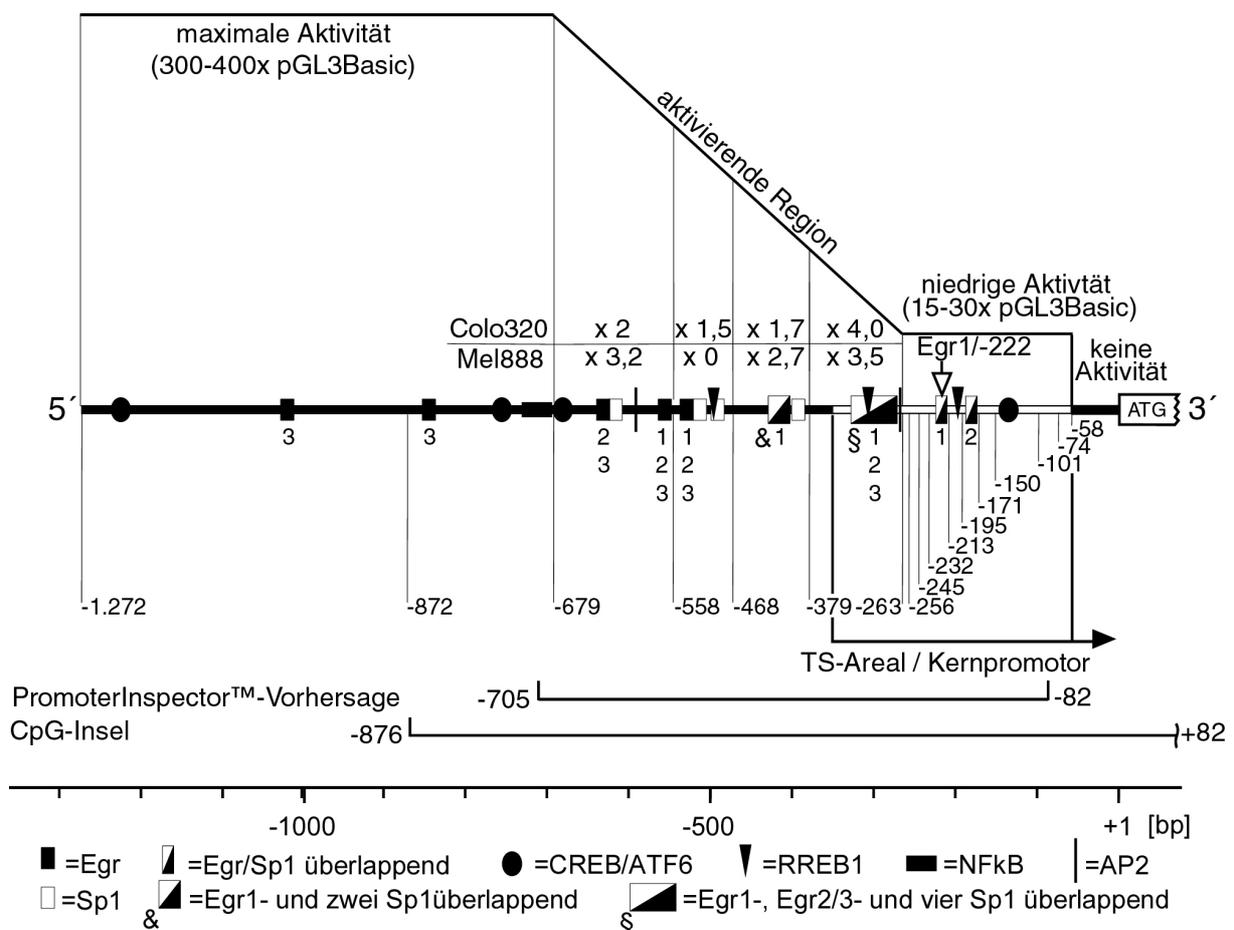


Abb. 5.1: Aufbau der Nab2-5'-Region und schematische Darstellung der basalen Aktivität der Nab2-Reporterkonstrukte. Für die aktivierende Region von Position -679 bis -263 ist der relative Aktivitätsanstieg durch die einzelnen Konstrukte in der Tabelle angegeben. Die Positionsangaben unter der Darstellung geben die Positionen der 5'-Enden der Nab2-Reporterkonstrukte an. Gezeigt sind außerdem der Kernpromotor bzw. das Transkriptionsstartareal (TS-Areal), sowie die *PromoterInspector*TM-Vorhersage und die CpG-Insel. Die Egr1/-222-Bindestelle ist durch einen Pfeil gekennzeichnet. Die Abkürzungen der Transkriptionsfaktoren sind in der Legende zu Abb. 4.7 definiert. Die Ziffern an den Egr-Bindestellen zeigen deren jeweilige Spezifität (1 = Egr1, 2 = Egr2, 3 = Egr3).

Zusammenfassend handelt es sich beim Nab2-Promotor um einen TATA- und Inr-losen CpG-Insel-Promotor mit multiplen Sp1-Bindestellen. Der Nab2-Promotor gehört damit zu einer eher seltenen Promotorklasse, die nur bei ca. 7,5 % der humanen proteinkodierenden Gene zu finden ist (Suzuki et al., 2001). Das Transkriptionsstartareal erstreckt sich über mehr als 250 bp und liegt in einem funktionellen Kernpromotor, der sich ungefähr von Position -366 bis -58 erstreckt. Der Kernpromotor alleine führt zu einer ca. 15- bis 30fach höheren Transkriptionsaktivität als der Leervektor pGL3Basic. An seinem 5'-Ende überschneidet sich der Kernpromotor mit einem starken positiven regulatorischen Element.

Um den Aufbau des Kernpromotors genauer zu untersuchen müssten als nächstes *Footprinting*-Assays (Sambrook and Russell, 2001) durchgeführt werden. Damit könnte direkt nachgewiesen werden, welche DNS-Abschnitte Proteinfaktoren binden. So könnten Informationen über die genaue Lokalisation der basalen Transkriptionsmaschinerie auf dem Promotor gewonnen werden und die Frage geklärt werden, wie viele Anlagerungsstellen für diese in der Sequenz vorkommen. Dadurch könnten möglicherweise mehrere alternative Kernpromotoren, die zusammen das Kernpromotorareal von Position -366 bis -58 bilden, definiert werden. Basierend darauf wären dann gezielte Untersuchungen an einzelnen Kernpromotoren möglich, die Aufschluß darüber geben könnten, unter welchen Umgebungsbedingungen welcher Kernpromotor bevorzugt benutzt wird und welche cis- und trans-regulatorischen Elemente an der Regulation jedes einzelnen Kernpromotors beteiligt sind.

Es ist gut vorstellbar, dass ein so komplex reguliertes Gen wie Nab2 ein aus mehreren individuell regulierten Untereinheiten aufgebautes Kernpromotorareal benötigt, um sowohl ein gewebespezifisches Expressionsmuster, als auch die Induzierbarkeit durch eine Vielzahl von Stimuli zu ermöglichen. Entsprechend dem Prinzip der kombinatorischen Genregulation könnte ein solcher modularer Aufbau mehrere komplexe Programme zur Genexpression in Anbetracht einer limitierten Zahl von zellulären Transkriptionsfaktoren kodieren (Levine and Tjian, 2003; Smale and Kadonaga, 2003).

5.2 Die Ausdehnung und basale Aktivität des Nab2-Promotors

Nach der Identifikation von Transkriptionsstartpunkten und der Eingrenzung des Kernpromotors wurden als nächstes die Ausdehnung und die basale Aktivität des gesamten Nab2-Promotors in verschiedenen Zelllinien analysiert. So sollten funktionell wichtige Regionen des Nab2-Promotors und wenn möglich die Ursache für die hohe Expression in Melanomzellen identifiziert werden.

Die langen Konstrukte luc-1272, luc-872 und luc-679 haben eine ca. 300- bis 400fach über dem Leervektor liegende Aktivität. Die maximale Expression wird dabei schon durch das Konstrukt luc-679 erreicht. Das deutet darauf hin, dass in diesem Konstrukt der gesamte Promotor des Nab2-Gens enthalten ist. Die *in silico* Vorhersage mit dem *PromoterInspector*TM (Promotorlokalisation von Position -705 bis -82) stimmt damit überein (Abb. 5.1).

Bei der Analyse der weiteren Verkürzungskonstrukte von Konstrukt luc-679 ausgehend fällt auf, dass die hohe Aktivität dieses Konstruktes vorwiegend durch mehrere positive regulatorische Elemente zwischen den Positionen -679 und -263 hervorgerufen wird (Abb.5.1).

Der DNS-Abschnitt von -379 bis -263 führt zu einem Aktivitätsanstieg auf das 3,5fache in Mel888 bzw. das 4fache in Colo320. Er enthält vier Sp1-Bindestellen und jeweils eine Egr1-, Egr2/3-, AP2- und RREB1-Bindestelle. Drei der Sp1-Bindestellen überlappen in dieser Region mit der Egr1-Bindestelle. Überlappende Egr1- und Sp1-Bindestellen wurden auch in vielen anderen Promotoren beschrieben (Khachigian et al., 1995; Huang et al., 1997; Call and Wolfe, 2002). Egr1 und Sp1 beeinflussen sich an solchen Bindestellen gegenseitig, wovon sowohl synergistische, als auch antagonistische Wirkungen ausgehen können.

Die Region von -468 bis -379 bewirkt einen weniger ausgeprägten Aktivitätsanstieg. Sie enthält drei Sp1-Bindestellen, von denen zwei mit einer Egr1-Bindestelle überlappen. Dieser DNS-Abschnitt steigert die Transkriptionsaktivität auf das 2,7fache in Mel888 und auf das 1,7fache in Colo320.

Zwischen Position -558 und -468 liegen zwei Sp1-, eine Egr1/2/3- und eine RREB1-Bindestelle. Dieser Abschnitt führt in Mel888 zu keiner Aktivitätszunahme und in Colo320 zu einer Aktivitätszunahme auf das 1,5fache.

Die Region von -679 bis -558 führt wieder zu einem ausgeprägten Aktivitätszuwachs. Die Promotoraktivität steigt in Mel888 auf das 3,2fache und in Colo320 auf das 2fache. In dieser Region liegen je eine Sp1-, Egr1/2/3-, Egr2/3- und AP2-Bindestelle.

Jeder dieser 4 Promotorabschnitte verursacht also eine deutliche Aktivitätszunahme, bis mit dem Konstrukt luc-679 die maximale basale Aktivität erreicht ist. Dabei fällt auf, dass jeder der 4 Promotorabschnitte Sp1-Bindestellen enthält. Stromaufwärts von Position -679 sind dagegen keine Sp1-Bindestellen mehr vorhanden und die Aktivität steigt nicht weiter an. Damit liegt die Vermutung nahe, dass die Sp1-Elemente - wie auch in einer Vielzahl anderer humaner Promotoren, wie z.B. dem der Caspase 8 (Liedtke et al., 2003) oder dem des α IIb-Gens (Block et al., 1996) - für die Stärke der basalen Expression des Nab2-Promotors wichtig sind.

Die Regionen von -379 bis -263 und von -679 bis -558, die höhere Aktivitätszuwächse bewirken als die Regionen von -468 bis -379 und von -558 bis -468, enthalten außerdem jeweils eine AP2-Bindestelle. Allerdings sprechen die Expressionsdaten dieses Transkriptionsfaktors in Mel888 und Colo320 Zelllinien dagegen, dass AP2 den positiven regulatorischen Effekt bewirkt. RT-PCR-Untersuchungen an Colo320 Zelllinien haben gezeigt, dass im nicht-induzierten Zustand keine AP2-mRNS detektiert werden konnte (Mintz-Weber and Johnson, 2000), dagegen wird AP2 in Mel888 auch im unstimulierten Zustand hoch exprimiert. AP2 hat für die basale Expression des Nab2-Promotors mit großer Wahrscheinlichkeit keine Bedeutung, weil sonst eine deutlich höhere Aktivität der Reporterkonstrukte in den AP2 exprimierenden Mel888 Zelllinien zu erwarten wäre.

Egr1, Egr2 und Egr3 sind induzierbare Transkriptionsfaktoren, die in den meisten Zelllinien im unstimulierten Zustand nur sehr niedrig exprimiert werden (Beckmann and Wilce, 1997; Patwardhan et al., 1991; Rangnekar et al., 1989). Außerdem wirkt Nab2 als transkriptioneller Korepressor auf diese drei Egr-Transkriptionsfaktoren. Die hohen Nab2-Spiegel in Mel888 würden die trans-Aktivierungsaktivität der Egr-Transkriptionsfaktoren wahrscheinlich unterdrücken. Aus diesen Gründen haben die Egr-Transkriptionsfaktoren vermutlich keine Bedeutung für die basale Expression.

Der Transkriptionsfaktor RREB1 ist zwar ubiquitär exprimiert, muss aber erst durch Signalmoleküle aus dem Ras-Signalweg aktiviert werden (Thiagalingam et al., 1996). Auch er ist ohne exogene Stimulation nicht aktiv. Demnach ist die Wahrscheinlichkeit gering, dass RREB1 die konstitutive Expression des Nab2-Gens bewirkt. Allerdings

gibt es bislang keine Daten zur Expression dieser Transkriptionsfaktoren in den getesteten Zelllinien. Da es sich um Tumorzelllinien handelt ist eine aberrante Expression nicht ausgeschlossen.

In Melanomzelllinien ist Nab2 im Vergleich zu Karzinomzelllinien überexprimiert. Wie in Kap. 1.3 erläutert, wird die Überexpression durch eine erhöhte transkriptionelle Aktivität des Nab2-Gens verursacht. Bei der Transfektion der Nab2-Reporterkonstrukte in Karzinom- und Melanomzelllinien, konnte aber keine höhere Nab2-Reportergenaktivität in den Melanomzelllinien beobachtet werden (Abb. 4.10).

Um auszuschließen, dass es sich dabei um ein Artefakt handelt, das durch eine unterschiedliche Transfektionseffizienz von Colo320 und Mel888 Zelllinien hervorgerufen wird, wurde der *Dual-Luciferase-Reporter-Assay*TM eingesetzt. Durch diesen kann der Einfluss unterschiedlicher Transfektionseffizienzen eliminiert werden und die Daten aus unterschiedlichen Zelllinien werden besser vergleichbar. Auch diese Versuche zeigten keine erhöhte Expression der Nab2-Reportergenkonstrukte in Mel888 im Vergleich zu Colo320 (Abb. 4.13). Auch bei der Untersuchung weiterer Zelllinien (Melanomzelllinien: MelJuso, SBC12; Karzinomzelllinien: Kato III) konnte kein Unterschied festgestellt werden.

Die Diskrepanz zwischen der unterschiedlichen chromosomalen Nab2-Promotoraktivität in Melanomzelllinien und Karzinomzelllinien und einer identischen Promotoraktivität der Nab2-Reportergenkonstrukte in Melanom- und Kolonkarzinomzelllinien kann mehrere Gründe haben. Das längste benutzte Nab2-Reporterkonstrukt enthält nur die regulatorische Sequenz bis 1.272 bp stromaufwärts vom Nab2-Startkodon. Diese Region enthält zwar den Nab2-Promotor, *Enhancer* oder *Silencer* liegen allerdings meistens weiter stromaufwärts, in Extremfällen sogar bis ca. 100 kbp vom Promotor entfernt (Levine and Tjian, 2003). Ein solcher *Enhancer* könnte z.B. im chromosomalen Nab2-Gen in Mel888 aktiv sein und die hohe Nab2-Expression verursachen. Genauso könnte ein *Silencer* im chromosomalen Nab2-Gen in Colo320 wirksam sein und zu den niedrigen Nab2-Spiegeln in dieser Zelllinie führen. Diese Hypothese wird dadurch gestützt, dass gerade die gewebespezifische Expression vieler Gene durch *Enhancer* oder *Silencer* geregelt wird (Ernst and Smale, 1995; Novina and Roy, 1996). Um die Existenz solcher *Enhancer* oder *Silencer* zu untersuchen, müssten Versuche mit weiter nach 5' reichenden Reporterkonstrukten durchgeführt werden. Eine weitere mögliche

Erklärung für den fehlenden Expressionsunterschied der Nab2-Reportergenkonstrukte in Melanom- und Karzinomzelllinien beruht darauf, dass es sich bei Reportergen-Plasmiden um ein artifizielles System handelt. Histone sind an den chromosomalen Nab2-Promotor in einer genau festgelegten und regulierten Weise angelagert (Turner, 2002). Sie haben eine herausragende Bedeutung für die transkriptionelle Regulation (s. Kap. 1.4). Ein *in vitro* transfiziertes Plasmid wird nur teilweise von Histonen gebunden und das dabei auftretende Histonmuster unterscheidet sich von dem Histongerüst, das unmittelbar im Anschluss an die Replikation an die chromosomale DNS angelagert wird (Lucchini and Sogo, 1995). *In vivo* Experimente haben beispielsweise gezeigt, dass der replikationsgekoppelte Chromatinaufbau für die Reprimierung der Basalexpression wichtig ist (Almouzni and Wolffe, 1993; Paranjape et al., 1994). Um abschließend zu klären, ob die Promotorregion in den verwendeten Reporterkonstrukten unter dem Einfluss eines korrekt angelagerten Histongerüsts nicht doch eine höhere Expression in Melanomzelllinien als in Karzinomzelllinien zeigt, müssten transgene Mäuse mit diesen Konstrukten generiert werden. Alternativ könnte das Histonmuster am chromosomalen Nab2-Promotor in Melanom- und Karzinomzelllinien durch DNaseI-Hypersensitivitätsassays (Lewin, 2000; Körner and Müller, 2000) untersucht werden. Ließe sich damit ein unterschiedliches Histonmuster in Melanom- und Karzinomzelllinien nachweisen, wäre das ein Hinweis auf eine wichtige Rolle des Chromatins bei der Regulation von Nab2 (Jones and Baylin, 2002).

Die aufgezeigten Limitationen dieses artifiziiellen Systems (Abwesenheit von *Silencern* und unzureichende Histonanlagerung) könnten auch erklären, warum die langen Konstrukte (luc-679, luc-872, luc-1272) in den Nab2 negativen Karzinomzelllinien eine sehr starke transkriptionelle Aktivität haben. Es kann nicht ausgeschlossen werden, dass die *in vitro* beobachtete Nab2-Promotoraktivität *in vivo* durch die Nukleosomen blockiert würde. Die für die starke basale Expression im Nab2-Reportergensystem identifizierten Promotorregionen von -679 bis -263 hätte dann im *in vivo* System wahrscheinlich aber immer noch eine wichtige Bedeutung für die maximale Expressionsstärke des Nab2-Promotors nach Aktivierung.

Auch aktivierende Mutationen in der regulatorischen Region könnten die Überexpression von Nab2 in Melanomzellen verursachen. Um dies näher zu untersuchen müsste die Nab2-5'-Region in Melanomzelllinien sequenziert werden. Diese Sequenz könnte dann mit der im Rahmen dieser Arbeit identifizierten

genomischen DNS-Sequenz bzw. der GenBank-Sequenz verglichen werden um Mutationen zu identifizieren. Schließlich wäre auch die Amplifikation des Nab2-Genlokus als Ursache der Überexpression in Melanomzelllinien vorstellbar. Dies ist eher unwahrscheinlich, weil Southern-Blot-Experimente mit genomischer DNS aus Melanomzelllinien keine Zunahme der Bandenstärke im Vergleich zu nicht-Melanomzellen gezeigt haben (Kirsch et al., 1996). Die Überexpression wird wahrscheinlich auch nicht durch eine Translokation des Nab2-Gens an einen anderen Promotor verursacht, weil sich in diesem Fall die Fragmentgrößen im Southern-Blot von denen des Wildtyp-Gens unterscheiden würden. Ein solcher Unterschied konnte aber nicht festgestellt werden (Kirsch et al., 1996).

Eine epigenetische Regulation durch DNS-Methylierung spielt wahrscheinlich keine Rolle. Methylierungs- und Demethylierungsvorgänge sind langsame Vorgänge und der Methylierungszustand der DNS ändert sich nur über viele Stunden bis Tage (Thomassin et al., 2001). Das Expressionsniveau von Nab2 erreicht dagegen innerhalb von nur zwei Stunden nach Induktion ein Maximum, so dass davon ausgegangen werden muss, dass die Nab2-Expression durch Transkriptionsfaktoren reguliert wird und Methylierungsvorgänge am Nab2-Promotor höchstens eine untergeordnete Rolle spielen.

5.3 Die Induktion des Nab2-Promotors

Das *delayed early response*-Gen Nab2 kann in allen bislang untersuchten Geweben durch zahlreiche Stimuli induziert werden (Kirsch et al., 1996; Svaren et al., 1996). Um zu ermitteln, ob diese Induktion auf der Transkriptionsebene reguliert wird, wurden die Nab2-Reportergenkonstrukte in Zellen transfiziert und diese mit dem Nab2-Induktor PMA behandelt. Die PMA-Stimulation führte bei den Konstrukten luc-872 bis luc-232 zu einer Zunahme der Promotoraktivität (Abb. 4.14). Damit konnte gezeigt werden, dass die Nab2-Induktion nach Stimulation mit PMA auf einer gesteigerten Transkription beruht. Interessant ist, dass bereits das Konstrukt luc-232 durch PMA-Stimulation eine Aktivitätszunahme auf das ca. 3fache der Basalaktivität zeigte und dass auch die längeren Konstrukte keine stärkere relative Aktivitätszunahme bei Stimulation aufwiesen. Das nächstkürzere Konstrukt luc-213 ließ sich dagegen nicht durch PMA induzieren. Die für die maximale Induzierbarkeit durch PMA notwendigen Elemente sind also in der Region zwischen Position -232

bis -213 lokalisiert. Darin liegen je eine putative Egr1- und Sp1-Bindestelle, die sich teilweise überlappen. Die Egr1-Bindestelle an Position -222 (Egr1/-222) stimmt vollständig mit der Egr1-Konsensussequenz G C G ^T/_G G G G C G (Swirnoff and Milbrandt, 1995) überein und ist zwischen dem murinen und dem humanen Nab2-Promotor konserviert (Abb. 4.7). Das Vorliegen evolutionär hoch konservierter Transkriptionsfaktor-Bindestellen in einem Promotor deutet auf eine wichtige Funktion dieser cis-Elemente hin (Tümpel et al., 2002; Yamashita et al., 2002). Die überlappende Sp1-Bindestelle an Position -220 ist ebenfalls konserviert und stimmt genau mit der Sp1-Konsensussequenz überein (Dyran and Tjian, 1983). Sp1 ist ein ubiquitär exprimierter Transkriptionsfaktor, der durch PMA nicht induziert wird (Khachigian et al., 1995). Damit ist es unwahrscheinlich, dass die Aktivitätszunahme nach PMA-Induktion durch Sp1 verursacht wird. Es sprechen aber mehrere Erkenntnisse dafür, dass Egr1 die Zunahme der transkriptionellen Aktivität des Nab2-Promotors nach PMA-Stimulation bewirkt. Nach PMA-Stimulation wird das *immediate early response*-Gen Egr1 zeitlich unmittelbar vor dem *delayed early response*-Gen Nab2 exprimiert (Svaren et al., 1996; Kirsch et al., 1996). Aufgrund der zeitlichen Abfolge und seiner Funktion als vorwiegend aktivierender Transkriptionsfaktor könnte Egr1 die Transkription am Nab2-Promotor steigern. Außerdem ist bekannt, dass die experimentelle Überexpression von Egr1 in Maus-Neuroblastomzelllinien die Nab2-Expression erhöht (Ehrengruber et al., 2000). Schließlich erscheint auch die funktionelle Konsequenz einer solchen Induktion von Nab2 durch Egr1 sinnvoll: Egr1 induziert seinen eigenen Inhibitor um eine überschießende Aktivierung von Egr1-Zielgenen zu verhindern.

Um die Bedeutung der Egr1/-222-Bindestelle für die Induktion von Nab2 genauer zu analysieren wurde sie in einigen der Nab2-Reportergenkonstrukte mutiert. Dadurch wurde die Egr1-Konsensussequenz G C G G G G C G zur Basenfolge **C T T G G G G C G** abgewandelt. Die Konsensussequenz der überlappenden Sp1-Bindestelle blieb dabei unverändert. Die Reportergenassays mit den mutierten Konstrukten luc-872_{mut}, luc-558_{mut}, luc-468_{mut} und luc-245_{mut} zeigten, dass die basale Aktivität dieser Konstrukte im Vergleich zu den Wildtyp-Konstrukten unverändert ist (Abb. 4.15). Für die basale Aktivität des Nab2-Promotors hat die Egr1/-222-Bindestelle also keine Bedeutung. Da Egr1 in den meisten nicht stimulierten Zelllinien nur sehr gering exprimiert ist, entspricht dies auch den Erwartungen.

Nach PMA-Stimulation der mit luc-245_{mut} und luc-872_{mut} transfizierten Zellen, zeigt sich die Bedeutung der Egr1/-222-Bindestelle für die Induktion deutlich (Abb. 4.16). Beide Konstrukte waren durch PMA induzierbar, die Aktivitätszunahme war jedoch für luc-245_{mut} um 55% bis 74% und für luc-872_{mut} um 35% bis 50% geringer als bei den Wildtyp-Konstrukten. Die starke Abnahme der Induzierbarkeit deutet darauf hin, dass Egr1 der wichtigste Induktor des Nab2-Promotors ist und dass die Induktion vorwiegend über die Egr1/-222-Bindestelle herbeigeführt wird. Um experimentell zu bestätigen, dass es sich bei dem trans-aktivierenden Element um Egr1 handelt, wurden Reporterassays mit den Wildtyp-Konstrukten und den mutierten Konstrukten bei experimentell überexprimiertem Egr1 durchgeführt. Bei der Kotransfektion der Konstrukte luc-232 und luc-872 mit variablen Mengen eines Egr1-Expressionsvektors zeigte sich eine deutliche, dosisabhängige Zunahme der Nab2-Promotoraktivität bis auf das 4- bis 6fache der Ausgangsaktivität (Abb. 4.17). Somit kann durch den Transkriptionsfaktor Egr1 die transkriptionelle Aktivität des Nab2-Promotors in Mel888 und Colo320 Zelllinien ungefähr im gleichen Maße gesteigert werden wie durch PMA-Stimulation. Bei der Kotransfektion der mutierten Konstrukte luc-245_{mut} und luc-872_{mut} mit dem Egr1-Expressionsvektor konnte gezeigt werden, dass es sich dabei um eine direkte Egr1-Wirkung am Nab2-Promotor handelt (Abb. 4.18). Das Konstrukt luc-245_{mut} war durch die Mutation der Egr1-Bindestelle an Position -222 nicht mehr durch Egr1 induzierbar. Die Aktivität des langen Konstruktes luc-872_{mut} ließ sich dagegen noch durch die Egr1-Kotransfektion steigern. Die Aktivitätszunahme war jedoch um 64% bis 73% geringer als die des Wildtyp-Konstruktes. Damit konnte gezeigt werden, dass Egr1 den Nab2-Promotor hauptsächlich über die Egr1/-222-Bindestelle aktiviert.

Überlappende Egr1/Sp1-Bindestellen, wie hier die Egr1/-222-Bindestelle und die Sp1-Bindestelle an Position -220, wurden bereits in mehreren anderen humanen Promotoren identifiziert (Call and Wolfe, 2002; Khachigian et al., 1995; In et al., 1997). Besonders gut beschrieben ist die Egr1/Sp1-Bindestelle im proximalen Promotor des Plättchenwachstumsfaktor-A (PDGF-A) (Khachigian et al., 1995). Im Ruhezustand wird die Egr1/Sp1-Bindestelle im PDGF-A-Promotor von Sp1 gebunden. Dadurch wird eine niedrige basale Transkriptionsaktivität möglich. Nach PMA-Stimulation verdrängt Egr1 dann Sp1 von der Bindestelle. Dies führt zu einer starken Zunahme der Transkriptionsaktivität. Ein ähnlicher Interaktionsmechanismus könnte auch im Nab2-Promotor auftreten.

Die Aktivierbarkeit durch Egr1-Kotransfektion geht bei dem Konstrukt *luc-872_{mut}* durch die Egr1/-222-Mutation nicht vollständig verloren. Deswegen muss davon ausgegangen werden, dass mindestens eine der drei weiter stromaufwärts liegenden Egr1-Bindestellen an der Aktivierung beteiligt ist. Durch PMA ist das Konstrukt *luc-872_{mut}* außerdem stärker aktivierbar als durch alleinige Egr1-Kotransfektion. Das deutet darauf hin, dass neben Egr1 auch noch andere Transkriptionsfaktoren an der PMA-vermittelten Induktion beteiligt sind. Egr2 und Egr3 werden genauso wie Egr1 durch PMA induziert und könnten als vorwiegend aktivierende Transkriptionsfaktoren dabei eine Rolle spielen. Durch PMA-Stimulation wird auch CREB/ATF6 aktiviert und AP2 induziert (Sanz et al., 2004; Zeng et al., 1997). Dagegen ist nicht bekannt, ob RREB1 PMA-induzierbar ist. Es ist möglich, dass auch diese Transkriptionsfaktoren zur Induktion von Nab2 beitragen. Nicht geklärt werden konnte, warum das Konstrukt *luc-245_{mut}* nicht durch Egr1, aber noch in geringem Maße durch PMA stimulierbar war (Abb. 4.16). Möglicherweise wird dies durch die putative Sp1-Bindestelle an Position -220 ermöglicht. Sp1 wird durch PMA nicht induziert (Khachigian et al., 1995), allerdings kann Sp1 durch PMA-Stimulation phosphoryliert werden (Milanini-Mongiat et al., 2002). In der Regel führt die Phosphorylierung aber zu einer schwächeren Bindung von Sp1 an die DNS und damit zu einer Abnahme der trans-Aktivierungsaktivität. Alternativ wäre es auch möglich, dass PMA den eng mit Sp1 verwandten Transkriptionsfaktor Sp3 induziert. Dieser kann an Sp1-Elemente binden und wirkt daran aktivierend (Li et al., 2004).

Die experimentellen Daten zur Induktion der Nab2-Expression durch PMA und Egr1 zeigen folglich, dass diese durch eine erhöhte transkriptionelle Aktivität des Nab2-Promotors hervorgerufen wird. Das Egr1/-222-Element spielt dabei eine besonders wichtige Rolle, da es alleine für die maximale Induktion ausreicht. Wird diese Bindestelle mutiert, so sinkt die Aktivitätszunahme des gesamten Promotors nach PMA-Induktion um bis zu 50%. Die Egr1/-222-Bindestelle ist damit wahrscheinlich die am stärksten aktivierende Egr1-Bindestelle im Nab2-Promotor. Darüber hinaus sind aber noch weitere Bindestellen an der Aktivierung des Nab2-Promotors durch PMA und Egr1 beteiligt.

5.4 Schlussfolgerung

Werden die Ergebnisse aus den Analysen der Transkriptionsstartpunkte, des Kernpromotors (Kap. 5.1), der basalen (Kap. 5.2) und der induzierten Nab2-Expression (Kap. 5.3) zusammen betrachtet, so ergibt sich ein komplexer Aufbau des Nab2-Promotors (Abb. 5.1). Der TATA- und Inr-lose CpG-Insel-Promotor setzt sich aus einem Kernpromotor (Position -366 bis -58) mit einem mindestens 250 bp großen Transkriptionsstartareal, und einer aktivierenden Region (Position -679 bis -263) zusammen. Die aktivierende Region führt bereits unter unstimulierten Bedingungen zu einer sehr hohen basalen Expression. Die multiplen Sp1-Bindestellen zwischen Position -617 und -182 haben dabei wahrscheinlich Einfluss auf die Lokalisation der Transkriptionsstartpunkte sowie auf die basale und maximale Expressionsaktivität des Nab2-Promotors.

Die PMA vermittelte Induktion des Nab2-Promotors wird hauptsächlich durch den Transkriptionsfaktor Egr1 hervorgerufen. Für die transkriptionsinduzierende Wirkung von Egr1 am Nab2-Promotor ist vorwiegend die Egr1-Bindestelle an Position -222 verantwortlich. Diese wird partiell von einem Sp1-Element überlappt. Zum Erreichen der maximalen Expressionsstärke nach Stimulation ist jedoch neben der Egr1/-222-Bindestelle die Präsenz der aktivierenden, stromaufwärts gelegenen Region zwischen Position -263 und -679 notwendig. Diese enthält 10 der insgesamt 12 im Nab2-Promotor vorhandenen Sp1-Konsensussequenzen.

Diese Ergebnisse zeigen, dass der Transkriptionsfaktor Egr1 die Expression seines eigenen Korepressors Nab2 induziert. Funktionell liegt damit ein negativer Rückkoppelungs-Mechanismus vor. Über diesen Mechanismus wird die trans-Aktivierungsaktivität von Egr1 an Egr1-Zielgenen (Abb. 5.2 A) und vermutlich auch am Nab2-Gen (Abb. 5.2 B) inhibiert. So könnte eine überschießende Aktivierung von Egr1-Zielgenen verhindert werden. Außerdem könnte dieser Rückkoppelungs-Mechanismus die Repressorwirkung von Egr1 am Egr1-Promotor (Cao et al., 1993) inhibieren (Abb. 5.2 C). Die Egr1-vermittelte Nab2-Induktion würde den Egr1-Promotor wieder aktivierbar machen und ihn so für die nächste Auslösung des Egr1-Nab2-Systems vorbereiten. Diese Zusammenhänge sind bislang hypothetischer Natur und müssen experimentell bestätigt werden.

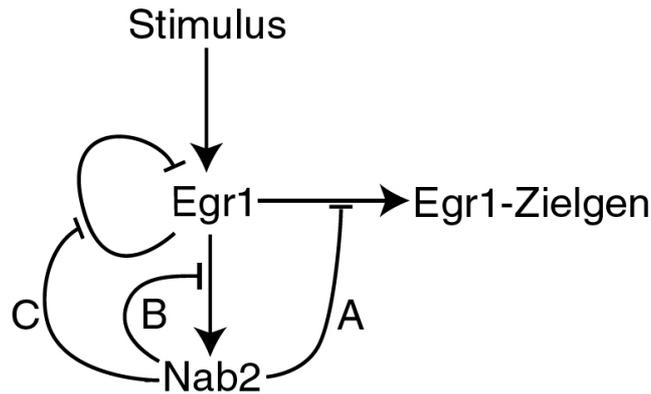


Abb. 5.2: Modellvorstellung der Regulation der Egr1-Aktivität. Spitzer Pfeil = aktivierende Wirkung; stumpfer Pfeil = inhibierende Wirkung.

Aus den im Rahmen dieser Arbeit gewonnenen Daten konnte eine Modellvorstellung entwickelt werden, die zeigt, wie eine kontrollierte Aktivierung und eine nachfolgende gezielte Inaktivierung eines Transkriptionsfaktors auf der transkriptionellen Ebene erfolgen kann. Die Kombination aus Autoinhibition des eigenen Promotors und Heteroaktivierung des eigenen Korepressors und anderer Zielgene, und die nachfolgende Inhibition dieser Vorgänge durch den selbst-induzierten Korepressor, könnte ein allgemeines Prinzip der Transkriptionsregulation darstellen. Dies muss an weiteren Transkriptionsfaktoren untersucht werden.

Aufgrund dieser Ergebnisse, die eine bedeutende Rolle für Egr1 am Nab2-Promotor aufzeigen, wäre es im Folgenden interessant, auch den Einfluss der Transkriptionsfaktoren Egr2 und Egr3 auf den Nab2-Promotor zu untersuchen. Da Nab2 auch der stärkste bekannte Korepressor für Egr2 und Egr3 ist, sind ähnliche Regulationsvorgänge auch durch diese Transkriptionsfaktoren zu erwarten. Putative Egr2- und Egr3-Bindestellen sind im Nab2-Promotor vorhanden und erste Hinweise, dass Nab2 ein Zielgen des Transkriptionsfaktors Egr2 ist, liegen bereits vor (Ehrengruber et al., 2000).

Auch für die notwendigen Schritte zum weiteren Verständnis der Nab2-Überexpression im Melanom ergeben sich aus diesen Daten neue Erkenntnisse. Da Nab2 von Egr1 und womöglich auch von Egr2 und Egr3 reguliert wird, ist es wichtig Expressionsdaten dieser drei Transkriptionsfaktoren in Melanomen und Melanomzelllinien zu gewinnen. Womöglich beruht die hohe Nab2-Überexpression auf einer konstitutiv überhöhten Expression eines dieser Transkriptionsfaktoren. Sollte dies der Fall sein, so könnten Egr-Transkriptionsfaktoren eine wichtige Rolle in der Tumorbologie des Melanoms spielen.

6 Zusammenfassung

Nab2 ist in Melanomen und Melanomzelllinien im Vergleich zu Melanozyten und benignen Nävi stark überexprimiert. Durch Stimulation mit Wachstumsfaktoren oder Phorbolester kann Nab2 außerdem in allen Geweben und Zelllinien transient induziert werden. Die Expressionskinetik folgt dabei der eines *delayed early response*-Gens. Das Nab2-Protein ist ein transkriptioneller Korepressor der für die Wachstums- und Differenzierungsregulation wichtigen Zinkfinger-Transkriptionsfaktoren Egr1, Egr2 und Egr3. Das sind *immediate early response*-Gene, die durch die selben Stimuli induziert werden wie Nab2. Nach Stimulation wird die Expression von Egr deswegen grundsätzlich von einem Anstieg der Nab2-Expression gefolgt. Nab2 ist deswegen wahrscheinlich der wichtigste Repressor der Egr-Aktivität und verhindert eine übermäßige Stimulation von Egr-Zielgenen.

Ziel dieser Arbeit war es, die regulatorischen DNS-Abschnitte des Nab2-Gens zu isolieren und genau zu charakterisieren. Am Nab2-Promotor sollten dann die Ursachen für die Überexpression im Melanom untersucht und der Mechanismus der Nab2-Induktion nach Stimulation identifiziert werden.

Dazu wurde die genomische Nab2-DNS in einer humanen DNS-Bibliothek durch DNS-Hybridisierung identifiziert und daraus isoliert. So konnte ein 7.391 bp langes DNS-Fragment kloniert werden, das 1.845 bp der 5'-untranslatierten Region sowie die gesamte, aus 7 Exons aufgebaute proteinkodierende Nab2-Sequenz enthält.

Durch *in silico* Analysen der 5'-untranslatierten Region konnten eine putative Promotorregion von Position -705 bis -82 (+1 = Adenin des Startkodons), eine CpG Insel von Position -876 bis +82 aber keine klassischen Kernpromotorelemente wie eine TATA-Box oder ein Inr-Element identifiziert werden. Der Nab2-Promotor gehört deshalb zur Klasse der TATA- und Inr-losen CpG-Insel-Promotoren. Durch eine Kombination aus EST- und cDNS-Kartierungen sowie Primerextensionsversuchen konnte ein sehr großes Transkriptionsstartareal identifiziert werden, das sich von Position -366 bis -96 erstreckt.

Um funktionelle Studien mit der 5'-untranslatierten Nab2-Region durchzuführen wurden 17 verschiedene 5'-verkürzte Abschnitte daraus in Luziferase-Reportervektoren kloniert und deren transkriptionelle Aktivität in verschiedenen Zelllinien untersucht. Für das Erreichen der maximalen Promotoraktivität (ca. dem 400fachen der Aktivität des Leervektors) war der Sequenzabschnitt stromabwärts von Position -679 ausreichend. Ab Position -58 war dann keine Promotoraktivität

mehr detektierbar. Der Nab2-Promotor erstreckt sich also von Position -679 bis -58. Der Kernpromotor konnte aufgrund der Lokalisation der Transkriptionsstartpunkte (-366 bis -96) und des 3'-Endes des Promotors (-58) zwischen Position -366 und -58 eingegrenzt werden. Die sehr hohe Aktivität des gesamten Nab2-Promotors wird durch die aktivierende Region von Position -679 bis -263 hervorgerufen. Durch diesen DNS-Abschnitt steigt die Aktivität vom 15- bis 30fachen auf das ca. 400fache der Aktivität des Leervektors. In dieser positiven regulatorischen Region konnten 10 putative Sp1-Bindestellen identifiziert werden, die mit hoher Wahrscheinlichkeit zu dem Aktivitätszuwachs beitragen.

Um die Ursache der Überexpression von Nab2 in Melanomzelllinien zu untersuchen, wurde die Aktivität der Nab2-Reporterkonstrukte in Melanomzelllinien, die Nab2 überexprimieren, und in Karzinomzelllinien, die nur wenig Nab2 exprimieren, verglichen. Die Reporterkonstrukte zeigten jedoch in Melanom- und Karzinomzelllinien ungefähr die gleiche Aktivität. Die Ursache für die Überexpression in Melanomzelllinien konnte durch diese Versuche nicht identifiziert werden.

Schließlich wurde die Aktivität der Reporterkonstrukte in unstimulierten und PMA stimulierten Zellen verglichen. Durch die PMA-Stimulation stieg die Aktivität des Nab2-Promotors auf das ca. 3fache der Basalaktivität an. Die gesteigerte Nab2-Expression nach Stimulation wird demnach auf der Transkriptionsebene reguliert. Anhand der Verkürzungskonstrukte konnte ein 19 bp langer DNS-Abschnitt zwischen Position -232 und -213 identifiziert werden, der diesen Anstieg der Promotoraktivität nach Stimulation hervorruft. In diesem Abschnitt liegen je eine Egr1- und Sp1-Bindestelle, die sich teilweise überlappen. Bei Kotransfektion eines Egr1-Expressionsvektors mit den Nab2-Reporterkonstrukten konnte ein Aktivitätsanstieg vergleichbarer Größenordnung wie durch PMA-Stimulation beobachtet werden. Wurde die Egr1-Bindestelle an Position -222 durch Mutation inaktiviert, so nahm die Induzierbarkeit des Nab2-Promotors durch PMA um 35-50% und durch Egr1-Kotransfektion um 64-73% ab. Diese Daten zeigen, dass Egr1 alleine in der Lage ist, den Nab2-Promotor maximal zu aktivieren und dass dieser Effekt vorwiegend über die Egr1-Bindestelle an Position -222 vermittelt wird. Weil der Promotor aber nach der Inaktivierung der Egr1-Bindestelle an Position -222 noch durch PMA und durch Egr1-Kotransfektion aktivierbar ist, sind weitere Egr1-Bindestellen und womöglich noch andere Transkriptionsfaktoren an der Aktivierung beteiligt.

Diese Daten zeigen, dass der Transkriptionsfaktor Egr1 seinen eigenen Korepressor Nab2 induziert. Funktionell liegt also ein negativer Rückkoppelungs-Mechanismus vor, der eine überschießende Egr1-Aktivität verhindert.

7 Literaturverzeichnis

Aalfs, J. and Kingston, R. (2000). What does 'chromatin remodeling' mean? *Trends Biochem Sci* 25, 548-555.

Abdulkadir, S., Qu, Z., Garabedian, E., Song, S., Peters, T., Svaren, J., Carbone, J., Naughton, C., Catalona, W., Ackerman, J., Gordon, J., Humphrey, P., and Milbrandt, J. (2001). Impaired prostate tumorigenesis in Egr-1 deficient mice. *Nature Med* 7, 101-107.

Adamson, E. and Mercola, D. (2002). Egr1 transcription factor: multiple roles in prostate tumor cell growth and survival. *Tumor Biol* 23, 93-102.

Almouzni, G. and Wolffe, A. (1993). Replication coupled chromatin assembly is required for the repression of basal transcription in vivo. *Genes Dev* 7, 2033-2047.

Altschul, S., Gish, W., Miller, W., Myers, E., and Lipman, D. (1990). Basic local alignment search tool. *J Mol Biol* 215, 403-410.

Alvarez, M., Rhodes, S., and Bidwell, J. (2003). Context-dependent transcription: all politics is local. *Gene* 313, 43-57.

Azizkhan, J., Jensen, D., Pierce, A., and Wade, M. (1993). Transcription from TATA-less promoters: dihydrofolate reductase as a model. *Crit Rev Eukaryot Gene Expression* 3, 229-254.

Beckmann, A. and Wilce, P. (1997). Egr transcription factors in the nervous system. *Neurochem Int* 31, 477-510.

Bird, A. (2002). DNA methylation patterns and epigenetic memory. *Genes Dev* 16, 6-21.

Block, K., Shou, Y., and Poncz, M. (1996). An Ets/Sp1 interaction in the 5'-flanking region of the megakaryocyte-specific α IIb gene appears to stabilize Sp1 binding and is essential for expression of this TATA-less gene. *Blood* 88, 2071-2080.

Bradford, M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* 7, 248-254.

Breathnach, R., Benoist, C., O'Hare, K., Gannon, F., and Chambon, P. (1978). Ovalbumin gene: evidence for a leader sequence in mRNA and DNA sequences at the exon-intron boundaries. *Proc Natl Acad Sci* 75, 4853-4858.

Breathnach, R. and Chambon, P. (1981). Organization and expression of eucaryotic split genes coding for proteins. *Annu Rev Biochem* 50, 349-383.

Burke, T., Willy, P., Kutach, A., Butler, J., and Kadonaga, J. (1998). The DPE, a conserved core promoter element that is functionally analogous to the TATA box. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol* 63, 75-82.

- Butler,J. and Kadonaga,J. (2002). The RNA polymerase II core promoter: a key component in the regulation of gene expression. *Genes Dev* 16, 2583-2592.
- Call,G. and Wolfe,M. (2002). Species differences in GnRH activation of the LHbeta promoter: role of Egr1 and Sp1. *Mol Cell Endocrinol* 189, 85-96.
- Cao,X., Mahendran,R., Guy,G., and Tan,Y. (1993). Detection and characterization of cellular Egr-1 binding to its recognition site. *J Biol Chem* 268, 16949-16957.
- Chen,S., Supakar,P., Vellanoweth,R., Song,C., Chatterjee,B., and Roy,A. (1997). Functional role of a conformational flexible homopurine/homopyrimidine domain of the androgen receptor gene promoter interacting with Sp1 and a pyrimidine single strand DNA-binding protein. *Mol Endocrinol* 11, 3-15.
- Clark,H., Elder,D., Guerry,D., and Epstein,M. (1984). A study of tumor progression: The precursor lesions of superficial spreading and nodular melanoma. *Hum Pathol* 15, 1147-1165.
- Colgan,J. and Manley,J. (1995). Cooperation between core promoter elements influences transcriptional activity in vivo. *Proc Natl Acad Sci* 92, 1955-1959.
- Cosma,M. (2002). Ordered recruitment: gene-specific mechanism of transcription activation. *Mol Cell* 10, 227-236.
- Croager,E., Gout,A., and Abraham,L. (2000). Involvement of Sp1 and microsatellite repressor sequences in the transcriptional control of the human *CD30* gene. *Am J Pathol* 156, 1723-1731.
- Cross,S. and Bird,A. (1995). CpG islands and genes. *Curr Opin Genet Dev* 5, 309-314.
- Dever,T. (2002). Gene-specific regulation by general translation factors. *Cell* 108, 545-556.
- Druker,B., Talpaz,M., Resta,D., Peng,B., Buchdunger,E., Ford,J., Lydon,N., Kantarjian,H., Capdeville,R., Ohno-Jones,S., and Swayers,C. (2001). Efficacy and safety of a specific inhibitor of the BCR-ABL tyrosine kinase in chronic myeloid leukemia. *N Engl J Med* 344, 1031-1037.
- Dynan,W. and Tjian,R. (1983). The promoter-specific transcription factor Sp1 binds to upstream sequences in the SV40 early promoter. *Cell* 35, 79-87.
- Ehrengruber,M., Muhlebach,S., Söhrmann,S., Leutenegger,C., Lester,H., and Davidson,N. (2000). Modulation of early growth response (EGR) transcription factor-dependent gene expression by using recombinant adenovirus. *Gene* 258, 63-69.
- Eid,M., Kumar,V., Iczkowski,A., Bostwick,D., and Tindall,D. (1998). Expression of early growth response genes in human prostate cancer. *Cancer Res* 58, 2461-2468.
- Ernst,P. and Smale,S. (1995). Combinatorial regulation of transcription. I: general aspects of transcriptional control. *Immunity* 2, 311-319.

- Feinberg,A. and Tycko,B. (2004). The history of cancer epigenetics. *Nat Rev Cancer* 4, 143-153.
- Feinberg,A. and Vogelstein,B. (1983). A technique for radiolabeling DNA restriction endonuclease fragments to high specific activity. *Anal Biochem* 132, 6-13.
- Fry,C. and Peterson,C. (2002). Unlocking the gates to gene expression. *Science* 295, 1847-1848.
- Gashler,A. and Sukathme,V. (1995). Early growth response protein 1 (Egr-1): prototype of a zinc-finger family of transcription factors. *Prog Nucleic Acid Res Mol Biol* 50, 191-224.
- Geng,Y. and Johnson,L. (1993). Lack of an initiator element is responsible for multiple transcription initiation sites of the TATA-less mouse thymidylate synthase promoter. *Mol Cell Biol* 13, 4894-4903.
- Hall,H., Miller,D., Rogers,J., and Bewerse,B. (1999). Update on the incidence and mortality from melanoma in the United States. *J Am Acad Dermatol* 40, 35-42.
- Han,M. and Grunstein,M. (1988). Nucleosome loss activates yeast downstream promoters in vivo. *Cell* 55, 1137-1145.
- Hanahan,D. and Weinberg,R. (2000). The Hallmarks of Cancer. *Cell* 100, 57-70.
- Herman,J. and Baylin,S. (2003). Gene silencing in cancer in association with promoter hypermethylation. *N Engl J Med* 349, 2042-2054.
- Huang,R., Fan,Y., Ni,Z., Mercola,D., and Adamson,E. (1997). Reciprocal modulation between Sp1 and Egr-1. *J Cell Biochem* 66, 489-499.
- Huang,R., Fan,Y., Peng,A., Zeng,Z., Reed,J., Adamson,E., and Boynton,A. (1998). Suppression of human fibrosarcoma cell growth by transcription factor, Egr-1, involves down-regulation of Bcl-2. *Int J Cancer* 77, 880-886.
- Huang,R., Liu,C., Fan,Y., Mercola,D., and Adamson,E. (1995). Egr-1 negatively regulates tumor cell growth via the DNA-binding domain. *Cancer Res* 55, 5054-5062.
- In,K., Asano,K., Beier,D., Grobholz,J., Finn,P., Silverman,E., Silverman,E., Collins,T., Fischer,A., Keith,T., Serino,K., Kim,S., De Sanctis,G., Yandava,C., Pillari,A., Rubin,P., Kemp,J., Israel,E., Busse,W., Ledford,D., Murray,J., Segal,A., Tinkleman,D., and Drazen,J. (1997). Naturally occurring mutations in the human 5-Lipoxygenase gene promoter that modify transcription factor binding and reporter gene transcription. *J Clin Invest* 99, 1130-1137.
- Ince,T. and Scotto,K. (1995a). A conserved downstream element defines a new class of RNA polymerase II promoters. *J Biol Chem* 270, 30249-30252.
- Ince,T. and Scotto,K. (1995b). Differential utilization of multiple transcription start points accompanies the overexpression of the P-glycoprotein encoding gene in Chinese hamster lung cells. *Gene* 156, 287-290.

- Javahery,R., Khachi,A., Lo,K., Zenzie-Gregory,B., and Smale,ST. (1994). DNA sequence requirements for transcriptional initiator activity in mammalian cells. *Mol Cell Biol* 14, 116-127.
- Jones,P. and Baylin,S. (2002). The fundamental role of epigenetic events in cancer. *Nat Rev Genet* 3, 415-428.
- Kadonaga,J. (2002). The DPE, a core promoter element for transcription by RNA polymerase II. *Exp Mol Med* 34, 259-264.
- Kadonaga,J. (2004). Regulation of RNA polymerase II transcription by sequence-specific DNA binding factors. *Cell* 116, 247-257.
- Khachigian,L., Williams,A., and Collins,T. (1995). Interplay of Sp1 and Egr-1 in the proximal platelet-derived growth factor A-chain promoter in cultured vascular endothelial cells. *J Biol Chem* 46, 27679-27686.
- Kirsch,K., Korradi,Y., and Johnson,J. (1996). Mader: a novel nuclear protein over expressed in human melanomas. *Oncogene* 12, 963-971.
- Kobayashi,D., Yamada,M., Kamagata,C., Kaneko,R., Tsuji,N., Nakamura,M., Yagihashi,A., and Watanabe,N. (2002). Overexpression of early growth response-1 as a metastasis-regulatory factor in gastric cancer. *Anticancer Res* 22, 3963-3970.
- Körner,K. and Müller,R. (2000). In vivo structure of the cell cycle-regulated human cdc25C promoter. *J Biol Chem* 275, 18676-18681.
- Körner,K., Wolfrain,L., Lucibello,F., and Müller,R. (1997). Characterization of the TATA-less core promoter of the cell cycle-regulated cdc25C gene. *Nucleic Acids Res* 25, 4933-4939.
- Kramer, D. (2000) MADER: Biochemische Eigenschaften und Regulation eines humanen Transkriptionskorepressors. Fakultät für Chemie und Pharmazie der Ludwig-Maximilians-Universität München. Dissertation.
- Krones-Herzig,A., Adamson,E., and Mercola,D. (2003). Early growth response 1 protein, an upstream gatekeeper of the p53 tumor suppressor, controls replicative senescence. *Proc Natl Acad Sci* 100, 3233-3238.
- Landry,J., Mager,D., and Wilhelm,B. (2003). Complex controls: the role of alternative promoters in mammalian genomes. *Trends Genet* 19, 640-648.
- Lau,L. and Nathans,D. (1991). The hormonal control of gene transcription., G.Foulkes and P.Cohen, eds. Elsevier), pp. 257-293.
- LeBeau,M., Espinosa,R., Neuman,W., Stock,W., Roulston,D., Larson,R., Keinanen,M., and Westbrook,C. (1993). Cytogenetic and molecular delineation of the smallest commonly deleted region of chromosome 5 in malignant myeloid disease. *Proc Natl Acad Sci* 90, 5484-5488.
- Lee,S., Sadovsky,Y., Swirnoff,A., Polish,J., Goda,P., Gayrilina,G., and Milbrandt,J. (1996). Luteinizing hormone deficiency and female infertility in mice lacking the transcription factor NGFI-A (Egr-1). *Science* 273, 1219-1222.

- Lemon,B. and Tjian,R. (2000). Orchestrated response: a symphony of transcription factors for gene control. *Genes Dev* 14, 2551-2569.
- Levin,W., Baynor,R., Press,M., Sukathme,V., Boone,T., Reissmann,P., Figlin,R., Holmes,E., Souza,L., and SalmonDJ (1995). Expression patterns of immediate early transcription factors in human non-small cell lung cancer. *Oncogene* 11, 1261-1269.
- Levine,M. and Tjian,R. (2003). Transcription regulation and animal diversity. *Nature* 424, 147-151.
- Lewin,B. (2000). *Genes VII*. (New York: Oxford University Press).
- Li,L., He,S., Sun,J., and Davie,J. (2004). Gene regulation by Sp1 and Sp3. *Biochem Cell Biol* 82, 460-471.
- Liedtke,C., Gröger,N., Manns,M., and Trautwein,C. (2003). The human caspase-8 promoter sustains basal activity through SP1 and ETS-like transcription factors and can be up-regulated by a p53-dependent mechanism. *J Biol Chem* 278, 27593-27604
- Lin,Y., Ince,T., and Scotto,K. (2001). Optimization of a versatile in vitro transcription assay for the expression of multiple start site TATA-less promoters. *Biochemistry* 40, 12959-12966.
- Liu,C., Calogero,A., Ragona,G., Adamson,E., and Mercola,D. (1996). EGR-1, the reluctant suppression factor: EGR-1 is known to function in the regulation of growth, differentiation, and also has significant tumor suppressor activity and a mechanism involving the induction of TGF-beta1 is postulated to account for this suppressor activity. *Crit Rev In Oncogen* 7, 101-125.
- Liu,C., Yao,J., de Belle,I., Huang,R., Adamson,E., and Mercola,D. (1999). The transcription factor EGR-1 suppresses transformation of human fibrosarcoma HT1080 cells by coordinated induction of transforming growth factor-beta1, fibronectin, and plasminogen activator inhibitor-1. *J Biol Chem* 274, 4400-4411.
- Liu,Y., Gano,J., Huang,R., Lin,Y., Wang,S., and Huang,R. (2002). Analysis of gene expression in Egr-1 transfected human fibrosarcoma cells. *J Surg Oncol* 80, 190-196.
- Lodish,H. (1999). *Molecular cell biology*. (New York: W.H. Freeman and Company).
- Lucchini,R. and Sogo,J. (1995). Replication of transcriptionally active chromatin. *Nature* 374, 276-282.
- Macleod,D., Charlton,J., Mullins,J., and Bird,A. (1994). Sp1 sites in the mouse aprt gene promoter are required to prevent methylation of the CpG island. *Genes Dev* 8, 2282-2292.
- McMasters,K., Sondak,V., Lotze,M., and Ross,M. (1999). Recent advances in melanoma staging and therapy. *Ann Surg Oncol* 6, 467-475.
- Messing,J., Gronenborn,B., ulla-Hill,B., and ans,H. (1977). Filamentous coliphage M13 as a cloning vehicle: insertion of a HindII fragment of the lac regulatory region in M13 replicative form in vitro. *Proc Natl Acad Sci* 74, 3642-3646.

- Milanini-Mongiati, J., Pouyssegur, J., and Pages, G. (2002). Identification of two Sp1 phosphorylation sites for p42/p44 mitogen activated protein kinases: their implication in vascular endothelial growth factor gene transcription. *J Biol Chem* 277, 20631-20639.
- Milbrandt, J. (1987). A nerve growth factor-induced gene encodes a possible transcriptional regulatory factor. *Science* 238, 799.
- Mintz-Weber, C. and Johnson, J. (2000). Identification of the elements regulating the expression of the cell adhesion molecule MCAM/MUC18. Loss of AP-2 is not required for MCAM expression in melanoma cell lines. *J Biol Chem* 275, 34672-34680.
- Muthukkumar, S., Nair, P., Sells, S., Maddiwar, N., Jacob, R., and Rangnekar, V. (1995). Role of EGR-1 in thapsigargin-inducible apoptosis in the melanoma cell line A375-C6. *Mol Cell Biol* 15, 6262-6272.
- Nair, P., Muthukkumar, S., Sells, S., Han, S., Sukhatme, V., and Rangnekar, V. (1997). Early growth response-1-dependent apoptosis is mediated by p53. *J Biol Chem* 272, 20131-20138.
- Novina, C. and Roy, A. (1996). Core promoters and transcriptional control. *Trends Genet* 12, 351-355.
- Ohler, U., Guo-chun, L., Niemann, H., and Rubin, G. (2002). Computational analysis of core promoters in *Drosophila*. *Genome Biol* 3, 1-12.
- O'Hanlon, T. and Miller, F. (2002). Genomic organization, transcriptional mapping, and evolutionary implications of the human bi-directional histidyl-tRNA synthetase locus (HARS/HARSL). *Biochem Biophys Res Comm* 294, 609-614.
- Paranjape, S., Kamakaka, R., and Kadonaga, J. (1994). Role of chromatin structure in the regulation of transcription by RNA polymerase II. *Annu Rev Biochem* 63, 265-297.
- Patikoglou, G., Kim, J., Sun, L., Yang, S., Kodadek, T., and Burley, S. (1999). TATA element recognition by the TATA box-binding protein has been conserved throughout evolution. *Genes Dev* 13, 3217-3230.
- Patwardhan, S., Gashler, A., Siegel, M., Chang, L., Joseph, L., Shows, L., LeBeau, M., and Sukhatme, V. (1991). EGR3, a novel member of the Egr family of genes encoding immediate-early transcription factors. *Oncogene* 6, 917-928.
- Qiu, P. (2003). Computational approaches for deciphering the transcriptional regulatory network by promoter analysis. *BioSilico* 1, 125-133.
- Qu, Z., Wolfrum, L., Svaren, J., Ehrenguber, M., Davidson, N., and Milbrandt, J. (1998). The transcriptional corepressor NAB2 inhibits NGF-induced differentiation of PC12 cells. *J Cell Biol* 142, 1075-1082.
- Quandt, K., Frech, K., Karas, H., Wingender, E., and Werner, T. (1995). MatInd and MatInspector - New fast and versatile tools for detection of consensus matches in nucleotide sequence data. *Nucleic Acids Res* 23, 4878-4884.

- Ragione,F., Cucciola,V., Criniti,V., Indaco,S., Borrello,A., and Zappia,V. (2003). p21^{Cip1} gene expression is modulates by Egr1. *J Biol Chem* 278, 23360-23368.
- Rangnekar,V., Aplin,A., and Sukhatme,V. (1989). The serum and TPA responsive promoter and intron-exon structure of EGR2, a human early growth response gene encoding a zinc finger protein. *Nucleic Acids Res* 18, 2749-2757.
- Rice,P., Longden,I., and Bleasby,A. (2000). EMBOSS: the European Molecular Biology Open Software Suite. *Trends Genet* 16, 276-277.
- Richmond,T. and Davey,C. (2003). The structure of DNA in the nucleosome core. *Nature* 423, 145-150.
- Roeder,R. (1996). The role of general initiation factors in transcription by RNA polymerase II. *Trends Biochem Sci* 21, 327-335.
- Rudge,T. and Johnson,L. (1999). Inactivation of MED-1 elements in the TATA-less, initiator-less mouse thymidylate synthase promoter has no effect on promoter strength or the complex pattern of transcriptional start sites. *J Cell Biochem* 73, 90-96.
- Russo,M., Sevetson,B., and Milbrandt,J. (1995). Identification of Nab1, a repressor of NGFI-A and Krox20 mediated transcription. *Proc Natl Acad Sci* 92, 6873-6877.
- Sambrook,J. and Russell,D. (2001). *Molecular cloning*. (Cold Spring Harbor: Cold Spring Harbor Laboratory Press).
- Sanger,E., Nicklen,S., and Coulson,A. (1977). DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc Natl Acad Sci* 74, 5463-5467.
- Sanz,C., Calasanz,M., Andreu,E., Richard,C., Prosper,F., and Fernandez-Luna,J. (2004). NALP1 is a transcriptional target for cAMP-response-element binding protein (CREB) in myeloid leukaemia cells. *Biochem J* 384, 281-286.
- Scherf,M., Klingenhoff,A., and Werner,T. (2000). Highly specific localization of promoter regions in large genomic sequences by PromoterInspector: a novel context analysis approach. *J Mol Biol* 297, 599-606.
- Schneider-Maunoury,S., Topilko,P., Seitanidou,T., Levi,G., Cohen-Tannoudji,M., Pournin,S., Babinet,C., and Charnay,P. (1993). Disruption of Krox-20 results in alteration of rhombomeres 3 and 5 in the developing hindbrain. *Cell* 75, 1199-1214.
- Sevetson,B., Svaren,J., and Milbrandt,J. (2000). A novel activation function for NAB proteins in EGR-dependent transcription of the luteinizing hormone beta gene. *J Biol Chem* 275, 9749-9745.
- Silverman,E., Khachigian,L., Santiago,F., Williams,A., Lindner,V., and Tucker,C. (1999). Vascular Smooth Muscle Cells Express the Transcriptional Corepressor NAB2 in Response to Injury. *Am J Pathol* 155, 1311-1317.
- Smale,S. (1994). In *Transcription: Mechanisms and Regulation*, R.Conway and J.Conway, eds. (New York: Raven), pp. 63-81.

- Smale,S. (1997). Transcription initiation from TATA-less promoters within eukaryotic protein-coding genes. *Biochim Biophys Acta* 1353, 73-88.
- Smale,S. and Baltimore,D. (1989). The "Initiator" as a transcription control element. *Cell* 57, 103-113.
- Smale,S. and Kadonaga,J. (2003). The RNA polymerase II core promoter. *Annu Rev Biochem* 72, 449-479.
- Song,J., Mangold,M., Suske,G., Geltinger,C., Kanazawa,I., Sun,K., and Yokoyama,K. (2001). Characterization and promoter analysis of the mouse gene for transcription factor Sp4. *Gene* 254, 19-27.
- Stapleton,M., Liao,G., Brockstein,P., Hong,L., Carninci,P., Shiraki,T., Hayashizaki,Y., Champe,M., Pacleb,J., Wan,K., Yu,C., Carlson,J., George,R., Cerniker,S., and Rubin,G. (2002). The Drosophila Gene Collection: identification of putative full-length cDNAs for 70% of *D. melanogaster* genes. *Genome Res* 12, 1294-1300.
- Stewart,C. (1987). Expression of retroviral vectors in transgenic mice obtained by embryo infection. *EMBO J* 6, 383-388.
- Strachan,T. and Read,A. (1996). *Molekulare Humangenetik*. (Heidelberg: Spektrum Akademischer Verlag).
- Suzuki,M. (1989). SPXX, a frequent sequence motif in gene regulatory proteins. *J Mol Biol* 207, 61-84.
- Suzuki,Y., Ishihara,D., Sasaki,M., Nakagawa,H., Hata,H., Tsunoda,T., Watanabe,M., Komatsu,T., Ota,T., Isogai,T., Suyama,A., and Sugano,S. (2000). Statistical analysis of the 5' untranslated region of human mRNA using "Oligo-Capped" cDNA libraries. *Genomics* 64, 286-297.
- Suzuki,Y., Tsunoda,T., Sese,J., Taira,H., Mizushima-Sugano,J., Hata,H., Ota,T., Isogai,T., Tanaka,T., Nakamura,Y., Suyama,A., Sakaki,Y., Morishita,S., Okubo,K., and Sugano,S. (2001). Identification and characterization of the potential promoter regions of 1031 kinds of human genes. *Genome Res* 11, 677-684.
- Suzuki,Y., Yamashita,R., Nakai,K., and Sugano,S. (2002). DBTSS: DataBase of human Transcriptional Start Sites and full-length cDNAs. *Nucleic Acids Res* 30, 328-331.
- Suzuki,Y., Yoshitomo-Nakagawa,K., Maruyama,K., Suyama,A., and Sugano,S. (1997). Construction and characterization of a full length-enriched and a 5'-end-enriched cDNA library. *Gene* 200, 149-156.
- Svaren,J., Sevetson,B., Apel,E., Zimonjic,D., Popescu,N., and Milbrandt,J. (1996). NAB2, a corepressor of NGFI-A (Egr-1) and Krox20, is induced by proliferative and differentiative stimuli. *Mol Cell Biol* 16, 3545-3553.
- Svaren,J., Sevetson,B., Golda,T., Stanton,J., Swirnoff,A., and Milbrandt,J. (1998). Novel mutants of NAB corepressors enhance activation by Egr transactivators. *EMBO J* 17, 6010-6009.

- Swirnoff,A. and Milbrandt,J. (1995). DNA-Binding Specificity of NGFI-A and related zinc finger transcription factors. *Mol Cell Biol* 15, 2275-2287.
- Thiagalasingam,A., De Bustros,A., Borges,M., Jasti,R., Compton,D., Diamond,L., Mabry,M., Ball,D., Baylin,S., and Nelkin,B. (1996). RREB-1, a novel zinc finger protein, is involved in the differentiation response to Ras in human medullary thyroid carcinomas. *Mol Cell Biol* 16, 5335-5345.
- Thomassin,H., Flavin,M., Espinas,M., and Grange,T. (2001). Glucocorticoid-induced DNA demethylation and gene memory during development. *EMBO J* 20, 1974-1983.
- Topilko,P., Schneider-Maunoury,S., Levi,G., Baron Van Evercooren,A., Chennoufi,A., Seitanidou,T., Babinet,C., and Charnay,P. (1994). Krox-20 controls myelination in the peripheral nervous system. *Nature* 371, 796-799.
- Topilko,P., Schneider-Maunoury,S., Levi,G., Trembleau,A., Gourdj,D., Driancourt,M., Rao,C., and Charnay,P. (1998). Multiple pituitary and ovarian defects in *Krox-24* (*NGFI-A*, *Egr-1*)-targeted mice. *Mol Endocrinol* 12, 107-122.
- Tourtellotte,W. and Milbrandt,J. (1998). Sensory ataxia and muscle spindle agenesis in mice lacking the transcription factor *Egr3*. *Nat Genet* 20, 87-91.
- Tsao,H. and Sober,A. (2005). Melanoma treatment update. *Dermatol Clin* 23, 323-333.
- Tsunoda,T., Koh,Y., Koizumi,F., Tsukiyama,S., Ueda,H., Taguchi,F., Yamaue,H., Saijo, and Nishio,K. (2003). Differential gene expression profiles and identification of genes relevant to clinicopathological factors in colorectal cancer selected by oligo array method in combination with principal component analysis. *Int J Oncol* 23, 49-59.
- Tümpel,S., Maconochie,M., Wiedemann,L., and Krumlauf,R. (2002). Conservation and diversity in the *cis*-regulatory networks that integrate information controlling expression of *Hoxa2* in hindbrain and cranial neural crest cells in vertebrates. *Dev Biol* 246, 45-56.
- Turner,B. (2002). Cellular memory and the histone code. *Cell* 111, 285-291.
- Wagener,C. (1999). *Molekulare Onkologie: Entstehung und Progression maligner Tumoren.* (Stuttgart; New York: Thieme).
- Wagner,E. (1985). Expression of retroviral vectors into embryonal carcinoma cells by retrovirus infection: efficient expression from an internal promoter. *EMBO J* 4, 663-666.
- Werner,T. (1999). Models for prediction and recognition of eukaryotic promoters. *Mamm Genome* 10, 168-175.
- White,R. (2001). *Gene transcription: mechanisms and control.* (Oxford: Blackwell Science Ltd).
- Woychik,N. and Hampsey,M. (2002). The RNA polymerase II machinery: structure illuminates function. *Cell* 108, 453-463.

Yamashita,M., Ukai-Tadenuma,M., Kimura,M., Omori,M., Inami,M., Taniguchi,M., and Nakayama,T. (2002). Identification of a Conserved GATA3 Response Element Upstream Proximal from the Interleukin-13 Gene Locus. *J Biol Chem* 277, 42399-42408.

Zeng,Y., Somasundaram,K., and el-Deiry,W. (1997). AP2 inhibits cancer cell growth and activates p21WAF1(cip). *Nat Genet* 15, 78-82.

Zenzie-Gregory,B., Khachi,A., Garraway,I., and Smale,S. (1993). Mechanism of initiator-mediated transcription: evidence for a functional interaction between the TATA-binding protein and DNA in the absence of a specific recognition sequence. *Mol Cell Biol* 13, 3841-3849.

Zhang,M. (1998). A discriminative study of human core-promoters. *Pac Symp Biocomp* 240-251.

Zimmermann, ACC. (2000) Funktionelle Charakterisierung von Mader in überexprimierenden Transfektanden und Zelllinien. Institut für Immunologie der Universität München. Dissertation.

8 Lebenslauf

Persönliche Daten

Name:	Marco Gerlinger
Geburtsdatum und -ort:	30.04.1975 in Ochsenfurt
Staatsangehörigkeit:	deutsch
Adresse:	7 Netherwood Road London W14 0BL Großbritannien

Schulbildung

1981-1985	Paul-Eber Grundschule, Kitzingen
1985-1994	Armin-Knab-Gymnasium, Kitzingen

Zivildienst

1994-1995	Arbeiterwohlfahrt, Würzburg
-----------	-----------------------------

Studium

1996-1999	Studium der Humanmedizin, Julius-Maximilians-Universität, Würzburg
1999-2003	Studium der Humanmedizin, Ludwig-Maximilians-Universität, München
Sept. 2000-Juni 2001	Studium der Humanmedizin an der Imperial College School of Medicine, London, Großbritannien
Feb. 2002-Juli 2002	Studium der Humanmedizin an der Harvard Medical School, Boston, USA
Mai 2003	3. Staatsexamen an der Ludwig-Maximilians-Universität, München

Berufstätigkeit

Aug. 2003-Dez. 2004	Assistenzarzt, Klinik und Poliklinik für Onkologie, Universitätsspital Zürich, Schweiz
seit Feb. 2005	Assistenzarzt, Department of Haematology, University College Hospital, London, Großbritannien

Wissenschaftliche Arbeit

seit Aug. 1999 Promotion am Institut für Immunologie, Ludwig-
Maximilians-Universität, München, Arbeitsgruppe:
Prof. Dr. J.P. Johnson

Posterpräsentationen

Dez. 2001 Gerlinger, M; Kuske, A; Kramer, D and Johnson, JP (2001). Promoter Structure and Transcriptional Regulation Of the Melanoma Associated Delayed Early Response (Mader/Nab2) Gene. Poster presentation, 1st International Congress on Molecular Staging of Cancer, München

Okt. 2004 Gerlinger, M; Walton, S; Knuth, A; Jager, D and Zippelius, A (2004). CD8 T Cell Responses Against the Melanocyte Differentiation Antigen RAB38/NY-MEL-1. Cancer Vaccines 2004 Meeting, New York, USA

9 Danksagung

Herzlichen Dank an alle die zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben. Mein besonderer Dank gilt dabei:

Frau Prof. Judith Johnson, die mir die Möglichkeit bot diese Arbeit in Ihrem Labor durchzuführen. Insbesondere möchte ich mich bedanken für die hervorragende Einführung in die molekularbiologische Forschung und die vielen Diskussionen über wissenschaftliche und nicht-wissenschaftliche Themen, sowie für die lockere Atmosphäre in ihrem Labor, in der immer viel Raum für die Umsetzung eigener Ideen war.

Allen Mitarbeitern der Arbeitsgruppe Johnson, die immer hilfsbereit waren und durch deren Humor auch die größten experimentellen Niederlagen erträglich wurden. Mein ganz besonderer Dank gilt dabei Rüdiger, der mich immer an seinem umfangreichen Wissen und seiner experimentellen Erfahrungen teilhaben liess sowie Angelika, die mich auch nach ihrem Ausscheiden aus dem Labor fast täglich bei meinen Bemühungen diese Arbeit fertigzustellen unterstützt hat.

Herrn Prof. Dr. med. Gerd Riethmüller, der mir die Möglichkeit bot in seinem Institut meine Doktorarbeit zu beginnen und mich stets unterstützt hat – insbesondere bei der Beantragung des Stipendiums ohne das diese umfangreiche Arbeit nicht möglich gewesen.

Herrn Prof. Dr. rer. nat. Thomas Brocker, der mir als neuer Vorstand des Instituts für Immunologie die Möglichkeit die Doktorarbeit an seinem Institut abzuschliessen.

Dem Arbeitskreis Mittagessen, der die ersten zwei Jahre der Doktorarbeit jedes Mittagessen zum eindeutigen Tageshöhepunkt gemacht hat.

Und ganz besonders meinen Eltern, die durch ihre jahrelange Unterstützung mein Studium und diese Arbeit erst ermöglicht haben.