Funktion und Regulation des melanomassoziierten transkriptionellen Repressors Nab2

Dissertation

zur Erlangung des Doktorgrades

der Naturwissenschaften

(Dr. rer. nat.)

an der Fakultät für Biologie der

Ludwig-Maximilians-Universität München

vorgelegt von

Jörg Kumbrink

München, Dezember 2007

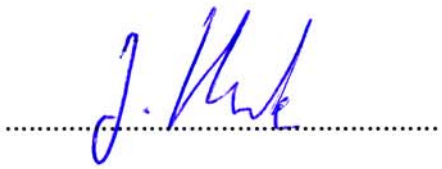
Erklärung

Diese Dissertation wurde im Sinne von §12 Abs. 3 der Promotionsordnung vom 21. November 1991 von Frau Prof. Dr. Judith Johnson betreut.

Ehrenwörtliche Versicherung

Diese Dissertation wurde selbstständig, ohne unerlaubte Hilfsmittel erarbeitet.

München, den 06.12.2007



(Jörg Kumbrink)

Dissertation eingereicht am 06.12.2007

1. Gutachter: Prof. Dr. Elisabeth Weiß

2. Gutachter: Prof. Dr. Harry K. MacWilliams

Sondergutachter: Prof. Dr. Judith P. Johnson

Mündliche Prüfung am 17.04.08

Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis I

Abkürzungsverzeichnis V

Nomenklatur V

Zusammenfassung 1

1 Einleitung 3

1.1 Zielsetzung der Arbeit 10

2 Material 11

2.1 Material und Bezugsquellen 11
2.1.1 Zelllinien 11
2.1.2 *E. coli*-Stämme 11
2.1.3 Polyklonale Seren und Antikörperkonjugate 12
2.1.4 Monoklonale Antikörper 12
2.1.5 Nukleinsäuren 13
2.1.5.1 Plasmide 13
2.1.5.2 Primer 15
2.1.5.3 in Gelretardationsanalysen verwendete Oligonukleotide 17
2.1.5.4 siRNA 18
2.1.6 Größenstandards 18
2.1.7 Chemikalien 18
2.1.8 Enzyme 19
2.1.9 Kommerzielle Analysesysteme und vorgefertigte Lösungen 19
2.1.10 Verbrauchsmaterial 19
2.1.11 Geräte 20

2.2 Medien 21
2.2.1 Zellkulturmedien für Mammalia-Zelllinien 21
2.2.2 *E. coli*-Medien 21

2.3 Allgemeine Puffer und Lösungen 22

3 Methoden 26

3.1 Arbeiten mit Zelllinien 26
3.1.1 Zellkultur 26
3.1.2 Einfrieren und Auftauen von Säugerzellen 26
3.1.3 Stimulation der Zellen mit Phorbolester 27
3.1.4 Transfektion von Säugerzellen in der Zellkultur 27
3.1.4.1 Transiente Transfektion mittels MATra (*Magnet Assisted Transfection*) 28
3.1.4.2 Transfektion mit *FuGENE™6* 28
3.1.4.3 Transfektion von *short interfering* RNA (siRNA) 29

3.1.5 Luziferase-Versuch 30
3.1.5.1 Probenaufbereitung und Luziferase-Versuch 30
3.1.5.2 Proteinbestimmung nach Bradford (1976) 31
3.2 Arbeiten mit *Escherichia coli* 32
3.2.1 Kultivierung von *E. coli* 32
3.2.2 Transformation von *E. coli* 32
3.2.2.1 Herstellung von Hitzeschock transformationskompetenten *E. coli* 32
3.2.2.2 Hitzeschock-Transformation *E. coli* 32
3.2.2.3 Transformation von *E. coli* mittels Elektroporation 33
3.3 Molekularbiologische Methoden 33
3.3.1 Isolierung von Nukleinsäuren 33
3.3.1.1 Minipräparation von Plasmid-DNA aus *E. coli* 33
3.3.1.2 Maxipräparation von Plasmid-DNA aus *E. coli* 34
3.3.1.3 Isolation genomischer DNA aus Säugerzellen 36
3.3.1.4 Phenol/Chloroform-Extraktion von DNA 36
3.3.1.5 DNA-Präzipitation 36
3.3.1.6 Isolation von RNA aus Säugerzelllinien 37
3.3.1.7 Konzentrationsbestimmung von DNA/RNA 37
3.3.2 Amplifikation von DNA mit der Polymerase-Kettenreaktion (PCR) 38
3.3.3 Reverse Transkription und PCR (RT-PCR) 40
3.3.4 Semiquantitative RT-PCR 40
3.3.5 Semiquantitative Real time PCR 42
3.3.5.1 Relative Quantifizierung mittels der Δ-Δ-C_t-Methode 44
3.3.5.2 Durchführung der Real time PCR 46
3.3.6 *In vitro*-Modifikation von DNA 48
3.3.6.1 Restriktionsverdau von DNA 48
3.3.6.2 Dephosphorylierung linearer DNA-Fragmente 48
3.3.6.3 Phosphorylierung linearer DNA-Fragmente 49
3.3.6.4 Auffüllen von 5´-überhängenden DNA-Fragment-Enden 49
3.3.6.5 Ligation von DNA-Fragmenten 49
3.3.7 Gelelektrophorese von Nukleinsäuren 49
3.3.7.1 Gelelektrophorese von DNA 50
3.3.7.2 Denaturierende RNA-Gelelektrophorese 50
3.3.7.3 Isolation von DNA aus Agarosegelen 50
3.3.8 Einfügen von Mutationen in Ziel-DNA 51
3.3.9 Subklonierungen 52
3.3.9.1 Herstellung des Expressionskonstrukts für humanes Egr-1 52
3.3.9.2 Herstellung des Expressionskonstrukts für humanes Egr-2 52
3.3.9.3 Herstellung des Expressionskonstrukts für humanes Nab1 53
3.3.9.4 Herstellung von E37K-IRES2-EGFP 53
3.3.10 Klonierung der humanen *Egr-3*-cDNA 53
3.3.11 Sequenzierung der genomischen *Nab2*-DNA 55
3.4 Proteinbiochemische Methoden 56
3.4.1 Western-Analyse 56
3.4.1.1 Zellaufschluss von Mammalia-Zelllinien 56
3.4.1.2 Messung der Proteinkonzentration 57
3.4.1.3 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese von Proteinen (SDS-PAGE) 57
3.4.1.4 Übertragung der Proteine auf eine Nitrozellulosemembran 58

3.4.1.5 Immundetektion von Proteinen auf Nitrozellulosemembranen 58
3.4.1.6 Entfernung von Immunkomplexen von Nitrozellulosemembranen 59
3.4.2 Gelretardationsanalyse (Elektromobilitätsshift-Analyse (EMSA)) 59
3.4.2.1 Präparation von Kernextrakten 59
3.4.2.2 Zusammenlagerung der Oligonukleotide 60
3.4.2.3 Markierung der Oligonukleotide mit der Polynukleotid-Kinase 60
3.4.2.4 Native Polyacrylamid-Gelektrophorese 61
3.4.2.5 Bindungsreaktionen 61
3.5 Immunologische Methoden zum Antigen-Nachweis 62
3.5.1 Herstellung von Gewebeschnitten und Zytospinpräparaten 62
3.5.2 Immunhistochemie 62
3.5.3 Immunfluoreszenz 63
3.5.3.1 Intrazelluläre Immunfluoreszenz 63
3.5.3.2 Auswertung im Fluoreszenzmikroskop 64
3.5.3.3 Auswertung im FACScan 64
3.6 Computeranalysen 64
3.6.1 Bearbeitung und Analyse von DNA- und Protein-Sequenzen 64
3.6.2 Densitometrische Analysen 65
4 Ergebnisse 66
4.1 Regulation der Nab2-Expression 66
4.1.1 Expression des Nab2-Proteins in Melanom- und Karzinom-Zelllinien 66
4.1.2 Kinetik der *Nab1*, Nab2- und Egr-1-Expression nach Phorbolester-Stimulation 67
4.1.3 *In silico* Analyse der 5`-Region des *Nab2*-Gens 69
4.1.4 Identifikation der Nab2-Promotor-Region 70
4.1.5 Einfluss von Egr-1, Egr-2 und Egr-3 auf die endogene *Nab2*-Expression 72
4.1.6 Einfluss von Egr-1, Egr-2 und Egr-3 auf die Nab2-Promotor-Aktivität 74
4.1.7 Einfluss von Nab1 und Nab2 auf die Egr-vermittelte Aktivierung des Nab2-Promotors 77
4.1.8 Identifikation von regulatorischen Elementen, welche die Induktion des Nab2-Promotors vermitteln 79
4.1.9 Identifikation von Egr-responsiven Elementen im Nab2-Promotor 80
4.1.10 Identifikation von in verschiedenen Spezies konservierten Elementen im Nab2-Promotor 82
4.1.11 Bindung von Mitgliedern der Egr- und Sp1-Familie an den Nab2-Promotor 83
4.1.12 Depletion von *Egr-1* führt zur Reduktion der *Nab2*-Expression 88
4.1.13 Einfluss der Depletion von *Egr-2* und *Egr-3* auf die endogene *Nab2*-Expression 89
4.1.14 Kinetik der Expression von *Egr-1*, *Egr-2*, *Egr-3* und *Nab2* nach PMA-Stimulation in verschiedenen Zelllinien 94
4.1.15 Untersuchung der Induzierbarkeit von Volllängen-*Nab2* und drop8-*Nab2* durch die Egr-Transkriptionsfaktoren und Phorbolester 98
4.2 Untersuchung der Funktion der konstitutiv starken Nab2-Expression in Melanomen 102
4.2.1 Sequenzierung der genomischen *Nab2*-DNA von Melanom- und Kolonkarzinomzelllinien. 102

4.2.2 Inaktivierung von Nab2-WT durch das dominant-negative Nab2-E37K 103
4.3 Regulation der Nab2-Expression im Melanom 105
4.3.1 Untersuchung der Stärke der Egr-vermittelten Aktivierung des Nab2-Promotors in Melanom- und Nicht-Melanom-Zelllinien 105
4.3.2 Untersuchung der mRNA-Expression von *Egr-1*, *Egr-2*, *Egr-3* und *Nab2* in verschiedenen Zelllinien 107
5 Diskussion 111
5.1 Regulation der Nab2-Expression 113
5.2 Regulation der Nab2-Expression im Melanom 127
5.3 Auswirkungen der Dysregulation des Nab2-Egr-Systems im Melanom 132
6 Literaturverzeichnis 136
Publikationen 146
Curriculum vitae 147
Danksagung 148

Abkürzungsverzeichnis

AD	Aktivierungsdomäne
AK	Antikörper
Amp	Ampizillin
APS	Ammoniumperoxodisulfat
AS	Aminosäure
Az	Azetat
BSA	Rinder-Serumalbumin
DMSO	Dimethylsulfoxid
dNTP	Desoxyribonukleotide
DTT	Dithioerytrol
E. coli	*Escherichia coli*
FACS	fluorescense activated cell sorter
FCS	fötales Kälberserum
FITC	Fluorescein Isothiocyanat
G418	Geneticin
GFP	*green fluorescent protein*
KαM-FITC	Kaninchen-Anti-Maus-Antikörper, FITC-fluoreszenzmarkiert
KαM-POD	Kaninchen-Anti-Maus-Antikörper, Peroxidase-konjugiert
KαZ-POD	Kaninchen-Anit-Ziege-Antikörper, Peroxidase-konjugiert
LB	*E. coli*-Medium (lysogeny broth)
m/v	Masse pro Volumen (Gewichtsprozent)
OD	optische Dichte
ORF	open reading frame (offener Leserahmen)
PBS	*phosphate buffered saline*
PMA	Phorbol-12-myristat-13-Azetat
POD	(Meerrettich-)Peroxidase
RefSeq	Referenz-Sequenz
Upm	Umdrehung pro Minute
UTR	untranslationierte Region
WT	Wildtyp
v/v	Volumen pro Volumen (Volumenprozent)
w/v	Gewichtsprozente pro Volumen

Nomenklatur

Schreibweise und Nomenklatur der Gennamen folgen den Regeln den HGNC *Guidelines* (http://www.genenames.org/guidelines.html).

Zusammenfassung

Nab2 (*NGFI-A binding protein* 2) ist ein durch verschiedene Stimuli, wie Stress und Wachstumsfaktoren, induzierbares Kernprotein und als Korepressor der Transkriptionsfaktoren Egr-1 (NGFI-A), Egr-2 (Krox20) und Egr-3 (PILOT) beschrieben. Die Transkriptionsfaktoren der Egr-Familie sind induzierbare „*immediate early genes*“, die an der Regulation wichtiger zellulärer Prozesse, wie z.B. Proliferation und Apoptoseinduktion beteiligt sind. Zeitversetzt zu den Mitgliedern der Egr-Familie wird durch die gleichen Stimuli das „*delayed early response gene*“ Nab2 induziert, wodurch eine überschießende Aktivierung der Egr-Zielpromotoren verhindert wird, die anderenfalls zu einer Entartung der Zelle führen könnte. Eine Dysregulation des Egr-Nab2-Systems ist in einer Vielzahl von Tumoren beschrieben.

Im Gegensatz zu Normalgewebe und anderen Tumoren ist das Nab2-Protein im malignen Melanom konstitutiv stark exprimiert. Um die Ursachen dieser aberranten Expression zu bestimmen, wurde die Regulation der Nab2-Expression in Melanom- und Nicht-Melanomzelllinien untersucht. Durch Transfektionen von sukzessiv verkürzten 5`-Bereichen des *Nab2*-Gens, welche in einen promotorlosen Luziferase-Reportergenvektor subkloniert wurden, konnte der TATA- und Initiator-lose Nab2-Promotor von –679 bp bis –74 bp identifiziert werden. *In silico* Analysen zeigten, dass diese Region 13 putative Egr-Bindestellen, inklusive einer Ansammlung von multiplen überlappenden Egr/Sp1-Motiven im Bereich –379 bp bis –263 bp, beinhaltet, welche evolutionär hochkonserviert sind. Durch Transfektion von Expressionsvektoren für Egr-1, Egr-2 oder Egr-3 wurde die endogene *Nab2*-Expression induziert und Kotransfektionen aller drei Transkriptionsfaktoren führten zu einer simultanen und additiven Aktivierung der Nab2-Promotor-Konstrukte, welche durch ektopische Expression von Nab2 komplett inhibiert werden konnte. Die Aktivierung der Nab2-Promotor-Deletions-Konstrukte durch die Mitglieder der Egr-Familie und den Phorbolester PMA war vergleichbar. Zusätzlich konnte das Haupt-regulatorische-Element identifiziert werden, welches multiple Egr/Sp1-Bindestellen und ein AP2-Motiv zwischen –329 bp bis –263 bp umfasst, und sowohl für die basale und PMA-induzierte Promotor-Aktivität als auch für die Egr-vermittelte Aktivierung des Nab2-Promotors wichtig ist. Mittels Gelretardations-Analysen wurde die Bindung von Egr-1 und weiterer Mitglieder der Egr-Familie in unstimulierten und verstärkt in stimulierten Zellen an diesen Bereich gezeigt, während die Bindung von Sp1

durch die Stimulation nicht beeinträchtigt wurde. Nach Depletion von *Egr-1*, *Egr-2* oder *Egr-3* durch Transfektion von *short interfering* RNA konnte der Einfluss dieser Transkriptionsfaktoren auf die endogene *Nab2*-Expression bestätigt werden. Die Depletion von *Egr-3* führte auch zur Reduktion von *Egr-2*, wodurch ebenfalls Egr-2 als Zielgen von Egr-3 identifiziert wurde.

Untersuchungen zur Kinetik der mRNA-Expression von *Egr-1*, *Egr-2*, *Egr-3* und *Nab2* nach PMA-Stimulation in verschiedenen Zelllinien deuteten an, dass Egr-1 an einer schnellen schwachen *Nab2*-Induktion und Egr-2 und Egr-3 an der Aufrechterhaltung und der maximal induzierbaren *Nab2*-Expression beteiligt sind. Zusätzlich konnte eine vorher nicht beschriebene Melanomassoziation von *Egr-2* und *Egr-3* beobachtet werden. *Egr-2*- und/oder *Egr-3*-Expression wurde in 77% der Melanomzelllinien gefunden, während *Egr-2* in nur 21% und *Egr-3* in keiner der Nicht-Melanomzelllinien nachgewiesen wurde.

Die Spleißvariante *drop8-Nab2* war im Vergleich zu *Volllängen-Nab2* durch PMA und auch die Mitglieder der Egr-Familie stärker induzierbar. Interessanterweise war die Induktion von *drop8-Nab2* in Melanomzelllinien deutlich geringer als in Nicht-Melanomzelllinien.

Zusammengefasst konnte gezeigt werden, dass nach extrazellulären Signalen Egr-1, Egr-2 und Egr-3 die Expression ihres eigenen Korepressors Nab2 induzieren, wodurch ein negativer Rückkopplungsmechanismus etabliert wird. Des Weiteren sind die melanomassoziierten Transkriptionsfaktoren Egr-2 und Egr-3 wahrscheinlich an der konstitutiven Expression von Nab2 im Melanom beteiligt.

Die Melanomassoziation von nicht nur Nab2, sondern auch Egr-2 und Egr-3 resultiert in einer Dysregulation des Egr-Nab2-Systems, welche mit großer Wahrscheinlichkeit zu einer veränderten Antwort auf extrazelluläre Signale oder sogar zur Unabhängigkeit von Einflüssen aus der Umgebung führt und dementsprechend zu einer erhöhten Malignität des Melanoms beitragen kann.

1 Einleitung

In den Industrienationen der westlichen Welt hat sich Krebs nach Herz- und Kreislauferkrankungen zur zweithäufigsten Todesursache entwickelt (Jemal et al., 2006). Alleine in Deutschland waren im Jahr 2006 mehr als 200.000 der Todesfälle, welches ungefähr ein Viertel der Gesamtzahl ausmachte, krebsbedingt (SBD, 2007).

Während die Zahl der Krebsneuerkrankungen in den letzten 25 Jahren allgemein abnahm oder zumindest konstant blieb, stieg die Inzidenz des hochaggressiven kutanen Melanoms, welches von Melanozyten der Haut abgeleitet ist, an (Geller et al., 2007). In Deutschland konnte diese Entwicklung ebenfalls mit einer Verdreifachung der Inzidenzrate von 1976 bis 2003 beobachtet werden (Lasithiotakis et al., 2006). Diese Tendenz beruht allerdings auch auf den verbesserten Diagnosemöglichkeiten, so dass Melanome mit geringerem Durchmesser als früher erkannt und behandelt werden können (Lasithiotakis et al., 2007). Im Einklang mit vor allem weiter entwickelten operativen, aber auch konservativen Methoden trägt die Früherkennung zu der weitgehend gleichbleibenden Mortalitätsrate der letzten Jahre in Melanompatienten bei.

Grundsätzlich wird zwischen den horizontal wachsenden Melanomen, die meist eine geringere Wachstumsrate besitzen und den schneller wachsenden Melanomen, welche sich vorwiegend vertikal ausbreiten, unterschieden. Zu den horizontal wachsenden Melanomen zählt das *Superfiziell-Spreitende-Melanom*, das etwa 65% aller malignen Melanome ausmacht und das *Lentigo-Maligna-Melanom*, welches eine Melanomvariante auf sonnengeschädigter Haut darstellt. Solange die Basalmembran noch nicht durchbrochen ist, werden diese Formen als *Melanoma in situ* definiert. Vertikal wachsende Melanome, wie das *Noduläre Melanom*, durchbrechen die Basalmembran ohne eine vorhergehende horizontale Wachstumsphase sehr schnell (Riede et al., 2003). Dementsprechend korreliert eine zunehmende vertikale Dicke des Tumors mit einer zunehmend schlechten Prognose für den Patienten (Breslow, 1970).

Die 5-Jahres-Überlebensrate von Patienten, bei denen ein Melanom von weniger als 1 mm Größe (T1-Melanom) diagnostiziert wurde, beträgt mehr als 90%, während sie in Patienten mit T4-Melanomen (Tumordicke > 4 mm) unter 45% fällt (Ries et al., 2007). Ein weiteres Indiz der hohen Aggressivität des Melanoms ist die schlechte Prognose trotz geringer Tumordicke. Im Vergleich dazu werden beispielsweise Brustkarzinome nach TNM-

Klassifikation mit einer weit größeren Ausdehnung von 1 bis 2 cm als T1- bzw. größer als 5 cm als T3-Tumor definiert (Wittekind Ch. et al., 2002).

Die hohe Malignität des Melanoms beruht vor allem auf seiner frühen Metastasierung sowie seiner Resistenz gegenüber Chemotherapeutika (Jung et al., 1998). In neueren Studien konnten allerdings Mechanismen aufgedeckt werden, die möglicherweise dazu beitragen könnten die Chemoresistenz in Melanomen abzuschwächen.

Beispielsweise scheint die durch das Tumorsuppressorgen p53 vermittelte Sensitivität für Chemotherapeutika durch das *melanoma antigen* (MAGE) -A2 herabgesetzt zu werden (Monte et al., 2006). Während in vielen Tumoren sowohl aktivierende als auch inaktivierende Mutationen des proapoptotischen Zellzyklusregulators p53 vorliegen, sind im Melanom nur selten Alterationen beobachtet worden (Petitjean et al., 2007). Allerdings zeigte sich, dass die transaktivierende Funktion von p53 durch Bindung von MAGE-A2 und Rekrutierung der Histon-Deacetylase HDAC3 in Melanomzellen stark reduziert wurde. Zusätzlich konnte durch kombinierte Behandlung mit einem Deacetylasehemmer und einem Zytostatikum die Chemoresistenz von Melanomzellen mit hoher MAGE-A2-Expression durch Reaktivierung von p53 aufgehoben werden (Monte et al., 2006). Die Expression verschiedener Mitglieder der MAGE-Familie scheint auf Tumoren unterschiedlicher Herkunft und Hoden beschränkt (Simpson et al., 2005) und im Melanom wahrscheinlich durch Demethylierung der Promotorregionen konstitutiv aktiv zu sein (Furuta et al., 2004).

Des Weiteren ist die frühe Metastasierung für die hohe Mortalität des Melanoms verantwortlich. Ein wichtiger Schritt für die Entwicklung von Metastasen ist die Dissemination der Tumorzellen vom Primärtumor, wodurch die Invasion der umliegenden Gewebe, die Einwanderung in das Blut- oder Lymph-System und die anschließende Extravasation der Tumorzellen in entfernte Organe ermöglicht wird (Yang et al., 2006). Für viele epitheliale Tumoren wird die Tumorprogression mit einer reversiblen epithelialen-mesenchymalen Transition (EMT) der Zellen in Verbindung gebracht, bei der die Tumorzellen eine Reihe von Veränderungen durchlaufen. Beispielsweise wird die Expression des für den epithelialen Zellverband wichtigen Adhäsionsmoleküls E-Cadherin (*epithelial*) während der EMT zuerst reduziert, welches die Dissemination der Tumorzellen begünstigt, und nach der Einwanderung in entfernte Gewebe zur Bildung von Metastasen reinduziert. In der Tumorigenese des Melanoms hat E-Cadherin insofern eine besondere

Bedeutung, da es das Hauptadhäsionsmolekül für die Interaktion zwischen den Melanozyten und Keratinozyten darstellt. In Melanomen ist die E-Cadherin-Expression häufig verändert und der Verlust wird mit einem erhöhten Potential zur Invasion und Metastasierung assoziiert (Bonitsis et al., 2006; Johnson, 1999).

Während des Metastasierungsprozesses werden allerdings auch Adhäsionsmoleküle verstärkt exprimiert. Beispielsweise korreliert die zunehmende Expression des an der Angiogenese-Induktion beteiligten MCAM/CD146 (*melanoma cell adhesion molecule*) positiv mit der Melanomprogression (Lehmann et al., 1989; Lehmann, 2008).

Für die Entwicklung und das Überleben eines Tumors müssen allerdings weitere Mechanismen außer der Blockierung der Apoptose und der Einleitung der Metastasierung ausgebildet werden (Hanahan and Weinberg, 2000). Für die Tumorprogression sind verschiedene Prozesse wie z.B. die Induktion der Angiogenese, die uneingeschränkte Replikation und die Unabhängigkeit von Wachstumsfaktoren essentiell. Letzteres wird häufig durch das Auschalten von Signaltransduktionswegen, welche die Proliferation verhindern, und das Anschalten von wachstumfördernden erreicht.

Im Melanom trägt die im Vergleich zu Melanozyten konstitutiv starke Expression des Wachstumsfaktors bFGF (*basic fibroblast growth factor*) durch die Etablierung eines positiven autokrinen Rückkopplungsmechanismus zur Unabhängigkeit von Wachstumsfaktoren bei (Halaban et al., 1988).

Eine andere Möglichkeit ist die Aktivierung der durch Wachstumsfaktorrezeptoren, die häufig aus multimeren Rezeptor-Tyrosin-Kinasen (RTZ) bestehen, vermittelten Signalweiterleitung oder der in der Kaskade untergeordneten Moleküle.

In kutanen Melanomen liegt im Vergleich zu anderen Tumoren häufig die aktivierende Mutation V600E der Serin/Threonin-Kinase BRAF vor, welche in den durch Rezeptor-Tyrosin-Kinasen aktivierten Ras/Raf/MAPK/ERK-Weg involviert ist (Davies et al., 2002; Dhomen and Marais, 2007; Poynter et al., 2006). Die Frequenz der V600E-Mutation in Melanomen variiert allerdings in verschiedenen Studien von 30 bis 60% und ist ebenfalls in mehr als 80% der benignen Nävi zu finden.

Verschiedene Untersuchungen konnten zeigen, dass gezieltes Ausschalten von V600E BRAF durch *short interfering* RNA (siRNA) aber auch RAF-Kinase-Inhibitoren die Tumorigenese in Tiermodellen, die Angiogenese, die Extravasation und das Wachstum von Melanomen blockieren (Liang et al., 2007; Sharma et al., 2005).

Dadurch ist V600E BRAF zur Zeit ein wichtiges therapeutisches Ziel im Melanom. Erste klinische Studien unter Verwendung eines Inhibitors nicht nur von BRAF, sondern auch CRAF und verschiedener VEGFRs (*vascular endothelial cell growth factor receptors*) zeigten in Melanompatienten nicht die erhoffte eindeutige Tendenz der Regression der Tumoren, so dass zur Zeit Kombinationen verschiedener Chemotherapeutika gegen BRAF, RAS und MAPK getestet werden (Eisen et al., 2006; Flaherty, 2006).

Eine weitere Therapiemöglichkeit bietet die Induktion einer effektiven Immunantwort gegen die in den Melanosomen lokalisierten, dementsprechend allerdings sowohl in Melanozyten als auch Melanomen exprimierten, MART-1 (Melan A), gp100 und die Tyrosinase, aber ebenfalls die vorher beschriebenen Mitglieder der MAGE-Familie.

In klinischen Studien, in denen Melanompatienten nach Resektion des Tumors und erfolgter Chemotherapie mit Peptiden der genannten Proteine im Kombination mit GM-CSF (*granulocyte-macrophage colony-stimulating factor*) vakziniert wurden, konnten allerdings zum Großteil eher palliative und nicht kurative Wirkungen, vor allem bei Patienten mit weiter fortgeschrittenen Melanomen, erzielt werden (Atzpodien and Reitz, 2007). Wie häufig bei Therapieansätzen zur Behandlung von Melanomen beobachtet, konnte das Wiederauftreten des Tumors und die Metastasenbildung nur selten verhindert werden.

Die Behandlung von Melanompatienten durch adoptive Immuntherapie mit autologen tumorinfiltrierenden Lymphozyten (TIL) wird ebenfalls untersucht. In klinischen Studien konnte eine vielversprechende Regression der Tumoren in fast 50% der Patienten mit fortgeschrittenen metastasierenden Melanomen erzielt werden (Dudley et al., 2005), so dass zur Zeit versucht wird die Effizienz dieser Methodik, vor allem hinsichtlich einer verlängerten Persistenz der TIL, zu steigern (Shen et al., 2007).

Dennoch werden in Anbetracht der hohen Malignität des Melanoms weitere melanomspezifische therapeutische Ziele und auch detailliertere Erkenntnisse über die Biologie des kutanen Melanoms zur Entwicklung alternativer oder zusätzlicher kombinatorischer Therapien benötigt.

Ein Ansatz, um Moleküle zu identifizieren, die bei der Melanom-Entstehung oder –Progression relevant sind, ist die Herstellung monoklonaler Antikörper gegen Melanomzellen. Diese werden auf Gewebeschnitten daraufhin selektioniert nicht mit benignen melanozytären Läsionen (Nävi) sondern nur mit Melanomgewebe zu reagieren. Anschließend dienen die verbliebenen monoklonalen Antikörper zur Isolation des Produkts der entsprechenden cDNA aus einer humanen Melanom cDNA-Expressionsbank.

Eines der Moleküle, welches auf diese Weise entdeckt wurde, ist das durch verschiedene extrazelluläre Stimuli, wie Stress und Wachstumsfaktoren, induzierbare und im Melanom überexprimierte Kernprotein Mader (*melanoma associated delayed early response gene*) (Kirsch et al., 1996), das im gleichen Jahr unabhängig als Nab2 (*nerve growth factor inducible protein A (NGFI-A) binding protein 2*) identifiziert wurde (Svaren et al., 1996). Im Folgenden wird der offizielle Name Nab2 weiter verwendet.

Die spezifische *Nab2*-mRNA wird auf basalem Niveau ubiquitär exprimiert, während immunhistochemische Färbungen eine deutliche Melanomassoziiation des Nab2-Proteins zeigten. In 88% der getesteten Melanom- und in nur 8% der Kolonkarzinomgewebe wurde das Nab2-Protein *in situ* nachgewiesen. In Normalgewebe hingegen konnte kein Nab2 detektiert werden (Kirsch, 1995).

Der offene Leserahmen der *Nab2*-cDNA kodiert für ein Protein von 525 Aminosäuren und einem Molekulargewicht von 56,5 kDa. Dabei fallen hohe Anteile von Leucin (11,43%), Prolin (10,48%) und Glycin (10,67%) auf. Nab2 verfügt über zwei prolinreiche Domänen, zwei Kernlokalisationssignale und eine große Anzahl an potentiellen Phosphorylierungsstellen und Interaktionsmotiven für regulatorische Proteine. Diese strukturellen Eigenschaften sind Charakteristika von nukleären regulatorischen Proteinen. Des Weiteren existiert eine Spleißvariante (drop8-Nab2), die im C-terminalen Bereich eine Deletion von 64 Aminosäuren aufweist.

Nab1, das zweite Mitglied der evolutionär hochkonservierten Nab-Familie ist im Gegensatz zu Nab2 in der Regel nicht induzierbar (Silverman et al., 1999) und wird ubiquitär konstistutiv exprimiert (Thiel et al., 2000).

Die Mitglieder der Nab-Familie sind als Korepressoren der Transkriptionsfaktoren der Egr (*early growth response*) –Familie beschrieben und besitzen die beiden zwischen Nab1 und Nab2 hochkonservierten Domänen NCD1 (*nab conserved domain*) und NCD2 (Russo et al., 1995; Svaren et al., 1996; Svaren et al., 1998). Über die NCD1 der Nab-Proteine erfolgt nicht nur die Interaktion mit der R1- (Repressions-) Domäne des Transkriptionsfaktors Egr-1 (*early growth response protein* 1; *NGFI-A*), sondern auch die Bildung von Nab1 und Nab2 Hetero- und Homo-Multimeren. Durch einen bisher ungeklärten Mechanismus, bei dem die NCD1 und NCD2 der Nab-Proteine benötigt werden, wird die Aktivität von Egr-1 reprimiert (Swirnoff et al., 1998a). Weitere Untersuchungen zeigten, dass Nab2 im Gegensatz zu Nab1 nicht nur ein Repressor von Egr-1 und Egr-2 (Krox20), sondern auch von Egr-3 (PILOT) ist (Russo et al., 1995; Sevetson et al., 2000; Svaren et al., 1996; Svaren et al., 1998). Da Egr-2 und Egr-3 im Vergleich zu Egr-1 eine nur geringfügig unterschiedliche R1-Domäne besitzen (Russo et al., 1995), wird ein ähnlicher Mechanismus der Repression von Egr-2 und Egr-3 in der Literatur angenommen.

Die schematische Darstellung des Nab2-Proteins und seiner Domänen ist in Abb. 1.1 dargestellt.

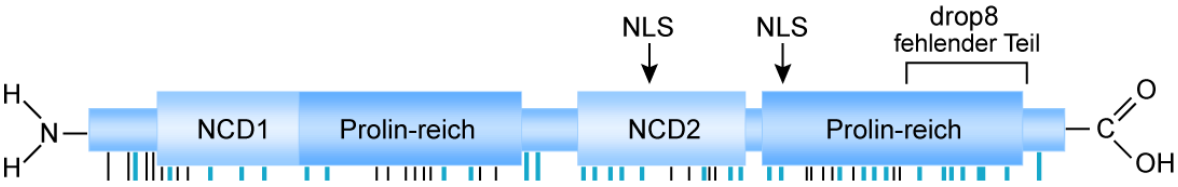


Abb. 1.1 Schematische Darstellung des Nab2-Proteins (nach Kramer, 2000). NLS = Kernlokalisationssignal. NCD1 (*nab conserved domain* 1) = wichtig für die Egr-Interaktion und die Bildung von Nab1 und Nab2 Homo- und Hetero-Multimeren. NCD2 = an der Repression der Egr-Aktivität beteiligt. Schwarze Balken = potentielle Phophorylierungsstellen. Hellblaue Balken = potentielle Phophorylierungsstellen und Interaktionsmotive für andere Proteine.

Die Transkriptionsfaktoren der Egr-Familie sind induzierbare „*immediate early genes*“, die an der Regulation vieler zellulärer Prozesse, wie z.B. Proliferation, Apoptoseinduktion, Differenzierung und neuronaler Entwicklung, beteiligt sind (Carter et al., 2007; Thiel and Cibelli, 2002; Unoki and Nakamura, 2003a).

Egr-1 ist beispielsweise in die Regulation des Zellzyklusregulators p53 (Krones-Herzig et al., 2003; Krones-Herzig et al., 2005) und der Wachstumsfaktoren bFGF, VEGF und HGF (*hepatocyte growth factor*) involviert (Fahmy and Khachigian, 2007; Houston et al., 2001; Zhang and Liu, 2003). Andererseits sind Egr-2 und Egr-3 an der Expression von apoptoseassoziierten Molekülen wie FasL, TRAIL und BAK beteiligt (Droin et al., 2003; Unoki and Nakamura, 2001).

Die Mitglieder der Egr-Familie sind Zink-Finger-Proteine und besitzen eine hochkonservierte DNA-Binde-Domäne, so dass sie die gleiche Konsensus-DNA-Bindungssequenz aufweisen (Beckmann and Wilce, 1997). Eine entsprechende direkte Koregulation der Genexpression durch die Transkriptionsfaktoren der Egr-Familie konnte allerdings bisher nur durch Egr-1 und Egr-3 für das Arc (*activity-regulated cytoskeletal-related*) –Gen und durch Egr-2 und Egr-3 für FasL (CD95L) beobachtet werden (Droin et al., 2003; Li et al., 2005).

Zeitversetzt zu den Transkriptionsfaktoren der Egr-Familie wird durch die gleichen extrazellulären Stimuli das „*delayed early response gene*“ Nab2 induziert (Kirsch et al., 1996; Svaren et al., 1996). Dadurch wird eine überschießende Aktivierung der Egr-Zielpromotoren verhindert, die anderenfalls zu einer malignen Transformation der Zelle führen könnte. Dies verdeutlicht nicht nur die Wichtigkeit der genauen Regulation des Egr-Nab2-Systems, sondern auch dass Nab2, welches im Gegensatz zu Nab1 induzierbar und ein Repressor von Egr-1, Egr-2 und auch Egr-3 ist, bei der Kontrolle der Egr-vermittelten Antwort auf Signale aus der zellulären Umgebung die wichtigere Rolle spielt.

Im Melanom liegt im Gegensatz zu anderen Tumoren und Normalgeweben eine konstitutiv starke Expression von Nab2 vor. Bisher konnte die Funktion und Ursache der verstärkten Nab2-Expression im Melanom nicht geklärt werden. Studien zur mRNA- und Protein-Stabilität nach Stimulation mit Phorbolestern zeigten keine Unterschiede in Zelllinien mit hoher oder niedriger Nab2-Expression, so dass als Ursache der Überexpression eine verstärkte Transkription des *Nab2*-Gens vermutet wurde (Kramer, 2000). Die starke Nab2-Expression könnte die Reaktion auf exogene Stimuli verhindern und beispielsweise zu einer Reduktion der Egr-1-vermittelten Expression des apoptoseassoziierten Tumorsuppressorgens p53 führen. In verschiedenen Zelllinien konnte allerdings keine Korrelation zwischen der Nab2- und p53-Expressionsstärke beobachtet werden (Kramer, 2000).

1.1 Zielsetzung der Arbeit

Ziel dieser Arbeit war es Ursachen und Auswirkungen der erhöhten Nab2-Expression im Melanom aufzudecken, welche zur Entstehung und/oder Progression des Melanoms beitragen könnten.

Um die Gründe der konstitutiv starken Nab2-Expression im Melanom zu bestimmen, sollte die Regulation der Nab2-Expression untersucht und eventuelle Unterschiede im Melanom im Vergleich zu anderen Tumoren und Geweben aufgedeckt werden.

Da über die Funktion und die Vorteile der konstitutiven Nab2-Expression in Melanomen bisher nur wenig bekannt ist, sollten stabile Transfektanten von Nab2-exprimierenden Melanomzelllinien hergestellt werden, in denen das endogen exprimierte Nab2 durch dominant-negatives Nab2 inaktiviert wird. Dadurch sollte es möglich sein vergleichende Experimente hinsichtlich Wachstum, Invasivität, Adhäsion und Apoptose-Sensitivität in ein und derselben Zelllinie mit aktivem und inaktiviertem Nab2 durchzuführen.

2 Material

2.1 Material und Bezugsquellen

2.1.1 Zelllinien

humanes Melanom:	A375, GTBS[#], HT-144, IgR3, Mel 888[&], Mel Büh°, Mel Ei*, Mel Gerl[§], Mel Ho*, Mel Im*, Mel Ju*, Mel Juso*, Mel Musa, Mel Rif*, Mel Wei*, SbCl2[&], SK-MEL-1, SK-MEL-2, SK-MEL-23[$], SK-MEL-25, SK-MEL-28
humanes Kolonkarzinom:	Colo 320 DM, LoVo, LS-180, HT-29
humanes Zervixkarzinom:	Caski, Hela L[~]
humanes Magenkarzinom:	AGS, Kato III
humanes Brustkarzinom:	MDA-MB-435s, BT-20*
humanes B-Zell-Lymphom:	Raji
humanes T-Zell-Lymphom:	Jurkat
humane myeloide Leukämie:	HL-60, K562
humanes Nierenepithel :	293

Herkunft der Zelllinien: ohne Markierung: ATCC, Manassas,VA, USA

* Institut für Immunologie, München
& M.BarEli, Housten, TX, USA
# M. Vetterlein
° AG Ziegler-Heitbrock
§ F. Schriever
$ E. Breitbart
~ R. Neef

2.1.2 *E. coli*-Stämme

Name	Genotyp	Herkunft
DH5α	*supE*44 *lac*U169 (80*lacZ* M15) *hsdR*17 *recA*1 *endA*1 *gyrA*96*thi*-1*relA*1	(Hanahan, 1983)
JM101	*supEthi* Δ(*lac-proAB*)F' (*traD*36*proAB*$^{+}$*lacI*^{q}*lacZ* ΔM15)	(Messing *et al.*, 1977)
XL1 Blue	*recA1 endA1 gyrA96 thi-1 hsdR17 supE44 relA1 lac [F, proAB*^{q}*TΔM15 Tn10 (Tet*^{r}*)]*^{c}	Stratagene
XL10-Gold	*Tet*^{r}*Δ (mcrA) 183 Δ(mcrCB-hsdSMR-mrr)173 endA1 supE44 thi-1 recA1 gyrA96 relA1 lac The [F,proAB lacI*^{q}*ZΔM15 Tn10 (Tet*^{r}*) Amy Cam*^{r}*]*	Stratagene

Tab. 2.1 Verwendete *E. coli*-Stämme

2.1.3 Polyklonale Seren und Antikörperkonjugate

Name	eingesetzte Verdünnung	Herkunft
FITC-konjugiertes Kaninchen-Anti-Maus-Antiserum (KαM-FITC) Best. Nr. F0261	1:25 in 1% BSA-PBS	DAKO, Hamburg
Peroxidase-konjugiertes Kaninchen-Anti-Maus-Antiserum (KαM-POD) Best. Nr. P0161	Western-Analyse: 1:5000 in 5% Magermilch-PBS	DAKO, Hamburg
Peroxidase-konjugiertes Schwein-Anti-Kaninchen-Antiserum (SαK-POD)	Western-Analyse: 1:5000 in 5% Magermilch-PBS	DAKO, Hamburg
Kaninchen-Anti-Egr-1 (sc-1)	1:800 in RPMI-Medium/ 5%-FCS/0.1%-Azid	Santa Cruz, CA, USA
Kaninchen-Anti-Egr-1 (sc-110 X)	Gelretardationsanalyse, unverdünnt	Santa Cruz, CA, USA
Kaninchen-Anti-Sp1 (sc-59 X)	Gelretardationsanalyse, unverdünnt	Santa Cruz, CA, USA
Kaninchen-Kontrollserum (X903)	Gelretardationsanalyse, 1:10	DAKO, Hamburg

Tab. 2.2 Verwendete polyklonale Seren und Antikörperkonjugate

2.1.4 Monoklonale Antikörper

Spezifität	Klon	Isotyp	Verdünnung bzw. eingesetzte Konzentration	Herkunft
humanes β-Aktin	AC-15	IgG1	1:10000 in RPMI-Medium/5%-FCS/0.1%-Azid	Sigma, Deisenhofen
humanes Nab2	1C4	IgG1	Hybridomüberstand, unverdünnt	Institut für Immunologie, München
humanes MUC-18 (extrazellulär)	MUC18-BA4	IgG1	Hybridomüberstand, unverdünnt	Institut für Immunologie, München
NCA, CD66c	FR4H12	IgG1	Hybridomüberstand, unverdünnt	Institut für Immunologie, München

Tab. 2.3 Verwendete monoklonale Antikörper. Alle monoklonalen Antikörper stammen aus Mäusen.

2.1.5 Nukleinsäuren

2.1.5.1 Plasmide

pACCMVpLpASR+	E. Hofer, Universität Wien, Österreich
pβTATAluci	AG Ziegler-Heitbrock
pcDNA3	Invitrogen, Karlsruhe
pCMV-SPORT6	MRC geneservice, Cambridge, UK
pEGFP-N1	Clontech, USA
pGL3-Basic	Promega, Madison, WI, USA
pIRES2-EGFP	Clontech, USA
pUC18	Stratagene, La Jolla, CA, USA
pWhitescript	Stratagene, La Jolla, CA, USA

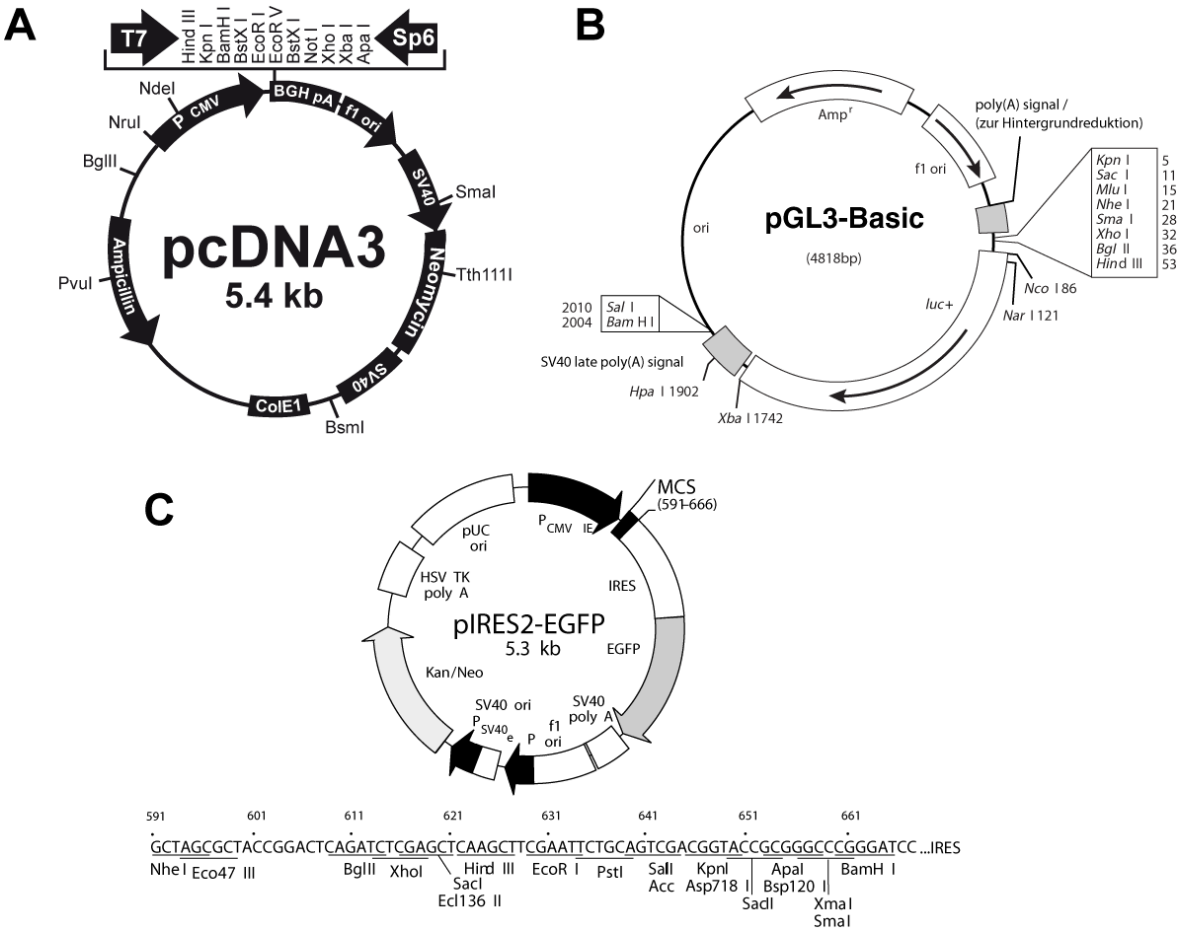


Abb. 2.1 Vektorkarte von pcDNA3 (a), pGL3-Basic (b) und pIRES2-EGFP (c)

Name	Vektor	Promotor	exprimiertes Gen	Herkunft
rnEgr1	pcDNA3	CMV	*Rattus norvegicus Egr-1*	Gerlinger, 2006
Egr-1	pcDNA3	CMV	humanes *Egr-1*	in dieser Arbeit hergestellt
Egr-2	pcDNA3	CMV	humanes *Egr-2*	in dieser Arbeit hergestellt
Egr-3	pcDNA3	CMV	humanes *Egr-3*	in dieser Arbeit hergestellt
hNab1	pcDNA3	CMV	humanes *Nab1*	in dieser Arbeit hergestellt
Nab2-WT	pcDNA3	CMV	humanes *Nab2*	Zimmermann, 2000
Nab2-E37K	pcDNA3	CMV	humanes *Nab2-E37K*	Kumbrink, 2002
E37K-IRES2-EGFP	pIRES2-EGFP	CMV	humanes *Nab2-E37K* und *EGFP*	in dieser Arbeit hergestellt
pEGFP-N1	pEGFP-N1	CMV	*EGFP*	Clontech, USA
egrpluci	pβTATAluci	minimal	*Luziferase*	Zimmermann, 2000
maluc-1839	pGL3-basic	-	*Luziferase*	Kumbrink et al., 2005
maluc-872	pGL3-basic	-	*Luziferase*	Kumbrink et al., 2005
maluc-679	pGL3-basic	-	*Luziferase*	Kumbrink et al., 2005
maluc-558	pGL3-basic	-	*Luziferase*	Kumbrink et al., 2005
maluc-468	pGL3-basic	-	*Luziferase*	Kumbrink et al., 2005
maluc-379	pGL3-basic	-	*Luziferase*	Kumbrink et al., 2005
maluc-263	pGL3-basic	-	*Luziferase*	Kumbrink et al., 2005
maluc-195	pGL3-basic	-	*Luziferase*	Kumbrink et al., 2005
maluc-74	pGL3-basic	-	*Luziferase*	Kumbrink et al., 2005

Tab. 2.4 in Transfektionen verwendete Vektor-Konstrukte

PcDNA3, pEGFP-N1 und pIRES2-EGFP tragen den menschlichen Zytomegalovirus *immediate early promotor* für eine starke, konstitutive Expression des klonierten Gens, das SV40-Polyadenylierungssignal für eine effiziente Transkriptionstermination und Polyadenylierung der mRNA und ein Neomycin-Resistenzgen zur Selektion in stabilen Transfektanten.

2.1.5.2 Primer

In PCR-Reaktionen wurden folgende Primer verwendet :

Name	Sequenz 5´→ 3´	Ziel-DNA	Bindungsposition in RefSeq / Vektor
CMV forward	CGCAAATGGGCGGTAGGCGTG	Vektor mit CMV-Promotor	bp 769-789 in pcDNA3
Nab2 1AS	CCAGGCAGTGGTGATAGCTTC	*Nab2*-cDNA	bp 882-902 in NM_005967.3
Nab2 Ex 1 1	GACCCTGCAGCCCAGACTC	*Nab2*-cDNA	bp 441-459 in NM_005967.3
madex1start-lo	CAAGCGCAGCCGGGGAGGGTGG	*Nab2* genomisch	bp 1651-1672 in AF268380
madex1end-lo	CCCGCTGCCTCCCTTTGCCCAC	*Nab2* genomisch	bp 1932-1953 in AF268380
madex2start-lo	CTCTCTCTTGTGCCCCTCCTTCTC	*Nab2* genomisch	bp 3671-3694 in AF268380
madex2-400-rev-lo	GGCTCTTGGGGCTAAAACTGCG	*Nab2* genomisch	bp 4079-4100 in AF268380
MadOligo13	CTGGCCTCAGCCTCCACT	*Nab2*-cDNA	bp 1929-1946 in NM_005967.3
SbN4-s	AGAGGAGATCCGCAAATACAGC	*Nab2*-cDNA	bp 1254-1275 in NM_005967.3
Nab1 Ex4 s	AACACTCTTCCAGCAGGCTAG	*Nab1*-cDNA	bp 1510-1630 in NM_005966.3
Nab1 Ex6 as	GCTCAGCTCCCCATCCACCAC	*Nab1*-cDNA	bp 1890-1910 in NM_005966.3
Egr-1 s	TCAGGCGGACACGGGCGAGC	*Egr-1*-cDNA	bp 534-553 in NM_001964.2
Egr-1 as	TGCGCAGCTCAGGGGTGGGC	*Egr-1*-cDNA	bp 830-849 in NM_001964.2
Egr-2 s	CAACATCTACCCGGTGGAGGAC	*Egr-2*-cDNA	bp 407-428 in NM_000399.2
Egr-2 as	GATGCCTGCACTCACAATATTG	*Egr-2*-cDNA	bp 677-698 in NM_000399.2
Egr-3 s	CCAGCGCGCTCAACCTCTTC	*Egr-3*-cDNA	bp 447-466 in NM_004430.2
Egr-3 as	GTAGAGGTCGCCGCAGTTGGAG	*Egr-3*-cDNA	bp 799-820 in NM_004430.2

Name	Sequenz 5´→ 3´	Ziel-DNA	Bindungsposition in RefSeq / Vektor
B1 (GAPDH s)	AATTCCATGGCACCG TCAAG	*GAPDH*-cDNA	bp 266-285 in NM_002046.3
B2 (GAPDH as)	GCCTGCTTCACCACC TTCTT	*GAPDH*-cDNA	bp 877-896 in NM_002046.3
EGFP s	ACCTACGGCAAGCTG ACC	Vektor mit *EGFP*-cDNA	bp 2932-2949 in pIRES2-EGFP
EGFP as	CGTTGTGGCTGTTGT AGTTG	Vektor mit *EGFP*-cDNA	bp 3249-3268 in pIRES2-EGFP

Tab. 2.5 In PCR-Reaktionen verwendete Primer. Alle Primer stammen von Metabion, Martinsried.

Sequenzierungen wurden unter Verwendung von folgenden Primern von der Eurofins Medigenomix GmbH (Martiensried) durchgeführt :

Name	Sequenz 5´→ 3´	Ziel-DNA	Bindungsposition in RefSeq / Vektor
madex2start-seq	CTTGTGCCCCTCCTTC TC	*Nab2* genomisch	bp 3677-3694 in AF268380
madex1start	AGCCGGGGAGGGTG G	*Nab2* genomisch	bp 1666-1680 in AF268380
MG11	TGTCCATCCAGACTC TCCC	*Nab2-cDNA*	bp 1628-1646 in NM_005967.3
Nab1 s	TTCTCTCACCGTTCTC TGG	*Nab1-cDNA*	2044-2062 in NM_005966.3
Egr1 seq1000 s	GATCCCCGACTACCT GTTTCC	*Egr-1*-cDNA	bp 1023-1043 in NM_001964.2
Egr1 seq1100 as	ACAGAGGGGTTAGCG AAGGC	*Egr-1*-cDNA	bp 1119-1138 in NM_001964.2
Egr2seq1	AGCCTCATCCAGCGT CACC	*Egr-2*-cDNA	bp 731-749 in NM_000399.2
Egr2seq2	TCAGCAGCAGCAGCA GCC	*Egr-2*-cDNA	bp 1233-1255 in NM_000399.2
Egr2seq3	TAATACATATTGCTT CAAGGG	*Egr-2*-cDNA	bp 2343-2363 in NM_000399.2
CMV forward	CGCAAATGGGCGGTA GGCGTG	Vektoren mit CMV-Promotor	bp 769-789 (in pcDNA3)

Name	Sequenz 5´→ 3´	Ziel-DNA	Bindungsposition in RefSeq / Vektor
T7	TAATACGACTCACTA TAGGG	pcDNA3 pCMV-SPORT6	bp 863-882 (in pcDNA3)
SP6	GCATTTAGGTGACAC TATAG	pcDNA3 pCMV-SPORT6	bp 999-1018 (in pcDNA3)

Tab. 2.6 Zur Sequenzierung verwendete Primer. Alle Primer stammen von Metabion, Martinsried.

2.1.5.3 in Gelretardationsanalysen verwendete Oligonukleotide

Name	Sequenz 5´→ 3´	Position im 5'-Bereich der genomischen Nab2-Sequenz (RefSeq: AF268380)
Nab2 Oligo 1 s	GCGCCCGCCTCCCCGGCCCCC GCCCCCACCCCCGC	bp 1514-1548
Nab2 Oligo 1 as	GCGGGGGTGGGGGCGGGGGC CGGGGAGGCGGGCGC	
Nab2 Oligo 2 s	GGCCCCCGCCCCCACCCCCGC CCCCGGCTCT	bp 1528-1558
Nab2 Oligo 2 as	AGAGCCGGGGGCGGGGGTGG GGGCGGGGGCC	
Nab2 Oligo 3 s	GCTCTGCCCACGCCCTCCGCC CGCCAGCCC	bp 1554-1583
Nab2 Oligo 3 as	GGGCTGGCGGGCGGAGGGCG TGGGCAGAGC	

Tab. 2.7 In Gelretardationsanalysen verwendete Nab2-Oligonukleotide. Angegeben sind die Sequenz und der entsprechende Bereich in der genomischen Nab2-DNA. Alle Oligonukleotide wurden von Metabion (Martinsried) bezogen.

Name	Sequenz 5´→ 3´	Bestellnummer
Egr Kons	GGA TCC AGC GGG GGC GAG CGG GGG CGA	Sc-2529 (Santa Cruz)
Egr Kons mut	GGA TCC AGC TAG GGC GAG CTA GGG CGA	Sc-2530 (Santa Cruz)
Sp1 Kons	ATT CGA TCG GGG CGG GGC GAG C	Sc-2502 (Santa Cruz)
Sp1 Kons mut	ATT CGA TCG GTT CGG GGC GAG C	Sc-2503 (Santa Cruz)

Tab. 2.8 In Gelretardationsanalysen verwendete Kompetitions-Oligonukleotide. Kons, Konsensus-Sequenz. Mut, mutiert; ausgetauschte Nukleotide sind unterstrichen. Die Oligonukleotide wurden bei Santa Cruz Biotechnology (Santa Cruz, CA,USA) gekauft.

2.1.5.4 siRNA

Name	Sequenz 5´→ 3´	Ziel-mRNA	siRNA ID / Katalog-Nr.
Egr-1-2	CGACAGCAGUCCCAUUUA Ctt	*Egr-1*	146223
Egr-1-3	CCUAUACUGGCCGCUUUUCtt	*Egr-1*	115233
Egr-2-2	CGCAAAACCACUAACUGAAtt	*Egr-2*	115177
Egr-3-2	CCAACACAACAGAUAGAAUtt	*Egr-3*	115514
KIF11	nicht vorhanden	*KIF11*	4639
Kontrolle-1	nicht vorhanden	-	4607
Kontrolle-2	nicht vorhanden	-	4613
Kontrolle-3	nicht vorhanden	-	4615
Kontrolle-4	nicht vorhanden	-	4641
Kontrolle-5	nicht vorhanden	-	4642
Kontrolle-6	nicht vorhanden	-	4643

Tab. 2.9 Verwendete siRNAs. Alle siRNAs wurden von Ambion bezogen.

2.1.6 Größenstandards

DNA Größenstandards:	- 100 bp Leiter	Life Technologies, Karlsruhe
	- 1 kb Leiter	Gibco, BRL, Life Technologies GmbH, Eggenstein
	- 1 kb Leiter	GeneRuler™ , Fermentas
Protein Marker :	Roti-Mark-Prestained (17 -245 kDa) Roth GmbH+ Co, Karlsruhe	

2.1.7 Chemikalien

Die Chemikalien wurden vom jeweils günstigsten Anbieter bezogen.

2.1.8 Enzyme

Kälberdarm-Phosphatase CIP	Roche, Mannheim
Klenow-Fragment	MBI Fermentas, St.Leon-Rot
PfuTurbo-DNA-Polymerase	Stratagene, La Jolla, CA, USA
Restriktionsenzyme	New England Biolabs, Frankfurt MBI Fermentas, St.Leon-Rot Stratagene, La Jolla, CA, USA
RNaseA (Rinderpankreas)	Roche, Mannheim
T4-DNA Ligase	New England Biolabs, Frankfurt
T4-Polynukleotidkinase	MBI Fermentas, St.Leon-Rot
Taq-DNA-Polymerase	PEQLAB Biotechnologie GMBH, Erlangen
Pfu-DNA-Polymerase	MBI Fermentas, St-Leon-Rot

2.1.9 Kommerzielle Analysesysteme und vorgefertigte Lösungen

Biorad Proteinassay System (nach *Bradford*)	Biorad, München
DC-protein kit (Protein-Assay nach Lowry)	Biorad, München
First strand cDNA Synthesis Kit	Roche, Mannheim
FuGENE™6 Transfektions Reagenz	Roche, Mannheim
GFX™ PCR DNA and Gel Band Purification Kit	GE Healthcare, München
JETstar™ Plasmid Purification System	Genomed, Bad Oeyenhausen
JETsorb™ DNA Isolierungskit	Genomed, Bad Oyenhausen
JETquick™ *spin column*-Säulen	Genomed, Bad Oyenhausen
Lipofectamine™ 2000	Invitrogen, Karlsruhe
Luziferase-Assay System	Promega, Mannheim
MATra Transfektions-System	IBA, Göttingen
QuikChange™ XL site-directed mutagenesis kit	Stratagene, La Jolla, CA, USA
Real time PCR Materialien und Reagenzien	Applied Biosystems, Foster City, CA, USA
RevertAid™ First Strand cDNA Synthesis Kit	MBI Fermentas, St.Leon-Rot
RNeasy™ Mini-Kit	Qiagen, Hilden
RPMI 1640-Medium	Biochrom-KG, Berlin
SiPORT™ *NeoFX*™	Ambion, Austin, TX, USA
Western lightning, Chemilumineszenz Reagenz	Perkin Elmer, Life Sciences

2.1.10 Verbrauchsmaterial

Die Verbrauchsmaterialien wurden vom jeweils günstigsten Anbieter bezogen.

2.1.11 Geräte

ABI PRISM™ 7000 *Sequence Detection System*	Applied Biosystems, Foster City, CA, USA
Beta-Szintillationszähler LS 1801	Beckmann, München
Blotting-Apparatur (Western) *Trans-Blot™Cell*	Biorad, München
Filmentwicklergerät Airclean 200	Protec, Deutschland
Activated Cell Scanner (FACS)	
FACscan und Facscalibur	Becton&Dickenson, San Jose, CA, USA
Fotoautomat für *Dialux 20*-Mikroskop	Wild, Heerbrugg, Schweiz
Fotometer	
Spektralfotometer U-3200	Hitachi, Tokio, Japan
Ultraspec 3000	GE Healthcare, München Fluorescence
Gene Pulser	BioRad, München
Inkubationsschrank Steri Cult 200	Forma Scentific, Ohio, USA
B5060	Heraeus, Hanau
Trockeninkubator (30/37°C)	Ehert, Emdingen
Luminometer (Victor 1420)	Wallach, Turku, Finnland
Microtom (Frigocut 2800)	Leica, Bensheim
Mikroskope	
Diavert	Leitz, München
Dialux 20	Leitz, München
Epifluoreszenzmiroskop DURAXA	Leica, Bensheim
Laborlux (Fluoreszenz)	Leitz, München
Netzgeräte	
Electrophoresis Power Supply	GE Healthcare, München
Labornetzgerät EA3003 Macrodrive 1	LKB, Uppsala, Schweden
Powersupply	Desaga, Heidelberg
NucTrap Probe Purification Column	Stratagene, La Jolla, CA, USA
PCR-Gerät (Robocycler Gradient 96)	Stratagene, La Jolla, CA, USA
pH-Elektrode	Ingold, Steinbach
Sterilwerkbank «Laminar Flow»	Büttner-Schilde-Haas AG, Bottmingen
Ultraschallgerät Branson Sonifier®	
Cell Disruptor B15	Heinemann, Schwäbisch Gmünd
UV-Transilluminator	Bachofer, Reutlingen
UV-Stratalinker 2400	Stratagene, La Jolla, CA, USA
Waagen	
Präzisionswaage HL32	Mettler, Gießen
Wasserbad	GLW, Würzburg
Zentrifugen	
Biofuge A	Heraeus Christ, Hanau
Rotixa 50 RS	Hettich, Tuttlingen
Sorvall RC-5B	DuPont, Wilmington, DE, USA

2.2 Medien

2.2.1 Zellkulturmedien für Mammalia-Zelllinien

Zellkulturmedium (Medium):	RPMI 1640 supplementiert mit 5% FCS (für einige Zelllinien 10%) 1 mM Natriumpyruvat 2 mM L-Glutamin 100 U/ml Penicillin 100 U/ml Streptomycin
Einfriermedium:	RPMI 1640 supplementiert mit 25% FCS 10% 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 Bacto Agar, autoklavieren
Bakterien-Einfriermedium (2x):	1,65 g $K_2HPO_4*3H_2O$ 0,36 g KH_2PO_4 0,09 g tri-Na-Citrat*$2H_2O$ 0,018 g $MgSO_4*7H_2O$ 1,18 g $(NH_4)_2SO_4$ 7,15 ml 87%-iges Glycerol auf 100 ml H_2O auffüllen, steril filtrieren

Antibiotikahaltige Medien wurden nach dem Autoklavieren und Abkühlen auf ca. 60°C mit Ampizillin (Endkonzentration: 100 µg/ml) versetzt.

2.3 Allgemeine Puffer und Lösungen

Ampizillinlösung:	100 mg/ml Ampizillin in H_2O, sterilfiltriert
Auftragspuffer DNA (6x):	16% Ficoll 400, 0,06% Bromphenolblau in H_2O
Auftragspuffer EMSA	40% Sucrose in H_2O
Auftragspuffer Protein (6x):	350 mM Tris-HCl, pH 6,8 10% (m/v) SDS 30% (m/v) Glyzerol 9,3% (m/v) DTT 0,01% (m/v) Bromphenolblau
Auftragspuffer RNA (5x):	16 µl gesättigte Bromphenolblau-Lösung 80 µl 500 mM EDTA 720 µl 37% Formaldehyd 2 ml 100% Glycerol 3084 µl Formamid 4 ml 10x MOPS-Puffer mit DEPC-Wasser auf 10 ml auffüllen aliquotieren und bei –20°C lagern vor Gebrauch Ethidiumbromid in einer Endkonzentration von 10 µg/ml zugeben
Blockinglösung Western:	5% (m/v) Magermilchpulver in PBS
Blotting-Puffer Western:	10 mM $NaHCO_3$ 3 mM Na_2CO_3 20% (v/v) Methanol
1% (m/v) BSA-PBS:	0,5 g BSA auf 50 ml PBS, sterilfiltrieren
Carbazollösung:	frisch herstellen 12,5 mg Carbazol (3-Amino-9-Ethycarbazol) in 2,5 ml DMSO lösen, 50 ml Na-Azetatpuffer (0,035 M Natriumazetat, 0,015 M Essigsäure, pH 4,9) 20µl H_2O_2
Chloramphenicollösung:	34 mg/ml in EtOH, bei –20°C lagern
DEPC-Wasser:	1 mg Diethylpyrocarbonat 999 ml Aqua dest. bei RT für 12-16 h stehen lassen, autoklavieren
EDTA-PBS:	1 mM Na-EDTA in PBS, autoklavieren

EMSA-Bindungspuffer	10 mM Trsi-HCl (pH 7,5) 1 mM DTT 1 mM EDTA 50 mM NaCl 5% Glycerol 2 µg Poly-dI/dC
Glukose-PBS:	100 mg Glukose in 100 ml PBS, sterilfiltrieren und bei 4°C aufbewahren
5M Kalium-Azetat pH 4,8	294,42 g Ka-Azetat in 600 ml H_2O 115 ml 100%ige Essigsäure 285 ml H_2O autoklavieren
Laufpuffer RNA:	100 ml 10x MOPS-Puffer 880 ml DEPC-Wasser 20 ml 37% Formaldehyd
Laufpuffer SDS-PAGE:	50 mM Tris-HCl pH 8,3 380 mM Glycin 0,1% (m/v) SDS
Lysepuffer (genomisch)	10 mM Tris-HCl pH 8,0 150 mM NaCl 10 mM EDTA 1% SDS
Mammalia-Lysepuffer:	50 mM Tris-HCl pH 7,5 150 mM NaCl 1% (m/v) NP-40, autoklavieren vor Gebrauch 1 *Complete*^{TM}-Proteaseinhibitor-tablette/10 ml Lysepuffer zugeben
Maxi-Präparations-Lösung	25 ml 1 M Tris-HCl pH 8 20 ml 500 mM EDTA pH 8 9,91 g Glucose auf 100 ml mit H_2O auffüllen, steril filtieren
Mini-Präp-Lysepuffer:	immer frisch herstellen 2 ml NaOH (5 M) 45,5 ml H_2O 2,5 ml SDS (20%ig)
10x MOPS-Puffer:	200 mM 3-[N-Morpholino]propansulfonsäure 50 mM Natrium-Azetat 10 mM EDTA , in DEPC-Wasser mit NaOH auf pH 7,0 einstellen (nicht autoklavierbar)

Na-Azetat pH 5,2:	408,01 g $NaCH_3OOx3H_2O$, auf 800 ml mit H_2O auffüllen mit 100% CH_3OOH pH 5,2 einstellen, auf 1l auffüllen, autoklavieren
NZY+ Medium:	10 g NZ Amin (Casein Hydrolysat) 5 g Hefeextrakt 5 g NaCl pH 7,5 mit NaOH einstellen, autoklavieren vor Gebrauch zugeben: 12,5 ml 1 M $MgCl_2$ 12,5 ml 1 M $MgSO_4$ 20 ml 20% (w/v) glucose Filtersterilisation
PBS pH 7,2:	2,7 mM KCl 1,5 mM KH_2PO_4 137 mM NaCl 8 mM Na_2HPO_4
PMA-Lösung:	1 mg PMA (Phorbol-12-Myristat-13-Azetat) in 250 µl Ethylazetat lösen (4 mg/ml) in 12,5 µl (50 µg) aliqotieren 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
Puffer A (Kernextraktion)	10 mM Hepes pH 7,6 15 mM KCl 2 mM $MgCl_2$ 0,1 mM EDTA ph 8,0 vor Gebrauch pro 10 ml Puffer A 10 µl 1M DTT, 100 µl Pefablock, 30 µl Aprotinin, 100 µl 200 mM PMSF und 100 µl 200 mM BH zugeben
Puffer A + NP40 (Kernextraktion)	pro 10 ml Puffer A + 200 µl 10% NP40 (0,2% NP40)
Puffer C (Kernextraktion)	25 mM Hepes pH 7,6 50 mM KCl 0,1 mM EDTA pH 8 10% Glycerol vor Gebrauch pro 10 ml Puffer A 10 µl 1 M DTT, 100 µl Pefablock, 30 µl Aprotinin, 100 µl 200 mM PMSF und 100 µl 200 mM BH zugeben
RNase-A-Lösung:	10 mg/ml RNase A in H_2O 15 mM NaCl 10 mM Tris-HCl pH 8,0

STE-Puffer (1x)	100 mM NaCl 20 mM Tris-HCl (pH 7,5) 10 mM EDTA
Stripping-Puffer:	100 mM Glycin pH 2,9
10x TBE:	900 mM Tris Base 900 mM Borsäure 20 mM EDTA pH 8,0 autoklavieren
TE:	10 mM Tris 1 mM EDTA mit HCl auf pH 7,0; 7,5 bzw. 8,0 einstellen und autoklavieren
Tris pH 8,0:	10 mM Tris mit HCl auf pH 8,0 einstellen und autoklavieren

3 Methoden

3.1 Arbeiten mit Zelllinien

3.1.1 Zellkultur

Säugerzelllinien wurden in einem Inkubator bei 37°C, 7% CO_2 und 90% Luftfeuchtigkeit inkubiert. Das Zellkulturmedium (siehe Kap. 2.2.1) wurde, soweit nicht anders vermerkt, mit 5% FCS supplementiert. Das FCS wurde vor Anwendung 30 min bei 56°C erhitzt, um die Komplementproteine zu inaktivieren. Alle Arbeiten erfolgten unter einer sterilen Werkbank. Die verwendeten Lösungen wurden autoklaviert oder durch 0,2 µm Filter sterilfiltriert. Zum Ablösen adhärent-wachsender Zellen wurde das Medium abgesaugt und die Zellen für ca. 10 min bei 37°C im Inkubator mit 1 mM EDTA-PBS-Lösung (siehe Kap. 2.3) überschichtet. Nach der Inkubation wurden die Zellen durch leichtes Klopfen abgelöst und anschließend 7 min bei 400 g und Raumtemperatur (RT) abzentrifugiert. Das Zellsediment wurde in Zellkulturmedium resuspendiert und falls nötig in einer Neubauer-Zählkammer die Zellzahl bestimmt.

3.1.2 Einfrieren und Auftauen von Säugerzellen

Zur Kryokonservierung wurden ca. $5x10^6$ Zellen 7 min bei 400 g abzentrifugiert, in 0,75 ml Medium resuspendiert, mit gleichem Volumen an Einfriermedium (siehe Kap. 2.2.1) versetzt und in 2 ml Kryoröhrchen überführt. Der Einfriervorgang soll möglichst langsam erfolgen, um das Auskristallisieren von Zellflüssigkeit zu vermeiden. Deshalb wurden die Kryoröhrchen mit Papier umwickelt und bei -80°C für 1-2 Tage eingefroren und anschließend zur Langzeitlagerung in flüssigen Stickstoff bei -196°C überführt.

Das Auftauen soll dagegen schnell durchgeführt werden. Die Kryoröhrchen mit den Zellen wurden im 37°C Wasserbad aufgetaut und auf 5 ml vorgewärmtes (37°C) Medium getropft. Nach anschließender Zentrifugation (7 min, 400 g) wurden die Zellen in frischem Medium aufgenommen und in Zellkulturflaschen überführt.

3.1.3 Stimulation der Zellen mit Phorbolester

Der Phorbolester PMA (Phorbol-12-Myristat-13-Azetat) ist ein künstlicher Aktivator der Proteinkinase-C und dementsprechend ein starker Tumorpromotor. Da durch PMA eine Vielzahl von Genen induziert wird, wurde dieser Phorbolester zur Stimulation der Zellen verwendet.

Die Zellen wurden bei einer Konfluenz von 60-80% (siehe auch Kap. 3.1.4) mit der PMA-Lösung (siehe Kap. 2.3) in einer Endkonzentration von 10 ng/ml versetzt und die Effekte der Stimulation nach den angegebenen Zeiten bestimmt.

3.1.4 Transfektion von Säugerzellen in der Zellkultur

Stabile und transiente Tansfektionen von DNA wurden wie angegeben mit dem nicht liposomalen Transfektionsreagenz *FuGENE^{TM}6* oder mittels MATra (*Magnet Assisted Transfection*) durchgeführt.

Die Zellen wurden wie in Tab. 3.1 angegeben ausplattiert, so dass die Zellen nach 24 h bis 48 h Inkubation im Brutschrank bei 60-80%iger Konfluenz transfiziert wurden. Da die Plasmide nicht in den eukaryotischen Zellen replizieren, ist die Expression der transfizierten Gene zeitlich begrenzt, so dass die Effekte der ektopischen Expression nach 24 h bis 72 h untersucht wurden.
Vor der Transfektion wurde mittels Restriktionsverdau (Kap. 3.3.6.1) und anschließender Gelelektrophorese (Kap. 3.3.7) überprüft, ob die zu transfizierende, verdünnte DNA intakt ist und die richtige Insertion enthält. Zusätzlich konnten über den Restriktionsverdau geringste Unterschiede in der DNA-Konzentration erkannt und gegebenenfalls anschließend angeglichen werden. Da die inserierten Fragmente unterschiedliche Längen aufwiesen und daher schwer zu vergleichen sind, wurden die Vektorgrundgerüste zum DNA-Mengenangleich verwendet. 200 ng der Verdünnungen der Nab2-Promotor-Konstrukte, die auf dem Vektor pGL3-Basic basieren, wurden mit *Alw44* I verdaut und ein 1246 bp großes Fragment des Vektorgrundgerüsts benutzt. Zum Angleich der Expressionskonstrukte im Vektor pcDNA3 wurden 100 ng mit *Sal* I verdaut, so dass ein 2223 bp großes vektorinternes Fragment entstand.

Zellkultur-Flaschen/Platten	ausplattierte Zellzahl (zelllinienabhängig)	Medium (RPMI +5% FCS)	transfizierte Gesamt-DNA-Menge	DNA-Verdünnung
96-Loch-Platte	9×10^3 - $1{,}3 \times 10^4$	200 µl	60-240 ng	Reporterkonstrukte : 20 ng/µl Expressionsplasmide : 5 ng/µl
24-Loch-Platte	$6\text{-}8 \times 10^4$	500 µl	200-400 ng	20 ng/µl
12-Loch-Platte	9×10^4 - $1{,}3 \times 10^5$	1 ml	-	-
6-Loch-Platte	3×10^5	2 ml	1-3 µg	0,1 µg/µl
25 cm^2 Flasche	5×10^5	4 ml	2-4 µg	1 µg/µl

Tab. 3.1 Bei der Transfektion von Säugerzellen verwendete Zellzahlen, Medienvolumina, DNA-Mengen und DNA-Verdünnungen für die angegebenen Zellkultur-Flaschen/Platten.

3.1.4.1 Transiente Transfektion mittels MATra (*Magnet Assisted Transfection*)

Bei der *Magnet Assisted Transfection* (MATra, IBA) werden Nukleinsäuren wie DNA oder Oligonukleotide an positiv geladene magnetische Partikel gebunden und anschließend der Nukleinsäure-Partikel-Komplex durch magnetische Kraft in die Zellen gezogen, wodurch eine effiziente Transfektion von adhärenten Zellen erreicht wird.

Die Transfektion von adhärenten Zellen in 6-Loch- und 96-Loch-Platten wurde nach Herstellerangaben unter Verwendung des Standardprotokolls für MATra-A und einer 96-Magnet-Platte durchgeführt. Es wurde immer ein Mediumwechsel vollzogen.

3.1.4.2 Transfektion mit *FuGENE™6*

Die transiente Transfektion erfolgte in 24-Loch-Platten. Pro Ansatz wurde 1 µl *FuGENE™6*, welches 15 min vor Gebrauch auf RT erwärmt und anschließend gemischt wurde, zu 29 µl serumfreiem Medium pipettiert und für 5 min bei RT inkubiert. Die Mischung wurde auf die zu transfizierende DNA gegeben und 15 min bei RT inkubiert. Nach Mediumwechsel wurde die *FuGENE™6*-DNA-Suspension direkt zu den Zellen ins Medium getropft.

Die stabile Transfektion erfolgte nach dem gleichem Schema in 25 cm^2 Kulturflaschen. Pro Ansatz wurden 10 µl *FuGENE™6*, 87 µl serumfreies Medium und 3 µl der zu

transfizierenden DNA (1 µg/µl) verwendet. Nach 48 h wurde dem Medium 1 mg/ml G418 zugesetzt. Die weitere Selektion ist in Kap. 4.2.2 beschrieben.

3.1.4.3 Transfektion von *short interfering* RNA (siRNA)

Durch die Transfektion von 21-28 Nukleotide langen RNAs (siRNAs), die komplementär zur Sequenz der mRNA eines Zielgens sind, kann die Expression des Zielgens spezifisch und signifikant reduziert werden. Dabei wird die transfizierte siRNA in einen Proteinkomplex RISC (*RNA-induced silencing complex*) integriert, der RNA-Helikase- und Nuklease-Aktivität besitzt. Über die siRNA bindet der Komplex spezifisch an der exprimierten mRNA des Zielgens, so dass die mRNA durch die Helikase-Aktivität entwunden werden kann und somit zugänglich für den Abbau durch die Nukleasedomäne von RISC, aber auch durch intrazelluläre Nukleasen wird. Durch die spezifische Reduktion der Expression können Hinweise auf die physiologische Bedeutung des betreffenden Gens erhalten werden.

Die Transfektion der siRNAs wurde in 12-Loch-Platten mit ca. 9 x 10^4 Zellen (siehe Tab. Tab. 3.1) durchgeführt und die Depletion der mRNA der Zielgene sowie der mögliche Einfluss auf die mRNA-Expression anderer Moleküle nach 24 bis 72 h mittels semiquantitativer RT-PCR (Kap. 3.3.4) oder Real time PCR (Kap. 3.3.5) analysiert. Während der Inkubationszeit wurden die transfizierten Zellen regelmäßig auf Veränderungen der Vitalität und Morphologie im Mikroskop untersucht. Die verwendeten siRNAs sind in Tab. 2.1.5.4 angegeben.

3.1.4.3.1 SiRNA Reverse Transfektion mit siPORT™ *NeoFX*™

Bei der reversen Transfektion oder Neofektion werden das lipid-basierte Reagenz siPORT™ *NeoFX*™ (Ambion) mit der zu transfizierenden siRNA gemischt und auf Zellkulturplatten verteilt. Anschließend wird die Mixtur mit den Zellen überlagert, so dass die Neofektion während der Adhäsion der Zellen erfolgt, wodurch gegenüber herkömmlichen Transfektionstechniken ein Tag gespart wird. Die Neofektion wurde nach den Herstellerangaben in 12-Loch-Platten durchgeführt. Nach 24 h erfolgte bei einer Inkubationszeit von 2-3 Tagen ein Mediumwechsel.

3.1.4.3.2 SiRNA-Transfektion mit Lipofectamine™ 2000

Die Zellen wurden wie in Tab. 3.1 angegeben in 12-Loch-Platten ausgesät und nach 24 h die siRNA-Transfektion mit Lipofectamine™ 2000 (Invitrogen) nach dem Standardprotokoll des Herstellers ausgeführt. Bei Inkubationszeiten von bis zu 3 Tagen erfolgte nach 24 h ein Mediumwechsel.

3.1.5 Luziferase-Versuch

In der Zellbiologie sind Reportergenkonstrukte, die aus zu untersuchenden genregulatorischen Elementen (z.B. verkürzten Promotoren) und einem Testgen mit bekanntem, leicht zu detektierenden Produkt bestehen, weit verbreitet, um Genexpression und andere Ereignisse in Zellen wie Signaltransduktion, Protein-Protein-Interaktionen oder die Aktivität von Transkriptionsfaktoren zu untersuchen (Alam, Cook, 1990; Wood, 1991).

Die Glühwürmchenluziferase ist als Reportergen weit verbreitet, da der Nachweis sehr sensitiv ist und die Luziferase keine posttranslationalen Modifikationen für ihre Aktivität in Säugerzellen benötigt (de Wet et al., 1987; Wood, 1990).
Wie Abb. 3.1 zeigt, wird durch die Umwandlung chemischer Energie aus der Oxidation von Luziferin durch Elektronenübertragung Licht erzeugt, wobei Oxyluziferin entsteht. Die Luziferase, ein 61 kDa Monomer, katalysiert die Luziferinoxidation unter Beteiligung von Mg^{2+}, ATP und Coenzym A.

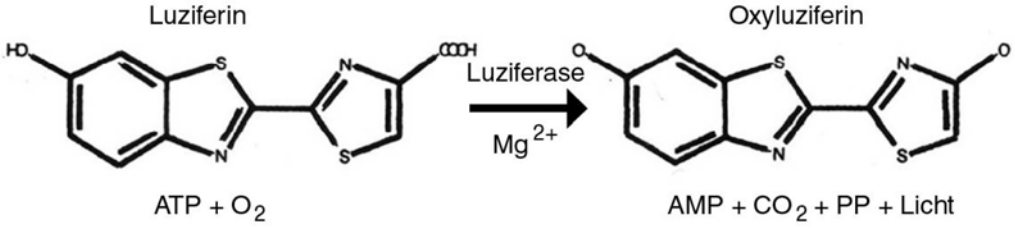


Abb. 3.1 Prinzip des Luziferasereporter-Versuches (Promega).

3.1.5.1 Probenaufbereitung und Luziferase-Versuch

Für die Durchführung des Versuchs wurden die zu untersuchenden Zellen, wie in Tab 3.3 beschrieben, ausplattiert und transient in, wenn nicht anders angegeben, Triplikaten mit der DNA transfiziert. Nach 24-48 h wurde das Zellkulturmedium abgesaugt und einmal vorsichtig (um die Zellen nicht abzulösen) mit PBS gewaschen. Anschließend wurde in

jede Vertiefung 1x Cell-Lysis-Buffer-Reagent (Promega) pipettiert und für mindestens 30 min auf einem Schüttler bei hoher Drehgeschwindigkeit inkubiert. Das Lysat der Zellen wurde durch mehrfaches Auf- und Abpipettieren sowie Spülen des jeweiligen Lochs homogenisiert und anschließend in eine Vertiefung einer undurchsichtigen, weißen 96-Loch-Platte übertragen und das Luziferase-Substrat (Promega) zugegeben. Die verwendeten Volumina für Zellen, die in 24-Loch- oder 96-Loch-Platten transfiziert wurden, sind in Tab. 3.3 dargestellt. Die Messung der Proben erfolgte am Luminometer bei 560 nm mit einer Ablesezeit von 1 s pro Loch. Für die Auswertung der Luziferase-Aktivität wurde der Proteingehalt der Proben bestimmt (Kap. 3.1.5.2) und die Werte als LE (Lichteinheiten) pro µg Protein berechnet.

transfiziert in :	96-Loch-Platte	24-Loch-Platte
lysiert in : (1x Cell-Lysis-Buffer-Reagent)	30 – 50 µl (abhängig von der Zelldichte)	50 µl
übertragenes Lysat :	10 – 20 µl	20 µl
Luziferase-Substrat :	20 – 30 µl	50 µl

Tab. 3.3 Verwendete Volumina im Luziferase-Versuch für Zellen, die in 96- oder 24-Loch-Platten transfiziert wurden.

3.1.5.2 Proteinbestimmung nach Bradford (1976)

Die im Luminometer erhaltenen Werte konnten nicht direkt verwendet werden, sondern mussten über den Gesamtproteingehalt der Proben normalisiert werden, da dieser in Beziehung zur Zellzahl der ursprünglichen Probe steht.

Zur Proteinbestimmung wurde der Proteinassay von Biorad (nach Bradford) durchgeführt, der darauf beruht, dass sich nach Bindung von Coomassie brilliant blue G-250 an Proteine, primär an basische (speziell Arginin) und aromatische Aminosäurereste, in saurem Millieu das Absorptionsmaximum der Farbe verschiebt (465 nm ohne Protein, 595 nm mit Protein). Die Zunahme der Absorption bei 595 nm ist ein Maß für die Proteinkonzentration der Lösung.

Es wurden nach Erstellen von BSA-Lösungen (0 µg/µl, 0,5 µg/µl, 1 µg/µl, 2µg/µl, 3 µg/µl und 5 µg/µl) für eine Standardkurve jeweils 2 µl der lysierten Proben und der

Standardwerte in Duplikaten in eine Vertiefung einer 96-Loch-Mikrotiterplatte pipettiert. 150 µl einer 1:5 Verdünnung des „Protein-Assay-Dye-Reagent-Concentrate“ (Biorad) wurden zugegeben und nach 5 min der Farbumschlag am ELISA-Reader bei 620 nm gemessen.

3.2 Arbeiten mit *Escherichia coli*

3.2.1 Kultivierung von *E. coli*

E. coli K12-Stämme wurden auf Festmedium, d.h. auf LB-Platten (siehe Kap. 2.2.2), bei 37°C oder als Übernachtkultur bei 200 Upm, 37°C in LB-Medium (siehe Kap. 2.2.2) auf dem Schüttelinkubator inkubiert. Auf Platten sind die *E. coli*-Kolonien bei 4°C einige Wochen haltbar. Zur Langzeitlagerung wurden 0,75 ml Übernachtkultur mit 0,75 ml Bakterien-Einfriermedium (Kap. 2.2.2) gemischt und bei -80°C gelagert. *E. coli* aus Glyzerinkulturen wurden mit einer sterilen Glaspipette auf Mediumplatten ausgestrichen oder direkt zum Animpfen der Übernachtkultur verwendet.

3.2.2 Transformation von *E. coli*

3.2.2.1 Herstellung von Hitzeschock transformationskompetenten *E. coli*

Zur Herstellung transformationskompetenter Bakterienzellen wurden 200 ml LB-Medium 1:200 mit einer frischen *E. coli*-Übernachtkultur angeimpft und bis zu einer OD_{600} von 0,5 bis 0,8 bei 37°C und 200 Upm inkubiert. Die Zellen wurden 15 min mit 1500 *g* und 4°C zentrifugiert und in 100 ml eiskalter 50 mM $CaCl_2$-Lösung resuspendiert. Nach 30 min Inkubation auf Eis wurden die Zellen erneut abzentrifugiert und in 10 ml eiskalter 50 mM $CaCl_2$, die 15% (m/v) Glyzerin enthielt, resuspendiert. Die Zellsuspension wurde zu je 200 µl aliquotiert und bei -80°C gelagert.

3.2.2.2 Hitzeschock-Transformation *E. coli*

Die Transformation wurde nach dem Protokoll des QuikChange™ XL Site-Directed Mutagenesis Kit von Stratagene durchgeführt. Mit 1 pg einer Transformations-Kontroll-DNA (pUC18) wurde die Transformationseffizienz (Kolonien/µg DNA) bestimmt.
Bei den im QuikChange™ XL Site-Directed Mutagenesis Kit mitgelieferten XL10-Gold ultrakompetenten *E. coli* konnten Transformationsraten von 10^9 Kolonien/µg DNA erreicht

werden, während bei selbst hergestellten kompetenten Zellen eine Effizienz von 10^7 Kolonien/µg DNA beobachtet werden konnte.

3.2.2.3 Transformation von *E. coli* mittels Elektroporation

Um höhere Transformationsraten (bis 10^9 Kolonien/µg DNA) mit selbst hergestellten kompetenten Zellen zu erreichen, die z.T. zur Transformation von Ligationsansätzen in *E. coli* nötig sind, wurde die Elektroporationsmethode angewandt.
Eine frische Übernachtkultur von *E. coli* wurde 1:100 in 500 ml LB-Medium verdünnt und bei 37°C und 200 Upm bis zu einer OD_{600} von 0,5 bis 1,0 inkubiert. Die Zellen wurden 15-30 min auf Eis heruntergekühlt und anschließend mit 1500 *g* bei 4°C für 15 min abzentrifugiert. Die Zellen wurden in 500 ml 4°C kaltem Aqua bidest resuspendiert, abzentrifugiert, erneut in 250 ml kaltem H_2O resuspendiert und wieder abzentrifugiert. Anschließend wurden die Zellen in 10 ml 4°C kaltem 10%igen Glyzerin resuspendiert, abzentrifugiert und schließlich in 1 ml 4°C kaltem 10%igen Glyzerin aufgenommen. Die transformationskompetenten Zellen wurden aliquotiert, in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -80°C aufbewahrt.
Zur Transformation wurden die elektrokompetenten Zellen langsam auf Eis aufgetaut. 40 µl der Zellen wurden mit bis zu 6 µl eines Ligationsansatzes oder der Plasmid-DNA, die 20 min auf einer Nitrozellulosemembran mit einer Porengröße von 0,025 µm gegen 10% Glyzerin dialysiert wurden, versetzt und auf Eis inkubiert. Der Transformationsansatz wurde in eine auf Eis vorgekühlte 0,2 cm Elektroporationsküvette überführt und mit dem *Gene Pulser* ein Strompuls ausgelöst (2,5 kV, 25 µF, 400 Ω). Die Zellen wurden sofort mit 1 ml LB-Medium aus der Küvette gespült, 30 min bei 37°C zur Expression der Antibiotikaresistenz inkubiert und anschließend auf den LB-Platten mit dem entsprechenden Antibiotikum ausplattiert.

3.3 Molekularbiologische Methoden

3.3.1 Isolierung von Nukleinsäuren

3.3.1.1 Minipräparation von Plasmid-DNA aus *E. coli*

Zur Isolierung von Plasmid-DNA mittels der alkalischen SDS-Lyse-Methode aus *E. coli* wurden 1,5 ml einer *E. coli*-Übernachtkultur 3 min bei RT und 2200 g zentrifugiert. Die Zellen wurden in 250 µl Maxipräparations-Lösung (siehe Kap. 2.3) resuspendiert, nach

Zugabe von 500 µl frisch hergestelltem Mini-Präp-Lysepuffer (siehe Kap. 2.3) leicht geschüttelt und für 5 min auf Eis inkubiert. Anschließend wurden 250 µl Neutralisationslösung (5 M Ka-Azetat pH 4,8 ; siehe Kap. 2.3) zugegeben, die Mischung leicht geschüttelt und für 15 min auf Eis inkubiert. Die lysierten Zellen wurden für 15 min bei 15600 g und 4°C abzentrifugiert und der Überstand in ein neues Eppendorfgefäß überführt. Nach Zugabe von 500 µl Isopropanol wurde die DNA für mindestens 20 min bei –20°C präzipitiert und daraufhin bei 15600 g und 4°C abzentrifugiert. Die DNA wurde zweimal mit 70% Ethanol gewaschen, anschließend bei RT getrocknet und in 50 µl Aqua bidest resuspendiert.

Um kleine Mengen an sehr reiner Plasmid DNA für z.B. Sequenzierungen zu erhalten, wurden JET™quick s*pin column*-Säulen (Genomed) verwendet. Sie beruhen auf einer alkalischen SDS-Lyse und anschließender säulenchromatographischer Reinigung, wodurch einzelne oder freie Nukleotide effizient abgetrennt werden.

Die Plasmid-DNA wurde nach dem Protokoll des Herstellers isoliert.

Die isolierte DNA wurde anschließend enzymatisch verdaut (siehe Kap. 3.3.6.1) und die entstandenen Fragmente auf die richtige Größe mittels Gelelektrophorese (siehe Kap. 3.3.7) getestet.

3.3.1.2 Maxipräparation von Plasmid-DNA aus *E. coli*

3.3.1.2.1 Modifizierte alkalische Lyse / PEG-Präzipitation

Zur Isolierung von größeren Mengen an reiner Plasmid-DNA aus *E. coli* wurden 100 ml einer *E. coli*-Übernachtkultur 10 min bei 4°C und 2000 g zentrifugiert. Die Zellen wurden in 4 ml Maxipräparations-Lösung (siehe Kap. 2.3) resuspendiert, nach Zugabe von 6 ml frisch hergestelltem Mini-Präp-Lysepuffer (siehe Kap. 2.3) durch Kippen vorsichtig gemischt und für 5 min auf Eis inkubiert. Anschließend wurden 3 ml Neutralisationslösung (5 M Ka-Azetat, pH 4,8 ; siehe Kap. 2.3) zugegeben, die Mischung leicht geschwenkt und für 15 min auf Eis inkubiert. Die lysierten Zellen wurden für 10 min bei 11500 g und RT abzentrifugiert, der Überstand in ein frisches Gefäß überführt und nach Zugabe von RNase A (10 mg/ml) zu einer Endkonzentration von 20 µg/ml für 20 – 40 min bei 37°C inkubiert. Darauf folgte eine zwei- bis dreimalige Extraktion mit je 8 ml Chlorophorm, wonach die wässrige Phase jeweils in ein frisches 50 ml Gefäß überführt wurde. Anschließend wurde die wässrige Phase zur weiteren Zentrifugation bei hohen g-Zahlen in ein 50 ml „Oak Ridge Centrifuge Tube“ gegeben. Nach Zugabe von 1 Vol Isopropanol wurde die DNA

sofort für 30 min bei 11500 g und 4°C abzentrifugiert. Das Sediment wurde einmal mit 10 ml 70% Ethanol gewaschen und nach Trocknung in 640 µl H_2O resuspendiert.
Zur weiteren Aufreinigung der DNA wurde eine Präzipitation mit Polyethylenglykol (PEG_{8000}) angeschlossen. Das hochmolekulare PEG_{8000} bindet Makromoleküle wie DNA, wodurch die Wasserlöslichkeit stark verringert wird und die PEG_{8000}-DNA-Komplexe ausfallen.
Die in 640 µl H_2O gelöste DNA wurde mit 160 µl 4 M NaCl und 800 µl 13% PEG_{8000} gemischt, für 30 min auf Eis inkubiert und bei 4°C und 14000 g für 15 min zentrifugiert. Auf die alternative Entfernung von Restmengen an PEG_{8000} mittels Ethanolfällung (Kap. 3.3.1.5) wurde verzichtet. Das Sediment wurde einmal mit 5 ml 70% Ethanol gewaschen und nach Trocknung in 300 - 500 µl H_2O resuspendiert.

Die isolierte DNA wurde anschließend enzymatisch verdaut (siehe Kap. 3.3.6.1) und die entstandenen Fragmente auf die richtige Größe mittels Gelelektrophorese (siehe Kap. 3.3.7) getestet.

3.3.1.2.2 JetStar Maxipäparations-Kit

Um größere und reine Mengen Plasmid-DNA aus *E. coli* zu isolieren, wurde das *JetStar Maxipäparations-Kit* von Genomed verwendet, welches auf dem gleichen Prinzip wie dem der s*pin column*-Säulen (Kap. 3.3.1.1) basiert.
Das Protokoll des Kits wurde bis auf folgende Änderungen übernommen.
Es wurden 250 ml einer Übernachtkultur von *E. coli* mit dem zu präparierenden Plasmid für 10 min bei 1500 *g* und 4°C abzentrifugiert, bevor die Säule äquilibriert wurde.
Außerdem wurde in Schritt 9 die DNA nach Zugabe von 10,5 ml Isopropanol für minimal 1 h bei –20°C präzipitiert und anschließend für 45 min bei 4°C und 14000 *g* abzentrifugiert. Daraufhin wurde die DNA mit 5 ml 70% Ethanol gewaschen und für 15 min bei 4°C und 14000 *g* zentrifugiert. Die DNA wurde unter vielfachem Auf- und Abpipettieren in 500 µl H_2O resuspendiert und über Nacht gelöst bevor sie in ein 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt wurde.

Die isolierte DNA wurde anschließend enzymatisch verdaut (siehe Kap. 3.3.6.1) und die entstandenen Fragmente auf die richtige Größe mittels Gelelektrophorese (siehe Kap. 3.3.7) getestet.

3.3.1.3 Isolation genomischer DNA aus Säugerzellen

Zur Präparation genomischer DNA wurden ca. 1 x 10^7 Zellen abgelöst, einmal in PBS gewaschen und das Zellsediment in 1 ml Lysepuffer (genomisch) (siehe Kap. 2.3) aufgenommen. Anschließend wurden 30 µl Proteinase K (10 µg/µl) zugegeben und der Ansatz über Nacht bei 54°C inkubiert. Die Inaktivierung des Enzyms und die Aufreinigung der Probe erfolgte durch Phenol/Chlorophorm-Extraktion (Kap. 3.3.1.4). Nach anschließender Fällung der DNA (Kap. 3.3.1.5) wurde die DNA mittels einer unter Hitzeeinwirkung veschlossenen und umgebogenen Pasteurpipette „gefischt", zweimal in 70% Ethanol getaucht und an der Luft getrocknet. Die getrocknete DNA wurde in 300 - 600 µl Aqua bidest aufgenommen.

3.3.1.4 Phenol/Chloroform-Extraktion von DNA

Proteine und andere Verunreinigungen wurden aus wässriger DNA-Lösung durch Extraktion mit Phenol entfernt. Die Probe wurde mit einem gleichen Volumen an Phenol gemischt. Die Phasentrennung erfolgte durch Zentrifugation (795 g, RT, 2 min) und anschließender Überführung der oberen, wässrigen Phase in ein neues Reaktionsgefäß. In einem zweiten Schritt wurde die Probe mit gleichem Volumen Phenol/Chloroform ausgeschüttelt und die Phasen wie beschrieben getrennt. Die so gereinigte Nukleinsäure wurde anschließend mit Ethanol präzipitiert.

3.3.1.5 DNA-Präzipitation

Die Reinigung und Konzentration von Nukleinsäure aus wässrigen Lösungen erfolgte durch Fällung. Hierfür wurde zur Probe 1/10 Volumen 3M Na-Azetat, pH 5,2 (siehe Kap. 2.3) und das 2,5-fache Volumen an eiskaltem Ethanol zugegeben, gemischt und für 1 h bei -20°C gefällt. Das Präzipitat wurde für 15 min bei 15600 g und 4°C zentrifugiert und anschließend das Sediment, um Salze zu entfernen, mit 70% Ethanol gewaschen. Nach erneuter Zentrifugation und vollständigem Abpipettieren des Überstandes wurde die DNA 10-20 min bei RT getrocknet und in Aqua bidest gelöst.

3.3.1.6 Isolation von RNA aus Säugerzelllinien

Um eine cDNA-Synthese durchführen zu können, wurde aus den Säugerzellen die gesamte RNA isoliert und anschließend mit der reversen Transkriptase in cDNA umgeschrieben. Das Problem beim Arbeiten mit RNA sind die hoch effizienten und schlecht inaktivierbaren RNasen. Deswegen wurden alle Arbeiten mit RNA an einem „RNase-freien" Arbeitsplatz unter Verwendung von Handschuhen und separaten Lösungen, Filter-Pipettenspitzen und Gefäßen durchgeführt.

Zur Isolation der RNA wurde das *RNeasy^{TM}-Mini-Kit* (Qiagen) verwendet. Da die zu untersuchenden Gene leicht und über ca. 24 h transient induzierbar sind, wurden die RNA-Präparationen erst 48 h nach Ausplattierung von entweder 5 x 10^5 Zellen in 25 cm^2 Kulturflaschen oder ca. 1 x 10^5 Zellen in 12-Loch-Platten (Tab. 3.1) durchgeführt, so dass die Zellen nach 48 h Inkubation im Brutschrank ca. 80% konfluent waren. Um kurzzeitige Expressionsinduktionen zu vermeiden, wurden die Zellen auf Eis einmal mit PBS gewaschen und daraufhin direkt in der auf Eis liegenden Zellkulturflasche mit 350 µl des mitgelieferten RLT-Puffers, komplementiert mit 1%-β-Mercaptoethanol, lysiert. Nach mehrfachem Auf- und Abpipettieren sowie Spülen des Zellkulturgefäßes wurde das Lysat (ca. 350 µl) über eine QIAshredder-Säule (Qiagen) bei RT homogenisiert. Alle weiteren Schritte wurden nach Angaben des Herstellers bei RT in der Regel mit DNase-Behandlung durchgeführt. Die RNA wurde abhängig von der vorher im Mikroskop bestimmten Konfluenz der Zellen mit 15-30 µl nukleasefreiem H_2O zweimal von jeder Säule eluiert. Die Integrität der isolierten RNA wurde anschließend über eine Gelelektophorese validiert (siehe Kap. 3.3.7.2).

3.3.1.7 Konzentrationsbestimmung von DNA/RNA

Die Konzentration von Nukleinsäuren wurde mit einem Spektralfotometer bestimmt. Bei einer Wellenlänge von 260 nm und einer Schichtdicke von 1 cm entspricht ein Absorptionswert von 1 einer Konzentration von 50 µg/ml doppelsträngiger DNA und 40 µg/ml RNA. Als Maß für die Reinheit der Nukleinsäure dient der Quotient bei den Wellenlängen 260 nm und 280 nm. Für reine DNA sollte er 1,8 und für reine RNA 1,8 bis 2,0 betragen. Niedrigere Werte deuten auf Verunreinigungen mit Proteinen, höhere Werte mit Salzen und Zuckern hin.

3.3.2 Amplifikation von DNA mit der Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

Mit Hilfe der Polymerase-Kettenreaktion oder *PCR* können definierte DNA-Sequenzen aus einem komplexen Gemisch von DNA selektiv angereichert werden (Saiki *et al.*, 1985; Saiki *et al.*, 1988). Hierzu werden zwei Oligonukleotide *(Primer)* benötigt, von denen einer zum 3´-Bereich der gewünschten DNA-Sequenz und der andere zum Gegenstrang des 5´-Bereichs komplementär ist. Die exponentielle Amplifikation der DNA wird durch wiederholte thermische Strangtrennung der DNA (Denaturierung), Anlagerung der *Primer* („*annealing*“) und DNA-Synthese aus Desoxyribonukleotiden mit Hilfe einer thermostabilen DNA-Polymerase (Extension) erreicht. Dem ersten Zyklus geht eine 5 minütige Denaturierungsphase voraus, um sicher zu stellen, dass sich sowohl beide Stränge der Ausgangs-DNA, als auch die Primer vollständig voneinander getrennt haben. Dem letzten Zyklus wird zur Vervollständigung der DNA-Synthese eine weitere längere Extensionsphase angehängt. Die PCR wurde in 0,2 ml Reaktionsgefäßen im Thermocycler (Robocycler Gradient 96, Stratagene) durchgeführt. Die jeweiligen optimalen Primer-Anlagerungstemperaturen wurden über einen PCR-Gradienten (44-66°C) für jedes Primerpaar bestimmt. Die Bildung der DNA-Fragmente definierter Länge wurde anschließend in einer Gelelektrophorese überprüft (siehe Kap. 3.3.7).

Der typische Reaktionsansatz und die Standard-Bedingungen der PCR-Reaktion sind in folgender Tab. 3.2 dargestellt. Die Amplifikatgrößen und verwendeten Primer sowie die Primer-Anlagerungstemperaturen, der mit den Standard-Parametern durchgeführten Reaktionen, können in Tab. 3.3 eingesehen werden.

Reaktionsansatz : 20 µl	PCR-Bedingungen:			
	Schritt	Temp.	Dauer	Zyklen
10 ng DNA 1x Reaktions-Puffer mit 2,5 mM $MgCl_2$ 10 pmol 5´-Primer 10 pmol 3´-Primer 100 µM/dNTP 0,5 U *Taq*-DNA-Polymerase (Peqlab)	Denaturierung	95°C	5 min	1
	Denaturierung Primer-Anlagerung Extension	95°C ***Tab. 3.3*** 72°C	35 sek 55 sek 1 min	30
	Extension	72°C	5 min	1

Tab. 3.2 Typischer Reaktionsansatz und die Standard-Bedingungen der PCR-Reaktionen.

amplifizierte cDNA (human)	Primer	Amplifikatgröße	Anlagerungs-Temperatur	Besonderheiten
EGFP	EGFP sense EGFP as	336 bp (cDNA)	58°C	
Egr-1	Egr-1 sense Egr-1 antisense	315 bp (cDNA) (1,7 kb genomisch)	62°C	
Egr-2	Egr-2 sense Egr-2 antisense	291 bp (cDNA) (1,7 kb genomisch)	56°C	
Egr-3	Egr-3 sense Egr-3 antisense	354 bp (cDNA) (1 kb genomisch)	62°C	
GAPDH	B1 B2	612 bp (cDNA) (1 kb genomisch)	55°C	26 Zyklen verwendet Extensionszeit: 50 sek
Nab1	Nab1 Ex4 s Nab1 Ex6 as	297 bp (cDNA) (3,5 kb genomisch)	58°C	
Nab2	Nab2 Ex1 1 Nab2 1AS	461 bp (cDNA) (2,2 kb genomisch)	62°C	Restriktion des Amplifikats mit *Gsu* I dient zur Unterscheidung von *Nab2-WT* und *Nab2-E37K*.
Nab2	SbN4-s MadOligo13	693 bp (VL-cDNA) 502 bp (drop8-cDNA)	58°C	Unterscheidung der mRNA-Expression von *Volllängen-Nab2* (VL) und der Spleißvariante *drop8-Nab2* (siehe Kap. 4.1.15)
Nab2 in Vektor mit CMV-Promotor	CMV forw Nab2 1AS	600 bp (cDNA in pcDNA3)	58°C	Zur Verifizierung der Orientierung der Nab2- oder E37K-Insertion

Tab. 3.3 Verwendete Primer, Anlagerungs-Temperaturen und erhaltene Produktgrößen für PCR-Reaktionen, die mit Standard-Parametern durchgeführt wurden. Die Primersequenzen sind in Tab. 2.5 angegeben.

3.3.3 Reverse Transkription und PCR (RT-PCR)

Mit Hilfe der RT-PCR kann aus RNA die komplementäre DNA (cDNA) herstellt werden. Dazu wird die virale *Reverse Transkriptase* verwendet, welche ein kurzes Oligonukleotid mit einem freien 3´OH Ende und als Vorlage RNA benötigt, um mit Hilfe von dNTPs den komplementären cDNA-Strang zu synthetisieren.

Für die cDNA-Synthese wurden sowohl das *First Strand cDNA Synthesis Kit for RT-PCR* Kit von Roche, als auch das *RevertAid*^{TM} *First Strand cDNA Synthesis* Kit von Fermentas weitgehend nach Standardprotokoll des Herstellers verwendet. Je nach Ansatz wurden 1 µg RNA und entweder *Oligo(dT)*$_{18}$*primer*, die mit den Poly-A-Enden der eukaryotischen mRNA hybridisieren, oder bei größeren 3'-untranslatierten Regionen (3'UTRs) *random hexamer primer* in die RT-Reaktion eingesetzt. Die so gewonnene einzelsträngige cDNA konnte anschließend z.B. für Klonierungen durch eine PCR-Reaktion amplifiziert (siehe Kap. 3.3.2) oder mittels semiquantitativer RT-PCR (siehe Kap. 3.3.4). und *real time* PCR (Kap. 3.3.5) analysiert werden.

3.3.4 Semiquantitative RT-PCR

Die semiquantitative RT-PCR ist eine sensitive Methode zum Vergleich der Expressionsstärke von mRNAs in verschiedenen Zelllinien oder Geweben sowie nach Behandlung mit stimulierenden Reagenzien.

Dazu wird 1 µg der Gesamt-RNA während der reversen Transkription in cDNA umgeschrieben (Kap. 3.3.3), die vorhandene cDNA des zu untersuchenden Gens mittels einer spezifischen PCR-Reaktion amplifiziert (Tab. 3.3) und nach einer Gelektrophorese die Bandenintensität densitometrisch ausgewertet (Kap. 3.6.2). Um Gesamt-cDNA-Mengen verschiedener Proben zu vergleichen, wird als interner Standard das Haushaltsgen Glyceraldehyd-3-phosphat-dehydrogenase (*GAPDH*) amplifiziert und zur Normalisierung verwendet.

Eine PCR-Reaktion läuft theoretisch nach der folgenden exponentiellen Funktion ab:

$$Y = X * 2^{n}$$

Dabei ist **Y** die Amplifikatmenge, **X** die Startkopienzahl zu Beginn der PCR und **n** die Anzahl der PCR-Zyklen. Unter optimalen Bedingungen wird demnach mit jedem Zyklus die Menge an Amplifikat verdoppelt. Praktisch gliedert sich der Verlauf einer PCR-Reaktion allerdings in die exponentielle Phase, die lineare Phase und die Plateauphase

(Abb. 3.2). Eine erstmalige exponentielle Amplifikation erfolgt nachdem die optimalen Verhältnisse der Primer zur Matrizen-DNA nach einigen Zyklen erreicht sind in der exponentiellen Phase. Die weitere Vedoppelung der Produktmenge resultiert in einem linearen Anstieg der Amplifikatmenge (lineare Phase). Mit zunehmender Zyklenzahl werden jedoch die benötigten Reagenzien (Primer, dNTPs, Polymerase) verbraucht, so dass die Reaktion langsamer abläuft bis sie letztendlich ganz abbricht (Plateauphase).

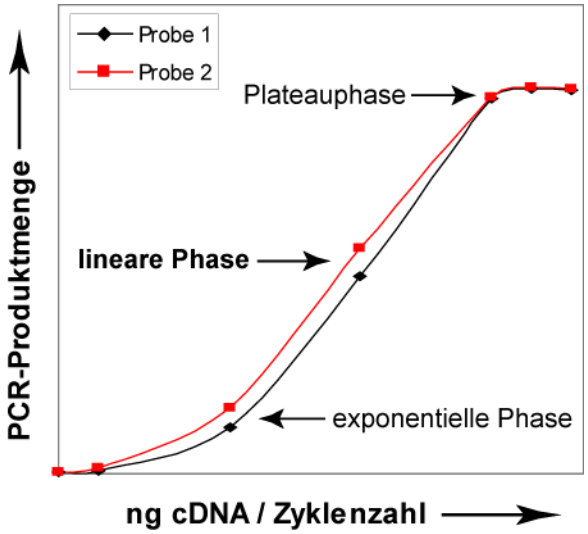


Abb. 3.2 Reaktionsverlauf einer PCR von zwei Proben mit geringfügig unterschiedlichen cDNA-Ausgangsmengen.

In Abb. Abb. 3.2 ist beispielhaft der PCR-Verlauf für zwei Proben, bei denen unterschiedliche cDNA-Ausgangsmengen eingesetzt wurden, dargestellt. Während in der Plateauphase keine Unterschiede in der Produktmenge aufgezeigt werden können, sind in der linearen und exponentiellen Phase Abweichungen erkennbar, wodurch deutlich wird, dass eine Endpunktanalyse für die Quantifizierung der mRNA-Menge nicht geeignet ist. Da in der exponentiellen Phase zwar die höchste Genauigkeit der PCR-Reaktion vorliegt, aber die geringen Amplifikatmengen gelelektrophoretisch nur schwer auswertbar sind, wird die mRNA-Expressionsstärke in der linearen Phase bestimmt.

Dazu wurden sowohl für das Haushaltsgen als auch für das zu untersuchende Gen der lineare Bereich der PCR-Reaktion durch Einsetzen von jeweils 1 µl serieller Verdünnungen (unverdünnt, 1:10, 1:100, 1:1000) der Ausgangs-cDNA bestimmt. Nach Auftragen der Bandenintensität, welche die PCR-Produktmenge widerspiegelt, gegen die eingesetzte cDNA-Menge konnte der lineare Bereich bestimmt werden. In der Regel wurde mit der 1:10 und/oder 1:100 Verdünnung eine lineare Amplifikation erreicht. Zur

Bestimmung der Expressionsstärke einer mRNA (relative mRNA-Expression) in einer Probe wurde der Quotient aus der nach linearer Amplifikation der gleichen cDNA-Vedünnung erhaltenen Bandenintensität des zu untersuchenden Gens und des internen Standards *GAPDH* gebildet.

$$\text{relative mRNA-Expression} = \frac{\text{Bandenintensität zu untersuchendes Gen}}{\text{Bandenintensität GAPDH}}$$

3.3.5 Semiquantitative Real time PCR

Die Real time PCR ist eine äußerst sensitive Methode zur Quantifizierung von PCR-Produkten und wird z.B. zur Diagnostik von RNA-Viren, aber auch zur Quantifizierung der mRNA-Expression in Zelllinien und Geweben verwendet. Nach dem Umschreiben der Gesamt-RNA in cDNA (Kap. 3.3.3) wird in der anschließenden PCR-Reaktion die Amplifikatmenge mit Hilfe von Fluoreszenz-Messungen am Ende eines jeden PCR-Zyklus („*real time*“) quantifiziert und unterscheidet sich somit von anderen quantitativen (z.B. kompetitive PCR) und semiquantitativen PCR-Methoden (Kap. 3.3.4), die erst nach Ablauf der PCR ausgewertet werden. Zur Detektion des PCR-Produkts können unter anderem fluoreszierende Farbstoffe, die sich unspezifisch an jede doppelsträngige DNA während der Amplifkation anlagern, oder fluoreszenz-markierte sequenzspezifische Hydrolyse-Sonden verwendet werden. In beiden Fällen nimmt die Fluoreszenz proportional mit der Menge an PCR-Produkt zu.

Fluoreszierende Farbstoffe, wie z.B. SYBR® Green, interkalieren in die kleine Furche doppelsträngiger DNA, wodurch die Fluoreszenz um das 1000-fache angeregt wird. Der Nachteil dieses Verfahrens ist die geringe Spezifität, da zwischen verschiedenen PCR-Produkten nicht unterschieden werden kann, so dass nach der abgelaufenen PCR-Reaktion eine Schmelzpunktanalyse durchgeführt werden muss.

Deswegen wurden zur Detektion sequenzspezifische *TaqMan*®-MGB-Sonden (Applied Biosystems) verwendet, die an einem Ende mit dem Reporter-Fluoreszenzfarbstoff FAM™ und am anderen Ende mit einem dunklen, nicht fluoreszierenden *Quencher* („Löscher“) und einem „Minor Groove Binder“ (MGB) markiert sind (siehe Abb. 3.3). Der „Minor Groove Binder“ interkaliert nach der spezifischen Bindung der Sonde in die kleine Furche der DNA, wodurch die Stabilität der letzten 5-6 Basen der Sonde erhöht wird und somit kürzere Sonden bei gleicher Schmelztemperatur verwendet werden können.

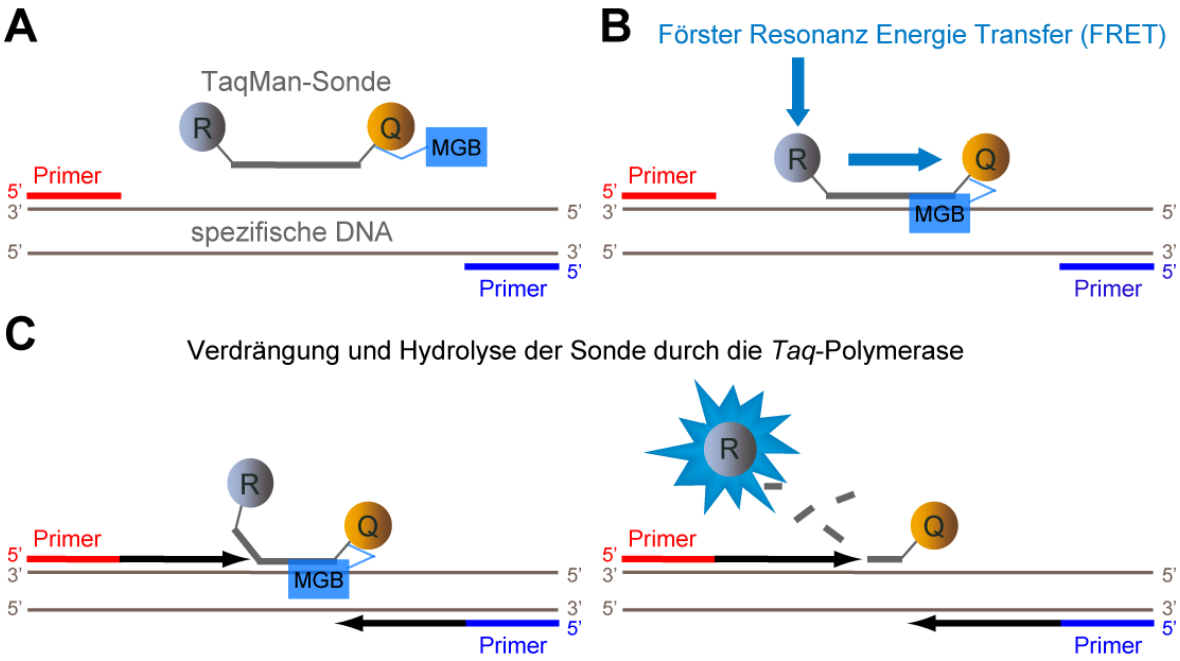


Abb. 3.3 Funktionsweise von *TaqMan*®-Sonden. A, Die mit einem Reporter-Fluoreszenzfarbstoff ®, einem nicht fluoreszierenden Quencher (Q) und einem „Minor Groove Binder“ (MGB) markierte *TaqMan*®-Sonde bindet an der spezifischen DNA-Sequenz. **B,** Nach der Bindung interkaliert der MGB zur Stabilisierung der Sonde in die kleine Furche der DNA. Die Fluoreszenz des Reporter-Fluorophors wird bei intakten *TaqMan*®-Sonden durch den Quencher mittels Förster Resonanz Energie Transfer (FRET) unterdrückt. **C,** Während der PCR-Reaktion baut die *Taq*-Polymerase auf Grund ihrer 5’-3’-Exonukleaseaktivität das 5’-Ende der Sonde ab, wodurch die Fluoreszenz des Reporters nicht mehr durch den Quencher „gelöscht“ wird und gemessen werden kann.

TaqMan®-Sonden basieren auf dem Prinzip des Förster Resonanz Energie Transfers (FRET) zwischen zwei Fluorophoren oder einem Fluorophor (Reporter) und einem dunklen, nicht fluoreszierenden *Quencher*, welcher Energie in Form von Wärme anstatt Licht verstreut (Didenko, 2001). Dabei wird ein Donor-Fluorochrom (Reporter) durch eine Lichtquelle angeregt und gibt einen Teil seiner Energie an ein in ausreichender Nähe befindlichen Akzeptor (Quencher) ab. Bei zunehmendem Abstand der Fluorochrome nimmt FRET und somit das Fluoreszenzsignal des Akzeptors ab, während das Signal des Donors zunimmt (Förster, 1948; Stryer and Haugland, 1967).

Während der PCR-Reaktion wird die hybridisierte DNA-Sonde durch die 5’-3’-Exonuklease-Aktivität der *Taq*-Polymerase zerschnitten. Durch die Sondenhydrolyse wird die räumliche Nähe zwischen Reporter und Quencher unterbrochen, so dass die Fluoreszenz des Reporters nicht mehr durch den Quencher „gelöscht“ wird und eine steigende Reporter-Fluoreszenz detektiert werden kann.

Auf Grund dieser äußerst sensitiven Detektionsmethode kann in der Real time PCR, im Gegensatz zur semiquantitativen RT-PCR, die Amplifikation in der exponentiellen Phase der PCR-Reaktion, in der eine sehr hohe Genauigkeit vorliegt, analysiert werden.

3.3.5.1 Relative Quantifizierung mittels der Δ-Δ-C_t-Methode

Zum Vergleich der exprimierten mRNA-Mengen in verschiedenen Proben wurde eine relative Quantifizierung durchgeführt. Dazu wurde, um eventuelle Unterschiede in der eingesetzten cDNA-Menge zu relativieren, die Menge an cDNA des zu untersuchenden Gens auf die des als endogene Kontrolle fungierenden Haushaltsgens Glucose-6-phosphat-dehydrogenase (*G6PD*) bezogen. Des Weiteren wurde der Fluoreszenzfarbstoff ROX™ als passive Referenz im Real time PCR-Ansatz verwendet, um PCR-unabhängige Fluoreszenzvariationen, die z.B. durch Unterschiede der Probenvolumina entstehen, zu normalisieren. Zur Bestimmung des normalisierten Reporter-Wertes (Rn) wurde der Quotient aus der Fluoreszenz des Reporters und der passiven Referenz gebildet. Um eine Quantifizierung der Amplifikatmengen in der exponentiellen Phase zu gewährleisten, wurde der C_t-Wert („threshold cycle“) ermittelt. Der C_t-Wert gibt den Zyklus an, bei dem die normalisierte Reporter-Fluoreszenz erstmalig signifikant über den Grenzwert („threshhold“) der Hintergrund-Fluoreszenz (Hintergrundrauschen) ansteigt (siehe Abb. 3.4). Je größer die Ausgangsmenge an einer spezifischen cDNA ist, desto geringer ist die Anzahl der Zyklen, die erforderlich sind, um den Grenzwert des Hintergrundrauschens deutlich zu übersteigen.

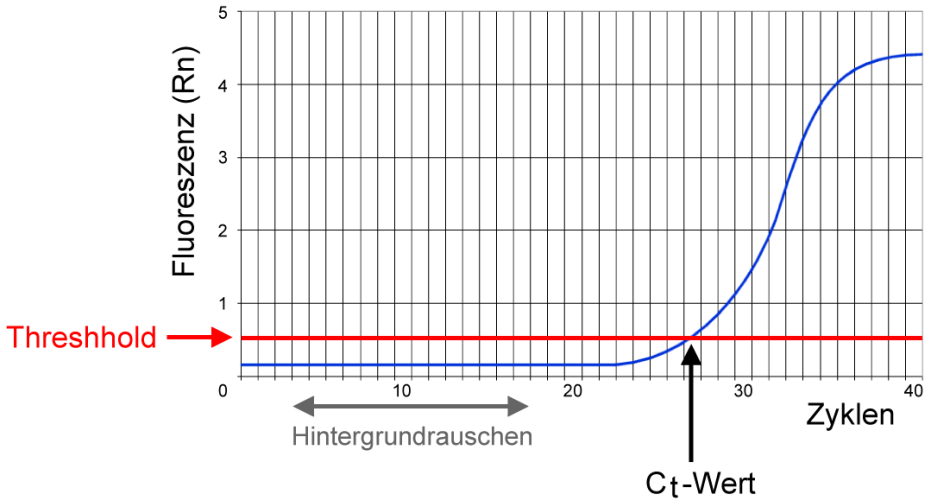


Abb. 3.4 Ermittlung des C_t-Werts („threshhold cycle“). Aufgetragen wurde die normalisierte Reporter-Fluoreszenz (Rn) gegen die Zyklenzahl. Der C_t-Wert gibt den Zyklus an, bei dem der Rn-Wert zum ersten mal den Grenzwert („threshhold“) des Hintergrundrauschens signifikant übersteigt.

Um die relative mRNA-Expression von unterschiedlichen Proben zu vergleichen, wurde die Δ-Δ-C_t-Methode verwendet. Dabei ist besonders wichtig, dass die PCR-Effizienzen des zu untersuchenden Zielgens und des Haushaltsgens (hier *G6PD*) vergleichbar sind, da ansonsten die Ergebnisse verfälscht werden könnten. Die Effizienz einer PCR-Reaktion liegt in der Regel zwischen 0,78 und 0,97 (optimal ist eine Effizienz von 1) und hängt unter anderem von der Amplifikatlänge, vorhandenen Sekundärstrukturen oder dem GC-Gehalt im Amplikon ab (Köhler et al., 1995). Zum Vergleich der Effizienz wurde eine serielle Verdünnungsreihe einer cDNA hergestellt und jeweils 50 ng, 20 ng, 10 ng, 5 ng, 2 ng, 1 ng und 0,5 ng in beide PCR-Reaktionen eingesetzt. Anschließend wurde der Logarithmus der cDNA-Menge gegen die für jede cDNA-Verdünnung erhaltenen Δ-C_t-Werte (C_t-Zielgen - C_t-*G6PD*) aufgetragen (Abb. 3.5). Bei annähernd gleicher Effizienz der beiden PCR-Reaktionen ergibt sich eine Regressionsgerade, die eine Steigung m < 0,1 aufweisen soll (Livak and Schmittgen, 2001). Eine identische Effizienz wäre bei einer Steigung von m = 0 gegeben.

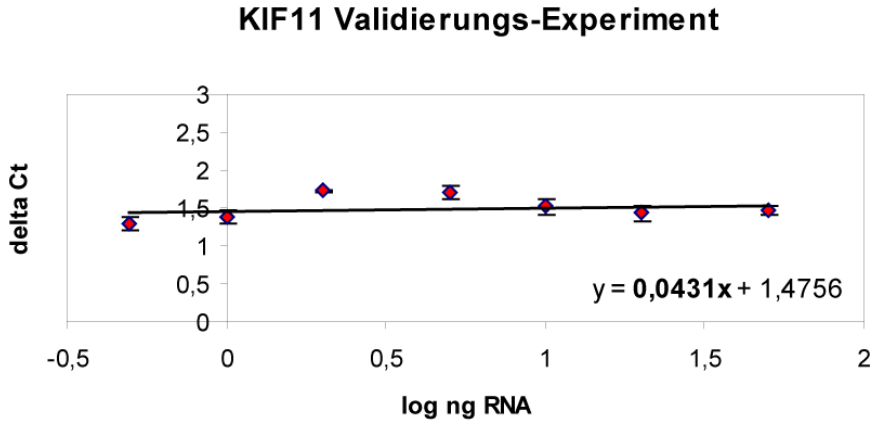


Abb. 3.5 Vergleich der Effizienz der KIF11 und der G6PD PCR-Reaktion. Die KIF11 und G6PD Real time PCR wurde jeweils mit 50 ng, 20 ng, 10 ng, 5 ng, 2 ng, 1 ng und 0,5 ng der Mel 888 cDNA in Triplikaten durchgeführt (Kap. 3.3.5.2). Es wurde der Logarithmus der eingesetzten cDNA-Menge gegen den ermittelten Δ-C_t-Wert (C_t-KIF11 - C_t-G6PD) aufgetragen. Die Steigung der Regressionsgerade ist mit m = 0,0431 kleiner als 0,1, so dass die Effizienz der beiden PCR-Reaktionen vergleichbar ist.

Nachdem dieses Validierungsexperiment für jedes zu untersuchende Zielgen erfolgreich durchgeführt wurde, konnte die relative Quantifizierung der exprimierten mRNA-Menge in verschiedenen Proben über die Δ-Δ-C_t-Methode erfolgen.

Es wurde die Differenz der ermittelten C_t-Werte der endogenen Kontrolle (*G6PD*) und des zu untersuchenden Zielgens in Probe 1 (Δ-C_t-Probe 1) gebildet. Für die mit Probe 1 zu vergleichende Probe wurden ebenfalls die C_t-Werte voneinander subtrahiert (Δ-C_t-Probe 2). Anschließend wurde die Differenz aus dem Δ-C_t-Probe 2 und Δ-C_t-Probe 1 berechnet (Δ-Δ-C_t-Wert) und in folgende Formel eingesetzt.

$$\textbf{n-fache Expression (Probe 2 relativ zu Probe 1)} = 2^{-\Delta-\Delta-Ct}$$

Ein erhaltener Wert von z.B. 64 gibt an, dass in Probe 2 die 64-fache Menge an Ziel-mRNA im Vergleich zu Probe 1 vorhanden ist. In Tab. 3.4 ist ein Rechenbeispiel angegeben.

Probe	*Egr-1* C_t-Wert	*G6PD* C_t-Wert	Δ-C_t-Wert (C_t-*Egr-1* - C_t-*G6PD*)	Δ-Δ-C_t-Wert (Δ-C_t-behandelt - Δ-C_t-unbehandelt)	$n = 2^{-\Delta-\Delta-Ct}$ (n-fache Menge an *Egr-1* relativ zur unbehandelten Probe)
unbehandelt	25	21	4	-6	64
behandelt	19	21	-2		

Tab. 3.4 Berechnung der *Egr-1*-Expressionsunterschiede in unbehandelten und für 2 h mit PMA behandelten Zellen mittels der Δ-Δ-C_t-Methode. Als endogener Standard wurde das Haushaltsgen Glucose-6-phosphat-dehydrogenase (*G6PD*) verwendet.

3.3.5.2 Durchführung der Real time PCR

Da die Real time PCR eine äußerst sensitive Methode ist, reichen bereits geringe Kontaminationen mit Fremd-DNA aus um falsch-positive Ergebnisse zu erhalten. Zur Vermeidung von Kontaminationen wurde die Real time PCR unter Verwendung von Handschuhen an einem eigenen Arbeitsplatz mit DNA-negativen Reagenzien, Pipetten, Filterpipettenspitzen in einer sterilen Werkbank pipettiert. Die Herstellung der cDNA, das Pipettieren der Real time PCR und die eigentliche PCR-Reaktion inklusive der Auswertung erfolgten räumlich getrennt. Des Weiteren war die Verwendung von Negativ-Kontrollen unerlässlich.

Alle zur Durchführung der Real time PCR benötigten Reagenzien, Materialien und Geräte wurden von Applied Biosystems bezogen.

Zur Amplifikation der Zielgene wurden *TaqMan® Gene Expression Assays* (Details Tab. 3.6), welche den jeweiligen 20x Primer/*TaqMan*®-Sonden Mix enthielten, und der *2x TaqMan® Universal PCR Master Mix* benutzt. Die Real time PCR wurde unter

Verwendung von Triplikaten für jede Probe in einem Gesamtvolumen von 25 µl in einer 96-Loch-Reaktionsplatte (*MicroAmp™ Optical 96-Well Reaction Plate*) bei RT angesetzt (siehe Tab. 3.5). Nach Vorlage von 20 µl des Real time PCR Mixes wurden standardmäßig 25 ng der zu untersuchenden cDNA bzw. H_2O als Negativ-Kontrolle zugegeben, gegebenenfalls mit H_2O auf 25 µl aufgefüllt und die 96-Loch-Reaktionsplatte durch eine adhäsive Klarsichtfolie (*MicroAmp™ Optical Adhesive Film*) verschlossen. Zur thermischen Abtrennung der adhäsiven Folie vom Thermocycler und um ein Überstrahlen von einer Probe zur anderen während der Laser-Auswertung zu verhindern, wurde ein *MicroAmp™ Optical Film Compression Pad* auf die verschlossene Reaktionsplatte gelegt. Die Real time PCR-Reaktion und Auswertung erfolgte weitgehend automatisiert über das ABI PRISM™ 7000 *Sequence Detection System* (SDS) Version 1.2.3 unter den in Tab. 3.5 angegebenen Bedingungen. Es wurde die 9600 Emulation verwendet. Nach der Normalisierung über den passiven Referenz-Farbstoff ROX™, konnten die erhaltenen C_t-Werte mit der Δ-Δ-C_t-Methode analysiert werden (Kap 3.3.5.1). Die jeweilige erwartete Amplifikatgröße wurde nach Abschluss der PCR-Reaktion über eine gelelektrophoretische Analyse der PCR-Produkte einmalig in zwei verschiedenen Proben validiert.

Real time PCR Reaktionsansatz :	Real time PCR-Bedingungen:			
12,5 µl 2x TaqMan® Universal PCR Master Mix, No AmpErase® UNG (enthält: AmpliTaq Gold® DNA Polymerase, dNTPs, Passiv-Referenz ROX™ und optimierte Puffer-Komponenten) 1,25 µl 20x Primer Mix (enthält 2 unmarkierte PCR-Primer (je 900 nM), FAM™-markierte TaqMan® MGB Sonde (250 nM Endkonzentration)) 6,25 µl H_2O ---------- 5 µl cDNA (5 ng/µl)	Schritt	Temp.	Dauer	Zyklen
	Denaturierung / Aktivierung der AmpliTaq Gold® DNA Polymerase	95°C	10 min	1
	Denaturierung	95°C	15 sek	40
	Primer-Anlagerung und Extension	60°C	1 min	

Tab. 3.5 Reaktionsansatz und Bedingungen in der Real time PCR

Zielgen	TaqMan® Gene Expression Assay ID	Amplikon (bp)	Sondensequenz und Bindungsposition in angegebener RefSeq
Egr-1	Hs00152928_m1	72	CACCTGACCGCAGAGTCTTTTCCTG bp 565-589 in NM_001964.2 (Exon 1-2)
Egr-2	Hs00166165_m1	66	GAGTGGCCGGAGATGGCATGATCAA bp 496-520 in NM_000399.2 (Exon 1-2)
Egr-3	Hs00231780_m1	91	TACAATCAGATGGCTACAGAGAATG bp 494-518 in NM_004430.2 (Exon 1-2)
Nab2	Hs01082003_m1	158	CCCAGACTCAAGCCCAGTGCCCGAG bp 451-475 in NM_005967.3 (Exon 1-2)
KIF11	Hs00189698_m1	101	CCATTCCCAGGAACTTTGCAAGTTA bp 2291-2315 in NM_004523.2 (Exon 16-17)
G6PD	Hs00166169_m1	94	TGGGTGCATCGGGTGACCTGGCCAA bp 583-607 in NM_000402.2 (Exon 2-3)

Tab. 3.6 Verwendete *TaqMan® Gene Expression Assays*. Angegeben sind die ID-Nummern, Sequenzen und Bindungspositionen der *TaqMan*®-Sonden und die Amplikongröße für das entsprechende Zielgen. Die Zielsequenz der Sonden wurde exonübergreifend gewählt, um die Amplifikation von genomischer DNA auszuschließen.

3.3.6 *In vitro*-Modifikation von DNA

3.3.6.1 Restriktionsverdau von DNA

Zur Spaltung von doppelsträngiger, zirkulärer DNA wurden TypII-Restriktionsendonukleasen eingesetzt. Es wurde mit 1 U Enzym pro µg DNA, 100 µg/ml BSA und unter den vom Hersteller empfohlenen Pufferbedingungen bei der für das Enzym optimalen Temperatur für minimal 1 h inkubiert.

3.3.6.2 Dephosphorylierung linearer DNA-Fragmente

Um eine Religation linearisierter DNA mit kompatiblen Enden zu verhindern, wurden 5´-terminale Phosphatgruppen mit Alkalischer Phosphatase aus Kälberdarm abgespalten. 1 µg DNA wurden mit 1 U CIP (*calf intestine phoshatase*) für 30 min bei 30°C und anschließend für 15 min bei 55°C inkubiert. Das Enzym wurde durch eine Phenol-Chloroform-Extraktion (siehe Kap. 3.3.1.3) inaktiviert und die DNA gefällt (siehe Kap. 3.3.1.5).

3.3.6.3 Phosphorylierung linearer DNA-Fragmente

5´-terminale Phosphatgruppen können mit der T4-Polynukleotidkinase (PNK) an einzel- oder doppelsträngige DNA angefügt werden, um sie so für Klonierungen ligieren zu können. Es wurden 1 µg DNA mit 2 µl 10-fach-konzentriertem PNK-Puffer und 2 U T4-PNK versetzt, mit H_2O auf 20 µl aufgefüllt und 45 min bei 37°C inkubiert.

3.3.6.4 Auffüllen von 5´-überhängenden DNA-Fragment-Enden

Das Klenow-Fragment der *E. coli* DNA-Polymerase-I ist in der Lage, 5'-überhängende DNA-Fragment-Enden in Anwesenheit von Desoxyribonukleotiden und Magnesiumionen aufzufüllen und andererseits 3'-überhängende Enden über 3'-5'-Exonuklease-Aktivität abzubauen, so dass glatte DNA-Enden erzeugt werden. Die Reaktion kann in allen herkömmlichen Restriktionspuffern durchgeführt werden. Es wurden 1 µg DNA mit 2 µl 10-fach-konzentriertem Restriktionspuffer, 50 µM dNTPs und 1 U Klenow-Fragment versetzt, mit H_2O auf 20 µl aufgefüllt und 15 min bei RT inkubiert. Das Enzym wurde 15 min bei 75°C inaktiviert und die so behandelten DNA-Fragmente direkt zur Ligation eingesetzt.

3.3.6.5 Ligation von DNA-Fragmenten

Doppelsträngige DNA-Fragmente mit glatten oder kompatiblen, überhängenden Enden wurden mit Hilfe der T4-DNA-Ligase kovalent verknüpft. Es wurden 100 ng linearisierter, dephosphorylierter Vektor mit dem 7-fach molaren Überschuss an zu klonierendem DNA-Fragment, 2 U T4-DNA-Ligase und 2 µl 10-fachem Ligase-Puffer gemischt und mit H_2O auf 20 µl aufgefüllt. Der Ansatz wurde über Nacht bei 16°C im Wasserbad inkubiert und anschließend in die Bakterien transformiert (siehe Kap. 3.2.2).

3.3.7 Gelelektrophorese von Nukleinsäuren

In einem Agarosegel können Nukleinsäuren im elektrischen Feld entsprechend ihrer Größe aufgetrennt, identifiziert und isoliert werden (Sambrook et al., 1989). Die Elektrophorese erfolgte bei konstanter Spannung (5-10 V/cm), was bei den verwendeten Gelkammern einer Spannung von ca. 80-120 V entsprach. Durch Zusatz von Ethidiumbromid, welches in die Nukleinsäuren interkaliert, konnte die DNA oder RNA im UV-Durchlicht bei 254 nm sichtbar gemacht werden und mit einer CCD-Kamera oder einer Digital-Kamera fotografiert werden.

3.3.7.1 Gelelektrophorese von DNA

In der Regel wurden Gele mit 1% Agarose hergestellt und 100 ml in horizontale Gelkammern gegeben. Dazu wurde die TypII-Agarose mit 1x TBE-Puffer (siehe Kap. 2.3) in der Mikrowelle aufgekocht, auf ca. 50°C abgekühlt und in einen Gelträger gegossen und vor Erstarren der Agarose zum Formen von Auftragstaschen ein Kamm eingesetzt. Als Laufpuffer diente 1x TBE mit 0,03 µg/ml Ethidiumbromid. Die Proben wurden 6:1 mit 6-fach-konzentriertem Auftragspuffer für DNA (siehe Kap. 2.3) gemischt, in die Taschen pipettiert und bei einer Spannung von 100 V aufgetrennt. Zur Bestimmung der Fragmentgrößen wurde parallel zu den Proben 1 µl DNA Größenstandard (Kap. 2.1.6) aufgetragen.

3.3.7.2 Denaturierende RNA-Gelelektrophorese

Zur RNA-Analyse wurde ein denaturierendes Gelsystem verwendet, da die meisten RNA-Moleküle häufig Sekundärstrukturen über intramolekulare Basenpaarung ausbilden, wodurch die Migrationsgeschwindigkeit beeinflusst wird.

Alle benötigten Utensilien (Gelkammer, Gelwanne, Kämme etc.) wurden vor der Verwendung mit DEPC-Wasser (Kap. 2.3) gereinigt. 1,2 g TypII-Agarose wurde mit 10 ml 10x MOPS-Puffer (Kap. 2.3) versetzt, auf 100 ml mit DEPC-Wasser aufgefüllt und durch Aufkochen gelöst. Nach dem Abkühlen unter dem Abzug auf 50°C wurde der Lösung 1,8 ml 37% Formaldehyd zugegeben. Bevor die Proben aufgetragen wurden, wurde das polymerisierte Gel für 30 min im RNA-Laufpuffer (Kap. 2.3) äquilibriert und anschließend für 3-5 min eine Spannung von 100 V angelegt. Die RNA-Proben (1 µg) wurden 1:4 mit 5x RNA-Auftragspuffer (Kap. 2.3) gemischt, zur Denaturierung der RNA für 15 min bei 65°C inkubiert und nach dem Abkühlen auf das Gel geladen. Die Elektrophorese erfolgte bei einer konstanten Spannung von 80 V für ca. 2 h.

3.3.7.3 Isolation von DNA aus Agarosegelen

Um DNA-Fragmente nach ihrer gelelektrophoretischen Trennung aus dem Agarosegel zu isolieren, wurden sie unter UV-Licht aus dem Gel ausgeschnitten und eine Elektro-Elution durchgeführt.

Die ausgeschnittenen Gelstücke mit der gewünschten DNA wurden zerkleinert und in die größere Kammer einer, vorher mit gewaschenem und sterilem Dialyseschlauch abgedichteten, Elutionskammer gegeben. Der Elutions-Tank und die –Kammer wurden mit

dem Laufpuffer 1x TBE gefüllt und die Elektro-Elution über Nacht bei 25 V durchgeführt. Anschließend wurde für 5 min der Strom (150 V) umgekehrt, so daß sich die DNA vom Dialyseschlauch ablöst und somit leichter zu isolieren ist. Der überschüssige Puffer wurde mit einer Pipette entfernt und der Puffer mit DNA (ca. 50-100 µl) aus der kleinen Elutionskammer in ein 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt. Daraufhin wurde die Kammer mit 50-100 µl H_2O gewaschen und die Flüssigkeit in das gleiche 1,5 ml Reaktionsgefäß gegeben.

Eine folgende DNA-Fällung (siehe Kap. 3.3.1.5) diente der Konzentration und Aufreinigung der DNA. Die isolierte DNA wurde im Agarosegel auf die richtige Größe getestet.

Alternativ wurde zur Extraktion der DNA das *Jetsorb-Kit* (Genomed) nach Hersteller-Protokoll verwendet. Das Prinzip besteht darin die DNA nach Schmelzen der Agarose unter Hochsalzbedingungen an eine Silikatmatrix (Glasmilch) zu binden, die Verunreinigungen durch mehrmaliges Waschen zu entfernen und anschließend unter Niedrigsalzbedingungen zu eluieren.

Zur direkten Aufreinigung oder nach elektrophoretischer Auftrennung von PCR-Produkten wurde das *GFX™ PCR DNA and Gel Band Purification Kit* (GE Healthcare, ehemalig Amersham) nach Herstellerangaben benutzt.

3.3.8 Einfügen von Mutationen in Ziel-DNA

Die gerichtete *in vitro* Mutagenese ist eine wichtige Technik, um Protein-Struktur-Funktions-Beziehungen zu untersuchen und um Vektor-Modifikationen durchzuführen beziehungsweise gezielte Mutationen, Insertionen oder Deletionen in eine Ziel-DNA einzufügen oder auch rückgängig zu machen.

Die gewünschten Punktmutationen wurden mit dem *QuikChange™ XL site-directed mutagenesis kit* von Stratagene hergestellt, welches darauf basiert, dass das zu mutierende Plasmid zusammen mit zwei komplementären Primern, welche die gewünschte Mutation tragen, in einer PCR-Reaktion eingesetzt werden. Die verwendeten Mutations-Primer werden bei dieser PCR-Reaktion inkorporiert, so dass es zu einer linearen Amplifikation des parentalen Stranges kommt. Im nächsten Schritt wird der gesamte Ansatz mit *Dpn* I, einer Endonuklease, die spezifisch methylierte DNA schneidet (McClelland and Nelson, 1992), selektioniert. Die aus *E. coli* isolierte unmutierte Ziel-DNA ist methyliert und wird

deswegen von *Dpn* I abgebaut, während die neu synthetisierte mutierte DNA keine Methylierung aufweist. Danach wird ein Teil des PCR-Amplifikats in kompetente Zellen transformiert (Kap. 3.2.2.2), in denen das mutierte Plasmid ligiert und amplifiziert wird und nach Präparation (Kap. 3.3.1) für weitere Untersuchungen verwendet werden kann.
Das mitgelieferte Protokoll wurde bis auf die Verlängerung der Extensionszeit auf 3 min/kb Plasmid-Länge in der Mutagenese-PCR befolgt.

3.3.9 Subklonierungen

Die isolierte Plasmid-DNA wurde mit Restriktionsenzymen geschnitten (siehe Kap. 3.3.6.1). Die geschnittenen Plasmide und Vektoren wurden anschließend über eine Gelelektrophorese gereinigt (siehe Kap. 3.3.7), die Insertion und der Vektor aus dem Gel extrahiert (siehe Kap. 3.3.7.3), ligiert (siehe Kap. 3.3.6.5) und daraufhin mittels Elektroporation oder Hitzeschock in *E. coli* transformiert (siehe Kap. 3.2.2). Die richtige Orientierung der eingebauten Insertion wurde gegebenfalls mittels PCR direkt aus Bakterienkolonien überprüft (siehe Kap. 3.3.2). In *E. coli* wurde die Plasmid-DNA amplifiziert, wieder extrahiert und mit anschließender Restriktionsanalyse auf Richtigkeit der Klonierung geprüft.

3.3.9.1 Herstellung des Expressionskonstrukts für humanes Egr-1

Die humane *Egr-1*-DNA wurde durch Restriktion mit *Eco*RI und *Hind*III aus pACCMVpLpASR+ (bereitgestellt von E. Hofer, Universität Wien) in pEGFP-N1 subkloniert und anschließend das 2,3 kb große Insert über die *Eco*RI und *Xho*I Schnittstellen in pcDNA3 ligiert. Das Insert enthält Teile von Exon 1 (246 bp – 577 bp), ein Intron (578 bp – 996 bp) und das zweite Exon bis zum Stop-Kodon (bp 2320), so dass die gesamte kodierende Sequenz vorhanden ist (RefSeq: NW_922784 ; NM_001964.2).

3.3.9.2 Herstellung des Expressionskonstrukts für humanes Egr-2

Die *Egr-2*-cDNA wurde aus pCMV-SPORT6 (IMAGE Klon 6177872, MRC geneservice, Cambridge, UK) durch Restriktion mit *Eco*RI und *Not*I in pcDNA3 subkloniert. Das 2,8 kb große Insert enthält den Bereich 213 bp – 2984 bp der publizierten Egr-2-mRNA (RefSeq: NM_000399.2), welcher den kompletten offenen Leserahmen (339 bp – 1769 bp) und die gesamte 3'-untranslatierte Region umfasst.

3.3.9.3 Herstellung des Expressionskonstrukts für humanes Nab1

Nach Restriktion mit *Eco*RI und *Not*I wurde die humane *Nab1*-cDNA aus pCMV-SPORT6 (IMAGE Klon 5721972, MRC geneservice, Cambridge, UK) in pcDNA3 ligiert. Das Insert hat eine Größe von 1,9 kb und beinhaltet den Bereich 494 bp – 2401 bp der Nab1-mRNA (RefSeq: NM_005966.3), welcher den kompletten offenen Leserahmen (573 bp – 2036 bp) enthält. Durch Sequenzierungen des Nab1-pcDNA3-Konstrukts wurde eine Punktmutation an Position 1826 bp identifiziert, die unter Verwendung des *QuikChange™ XL site-directed mutagenesis kit* von Stratagene (Kap. 3.3.8) mit den Primern Nab1-1826s und Nab1-1826as (Kap. 2.1.5.2) korrigiert wurde.

3.3.9.4 Herstellung von E37K-IRES2-EGFP

Die *Nab2-E37K*-cDNA enthält im Vergleich zur *Nab2-WT*-mRNA (RefSeq: NM_005967.3) an Position 622 bp eine G zu A Punktmutation, welche in einem E zu K Aminosäureaustausch in der NCD1 resultiert (Kumbrink, 2002; siehe auch Kap. 4.2.2). Durch Restriktion mit *Hind*III wurde die *Nab2-E37K*-cDNA aus pcDNA3 ausgeschnitten und die Enden aufgefüllt (Kap. 3.3.6.4). Daraufhin wurde das Fragment in den *Sma*I geschnittenen Vektor pIRES2-EGFP, dessen Enden dephosphoryliert wurden (Kap. 3.3.6.2), subkloniert. Die richtige Orientierung der Insertion wurde mittels PCR mit den Primern CMV forward und Nab2 1AS, durch Bildung eines 649 bp großen Amplifikats, überprüft (Kap. 3.3.2). Durch Restriktion mit *Bam*HI und *Eco*RI kann die 1,7 kb große Insertion aus E37K-IRES2-EGFP ausgeschnitten werden.

3.3.10 Klonierung der humanen *Egr-3*-cDNA

Um die humane *Egr-3*-cDNA zu klonieren, wurde die Gesamt-RNA aus für 3 h mit PMA stimulierten Mel 888 Zellen isoliert (Kap. 3.3.1.6), mittels RT-PCR in cDNA umgeschrieben (Kap. 3.3.3), über spezifische Primer amplifiziert und anschließend in den Vektor pcDNA3 kloniert (Kap. 3.3.9).

Zum Umschreiben von 1 µg RNA in cDNA wurde ein *Egr-3*-spezifischer Primer (Egr-3 as3, Tab. 3.7), der 5’ eine *Eco*RI-Schnittstelle und einen 3 Nukleotide großen Überhang zum Ansetzen der Restriktionsendonuklease enthält, eingesetzt. Die Funktionalität der reveresen Transkription wurde mittels des Standard-PCR-Ansatzes für Egr-3 (Kap. 3.3.2) überprüft.

Die Amplifikation des gesamten für *Egr-3* kodierenden Bereichs wurde mit oben erwähntem Primer Egr-3 as3 und Egr-3 s2, welcher eine *Bam*HI-Schnittstelle enthält (Tab. 3.7), unter Verwendung der *Pfu*-Polymerase (Fermentas), die durch ihre 3'→5' Exonukleaseaktivität eine Korrekturlesefähigkeit („*proofreading activity*") und dementsprechend eine geringere Fehlerrate als die *Taq*-Polymerase aufweist, erreicht. Die verwendeten Bedingungen zur Amplifikation des 1416 bp großen PCR-Produkts sind in Tab. 3.8 angegeben.

Primer	Position in *Egr-3*-Sequenz (RefSeq: NM_004430.2)	Sequenz
Egr-3 as3	1647-1667	*Eco*RI Egr-3-spezifisch ATA GAATTC GCATCGAAGGGGAAGCAAGGG
Egr-3 s2	251-270	*Bam*HI Egr-3-spezifisch ATA GGATCC CCCCTGCACCACGGATCGCC

Tab. 3.7 Zur Amplifikation und reversen Transkription der *Egr-3*-cDNA verwendete Primer.

Reaktionsansatz : 20 µl	PCR-Bedingungen:			
1 µl cDNA (1:5 verdünnt) 1x *Pfu*-Puffer mit $MgSO_4$ (25 mM) 10 pmol Primer Egr-3 as3 10 pmol Primer Egr-3 s2 100 µM/dNTP 0,75 U *Pfu*-DNA-Polymerase	Schritt	Temp.	Dauer	Zyklen
	Denaturierung	95°C	5 min	1
	Denaturierung Primer-Anlagerung Extension	95°C 62°C 72°C	35 sek 35 sek 2 min	30
	Extension	72°C	5 min	1

Tab. 3.8 Verwendeter Reaktionsansatz und die gewählten PCR-Bedingungen zur Amplifikation der *Egr-3*-cDNA.

Da für die Klonierung der *Egr-3*-cDNA größere Mengen benötigt wurden, wurden 15 Reaktionsansätze verwendet. Die gesamte Probe wurde anschließend gefällt und mit *Eco*RI und *Bam*HI in 2x Tango-Restriktionspuffer (Fermentas) restringiert. Nach Aufreinigung durch eine Gelektrophorese wurde die *Egr-3*-cDNA in den mit *Eco*RI und *Bam*HI geschnittenen Vektor pcDNA3 ligiert. Die *Egr-3*-Sequenz in pcDNA3 wurde unter Verwendung der Primer CMV forward und Sp6 über Sequenzierungen durch die Eurofins Medigenomix GmbH (Martiensried) validiert.

3.3.11 Sequenzierung der genomischen *Nab2*-DNA

Um Exon 1 und Teile von Exon 2 des *Nab2*-Gens, welche für die NCD1 und die flankierenden Regionen kodieren (siehe auch Abb. 4.23), in verschiedenen Zelllinien zu sequenzieren, wurde die genomische DNA dieser Zellen präpariert (Kap. 3.3.1.3), die entsprechenden Bereiche mittels PCR amplifiziert und anschließend die Amplifikate sequenziert.

Da es z.B. für Klonierungen und Sequenzierungen wichtig ist sequenzexakte DNA-Amplifikate zu erhalten, wurde abweichend zur Standard-PCR die *Pfu*-Polymerase (Fermentas) verwendet (siehe auch Kap. 3.3.10). Zusätzlich wurden bei den PCR-Reaktionen mit genomischer DNA längere Primer (22-24 bp) als z.B. zur Amplifikation von Plasmid-DNA (16-20 bp) benötigt. Da bei der Amplifikation von genomischer DNA die Spezifität der Primer besonders wichtig ist, wurden beim Auswählen der Primer signifikante Sequenzhomologien zu humanen Genen mittels der *BLAST*®-Onlinesuche (Kap. 3.6.1) und die Bildung von Haarnadelstrukturen und Dimeren über die *Generunner*-Software (Kap. 3.6.1) ausgeschlossen. Ein weiterer kritischer Aspekt war die als Matrize eingesetzte Menge an genomischer DNA. Die optimale DNA-Menge musste für jede Zelllinie, jede DNA-Präparation und jedes Primerpaar über eine Verdünnungsreihe (1:10, 1:20, 1:50, 1:100) bestimmt werden, da beispielsweise zu große eingesetzte Mengen die Effizienz oder/und die Spezifität der PCR-Reaktion stark beeinträchtigen können.

Die für die PCR und Sequenzierung des *Nab2*-Gens verwendeten Primer, Primer-Anlagerungstemperaturen, Bindungspositionen und Amplifikatgrößen sind in Tab. 3.9 angegeben. Die Primersequenzen sind in Tab. 2.1.5.2 gezeigt.

Primer	Bindungsposition in der genomischen Nab2-Sequenz (RefSeq: AF268380)	Amplifikatgröße	Primer-Anlagerungstemperatur
madex1start-lo madex1end-lo	1651-1672 1932-1953	303 bp	56°C
madex1start (Sequenzierprimer)	1666-1680		
madex2start-lo madex2-400-rev-lo	3671-3694 4079-4100	430 bp	58°C
madex2start-seq (Sequenzierprimer)	3677-3694		

Tab. 3.9 Zur Amplifikation und Sequenzierung der genomischen *Nab2*-DNA verwendete Primer.

Folgender Reaktionsansatz wurde unter den angegebenen PCR-Bedingungen verwendet.

Reaktionsansatz :	PCR-Bedingungen:			
1-2 µl DNA (DNA-Menge austesten) 1x *Pfu*-Puffer mit $MgSO_4$ (25 mM) 10 pmol Primer Egr-3 as3 10 pmol Primer Egr-3 s2 100 µM/dNTP 0,75 U *Pfu*-DNA-Polymerase	Schritt	Temp.	Dauer	Zyklen
	Denaturierung	95°C	5 min	1
	Denaturierung Primer-Anlagerung Extension	95°C s.o. 72°C	35 sek 1 min 1:40 min	30
	Extension	72°C	5 min	1

Tab. 3.10 Verwendeter Reaktionsansatz und die gewählten PCR-Bedingungen zur Amplifikation der genomischen *Nab2*-DNA.

Da für die Sequenzierung von PCR-Produkten mindestens 10 ng pro 100 bp benötigt wurden, wurden 100 µl Reaktionsansätze verwendet. Die Funktionalität der PCR-Reaktion wurde durch Gelektrophorese von 5 µl des Ansatzes bestimmt. Die gesamten Proben wurden daraufhin abhängig von der Reinheit entweder direkt oder nach weiterer Aufreinigung durch eine Gelektrophorese mit anschließendem Ausschneiden des gewünschten Amplifikats mit dem *GFX™ PCR DNA and Gel Band Purification Kit* (GE Healthcare, ehemalig Amersham) aufgereinigt (Kap. 3.3.7.3). Die Sequenzierung der PCR-Produkte erfolgte mit den Primern madex1start und madex2start-seq (Tab. 2.1.5.2) durch die Eurofins Medigenomix GmbH (Martiensried). Die Sequenzierergebnisse wurden ebenfalls manuell mittels der Software *Chromas* (Kap. 3.6.1) abgeglichen.

3.4 Proteinbiochemische Methoden

3.4.1 Western-Analyse

3.4.1.1 Zellaufschluss von Mammalia-Zelllinien

Ca. $6x10^5$ Zellen wurden abzentrifugiert, einmal mit PBS gewaschen und mit 100 µl Mammalia-Lysepuffer, der eine Mischung aus Proteaseinhibitoren enthielt (siehe Kap. 2.3), versetzt. Alle weiteren Schritte wurden auf Eis durchgeführt. Die Zellen wurden 15 s mit dem *Branson Sonifier* mit der Mikroultraschallspitze auf Intensitätsstufe 4 und 40%igem Zyklus lysiert, wodurch auch die DNA geschert wurde. Es wurde 30 min auf Eis

inkubiert, für 10 min die unlöslichen Bestandteile bei 1500 *g* und 4°C abzentrifugiert und der klare Überstand abgenommen.

3.4.1.2 Messung der Proteinkonzentration

Die Messung der Proteinkonzentration beruht auf der Methode von Lowry et al. (1951). Im alkalischen Milieu bildet sich hierbei ein Komplex aus Cu^{2+} und den freien Elektronenpaaren der Stickstoffatome in den Peptidbindungen der Proteine. Dadurch wird das Cu^{2+} zu Cu^{+} reduziert, das wiederum die Heteropolysäure $H_3[PMo_{12}O_{40}]$ im Folin-Reagenz zu tiefblauem kolloidalem Molybdän reduziert. Die Absorption dieser Lösung ist bei 750 nm proportional zur Proteinmenge.

Die Lowry-Proteinbestimmung wurde mit dem *DC-Protein Assay Kit* durchgeführt. Es wurden 10 µl Zelllysat in 40 µl H_2O verdünnt und mit 125 µl der mitgelieferten Lösung-A (alkalische Kupfersulfatlösung) und 2,5 µl 1% SDS-Lösung versetzt. Nach Zugabe von 1 ml Lösung-B (Folin-Reagenz) und anschließender Inkubation für 15 min bei RT wurde die Absorption bei 750 nm im Fotometer gemessen. Als Standard diente Rinderserumalbumin mit bekannter Konzentration (1 mg/ml).

3.4.1.3 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese von Proteinen (SDS-PAGE)

Die elektrophoretische Auftrennung von denaturierten Proteinen erfolgte durch vertikale, diskontinuierliche SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (nach Laemmli, 1970). Durch die Beladung der Proteine mit dem Detergenz Natriumdodecylsulfat (SDS) erhalten sie eine negative Ladung und wandern weitgehend unabhängig von der Eigenladung im elektrischen Feld zur Anode, wodurch eine Auftrennung nach Molekulargewicht stattfindet.

Es wurden Gele mit Glasplatten (22 cm x 17 cm) und einem Abstandhalter von 1,5 mm verwendet. Die Trenngele enthielten 10% (m/v) Acrylamid, 0,3% (m/v) Bisacrylamid, 0,1% (m/v) SDS, 0,1% (v/v) TEMED, 0,03% (m/v) APS und 375 mM Tris-HCl pH 8,8. Nach der Polymerisation (ca. 1 h) wurden die Trenngele mit Sammelgel überschichtet, das aus 3% (m/v) Acrylamid, 0,08% (m/v) Bisacrylamid, 0,1% (m/v) SDS, 0,1% (v/v) TEMED, 0,05% (m/v) APS und 125 mM Tris-HCl pH 6,8 besteht. Die Auftragstaschen wurden durch einen Kamm geformt, der nach vollständiger Polymerisierung des Sammelgels entfernt wurde. Pro Geltasche wurde in der Regel 80 µg Protein aufgetragen (max. 120 µl), das zuvor mit Autragspuffer für Protein (siehe Kap. 2.3) für 5 min bei 95°C

erhitzt wurde. Zur Bestimmung der Proteingrößen wurde ein Molekulargewichtsstandard verwendet (Kap. 2.1.6). Die Elektrophorese erfolgte bei 80 V und RT für 16 h mit dem Laufpuffer für SDS-PAGE (siehe Kap. 2.3). Anschließend wurden die Proteine mittels Westerntransfer (siehe Kap. 3.4.1.4) auf eine Nitrozellulosemembran übertragen.

3.4.1.4 Übertragung der Proteine auf eine Nitrozellulosemembran

Um Proteine nach ihrer elektrophoretischen Auftrennung immunologisch durch Antikörper nachweisen zu können, wurden sie auf Nitrozellulosemembranen transferiert (Towbin *et al.*, 1979). Dazu wurde die *Trans-Blot*^{TM}*Cell* Nassblot-Apparatur verwendet. Schwämme, Filterpapiere und die Nitrozellulosemembran *BA85* wurden 10 min in Blottingpuffer (siehe Kap. 2.3) getränkt. Im „Sandwich-Verfahren“ wurde zwischen die Halterung ein Schwamm, ein Filterpapier, das Acrylamidgel, die Nitrozellulosemembran, ein weiteres Filterpapier und ein zweiter Schwamm gelegt. Das „Sandwich“ wurde so in die Apparatur eingeklemmt, dass sich die Nitrozellulosemembran auf der zur Anode gewandten Seite des Acrylamidgels befand. Nach dem Auffüllen der Apparatur mit Blottingpuffer erfolgte der Transfer für 1,5 h bei 50 V, 1,5 A unter Wasserkühlung. Anschließend wurde die Rückseite der Nitrozellulosemembran markiert und in PBS gewaschen.

3.4.1.5 Immundetektion von Proteinen auf Nitrozellulosemembranen

Die Proteine sollten nach ihrem Transfer auf Nitrozellulosemembranen durch Antikörper (Ak) detektiert werden. Zunächst wurden die unspezifischen Bindestellen auf der Membran durch eine einstündige Inkubation in 5% Magermilch-PBS abgeblockt. Anschließend wurde die Nitrozellulosemembran für 1 h mit dem ersten Ak bei RT inkubiert. Dazu wurde der Ak (für die Verdünnungen der Ak siehe Kap. 2.1.4) dünn auf eine in einer feuchten Färbekammer, horizontal liegende Glasplatte aufgetragen. Die Membran wurde darauf luftblasenfrei mit der Antigenseite nach unten plaziert. Nach dreimaligem Waschen für je 10 min mit 0,1% Tween-PBS auf einem Schüttler, erfolgte die Inkubation mit dem zweiten, Peroxidase-gekoppelten Antikörper (siehe Kap. 2.1.3) wie für den ersten Ak beschrieben. Die Membran wurde dreimal mit 0,1% Tween-PBS gewaschen und anschließend zur Detektion für 5 min in der Chemolumineszenz-Substratlösung (Biorad, Kap. 2.1.9), die durch Mischen von 1 ml Lösung-1 (Luminol) mit 1 ml Lösung-2 (Wasserstoffperoxidlösung) hergestellt wurde, geschwenkt.

Die Chemolumineszenzreaktion wird durch die an den zweiten Ak gekoppelte Meerrettichperoxidase ausgelöst. Dabei wird das Luminol oxidiert und geht in einen angeregten Zustand über. Beim Übergang in den Grundzustand wird Energie in Form von Licht frei, die durch Schwärzung eines Röntgenfilms detektiert wurde. Die Belichtungszeiten betrugen je nach Signalstärke zwischen 30 s und 20 min

3.4.1.6 Entfernung von Immunkomplexen von Nitrozellulosemembranen

Um dieselbe Membran mit anderen Antikörpern inkubieren zu können, mußten die ersten Immunkomplexe wieder entfernt werden (*stripping*). Dies wurde z.B. durchgeführt, wenn die Membran zur Kontrolle eines gleichmäßigen Proteinauftrages mit Anti-β-Aktin detektiert werden sollte. Dazu wurde die Membran nach der Chemolumineszenzdetekion zweimal kurz in 0,1% Tween-PBS gewaschen und anschließend zweimal für je 20 min mit *Stripping*-Puffer (siehe Kap. 2.3) auf dem Schüttler inkubiert. Nach dreimaligem Waschen mit PBS konnte die Nitrozellulosemembran mit einem anderen Antikörper wie unter Kap. 3.4.1.5 beschrieben inkubiert werden.

3.4.2 Gelretardationsanalyse (Elektromobilitätsshift-Analyse (EMSA))

Die Gelretardationsanalyse dient zum Nachweis der Bindung von Proteinen, wie z.B. Transkriptionsfaktoren, an DNA bekannter Sequenz. Das Prinzip dieser Methode beruht darauf, dass Protein-DNA-Komplexe in der Gelektrophorese langsamer laufen als freie DNA, also retardiert werden. Hierzu werden Oligonukleotide, welche beispielsweise einer regulatorischen Sequenz eines Promotors entsprechen, radioaktiv markiert, mit Kernextraktproteinen inkubiert und anschließend die gebildeten Komplexe mittels Gelelektrophorese aufgetrennt und autoradiographisch dargestellt. An DNA gebundene Proteine können durch Präinkubation mit unmarkierten kompetitiven Konsensus-Oligonukleotiden oder spezifischen Antikörpern identifiziert werden.

3.4.2.1 Präparation von Kernextrakten

Die Herstellung von Kernextrakten erfolgte nach einer modifizierten Methode von Schreiber et al. und basiert auf dem Prinzip der Hochsalzextraktion (Schreiber et al., 1989). Alle Arbeiten wurden auf Eis mit gekühlten Puffern, Pipetten und Gefäßen durchgeführt. Etwa 5 x 10^7 Zellen wurden in der Kulturflasche auf Eis dreimal mit eiskaltem PBS vorsichtig gewaschen und für 10 min mit ca. 10 ml eiskaltem Puffer A (siehe Kap. 2.3) bedeckt, wodurch eine osmotisch bedingte Vergrößerung der Zellen, aber keine Lyse

erreicht wird. Anschließend wurden die Zellen mit 3 ml Puffer A + NP40 (siehe Kap. 2.3) bedeckt, nach 1 min behutsam abgeschabt und nach mehrfachem Spülen der Flasche sowie Auf- und Abpipettieren (P1000) das gesamte Lysat in einem 15 ml Röhrchen für 5 min bei 4°C und 795 g zentrifugiert. Der aus zytoplasmatischen Proteinen bestehende Überstand wurde verworfen, das Sediment in 750 µl – 1 ml eiskaltem Puffer C (siehe Kap. 2.3) durch Auf- und Abpipettieren resuspendiert, in ein vorgekühltes 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt und bei 4°C und 795 g für 5 min zentrifugiert. Nach Resuspension des Sediments in 100 – 300 µl Puffer C wurde das genaue Gesamtvolumen ermittelt und die Salzkonzentration mit 5 M NaCl auf 0,4 M NaCl eingestellt. Die Hochsalzextraktion der Kernproteine erfolgte durch eine 30 minütige Inkubation auf Eis und anschließender Zentrifugation für 15 min bei 4°C und 15600 g. Der Überstand, welcher die Kernproteine enthält, wurde aliquotiert (15-20 µl) und bei –80°C gelagert. Die Proteinmenge der Extrakte wurde wie in Kap. 3.1.5.2 beschrieben bestimmt.

3.4.2.2 Zusammenlagerung der Oligonukleotide

Sehr viele Transkriptionfaktoren binden nur an doppelsträngige DNA. Deswegen ist es notwendig die zueinander komplementären Oligonukleotide in äquimolaren Mengen aneinander binden zu lassen. Von jedem Oligonukleotid (1 µg/µl) wurden 2 µl mit 0,4 M NaCl in einem Volumen von 20 µl für 10 min bei 95°C erhitzt, über Nacht bei einer Temperatur etwa 5-10°C unter der Schmelztemperatur des Oligonukleotids im Wasserbad inkubiert und anschließend langsam auf RT abgekühlt. Die Oligopaare wurden bei –20°C aufbewahrt und bei Bedarf auf Eis aufgetaut. In allen Gelretardationsanalysen kamen ausschließlich doppelsträngige Oligonukleotide zum Einsatz.

3.4.2.3 Markierung der Oligonukleotide mit der Polynukleotid-Kinase

Mit Hilfe der T4-Polynukleotid-Kinase können Oligonukleotide mit glatten Enden endmarkiert werden. Das Enzym katalysiert den Transfer einer Phosphatgruppe von der γ-Position eines ATP auf das 5'-Hydroxylende von Polynukleotiden. 200 ng der doppelsträngigen Oligonukleotide wurden zur radioaktiven Markierung mit 3 µl T4-PNK-Puffer (Polynukleotid-Kinase-Puffer), 3 µl T4-Polynukleotid-Kinase (New England Biolabs, 10 U/µl) und 5 µl γ-^{32}P-dATP (6000 Ci/mMol) in einem Endvolumen von 30 µl für 1 h bei 37°C inkubiert. Um die Phosphataseaktivität des Enzyms zu unterbinden, wurde der Reaktionsansatz anschließend sofort auf Eis gestellt und die Reaktion mit 1 x STE-

Puffer (siehe Kap. 2.3) gestoppt. Freies, nicht eingebautes γ-^{32}P-dATP wurde mittels einer „NucTrap Probe Purification Column“ (Stratagene) nach Herstellerangaben entfernt. Zur Ermittlung der Einbaueffizienz bei der *in vitro*-Markierung der Oligonukleotide mit γ-^{32}P-dATP wurde die Aktivität eines Aliquots der Probe im Beta-Szintillationszähler (Beckmann) gemessen.

3.4.2.4 Native Polyacrylamid-Gelektrophorese

Zur elektrophoretischen Auftrennung von DNA-Proteinkomplexen wurde eine native kontinuierliche Polyacrylamid-Gelelektrophorese durchgeführt, wodurch die Komplexe nach Molekulargewicht und, da zur Beibehaltung der Protein-DNA-Interaktionen kein SDS verwendet wurde, nach Ladung aufgetrennt wurden.

Es wurden Gele mit Glasplatten (20 cm x 17 cm) und einem Abstandhalter von 1,5 mm verwendet. Die Gele enthielten 4% (m/v) Acrylamid, 0,1% (m/v) Bisacrylamid, 0,1% (v/v) TEMED, 0,03% (m/v) APS und 0,5x TBE. Die Proben wurden vor dem Auftragen auf das polymerisierte Gel mit 5 µl EMSA-Auftragspuffer (siehe Kap. 2.3) versetzt. Als Laufpuffer diente 0,5x TBE und die Laufzeit betrug bei 100 V etwa 3 h. Nach dem Trocknen des Gels (auf Whatman-Papier) in einem Vakuumtrockner für ca. 1,5 h wurde das Gel über Nacht bei –80°C einem Röntgenfilm (x-ray 90) exponiert.

3.4.2.5 Bindungsreaktionen

Die Kernextrakte (12 µg) wurden für 45 min auf Eis mit dem 30.000 cpm γ-^{32}P-dATP-markierten Oligonukleotid in einem Endvolumen von 15 µl mit EMSA-Bindungspuffer (Kap. 2.3) inkubiert.

Um Hinweise auf Transkriptionfaktoren, die an den markierten Oligonukleotiden binden können, zu erhalten, wurden Kompetitionsexperimente mit unmarkierten Oligonukleotiden durchgeführt, welche die bekannte Konsensus-Bindungssequenz bzw. die mutierte Konsensus-Sequenz der Faktoren widerspiegelten. Dazu wurde der Bindungsansatz vor Zugabe des markierten Oligonukleotids mit 40 ng der Kompetitions-Oligonukleotide (Santa Cruz) für 30 min auf Eis präinkubiert.

Um die Zusammensetzung der retardierten Protein-DNA-Komplexe eindeutig zu bestimmen, können Antikörper eingesetzt werden, die spezifisch an das Protein binden. Diese Bindung erhöht entweder das Molekulargewicht des Protein-DNA-Komplexes, wodurch die Mobilität in der Gelelektrophorese verringert wird und es zu einer

Superretardierung kommt, oder verhindert die Bildung des Protein-DNA-Komplexes beispielsweise durch Blockierung der DNA-Bindedomäne des Transkriptionsfaktors. Zur Identifizierung der gebundenen Faktoren wurde der Bindungsansatz vor Zugabe des markierten Oligonukleotids für 30 min mit 2 µg der spezifischen Antikörper (Santa Cruz) oder dem Kontrollserum (DAKO) für 30 min auf Eis präinkubiert. Die Vorbehandlung mit dem Egr-1-Ak erfolgte bei RT.

3.5 Immunologische Methoden zum Antigen-Nachweis

3.5.1 Herstellung von Gewebeschnitten und Zytospinpräparaten

Die verwendeten Gewebe wurden direkt nach Entfernung in Stickstoff schockgefroren und bei –80°C gelagert. Serielle Gefrierschnitte von verschiedenen humanen Gewebe, wurden in einer Dicke von 5 - 10 µm unter Verwendung eines Kryostaten (Frigocut 2800 E, Jung) angefertigt und auf Objektträger gezogen.

Zur Herstellung von Zytospins wurden die Zellen abgelöst, einmal mit PBS gewaschen, gezählt und die Zellsuspension mit PBS auf 5 x 10^5 Zellen/ml eingestellt. 100 µl der Zellsuspension wurden bei 500 g für 5 min mit einer Zytozentrifuge 2 (Shandon Southern) auf Objektträger zentrifugiert.

Gewebeschnitte und Zytospins wurden anschließend über Nacht bei RT getrocknet und daraufhin entweder direkt für immunhistochemische Färbungen verwendet oder bei –80°C gelagert.

3.5.2 Immunhistochemie

Gewebeschnitte oder Zytospinpräparate wurden nach Lagerung bei -80°C zuerst 30 min bei 37°C getrocknet und für 5 min in 100% Azeton fixiert. Das Gewebe bzw. die Zellen wurden mit einem Fettstift umrandet, damit die Antikörper (Ak) nicht verliefen. Alle weiteren Arbeiten wurden in einer feuchten Färbekammer durchgeführt. Nach einer 1 stündigen Inkubation mit 30 µl des ersten Antikörpers (siehe Kap. 2.1.4 für die Verdünnungen) wurde überschüssiger Ak durch dreimaliges Waschen in einer Färbeküvette mit PBS entfernt. Mit 30 µl des zweiten Peroxidase-gekoppelten Antikörpers (1:100 Verdünnung) wurde für 45 min inkubiert und anschließend erneut dreimal mit PBS gewaschen. Die Färbung erfolgte für 5-20 min mit Carbazol-Lösung (siehe Kap. 2.3) in einer Färbeküvette bei 37°C im Wasserbad. Anschließend wurde dreimal mit H_2O

gewaschen und 1 min mit Hämatoxylin-Lösung gegengefärbt. Die Schnitte wurden getrocknet, mit *Kaisers*-Glyzeringelatine eingedeckelt und im Dunkeln aufbewahrt. Die lichtmikroskopische Auswertung der gefärbten Gewebeschnitte wurde fotografisch dokumentiert. Dadurch, dass von den Geweben serielle Schnitte angefertigt wurden, konnten die Serien mit verschiedenen ersten Antikörpern inkubiert werden, um die einzelnen Zellpopulationen zu lokalisieren. Alle melanozytären Läsionen wurden mit einem Anti-Proteoglykan-AK inkubiert, der sowohl Nävi als auch Melanome, nicht aber epidermale Melanozyten anfärbte. Dieses Färbemuster wurde sowohl mit dem des Anti-Egr-2 (Covance) und Anti-Egr-3 (Santa-Cruz) als auch mit der Färbung von Lymphozyten mit dem Anti-CD45-AK GAP 8.3 (siehe Kap. 2.1.4) verglichen. Zusätzlich wurden Isotypkontrollen verwendet, die gegen nicht auf dem Gewebe vorhandene Epitope gerichtet waren, aber den gleichen Isotyp wie die verwendeten Antikörper besaßen. Mit der Isotypkontrolle kann die unspezifische Bindung unter anderem an Fc-Rezeptoren nachgewiesen und gegebenenfalls blockiert werden.

3.5.3 Immunfluoreszenz

Mit Hilfe der Immunfluoreszenz können Oberflächen-, zytoplasmatische und nukleäre Antigene durch Bindung eines spezifischen Antikörpers und dessen Detektion mit Hilfe eines fluoreszenzmarkierten zweiten Antikörpers nachgewiesen werden (indirekte Immunfluoreszenz). Wichtig ist bei der Oberflächenimmunfluoreszenz von lebenden Zellen die Verwendung von 0,1% NaN_3 in den Lösungen, um die Internalisierung und Polarisation der Antigene (*Capping*) zu vermeiden.

3.5.3.1 Intrazelluläre Immunfluoreszenz

Um Antigene im Nukleus nachweisen zu können, müssen die Zell- und Kernmembran permeabilisiert werden, damit die Antikörper eindringen können. Dazu wurden 10^5 Zellen einmal in PBS gewaschen und für 1 h im Dunkeln bei RT mit 500 µl 0,25% Paraformaldehyd/PBS fixiert. Nach einmaligem Waschen mit PBS wurde die Zell- und Kernmembran durch eine 1 stündige Inkubation mit 1 ml 70% MeOH (-20°C)/PBS bei 4°C im Dunkeln permeabilisiert. Anschließend wurden die Zellen zweimal in 0,5 ml 0,05% Triton-X100/PBS resupendiert, für 10 min bei RT inkubiert und bei 4°C und 795 g für 5 min zentrifugiert. Daraufhin erfolgte die Inkubation mit 100 µl des ersten AK (siehe Kap. 2.1.4) für 16 h bei 4°C. Nach zweimaligem, wie oben beschriebenem, Waschen mit 10% BSA/PBS/0,05% Triton-X100 wurden 100 µl des zweiten AK (Kaninchen-Anti-Maus

FITC-konjugiert; siehe Kap. 2.1.3) zu den Zellen gegeben und für 2 h bei RT im Dunkeln inkubiert. Die Zellen wurden, nach erneutem Waschen mit 10% BSA/PBS/0,05% Triton-X100, in 250 µl 1%iger Paraformaldehydlösung aufgenommen und bei 4°C im Dunkeln aufbewahrt. Die Auswertung erfolgte fluoreszenzmikroskopisch (siehe Kap. 3.5.3.2) oder mittels FACS-Analyse (siehe Kap. 3.5.3.3).

Zur intrazellulären Nab2-Färbung wurde als erster AK (siehe Kap. 2.1.4) der monoklonale Nab2-1C4-AK, sowie als Isotypkontrolle für Melanomzellen der FR4H12-AK (gegen ein Kolonkarzinom-Antigen gerichtet) und für Kolonkarzinomzellen der MUC18-BA4-AK verwendet.

3.5.3.2 Auswertung im Fluoreszenzmikroskop

10 µl der gefärbten Zellen wurden auf einen Objektträger getropft, mit einem Deckglas abgedeckt und unter einem Fluoreszenzmikroskop bei 495 nm betrachtet. Verglichen wurde die Färbeintensität des spezifischen Antikörpers mit der der Isotypkontrolle.

3.5.3.3 Auswertung im FACScan

Zur Quantifizierung der Immunfluoreszenz wurden jeweils 10.000 Einzelzellen, die mit der Kernimmunfluoreszenz gefärbt wurden, im *FACScan* gemessen und mit der *CellQuest*^{TM}-Software Version 3.1f (Becton Dickinson) ausgewertet. Die Zellen wurden im Histogramm auf Fluoreszenzintensität und auf einheitliche morphologische Parameter im „*dot-plot*“ untersucht. Zur Beschreibung der Expressionsstärke wurde der *delta mean channel* ermittelt. Er ergibt sich aus der Differenz des *mean channels* (Mittelwert der Fluoreszenzintensität) der Probe mit spezifischem Antikörper und dem *mean channel* der Isotypkontrolle.

3.6 Computeranalysen

3.6.1 Bearbeitung und Analyse von DNA- und Protein-Sequenzen

Zur Analyse von Sequenzhomologien wurde eine *BLAST*®-Suche (Basic Local Alignment Search Tool) am *NCBI*, in Bethesda, USA durchgeführt (http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST) (Altschul et al., 1990).

Um Sequenzen zu vergleichen, wurden das Programm *ALIGN* der *European Bioinformatics Institute (EBI) toolbox* (http://www.ebi.ac.uk/Tools/index.html) verwendet.

Außerdem wurde das Programm *CpG Plot/CpGreport* zum Auffinden CpG-reicher genomischer Sequenzen (CpG-Inseln) benutzt. Die *EBI toolbox* enthält weitere Programme, die zur DNA-Analyse, aber auch Protein-Analyse in Anspruch genommen werden können.

Die 5'-Regionen verschiedener Gene wurden mit der *Genomatix*-Software (http://www.genomatix.de) auf Promotoren (*PromotorInspector*) und putative Transkriptionsfaktor-Bindestellen (*MatInspector Professional*, Version 7.4.8.2) untersucht (Cartharius et al., 2005; Quandt et al., 1995). Über die *Gene2Promotor*-Software konnten evolutionär konservierte putative Transkriptionsfaktor-Bindestellen in Nab2-Promotoren verschiedener Spezies analysiert werden.

Die Vorhersage von funktionellen Protein-Interaktions-Motiven wurde mit der auf dem ELM server (*Eukaryotic Linear Motiv* resource) http://elm.eu.org/ bereitgestellten Software (ELM database Mai 2007) (Puntervoll et al., 2003) und der Phosida (*phosphorylation site database*, http://www.phosida.com/) durchgeführt.

Um Proteinsequenzen miteinander zu vergleichen und nach Sequenzhomologien zu suchen, wurde das *Fasta3* Programm vom *EBI* (http://www.ebi.ac.uk/fasta33) verwendet.

Mit der Software *Generunner* Version 3.05 (Hastings Software) wurden DNA- und Aminosäure-Sequenzen bearbeitet, Restriktionsfragmentgrößen sowie der offene Leserahmen von mRNAs bestimmt und Oligonukleotide entworfen.

Zur manuellen Auswertung von nach Sequenzierung erhaltenen Elektropherogrammen wurde das Programm *Chromas* Version 2.3 (Technelysium) verwendet.

3.6.2 Densitometrische Analysen

Die densitometrischen Auswertungen von Elektrophoresegelen und Röntgenfilmen erfolgten mit dem Programm Sigma Gel (SPSS Science). Zur Bestimmung der Bandenintensitäten wurde der Schwärzegrad in einem Quadrat („Spots", siehe Sigma Gel) bestimmt, dessen Seitenlänge der breitesten Bande des jeweiligen Gels/Films entsprach. Da bei dieser Variante auch Bereiche oberhalb und unterhalb der Bande mitgemessen werden, wurde an drei verschiedenen Stellen, die keine Banden aufwiesen, der Hintergrund des Gels/Films bei gleicher Quadratgröße gemessen, der Hintergrund-Mittelwert berechnet und von den spezifischen Bandenintensitäten subtrahiert.

4 Ergebnisse

Im Gegensatz zu anderen Tumoren wird Nab2 im Melanom konstitutiv stark exprimiert (Kirsch et al., 1996) und ist als Bindungspartner und Regulator der Transkriptionsfaktoren Egr-1, Egr-2 und Egr-3 beschrieben (Svaren et al., 1998, weitere). Die Repression der Egr-Aktivität erfolgt durch Bindung der NCD1 von Nab2 an die R1-Domäne der Egr-Moleküle, wodurch die Aktivität der Zielpromotoren von Egr-1, Egr-2 und Egr-3 beeinflusst wird. Die NCD1 vermittelt nicht nur die Bindung an die Transkriptionsfaktoren der Egr-Familie, sondern auch die Multimerisation der Nab2-Moleküle.

4.1 Regulation der Nab2-Expression

Um die Ursachen der konstitutiv starken Nab2-Expression zu bestimmen, sollte die Regulation der Nab2-Expression untersucht und eventuelle Unterschiede im Melanom im Vergleich zu anderen Tumoren und Geweben aufgedeckt werden.

4.1.1 Expression des Nab2-Proteins in Melanom- und Karzinom-Zelllinien

Um die Melanomassoziation der Nab2-Expression in Zelllinien zu zeigen, wurden fünf verschiedene Melanomzelllinien (Mel 888, Mel Ei, Mel Wei, SK-MEL-25 und Mel JuSo) sowie zwei Kolonkarzinomzelllinien (Colo 320 DM und LoVo) und eine Magenkarzinomzelllinie (AGS) mittels intrazellulärer Immunfluoreszenz (siehe Kap. 3.5.3.1) getestet und anschließend in der Durchflusszytometrie (siehe Kap. 3.5.3.3) analysiert. Wie in Abb. 4.1 erkennbar ist, zeigte der Nab2-AK (rote Kurve) in allen Melanomzellen eine starke Bindung gegenüber den Isotypkontrollen (schwarze Kurve) mit *delta mean channel* Werten von 120 bis 155, während in den Kolonkarzinomzellen und der Magenkarzinomzelllinie keine signifikante Bindung nachgewiesen werden konnte. Die mikroskopische Auswertung zeigte, dass die Nab2-Expression weitgehend auf den Zellkern beschränkt ist.

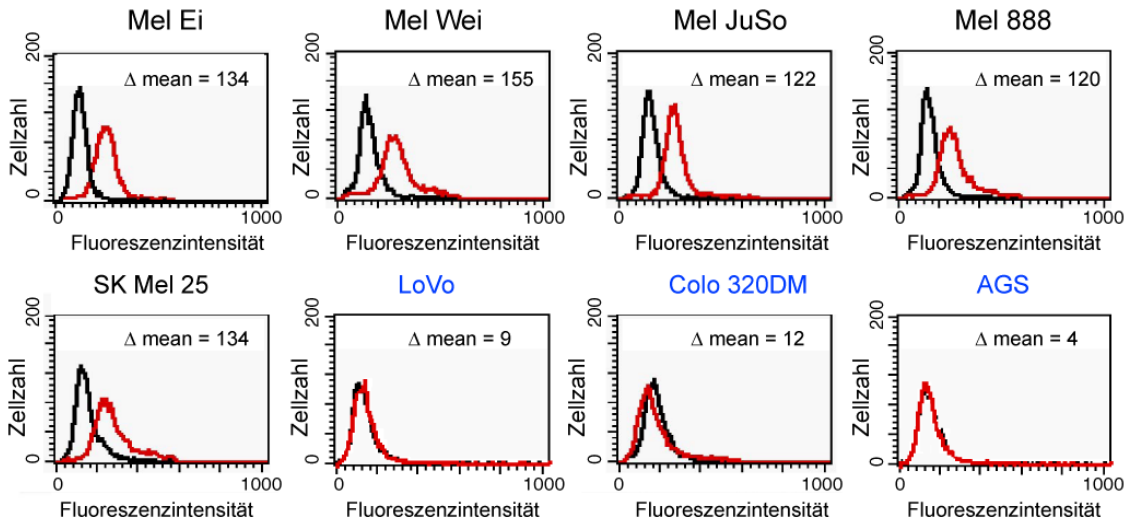


Abb. 4.1 Nachweis der Nab2-Expression über FACS-Analyse mit einem monoklonalen Anti-Nab2-AK. Der Anti-Nab2-mAK wurde in der intrazellulären Immunfluoreszenz (Kap. 3.5.3.1) auf den Melanomzelllinien Mel Ei, Mel Wei, Mel Juso, Mel 888 und SK-MEL-25, den Kolonkarzinomzelllinien Colo 320 DM und LoVo und der Magenkarzinomzelllinie AGS inkubiert und die Bindung mit Kaninchen-anti-Maus-FITC detektiert (rote Linien). Die jeweilige Isotypkontrolle ist in schwarzer Linie dargestellt und die *delta mean channel* (Δ mean) (siehe Kap. 3.5.3.3) sind angegeben. In den Histogrammen sind die Fluoreszenzintensitäten (FL-1-Kanal) gegen die Zellzahlen dargestellt.

4.1.2 Kinetik der *Nab1*, Nab2- und Egr-1-Expression nach Phorbolester-Stimulation

Zur Untersuchung der Kinetik der *Nab1*, Nab2- und Egr-1-Expression, wurden die Melanomzellen Mel Ei, Mel JuSo, Mel 888 und die Karzinomzelllinie Colo 320 DM mit dem Phorbolester Phorbol-12-Myristat-13-Azetat (PMA) stimuliert.

Die Bestimmung der Protein-Expression von Nab2 und Egr-1 erfolgte 2-6 h nach bzw. kurz vor der PMA-Stimulation (0 h) mittels Western-Analyse (Kap. 3.4.1).

Wie in Abb. 4.2 A zu sehen ist zeigt Nab2 im Gegensatz zu β-Aktin und Egr-1 mehrere Banden, die zwischen 56 und 65 kDa liegen. Kramer (2000) konnte zeigen, dass unterschiedliche Phosphorylierungsstufen der beiden Nab2-Isoformen an der Bandenheterogenität von Nab2 beteiligt sind.

Abb. 4.2 A zeigt, dass die Melanomzelllinien Mel Ei, Mel JuSo und Mel 888 eine höhere basale Nab2-Expression (ohne PMA-Stimulation (0 h)) als die Kolonkarzinomzellen Colo 320 DM aufweisen. Im Gegensatz zu den Ergebnissen in Kap. 4.1 konnte eine schwache Nab2-Expression in Colo 320 DM detektiert werden. Dies ist darauf zurückzuführen, dass der monoklonale Nab2-AK gegen rekombinantes bakterielles Protein generiert wurde, wodurch er eine größere Affinität zu denaturiertem als zu nicht denaturiertem Nab2 besitzt, so dass die Sensitivität in der Immunfluoreszenz geringer ist.

Weiterhin kann gezeigt werden, dass der Höchstwert der Nab2-Expression 4 h nach Stimulation in allen Zellen erreicht ist und die Expression auch nach 6 h stabil ist.

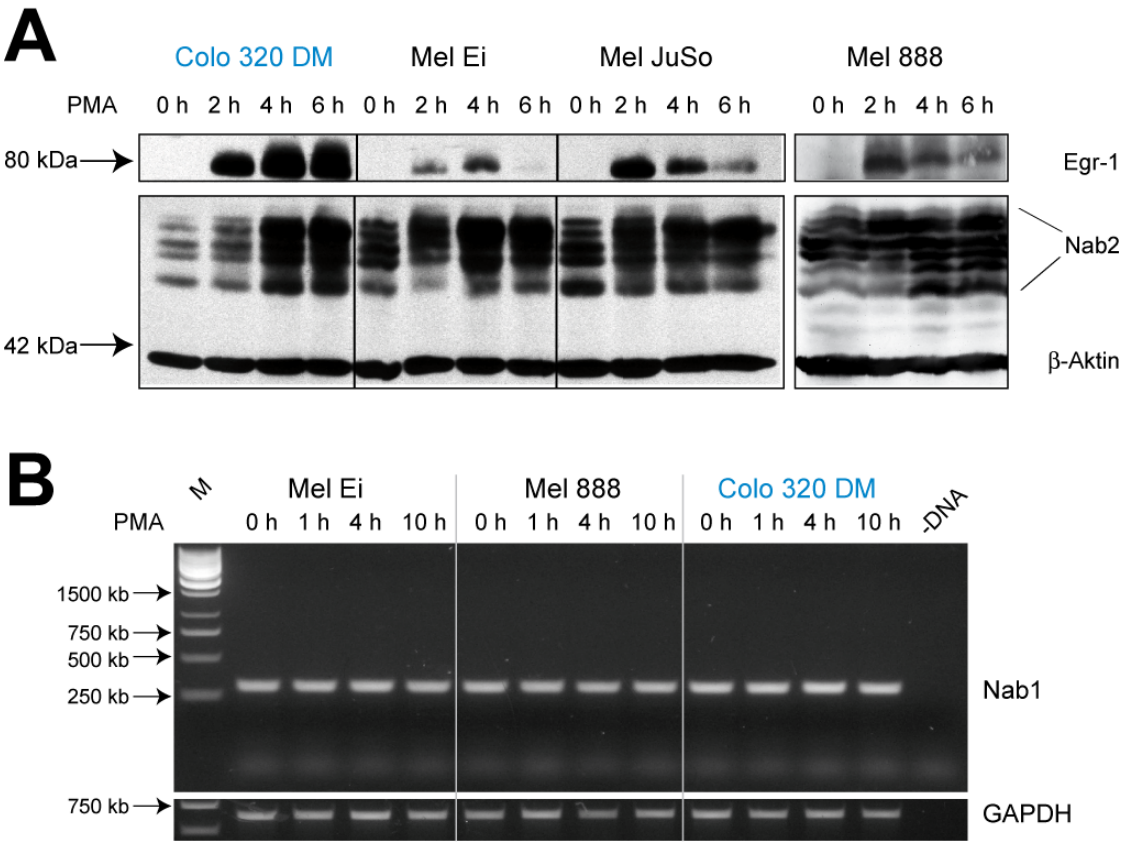


Abb. 4.2 Untersuchung der Kinetik der *Nab1*-, Nab2- und Egr-1-Expression nach PMA-Stimulation. Die Bestimmung der Expression erfolgte nach den angegebenen Zeiten bzw. kurz vor der PMA-Stimulation (0 h) (Kap. 3.1.3). **A, Bestimmung der Nab2- und Egr-1-Expression mittels Western-Analyse.** Von den Zelllinien Colo 320 DM, Mel Ei, Mel JuSo und Mel 888 wurden 80 µg Gesamtzelllysat auf einem reduzierenden 10%igen SDS-Polyacrylamidgel aufgetrennt, auf eine Nitrozellulosemembran übertragen und mit dem monoklonalen Anti-Nab2-AK, dem Anti-β-Aktin-AK, zur Kontrolle eines gleichmäßigen Proteinauftrages und dem Peroxidase-konjugierten Kaninchen-Anti-Maus-AK gleichzeitig detektiert (Kap. 3.4.1). Nach dem Entfernen dieser Immunkomplexe (Kap. 3.4.1.6) erfolgte der Egr-1-Nachweis mit dem Anti-Egr-1-AK und dem Peroxidase-konjugierten Schwein-Anti-Kaninchen-AK. **B, Untersuchung der *Nab1*-mRNA-Expression durch semiquantitative RT-PCR (Kap. 3.3.4).** Auftrennung der PCR-Amplifikate von Mel Ei, Mel 888 und Colo 320 DM in einem 1% Agarose-Gel. –DNA = Negativ-Kontrolle. M = Marker.

Das Egr-1-Protein ist ohne Stimulation der Zellen nicht detektierbar und wird nach 2 h in allen Zellen hochreguliert. Der Höchstwert der Egr-1-Protein-Expression wird nach 2-4 h erreicht. Die Egr-1-Proteinmenge nimmt in den Melanomzellen 6 h nach Stimulation deutlich ab, während sie in den Colo 320 DM Zellen interessanterweise auch nach 6 h stabil ist. Des Weiteren kann beobachtet werden, dass die Induktion der Egr-1-Protein-Expression in Mel Ei geringer ist, als in den anderen Zelllinien.

Die *Nab1*-mRNA-Expression in Mel Ei, Mel 888 und Colo 320 DM wurde nach 1-10 h PMA-Stimulation und in unbehandelten Zellen (0 h) mittels semiquantitativer RT-PCR (Kap. 3.3.4) analysiert und ist in Abb. 4.2 B dargestellt. Im Gegensatz zur Nab2-Protein-Expression konnte in allen Zelllinien eine vergleichbare basale *Nab1*-mRNA-Expression (0 h) und keine Induktion nach Behandlung mit PMA gezeigt werden.

4.1.3 *In silico* Analyse der 5`-Region des *Nab2*-Gens

Um putative regulatorische Elemente in der 5`-Region des *Nab2*-Gens zu identifizieren, wurden *in silico* Analysen durchgeführt (Kap. 3.6.1). Es konnten keine typischen Kern-Promotor-Elemente wie eine TATA-Box, CAAT-Box oder Initiator-Sequenz in der sehr GC-reichen 5`-Region nachgewiesen werden. Eine CpG-Insel liegt, relativ zum Translationsstartpunkt (ATG = +1), im Bereich von –876 bp bis +82 bp und ein Promotor-Bereich wurde von –705 bp bis –82 bp vorhergesagt (Abb. 4.3). Da TATA-lose Promotoren häufig in CpG-Inseln liegen, wurden putative Transkriptionsfaktorbindestellen im Abschnitt –1000 bp bis +1 bp bestimmt. Abb. 4.3 zeigt, dass im 5`-Bereich des *Nab2*-Gens sehr viele Bindestellen für die Transkriptionsfaktoren der Egr-Familie und der Sp1-Familie vorhanden sind. Da die Konsensus-Sequenzen dieser beiden Familien sehr ähnlich ist, liegen die putatitven Bindestellen häufig überlappend vor. Auffällig ist eine Ansammlung von 11 Bindungspositionen (fünf für die Egr-, fünf für die Sp1-Familie und eine für AP2) in dem nur 67 bp umfassenden Bereich von –263 bp bis –329 bp. Zusätzlich wurden in der 5`-Region Bindestellen für HIF-1 (an 4 Positionen), CREB-Familienmitglieder (4), NFκB (1) und AP2 (1) vorhergesagt.

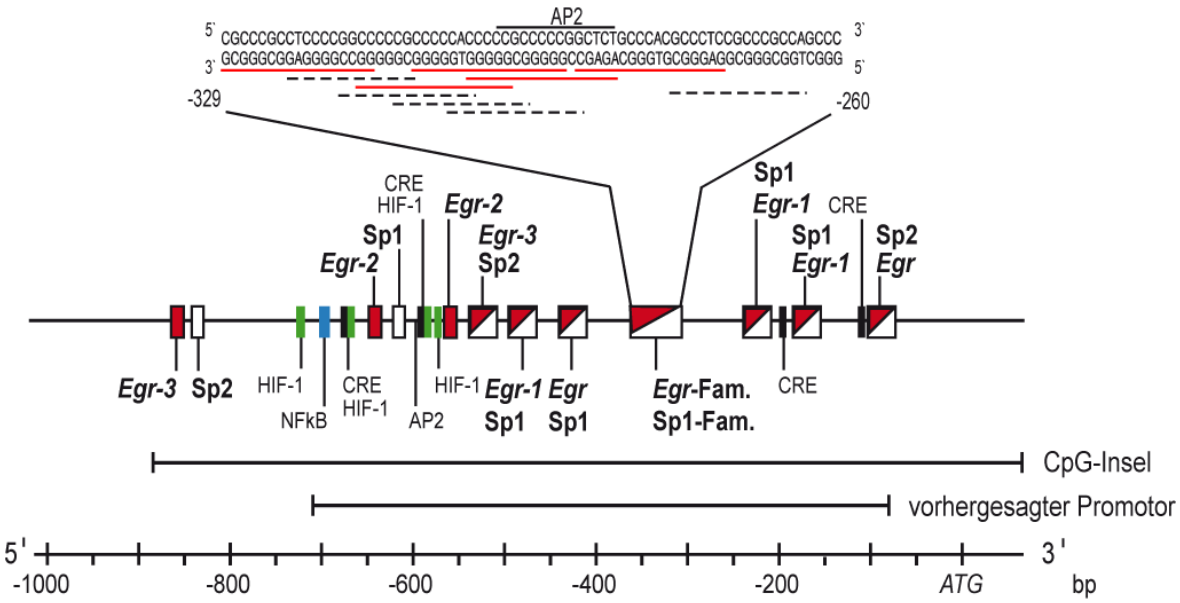


Abb. 4.3 ***In silico*** **Analyse der 5`-Region des** ***Nab2*****-Gens (Kap. 3.6.1).** Relativ zum Translationsstart (ATG = +1) ist der vorhergesagte Promotor-Bereich, eine CpG-Insel, sowie die putativen Transkriptionsfaktorbindestellen dargestellt. Die schräg geteilten Rechtecke stellen überlappende Bindungspositionen der angegebenen Transkriptionsfaktoren bzw. Familien dar. Der Bereich –329 bp bis –260 bp des *Nab2*-Gens ist detailliert gezeigt**.** Die schwarzen gestrichelten Linien geben putative Sp1-Motive und die roten durchgezogenen Linien putative Egr-Bindestellen an.

4.1.4 Identifikation der Nab2-Promotor-Region

Zur Bestimmung regulativ wichtiger Elemente, welche die *Nab2*-Transkription kontrollieren, wurde die 5`-Region des *Nab2*-Gens und serielle Verkürzungen vor das Luziferasegen in den Vektor pGL3-basic, welcher keinen Promotor enthält, kloniert (Kap. 2.1.5.1), um die Expression der Luziferase zu steuern. Anschließend wurden die Zelllinien Mel 888 und Colo 320 DM mit den Verkürzungskonstrukten transfiziert und nach 48 h die Aktivitäten im Luziferase-Versuch bestimmt (Kap. 3.1.4).

Die prozentualen Aktivitäten der einzelnen Konstrukte sind auf das Luziferase-Reporterkonstrukt maluc-1839 bezogen, welches die komplette genomische 5`-Region von *Nab2* enthält.

Die Aktivität des Reporterkonstrukts maluc-679 ist vergleichbar mit der von maluc-872 und dem Konstrukt maluc-1839 (nicht gezeigt), während die Aktivität von maluc-558, welchem zwei Egr-, zwei CREB-, drei HIF-1-Bindepositionen, eine Sp1- und eine AP2-Bindestelle fehlen, um 20-30% reduziert ist (Abb. 4.4). Diese Beobachtung zeigt, dass das Konstrukt maluc-679 den kompletten Nab2-Promotor enthält. Weitere Entfernung um 90 bp, die zwei überlappende Egr/Sp1-Motive umfassen, bis zum Nukleotid –468 bp verminderte die Aktivität um weitere 20%, während eine zusätzliche Deletion bis

Nukleotid –379 bp keinen Einfluss auf die Luziferase-Aktivität hatte. Dementsprechend scheint die überlappende Egr/Sp1-Bindestelle keinen Einfluss auf die basale Promotoraktivität zu haben. Die Verkürzung des Nab2-Promotors bis Nukleotid –263 bp resultierte im Vergleich zu maluc-379 in einer Reduktion der Luziferase-Aktivität von 72% in Mel 888 und 60% in Colo 320 DM, welche auf ein wichtiges regulatorisches Element in Bereich –379 bp bis –263 bp hindeutet. Dieser Bereich enthält multiple überlappende Bindemotive für Mitglieder der Egr- und Sp1-Familie und eine AP2-Bindestelle. Die Aktivität von maluc-195, welchem im Vergleich zu maluc-263 eine überlappende Egr/Sp1-Bindestelle und ein cAMP-responsives Element fehlt, sank um weitere 60%. Nach Deletion von zwei weiteren Egr/Sp1-Motiven und einem cAMP-responsiven Element konnte in maluc-74 nahezu keine Luziferase-Aktivität mehr nachgewiesen werden.

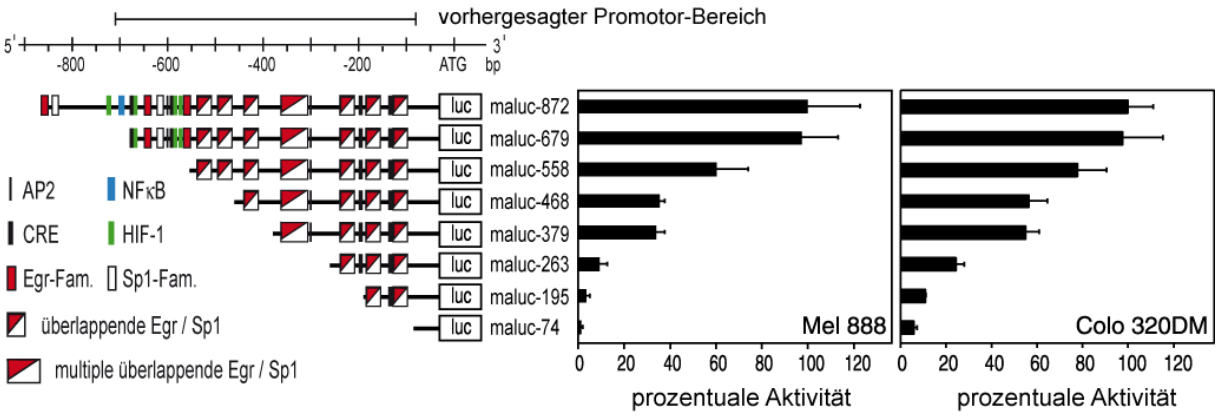


Abb. 4.4 Identifizierung der Nab2-Promotor-Region. Mel 888 und Colo 320 DM Zellen wurden transient mit 100 ng der angegebenen Nab2-5`-Region-Luziferase-Konstrukten in 96-Loch-Platten mittels MATra transfiziert und die Aktivität nach 48 h im Luziferase-Versuch bestimmt (Kap. 3.1.4). Links sind die verwendeteten Verkürzungskonstrukte mit den enthaltenen putativen Transkriptionsfaktorbindestellen dargestellt. Rechts ist auf der x-Achse die prozentuale Luziferase-Aktivität, bezogen auf maluc-1839 (gleich 100% gesetzt), welches die komplette *Nab2*-5`-Region enthält, als Mittelwert aus Triplikaten mit Standardabweichung gezeigt.

Die Ergebnisse zeigen, dass der Nab2-Promotor von –679 bp bis –74 bp relativ zum Translationsstart, übereinstimmend mit der Vorhersage der *in silico* Analyse, lokalisiert ist. Diese Region beinhaltet zwei Egr-, sechs überlappende Egr/Sp1-, zwei Sp1-, drei HIF-1-Bindemotive, eine AP2-Stelle, vier cAMP-responsive Elemente, sowie eine Ansammlung von fünf Egr- und fünf Sp1-Bindestellen und einem AP2-Motiv im Bereich –379 bp bis -263 bp. Die Analyse der Deletionskonstrukte deutet darauf hin, dass dieser Bereich von -379 bp bis –263 bp ein wichtiges regulatorisches Element enthält. Die Korrelation zwischen der Aktivität und der Anzahl der Bindemotive der Sp1-Familie in den

Verkürzungskonstrukten weist darauf hin, dass der konstitutiv exprimierte Faktor Sp1 an der Regulation der basalen Nab2-Expression beteiligt ist.

4.1.5 Einfluss von Egr-1, Egr-2 und Egr-3 auf die endogene *Nab2*-Expression

Da mittels *in silico* Analyse eine hohe Anzahl an putativen Egr-Bindestellen in der 5`-Region des *Nab2*-Gens identifiziert wurden, sollte der Einfluss von Egr-1, Egr-2 und Egr-3 auf die endogene *Nab2*-Expression analysiert werden. Dazu wurden Expressionskonstrukte für humanes Egr-1, Egr-2 und Egr-3 hergestellt (Kap. 3.3.9 und 3.3.10), die in transienten Transfektionen eingesetzt werden sollten.

Die Konstrukte für Egr-1, Egr-2 und Egr-3, sowie ein Expressionsvektor für humanes Phlda-1 und der entsprechende Leervektor als Kontrollen wurden in Colo 320 DM transient transfiziert (Kap. 3.1.4) und nach 48 h die mRNA-Expressionsmuster mittels semiquantitativer RT-PCR (Kap. 3.3.4) bestimmt. Das Phlda-1-Konstrukt dient als Kontrolle für einen möglichen unspezifischen Einfluss der durch den Vektor vermittelten starken Genexpression auf das Expressionsmuster der Zellen. Um Vergleiche einer möglichen *Nab2*-Induktionsstärke durch die Egr-Moleküle anstellen zu können, wurden parallel zum Transfektionsansatz Colo 320 DM Zellen ausplattiert, nach 72 h für 1 h und 4 h mit PMA stimuliert (Kap. 3.1.3) und mittels RT-PCR analysiert.

In Abb. 4.5. ist nach Transfektion des Leervektors und von Phlda-1 eine vergleichbare *Nab2*-Expression erkennbar, die allerdings im Vergleich zu untransfizierten Colo 320 DM leicht erhöht ist. Dieser Effekt beruht vermutlich auf einer Induktion durch den Transfektionsprozess. Eine deutliche Erhöhung der *Nab2*-Expression gegenüber den Kontrolltransfektionen ist nach Transfektion der Expressionskonstrukte für Egr-1, Egr-2 oder Egr-3 erkennbar, welche allerdings niedriger ist als nach 4 h Behandlung mit PMA.
Um einen möglichen Einfluss von Egr-1, Egr-2 und Egr-3 auf die endogene Expression des nicht-induzierbaren Nab1 zu untersuchen, wurde im gleichen Experiment die *Nab1*-Expression untersucht (Abb. 4.5 B). Es konnte kein Unterschied in der exprimierten *Nab1*-mRNA-Menge nach Transfektion von Egr-1, Egr-2 oder Egr-3 bestimmt werden.

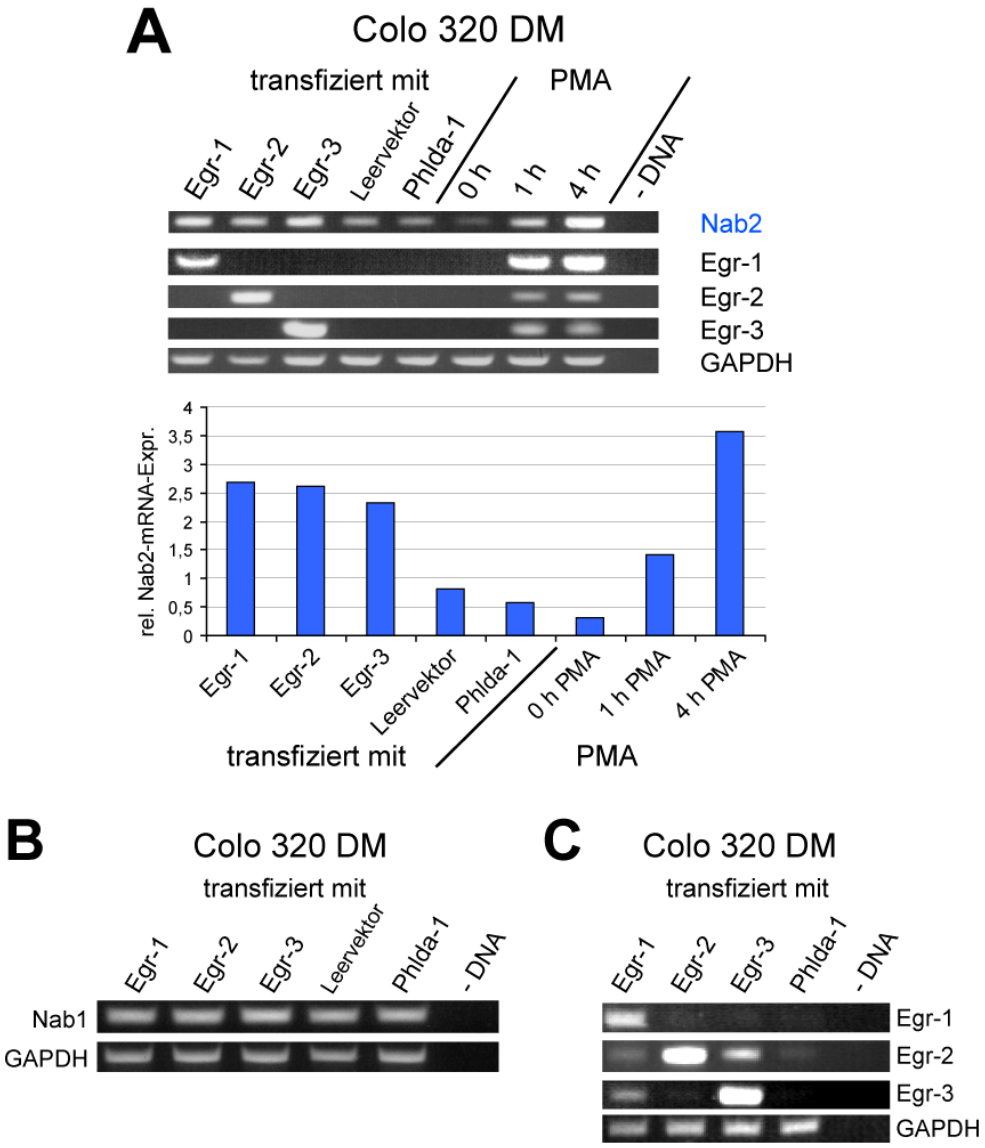


Abb. 4.5 Einfluss von Egr-1, Egr-2 und Egr-3 auf die *Nab2*-Expression. Colo 320 DM Zellen wurden mit 2 µg der Expressionskonstrukte für Egr-1, Egr-2, Egr-3 und als Kontrollen dem Leervektor und dem Phlda-1 exprimierenden Vektor in 6-Loch-Platten mittels MATra transfiziert (Kap. 3.1.4) und nach 48 h analysiert. Parallel dazu wurden Colo 320 DM ausgesät und für 1 h und 4 h mit PMA stimuliert (Kap. 3.1.3). Daraufhin erfolgte die Analyse der mRNA-Expression mittels semiquantitativer RT-PCR (Kap. 3.3.4). Auftrennung der Amplifikate erfolgte in einem 1% Agarose-Gel. –DNA = Negativ-Kontrolle. **A, oben,** Reihe 1, *Nab2*-Expression ; Reihe 2-4, zur Kontrolle der Spezifität der Expressionskonstrukte ist die *Egr-1*-, *Egr-2*-, und *Egr-3*-Expression dargestellt. **A, unten**, Nach densitometrischer Auswertung der Banden ist die relative *Nab2*-mRNA-Expression im Verhältnis zur *GAPDH*-Expression, welche als 1 gesetzt wurde, dargestellt (Kap. 3.6.2); **B, *Nab1*-Expression** nach Transfektion der angegebenen Konstrukte. **C, *Egr-1*, *Egr-2* und *Egr-3*-Expression** nach Transfektion der angegebenen Konstrukte. Entgegen den normalen PCR-Bedingungen (Kap. 3.3.2) wurden 2 µl unverdünnte cDNA in die Egr-2- und Egr-3-PCR eingesetzt und die doppelte Menge des PCR-Ansatzes (18 µl) über ein 1% Agarose-Gel aufgetrennt.

Des Weiteren wurde die Möglichkeit einer Autoregulation der Transkriptionsfaktoren der Egr-Familie untereinander geprüft. Da in unstimulierten Colo 320 DM bisher kein Egr-2 und Egr-3 nachgewiesen werden konnte, wurden, entgegen den normalen PCR-Bedingungen (Kap. 3.3.2), 2 µl unverdünnte cDNA in die PCR eingesetzt und die doppelte Menge des PCR-Ansatzes (18 µl) über ein 1% Agarose-Gel aufgetrennt (Abb. 4.5 C). Dabei zeigte sich, dass Egr-1 die mRNA-Expression von *Egr-3* und Egr-3 die Expression von *Egr-2* induzieren kann. Die Stärke der Induktion ist, wie die gewählten Nachweisbedingungen verdeutlichen, allerdings in keiner Weise mit der durch PMA zu vergleichen.

Diese Ergebnisse zeigen, dass Egr-1, Egr-2 oder Egr-3 endogene *Nab2*-Expression induzieren können. Die Induktion durch PMA ist allerdings höher als durch entweder Egr-1, Egr-2 oder Egr-3, woraus man schließen kann, dass andere Faktoren, wie z.B. AP2 oder CREB, und/oder alle drei Egr-Transkriptionsfaktoren in die Induktion durch PMA involviert sind.

4.1.6 Einfluss von Egr-1, Egr-2 und Egr-3 auf die Nab2-Promotor-Aktivität

Nach Transfektion von Expressionskonstrukten für Egr-1, Egr-2 und Egr-3 konnte im vorigen Kapitel ein Anstieg der endogenen *Nab2*-Expression gezeigt werden. Außerdem enthält der Nab2-Promotor viele putative Egr- und überlappende Egr/Sp1-Bindestellen (Kap. 4.1.3), so dass die Vermutung nahe liegt, dass die Transkriptionsfaktoren der Egr-Familie wichtige Regulatoren der Nab2-Expression sind.

Um die Regulation der Nab2-Expression durch die Mitglieder der Egr-Familie zu untersuchen, wurden Expressionskonstrukte für humanes Egr-1, Egr-2 oder Egr-3 zusammen mit einem Nab2-Promotor-Reporter-Konstrukt transfiziert und die Luziferaseaktivität nach 48 h gemessen (Kap. 3.1.4). Vierzig ng der Expressionskonstrukte für Egr-1, Egr-2, Egr-3 und Phlda-1, welches die Nab2-Promotoraktivität nicht beeinflusst (Kumbrink et al., 2005), wurden zusammen mit 60 ng des Reporterkonstrukts maluc-679, das den kompletten Nab2-Promotor enthält, transient in Mel 888 und Colo 320 DM transfiziert. Wie in Abb. 4.6 zu sehen ist, steigt die Nab2-Promotor-Aktivität nach Transfektion von Egr-1, Egr-2 und Egr-3 im Vergleich zu Phlda-1 (als 1 gesetzt) deutlich an. Die Aktivierung durch Egr-1 und Egr-3 (8-fach) ist in Mel 888 höher als durch Egr-2 (4-fach), was darauf hindeutet, dass Egr-1 und Egr-3 stärkere Aktivatoren der *Nab2*-

Transkription sind als Egr-2. In den Colo 320 DM Zellen ist die Induktion des Nab2-Promotors durch die Egr-Moleküle, vor allem durch Egr-3 (3-fach), deutlich geringer als in Mel 888 (8-fach). Diese Resultate weisen, übereinstimmend mit früheren Ergebnissen (Kumbrink et al., 2005), auf eine unterschiedliche Regulation der Nab2-Expression in der Melanomzelllinie Mel 888 und der Kolonkarzinomzelllinie Colo 320 DM hin. Um die Spezifität der Induktion des Nab2-Promotors durch die Egr-Moleküle zu zeigen, wurden Mel 888 Zellen mit ansteigenden Mengen (2-40 ng) von Expressionsvektoren für entweder Egr-1, Egr-2 oder Egr-3 zusammen mit maluc-679 transfiziert. Abb. 4.6 (rechts) zeigt, dass die Aktivierung durch die Egr-Transkriptionsfaktoren dosis-abhängig ist und die maximale Induktion nach Transfektion von 20-40 ng erreicht ist. Obwohl nach Transfektion von 2 ng Egr-1 oder Egr-2 kein Einfluss auf die Promotoraktivität zu beobachten war, waren interessanterweise 2 ng Egr-3 bereits ausreichend um eine 4-fache Aktivierung zu induzieren.

Diese Resultate weisen darauf hin, dass Egr-1, Egr-2 und vor allem Egr-3 an der Regulation der Expression ihres eigenen Regulators Nab2 beteiligt sind (siehe auch Kap. 4.1.7).

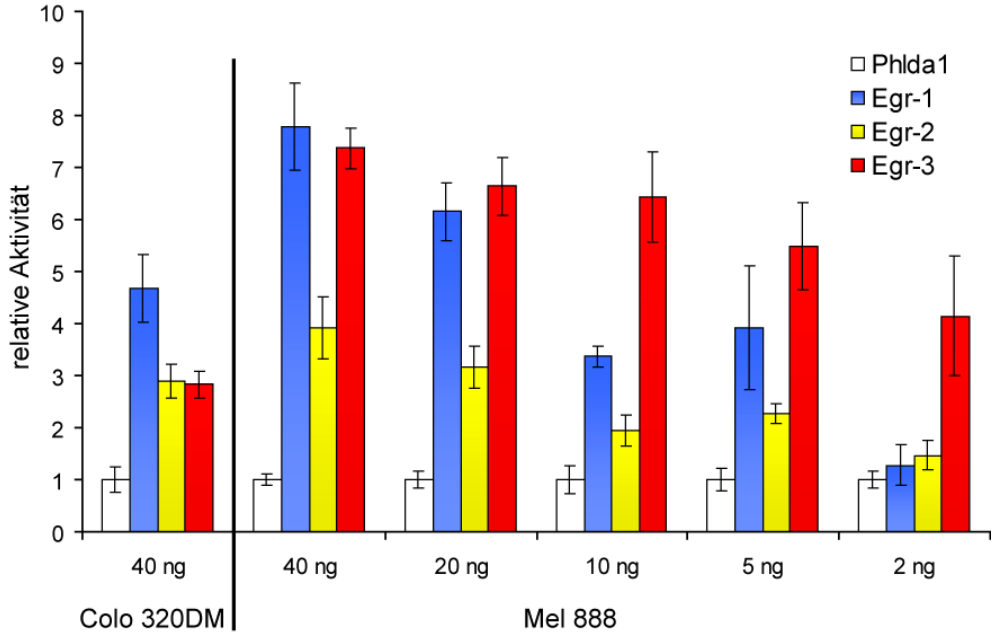


Abb. 4.6 Aktivierung des Nab2-Promotors durch Egr-1, Egr-2 und Egr-3. Mel 888 und Colo 320 DM Zellen wurden mit 60 ng maluc-679, welches den kompletten Nab2-Promotor enthält, und den angegebenen Mengen (2-40 ng) der Expressionskonstrukte für Egr-1, Egr-2, Egr-3 oder zur Kontrolle für Phlda-1 mittels MATra in 96-Loch-Platten transfiziert und die Promotoraktivität nach 48 h im Luziferase-Versuch bestimmt (Kap. 3.1.4). Die Menge an transfizierter DNA wurde mit dem Leervektor auf 100 ng angeglichen. Angegeben ist die relative Aktivität im Vergleich zur Promotor-Aktivität nach Transfektion von Phlda-1 (als 1 gesetzt) als Mittelwerte aus Triplikaten mit Standardabweichung.

Transkriptionsfaktoren können die Expression eines Gens auf verschiedene Weisen beeinflussen. Beispielsweise durch Bindung an andere Transkriptionsfaktoren, wodurch sie deren Aktivität modulieren, oder durch Kompetition um Bindungsstellen. Da die Transkriptionsfaktoren der Egr-Familie die gleiche Konsensus-Sequenz teilen und eine ähnliche DNA-Bindedomäne besitzen, könnte es zur Kompetition kommen. Um herauszufinden wie Egr-1, Egr-2 und Egr-3 simultan auf den Nab2-Promotor und dessen Aktivität wirken, wurden diese Faktoren gleichzeitig in verschiedenen Kombinationen mit dem Nab2-Promotor-Reporter-Konstrukt maluc-679 in Mel 888 transfiziert. Dazu wurden 15 ng von jedem Expressionskonstrukt für Egr-1, Egr-2 und Egr-3 verwendet, damit die maximale Aktivierung des Nab2-Promotors durch jeden einzelnen Faktor noch nicht erreicht ist.

Wie in Abb. 4.7 zu sehen ist, steigt, übereinstimmend mit vorigen Ergebnissen, die Promotoraktivität nach Transfektion von Egr-1-, Egr-2- oder Egr-3-Konstrukte im Vergleich zu Phlda-1 deutlich an, wobei die Aktivierung durch Egr-1 und Egr-3 stärker als durch Egr-2 ist.

Nach simultaner Transfektion von Egr-1 und Egr-3 ist ein additiver Effekt auf die Promotor-Aktivität zu beobachten. Diese additive Wirkung kann auch nach gleichzeitiger Transfektion von Egr-1 und Egr-2 oder Egr-3 und Egr-2 gezeigt werden. Eine additive Aktivierung des Nab2-Promotors nach simultaner Transfektion von allen drei Egr-Vektoren kann nicht eindeutig nachgewiesen werden, da vermutlich bereits nach Transfektion von 15 ng Egr-1 und 15 ng Egr-3 die maximale Induktion erreicht ist. Allerdings kann, dadurch, dass die Aktivität nicht durch Egr-2 verringert wurde, ausgeschlossen werden, dass sich die Mitglieder der Egr-Familie gegenseitig inhibieren. Zusätzlich zeigt dieses Experiment, dass Egr-1, Egr-2 und Egr-3 nicht um Bindestellen konkurrieren, sondern additiv am Nab2-Promotor wirken können.

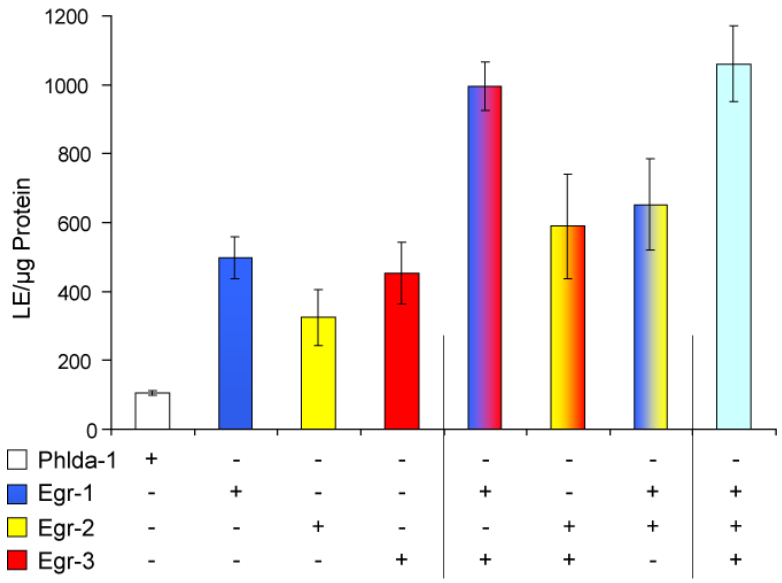


Abb. 4.7 Aktivierung des Nab2-Promotors nach simultaner Transfektion von Egr-1, Egr-2 und Egr-3. Mel 888 Zellen wurden mit 60 ng maluc-679, welches den kompletten Nab2-Promotor enthält, und jeweils 15 ng der Egr-1-, Egr-2- und Egr-3-Expressionsvektoren in den angegebenen Kombinationen mittels MATra in 96-Loch-Platten transfiziert und die Promotoraktivität nach 48 h im Luziferase-Versuch bestimmt (Kap. 3.1.4). Die Menge an transfizierter DNA wurde mit dem Leervektor auf 105 ng angeglichen. Als Kontrolle für die basale Promotor-Aktivität wurden 45 ng des Phlda-1-Konstrukts, welches den Nab2-Promotor nicht beeinflusst, transfiziert. Angegeben sind die LE/µg Protein als Mittelwerte aus Triplikaten mit Standardabweichung.

4.1.7 Einfluss von Nab1 und Nab2 auf die Egr-vermittelte Aktivierung des Nab2-Promotors

Da Nab1 und Nab2 nicht nur als Korepressor, sondern auch als Koaktivator der Egr-abhängigen Transkription agieren können (Collins et al., 2006; Sevetson et al., 2000), sollte untersucht werden, ob Nab1 und Nab2 einen inhibierenden oder stimulierenden Effekt auf die Egr-vermittelte Aktivierung des Nab2-Promotors ausüben.

Um dieser Fragestellung nachzugehen, wurden Mel 888 Zellen mit 60 ng des Nab2-Promotor enthaltenden Reporterkonstrukts maluc-679 zusammen mit 40 ng der Expressionsvektoren für Egr-1, Egr-2, Egr-3 oder als Kontrolle für Phlda-1 und zusätzlich mit 40 ng der Nab1- und/oder Nab2-Konstrukte transfiziert.

Abb. 4.8 A zeigt, dass die durch Egr-1, Egr-2 und Egr-3 vermittelte Aktivierung des Nab2-Promotors durch Nab2 komplett inhibiert wird. Durch die gleiche Menge Nab1 wurde eine schwächere, aber deutliche Inhibition der Egr-1- und Egr-2-abhängigen Induktion erreicht, während die Aktivierung durch Egr-3 nur geringfügig reprimiert wurde. Nach

Kotransfektion von Nab1 zusammen mit Nab2 konnte keine weitere Inhibition im Vergleich zur Nab2 vermittelten Repression nachgewiesen werden.

Da Nab2 nicht nur einen stärkeren reprimierenden Effekt ausübt, sondern im Gegensatz zu Nab1 alle drei Egr-Familienmitglieder inhibiert, wurde die von Nab2 abhängige Repression durch Transfektion von ansteigenden Mengen (2-60 ng) des Nab2-Vektors weiter untersucht. Wie in Abb. 4.8 B erkannt werden kann, ist die durch Nab2 vermittelte Inhibition der von Egr-1 und Egr-3 abhängigen Nab2-Promotor Induktion dosis-abhängig und führt zu einer kompletten Repression nach Transfektion von 40 ng Nab2.

Diese Ergebnisse zeigen, dass die Egr-vermittelte Aktivierung des Nab2-Promotors durch Nab1 und Nab2 reprimiert werden kann. Interessanterweise übt Nab2 einen stärkeren inhibitorischen Effekt als Nab1 aus und kann im Gegensatz zu Nab1 die Aktivität von allen drei Mitgliedern der Egr-Familie beeinflussen.

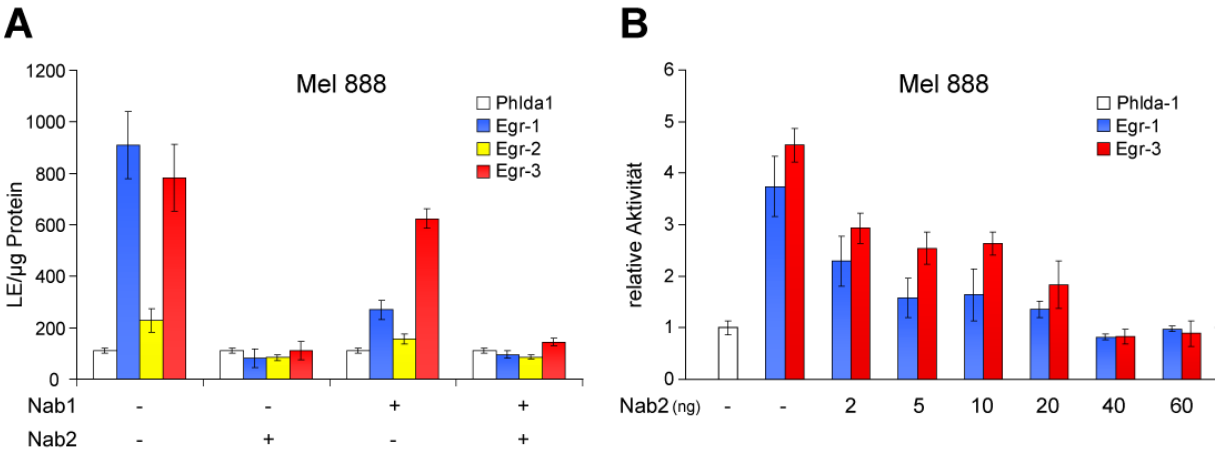


Abb. 4.8 Einfluss von Nab1 und Nab2 auf die Egr-vermittelte Aktivierung des Nab2-Promotors. A, Mel 888 Zellen wurden mit 60 ng maluc-679, welches den kompletten Nab2-Promotor enthält, und 40 ng der Expressionsvektoren für Egr-1, Egr-2, Egr-3 oder Phlda-1 als Kontrolle und zusätzlich, wie angegeben, mit 40 ng der Nab1- und/oder Nab2-Konstrukte mittels MATra in 96-Loch-Platten transfiziert und die Promotoraktivität nach 48 h im Luziferase-Versuch bestimmt (Kap. 3.1.4). Die Menge an transfizierter DNA wurde mit dem Leervektor auf 180 ng angeglichen. Angegeben sind die LE/µg Protein als Mittelwerte aus Triplikaten mit Standardabweichung. **B,** Mel 888 Zellen wurden mit 60 ng maluc-679 und 40 ng der Egr-1-, Egr-3- oder Phlda-1-Plasmide als Kontrolle und zusätzlich, wie angegeben, mit 2-60 ng des Nab2-Expressionskonstrukts transfiziert und die Promotoraktivität nach 48 h im Luziferase-Versuch bestimmt. Die Menge an transfizierter DNA wurde mit dem Leervektor auf 160 ng angeglichen. Angegeben ist die relative Aktivität im Vergleich zur Promotor-Aktivität nach Transfektion von Phlda-1 (als 1 gesetzt) als Mittelwerte aus Triplikaten mit Standardabweichung.

4.1.8 Identifikation von regulatorischen Elementen, welche die Induktion des Nab2-Promotors vermitteln

Um wichtige Elemente im Nab2-Promotor zu finden, welche die Induktion durch Phorbolester vermitteln, wurden die Zelllinien Mel 888 und Colo 320 DM mit den in Abb. 4.9 A angegebenen Nab2-Promotor-Verkürzungskonstrukten transfiziert und für 24 h mit oder ohne dem Phorbolester PMA kultiviert.

In den Colo 320 DM Zellen hatte die Verkürzung des kompletten Nab2-Promotors bis –379 bp, relativ zum Translationsstart, keinen Einfluss auf die Luziferase-Aktivität, die durch PMA induziert wurde. Weitere Deletion bis –263 bp reduzierte die Luziferase-Aktivität um signifikante 80%. Dennoch konnte in maluc-263 eine 4 bis 5-fache Aktivierung durch PMA beobachtet werden, die nach weiterer Deletion bis –195 bp auf das 2 bis 3-fache absank. Diese Resultate zeigen, dass wichtige Elemente im Bereich -379 bp bis –263 bp, welche in Colo 320 DM notwendig für die maximale Aktivierung des Nab2-Promotors durch PMA sind, und responsive Elemente zwischen –263 bp und –74 bp liegen. Die Region zwischen –379 bp und –263 bp, welche ebenfalls wichtig für die basale Nab2-Promotor-Aktivität ist (siehe auch Kap. 4.1.4), enthält eine komplexe Ansammlung von multiplen überlappenden Egr/Sp1-Bindemotiven und einer AP2-Bindestelle. Drei zusätzliche Egr/Sp1-Bindestellen und zwei cAMP-responsive Elemente sind im Bereich von –263 bis –74 bp lokalisiert. Die Signifikanz der Region zwischen –379 bp und -263 bp für die durch PMA vermittelte Induktion konnte auch in Mel 888 Zellen gezeigt werden. Allerdings tragen in diesen Zellen Elemente, die weiter 5` lokalisiert sind, deutlich zur Aktivierung durch PMA bei. Nach Behandlung mit PMA war die Luziferase-Aktivität von maluc-872, welches den kompletten Nab2-Promotor enthält, ungefähr 2,5-fach höher als von maluc-379 und maluc-468. In dieser Region liegen 2 Egr/Sp1-, 2 Egr-, 2 Sp1-, 4 HIF-1-Motive und 2 cAMP-responsive Elemente, sowie eine AP2- und eine einzelne NFκB-Bindestelle.

Diese Ergebnisse verdeutlichen, dass die Ansammlung von multiplen überlappenden Egr-/Sp1-Bindemotiven und einer AP2-Stelle im Bereich –329 bp bis –263 bp, welche in maluc-379, aber nicht in maluc-263 vorhanden ist, das Haupt-regulatorische-Element im Nab2-Promotor für die Induktion der Transkription durch PMA darstellt.

4.1.9 Identifikation von Egr-responsiven Elementen im Nab2-Promotor

Die Expression der Transkriptionsfaktoren der Egr-Familie, aber nicht die von Sp1, kann durch Stimulation mit PMA induziert werden. Um herauszufinden, ob die Nab2-Promotor-Deletions-Konstrukte durch die Egr-Moleküle in der gleichen Art aktiviert werden wie nach Behandlung mit PMA, wurden die 5`-verkürzten Fragmente auf ihre Aktivität in Colo 320 DM und Mel 888 Zellen nach zusätzlicher Transfektion von 40 ng der Expressionskonstrukte für Egr-1, Egr-3 oder Phlda-1 als Kontrolle untersucht. In Abb. 4.9 B ist die Aktivierung der Promotor-Reporter-Konstrukte durch Egr-1 gezeigt. Obwohl die Aktivierung in den Colo 320 DM Zellen nach Behandlung mit PMA höher als nach Transfektion des Egr-1-Konstrukts war, konnte ein nahezu identisches Muster der Induktion des Nab2-Promotors durch Egr-1 und durch PMA-Stimulation beobachtet werden. Allerdings konnte mit dem Konstrukt maluc-195 in Colo 320 DM keine Aktivierung durch Egr-1 gezeigt werden, während es durch PMA aktivierbar war. Übereinstimmend mit den nach PMA-Stimulation erhaltenen Ergebnissen war die Ansammlung von multiplen Egr/Sp1-Motiven im Bereich –379 bp bis –263 bp in Colo 320 DM Zellen notwendig für die maximale durch Egr-1 vermittelte Aktivierung des Nab2-Promotors.

In Mel 888 Zellen waren sowohl das Muster, als auch die Stärke der Induktion des Nab2-Promotors durch Egr-1 vergleichbar mit der nach PMA-Stimulation erhaltenen. Die Region zwischen –379 bp und –263 bp ist ebenfalls sehr wichtig für die durch Egr-1 vermittelte Aktivierung, aber zwei überlappende Egr/Sp1-Bindemotive in der Region von –558 bp und –468 bp sind für die höchste Egr-1-abhängige Induktion der Nab2-Expression in Mel 888 notwendig.

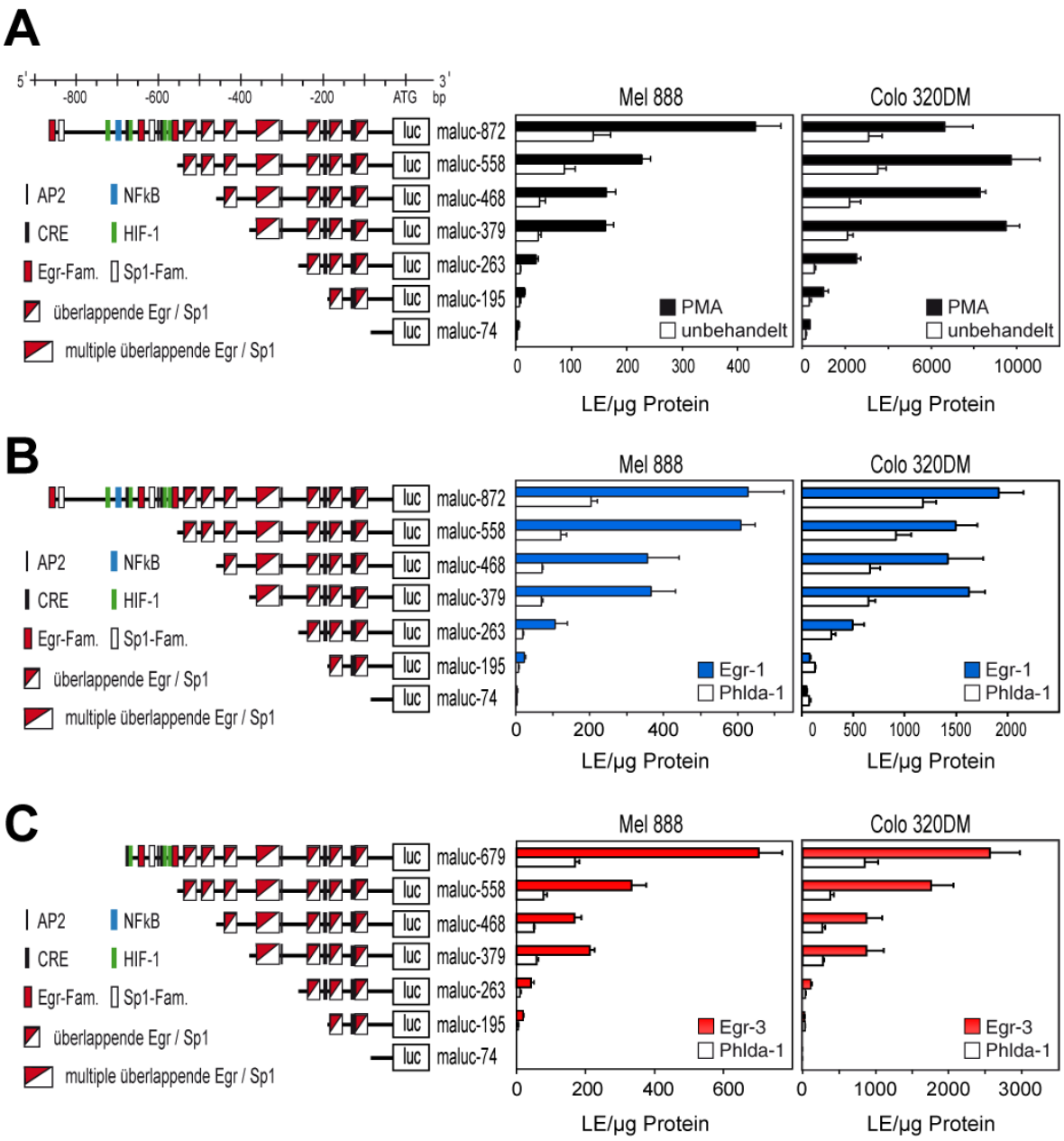


Abb. 4.9 Identifikation von regulatorischen Elementen im Nab2-Promotor. A, Mel 888 und Colo 320 DM Zellen wurden mit 100 ng des angegebenen Reporter-Promotor-Konstrukts mittels MATra in 96-Loch-Platten transfiziert, für 24 h mit oder ohne Zugabe von PMA inkubiert und anschließend die Promotoraktivität im Luziferase-Versuch bestimmt. Angegeben sind die LE/µg Protein als Mittelwerte aus Triplikaten mit Standardabweichung. LE, Lichteinheiten. **B,** Mel 888 und Colo 320 DM Zellen wurden mit 100 ng des angegebenen Reporter-Promotor-Konstrukts und 40 ng des Expressionskonstrukts für Egr-1 oder Phlda-1 als Kontrolle transfiziert und nach 24 h die Promotoraktivität im Luziferase-Versuch bestimmt. Angegeben sind die LE/µg Protein als Mittelwerte aus Triplikaten mit Standardabweichung. LE, Lichteinheiten. **C,** Mel 888 und Colo 320 DM Zellen wurden mit 100 ng des angegebenen Reporter-Promotor-Konstrukts und 40 ng der Egr-3- oder Phlda-1-Vektoren als Kontrolle transfiziert und nach 24 h die Promotoraktivität im Luziferase-Versuch bestimmt. Angegeben sind die LE/µg Protein als Mittelwerte aus Triplikaten mit Standardabweichung. LE, Lichteinheiten.

Wie in Abb. 4.9 C zu sehen ist, ist nicht nur das Muster, sondern auch die Stärke der durch Egr-3 vermittelten Aktivierung des Nab2-Promotors in den Mel 888 Zellen nur geringfügig von der durch PMA vermittelten unterscheidbar. Wiederum ist die Ansammlung von multiplen Egr/Sp1-Bindestellen zwischen –379 bp bis –263 bp von großer Signifikanz für die Egr-3-abhängige Induktion. Allerdings werden die selben Elemente im vorgeschalteten 5`-Bereich für die maximale Induktion durch Egr-3 wie nach Behandlung mit PMA benötigt. In den Colo 320 DM Zellen ist das gleiche Muster der Aktivierung der Deletionskonstrukte durch Egr-3 wie in Mel 888 zu erkennen. Im Vergleich zur Induktion durch PMA und Egr-1 in Colo 320 DM zeigt sich allerdings, dass in diesen Zellen für die durch Egr-3 vermittelte maximale Aktivität des Nab2-Promotors die Ansammlung von Egr/Sp1-Stellen von –379 bp bis –263 bp nicht ausreicht, sondern vorgelagerte Elemente im 5`-Bereich benötigt werden.

Aus diesen Ergebnissen kann man schließen, dass Egr-1 und Egr-3 wichtige Aktivatoren der Nab2-Expression in Antwort auf den Phorbolester PMA sind. Des Weiteren konnte gezeigt werden, dass das Haupt-regulatorische-Element, welches eine Ansammlung von multiplen Egr/Sp1-Bindestellen und ein AP2-Motiv zwischen –329 bp bis –263 bp umfasst, nicht nur für die basale Promotor-Aktivität und PMA-induzierte Transkription, sondern auch für die durch Egr-1 und Egr-3 vermittelte Aktivierung des Nab2-Promotors wichtig ist.

4.1.10 Identifikation von in verschiedenen Spezies konservierten Elementen im Nab2-Promotor

Der Vergleich von Promotorsequenzen verschiedener Spezies sollte evolutionär konservierte und dementsprechend wichtige regulatorische Elemente im Nab2-Promotor aufzeigen. Dazu wurden die Nab2-Promotor-Sequenzen von Mensch, Rhesus-Affe (*Macaca mulatta*), Wildrind (*Bos taurus*), Ratte und Maus mittels *in silico* Analyse (Kap. 3.6.1) auf putative Transkriptionsfaktor-Bindestellen untersucht.

Wie Abb. 4.10 zeigt, ist das Muster der Bindemotive in allen Spezies weitgehend konserviert. In allen Spezies wurden deutlich mehr Egr- und Sp1-Bindestellen vorhergesagt als putative Motive für andere Transkriptionsfaktoren. Des Weiteren konnte gezeigt werden, dass das Haupt-regulatorische-Element im Nab2-Promtor zwischen -329 bp und –263 bp, welches wichtig für die basale, induzierbare und Egr-vermittelte Promotor-Aktivität ist, in allen Spezies vorhanden ist, wodurch die Wichtigkeit dieses

Elements weiter unterstrichen wird. Im 5`-vorgelagerten Bereich von –468 bp bis –679 bp, der bedeutend für die maximale Aktivierung des Nab2-Promotors ist, sind einige Egr-, Sp1- und HIF-1-Bindestellen sowie cAMP-responsive Elemente evolutionär hochkonserviert.

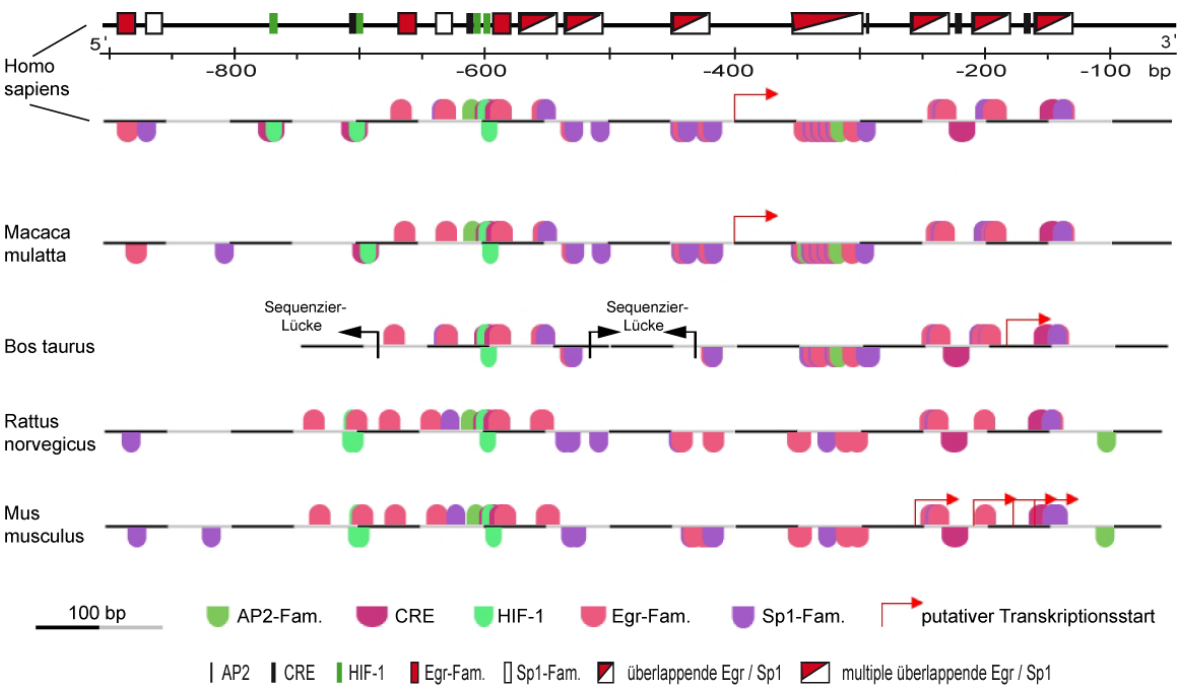


Abb. 4.10 Identifizierung von evolutionär konservierten putativen Transkriptionsfaktor-Bindestellen. Die Nab2-Promotorsequenzen von Mensch, Rhesus-Affe (Macaca mulatta), Wildrind (Bos taurus), Ratte und Maus wurden mittels *in silico* Analyse auf putative Bindestellen untersucht (Kap. 3.6.1). Dargestellt sind die Bindestellen der Transkriptionsfaktoren, für die mindestens 3 putative Bindemotive im Nab2-Promotor vorhanden sind. Die farbliche Aufschlüsselung der Bindestellen ist der Legende zu entnehmen. Zum Vergleich ist die humane Nab2-Promotorsequenz in der vereinfachten (oben) und der Einzeldarstellung (unten) der Bindemotive gezeigt.

4.1.11 Bindung von Mitgliedern der Egr- und Sp1-Familie an den Nab2-Promotor

Um herauszufinden, ob Egr-1 und/oder Sp1 in den Nuklei von PMA-stimulierten Zellen und Kontrollzellen vorhanden sind und an das konservierte Haupt-regulatorische-Element von –329 bp bis –263 bp mit multiplen Egr/Sp1-Bindestellen im Nab2-Promotor binden können, wurden Gelretardationsanalysen durchgeführt (siehe Kap. 3.4.2).

Kernextrakte von entweder für 3 h mit PMA stimulierten oder unstimulierten Mel 888 Zellen wurden mit den ^{32}P-markierten Nab2-Oligonukleotiden (Abb. 4.11), die den Bereichen –329 bp bis –294 bp (Oligo 1), -315 bp bis –285 bp (Oligo 2) und –289 bp bis -260 bp (Oligo 3) des Nab2-Promotors entsprechen inkubiert.

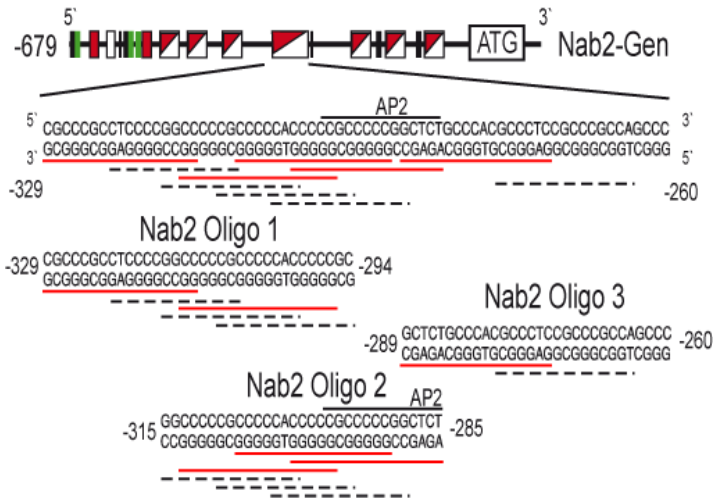


Abb. 4.11 Detaillierte Darstellung der in den Gelretardationsanalysen benutzten Nab2-Oligonukleotide 1, 2 und 3, welche den Bereich –329 bis –260 bp des Nab2-Promotors umfassen. Positionen sind relativ zum Translationsstart (+1) angezeigt. Die schwarzen gestrichelten Linien geben putative Sp1-Motive und die roten durchgezogenen Linien putative Egr-Bindestellen an.

In den Extrakten von unstimulierten Mel 888 Zellen konnten fünf spezifische Komplexe, die mit Oligo 3 gebildet wurden, beobachtet werden, welche durch entweder das Egr-Konsensus-Oligonukleotid oder die Sp1-Konsensus-Sequenz beeinflusst wurden (Abb. 4.12). Die Bildung von Komplex I, II, V und VI konnte durch das nicht-markierte Sp1-Konsensus-Oligonukleotid, aber nicht durch die mutierte Sp1-Konsensus-Sequenz, inhibiert oder vermindert werden. Daraus kann man schließen, dass Komplex I, II, V und VI aus Sp1 und/oder Sp3, welche die gleiche Konsensus-Sequenz teilen, gebunden an Oligo 3 besteht. Der Komplex III wird durch das Egr-Konsensus-Oligonukleotid, aber nicht durch die mutierte Egr-Konsensus-Sequenz blockiert, was darauf hindeutet, dass Komplex III ein Mitglied der Egr-Familie enthält. Die Bildung von Komplex IV wird nicht durch Kompetition mit der Egr- oder Sp1-Konsensus-Sequenz beeinflusst.

Nach Stimulation mit PMA erscheinen drei Banden, Komplex IVa, Va und VII. Alle drei Komplexe werden durch die Egr-Konsensus-Sequenz, aber nicht durch die mutierte Egr-Konsensus-Sequenz oder die Sp1-Oligonukleotide, inhibiert. Dieses Ergebnis zeigt, dass Mitglieder der Egr-Familie, die in unstimulierten Zellen nicht detektierbar sind, nach PMA-Stimulation an das Nab2 Oligo 3 binden können. Obwohl sowohl Komplex IV und IVa als auch V und Va eine vergleichbare elektrophoretische Mobilität besitzen, migrieren Komplex IV und V etwas schneller und werden durch die Egr-Konsensus-Sequenz nicht beeinflusst. Komplex III ist in stimulierten Zellen stärker vorhanden als in unstimulierten

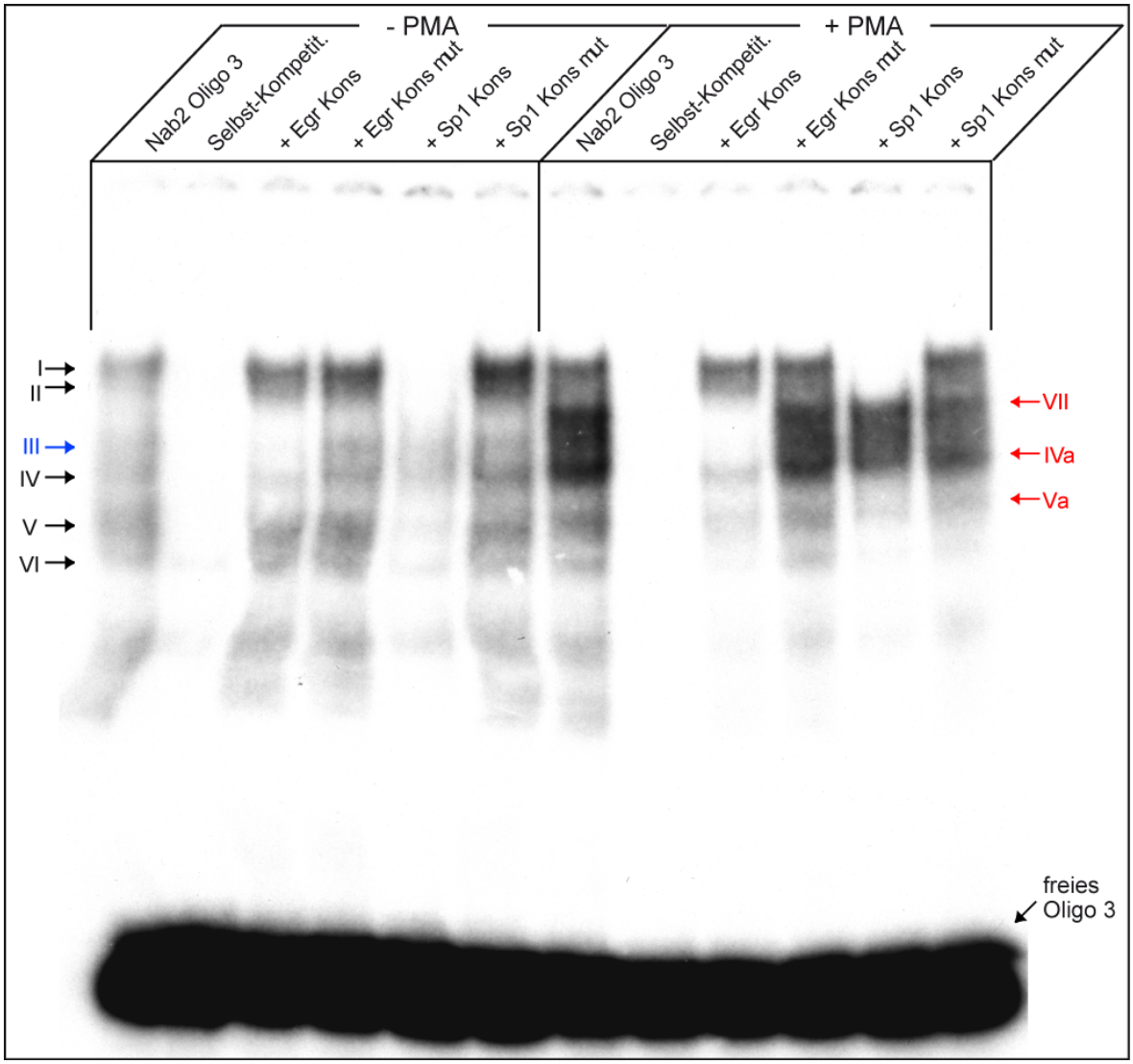


Abb. 4.12 Bindung von Mitgliedern der Egr- und Sp1-Familie an dem Nab2-Promotor. Kernextrakte von PMA-stimulierten oder unstimulierten Mel 888 Zellen wurden mit dem ^{32}P-markierten Nab2 Oligonukleotid 3 zusammen mit den angezeigten unmarkierten Egr oder Sp1 Kompetitions-Oligonukleotiden inkubiert und in einer nativen Polyacrylamid-Gelelektrophorese (PAGE) aufgetrennt (Kap. 3.4.2). Die durch Egr- oder Sp1-Konsensus-Oligonukleotide blockier- oder reduzierbaren Komplexe sind mit römischen Zahlen nummeriert. Nach PMA-Stimulation neu entstehende Komplexe sind durch rote Pfeile markiert. Ein durch Behandlung mit PMA verstärkt auftretender Komplex ist in blau angezeigt. Mit den Nab2 Oligonukleotiden 1 und 2 wurden vergleichbare Ergebnisse erzielt. Nab2 Oligo = keine Kompetition. Kons = Konsensus-Sequenz-Oligonukleotid. Kons mut = mutierte Konsensus-Sequenz; durch den Austausch von zwei oder vier Nukleotiden (Kap. 2.1.5.3) in der Konsensus-Sequenz können die Transkriptionsfaktoren der jeweiligen Familie nicht mehr binden.

Zellen. Die Intensität von Komplex I, II, V und VI wird durch Stimulation mit PMA nicht beeinflusst, welches ein weiteres Indiz für das Vorhandensein der nicht-induzierbaren Faktoren Sp1 und Sp3 in diesen Komplexen liefert.

Vergleichbare Ergebnisse konnten nach Verwendung der radioaktiv-markierten Nab2-Oligonukleotide 1 und 2 beobachtet werden (nicht gezeigt).

Wie in Kap 4.1.8 beschrieben, ist die Region zwischen –329 bp und –263 bp wichtig für die Induktion des Nab2-Promotors durch Phorbolester. Die Gelretardationsanalyse dieser Region lässt vermuten, dass Mitglieder der Egr-Familie, welche die Komplexe IVa, Va und VII mit den verwendeten Oligonukleotiden bilden, dadurch, dass diese Komplexe nur in stimulierten Zellen gefunden werden, in diese Induktion involviert sind. Die Proteine, welche die Komplexe I, II, IV, V, VI und den, durch die Egr-Konsensus-Sequenz blockierbaren, Komplex III mit den Oligonukleotiden bilden, sind vermutlich an der basalen Aktivität dieser Region im Nab2-Promotor beteiligt, da sie sowohl in unstimulierten, als auch in stimulierten Zellen in gleichem Maße gefunden wurden.

Um die Proteine, welche an die drei Nab2-Oligonukleotide gebunden haben, zu identifizieren, wurden die Kernextrakte mit Antikörpern spezifisch für Egr-1, Sp1 und Sp3 präinkubiert. Vergleichbare Resultate wurden mit allen drei Oligonukleotiden erzielt.

Präinkubation mit dem Sp1 spezifischen Antikörper eliminierte Komplex I, reduzierte die Bildung von Komplex II und führte zur Ausbildung von super-retardierten Komplexen in Kernextrakten aus stimulierten und unstimulierten Zellen (Abb. 4.13). Die Bildung der Komplexe V und VI wurde nicht beeinflusst. Diese Ergebnisse zeigen, dass der mit allen drei Nab2-Oligonukleotiden interagierende Faktor in Komplex I Sp1 ist. Gleiche Experimente mit einem spezifischen Antikörper für Sp3 bewiesen, dass dieser Transkriptionsfaktor in Komplex II vorhanden ist (nicht gezeigt). Unter den Bedingungen, die für die anti-Egr-1-Antikörper Präinkubation benötigt werden, sind die Sp1- und Sp3-Komplexe nicht detektierbar, während die Egr-Komplexe III, IVa, Va und VII in PMA-stimulierten Zellen eindeutig erkannt werden können. Der Egr-1-Antikörper blockierte die Bildung von Komplex VII, wodurch Egr-1 als das Protein identifiziert wurde, welches mit den drei Nab2-Oligonukleotiden, die den Bereich zwischen –329 bp und –260 bp umfassen, den Komplex VII bildet. Die Tatsache, dass die Komplexe IVa und Va nicht durch den Egr-1-Antikörper, aber durch die Egr-Konsensus-Sequenz beeinflusst wurde, deutet daraufhin, dass zwei weitere Mitglieder der Egr-Familie nach PMA-Stimulation an diese Region des Nab2-Promotors binden können.

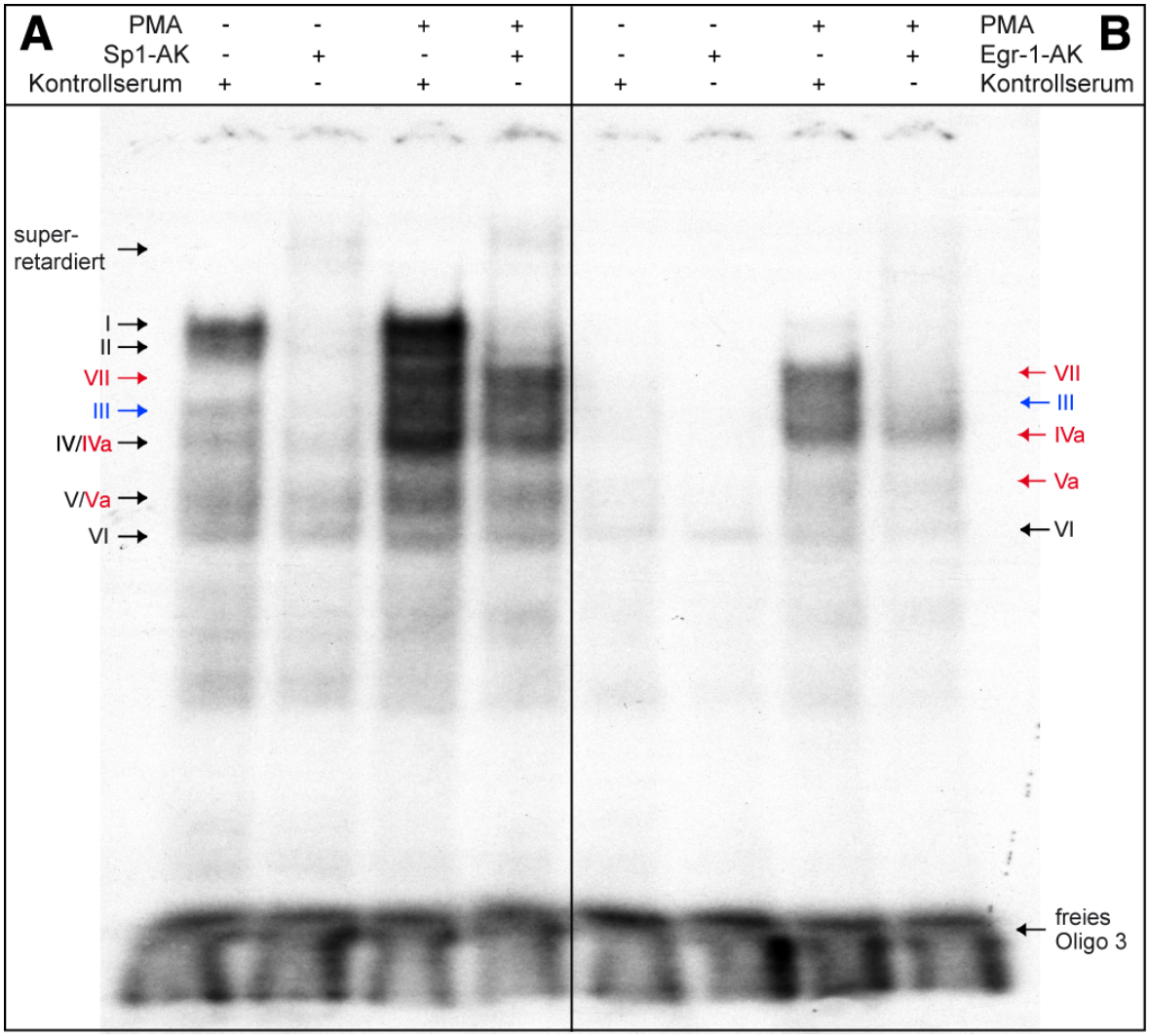


Abb. 4.13 Egr-1 bindet nach Stimulation mit PMA an die Region –329 bis –260 bp des Nab2-Promotors, während die Bindung von Sp1 nicht durch PMA beeinflusst wird. Kernextrakte von entweder unbehandelten oder für 3 h mit PMA stimulierten Mel 888 Zellen wurden nach Präinkubation mit dem Sp1- (**A**) oder Egr-1-spezifischen (**B**) Antikörper oder dem Kontrollserum mit dem ^{32}P-markierten Nab2 Oligonukleotid 3 inkubiert und in einer nativen Polyacrylamid-Gelelektrophorese aufgetrennt (Kap. 3.4.2). Die durch Egr- oder Sp1-Konsensus-Oligonukleotide blockier- oder reduzierbaren Komplexe (siehe Abb. 4.12) sind mit römischen Zahlen nummeriert. Nach PMA-Stimulation neu entstehende Komplexe sind durch rote Pfeile markiert. Ein durch Behandlung mit PMA verstärkt auftretender Komplex ist in blau angezeigt. Mit den Nab2 Oligonukleotiden 1 und 2 wurden vergleichbare Ergebnisse erzielt. **A,** Die Präinkubation mit dem Sp1-spezifischen Antikörper oder dem Kontrollserum erfolgte bei 4°C. **B,** Die Präinkubation mit dem Egr-1-spezifischen Antikörper oder dem Kontrollserum wurde bei RT durchgeführt.

Diese Ergebnisse demonstrieren, dass Stimulation mit PMA die Bindung von Egr-1 und weiteren Mitgliedern der Egr-Familie an das Haupt-regulatorische-Element von –329 bp bis –263 bp im Nab2-Promotor, welches mehrere überlappende Egr/Sp1-Motive enthält, induziert, während das Bindeverhalten von Sp1 und Sp3 unverändert bleibt. Des Weiteren konnte gezeigt werden, dass ein Mitglied der Egr-Familie auch in unstimulierten Zellen an diese Region des Nab2-Promotors binden kann.

4.1.12 Depletion von *Egr-1* führt zur Reduktion der *Nab2*-Expression

Um den Einfluss von Egr-1 auf die Regulation der Nab2-Expression zu zeigen, wurden zwei unterschiedliche *short interfering* (si) RNAs gegen Egr-1 (Egr-1-2 und Egr-1-3) und eine Negativ-Kontroll-siRNA (Kontrolle-1), die keine Ähnlichkeit mit humanen Gensequenzen hat, in Hela L-Zellen transfiziert (Kap. 3.1.4.3). Nach 48 h wurden die Zellen mit PMA stimuliert und nach 20 min und 1 h die *Egr-1*- und *Nab2*-Expression mittels semiquantitativer RT-PCR untersucht.

In Abb. 4.14 ist erkennbar, dass die Hela L-Zelllinie sowohl *Egr-1*- als auch *Nab2*–mRNA unter normalen Wachstumsbedingungen exprimiert. Die Transfektion der Kontroll-siRNA hat das typische Expressionsmuster von *Egr-1* und *Nab2* nicht beeinflusst. Nach PMA-Stimulation konnte eine 3-fache Induktion von *Egr-1* nach 20 min beobachtet werden, die nach 1 h auf das 4-fache anstieg, während eine 2-fache Induktion von *Nab2* erst nach 1 h Behandlung mit PMA gezeigt werden konnte. Die Transfektion der beiden siRNAs, die gegen *Egr-1* gerichtet sind, resultierte in einer Reduktion der basalen *Egr-1*-Expression von 40% (Egr-1-2) beziehungsweise 70% (Egr-1-3). Obwohl die Behandlung mit PMA auch in mit Egr-1-siRNA transfizierten Zellen nach 20 min *Egr-1* induzierte, war die *Egr-1*-mRNA-Expression im Vergleich zu den Kontrollzellen um 60% in mit Egr-1-2 und 70% in mit Egr-1-3 transfizierten Zellen reduziert. Im Gegensatz zu den mit Kontroll-siRNA behandelten Zellen konnte kein weiterer Anstieg der *Egr-1*-Expression nachgewiesen werden. Die Depletion von *Egr-1* beeinflusste auch die *Nab2*-Expression. Die Transfektion der Egr-1-siRNAs reduzierte die basale *Nab2*-Expression um 65% (Egr-1-2) und 80% (Egr-1-3). Nach PMA-Stimulation für 1 h konnte zwar ein Anstieg der *Nab2*-Expression beobachtet werden, aber die *Nab2*-mRNA-Menge war im Vergleich zu den Kontrollzellen um 70% reduziert.

Die Transfektion von beiden siRNAs, die gegen unterschiedliche Bereiche der *Egr-1*-mRNA gerichtet sind, inhibierte nicht nur die *Egr-1*-Expression, sondern resultierte auch in einer Abnahme der *Nab2*-Expression. Diese Ergebnisse bestätigen, dass endogenes Egr-1 einen signifikanten Einfluss auf die Regulation der *Nab2*-Expression hat.

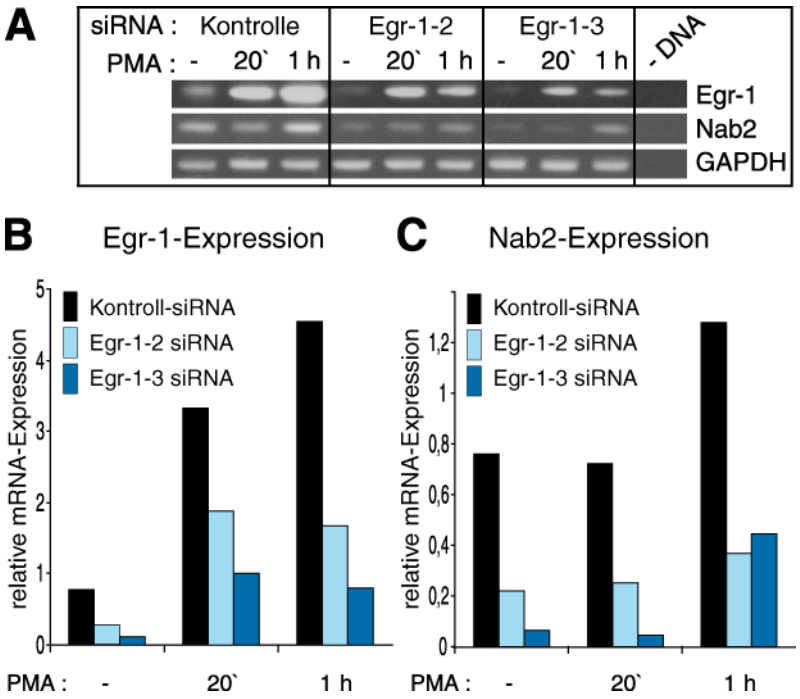


Abb. 4.14 Depletion von *Egr-1* führt zu einer Reduktion der *Nab2*-Expression. Hela L-Zellen wurden mit Kontroll-siRNA und 2 gegen unterschiedliche Bereiche der *Egr-1*-mRNA gerichtete siRNAs (Egr-1-2 und Egr-1-3) mittels siPORT™ *NeoFX*™ in einer Endkonzentration von 50 nM transfiziert (Kap. 3.1.4.3). Nach 48 h wurden die Zellen mit PMA stimuliert und nach 20 min und 1 h die RNA präpariert. Die Expression der *Egr-1*- und *Nab2*-mRNA wurde mittels semiquantitativer RT-PCR analysiert. **A,** Die PCR-Amplifikate wurden in einem 1% Agarose-Gel aufgetrennt. –DNA = Negativ-Kontrolle. Nach densitometrischer Auswertung der Banden ist die relative *Egr-1*- (**B**) und *Nab2*- (**C**) mRNA-Expression im Verhältnis zur *GAPDH*-Expression, welche als 1 gesetzt wurde, dargestellt (Kap. 3.3.4).

4.1.13 Einfluss der Depletion von *Egr-2* und *Egr-3* auf die endogene *Nab2*-Expression

Die Ergebnisse in beispielsweise Kap. 4.1.6 deuten auf eine komplexe Regulation der Nab2-Expression nicht nur durch Egr-1, sondern auch durch Egr-2 und Egr-3 hin. Um den Einfluss von Egr-2 und Egr-3 auf die endogene *Nab2*-Expression zu untersuchen, sollte die *Egr-2*- oder *Egr-3*-Expression in Zelllinien durch Transfektion von siRNAs (Kap. 3.1.4.3), die gegen *Egr-2* oder *Egr-3* gerichtet sind, vermindert werden. Die Reduktion der *Egr-2*- und *Egr-3*-mRNA-Expression und der Einfluss auf die *Nab2*-mRNA-Expression wurden mittels semiquantitativer Real time PCR (Kap. 3.3.5) bestimmt.

Da es sich bei *Egr-1*, *Egr-2*, *Egr-3* und *Nab2* in der Regel um leicht induzierbare Gene handelt, sollte zunächst der Einfluss von sechs verschiedenen Negativ-Kontroll-siRNAs, die keine Ähnlichkeit mit humanen Gensequenzen haben, auf die Expression der zu untersuchenden Gene bestimmt werden. Nach Transfektion der Kontroll-siRNAs in Colo

320 DM Zellen zeigte sich (siehe Abb. 4.15), dass vor allem Kontrolle 2 und 4 die mRNA-Expression der Transkriptionsfaktoren der Egr-Familie und von Nab2 im Vergleich zu untransfizierten Zellen signifikant beeinflussen, so dass für folgende Experimente die Kontrollen 1, 3 und 5 verwendet wurden.

Da es möglicherweise abhängig von Inkubationszeiten oder siRNA-Mengen auch durch diese Kontrollen zu Abweichungen in der Expression kommen könnte, wurden in jedem Versuch immer mindestens zwei verschiedene Kontroll-siRNAs benutzt.

Des Weiteren ist erkennbar, dass in den Colo 320 DM Zellen eine sehr schwache *Egr-2*- und *Egr-3*-Expression vorliegt, welches zu Ungenauigkeiten in der Quantifizierung führt, so dass Zellen mit einer stärkeren Expression dieser Transkriptionsfaktoren benötigt wurden. Da die in Kap. 4.1.12 verwendeten Zervixkarzinomzellen Hela L ebenfalls eine äußerst geringe *Egr-2* und *Egr-3*-Expression aufweisen (siehe auch Kap. 4.3.2), welche zusätzlich nur schwach induzierbar ist, konnte diese Zelllinie nicht benutzt werden.

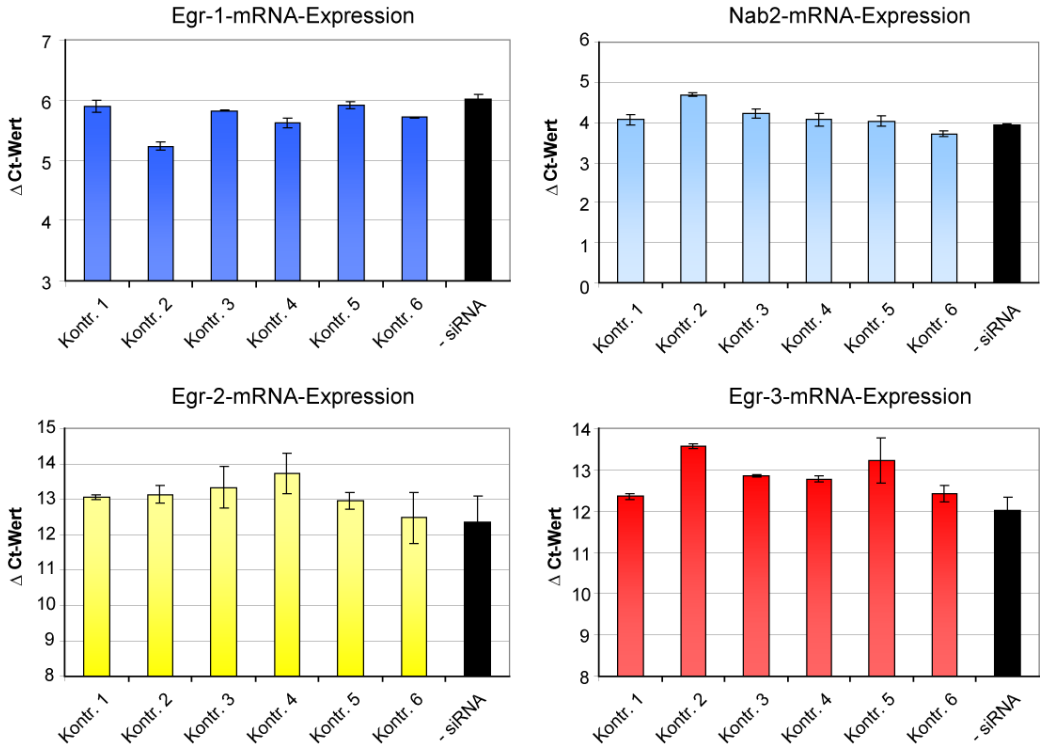


Abb. 4.15 Einfluss von verschiedenen Kontroll-siRNAs auf die *Egr-1*-, *Egr-2*-, *Egr-3*- und *Nab2*-Expression. Colo 320 DM Zellen wurden mit sechs verschiedenen Kontroll-siRNAs (Kontr. 1-6) in einer Endkonzentration von 30 nM mittels siPORT^{TM} *NeoFX*^{TM} transfiziert (Kap. 3.1.4.3). Parallel dazu wurden Colo 320 DM Zellen als Kontrolle für die endogene Expression (-siRNA, schwarzer Balken) in gleicher Weise, allerdings ohne Verwendung des Transfektionsreagenz und siRNA, ausplattiert und kultiviert. Nach 48 h wurde die RNA der transfizierten und untransfizierten Zellen präpariert und die Expression der *Egr-1*-, *Egr-2*-, *Egr-3*- und *Nab2*-mRNA mittels semiquantitativer Real time PCR (Kap. 3.3.5) analysiert. Angegeben sind die Mittelwerte der erhaltenen ΔC_t-Werte aus Triplikaten und die Standardabweichung.

Daraufhin wurde die Transfizierbarkeit von drei Melanomzellen (Mel 888, Mel Ei, SK-MEL-23) und der Adenovirus-transformierten Nierenepithel-Zelllinie 293 mit starker *Egr-2*- und *Egr-3*-Expression bestimmt. Dazu wurden die Zellen mit einer als Positiv-Kontrolle dienenden siRNA gegen KIF11 transfiziert. KIF11 ist ein Motorprotein, welches an der Chromosomen-Positionierung während der Mitose beteiligt ist, so dass die Reduktion von KIF11 nach 24 - 48 h zu mitotischem Arrest führt (Weil et al., 2002). Eine resultierende morphologische Veränderung der Zellen kann mikroskopisch ausgewertet werden. In allen Zelllinien außer Mel Ei konnte eine Veränderung der Morphologie in 30 – 40 % der Zellen beobachtet werden (nicht gezeigt). Zusätzlich wurde die *KIF11*-mRNA-Expression in den mit KIF11-siRNA transfizierten Zelllinien bestimmt. In Abb. 4.16 ist zu erkennen, dass eine effiziente Reduktion der *KIF11*-mRNA-Expression in allen Zelllinien bis auf Mel Ei erreicht wurde, so dass der Einfluss der gegen Egr-2 und Egr-3 gerichteten siRNAs in den Melanomzellen SK-MEL-23 und Mel 888 untersucht wurde.

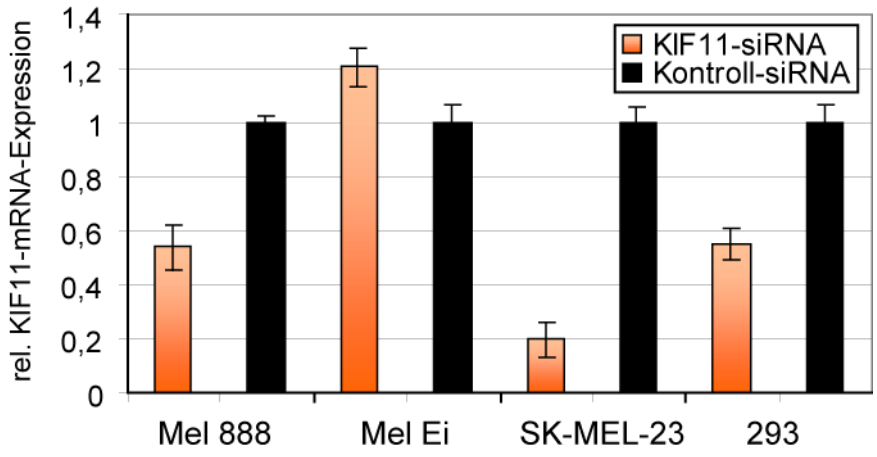


Abb. 4.16 Bestimmung der Transfizierbarkeit von Zelllinien mit starker *Egr-2*- und *Egr-3*-Expression. Mel 888, Mel Ei, SK-MEL 23 und 293 Zellen wurden mit, der als Positivkontrolle dienenden, KIF11-siRNA sowie den Negativkontrollen 3 und 5 in einer in einer Endkonzentration von 10 nM mittels siPORT^{TM} *NeoFX*^{TM} transfiziert (Kap. 3.1.4.3). Nach 24 h wurde die RNA präpariert und die *KIF11*-mRNA-Expression in Duplikaten mittels semiquantitativer Real time PCR (Kap. 3.3.5) analysiert. Dargestellt ist die relative *KIF11*-mRNA-Expression bezogen auf die *KIF11*-Expression nach Transfektion der Negativkontrollen und die Standardabweichung. Dazu wurde der Mittelwert der ΔC_t-Werte der Negativkontrollen 3 und 5 verwendet.

Die Analyse der mRNA-Expression erfolgte in SK-MEL-23 Zellen 24 h nach der Transfektion der siRNAs. Wie in Abb. 4.17 A gezeigt ist, konnte nach Transfektion der gegen Egr-2 gerichteten siRNA eine 46%ige Reduktion der *Egr-2*-Expression erreicht werden, welche in einer leichten Reduktion der *Egr-3*-Expression um 10% und einer Depletion der *Nab2*-Expression um 34% resultierte. Eine 26%ige Verminderung der *Egr-3*-Expression nach Transfektion der gegen Egr-3 gerichteten siRNA reduzierte die *Egr-2*-Expression um 21% und die *Nab2*-Expression um 39%. Die *Egr-1*-Expression wurde durch beide siRNAs nicht beeinflusst.

Da in Mel 888 Zellen 24 h nach der siRNA-Transfektion keine effiziente Reduktion der *Egr-2*- und *Egr-3*-Expression beobachtet werden konnte, ist in Abb. 4.17 B die mRNA-Expression 48 h nach der Transfektion dargestellt. Nach Transfektion der gegen Egr-2 gerichteten siRNA wurde die *Egr-2*-Expression um 36% reduziert, welches zu einer Erhöhung der *Egr-1*-Expression um 57%, der *Egr-3*-Expression um 27% und der *Nab2*-Expression um 40% führte. Die Reduktion der *Egr-3*-mRNA-Menge durch die gegen Egr-3 gerichtete siRNA um 38% resultierte in einem Anstieg der *Egr-1*-Expression um 61%, der *Egr-2*-Expression um 23% und der *Nab2*-Expression um 38%.

In beiden Zelllinien konnte gezeigt werden, dass sowohl endogenes Egr-2 als auch Egr-3 einen Einfluss auf die Regulation der *Nab2*-Expression haben. Allerdings führte die jeweilige Reduktion von *Egr-2* oder *Egr-3* in SK-MEL-23 zu einer Reduktion der *Nab2*-Expression, während in Mel 888 die Reduktion durch Hochregulation der anderen Mitglieder der Egr-Familie kompensiert wurde und dementsprechend zu einer Erhöhung der *Nab2*-Expression führte.

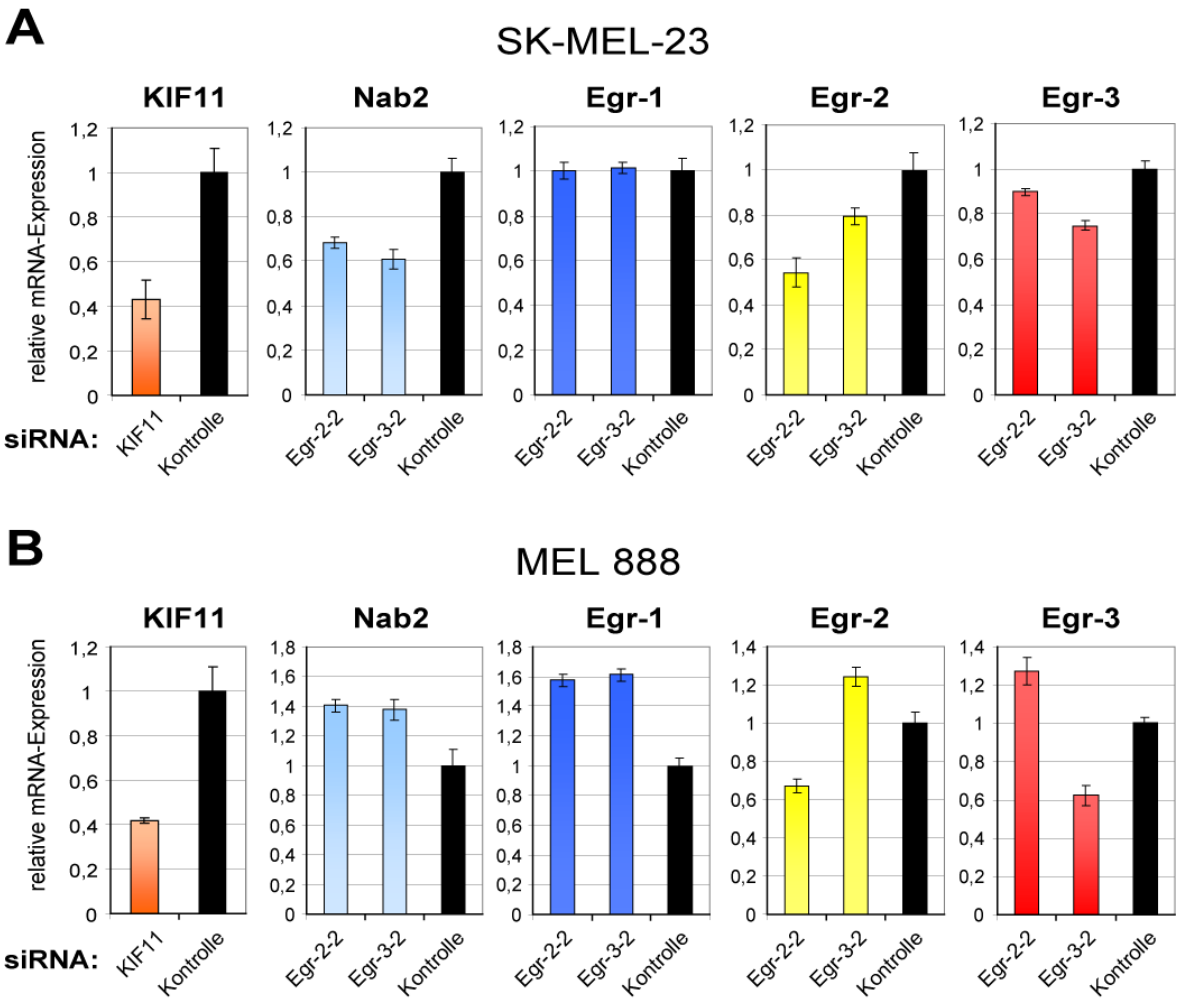


Abb. 4.17 Einfluss der Depletion von *Egr-2* oder *Egr-3* in SK-MEL-23 und Mel 888 Zellen auf die *Nab2*-Expression. SK-MEL-23 (**A**) und Mel 888 (**B**) Zellen wurden mit, der als Positivkontrolle dienenden, KIF11-siRNA und mit den gegen Egr-2 (Egr-2-2) und gegen Egr-3 (Egr-3-2) gerichteten siRNAs, sowie den Negativkontrollen 3 und 5 mittels siPORT^{TM} *NeoFX*^{TM} transfiziert (Kap. 3.1.4.3). Die SK-MEL-23 Zellen (**A**) wurden mit 30 pmol (Endkonzentration 30 nM) der siRNAs transfiziert und nach 24 h geerntet. Eine 40 nM Endkonzentration der siRNAs wurde in Mel 888 Zellen (**B**), welche nach 48 h geerntet wurden, verwendet. Anschließend wurde die RNA präpariert und die mRNA-Expression von *KIF11*, *Egr-1*, *Egr-2*, *Egr-3* und *Nab2* in Triplikaten durch semiquantitative Real time PCR (Kap. 3.3.5) analysiert. Dargestellt ist die relative mRNA-Expression bezogen auf die entsprechende Expression nach Transfektion der Negativkontrollen und die Standardabweichung. Dazu wurden die Mittelwerte der ΔC_t-Werte der Negativkontrollen 3 und 5 verwendet.

Während die Zelllinie SK-MEL-23 aus einer Metastase generiert wurde, sind Mel 888 Zellen von einem Primärtumor abgeleitet, wodurch Unterschiede in den Expressionsstärken der Transkriptionsfakoren der Egr-Familie und Nab2, aber auch anderer Faktoren vorliegen könnten, die zu diesen differierenden Mechanismen führen könnten. Deswegen wurden die Expressionsstärken von *Egr-1*, *Egr-2*, *Egr-3* und *Nab2* im Verhältnis zu dem Haushaltsgen Glucose-6-phosphat-dehydrogenase (*G6PD*) in beiden Zelllinien zum Zeitpunkt der Bestimmung der siRNA-Effekte errechnet.

Wie in Abb. 4.18 zu erkennen ist, liegt in SK-MEL-23 eine signifikant höhere *Egr-1*- und *Egr-2*-, aber eine geringere *Egr-3*- und *Nab2*-Expression vor als in Mel 888.

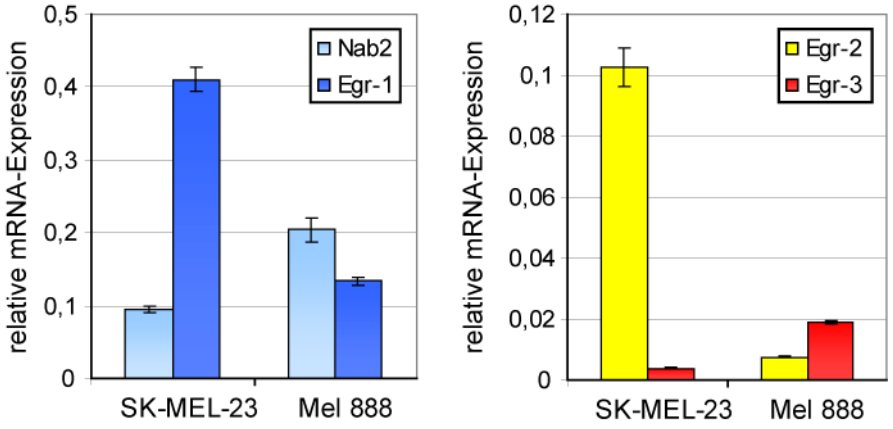


Abb. 4.18 Untersuchung der Expressionsstärke von *Egr-1, Egr-2, Egr-3* und *Nab2* in Mel 888 und SK-MEL-23 Zellen. SK-MEL-23 (**A**) und Mel 888 (**B**) Zellen wurden mit der Negativkontrolle 5 mittels siPORT™ *NeoFX*™ transfiziert (Kap. 3.1.4.3). Die SK-MEL-23 Zellen (**A**) wurden mit 30 pmol (Endkonzentration 30 nM) der siRNAs transfiziert und nach 24 h geerntet. Eine 40 nM Endkonzentration der siRNAs wurde in Mel 888 Zellen (**B**), welche nach 48 h geerntet wurden, verwendet. Anschließend wurde die RNA präpariert und die mRNA-Expression von *Egr-1*, *Egr-2*, *Egr-3* und *Nab2* durch semiquantitativer Real time PCR (Kap. 3.3.5) analysiert. Dargestellt ist die relative mRNA-Expression bezogen auf die *G6PD*-Expression und die Standardabweichung in Triplikaten.

Die Ergebnisse zeigen, dass endogenes Egr-2 und Egr-3 in die Regulation der Nab2-Expression involviert sind. Zusätzlich deuten die Resultate auf eine differentielle Regulation der Transkriptionsfaktoren der Egr-Familie und von Nab2 in verschiedenen Stadien der Melanomprogression hin.

4.1.14 Kinetik der Expression von *Egr-1, Egr-2, Egr-3* und *Nab2* nach PMA-Stimulation in verschiedenen Zelllinien

Nachdem in den vorigen Experimenten gezeigt werden konnte, dass die Transkriptionsfaktoren der Egr-Familie in die Regulation der Nab2-Expression involviert sind, sollte der Zeitverlauf der Induktion der Egr-Transkriptionsfaktoren und von Nab2 nach PMA-Stimulation genauer untersucht werden.

Um die Kinetik der Expression von Egr-1, Nab2 und der ebenfalls transient induzierbaren Transkriptionsfaktoren Egr-2 und Egr-3 nach PMA-Stimulation zu bestimmen, wurden die mRNA-Mengen von *Egr-1*, *Egr-2*, *Egr-3* und *Nab2* zu fünf verschiedenen Zeitpunkten

nach Stimulation mit PMA in den Melanomzelllinien Mel Ei und SK-MEL-28, sowie den Kolonkarzinomzelllinien Colo 320 DM und LoVo durch semiquantitative Real time PCR (Kap. 3.3.5) bestimmt.

In Abb. 4.19 ist die relative Induktion durch PMA nach 45 min, 1,5 h, 3 h und 14 h im Vergleich zu unstimulierten Zellen in Mel Ei, repräsentativ für beide Melanomzellen, und Colo 320 DM, repräsentativ für Colo 320 DM und LoVo, dargestellt.

Als Antwort auf PMA konnte zuerst eine starke transiente Induktion von *Egr-1* nach 45 min, die ihr Maximum nach 1,5 h erreichte, in allen Zelllinien beobachtet werden. Im Gegensatz zu Mel Ei scheint die durch PMA-induzierte *Egr-1*-Expression in Colo 320 DM länger stabil zu sein, da auch nach 14 h eine 75-fache Induktion vorhanden ist. Eine mit *Egr-1* vergleichbare Induktions-Kinetik konnte in Mel Ei ebenfalls für *Egr-2* und *Egr-3* gezeigt werden, während in Colo 320 DM die Induktion von *Egr-2* und *Egr-3* zeitversetzt zu *Egr-1* erfolgte, so dass ihr Maximum nach 3 h erreicht wurde.

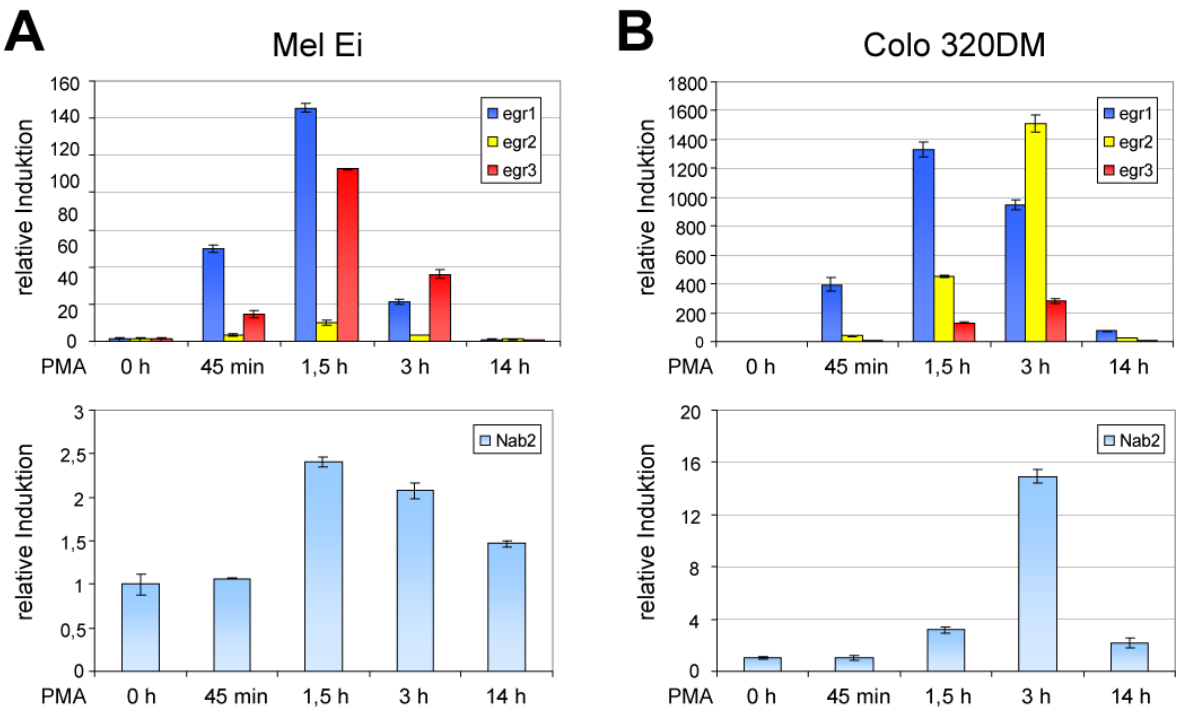


Abb. 4.19 Untersuchung der Kinetik der Expression von *Egr-1, Egr-2, Egr-3* und *Nab2* in Zelllinien mittels quantitativer Real time PCR. Die mRNA-Expression in den Melanomzellen SK-MEL-28 und Mel Ei, sowie in den Kolonkarzinomzellen Colo 320 DM und LoVo wurde mittels semiquantitativer Real time PCR bestimmt (Kap. 3.3.5). Dargestellt ist die relative mRNA-Induktion im Verhältnis zur *G6PD*-Expression in Mel Ei, repräsentativ für beide Melanomzelllinien, und Colo 320 DM, repräsentativ für Colo 320 DM und LoVo, und die Standardabweichung in Triplikaten.

Nach 1,5 h konnte in Mel Ei eine Induktion der *Nab2*-Expression, welche gleichzeitig der maximalen Induktion entsprach, bestimmt werden, die nach 3 h leicht absank und nach 14 h nur noch geringfügig vorhanden war. In Colo 320 DM wurde ein leichter Anstieg der *Nab2*-Expression nach 1,5 h Behandlung mit PMA und erst nach 3 h die maximale *Nab2*-Induktion beobachtet. Insgesamt war die Induzierbarkeit von *Egr-1*, *Egr-2*, *Egr-3* und auch *Nab2* in Colo 320 DM deutlich stärker. Die Berechnung der basalen mRNA-Expression dieser Gene zeigte signifikant geringere mRNA-Mengen, vor allem von *Egr-2* und *Egr-3*, in Colo 320 DM auf (nicht gezeigt), welche die Ursache für die hohen Induktionswerte sein können.

Um eine detaillierte Aufschlüsselung der Expressionskinetiken zu erhalten, wurden acht Zelllinien unterschiedlichen Ursprungs mit PMA stimuliert und anschließend die mRNA-Expression von *Egr-1*, *Egr-2*, *Egr-3* und *Nab2* untersucht. Zelllinien unterschiedlichen Ursprungs wurden an 11 Zeitpunkten zwischen 15 min und 14 h nach bzw. kurz vor der PMA-Stimulation (0 h) geerntet und die mRNA-Expression mittels semiquantitativer RT-PCR bestimmt (Kap. 3.3.4).

Wie in Abb. 4.20 A erkennbar, ist in allen Zelllinien bis auf Colo 320 DM in unstimulierten Zellen *Egr-1*-Expression detektierbar. Bereits nach 15-30-minütiger Behandlung mit PMA steigt die *Egr-1*-Expression an und erreicht ihr Maximum nach ungefähr 30 min bis 1 h. In den Melanomzelllinien Mel 888, Mel Ei, HT 144 und SK-MEL-28 ist die *Egr-1*-Induktion transient, so dass die *Egr-1*-Expression nach 1,5 – 2 h abfällt und nach spätestens 14 h das basale Expressions-Niveau erreicht ist. Im Gegensatz dazu ist die Induktion der *Egr-1*-Expression in Mel JuSo, Colo 320 DM, LoVo und der Adenovirus-transformierten Nierenepithelzelllinie 293 auch nach 14 h weitgehend stabil.

In Mel JuSo und 293 ist die *Egr-2*- und *Egr-3*-Expression ebenfalls auch nach 14 h Behandlung mit PMA stabil, während die Induktion in den restlichen Zelllinien transient ist. Die Induktion von *Egr-2* erfolgt in den Kolonkarzinomzelllinien Colo 320 DM und LoVo um 15 min zeitversetzt zur *Egr-1*-Expression nach 30 - 45 min, erreicht das Maximum nach ca. 2 - 3h und sinkt danach schnell ab. Die *Egr-3*-Expression wird in diesen Zellen ungefähr 15 min nach der *Egr-2*-Expression induziert und der Höchstwert konnte nach 3 h beobachtet werden. In den übrigen Zelllinien erfolgt eine starke Induktion von *Egr-2* und *Egr-3* bereits nach 15-30 min und die maximale Expression kann nach 45 min – 1,5 h nachgewiesen werden. Auch hier zeigte sich, dass *Egr-2* und *Egr-3* etwas zeitversetzt zu *Egr-1* durch PMA induziert werden. Interessanterweise konnte in allen

Melanomzelllinien und der Adenovirus-transformierten Nierenepithelzelllinie 293, im Gegensatz zu den beiden Kolonkarzinomzellen, eine basale Expression von *Egr-2* und *Egr-3* nachgewiesen werden.

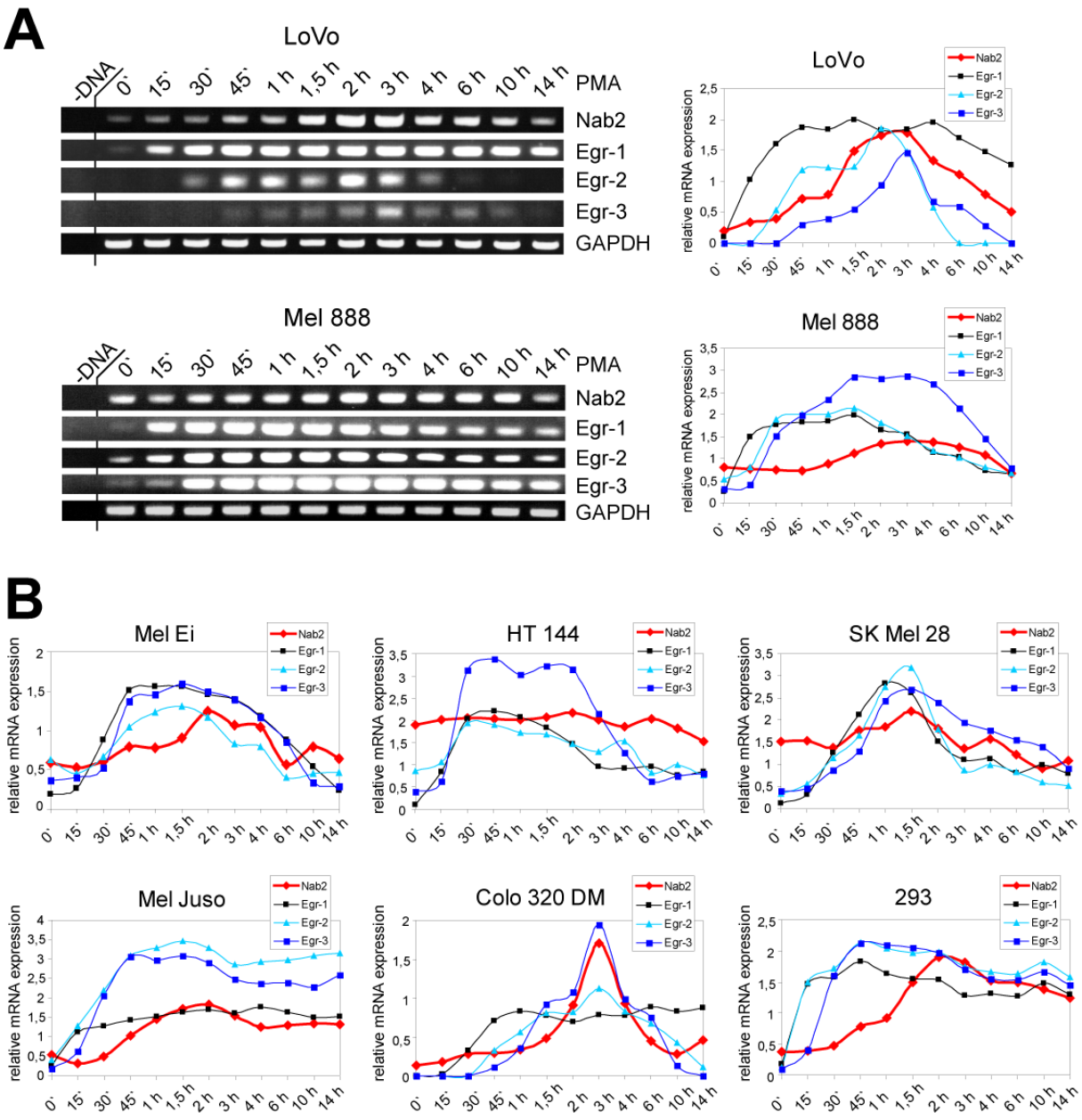


Abb. 4.20 Kinetik der Expression von *Egr-1*, *Egr-2*, *Egr-3* und *Nab2* in verschiedenen Zelllinien. Die angegebenen Zellen wurden 15 min - 14 h nach bzw. kurz vor PMA-Stimulation (0 h) geerntet und die mRNA-Expression mittels semiquantitativer RT-PCR bestimmt (Kap. 3.3.4). **A, links,** beispielhafte Auftrennung der PCR-Amplifikate in einem 1% Agarose-Gel von LoVo und Mel 888. –DNA = Negativ-Kontrolle. **Rechts,** Nach densitometrischer Auswertung der Banden ist die relative mRNA-Expression in LoVo und Mel 888 im Verhältnis zur *GAPDH*-Expression, welche als 1 gesetzt wurde, zu den angegebenen Zeitpunkten nach PMA-Stimulation dargestellt. **B,** die relative mRNA-Expression ist wie in Teilabb. A, rechts für weitere Zelllinien bestimmt und abgebildet worden.

Nab2-Expression konnte in allen Zelllinien ohne Stimulation durch PMA erkannt werden. Allerdings war diese in den Melanomzellen höher als in den restlichen Zellen. In allen Melanomzellen außer Mel JuSo und HT 144 konnte nach 1,5 – 2 h eine leichte transiente Erhöhung der *Nab2*-mRNA beobachtet werden, während in den beiden Kolonkarzinomzellen die maximale Expression nach ungefähr 3 h erreicht und transient war. In Mel JuSo und 293 konnte im Gegensatz zu allen anderen Zelllinien nicht nur eine frühere *Nab2*-Induktion sondern eine auch nach 14 h weitgehend stabile PMA-vermittelte Expression von *Nab2* gezeigt werden.

Zusammenfassend kann gesagt werden, dass als Antwort auf PMA zuerst die Transkription von *Egr-1* und daraufhin von *Egr-2* und *Egr-3* induziert wird. Eine leichte Induktion der *Nab2*-Expression konnte nach 45 min Stimulation, nachdem bereits große Mengen an *Egr-1*- aber geringe Mengen an *Egr-2*- und *Egr-3*-mRNA vorlagen, beobachtet werden. Die maximale Induktion von *Nab2* erfolgte allerdings erst kurz nach der von *Egr-2* und *Egr-3*. In den Zelllinien, in denen eine verlängerte Induktion von nicht nur *Egr-1*, sondern auch *Egr-2* und *Egr-3* vorlag, konnte eine verlängerte Expression von *Nab2* erkannt werden. Des Weiteren erfolgte eine frühere Induktion der Egr-Moleküle und von *Nab2* in den Melanomzellen und 293 als in den Kolonkarzinomzellen.

Im Zusammenhang mit den Ergebnissen aus den vorigen Kapiteln deuten diese Resultate an, dass die Transkriptionsfaktoren der Egr-Familie dahingehend in die Regulation der Induktion von Nab2 involviert sind, dass Egr-1 an einer schnellen schwachen Nab2-Induktion und Egr-2 und Egr-3 an der Aufrechterhaltung und der maximalen durch PMA-induzierten Nab2-Expression beteiligt sind.

4.1.15 Untersuchung der Induzierbarkeit von Volllängen-*Nab2* und drop8-*Nab2* durch die Egr-Transkriptionsfaktoren und Phorbolester

Zusätzlich zum Volllängen-Nab2 (VL) existiert die Spleißvariante drop8-Nab2, der Exon 6 fehlt. Da in Kap. 4.1.5 gezeigt wurde, dass nach Transfektion von Egr-1, Egr-2 oder Egr-3 endogene Nab2-Expression induziert wurde, sollte der Einfluss der transfizierten Egr-Expressionsplasmide auf eine mögliche differentielle Aktivierung der Expression der beiden Nab2-Varianten untersucht werden.

Die Unterschiede in Expression und Induzierbarkeit beider Varianten können in der semiquantitativen RT-PCR bestimmt werden, indem für die spezifische PCR Oligonukleotide gewählt weden, die in Exon 2 und Exon 7 binden (Kap. 3.3.2). Dadurch

entsteht, wenn Exon 6 vorhanden ist, ein 694 bp großes Amplifikat, während ohne Exon 6 ein kleineres Fragment der Größe 502 bp gebildet wird. In vereinzelten Fällen tritt ein unerwartetes Fragment der Größe 640 bp auf, welches durch Klonierung und anschließende Sequenzierung allerdings als Heteroduplex bestehend aus VL-*Nab2* und drop8-*Nab2* identifiziert wurde (Peterhoff, 2005).
Nach Transfektion der Kontrollplasmide zeigte sich, dass die in Kap. 4.1.5 beschriebene, vermutlich durch die Transfektionsmethodik induzierte, Erhöhung der Gesamt-*Nab2*-Expression im Vergleich zu untransfizierten Colo 320 DM auf einer Verdoppelung der drop8-Expression beruht, während die bestimmten VL-Werte ungefähr gleich sind.
Im Vergleich zu den Kontrollen konnte nach Transfektion der Expressionsplasmide für Egr-1, Egr-2 und Egr-3 eine Erhöhung der VL-mRNA-Menge, aber eine deutlich stärkere Induktion der drop-8-Expression nachgewiesen werden.
Nach 1 h Stimulation mit PMA konnte nur eine Erhöhung der drop8-Expression beobachtet werden, während weitere Behandlung mit PMA für 3 h sowohl in einer starken Induktion der Expression der VL-, als auch der drop8-Isoform resultierte.

Daraufhin wurde die differentielle mRNA-Expression von Volllängen-*Nab2* und drop8-*Nab2* nach 3 h PMA-Stimulation in weiteren Zelllinien untersucht.

Wie in Abb. 4.22 dargestellt, sind in allen Zelllinien beide *Nab2*-Varianten in unstimulierten Zellen detektierbar. Während in den Kolonkarzinomzellen in etwa gleich viel VL und drop8 bestimmt wurde, ist in den Melanomzelllinien und 293 mehr VL als drop8 vorhanden. In den aus Metastasen abgeleiten Melanomzellen Mel Ei und HT 144 war der Unterschied an VL im Verhältnis zu drop8 am größten.

Nach 3 h Stimulation mit PMA konnte eine deutliche Induktion von VL in LoVo, Colo 320 DM und 293 beobachtet werden, während in den Melanomzelllinien nur eine geringfügige Induktion von VL gezeigt werden konnte.
Interessanterweise steigt die drop8-Expression in allen Zelllinien stärker an als die VL-Expression. Eine deutlich stärkere Erhöhung der drop8-Expression als in den Melanomzelllinien konnte in LoVo, Colo 320 DM und 293 beobachtet werden. In den Zelllinien LoVo, Colo 320 DM und 293 wurde nach 3 h Behandlung mit PMA ungefähr 50% mehr drop8 als VL exprimiert, während in den aus Primärtumoren abgeleiteten Mel 888 und Mel JuSo eine ähnliche Expressionsstärke beider Varianten vorlag. Die aus Metastasen abgeleiteten Mel Ei und HT 144 zeigten auch nach Stimulation eine signifikant geringere drop8- als VL-Expression.

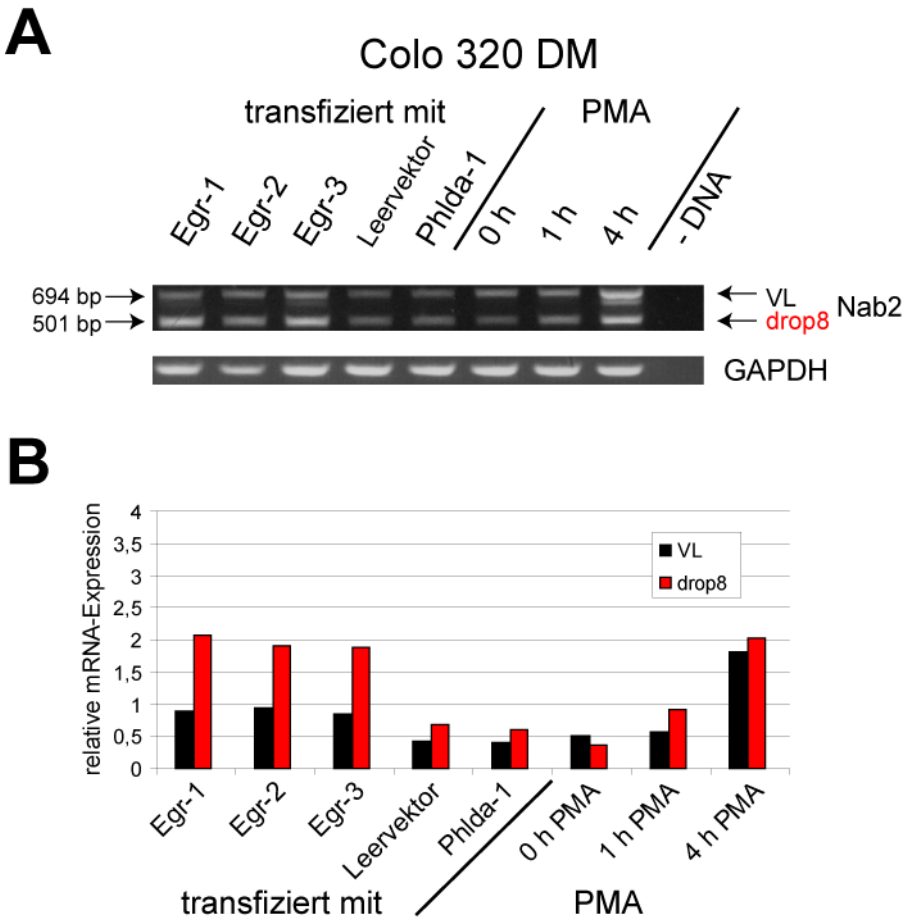


Abb. 4.21 Einfluss von Egr-1, Egr-2, Egr-3 oder Phorbolester auf die Expression von Volllängen-*Nab2* und der Spleißvariante drop8-*Nab2*. Colo 320 DM Zellen wurden mit 40 ng von Expressionskonstrukten für Egr-1, Egr-2, Egr-3 und als Kontrollen dem Leervektor und dem Phlda-1 exprimierenden Vektor in 6-Loch-Platten mittels MATra transfiziert (Kap. 3.1.4) und nach 48 h mittels semiquantitativer RT-PCR (Kap. 3.3.4) analysiert. Parallel dazu wurden Colo 320 DM ausgesät und für 1 h und 4 h mit PMA stimuliert (Kap. 3.1.3). Daraufhin erfolgte die Analyse der mRNA-Expression mittels semiquantitativer RT-PCR (Kap. 3.3.4). Der Spleißvariante drop8 fehlt Exon 6. Dementsprechend wurden in der spezifischen PCR Oligonukleotide gewählt, die in Exon 2 und Exon 7 binden (Kap. 3.3.2). Amplifikat mit Exon 6 = 694 bp (VL=Volllängen-Nab2, schwarz); Amplifikat ohne Exon 6 = 502 bp (drop8=drop8-Nab2, rot). **A,** mRNA-Expression von Volllängen-*Nab2*- (VL) und drop8-*Nab2* (rot). Auftrennung der PCR-Amplifikate in einem 1,5% Agarose-Gel. –DNA = Negativ-Kontrolle. **B,** Nach densitometrischer Auswertung der Banden ist die relative mRNA-Expression im Verhältnis zur *GAPDH*-Expression, welche als 1 gesetzt wurde, dargestellt; Volllängen-*Nab2* (VL, schwarzer Balken), drop8-*Nab2* (drop8, roter Balken).

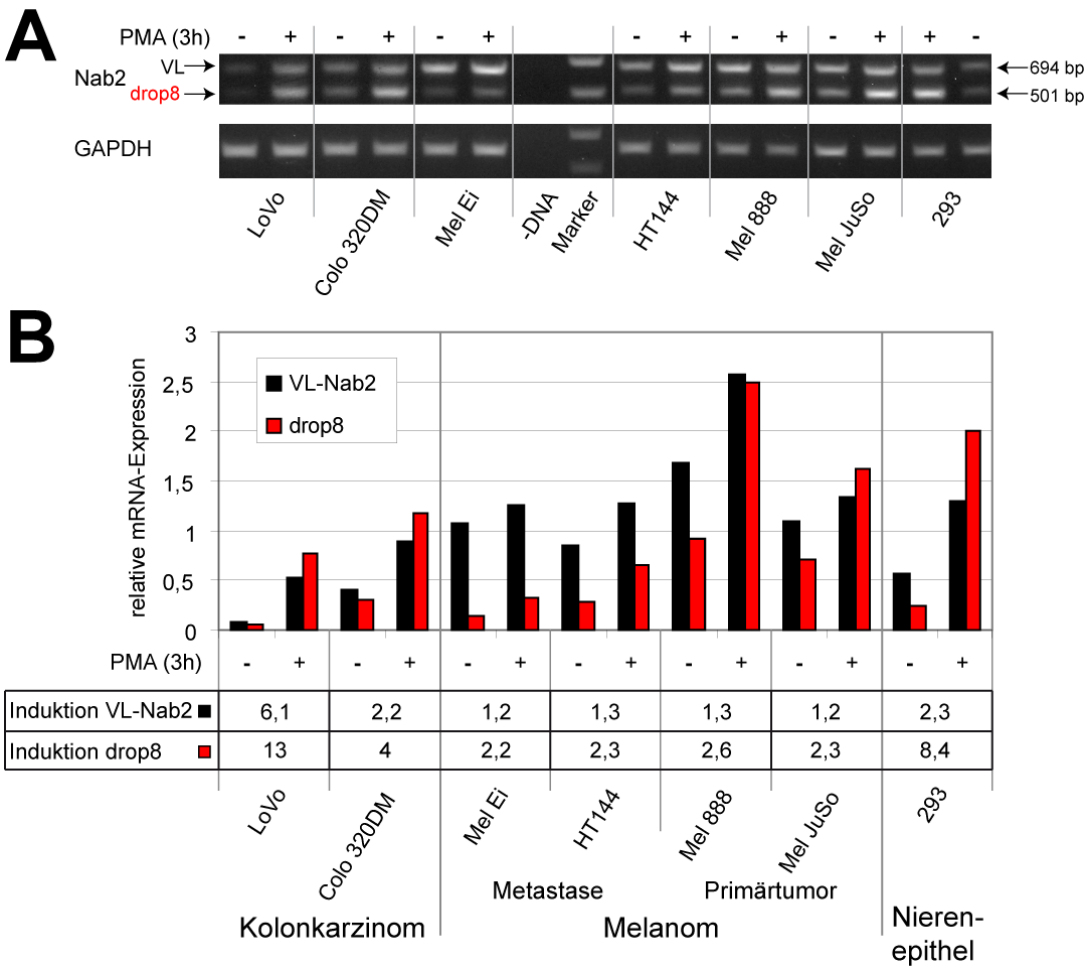


Abb. 4.22 Expression von Volllängen-*Nab2* und der Spleißvariante drop8-*Nab2* nach PMA-Stimulation. Die angegebenen Zellen wurden 3 h nach bzw. kurz vor PMA-Stimulation (0 h) geerntet und die mRNA-Expression mittels semiquantitativer RT-PCR bestimmt (Kap. 3.3.4). Der Spleißvariante drop8 fehlt Exon 6. Dementsprechend wurden in der spezifischen PCR Oligonukleotide gewählt, die in Exon 2 und Exon 7 binden (Kap. 3.3.2). Amplifikat mit Exon 6 = 694 bp (VL=Volllängen-*Nab2*, schwarz); Amplifikat ohne Exon 6 = 502 bp (drop8=drop8-*Nab2*, rot). **A,** Auftrennung der PCR-Amplifikate in einem 1,5% Agarose-Gel. –DNA = Negativ-Kontrolle. **B,** Nach densitometrischer Auswertung der Banden ist die relative mRNA-Expression im Verhältnis zur *GAPDH*-Expression, welche als 1 gesetzt wurde, dargestellt. In der Tabelle ist die Induktion, bezogen auf unstimulierte Zellen, von VL-*Nab2* und drop8-*Nab2* gezeigt.

Diese Resultate belegen, dass sowohl nach PMA-Stimulation, als auch nach Transfektion von Egr-1, Egr-2 oder Egr-3 verstärkt die endogene Expression der *Nab2*-Spleißvariante drop8 induziert wird, welches zusätzlich zu vorigen Ergebnissen darauf hindeutet, dass die Transkriptionsfaktoren der Egr-Familie in die durch PMA-vermittelte Aktivierung der Nab2-Expression involviert sind. Weiterhin konnte gezeigt werden, dass in Melanomzellen eine verringerte basale Expression und Induzierbarkeit der Spleißvariante drop8-*Nab2* vorliegt.

4.2 Untersuchung der Funktion der konstitutiv starken Nab2-Expression in Melanomen

4.2.1 Sequenzierung der genomischen *Nab2*-DNA von Melanom- und Kolonkarzinomzelllinien.

Kirsch (1996) konnte nach Sequenzierung der kompletten *Nab2*-cDNA der Melanomzelllinie Mel JuSo keine Alterationen feststellen.

Um mögliche Mutationen des *Nab2*-Gens in mehreren Melanomzellen, welche zu einer Veränderung der Funktionalität oder Stabilität von Nab2 führen könnten, auszuschließen, wurden Bereiche der genomischen DNA der Melanomzelllinien Mel 888, Mel Ei, Mel JuSo und der Kolonkarzinomzelllinien Colo 320 DM und LoVo sequenziert (Kap. 3.3.11). Dazu wurden Exon 1 und Teile von Exon 2, welche für die Egr-Bindedomäne NCD1 und die flankierenden Proteinregionen kodieren, mittels PCR amplifiziert und anschließend sequenziert. In Abb. 4.23 sind die Primerbindungspositionen in der genomischen DNA und der entsprechende Bereich in der cDNA dargestellt.

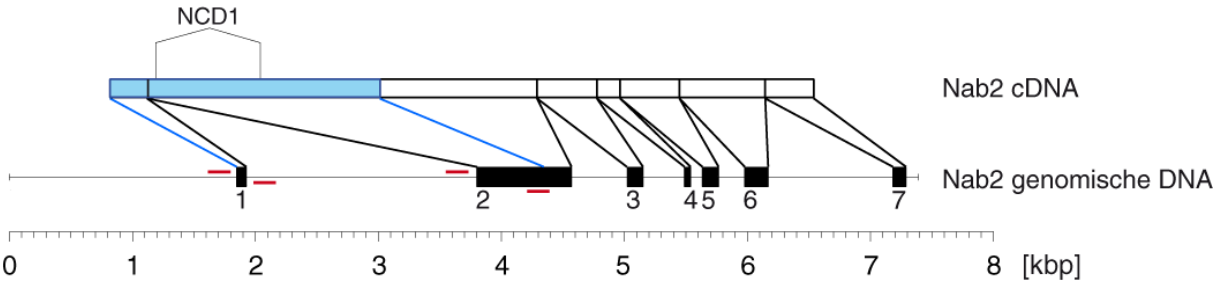


Abb. 4.23 Sequenzierung der genomischen *Nab2*-DNA. Skizze der Struktur des *Nab2*-Gens. Mittels PCR wurden Exon 1 und Teile von Exon 2 der genomischen *Nab2*-DNA amplifiziert, anschließend aufgereinigt und sequenziert (Kap. 3.3.11). Die Exons sind als schwarze Rechtecke dargestellt und nummeriert. Die Primerbindungspositionen sind rot markiert. Der entsprechende Bereich der cDNA ist in hellblau erkennbar.

Die Ergebnisse der Sequenzierungen zeigen in allen Zelllinien keine Alteration der genomischen Nab2-Sequenz, so dass die über die NCD1 vermittelte Funktion von Nab2 in Melanomzelllinien vermutlich nicht verändert ist.

Um vergleichende Experimente, welche Aufschluss über die Funktion und die Vorteile der konstitutiven Nab2-Expression in Melanomen geben könnten, durchführen zu können, sollten stabile Transfektanten von Nab2-exprimierenden Melanomzelllinien hergestellt werden, in denen das endogen exprimierte Nab2 inaktiviert oder reduziert wird.

4.2.2 Inaktivierung von Nab2-WT durch das dominant-negative Nab2-E37K

Das dominant-negativ wirkende Nab2-E37K unterscheidet sich durch einen Basen- und einen daraus resultierenden Aminosäure-Austausch in der NCD1 von Wildtyp-Nab2, wodurch es nach Einbau als Untereinheit in den multimeren Nab2-Komplex die Bindung an Egr-1, Egr-2 und Egr-3 verhindert und somit den ganzen Komplex unfunktionell macht (Kumbrink, 2002; Svaren et al., 1998).

Durch stabile Transfektion der Melanomzelllinien Mel 888 und Mel JuSo mit einem Expressionskonstrukt für das dominant-negativ wirkende Nab2-E37K sollte das endogen exprimierte Wildtyp-Nab2 (Nab2-WT) inaktiviert werden.

Die Expression von Nab2-E37K kann durch den einzelnen Aminosäureaustausch nicht über die vorhandenen Antikörper nachgewiesen bzw. von der des endogenen Wildtyp-Nab2 unterschieden werden. Um die Expression von Nab2-E37K in den Transfektanten schnell und einfach nachzuweisen, könnte ein Fusionsprotein aus Nab2-E37K und dem fluoreszierenden EGFP dienen. Da sich die Proteinfaltung von Nab2-E37K durch die Fusion an EGFP verändern und dementsprechend die Funktionalität des dominant-negativen Nab2 beeinträchtigt werden könnte, wurde ein bicistronisches Expressionssystem verwendet. Hierzu wurde die *Nab2*-E37K-Sequenz in den bicistronischen Expressionsvektor pIRES2-EGFP subkloniert (Kap. 3.3.9.4), wodurch das Nab2-E37K-Protein und zusätzlich EGFP über die in diesem Vektor vorhandene *interne Ribosomeneintrittsstelle* (IRES) simultan von einer mRNA ko-exprimiert werden (Kap. 2.1.5.1).

Zusätzlich zum indirekten Nachweis der Nab2-E37K-Expression kann auch die Funktionalität von Nab2-E37K bestimmt werden. Durch Inaktivierung des endogenen Nab2 durch Nab2-E37K sollte die Aktivität der Transkriptionsfaktoren der Egr-Familie ansteigen. Die Egr-Aktivität der Zellen kann nach transienter Transfektion des egr-pluci-Konstrukts (Zimmermann, 2000), welches drei Egr-Bindemotive enthält, die vor ein Luziferasegen in den pβTATAluci-Vektor mit Minimal-Promotor kloniert wurden (Kap. 2.1.5.1), gemessen werden.

Um die dominant-negative Wirkung des Nab2-E37K-EGFP-Konstrukts (E37K-IRES2-EGFP) zu untersuchen, wurden die Zelllinien Colo 320 DM und Mel 888 mit egr-pluci, rnEgr-1 (Expressionsvektor für *Rattus norvegicus* Egr-1) und E37K-IRES2-EGFP oder dem Leervektor pIRES2-EGFP transient transfiziert und nach 48 h die Egr-Aktivität im Luziferase-Versuch bestimmt.

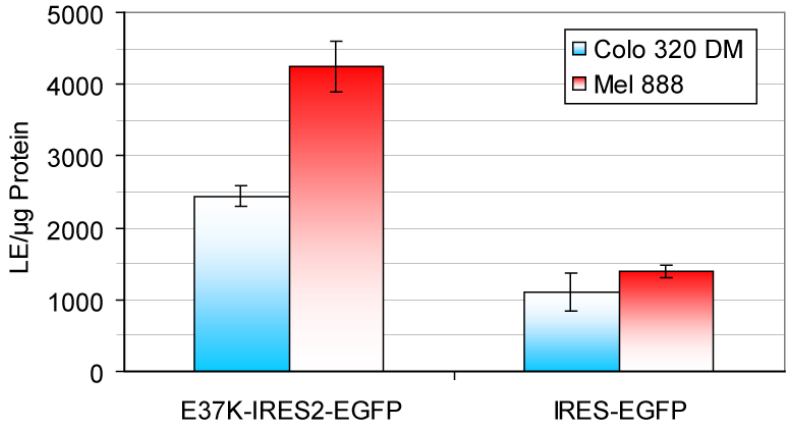


Abb. 4.24 Egr-Aktivität nach gleichzeitiger Transfektion von rnEgr-1 und E37K-IRES2-GFP. Colo 320 DM und Mel 888 wurden mit 200 ng egr-pluci und 40 ng der Expressionsvektoren für rnEgr-1 (*Rattus norvegicus* Egr-1) und E37K-IRES2-EGFP oder dem Leervektor pIRES2-EGFP mittels *FuGENE*^{TM}*6* in 24-Loch-Platten transfiziert und nach 48 h die Egr-Aktivität im Luziferase-Versuch bestimmt (Kap. 3.1.4). Angegeben sind als repräsentatives Ergebnis aus 2 Versuchen die Mittelwerte aus Duplikaten mit Standardabweichung in LE/µg Protein.

Abb. 4.24 zeigt, dass die Egr-Aktivität nach Transfektion von E37K-IRES2-EGFP im Vergleich zur Leervektor-Transfektion (pIRES2-EGFP) in beiden Zelllinien stark zunimmt, welches die dominant-negative Wirkung von E37K-IRES2-EGFP bestätigt.

Die dominant-negative Wirkung von E37K-IRES2-EGFP konnte gezeigt werden, so dass stabile E37K-IRES2-EGFP- und pIRES2-EGFP-Leervektor-Transfektanten der Melanomzelllinien Mel 888 und Mel JuSo hergestellt werden sollten (Kap. 3.1.4.2). Die Charakterisierung der E37K-IRES2-EGFP-Transfektanten, die bereits über G418 selektiert wurden, mittels Fluroreszenz-Mikroskopie, FACS-Analyse und Luziferase-Versuch zur Bestimmung der Egr-Aktivität zeigte allerdings, dass keine stabile Expression des dominant-negativen Nab2-E37K mit diesem System erreicht werden konnte.

4.3 Regulation der Nab2-Expression im Melanom

In Kapitel 4.1 wurden während der Untersuchung der allgemeinen Regulation der Nab2-Expression einige Unterschiede zwischen Melanom- und Nicht-Melanom-Zelllinien aufgedeckt, die möglicherweise Aufschluss über die Ursachen der konstitutiv starken Expression von Nab2 in Melanomen geben könnten. Beispielsweise ist das Haupt-regulatorische-Element zwischen –329 bp und –263 bp in Colo 320 DM Zellen ausreichend für die maximale Induktion durch PMA und Egr-1, während in der Melanom-Zelllinie für die stärkste Aktivierung 5`-vorgelagerte Cis-Elemente benötigt werden (Kap. 4.1.8 und 4.1.9).

Zusätzlich konnte in Mel 888 eine stärkere Egr-vermittelte Aktivierung des Nab2-Promotors als in Colo 320 DM beobachtet werden (Kap. 4.1.6).

4.3.1 Untersuchung der Stärke der Egr-vermittelten Aktivierung des Nab2-Promotors in Melanom- und Nicht-Melanom-Zelllinien

Um mögliche Unterschiede in der Stärke der Aktivierung des Nab2-Promotors durch Egr-1, Egr-2 und Egr-3 in Zelllinien unterschiedlichen Ursprungs aufzudecken, wurden fünf Melanom- und drei Nicht-Melanom-Zelllinien mit dem Reporter-Konstrukt maluc-679, welches den kompletten Nab2-Promotor enthält, und Expressionskonstrukten für Egr-1, Egr-2 oder Egr-3 transfiziert.

Wie Abb. 4.25 zeigt, ist die Induktion des Nab2-Promotors durch Egr-1 im Vergleich zu den Nicht-Melanomzellen (2,5 - 4,5-fach) in drei Melanomzellen signifikant höher (11,5 - 14-fach), in einer leicht erhöht (5,5-fach) und in einer in etwa gleich (3,5-fach). Für die Egr-3-vermittelte Aktivierung des Nab2-Promoters kann ein ähnliches Muster beobachtet werden. Die vier Melanomzelllinien, welche eine erhöhte Egr-1-abhängige Induktion aufwiesen, zeigten eine deutlich stärkere Aktivierung (7 - 8,5-fach) durch Egr-3 als die Nicht-Melanome (2 - 3,5-fach). Eine leicht erhöhte Egr-3-vermittelte Induktion (4-fach) konnte, obwohl die Egr-1-abhängige Aktivierung schwach war, in der fünften Melanom-Zelllinie nachgewiesen werden. Die Induktion des Nab2-Promotors durch Egr-2 war in den Melanomen deutlich schwächer als durch Egr-1 und Egr-3, während sie in den Nicht-Melanomen vergleichbar mit der durch Egr-3 vermittelten Aktivierung war.

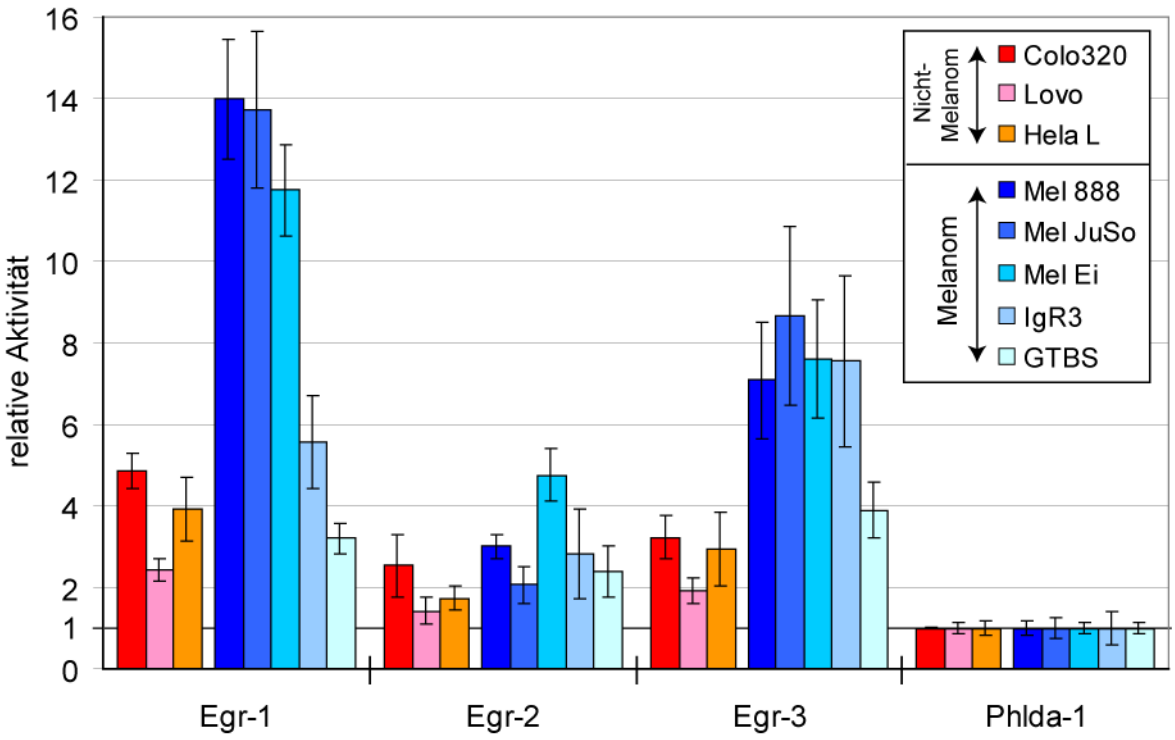


Abb. 4.25 Aktivierung des Nab2-Promotors durch Egr-1, Egr-2 und Egr-3 in Zelllinien unterschiedlichen Ursprungs. Die fünf angegebenen Melanomzelllinien und die Kolonkarzinomzellen Colo 320 DM und LoVo, sowie die Zervixkarzinom-Zelllinie Hela L wurden mit 60 ng maluc-679, welches den kompletten Nab2-Promotor enthält, und 40 ng der Expressionsvektoren für Egr-1, Egr-2, Egr-3 oder zur Kontrolle für Phlda-1 mittels MATra in 96-Loch-Platten transfiziert und die Promotoraktivität nach 48 h im Luziferase-Versuch bestimmt (Kap. 3.1.4). Angegeben ist die relative Aktivität im Vergleich zur Promotor-Aktivität nach Transfektion von Phlda-1 (als 1 gesetzt) als Mittelwerte aus Triplikaten mit Standardabweichung.

Diese Resultate zeigen, dass Egr-1 der stärkste Aktivator des Nab2-Promotors ist und zusätzlich die Induktion durch Egr-1 und Egr-3 in Melanomzelllinien signifikant stärker ist als in den getesteten Nicht-Melanomzellen. Dies deutet auf eine erhöhte Aktivität bzw. Funktionalität und dementsprechend auf eine besondere Rolle von Egr-1 und vor allem von Egr-3, welches im Gegensatz zu Egr-1 nicht durch Nab1 (siehe auch Kap. 4.1.7), sondern nur von Nab2 reguliert werden kann, im Melanom hin.

4.3.2 Untersuchung der mRNA-Expression von *Egr-1, Egr-2, Egr-3* und *Nab2* in verschiedenen Zelllinien

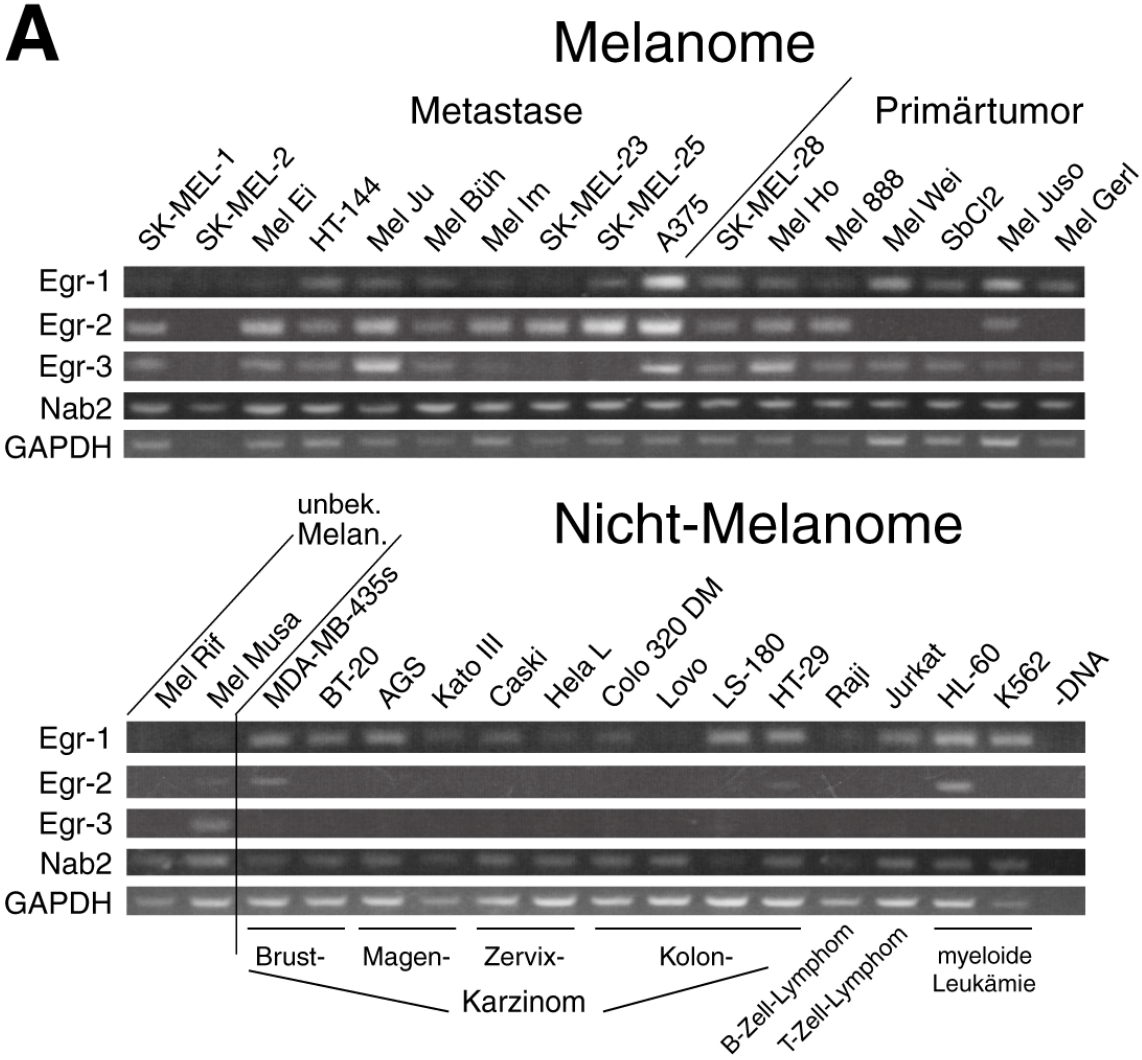
Wie im vorigen Kapitel beschrieben, scheinen Egr-1 und Egr-3 in Melanomzelllinien eine signifikant erhöhte Aktivität bzw. Funktionalität zu besitzen. Zusätzlich deuten die Ergebnisse in Kap. 4.1.14 darauf hin, dass im Melanom eine veränderte Expression der Transkriptionsfaktoren der Egr-Familie vorliegt. Deswegen sollte die mRNA-Expression von *Egr-1*, *Egr-2*, *Egr-3* und *Nab2* in mehreren verschiedenen Zelllinien mittels semiquantitativer RT-PCR bestimmt werden (Kap. 3.3.4).

Wie in Abb. 4.26 detailliert zu sehen ist, wurde diese Analyse mit 19 Melanomzellen und 14 Nichtmelanomzellen (unter anderem Karzinome und Lymphome) durchgeführt.

Dabei zeigte sich, dass *Nab2*-mRNA-Expression zwar in allen Zelllinien detektierbar ist, aber in den Melanomzellen signifikant höher ist und somit die Melanomassoziation von Nab2 bestätigt werden konnte.

Egr-1-mRNA-Expression konnte in 77% der ausgewerteten Melanom- und 93% der Nicht-Melanom-Zellen nachgewiesen werden.
Interessanterweise wurde im Gegensatz dazu *Egr-2*-mRNA-Expression in 14 von 18 (77%) Melanomzelllinien gefunden, während nur 3 von 14 (21%) Nicht-Melanomzelllinien unterschiedlichen Ursprungs *Egr-2* exprimierten. *Egr-2*-Expression wurde in 100% der aus Metastasen, aber nur in 57% der aus Primärtumoren abgeleiteten Melanomzelllinien detektiert. Dies deutet auf eine mögliche Melanom-Progressions-Assoziation von Egr-2 hin.
In keiner Nicht-Melanomzelllinie konnte *Egr-3*-Expression gezeigt werden, während in 77% der Melanomzelllinien *Egr-3*-mRNA vorhanden ist.
Gleichzeitige Expression von *Egr-2* und *Egr-3* wurde in 61% der Melanomzelllinien nachgewiesen.
Diese Ergebnisse verdeutlichen die Melanomassoziation von nicht nur Egr-3, sondern auch von Egr-2, während Egr-1 ubiquitär exprimiert wird.

A



B

	Egr-1	Egr-2	Egr-3	Egr-2 + Egr-3
Melanom	14/18 (77%)	**14/18 (77%)**	**14/18 (77%)**	**11/18 (61%)**
Metastase	6/9 (66%)	**9/9 (100%)**	7/9 (77%)	**7/9 (77%)**
Primärtumor	7/7 (100%)	4/7 (57%)	6/7 (85%)	3/7 (42%)
unbekannt	1/2 (50%)	1/2 (50%)	1/2 (50%)	1/2 (50%)
Nicht-Melanom	13/14 (93%)	3/14 (21%)	0/14 (0%)	0/14 (0%)

Abb. 4.26 Untersuchung der Expression von *Egr-1, Egr-2, Egr-3* und *Nab2* in Zelllinien unterschiedlichen Ursprungs. Die mRNA-Expression in den angegebenen Zelllinien wurde mittels semiquantitativer RT-PCR bestimmt (3.3.4). **A,** Die getesteten Zelllinien und der Ursprung sind angegeben. Auftrennung der PCR-Amplifikate in einem 1% Agarose-Gel. –DNA = Negativ-Kontrolle. **B,** Tabellarische Aufstellung der mRNA-Expression von *Egr-1*, *Egr-2* und *Egr-3* in den untersuchten Melanom- und Nicht-Melanom-Zelllinien.

Um die Ergebnisse der semiquantitativen RT-PCR zu bestätigen und die Unterschiede in den mRNA-Mengen genauer zu quantifizieren, wurde die Expression von *Egr-1*, *Egr-2*, *Egr-3* und *Nab2* in vier Melanom- und drei Nicht-Melanom-Zelllinien durch semiquantitative Real time PCR (Kap. 3.3.5) bestimmt und ist in Abb. 4.27 dargestellt.

Übereinstimmend mit den Resultaten der semiquantitativen RT-PCR konnte eine erhöhte *Nab2*-mRNA-Expression in den Melanomzellen und eine ubiquitäre, aber in der Stärke variierende Expression von *Egr-1* bestätigt werden. Da sowohl in Melanom- als auch in Nicht-Melanom-Zellen hohe und niedrige *Egr-1*-Werte bestimmt wurden, können Unterschiede in der *Egr-1*-Expression nicht die Ursache der erhöhten *Nab2*-Expression sein.

Die Melanomassoziation von *Egr-2* und *Egr-3* konnte mit einer mindestens 10-fach und maximal 70-fach höheren Expression verglichen mit den getesteten Nicht-Melanomzellen ebenfalls bestätigt werden. Interessanterweise wurde in beiden aus Metastasen abgeleiteten Melanomzellen SK-MEL-23 und Mel Ei eine besonders hohe *Egr-2*-Expression, aber eine deutlich schwächere *Egr-3*-Expression beobachtet, während in den aus Primärtumoren hergestellten Melanomzellen SK-MEL-28 und Mel 888 größere Mengen an *Egr-3*-mRNA und wesentlich geringere an *Egr-2* vorlagen.

Die Ergebnisse der semiquantitativen und auch der quantitativen RT-PCR zeigen nicht nur die Melanomassoziation von *Egr-2* und *Egr-3*, sondern auch ein mögliches differentielles Expressionsmuster von Egr-2 und Egr-3 abhängig von der Progression des Melanoms.

Des Weiteren kann man im Zusammenhang mit vorigen Resultaten daraus schließen, dass Egr-2 und Egr-3 spezifisch im Melanom an der konstitutiv hohen basalen Expression von Nab2 beteiligt sind, während das ubiquitär exprimierte Egr-1 einen geringen Einfluss hat.

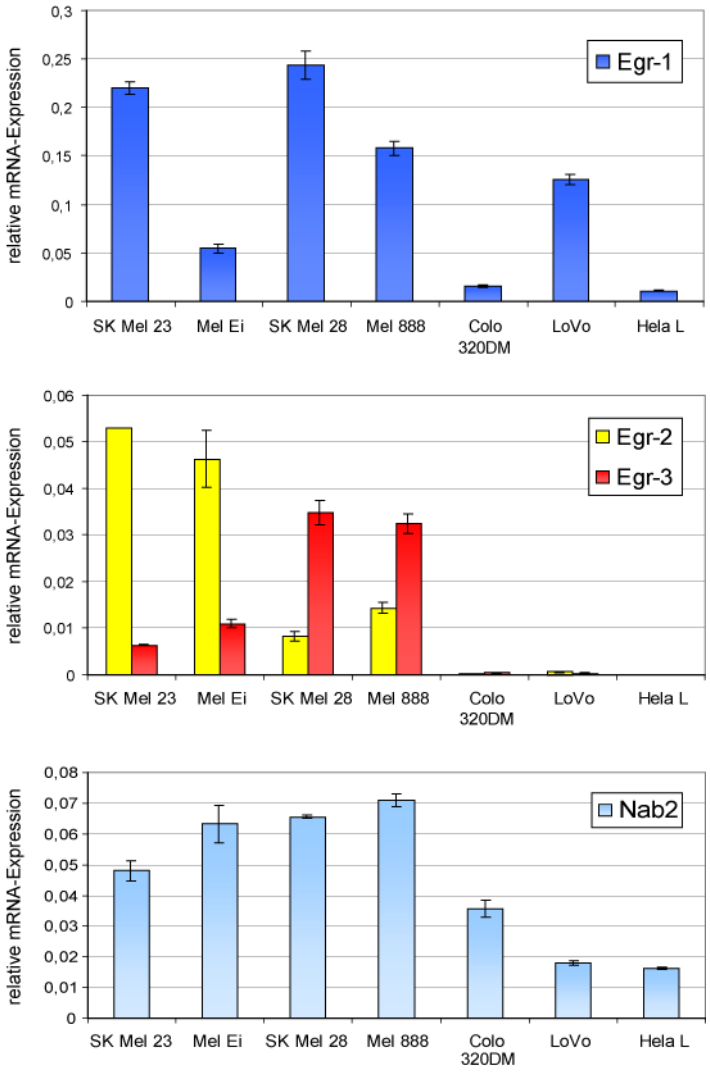


Abb. 4.27 Untersuchung der Expression von *Egr-1*, *Egr-2*, *Egr-3* und *Nab2* in Zelllinien unterschiedlichen Ursprungs mittels semiquantitativer Real time PCR. Die mRNA-Expression in den aus Metastasen abgeleiteten Melanomzellen SK-MEL-23 und Mel Ei und den aus Primärtumoren hergestellten Melanomzelllinien SK-MEL-28 und Mel 888, sowie in den Kolonkarzinomzellen Colo 320 DM und LoVo und der Zervixkarzinomzelllinie Hela L wurde mittels semiquantitativer Real time PCR bestimmt (Kap. 3.3.5). Dargestellt ist die relative mRNA-Expression im Verhältnis zur *G6PD*-Expression und die Standardabweichung in Triplikaten.

5 Diskussion

Das durch verschiedene extrazelluläre Stimuli induzierbare Kernprotein Nab2 (*NGFI-A binding protein* 2) wurde 1996 als Bindungspartner des Transkriptionsfaktors Egr-1 (NGFI-A) identifiziert (Svaren et al., 1996). Weitere Untersuchungen zeigten, dass Nab2 nicht nur ein Repressor von Egr-1 (*early growth response protein* 1), sondern auch der Transkriptionsfaktoren Egr-2 (Krox20) und Egr-3 (PILOT) ist (Sevetson et al., 2000; Svaren et al., 1996; Svaren et al., 1998). Nab1, das zweite Mitglied der Nab-Familie, welches im Gegensatz zu Nab2 in der Regel nicht induzierbar ist (Silverman et al., 1999) und ubiquitär konstitutiv exprimiert wird (Thiel et al., 2000), ist ebenfalls als Repressor von Egr-1 und Egr-2, aber nicht von Egr-3 beschrieben (Russo et al., 1995). Die Mitglieder der Nab-Familie besitzen die beiden zwischen Nab1 und Nab2 hochkonservierten Domänen NCD1 (*nab conserved domain*) und NCD2. Die Interaktion mit Egr-1 erfolgt über die NCD1 der Nab-Proteine und die R1- (Repressions-) Domäne von Egr-1. Durch einen bisher ungeklärten Mechanismus, bei dem die NCD1 und NCD2 der Nab-Proteine benötigt werden, wird die Aktivität von Egr-1 reprimiert (Swirnoff et al., 1998b). Da Egr-2 und Egr-3 im Vergleich zu Egr-1 eine nur geringfügig unterschiedliche R1-Domäne besitzen (Russo et al., 1995), wird ein ähnlicher Mechanismus der Repression von Egr-2 und Egr-3 in der Literatur angenommen.

Die Transkriptionsfaktoren der Egr-Familie sind induzierbare „*immediate early genes*“, die an der Regulation vieler zellulärer Prozesse, wie z.B. Proliferation, Apoptoseinduktion, Differenzierung und neuronaler Entwicklung, beteiligt sind (Carter et al., 2007; Thiel and Cibelli, 2002; Unoki and Nakamura, 2003a). Zeitversetzt zu den Transkriptionsfaktoren der Egr-Familie wird durch die gleichen extrazellulären Stimuli das „*delayed early response gene*“ Nab2 induziert (Kirsch et al., 1996; Svaren et al., 1996). Dadurch wird eine überschießende kontinuierliche Aktivierung der Egr-Zielpromotoren verhindert, die anderenfalls zu einer malignen Transformation der Zelle führen könnte.

Eine Dysregulation des Egr-Nab2-Systems ist in einer Vielzahl von Tumoren beschrieben. Beispielsweise wurde einerseits gezeigt, dass Egr-1 Tumorsuppressoraktivität besitzt (Huang et al., 1998), andererseits spricht gegen eine einfache Beziehung zwischen geringer Egr-1-Expression und Tumorentwicklung, dass Egr-1 in Prostatakarzinomen häufig überexprimiert wird (Baron et al., 2003; Eid et al., 1998). Egr-2 und Egr-3 sind unter anderem an der Induktion von FasL in nicht-lymphoiden Zellen und Tumorzellen beteiligt

(Droin et al., 2003; Mittelstadt and Ashwell, 1998; Yoo and Lee, 2004), welches ein bekannter „*escape*"-Mechanismus von Tumorzellen ist (Chen et al., 2003). Des Weiteren ist Egr-3 in die Östrogen-vermittelte Invasion von Brustkarzinomen involviert (Suzuki et al., 2007).

Alterationen der Nab2-Expression sind im Zusammenhang mit Tumorentstehung und Progression nur selten beschrieben. Allerdings konnte gezeigt werden, dass die VEGF (*vascular endothelial growth factor*) –vermittelte Induktion der Angiogenese durch Überexpression von Nab2 inhibiert werden konnte (Lucerna et al., 2003). Des Weiteren blockierte Nab2 die Expression der mit Tumorprogression assoziierten Egr-1-Zielgene HGF (*hepatocyte growth factor*), PDGF-A (*platelet derived growth factor*), TGF beta (*transforming growth factor*) und VEGF, welches ebenfalls in einer Reduktion der Angiogenese resultierte (Houston et al., 2001). Korrelierend mit diesen Ergebnissen geht im Prostatakarzinom ein häufiger Verlust der Nab2-Expression mit der oben beschriebenen erhöhten Expression und Aktivität von Egr-1 einher, welche zur Aktivierung von Genen führt, die im Prostatakarzinom wichtig für die Tumorprogression sind (Abdulkadir et al., 2001). In neueren Studien konnte gezeigt werden, dass als Ursache für diesen Verlust die Hypermethylierung der 5`-Region des Nab2-Gens anzusehen ist (Bastian et al., 2007).

Ähnlich wie für Egr-1 geschildert, gibt es keine einfache Korrelation der Nab2-Expressionsstärke mit der Entwicklung von Tumoren. In einer Studie zur Identifizierung von Biomarkern für *small round blue cell tumors* konnte im Gegensatz zu Prostatakarzinomen eine hohe Nab2-Expression in Ewing-Sarkomen nachgewiesen werden (Pal et al., 2007), deren funktionelle Auswirkungen bisher nicht weiter charakterisiert wurden.

Des Weiteren wurde Nab2 unabhängig von den Studien von Svaren et al. im gleichen Jahr als das im Melanom überexprimierte Molekül Mader (*melanoma associated delayed early response gene*) identifiziert (Kirsch et al., 1996). Immunhistochemische Färbungen zeigten, dass in 88% der getesteten Melanom- und in nur 8% der Kolonkarzinomgewebe das Nab2-Protein exprimiert wurde. In Normalgewebe hingegen konnte kein Nab2 nachgewiesen werden (Kirsch, 1995).

Bisher konnte die Funktion und Ursache der verstärkten Nab2-Expression im Melanom nicht geklärt werden. Studien zur mRNA- und Protein-Stabilität nach Stimulation mit Phorbolestern zeigten keine Unterschiede in Zelllinien mit hoher oder niedriger Nab2-

Expression, so dass als Ursache der Überexpression eine verstärkte Transkription des Nab2-Gens vermutet wurde (Kramer, 2000). Eine mögliche Funktion der starken Nab2-Expression könnte eine verringerte Egr-1-Tumorsuppressor-Aktivität sein. In Egr-1-null-Mäusen konnte eine beschleunigte Entwicklung von Hauttumoren nachgewiesen werden, die histologisch vergleichbar mit den in p53-null-Mäusen beobachteten sind. Weitere Untersuchungen zeigten, dass der Promotor des p53-Gens sowohl *in vitro* als auch *in vivo* ein direktes Ziel von Egr-1 ist (Krones-Herzig et al., 2005). Dementsprechend würde eine Repression der Egr-1-Aktivität durch Nab2 zu einer Verringerung der p53-Expression und der dadurch vermittelten Apoptose-Sensitivität führen. In verschiedenen Zelllinien konnte allerdings keine Korrelation zwischen der Nab2- und p53-Expressionsstärke beobachtet werden (Kramer, 2000).

Ziel dieser Arbeit war es Ursachen und Auswirkungen der erhöhten Nab2-Expression im Melanom aufzudecken, welche zur Entstehung und/oder Progression des Melanoms beitragen könnten.

5.1 Regulation der Nab2-Expression

Um die Gründe der konstitutiv starken Nab2-Expression im Melanom zu bestimmen, sollte die Regulation der Nab2-Expression untersucht und eventuelle Unterschiede im Melanom im Vergleich zu anderen Tumoren und Geweben aufgedeckt werden.

Die in der Literatur beschriebene Melanomassoziation der Nab2-Expression sowie die im Vergleich zu Egr-1 zeitversetzte Induktion von Nab2 konnte bestätigt werden (Kap. 4.1.1, 4.1.2, 4.3.2). Da das konstitutiv exprimierte Nab1 normalerweise nicht induzierbar ist (Silverman et al., 1999; Thiel et al., 2000), allerdings während der neuronalen Entwicklung transient exprimiert wird (Mechta-Grigoriou et al., 2000) und durch Neuropeptide in gonadotropen Zellen induzierbar ist (Wolfe and Call, 1999), wurde die *Nab1*-mRNA-Expression in Melanom- und Kolonkarzinom-Zelllinien untersucht. Nach Stimulation mit dem Phorbolester PMA, einem Aktivator der Proteinkinase C, konnte keine Veränderung der Expressionsstärke von *Nab1* beobachtet werden. Des Weiteren wurden keine Unterschiede in der basalen *Nab1*-Expression der verschiedenen Zelllinien nachgewiesen (Kap. 4.1.2). Diese Ergebnisse verdeutlichen, dass Nab2, welches im Gegensatz zu Nab1 durch die gleichen Stimuli wie die Transkriptionsfaktoren der Egr-Familie induzierbar und

ein Repressor von Egr-1, Egr-2 und auch Egr-3 ist, bei der Kontrolle der Egr-vermittelten Antwort auf extrazelluläre Signale die wichtigere Rolle spielt.

Um putative regulatorische Elemente, die wichtig für die Nab2-Expression sind, zu identifizieren, wurden *in silico* Analysen der 5`-Region des *Nab2*-Gens durchgeführt (Kap. 4.1.3). Typische Kernpromotor-Elemente wie eine TATA-Box, CAAT-Box oder Initiator-Sequenz konnten in der äußerst GC-reichen 5`-Region nicht nachgewiesen werden. Der vorhergesagte Promotor-Bereich liegt, relativ zum Translationsstartpunkt (ATG = +1), zwischen –705 bp und –82 bp in einer CpG-Insel, was bei TATA-losen Promotoren häufig der Fall ist (Gross and Oelgeschlager, 2006; Smale, 1997). Ein weiteres Kennzeichen von TATA-losen Promotoren sind variable Transkriptionsstartpunkte in verschiedenen Geweben und Zelllinien (Smale and Kadonaga, 2003), die durch Analyse der 5`-Startpunkte verschiedener *Expressed Sequence Tags* (ESTs), aber auch experimentell mittels Primerextensionsversuchen auf einen 126 bp großen Bereich (-366 bp bis –240 bp) des *Nab2*-Gens eingegrenzt wurden (Gerlinger, 2006).

Weitere *in silico* Analysen zur Identifizierung von putativen Transkriptionsfaktor-bindestellen im Abschnitt –1000 bp bis +1 bp des *Nab2*-Gens ergaben, dass im 5`-Bereich des *Nab2*-Gens sehr viele Bindestellen für die Transkriptionsfaktoren der Egr-Familie und der Sp1-Familie vorhanden sind (Abb. 4.3). Da die Konsensus-Sequenzen dieser beiden Familien sehr ähnlich sind (Huang et al., 1997), liegen die putatitven Bindestellen häufig überlappend vor. Auffällig ist eine Ansammlung von 11 Bindungspositionen (fünf für die Egr-, fünf für die Sp1-Familie und eine für AP2) in dem nur 67 bp umfassenden Bereich von –263 bp bis –329 bp. Zusätzlich wurden in der 5`-Region Bindestellen für HIF-1 (an 4 Positionen), CREB-Familienmitglieder (4), NFκB (1) und AP2 (1) vorhergesagt.

Die Verwendung von Reportergenen, deren Expression durch die 5`-Region des zu untersuchenden Gens angetrieben wird, ist ein häufig beschriebenes Mittel zur Bestimmung regulatorischer Bereiche, die für die Transkription des Gens wichtig sind. Um regulatorische Elemente, welche die Nab2-Transkription kontrollieren, zu identifizieren, wurde die 5`-Region des *Nab2*-Gens sowie serielle Verkürzungen dieser Region in ein promotorloses Luziferase-Reportergen-Plasmid subkloniert und in die Melanomzelllinie Mel 888 und die Kolonkarzinomzelllinie Colo 320 DM transfiziert. In beiden Zelllinien konnten vergleichbare Ergebnisse erzielt werden. Durch diese Transfektionen konnte gezeigt werden, dass der Nab2-Promotor von –679 bp bis –74 bp, übereinstimmend mit der

Vorhersage der *in silico* Analyse, lokalisiert ist (Kap. 4.1.4). Diese Region beinhaltet zwei Egr-, sechs überlappende Egr/Sp1-, zwei Sp1-, drei HIF-1-Bindemotive, eine AP2-Stelle, vier cAMP-responsive Elemente, sowie eine Ansammlung von fünf Egr- und fünf Sp1-Bindestellen und einem AP2-Motiv im Bereich –379 bp bis –263 bp. Die Analyse der Deletionskonstrukte deutet darauf hin, dass dieser Bereich von –379 bp bis –263 bp ein wichtiges regulatorisches Element enthält. Die Korrelation zwischen der Aktivität und Anzahl der Bindemotive der Sp1-Familie in den Verkürzungskonstrukten weist darauf hin, dass der konstitutiv exprimierte und nicht induzierbare Faktor Sp1 (Khachigian et al., 1995) an der Regulation der basalen Nab2-Expression beteiligt ist. Die große Anzahl an Bindestellen für die induzierbaren Transkriptionsfaktoren der Egr-Fmilie, welche evolutionär konserviert sind (Kap. 4.1.10), deuten auf eine Involvierung dieser Faktoren in die durch extrazelluläre Signale vermittelte Aktivierung der Nab2-Expression hin. Ein weiteres Indiz für diese Theorie zeigten Untersuchungen hinsichtlich der Regulation des PDGF-A-Promotors, welcher ebenfalls ein Element mit multiplen überlappenden Egr/Sp1-Bindestellen enthält (Khachigian et al., 1995). Nach PMA-Stimulation konnte eine mit Nab2 vergleichbare zeitversetzte Induktion der PDGF-A-Expression im Verhältnis zu Egr-1 beobachtet werden. Zusätzlich aktivierte Egr-1 den PDGF-A-Promotor und konnte nach Behandlung mit PMA an das Egr/Sp1-Element binden.

Nach ektopischer Expression von Egr-1, Egr-2 oder Egr-3 konnte eine verstärkte endogene *Nab2*-mRNA-Expression beobachtet werden (Kap. 4.1.5). Ein Vergleich der Induktionsstärke durch die einzelnen Mitglieder der Egr-Familie mit der nach PMA-Behandlung erhaltenen bewies allerdings, dass andere Faktoren, wie z.B. AP2 oder CREB, und/oder alle drei Mitglieder der Egr-Familie in die Induktion durch PMA involviert sind.

Durch die drei Mitglieder der Egr-Familie konnte jeweils ein dosis-abhängiger Anstieg der Nab2-Promotor-Aktivität beobachtet werden (Kap. 4.1.6). Allerdings war die Aktivierung durch Egr-2 schwächer als durch Egr-1 und Egr-3. Interessanterweise war vor allem die Egr-1- und Egr-3-vermittelte Aktivierung des Nab2-Promotors in Mel 888 deutlich stärker als in Colo 320 DM.

Die Expression eines Gens kann durch Transkriptionsfaktoren über verschiedene Mechanismen beeinflusst werden. Beispielsweise durch Kompetition mit anderen Transkriptionsfaktoren um Bindungsstellen (Khachigian et al., 1995), wodurch möglicherweise ein Inhibitor durch einen Aktivator verdrängt wird. Transkriptionsfaktoren

können auch synergistisch wirken, indem sie entweder durch Bindung an verschiedenen Stellen oder durch Interaktion miteinander die Promotoraktivität weiter steigern (Schabbauer et al., 2007). Nach simultaner Transfektion verschiedener Kombinationen der Mitglieder der Egr-Familie (Kap. 4.1.6) konnte eine additive Aktivierung des Nab2-Promotors beobachtet werden. Dadurch kann ausgeschlossen werden, dass sich die Transkriptionsfaktoren Egr-1, Egr-2 und Egr-3 gegenseitig inhibieren oder um Bindestellen konkurrieren. Inwiefern möglicherweise eine Interaktion zwischen diesen Faktoren bei der Aktivierung des Nab-Promotors stattfindet, könnte mittels Chromatin Immunopräzipitation (ChIP) untersucht werden (Orlando, 2000).

In der Literatur werden die Nab-Proteine als Repressor der Transkriptionsfaktoren Egr-1, Egr-2 und Egr-3 beschrieben. Allerdings deuten verschiedene Studien darauf hin, dass die Nab-Proteine unter bestimmten Bedingungen ebenfalls als Aktivator wirken können. Am LHβ-Promotor konnte gezeigt werden, dass diese Nab-vermittelte Aktivierung abhängig von der Anzahl und Affinität der Egr-Bindestellen ist (Sevetson et al., 2000). Des Weiteren zeigte sich, dass Nab2 ein höheres Aktivierungspotential als Nab1 besitzt, wodurch die bereits durch Egr-2 und Egr-3 vermittelte Aktivierung des FasL-Promotors potenziert wird. In einer weiteren Studie konnte die Koaktivierung des IL-2-Promotors nach Rekrutierung von Nab2 durch Egr-1 zum Promotor beobachtet werden (Collins et al., 2006). Im Gegensatz dazu ließ sich, wie durch die große Anzahl an Egr-Bindestellen zu erwarten ist, die Egr-vermittelte Aktivierung des Nab2-Promotors dosis-abhängig durch Nab2 komplett reprimieren (Kap. 4.1.7). Die Repression durch Nab1 war schwächer und konnte übereinstimmend mit oben beschriebener Studie (Russo et al., 1995) nur für Egr-1 und Egr-2 gezeigt werden.

Um wichtige Egr-responsive Elemente zu identifizieren und deren Positionen im Nab2-Promotor näher einzugrenzen, wurde die Aktivierung der Nab2-Promotor-Deletions-Konstrukte durch Egr-1 und Egr-3 untersucht (Kap. 4.1.9). Sowohl in Mel 888 als auch in Colo 320 DM Zellen konnte gezeigt werden, dass das regulatorische Element, welches eine Ansammlung von multiplen Egr/Sp1-Bindestellen und ein AP2-Motiv zwischen –329 bp bis 263 bp umfasst, nicht nur für die basale Promotor-Aktivität, sondern auch für die durch Egr-1 und Egr-3 vermittelte Aktivierung des Nab2-Promotors wichtig ist. In Colo 320 DM Zellen ist dieses Element für die maximale durch Egr-1 vermittelte Aktivierung des Nab2-Promotors ausreichend, während in Mel 888 zusätzlich zwei überlappende Egr/Sp1-Bindemotive benötigt werden. Die Egr-3-vermittelte Aktivierung der Deletionskonstrukte

wies in beiden Zelllinien das gleiche Muster auf. Im Vergleich zur Aktivierung durch Egr-1 zeigte sich allerdings, dass für die durch Egr-3 vermittelte maximale Aktivität des Nab2-Promotors die Ansammlung von Egr/Sp1-Stellen von –329 bp bis –263 bp nicht ausreicht, sondern vorgelagerte Elemente im 5`-Bereich benötigt werden. Ein Vergleich der Aktivitäten der Deletionskonstrukte nach PMA-Stimulation (Kap. 4.1.8) mit der nach Egr-1- oder Egr-3-Transfektion erhaltenen zeigte ähnliche Muster auf, so dass vermutet werden kann, dass Egr-1 und Egr-3 in die PMA-vermittelte Aktivierung der Nab2-Expression involviert sind.

Zur weiteren Bestätigung dieser Theorie konnte in Gelretardationsanalysen die Bindung von Egr-1 an das Haupt-regulatorische-Element zwischen –329 bp bis –263 bp nach PMA-Stimulation von Mel 888 Zellen gezeigt werden, während die Bindung von Sp1 durch PMA unbeeinflusst blieb (Kap. 4.1.11). Die Bindung weiterer Mitglieder der Egr-Familie konnte durch Kompetitionsexperimente mit Egr-Konsensus-Sequenz-Oligonukleotiden sowohl in unstimulierten als auch stimulierten Zellen gezeigt werden. Diese Ergebnisse deuten darauf hin, dass Sp1 nach PMA-Stimulation nicht durch die Transkriptionsfaktoren der Egr-Familie von dem regulatorischen Bereich des Nab2-Promotors verdrängt wird. Allerdings liefern diese Versuche nur Hinweise dafür, dass die Egr-Familienmitglieder und Sp1 gleichzeitig an diesen Bereich des Nab2-Promotors binden können und geben keine Auskunft über mögliche Interaktionen dieser Transkriptionsfaktoren. Die Komplexbildung von Egr-1 und Sp1, die durch die verstärkte Phosphorylierung des Egr-1-Proteins verhindert wird, ist z.B. bei der Regulation des *M-CSF* (*macrophage colony stimulating factor*) –Gens beschrieben (Srivastava et al., 1998). Durch diesen Mechanismus liegt mehr freies Sp1 vor, welches die M-CSF-Expression induzieren kann.

Eine Inhibition von Sp1 durch Egr-1 kann allerdings bei der Regulation der Nab2-Expression ausgeschlossen werden, da nach Reduktion der *Egr-1*-Expression durch siRNA-Transfektion keine Erhöhung, sondern eine Reduzierung der basalen und induzierten *Nab2*-Expression gezeigt werden konnte (Kap. 4.1.12). Die Depletion von *Egr-2* und *Egr-3* durch siRNA-Transfektion führte zwar in zwei Zelllinien zu verschiedenen Ergebnissen, konnte aber den Einfluss von Egr-2 und Egr-3 auf die endogene Regulation der *Nab2*-Expression in beiden Zelllinien nachweisen (Kap. 4.1.13). Die Reduktion von *Egr-3* führte in der aus einer Metastase abgeleiteten Melanomzelllinie SK-MEL-23 zu einer Reduzierung von *Egr-2* und *Nab2*, während sie in den aus einem Primärtumor generierten Melanomzellen Mel 888 zu einer kompensatorischen

Hochregulierung der *Egr-1*-, *Egr-2*- und *Nab2*-Expression führte. Vergleichbare Einflüsse konnten in der jeweiligen Zelllinie nach Reduktion der *Egr-2*-Expression beobachtet werden. Da bisher keine gegenseitige Inhibition der Expression der Transkriptionsfaktoren der Egr-Familie bekannt ist und Egr-1, Egr-2 und Egr-3 den Nab2-Promotor in Mel 888 Zellen simultan aktivieren können, wird in den Mel 888 Zellen ein Kompensationsmechanimus angenommen. Die Kompensation der Reduktion eines Transkriptionsfaktors durch einen funktionell redundanten anderen ist in der Literatur häufig beschrieben worden (Cho et al., 2007; Tourtellotte et al., 2000). In den Untersuchungen von Tourtellotte et al. (2000) konnte beispielsweise in männlichen Egr-1-defizienten Mäusen die Aufrechterhaltung der LHβ-Expression durch Egr-4 (NGFI-C), einem weiteren Mitglied der Egr-Familie, welches nicht durch die Nab-Proteine beeinflusst wird (Russo et al., 1995), gezeigt werden. Möglicherweise liegen in SK-MEL-23 Defekte in der Induzierbarkeit der Transkriptionsfaktoren der Egr-Familie vor, so dass es zu keiner Kompensation kommen kann. Beispielsweise konnte in der Zelllinie Hela L, die keine *Egr-2*- und *Egr-3*-Expression und eine äußerst geringe Induzierbarkeit dieser beiden Faktoren aufweist (nicht gezeigt), ebenfalls eine Reduktion der *Nab2*-Expression nach Depletion eines Mitglieds der Egr-Familie (Egr-1) bestimmt werden. Stimulationen mit PMA bewiesen allerdings, dass die Expression von Egr-1, Egr-2, Egr-3 und Nab2 in SK-MEL-23 induzierbar ist (nicht gezeigt). Um mögliche Unterschiede in den beiden Zelllinien Mel 888 und SK-MEL-23 aufzudecken, die Hinweise auf die Ursache der differierenden Mechanismen geben könnten, wurde die Expressionsstärke von *Egr-1*, *Egr-2*, *Egr-3* und *Nab2* zum Zeitpunkt der Bestimmung der siRNA-Effekte errechnet. In SK-MEL-23 liegt eine signifikant höhere *Egr-1*- und *Egr-2*, aber eine geringere *Egr-3* und *Nab2*-Expression vor als in Mel 888. Da im Vergleich zu untransfizierten SK-MEL-23 Zellen (Kap. 4.3.2) die *Egr-1*-, *Egr-2*- und *Nab2*-Expression, vermutlich induziert durch die Transfektionsmethodik, deutlich erhöht ist, kann möglicherweise die Reduktion der Egr-3-Menge nicht mehr kompensiert werden. Allerdings widerspricht dieser Theorie, dass die Depletion von Egr-2 nicht durch Hochregulierung der Transkription des schwach exprimierten *Egr-3* ausgeglichen wird. Deswegen ist die Ursache der verschiedenen Mechanismen bei anderen zelllinien-spezifischen Transkriptionsfaktoren oder auch regulatorischen Molekülen, welche z.B. die Aktivität und Stabilität der Egr-Familien-Mitglieder durch Acetylierung oder Phosphorylierung modulieren (Yu et al., 2004), zu

suchen. Inwiefern das Stadium der Melanomprogression eine Rolle spielt kann anhand der Untersuchungen von nur zwei Melanomzelllinien nicht gesagt werden.

Die Ergebnisse der Depletions-Experimente zeigen nicht nur, dass Egr-1, Egr-2 und Egr-3 wichtige Regulatoren der endogenen Nab2-Expression sind, sondern auch, dass eine gegenseitige Regulation der Transkriptionsfaktoren der Egr-Familie vorliegt.

In der Literatur ist bisher nur wenig über die gegenseitige Regulation der Transkription innerhalb der Egr-Familie bekannt. Zwei Studien zeigten, dass Egr-1 nach Behandlung mit GM-CSF (*granulocyte macrophage colony stimulating factor*) an eine Egr-1-Bindestelle im eigenen Promotor rekrutiert wurde, um möglicherweise eine Aufrechterhaltung der Egr-1-Expression zu gewährleisten (Sakamoto et al., 1994) und die Aktivität des Egr-1-Promotors durch ektopische Expression von Egr-1 gesteigert wurde (Russell et al., 2003). Des Weiteren führte die Transfektion von Egr-1 zu einer verstärkten Expression von Egr-3 (Ehrengruber et al., 2000). Durch *in silico* Analyse der 5`-Region von *Egr-1*, *Egr-2* und *Egr-3* konnten in der Promotorregion von *Egr-1* vier Bindestellen für Egr-1 und eine für Egr-3 und in der von *Egr-2* vier putative Egr-1- und zwei Egr-2-Bindemotive vorhergesagt werden. Die für die Transkription und Induktion wichtigen Bereiche der 5`-Region des *Egr-3*-Gens (Mages et al., 1998) wiesen multiple Bindungspositition für sowohl Egr-1, Egr-2 als auch Egr-3 auf. Weitere Untersuchungen zeigten, dass nach Transfektion von Egr-1 ein schwacher Anstieg der *Egr-2*- und eine stärkere Induktion der *Egr-3*-mRNA-Expression zu beobachten war (Kap. 4.1.5). Ektopische Expression von Egr-3 führte zu einer erhöhten Transkription des *Egr-2*-Gens. Diese Ergebnisse zeigen im Zusammenhang mit den Resultaten der Depletionsexperimente nicht nur, dass sich die Transkriptionsfaktoren der Egr-Familie untereinander regulieren können, sondern auch eine vorher nicht beschriebene Regulation der basalen Egr-2-Expression durch Egr-3.

Die Kinetik der Induktion der Transkriptionsfaktoren der Egr-Familie ist abhängig von dem Gewebe- oder Zelltyp aber auch dem Stimulus sehr variabel (Beckmann and Wilce, 1997). Beispielsweise wurde nach Behandlung mit Capsaicin, einem zellulären Stress auslösenden Alkaloid, eine transiente Induktion der Egr-1-Expression bereits nach 15 min und der Egr-3-Expression nach 30 min beobachtet, während Egr-2 nicht induziert wurde (Honkaniemi et al., 2000). Im Gegensatz dazu konnte nach Stimulation mit Carbachol, einem Strukturanalogon des Neurotransmitters Acetylcholin, eine transiente Induktion aller drei Mitglieder der Egr-Familie gezeigt werden. Die gleichzeitige Induktion von Egr-2 und

Egr-3 erfolgte im Vergleich zu Egr-1 etwas später (von der Kammer H. et al., 1998). In Jurkat T-Zellen wurde die durch PMA induzierte simultane Transkription der Mitglieder der Egr-Familie beobachtet (Skerka et al., 1997). Allerdings sind keine vergleichenden Untersuchungen hinsichtlich der Induzierbarkeit von nicht nur Egr-1, Egr-2 und Egr-3 sondern auch Nab2 bekannt. Da die in der Literatur beschriebene sehr heterogene Expressionskinetik der Egr-Transkriptionsfaktoren ebenfalls keine eindeutigen Rückschlüsse auf die zeitliche Regulation der PMA-vermittelten Nab2-Induktion zulässt, wurde die Induzierbarkeit von *Egr-1*, *Egr-2*, *Egr-3* und *Nab2* in fünf Melanom-, zwei Kolonkarzinom-Zelllinien und einer Adenovirus-transformierten Nierenepithelzelllinie detailliert untersucht (Kap. 4.1.14). Diese Experimente zeigten, dass nach Behandlung mit PMA in den getesteten Zelllinien zuerst *Egr-1* und daraufhin *Egr-2* und *Egr-3* induziert werden. Eine leichte Induktion der *Nab2*-Expression konnte nach 45 min Stimulation, nachdem bereits große Mengen an *Egr-1* aber geringe Mengen an *Egr-2* und *Egr-3* vorlagen, beobachtet werden. Die maximale Induktion von *Nab2* erfolgte allerdings erst kurz nach der von *Egr-2* und *Egr-3*. In den beiden Kolonkarzinomzelllinien lag eine verlängerte Induktion von Egr-1 vor (siehe auch Kap. 4.1.2), die allerdings nicht zu einer länger anhaltenden *Nab2*-Transkription führte. Im Gegensatz dazu ging in einer Melanom- und der Nierenepithel- Zelllinie eine verlängerte Induktion von nicht nur *Egr-1*, sondern auch *Egr-2* und *Egr-3* mit einer verlängerten Expression von *Nab2* einher. Dies deutet darauf hin, dass Egr-1 entweder alleine nicht ausreicht, um die Nab2-Expression aufrecht zu erhalten oder in Kolonkarzinomzellen, möglicherweise durch Phosphorylierung, in inaktiver Form vorliegt. Durch Phosphorylierung von Egr-1 durch die Casein Kinase II wurde beispielsweise die DNA-Bindung von Egr-1 verringert (Jain et al., 1996) und die Protein Kinase A abhängige Phosphorylierung von WT1 (Wilms Tumor 1), einem weiteren Mitglied der Egr-Familie, resultierte in der Translokation aus dem Zellkern in das Zytoplasma (Marcet-Palacios et al., 2007).

Im Zusammenhang mit den vorher beschriebenen Ergebnissen deuten diese Resultate an, dass die Transkriptionsfaktoren der Egr-Familie dahingehend in die Regulation der Induktion von Nab2 involviert sind, dass Egr-1 an einer schnellen schwachen Nab2-Induktion und Egr-2 und Egr-3 an der Aufrechterhaltung und der maximalen durch PMA-induzierten Nab2-Expression beteiligt sind.

Zusammengefasst konnte gezeigt werden, dass nach extrazellulären Signalen Egr-1, Egr-2 und Egr-3 die Expression ihres eigenen Repressors Nab2 induzieren, wodurch ein

negativer Rückkopplungsmechanismus etabliert wird. In Abb. 5.1 ist der postulierte Mechnanismus, durch den die Egr-vermittelte Antwort auf extrazelluläre Stimuli kontrolliert wird, anhand des Wachstumsfaktors PDGF beispielhaft dargestellt. Durch Bindung von PDGF an den PDGF-Rezeptor wird die Expression von zuerst Egr-1 und um ungefähr 30 min versetzt von Egr-2 und Egr-3 induziert. Egr-1 und vermutlich auch Egr-2 und Egr-3 (siehe auch Abb. 5.2) aktivieren ihrerseits die Transkription von *PDGF*, welches nach Sezernierung wiederum an den PDGF-Rezeptor binden kann, so dass ein positiver autokriner Rückkopplungsmechanismus entsteht. Dadurch, dass die Transkriptionsfaktoren der Egr-Familie gegenseitig ihre Expression induzieren können, wird dieser Effekt zusätzlich weiter verstärkt. Parallel zu PDGF induzieren die Mitglieder der Egr-Familie allerdings ihren Repressor Nab2, so dass die dauerhafte Aktivierung des PDGF-Promotors verhindert wird. Die Wichtigkeit dieses negativen Rückkopplungsmechanismus wird vor allem in Anbetracht der Tatsache deutlich, dass Egr-1 die Expression einer Vielzahl weiterer Wachstumsfaktoren wie z.B. bFGF, VEGF und HGF reguliert (Fahmy and Khachigian, 2007; Houston et al., 2001; Zhang and Liu, 2003), die mit Tumorentwicklung assoziiert werden. Eine Störung des Egr-Nab2-Mechanismus könnte zu einer aberranten Expression dieser Faktoren und dadurch möglicherweise zur malignen Transformation der Zelle führen.

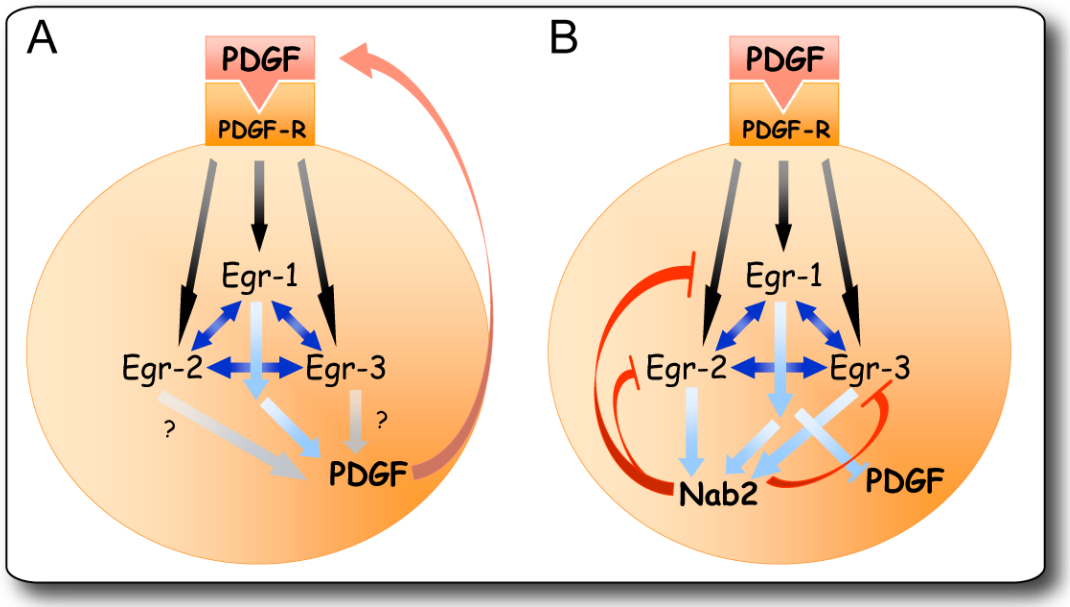


Abb. 5.1 Die Transkriptionsfaktoren Egr-1, Egr-2 und Egr-3 induzieren als Antwort auf extrazelluläre Stimuli die Expression ihres eigenen Repressors Nab2, wodurch eine überschießende Reaktion verhindert wird. A, durch PDGF und die Transkriptionsfaktoren der Egr-Familie vermittelter positiver autokriner Rückkopplungsmechanismus. B, Etablierung eines negativen Rückkopplungsmechanismus zur Kontrolle der PDGF-vermittelten Prozesse. Spitzer Pfeil = aktivierende Wirkung; roter stumpfer Pfeil = Inhibition von Egr-1, Egr-2 und Egr-3; hellblauer stumpfer Pfeil = Inhibition der Egr-vermittelten PDGF-Expression.

Wie oben beschrieben ist Egr-1 in die Regulation einer Vielzahl von Genen, wie z.B. *VEGF*, *PDGF-A*, *HGF*, *cMET*, *bFGF* und *EGF*, involviert. Untersuchungen hinsichtlich einer gemeinsamen Regulation der Transkription dieser Gene durch Egr-1, Egr-2 und Egr-3 sind bisher selten durchgeführt worden. Eine direkte Koregulation konnte bisher nur durch Egr-1 und Egr-3 für das *Arc* (*activity-regulated cytoskeletal-related*) -Gen und durch Egr-2 und Egr-3 für FasL beobachtet werden (Droin et al., 2003; Li et al., 2005). Da in dieser Studie gezeigt werden konnte, dass die Nab2-Expression nicht nur durch Egr-1, sondern auch durch Egr-2 und Egr-3 reguliert wird, wurden die 5`-Regionen von Egr-1-regulierten Genen mittels *in silico* Analyse mit dem Nab2-Promotor verglichen. In Abb. 5.2 sind die putativen Bindestellen für die Transkriptionsfaktoren der Egr- und Sp1-Familie im Nab2-Promotor und beispielhaft für Egr-1-regulierte Gene im PDGF-A- und VEGF-Promotor dargestellt. Dort ist erkennbar, dass in den Promotor-Bereichen viele überlappende Egr/Sp1-Bindemotive vorhanden sind. Interessanterweise konnten im VEGF- und PDGF-A-Promotor eine Anhäufung von multiplen überlappenden Egr/Sp1-Bindestellen, welche vergleichbar mit dem Haupt-regulatorischen-Element von –329 bp bis –263 bp im Nab2-Promotor sind, identifiziert werden. Diese Regionen im VEGF- und PDGF-A-Promotor sind für die Transkription essentiell (Gille et al., 1997; Goldhar et al., 2005; Khachigian et al., 1995). Ähnliche Elemente konnten auch in den Promotoren von *bFGF*, *HGF*, *cMET* und *EGF* entdeckt werden (nicht gezeigt).

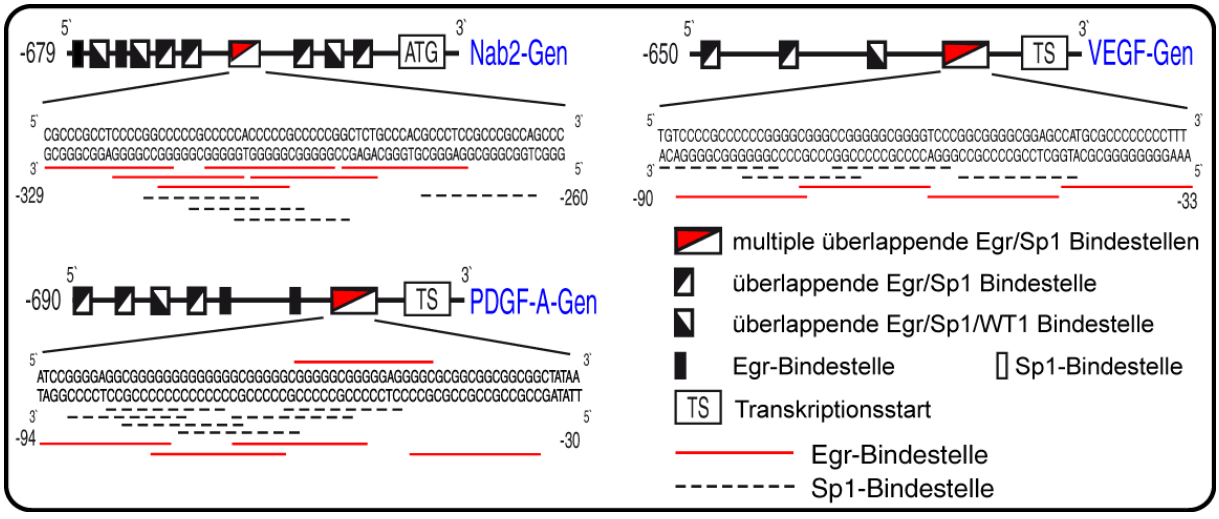


Abb. 5.2 *In silico* Analyse der 5`-Region von Egr-1-regulierten Genen. Relativ zum Translationsstart (ATG = +1) oder Transkriptionsstart (TS = +1) sind die putativen Transkriptionsfaktorbindestellen der Egr- und Sp1-Familie im Nab2-, PDGF-A und VEGF-Promotor dargestellt. Die Sequenz und die Bindestellen der Bereiche mit multiplen überlappenden Egr/Sp1-Bindemotiven (rot geteiltes Rechteck) sind detailliert angezeigt.

Das Auffinden von Ansammlungen multipler überlappender Egr/Sp1-Bindestellen, die mit dem Haupt-regulatorischen-Element im Nab2-Promotor vergleichbar sind, in den 5`-Regionen von *VEGF*, *PDGF-A*, *bFGF*, *HGF*, *cMET* und *EGF*, ist ein Hinweis darauf, dass diese Gene ähnlich wie das *Nab2*-Gen durch ein Zusammenspiel von Egr-1, Egr-2 und Egr-3, aber auch Nab2 reguliert werden könnten.

Zusätzlich zum Volllängen-Nab2 (VL) existiert die Spleißvariante drop8-Nab2, der Exon 6 fehlt (Kirsch, 1995; Kumbrink et al., 2005). Dem alternativen Spleißen wird in den letzten Jahren eine deutlich größere Bedeutung zugesprochen, da inzwischen angenommen wird, dass nahezu von jedem Genprodukt mindestens zwei Spleißvarianten vorhanden sind, die möglicherweise unterschiedliche Funktionen haben können (Stamm et al., 2005; Tress et al., 2007). Dadurch kann in eukaryotischen Organismen trotz der relativ geringen Anzahl von Genen eine enorme funktionelle Komplexität erreicht werden. Beispielsweise wurde die anti-angiogenetische Spleißvariante $VEGF_{165}b$ des pro-angiogenetischen Wachstumsfaktors VEGF-A entdeckt, welche durch alternatives Spleißen der gleichgroßen Exons 8a und 8b entsteht und in verschiedenen Tumoren verringert exprimiert wird (Bates et al., 2002; Ladomery et al., 2007).

Über die drop8-Nab2 Spleißvariante und funktionelle Unterschiede im Vergleich zu Volllängen-Nab2 (VL) ist nur wenig bekannt. Die basale Expression beider Varianten konnte in allen getesteten Mausgeweben nachgewiesen werden und durch Behandlung mit FGF23 (*fibroblast growth factor*) konnten beide Isoformen *in vivo* und *in vitro* induziert werden (Fukuda et al., 2007). Sowohl drop8- als auch VL-Nab2 sind in der Lage mit Egr-1 zu interagieren und die Egr-1-vermittelte Aktivierung eines synthetischen Egr-responsiven Promotors komplett zu inhibieren. In eigenen Untersuchungen konnte ebenfalls eine Koexpression von drop8-*Nab2* und VL-*Nab2* in verschiedenen Zelllinien gezeigt werden (Kap. 4.1.15). Interessanterweise lag in den Melanomzellen eine im Verhältnis zu VL-*Nab2* verringerte basale Expression und Induzierbarkeit der Spleißvariante drop8-*Nab2* vor. Allgemein konnte allerdings beobachtet werden, dass sowohl nach PMA-Stimulation, als auch nach Transfektion von Egr-1, Egr-2 oder Egr-3 verstärkt die endogene Expression der *Nab2* Spleißvariante drop8 induziert wird, welches zusätzlich zu vorigen Ergebnissen darauf hindeutet, dass die Transkriptionsfaktoren der Egr-Familie in die durch PMA-vermittelte Aktivierung der Nab2-Expression involviert sind. Über die mögliche Funktion der bevorzugten Induktion von drop8-Nab2 nach Antwort auf extrazelluläre Signale ist bisher nur wenig bekannt, so dass eine *in silico* Analyse der funktionellen Domänen, die

nach Spleißen von Exon 6 wegfallen, durchgeführt wurde. In Abb. 5.3 ist die Nab2-Proteinstruktur und die mittels zweier verschiedener Vorhersage-Programme verifizierten putativen Phosphorylierungsstellen und/oder Interaktionsmotive dargestellt.

Insgesamt konnten nach Beschränkung auf Interaktionspartner, die im Zellkern vorkommen, 59 potentielle Motive erkannt werden. Unter anderem wurden 11 Interaktionsstellen für Proteine mit SH3 (src-homology) –Domänen, 4 Stellen für das regulatorische Protein 14-3-3, 5 für APC/C (*anaphase promoting ubiquitin ligase complex*), 6 für Transkriptionsfaktoren mit FHA (*forkhead-associated domain*) -Domänen und 13 PDZ-Motive, die wichtig für die Komplexbildung von Proteinen sind, gefunden. Des Weiteren wurden beispielsweise 10 potentielle Phosphorylierungsstellen für prolin-abhängige Kinasen, wie z.B. MAPK (*mitogen-activated protein kinase*), 10 für die Casein Kinase II, 11 für die Protein Kinase A und 4 für CHK1/2 (*checkpoint kinase*) vorhergesagt.

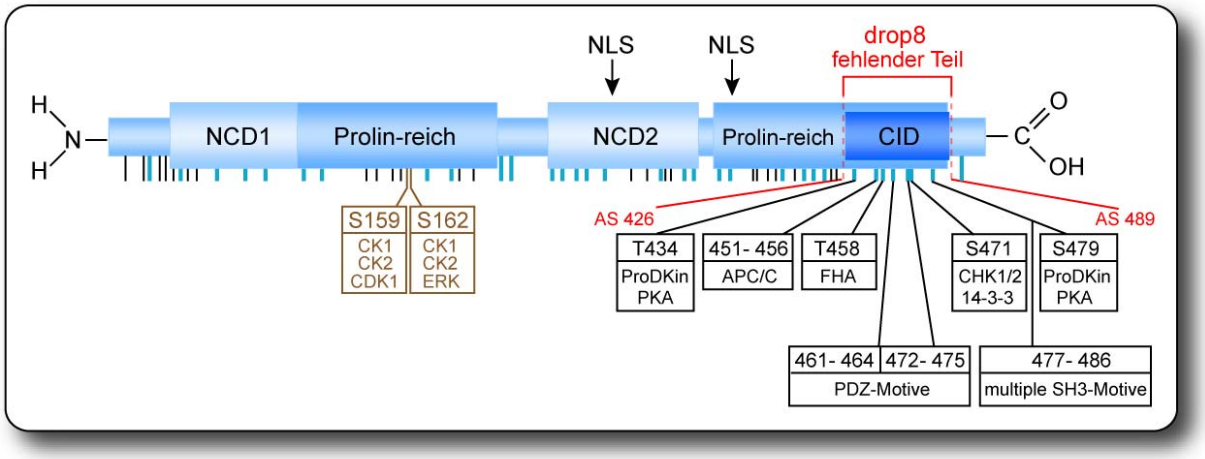


Abb. 5.3 Analyse der funktionellen Domänen des Nab2-Proteins. Dargestellt ist die Nab2-Proteinstruktur und die potentiellen funktionellen Stellen. Vorhergesagte Phophorylierungsstellen (siehe Kap. 3.6.1) sind mit einem schmalen schwarzen Balken markiert. Stellen an denen nicht nur eine mögliche Phosphorylierung durch Kinasen, sondern auch Interaktionsmotive für andere Proteine bestimmt wurden, sind mit breiten hellblauen Strichen gekennzeichnet. Die potentiellen Bindungs-partner oder -domänen für die funktionellen Motive, die in der Spleißvariante drop8-Nab2 fehlen (zwischen AS 426 und 489), sind detailliert dargestellt. In braun sind zwei Serinreste inklusive der möglichen interagierenden Kinasen gezeigt, deren Phosphorylierung nach Stimulation mit dem *epidermal growth factor* (EGF) experimentell verifiziert wurde (Olsen et al., 2006). NCD1 (*nab conserved domain 1*) = Interaktion mit den Transkriptionsfaktoren der Egr-Familie. NCD2 = vermutlich zur Regulation der Aktivität der Egr-Transkriptionsfaktoren benötigt. CID = *CHD4-interacting domain*. NLS = Kernlokalisationssignal. APC/C = *anaphase promoting ubiquitin ligase complex*. CDK1 = *cyclin-dependent kinase*. CHK1/2 = *checkpoint kinase* 1 oder 2. CK1/2 = *casein kinase* 1 oder 2. ERK = *extracellular-signal regulated kinase*. FHA = *forkhead-associated domain*. PDZ-Motive sind wichtig für die Bildung von Multi-Protein-Komplexen. PKA = *protein kinase A*. ProDKin = *prolin dependent Kinases* (z.B. MAPK = *mitogen-activated protein kinase*). SH3 = *src-homology 3 domain*.

Die *in silico* Analysen von linearen Aminosäuremotiven geben jedoch keine Auskunft darüber, ob die vorhergesagten Interaktionsmotive in der Tertiär- oder im Falle des komplexbildenden Nab2 Quartärstruktur überhaupt vorhanden oder für andere Proteine zugänglich sind. Allerdings konnte nach Stimulation mit EGF (*epidermal growth factor*) die Phosphorylierung der Serinreste 159 und 162 des Nab2-Proteins, welche auch als potentielle Phosphorylierungsstellen vorhergesagt wurden, bestimmt werden, wodurch die Aussagekraft der *in silico* Analyse zunimmt (Olsen et al., 2006).

In der Spleißvariante drop8-Nab2 fallen acht potentielle Interaktionsmotive ohne Entstehung von neuen Motiven weg. Darunter eine von 5 Positionen für die Multiprotein E3 Ubiquitinligase APC/C, welche Zellzyklus-regulierende Proteine durch Ubiquitilierung für den Abbau durch das Proteasom markiert und dadurch essentiell für den Ablauf der Mitose ist (Baker et al., 2007). Der Wegfall einer APC/C-Interaktionsstelle könnte durch verringerte Ubiquitilierung zu einer erhöhten Proteinstabilität führen. Die Ubiquitilierung dient jedoch nicht nur der Markierung eines Proteins für den Abbau durch das Proteasom, sondern vermittelt auch durch K63-Ubiquitinketten die Interaktion mit Kinasen (Wang et al., 2001) und ist an der Regulation der zellulären Lokalisation von Proteinen beteiligt (Geetha et al., 2005). Beide Nab2-Varianten wurden ausschließlich im Zellkern gefunden (Fukuda et al., 2007), so dass der Wegfall der funktionellen Motive keinen Einfluss auf die Lokalisation des Nab2-Proteins hat. Der Verlust der Bindung oder der Phosphorylierung durch regulatorische Protein ist allerdings wahrscheinlich, da zusätzlich 4 von 13 SH3-Domänen- sowie 1 von 4 14-3-3-Bindemotive/n und Phosphorylierungsstellen für die *checkpoint* Kinasen (CHK) 1 und 2 (2/4), Proteinkinase A (2/8) und prolin-abhängige Kinasen (2/10) entfallen. Des Weiteren könnte die Reduktion um zwei von 13 Interaktionsmotiven für PDZ-Domänen, welche wichtig für die Bildung von Multi-Protein-Komplexen sind, die Ausbildung von Homo- und Heteromultimeren der Nab-Proteine und auch die Bindung weiterer Proteine beeinträchtigen. Die Spleißvariante drop8-Nab2 ist sowohl in der Lage Egr-1 als auch sich selbst und VL-Nab2 zu binden (Fukuda et al., 2007). Ob Egr-2, Egr-3 und Nab1 ebenfalls mit drop8-Nab2 interagieren können, ist nicht bekannt. Da die Egr-1- (Fukuda et al., 2007) und Egr-2-vermittelte Aktivierung (Srinivasan et al., 2006) eines synthetischen Egr-responsiven Elements auch durch drop8-Nab2 inhibiert werden konnte und der in drop8-Nab2 fehlende C-terminale Bereich bisher nicht in Zusammenhang mit der Egr-Interaktion gebracht wurde, liegt die Vermutung nahe, dass drop8-Nab2 ebenfalls Egr-2 und auch Egr-3 binden und reprimieren kann. Allerdings

wurde gezeigt, dass über den C-terminalen Bereich, der in der Spleißvariante fehlt, Nab2 an CHD4 (*chromodomain helicase DNA-binding protein 4*) binden kann (Srinivasan et al., 2006). Dieser Bereich wurde CHD4-interacting domain (CID) genannt. CHD4 und HDAC (*histone deacetylase*) 1 und 2 sind Bestandteile des NuRD (*nucleosome remodeling and deacetylase*) Komplexes, der sowohl an der ATP-abhängigen Chromatin-Remodellierung als auch der Histondeacetylierung beteiligt ist. Diesen epigenetischen Mechanismen wird eine große Rolle bei der Regulation der Genexpression zugeschrieben (Denslow and Wade, 2007; Feng et al., 2007). Durch die Bindung an CHD4 konnte VL-Nab2 in einem von dem bisher bekannten NCD2-vermittelten unabhängigen Mechanismus, bei dem HDAC-Aktivität benötigt wird, die Egr-2-Aktivität reprimieren (Srinivasan et al., 2006). Das heißt, dass drop8-Nab2 die Egr-Aktivität nur durch den NCD2-vermittelten Mechanismus regulieren kann, der allerdings zur kompletten Repression der Egr-2-vermittelten Aktivierung eines synthetischen Egr-2-Promotors ausreichte. Die durch CID vermittelte Repression schien außerdem schwächer als die NCD2-abhängige zu sein. In Ratten konnte durch ChIP-Analysen die Bindung von Egr-2 und die Rekrutierung von Nab2 und CHD4 an eine Egr-Bindestelle im RAD (*Ras-related gene associated with diabetes*) –Promotor die Existenz dieses Mechanismus auch *in vivo* gezeigt werden.

Über die Funktion der Koexpression der beiden Nab2-Isoformen und die in dieser Arbeit gefundene im Vergleich zu VL-*Nab2* verstärkte Induzierbarkeit der drop8-Spleißvariante nach Transfektion von Egr-1, Egr-2 und Egr-3 oder Behandlung mit PMA kann nur spekuliert werden. Möglicherweise wird die Repressions- oder auch die Aktivierungsstärke von Egr-Zielpromotoren differentiell durch beide Varianten reguliert. VL-Nab2 könnte die Egr-Aktivität nicht nur durch beide Repressionsmechanismen effizienter inhibieren, sondern auch dadurch, dass Nab2 Multimere ausbildet werden, wodurch multiple NuRD-Komplexe rekrutiert werden. Der Verlust der über CHD4-vermittelten Repression bzw. Rekrutierung von HDACs könnte ebenfalls in einer Aktivierung von Egr-Zielpromotoren resultieren, da z.B. gezeigt werden konnte, dass Überexpression von HDAC2 und 3 in die Repression des Zellzyklusregulators p21 (CDKN1A) involviert ist (Huang et al., 2005; Wilson et al., 2006). Dementsprechend könnte die beobachtete verstärkte Induzierbarkeit von drop8-*Nab2* im Verhältnis zu VL-*Nab2* zu einer verringerten Inhibition oder Aktivierung der Egr-vermittelten Transaktivierung führen. Die Induktion von drop8-*Nab2* könnte auch nur temporär größer sein, so dass zu einem späteren Zeitpunkt die Egr-Aktivität durch VL-Nab2 verstärkt reprimiert wird. Um diese Möglichkeit zu untersuchen,

müsste die Expressionskinetik der beiden Varianten über einen größeren Zeitraum bestimmt werden. Welche Rolle die CID-abhängige Inhibition allerdings tatsächlich spielt, ist fraglich, da die CHD4- und HDAC1/2-Expression in verschiedenen Geweben sehr variabel und nicht induzierbar ist. Allerdings zeigten die *in silico* Analysen, dass in drop8-Nab2 ebenfalls wichtige potentielle Interaktionsmotive für regulatorische Proteine fehlen, welche nicht nur die Aktivität oder auch Funktion von Nab2, sondern auch anderer Proteine modulieren könnten. Die in dieser Arbeit gezeigte in der Stärke differierende Expression und Induzierbarkeit von drop8-*Nab2* in Melanomzellen und Kolonkarzinomzellen deutet ebenfalls auf eine wichtige vom Zell- und Gewebetyp abhänige drop8-Funktion hin.

5.2 Regulation der Nab2-Expression im Melanom

Während der Untersuchung der Nab2-Regulation konnten einige Unterschiede zwischen Melanom- und Nicht-Melanom-Zelllinien aufgezeigt werden, die möglicherweise zu der Überexpression von Nab2 im Melanom beitragen könnten.

Beispielsweise konnte in den Experimenten zur Expressionskinetik der Transkriptionsfaktoren der Egr-Familie und Nab2 nicht nur eine verstärkte basale Nab2-Expression bestätigt, sondern auch, im Gegensatz zu den beiden Kolonkarzinomzelllinien, basale *Egr-2*- und *Egr-3*-Expression in fünf Melanomzelllinien gezeigt werden (Kap. 4.1.14). Durch die erweiterte Analyse der basalen Expressionen in 19 Melanomzelllinien und 14 Nichtmelanomzelllinien konnte eine bisher nicht beschriebene Melanomassoziation von *Egr-2* und *Egr-3* gezeigt werden (Kap. 4.3.2). In 77% der Melanomzelllinien konnte die basale *Egr-2*- und *Egr-3*-Expression und in 63% eine Koexpression von *Egr-2* und *Egr-3* nachgewiesen werden, während in nur 21% der Nichtmelanomzelllinien *Egr-3* und in keiner *Egr-2* gefunden wurde. *Egr-1*-Expression konnte in nahezu allen Zelllinien beobachtet werden. Die genauere Quantifizierung der mRNA-Expressionsstärke in vier Melanom- und drei Nichtmelanom-Zelllinien mittels real time PCR (Abb. 4.27) konnte diese Ergebnisse bestätigen. Dabei zeigte sich, dass *Egr-1* zwar ubiquitär aber unterschiedlich stark exprimiert wird. Die Expressionsstärke korrelierte nicht mit der von *Nab2*, so dass man daraus schließen kann, dass, übereinstimmend mit den Ergebnissen aus Kap. 4.1.14, Egr-1 einen geringen Einfluss sowohl auf die Induzierbarkeit als auch auf die konstitutiv hohe basale Expression von Nab2 im Melanom hat. Eine erhöhte *Nab2*-Expression lag nur in den vier Melanomzelllinien vor, die eine konstitutive *Egr-2* und

Egr-3-Expression aufwiesen. Interessanterweise wurde in beiden aus Metastasen abgeleiteten Melanomzelllinien eine besonders hohe *Egr-2*-Expression, aber eine deutlich schwächere *Egr-3*-Expression beobachtet, während in den aus Primärtumoren generierten größere Mengen an *Egr-3*-mRNA und wesentlich geringere an *Egr-2* vorlagen. Dies deutet auf ein mögliches differentielles Expressionsmuster von Egr-2 und Egr-3 abhängig von der Progression des Melanoms hin. Des Weiteren kann man im Zusammenhang mit den vorher beschriebenen Resultaten der allgemeinen Nab2-Regulation daraus schließen, dass Egr-2 und Egr-3 spezifisch im Melanom an der konstitutiv hohen basalen Expression von Nab2 beteiligt sind, während das ubiquitär exprimierte Egr-1 einen geringen Einfluss hat.

Da die Expression von *Egr-2* und *Egr-3* in den untersuchten Zelllinien durch beispielsweise Zellkulturbedingungen beeinflusst werden kann, wurden immunhistochemische Untersuchungen von Melanom- und Nicht-Melanom-Geweben hinsichtlich der *in situ* Expression von Egr-2 und Egr-3 durchgeführt (nicht gezeigt). Die vorläufigen Ergebnisse dieser Färbungen, die allerdings auf Grund der geringen Anzahl der bisher untersuchten Gewebe nicht repräsentativ sind, deuten ebenfalls auf eine Melanomassoziation von Egr-2 und Egr-3 *in situ* hin.

Die Melanomassoziation von *Egr-2* konnte ebenfalls indirekt in einer weiteren Studie, in der nur 5 von 39 Nicht-Melanom Tumorzelllinien (Melanomzelllinien wurden nicht untersucht) eine erhöhte *Egr-2*-Expression aufwiesen, bestätigt werden (Unoki and Nakamura, 2003b).

Die Ergebnisse in Kap. 4.1.6 zeigten, dass die Aktivierung des Nab2-Promotors durch die Transkriptionsfaktoren der Egr-Familie und vor allem durch Egr-1 und Egr-3 in der Melanomzelllinie Mel 888 deutlich stärker als in der Kolonkarzinomzelllinie Colo 320 DM ist. Um zu untersuchen, ob dieses Phänomen melanomspezifisch ist, wurde die Egr-vermittelte Aktivierung des Nab2-Promotors in vier weiteren Melanomzelllinien und zwei weiteren Nichtmelanomzelllinien bestimmt (Kap. 4.3.1). Diese Versuche zeigten, dass Egr-1 und Egr-3 besonders starke Aktivatoren des Nab2-Promotors ist und zusätzlich die Induktion durch Egr-1 und Egr-3 in Melanomzelllinien signifikant stärker ist als in den getesteten Nicht-Melanomzelllinien.

Da die Expressionsstärke von *Egr-1* nicht mit der von *Nab2* im Melanom korreliert (Abb. 4.27), deutet dies auf eine erhöhte Aktivität bzw. Funktionalität und dementsprechend auf eine besondere Rolle von vor allem Egr-3, welches zusätzlich im Gegensatz zu Egr-1 nicht durch Nab1 (siehe auch Kap. 4.1.7), sondern nur durch Nab2 reguliert werden kann, im Melanom hin.

Die Aktivität oder Funktionalität kann durch verschiedene Faktoren beeinflusst werden. Ein bekannter die Egr-Aktivität modulierender Mechanismus könnte in den Melanomzellen durch dominant-negatives Nab2 ausgeübt werden. Das dominant-negativ wirkende Nab2 unterscheidet sich durch einen Basen- und einen daraus resultierenden Aminosäure-Austausch in der NCD1 von Wildtyp-Nab2, wodurch es nach dem Einbau in den multimeren Nab2-Komplex die Bindung an Egr-1, Egr-2 und Egr-3 verhindert und somit den gesamten Komplex unfunktionell macht (Kumbrink, 2002; Svaren et al., 1998). Dementsprechend würde die Aktivität der Transkriptionsfaktoren der Egr-Familie ansteigen. Nach Sequenzierung der kompletten *Nab2*-cDNA der Melanomzelllinie Mel JuSo konnten keine Alterationen festgestellt werden (Kirsch, 1995). Durch zusätzliche Sequenzierungen der genomischen DNA, welche für die NCD1 und die flankierenden Regionen kodiert, von Mel JuSo und zwei weiteren Melanomzelllinien sowie zwei Kolonkarzinomzelllinien konnten ebenfalls keine Veränderungen in der Sequenz aufgezeigt werden (Kap. 4.2.1), so dass mutiertes *Nab2* als Ursache der veränderten Egr-Aktivität ausgeschlossen werden kann.

Eine andere Ursache für die erhöhte Egr-1- und Egr-3-Aktivität könnte das verstärkte Auftreten von bestimmten hochaktiven Isoformen durch spezifische Verwendung alternativer Translationsstartpunkte im Melanom sein. Interessanterweise existieren im Gehirn koexprimierte multiple Egr-3-Isoformen, die unterschiedliche transaktivierende Fähigkeiten, aber die gleiche Expressionskinetik aufweisen (O'Donovan et al., 2000; O'Donovan and Baraban, 1999). Die weitere Untersuchung der Egr-3-Isoformen mit Hilfe von Deletionskonstrukten zeigte, dass Egr-3 zwei N-terminale Aktivierungsdomänen besitzt, von denen die erste der im Gehirn hauptsächlich vorkommenden Egr-3β-Isoform fehlt. Dementsprechend wurde eine geringere transaktivierende Funktion dieser Isoform beobachtet. Die spezifische Expression der aktiveren Egr-3-Isoformen im Melanom könnte demnach die erhöhte Aktivierung des Nab2-Promotors durch Egr-3 im Vergleich zu Nicht-Melanomzelllinien erklären. Eine Untersuchung der Expressionsmuster der Egr-3-Isoformen in Melanom-zelllinien und –geweben könnte hier Aufschluss geben.

Die Verwendung alternativer Translationsstartpunkte könnte ebenfalls zu der bisher nicht genau geklärten Bandenheterogenität von Nab2 beitragen (Kap. 4.1.2), da im Leserahmen von Nab2 fünf Methionine in geringem Abstand zueinander vorliegen (nicht gezeigt).

Die Experimente in dieser Arbeit zur Regulation der Nab2-Expression haben gezeigt, dass Egr-1, Egr-2 und Egr-3 die Expression ihres eigenen Repressors regulieren. Des Weiteren deuten die Resultate darauf hin, dass im Gegensatz zu Egr-1 die melanomassoziierten Transkriptionsfaktoren Egr-2 und Egr-3 an der konstitutiv starken Nab2-Expression im Melanom beteiligt sind. Egr-3 scheint auf Grund seiner erhöhten Aktivität im Melanom dabei eine besondere Bedeutung zu haben. Allerdings ist die konstitutive Egr-2- und Egr-3-Expression sicherlich nur eine Teilursache, da vermutlich auch epigenetische Mechanismen wie Methylierung, Deacetylierung und Chromatin-Remodellierung, denen in den letzten Jahren eine immer größere Rolle bei der Genregulation zugesprochen wird (Denslow and Wade, 2007; Feng et al., 2007), in die gewebespezifische Nab2-Expression involviert sind. Mutationen im 5`-Bereich des *Nab2*-Gens könnten ebenfalls im Melanom vorliegen. Beispielsweise liegen in dem durch HDACs und Egr/Sp1 regulierten Promotor der 5-Lipoxygenase in Asthmapatienten Veränderungen vor, die zur Deletion verschiedener für die Transkription wichtiger Egr/Sp1-Bindestellen führen (In et al., 1997; Schnur et al., 2007). Eine veränderte posttranskriptionelle Regulation durch die inzwischen immer häufiger mit Tumoren assoziierten microRNAs (miRNAs) könnte ebenfalls die Nab2-Expression beeinflussen (Ma et al., 2007; Mack, 2007).

Andererseits können auch Veränderungen der Moleküle, die in den Ras/Raf/MAPK-Signaltransduktionsweg involviert sind, und somit die Aktivität und Expression der Mitglieder der Egr-Familie und anderer Transkriptionsfaktoren modulieren, vorliegen. Beispielsweise wurde in bis zu 60% der kutanen Melanome die aktivierende Mutation V600E der Serin/Threonin-Kinase BRAF nachgewiesen, während sie in anderen Tumoren deutlich seltener vorlag (Davies et al., 2002; Dhomen and Marais, 2007; Poynter et al., 2006). Allerdings ist das Expressionsmuster hinsichtlich der Egr-Mitglieder und *Nab2* in den beiden Melanomzelllinien SK-MEL-1 (ohne V600E-Mutation) und A375 (mit V600E-Mutation) vergleichbar (Abb. 4.26), so dass vermutlich kein Zusammenhang zwischen mutiertem BRAF und der konstitutiven Egr-2-, Egr-3- und Nab2-Expresion im Melanom besteht.

Da die Induktion der *Nab2*-Expression innerhalb von 1-2 h zur Kontrolle der Egr-Aktivität erfolgt und Methylierungs- und Demethylierungsvorgänge in der Regel über mehrere Stunden oder Tage ablaufen (Kress et al., 2001; Thomassin et al., 2001), dürfte die DNA-Methylierung der 5`-Region von *Nab2* bei der Regulation der Nab2-Expression keine große Bedeutung haben. Die Regulation eines Gens durch Methylierung muss allerdings

nicht auf die 5`-Region beschränkt sein, denn die Egr-3-Expression wird in ATL (*adult T-cell leukemia*) –Zellen durch Hypermethylierung in Exon 2 unterdrückt (Yasunaga et al., 2004). Andererseits konnte eine verstärkte Egr-2-Expression in Zelllinien beobachtet werden, in denen Methylierung in Intron 1 von *Egr-2* vorlag (Unoki and Nakamura, 2003b). Dadurch könnte vermutet werden, dass die erhöhte Egr-3-Expression im Melanom auf einer Demethylierung in Exon 2 beruht, während Methylierung des *Egr-2*-Introns zu der verstärkten Egr-2-Expression führt. Inwiefern diese Mechanismen Einfluss auf die Nab2-Expression haben ist ungeklärt und bedarf weiterer Untersuchungen.

Eine weitere Möglichkeit, die gerade im Hinblick auf die in dieser Arbeit entdeckte Melanomassoziation von Egr-2 wichtig erscheint, ist die zusätzliche Aktivierung der Nab2-Transkription durch Bindung von Egr-2 in Intronbereichen des *Nab2*-Gens. Dieser Mechanismus konnte für die Regulation von *MZP* (*myelin protein zero*) durch Egr-2 gezeigt werden (LeBlanc et al., 2006). In Intron 1 der *Nab2*-DNA konnten mittels *in silico* Analyse zahlreiche überlappende Egr/Sp1-Bindestellen vorhergesagt werden (nicht gezeigt), so dass dieser Mechanismus ebenfalls zur konstitutiv starken Expression von Nab2 beitragen könnte.

Diese beschriebenen Regulationsmöglichkeiten können mit den verwendeten Nab2-Promotor-Reportergen-Konstrukten nicht untersucht werden. Zum einen handelt es sich bei einem Reportergen-Plasmid um ein artifizielles System, bei dem sich beispielsweise das Bindungsmuster der Histone von dem chromosomalen unterscheidet (Turner, 2002), wodurch es zu einer unterschiedlichen Rekrutierung von Chromatin-remodellierenden Faktoren kommen kann, welches die Genregulation beeinflusst. Andererseits kann mit diesem System nicht der Einfluss von bis zu 100 kb entfernten *enhancer/silencer*-Elementen auf die *Nab2*-Transkription untersucht werden (Bondarenko et al., 2003; Yagi et al., 2007). Eine Erweiterung des 3`-Bereichs könnte allerdings Hinweise liefern, ob regulatorische Elemente in den Exons oder Introns des *Nab2*-Gens vorhanden sind.

Diese Einschränkungen bei der Verwendung von Promotor-Reportergen-Konstrukten könnten auch die stärkeren Aktivitäten der Nab2-Promotor-Luziferase-Konstrukte (Abb. 4.9), die nicht mit der endogenen Nab2-Expression korrelieren (Kap. 4.1.1 und 4.3.2), in den Colo 320 DM Zellen im Vergleich zu Mel 888 Zellen erklären. Die deutlich höhere Transfektionseffizienz der Colo 320 DM Zellen könnte ebenfalls eine Ursache sein (Kumbrink, 2002). Allerdings konnten mittels Dual-Luziferase-Versuch, durch den der

Einfluss unterschiedlicher Transfektionseffizienzen eliminiert werden kann, in diesen und drei weiteren Tumorzelllinien unerwarteterweise vergleichbare basale Nab2-Promotor-Aktivitäten festgestellt werden (Gerlinger, 2006). Mit diesen Experimenten kann jedoch keine durch die Transfektionsmethodik induzierte Nab2-Expression bzw- Nab2-Promotor-Aktivität ausgeschlossen werden, denn wie in dieser Arbeit in Kap. 4.1.5. und einer anderen Studie (Kumbrink, 2002) gezeigt werden konnte, ist die endogene Nab2-Expression durch zwei verschiedene Transfektionsreagenzien induzierbar. Da die Induktionsstärke von *Nab2* in den Zelllinien sehr variabel ist (Kap. 4.1.14), ist die tatsächliche Nab2-Promotor-Reporter-Aktivität nur schwer zu bestimmen.

Diese Ergebnisse deuten daraufhin, dass die melanomassoziierten Egr-2 und Egr-3 und oben beschriebene epigenetische Mechanismen, durch welche die Aktivität von Egr-2 und Egr-3 möglicherweise verstärkt wird, an der konstitutiven Nab2-Expression im Melanom beteiligt sind.

5.3 Auswirkungen der Dysregulation des Nab2-Egr-Systems im Melanom

Da über die Funktion und die Vorteile der konstitutiven Nab2-Expression in Melanomen bisher nur wenig bekannt ist, sollten stabile Transfektanten von Nab2-exprimierenden Melanomzelllinien hergestellt werden, in denen das endogen exprimierte Nab2 inaktiviert wird. Dadurch sollte es möglich sein vergleichende Experimente hinsichtlich Wachstum, Invasivität, Adhäsion und Apoptose-Sensitivität in ein und derselben Zelllinie mit aktivem und inaktiviertem Nab2 durchzuführen.

Durch stabile Transfektion der Melanomzelllinien Mel 888 und Mel JuSo mit dem dominant-negativ wirkenden Nab2-E37K sollte das endogen exprimierte Nab2 inaktiviert werden (Kap. 4.2.2). Um die Expression von Nab2-E37K in den Transfektanten von der des Nab2-Wildtyps zu differenzieren, wurde ein bicistronisches Expressionssystem (pIRES2-EGFP) verwendet. Die dominant-negative Wirkung von E37K-IRES2-EGFP und die Detektierbarkeit des EGFP wurde überprüft (Kap.4.2.2) und anschließend sollten stabile E37K-IRES2-EGFP- und pIRES2-EGFP-Leervektor-Transfektanten der Melanom-zelllinien Mel 888 und Mel JuSo hergestellt werden. Allerdings zeigte sich, dass die Transfektanten im Verlauf der Klonierung die Nab2-E37K-Expression verloren, so dass keine funktionellen Experimente durchgeführt werden konnten.

Um jedoch Untersuchungen hinsichtlich der Funktion der konstitutiven Nab2-Expression im Melanom durchführen zu können, könnte ein induzierbares siRNA-Expressionssystem verwendet werden, welches auf dem Prinzip der Tetracyclin-kontrollierten Genexpression basiert (Gossen et al., 1995; Gossen and Bujard, 1992). Durch Zugabe des Tetracyclin-Derivats Doxycyclin zum Zellkulturmedium kann, abhängig vom gewählten System, die Expression der siRNA transient an- oder abgeschaltet werden (BD, 2005). Der Vorteil gegenüber einer transienten Transfektion ist vor allem, dass durch die vorherige Klonierung der induzierbaren Transfektanten, die transiente Depletion der Expression in allen Zellen erreicht wird. Des Weiteren kann die Stärke der Depletion durch Doxycyclin dosis-abhängig reguliert werden. Eine hierfür zu verwendende funktionelle Nab2-siRNA-Sequenz ist inzwischen ebenfalls beschrieben worden (Collins et al., 2006).

Da in dieser Arbeit aus oben genannten Gründen keine funktionellen Untersuchungen hinsichtlich der konstitutiven Nab2-Expression im Melanom durchgeführt werden konnten und in der Literatur wenig bekannt ist, können nur Vermutungen über die Auswirkungen angestellt werden.

In Abb. 5.4 sind beispielhaft einige der Egr-Zielgene, deren Expression durch die Dysregulation des Egr-Nab2-Systems beeinflusst werden könnte, und entsprechende mögliche Auswirkungen, die zur Malignität des Melanoms beitragen könnten, dargestellt.

Die durch Egr-2- und Egr-3-vermittelte Expression von FasL wird durch Nab2, entgegen seiner normalen Repressorfunktion, weiter verstärkt (Mittelstadt and Ashwell, 1998; Mittelstadt and Ashwell, 1999; Sevetson et al., 2000; Yoo and Lee, 2004). Dies könnte eine Erklärung für die häufig im Melanom beobachtete Überexpression von membranständigem und löslichem FasL sein (Neuber and Eidam, 2006; Redondo et al., 2002). Im Gegensatz dazu liegt in normalen Melanozyten und benignen Nävuszellen keine FasL-Expression vor, welches zu einer im Vergleich zu Melanomzellen verringerten Apoptose-Sensitivität führte (Shukuwa et al., 2002). Allerdings war die durch Fas und FasL vermittelte Apoptose in den Melanomzellen deutlich geringer als in tumorinfiltrierenden Lymphozyten (TIL), welches darauf hindeutet, dass Melanomzellen über FasL die Apoptose von TIL induzieren können (Shukuwa et al., 2002). FasL scheint im Magenkarzinom auch in die Rekrutierung von tumorassoziierten Macrophagen (TAM) involviert zu sein (Ohno et al., 2005). TAM wird in den letzten Jahren eine wichtige Rolle bei der Progression von Tumoren zugeschrieben (Lewis and Pollard, 2006; Mantovani et al., 2006). Sie werden durch verschiedene vom Tumor sezernierte Faktoren, wie M-CSF,

VEGF, CCL2 und anscheinend auch FasL, zum Tumor rekrutiert und dahingehend beeinflusst ihrerseits TIL zu supprimieren und das Tumorwachstum, die Invasion, die Angiogenese und die Mestastasierung zu fördern. TAM spielen ebenfalls, wie die erhöhte FasL-Expression vermuten lässt, beim Melanom eine Rolle. Die Menge an rekrutierten TAM korrelierte in Patientengeweben positiv mit der Tumordicke, der Invasivität und Metastasierung (Varney et al., 2005). Des Weitern konnte eine Assoziation der VEGF-Expressionsstärke mit der zunehmenden Melanomprogression gezeigt werden. Egr-1 und, wie vorher diskutiert, vermutlich auch Egr-2 und Egr-3 sind an der Regulation der VEGF-Expression beteiligt. Die konstitutive Expression von Egr-2 und Egr-3 könnte zu der beobachteten starken VEGF-Expression führen. Das in Kap. 4.3.2 gezeigte Umkehren der Expressionsstärken von Egr-2 und Egr-3 in aus Metastasen generierten Melanomzelllinien könnte eine Erklärung für den weiteren Anstieg der VEGF-Expression in Metastasen sein. In welchem Zusammenhang die konstitutive Nab2-Expression im Melanom dazu steht ist unklar, da Überexpression von Nab2 durch Inhibition von Egr-1 die VEGF-vermittelte Angiogenese blockiert (Houston et al., 2001; Lucerna et al., 2003). Möglicherweise überwiegt im Melanom der aktivierende Effekt von Egr-2 und Egr-3, auch durch die gegenseitige Induktion der Egr-Transkriptionsfaktoren (Kap. 4.1.5 und 4.1.13), den inhibierenden durch Nab2, da die nach ektopischer Überexpression erhaltenen Nab2-Mengen sicherlich deutlich größer als die endogenen im Melanom sind. Andererseits würde die Inhibition der Expression der anti-angiogenetischen $VEGF_{165}$b-Spleißvariante (Ladomery et al., 2007) durch Nab2 von Vorteil für die Melanomzellen sein. Ähnliches könnte für das funktionell ambivalente und häufig mit Tumorprogression in Zusammenhang gebrachte TGFβ vermutet werden (Jakowlew, 2006). Sowohl die Inhibition der pro-apoptotischen Eigenschaften durch Nab2 als auch die Aktivierung der pro-angiogenetischen und Stroma-bildenden Funktionen durch Egr-2 und Egr-3 würden positiv auf die Melanomprogression wirken. Vergleichbare Mechanismen liegen möglicherweise für den im Melanom als autokrinen Wachstumsfaktor wirkenden bFGF (Halaban et al., 1988) oder die ebenfalls mit Tumoren assoziierten HGF/cMET und EGF/EGFR vor. Eine weitere wichtige Funktion wäre die Inhibition der durch Egr-2 über den PTEN-Weg vermittelten Induktion der Apoptose durch Nab2 (Unoki and Nakamura, 2001; Unoki and Nakamura, 2003a). Inwiefern die Unterdrückung der drop8-*Nab2*-Spleißvariante eine Rolle im Melanom spielt ist ebenfalls unklar. Möglichweise ist die nur durch Volllängen-Nab2 bedingte Rekrutierung des NuRD-Komplexes oder anderer

Proteine in Melanomen essentiell (Srinivasan et al., 2006). Diese Hypothesen müssen allerdings experimentell z.B. durch oben beschriebene induzierbare Depletion der Nab2-, Egr-2- und Egr-3-Expression oder induzierbare Expression von drop8-Nab2 und darauf folgende funktionelle Untersuchungen verifiziert werden.

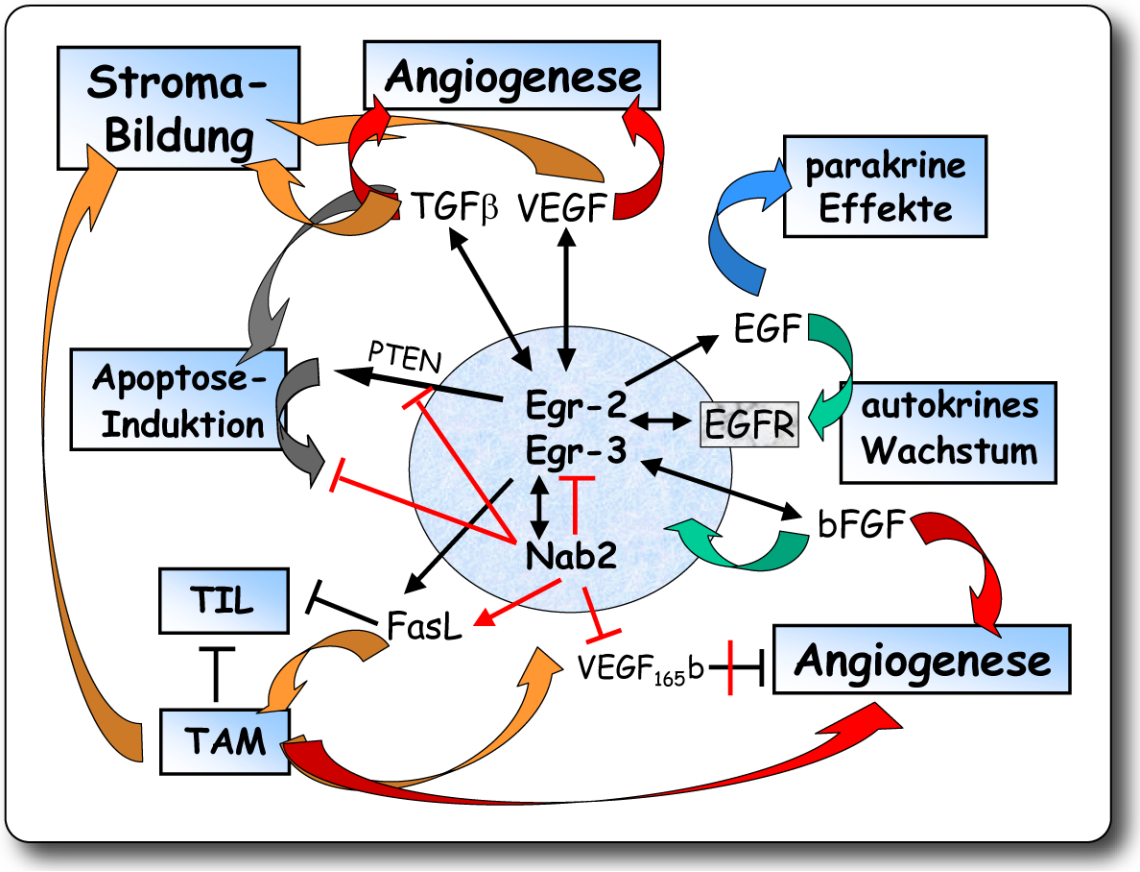


Abb. 5.4 Mögliche Auswirkungen der konstitutiv starken Expression von Nab2, Egr-2 und Egr-3, welche zur Malignität des Melanoms beitragen könnten. Spitzer Pfeil = aktivierende Wirkung; stumpfer Pfeil = direkte oder indirekte inhibierende Wirkung. TAM = tumorassoziierte Macrophagen. TIL = tumorinfiltrierende Lymphozyten. $VEGF_{165}b$ = anti-angiogenetische Spleißvariante von VEGF-A.

Zusammenfassend bleibt zu sagen, dass die Dysregulation des Nab2-Egr-Systems im Melanom mit großer Wahrscheinlichkeit an dessen hoher Malignität beteiligt ist. Durch die vermutlich komplexe und sehr sensitiv regulierte Aktivierung und Inhibition von Egr-Zielgenen durch Nab2 könnte ein Gleichgewicht von Faktoren entstehen, welches für die Melanomzellen von großem Vorteil ist. Die in dieser Arbeit nachgewiesene Regulation des Egr-Repressors Nab2 durch die Transkriptionsfaktoren der Egr-Familie und der dadurch etablierte negative, aber in vereinzelten Fällen auch positive, Rückkopplungs-Mechanismus kann im Zusammenhang mit der entdeckten Melanomassoziation von Egr-2 und Egr-3 durch darauf aufbauende Experimente zum Verständnis der Biologie des Melanoms beitragen.

6 Literaturverzeichnis

Abdulkadir,S.A., Carbone,J.M., Naughton,C.K., Humphrey,P.A., Catalona,W.J., and Milbrandt,J. (2001). Frequent and early loss of the EGR1 corepressor NAB2 in human prostate carcinoma. Hum. Pathol. *32*, 935-939.

Atzpodien,J. and Reitz,M. (2007). GM-CSF plus antigenic peptide vaccination in locally advanced melanoma patients. Cancer Biother. Radiopharm. *22*, 551-555.

Baker,D.J., Dawlaty,M.M., Galardy,P., and van Deursen,J.M. (2007). Mitotic regulation of the anaphase-promoting complex. Cell Mol. Life Sci. *64*, 589-600.

Baron,V., Duss,S., Rhim,J., and Mercola,D. (2003). Antisense to the early growth response-1 gene (Egr-1) inhibits prostate tumor development in TRAMP mice. Ann. N. Y. Acad. Sci. *1002*, 197-216.

Bastian,P.J., Palapattu,G.S., Yegnasubramanian,S., Lin,X., Rogers,C.G., Mangold,L.A., Trock,B., Eisenberger,M., Partin,A.W., and Nelson,W.G. (2007). Prognostic Value of Preoperative Serum Cell-Free Circulating DNA in Men with Prostate Cancer Undergoing Radical Prostatectomy. Clin. Cancer Res. *13*, 5361-5367.

Bates,D.O., Cui,T.G., Doughty,J.M., Winkler,M., Sugiono,M., Shields,J.D., Peat,D., Gillatt,D., and Harper,S.J. (2002). VEGF165b, an inhibitory splice variant of vascular endothelial growth factor, is down-regulated in renal cell carcinoma. Cancer Res. *62*, 4123-4131.

BD (2005). Knockout Inducible RNAi Systems. Clontechniques 14-15.

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

Bondarenko,V.A., Liu,Y.V., Jiang,Y.I., and Studitsky,V.M. (2003). Communication over a large distance: enhancers and insulators. Biochem. Cell Biol. *81*, 241-251.

Bonitsis,N., Batistatou,A., Karantima,S., and Charalabopoulos,K. (2006). The role of cadherin/catenin complex in malignant melanoma. Exp. Oncol. *28*, 187-193.

Breslow,A. (1970). Thickness, cross-sectional areas and depth of invasion in the prognosis of cutaneous melanoma. Ann. Surg. *172*, 902-908.

Carter,J.H., Lefebvre,J.M., Wiest,D.L., and Tourtellotte,W.G. (2007). Redundant role for early growth response transcriptional regulators in thymocyte differentiation and survival. J. Immunol. *178*, 6796-6805.

Cartharius,K., Frech,K., Grote,K., Klocke,B., Haltmeier,M., Klingenhoff,A., Frisch,M., Bayerlein,M., and Werner,T. (2005). MatInspector and beyond: promoter analysis based on transcription factor binding sites. Bioinformatics. *21*, 2933-2942.

Chen,Y.L., Chen,S.H., Wang,J.Y., and Yang,B.C. (2003). Fas ligand on tumor cells mediates inactivation of neutrophils. J. Immunol. *171*, 1183-1191.

Cho,J.H., Klein,W.H., and Tsai,M.J. (2007). Compensational regulation of bHLH transcription factors in the postnatal development of BETA2/NeuroD1-null retina. Mech. Dev. *124*, 543-550.

Collins,S., Wolfraim,L.A., Drake,C.G., Horton,M.R., and Powell,J.D. (2006). Cutting Edge: TCR-induced NAB2 enhances T cell function by coactivating IL-2 transcription. J. Immunol. *177*, 8301-8305.

Davies,H., Bignell,G.R., Cox,C., Stephens,P., Edkins,S., Clegg,S., Teague,J., Woffendin,H., Garnett,M.J., Bottomley,W., Davis,N., Dicks,E., Ewing,R., Floyd,Y., Gray,K., Hall,S., Hawes,R., Hughes,J., Kosmidou,V., Menzies,A., Mould,C., Parker,A., Stevens,C., Watt,S., Hooper,S., Wilson,R., Jayatilake,H., Gusterson,B.A., Cooper,C., Shipley,J., Hargrave,D., Pritchard-Jones,K., Maitland,N., Chenevix-Trench,G., Riggins,G.J., Bigner,D.D., Palmieri,G., Cossu,A., Flanagan,A., Nicholson,A., Ho,J.W., Leung,S.Y., Yuen,S.T., Weber,B.L., Seigler,H.F., Darrow,T.L., Paterson,H., Marais,R., Marshall,C.J., Wooster,R., Stratton,M.R., and Futreal,P.A. (2002). Mutations of the BRAF gene in human cancer. Nature *417*, 949-954.

Denslow,S.A. and Wade,P.A. (2007). The human Mi-2/NuRD complex and gene regulation. Oncogene *26*, 5433-5438.

Dhomen,N. and Marais,R. (2007). New insight into BRAF mutations in cancer. Curr. Opin. Genet. Dev. *17*, 31-39.

Didenko,V.V. (2001). DNA probes using fluorescence resonance energy transfer (FRET): designs and applications. Biotechniques *31*, 1106-1.

Droin,N.M., Pinkoski,M.J., Dejardin,E., and Green,D.R. (2003). Egr family members regulate nonlymphoid expression of Fas ligand, TRAIL, and tumor necrosis factor during immune responses. Mol. Cell Biol. *23*, 7638-7647.

Dudley,M.E., Wunderlich,J.R., Yang,J.C., Sherry,R.M., Topalian,S.L., Restifo,N.P., Royal,R.E., Kammula,U., White,D.E., Mavroukakis,S.A., Rogers,L.J., Gracia,G.J., Jones,S.A., Mangiameli,D.P., Pelletier,M.M., Gea-Banacloche,J., Robinson,M.R., Berman,D.M., Filie,A.C., Abati,A., and Rosenberg,S.A. (2005). Adoptive cell transfer therapy following non-myeloablative but lymphodepleting chemotherapy for the treatment of patients with refractory metastatic melanoma. J. Clin. Oncol. *23*, 2346-2357.

Ehrengruber,M.U., Muhlebach,S.G., Sohrman,S., Leutenegger,C.M., Lester,H.A., 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.A., Kumar,M.V., Iczkowski,K.A., Bostwick,D.G., and Tindall,D.J. (1998). Expression of early growth response genes in human prostate cancer. Cancer Res *58*, 2461-2468.

Eisen,T., Ahmad,T., Flaherty,K.T., Gore,M., Kaye,S., Marais,R., Gibbens,I., Hackett,S., James,M., Schuchter,L.M., Nathanson,K.L., Xia,C., Simantov,R., Schwartz,B., Poulin-Costello,M., O'Dwyer,P.J., and Ratain,M.J. (2006). Sorafenib in advanced melanoma: a Phase II randomised discontinuation trial analysis. Br. J. Cancer *95*, 581-586.

Fahmy,R.G. and Khachigian,L.M. (2007). Suppression of growth factor expression and human vascular smooth muscle cell growth by small interfering RNA targeting EGR-1. J. Cell Biochem. *100*, 1526-1535.

Feng,J., Fouse,S., and Fan,G. (2007). Epigenetic regulation of neural gene expression and neuronal function. Pediatr. Res. *61*, 58R-63R.

Flaherty,K.T. (2006). Chemotherapy and targeted therapy combinations in advanced melanoma. Clin. Cancer Res. *12*, 2366s-2370s.

Förster,T. (1948). Annalen der Physik 2, 55-75.

Fukuda,T., Kanomata,K., Nojima,J., Urakawa,I., Suzawa,T., Imada,M., Kukita,A., Kamijo,R., Yamashita,T., and Katagiri,T. (2007). FGF23 induces expression of two isoforms of NAB2, which are corepressors of Egr-1. Biochem. Biophys. Res. Commun. *353*, 147-151.

Furuta,J., Umebayashi,Y., Miyamoto,K., Kikuchi,K., Otsuka,F., Sugimura,T., and Ushijima,T. (2004). Promoter methylation profiling of 30 genes in human malignant melanoma. Cancer Sci. *95*, 962-968.

Geetha,T., Kenchappa,R.S., Wooten,M.W., and Carter,B.D. (2005). TRAF6-mediated ubiquitination regulates nuclear translocation of NRIF, the p75 receptor interactor. EMBO J. *24*, 3859-3868.

Geller,A.C., Swetter,S.M., Brooks,K., Demierre,M.F., and Yaroch,A.L. (2007). Screening, early detection, and trends for melanoma: current status (2000-2006) and future directions. J. Am. Acad. Dermatol. *57*, 555-572.

Gerlinger,M. (2006). Die genomische Organisation und transkriptionelle Regulation des Transkriptionskorepressors Nab2. Dissertation, Ludwig-Maximilians-Universität München.

Gille,J., Swerlick,R.A., and Caughman,S.W. (1997). Transforming growth factor-alpha-induced transcriptional activation of the vascular permeability factor (VPF/VEGF) gene requires AP-2-dependent DNA binding and transactivation. EMBO J. *16*, 750-759.

Goldhar,A.S., Vonderhaar,B.K., Trott,J.F., and Hovey,R.C. (2005). Prolactin-induced expression of vascular endothelial growth factor via Egr-1. Mol. Cell Endocrinol. *232*, 9-19.

Gossen,M. and Bujard,H. (1992). Tight control of gene expression in mammalian cells by tetracycline-responsive promoters. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A *89*, 5547-5551.

Gossen,M., Freundlieb,S., Bender,G., Muller,G., Hillen,W., and Bujard,H. (1995). Transcriptional activation by tetracyclines in mammalian cells. Science *268*, 1766-1769.

Gross,P. and Oelgeschlager,T. (2006). Core promoter-selective RNA polymerase II transcription. Biochem. Soc. Symp. 225-236.

Halaban,R., Kwon,B.S., Ghosh,S., Delli,B.P., and Baird,A. (1988). bFGF as an autocrine growth factor for human melanomas. Oncogene Res. *3*, 177-186.

Hanahan,D. and Weinberg,R.A. (2000). The hallmarks of cancer. Cell *100*, 57-70.

Honkaniemi,J., Zhang,J.S., Longo,F.M., and Sharp,F.R. (2000). Stress induces zinc finger immediate early genes in the rat adrenal gland. Brain Res. *877*, 203-208.

Houston,P., Campbell,C.J., Svaren,J., Milbrandt,J., and Braddock,M. (2001). The transcriptional corepressor NAB2 blocks Egr-1-mediated growth factor activation and angiogenesis. Biochem. Biophys. Res. Commun. *283*, 480-486.

Huang,B.H., Laban,M., Leung,C.H., Lee,L., Lee,C.K., Salto-Tellez,M., Raju,G.C., and Hooi,S.C. (2005). Inhibition of histone deacetylase 2 increases apoptosis and p21Cip1/WAF1 expression, independent of histone deacetylase 1. Cell Death. Differ. *12*, 395-404.

Huang,R.P., Fan,Y., Ni,Z., Mercola,D., and Adamson,E.D. (1997). Reciprocal modulation between Sp1 and Egr-1. J. Cell Biochem. *66*, 489-499.

Huang,R.P., Fan,Y., Peng,A., Zeng,Z.L., Reed,J.C., Adamson,E.D., and Boynton,A.L. (1998). Suppression of human fibrosarcoma cell growth by transcription factor, Egr-1, involves down-regulation of Bcl-2. Int. J. Cancer *77*, 880-886.

In,K.H., Asano,K., Beier,D., Grobholz,J., Finn,P.W., Silverman,E.K., Silverman,E.S., Collins,T., Fischer,A.R., Keith,T.P., Serino,K., Kim,S.W., DeSanctis,G.T., Yandava,C., Pillari,A., Rubin,P., Kemp,J., Israel,E., Busse,W., Ledford,D., Murray,J.J., Segal,A., Tinkleman,D., and Drazen,J.M. (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.

Jain,N., Mahendran,R., Philp,R., Guy,G.R., Tan,Y.H., and Cao,X. (1996). Casein kinase II associates with Egr-1 and acts as a negative modulator of its DNA binding and transcription activities in NIH 3T3 cells. J. Biol. Chem. *271*, 13530-13536.

Jakowlew,S.B. (2006). Transforming growth factor-beta in cancer and metastasis. Cancer Metastasis Rev. *25*, 435-457.

Jemal,A., Siegel,R., Ward,E., Murray,T., Xu,J., Smigal,C., and Thun,M.J. (2006). Cancer statistics, 2006. CA Cancer J. Clin. *56*, 106-130.

Johnson,J.P. (1999). Cell adhesion molecules in the development and progression of malignant melanoma. Cancer Metastasis Rev. *18*, 345-357.

Khachigian,L.M., Williams,A.J., 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. *270*, 27679-27686.

Kirsch,K.H. (1995). Strukturelle und funktionelle Charakterisierung des melanomassoziierten mader-Gens. Dissertation, Ludwig-Maximilians-Universität München *12*, 963-971.

Kirsch,K.H., Korradi,Y., and Johnson,J.P. (1996). Mader: a novel nuclear protein over expressed in human melanomas. Oncogene *12*, 963-971.

Köhler,T., Laßner,D., Rost,A.K., Thamm,B., Pustowoit,B., and Remke,H. (1995). Quantitation of mRNA by polymerase chain reaction. Springer.

Kramer,D. (2000). Mader: Biochemische Eigenschaften und Regulation eines humanen Transkriptionskorepressors. Dissertation, Ludwig-Maximilians-Universität München.

Kress,C., Thomassin,H., and Grange,T. (2001). Local DNA demethylation in vertebrates: how could it be performed and targeted? FEBS Lett. *494*, 135-140.

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. U. S. A *100*, 3233-3238.

Krones-Herzig,A., Mittal,S., Yule,K., Liang,H., English,C., Urcis,R., Soni,T., Adamson,E.D., and Mercola,D. (2005). Early growth response 1 acts as a tumor suppressor in vivo and in vitro via regulation of p53. Cancer Res. *65*, 5133-5143.

Kumbrink, J. (2002). Herstellung und Charakterisierung von dominant negativen Mutanten des Egr-1 regulierenden Moleküls Mader. Diplom-Arbeit, Ludwig-Maximilians-Universität München.

Kumbrink,J., Gerlinger,M., and Johnson,J.P. (2005). Egr-1 induces the expression of its corepressor nab2 by activation of the nab2 promoter thereby establishing a negative feedback loop. J. Biol. Chem. *280*, 42785-42793.

Ladomery,M.R., Harper,S.J., and Bates,D.O. (2007). Alternative splicing in angiogenesis: the vascular endothelial growth factor paradigm. Cancer Lett. *249*, 133-142.

Lasithiotakis,K.G., Leiter,U., Eigentler,T., Breuninger,H., Metzler,G., Meier,F., and Garbe,C. (2007). Improvement of overall survival of patients with cutaneous melanoma in Germany, 1976-2001: which factors contributed? Cancer *109*, 1174-1182.

Lasithiotakis,K.G., Leiter,U., Gorkievicz,R., Eigentler,T., Breuninger,H., Metzler,G., Strobel,W., and Garbe,C. (2006). The incidence and mortality of cutaneous melanoma in Southern Germany: trends by anatomic site and pathologic characteristics, 1976 to 2003. Cancer *107*, 1331-1339.

LeBlanc,S.E., Jang,S.W., Ward,R.M., Wrabetz,L., and Svaren,J. (2006). Direct regulation of myelin protein zero expression by the Egr2 transactivator. J. Biol. Chem. *281*, 5453-5460.

Lehmann,J.M., Riethmuller,G., and Johnson,J.P. (1989). MUC18, a marker of tumor progression in human melanoma, shows sequence similarity to the neural cell adhesion molecules of the immunoglobulin superfamily. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A *86*, 9891-9895.

Lehmann,S. (2008). Der Einfluss des melanomassoziierten Zelladhäsionsmoleküls MCAM auf die Angiogenese. Dissertation. Ludwig-Maximilians-Universität München.

Lewis,C.E. and Pollard,J.W. (2006). Distinct role of macrophages in different tumor microenvironments. Cancer Res. *66*, 605-612.

Li,L., Carter,J., Gao,X., Whitehead,J., and Tourtellotte,W.G. (2005). The neuroplasticity-associated arc gene is a direct transcriptional target of early growth response (Egr) transcription factors. Mol. Cell Biol. *25*, 10286-10300.

Liang,S., Sharma,A., Peng,H.H., Robertson,G., and Dong,C. (2007). Targeting mutant (V600E) B-Raf in melanoma interrupts immunoediting of leukocyte functions and melanoma extravasation. Cancer Res. *67*, 5814-5820.

Livak,K.J. and Schmittgen,T.D. (2001). Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method. Methods *25*, 402-408.

Lucerna,M., Mechtcheriakova,D., Kadl,A., Schabbauer,G., Schafer,R., Gruber,F., Koshelnick,Y., Muller,H.D., Issbrucker,K., Clauss,M., Binder,B.R., and Hofer,E. (2003). NAB2, a corepressor of EGR-1, inhibits vascular endothelial growth factor-mediated gene induction and angiogenic responses of endothelial cells. J. Biol. Chem. *278*, 11433-11440.

Ma,L., Teruya-Feldstein,J., and Weinberg,R.A. (2007). Tumour invasion and metastasis initiated by microRNA-10b in breast cancer. Nature *449*, 682-688.

Mack,G.S. (2007). MicroRNA gets down to business. Nat. Biotechnol. *25*, 631-638.

Mages,H.W., Baag,R., Steiner,B., and Kroczek,R.A. (1998). Utilization of an NF-ATp binding promoter element for EGR3 expression in T cells but not fibroblasts provides a molecular model for the lymphoid cell-specific effect of cyclosporin A. Mol. Cell Biol. *18*, 7157-7165.

Mantovani,A., Schioppa,T., Porta,C., Allavena,P., and Sica,A. (2006). Role of tumor-associated macrophages in tumor progression and invasion. Cancer Metastasis Rev. *25*, 315-322.

Marcet-Palacios,M., Davoine,F., Adamko,D.J., Moqbel,R., and Befus,A.D. (2007). Human lymphocytes express the transcriptional regulator, Wilms tumor 1: The role of WT1 in mediating nitric oxide-dependent repression of lymphocyte proliferation. Biochem. Biophys. Res. Commun. *363*, 283-287.

McClelland,M. and Nelson,M. (1992). Effect of site-specific methylation on DNA modification methyltransferases and restriction endonucleases. Nucleic Acids Res. *20 Suppl*, 2145-2157.

Mechta-Grigoriou,F., Garel,S., and Charnay,P. (2000). Nab proteins mediate a negative feedback loop controlling Krox-20 activity in the developing hindbrain. Development *127*, 119-128.

Mittelstadt,P.R. and Ashwell,J.D. (1998). Cyclosporin A-sensitive transcription factor Egr-3 regulates Fas ligand expression. Mol. Cell Biol. *18*, 3744-3751.

Mittelstadt,P.R. and Ashwell,J.D. (1999). Role of Egr-2 in up-regulation of Fas ligand in normal T cells and aberrant double-negative lpr and gld T cells. J. Biol. Chem. *274*, 3222-3227.

Monte,M., Simonatto,M., Peche,L.Y., Bublik,D.R., Gobessi,S., Pierotti,M.A., Rodolfo,M., and Schneider,C. (2006). MAGE-A tumor antigens target p53 transactivation function through histone deacetylase recruitment and confer resistance to chemotherapeutic agents. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A *103*, 11160-11165.

Neuber,K. and Eidam,B. (2006). Expression of Fas ligand (CD95L) in primary malignant melanoma and melanoma metastases is associated with overall survival. Onkologie. *29*, 361-365.

O'Donovan,K.J. and Baraban,J.M. (1999). Major Egr3 isoforms are generated via alternate translation start sites and differ in their abilities to activate transcription. Mol. Cell Biol. *19*, 4711-4718.

O'Donovan,K.J., Levkovitz,Y., Ahn,D., and Baraban,J.M. (2000). Functional comparison of Egr3 transcription factor isoforms: identification of an activation domain in the N-terminal segment absent from Egr3beta, a major isoform expressed in brain. J. Neurochem. *75*, 1352-1357.

Ohno,S., Inagawa,H., Dhar,D.K., Fujii,T., Ueda,S., Tachibana,M., Ohno,Y., Suzuki,N., Inoue,M., Soma,G., and Nagasue,N. (2005). Role of tumor-associated macrophages (TAM) in advanced gastric carcinoma: the impact on FasL-mediated counterattack. Anticancer Res. *25*, 463-470.

Olsen,J.V., Blagoev,B., Gnad,F., Macek,B., Kumar,C., Mortensen,P., and Mann,M. (2006). Global, in vivo, and site-specific phosphorylation dynamics in signaling networks. Cell *127*, 635-648.

Orlando,V. (2000). Mapping chromosomal proteins in vivo by formaldehyde-crosslinked-chromatin immunoprecipitation. Trends Biochem. Sci. *25*, 99-104.

Pal,N.R., Aguan,K., Sharma,A., and Amari,S. (2007). Discovering biomarkers from gene expression data for predicting cancer subgroups using neural networks and relational fuzzy clustering. BMC. Bioinformatics. *8*, 5.

Peterhoff,U. (2005). Untersuchung der Expression und Induzierbarkeit von NAB2-Isoformen in humanen Zelllinien und Blutleukozyten. Diplom-Arbeit, Ludwig-Maximilians-Universität München.

Petitjean,A., Achatz,M.I., Borresen-Dale,A.L., Hainaut,P., and Olivier,M. (2007). TP53 mutations in human cancers: functional selection and impact on cancer prognosis and outcomes. Oncogene *26*, 2157-2165.

Poynter,J.N., Elder,J.T., Fullen,D.R., Nair,R.P., Soengas,M.S., Johnson,T.M., Redman,B., Thomas,N.E., and Gruber,S.B. (2006). BRAF and NRAS mutations in melanoma and melanocytic nevi. Melanoma Res. *16*, 267-273.

Puntervoll,P., Linding,R., Gemund,C., Chabanis-Davidson,S., Mattingsdal,M., Cameron,S., Martin,D.M., Ausiello,G., Brannetti,B., Costantini,A., Ferre,F., Maselli,V., Via,A., Cesareni,G., Diella,F., Superti-Furga,G., Wyrwicz,L., Ramu,C., McGuigan,C., Gudavalli,R., Letunic,I., Bork,P., Rychlewski,L., Kuster,B., Helmer-Citterich,M., Hunter,W.N., Aasland,R., and Gibson,T.J. (2003). ELM server: A new resource for investigating short functional sites in modular eukaryotic proteins. Nucleic Acids Res. *31*, 3625-3630.

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.

Redondo,P., Solano,T., VAzquez,B., Bauza,A., and Idoate,M. (2002). Fas and Fas ligand: expression and soluble circulating levels in cutaneous malignant melanoma. Br. J. Dermatol. *147*, 80-86.

Riede,U.S., Werner,M., and Schaefer,H.E. (2003). Allgemeine und spezielle Pathologie. 5.Auflage. Georg Thieme Verlag, Stuttgart.

Ries,L.A.G., Melbert,D., Krapcho,M., Mariotto,A., Miller,B.A., Feuer,E.J., Clegg,L., Horner,M.J., Howlader,N., Eisner,M.P., Reichman,M., and Edwards,B.K. (2007). SEER Cancer Statistics Review, 1975-2004. National Cancer Institute. Bethesda, MD.

Russell,D.L., Doyle,K.M., Gonzales-Robayna,I., Pipaon,C., and Richards,J.S. (2003). Egr-1 induction in rat granulosa cells by follicle-stimulating hormone and luteinizing hormone: combinatorial regulation by transcription factors cyclic adenosine 3',5'-monophosphate regulatory element binding protein, serum response factor, sp1, and early growth response factor-1. Mol. Endocrinol. *17*, 520-533.

Russo,M.W., Sevetson,B.R., and Milbrandt,J. (1995). Identification of Nab1, A Repressor of Ngfi-A-Mediated and Krox20-Mediated Transcription. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. *92*, 6873-6877.

Sakamoto,K.M., Fraser,J.K., Lee,H.J., Lehman,E., and Gasson,J.C. (1994). Granulocyte-macrophage colony-stimulating factor and interleukin-3 signaling pathways converge on the CREB-binding site in the human egr-1 promoter. Mol. Cell Biol. *14*, 5975-5985.

SBD (2007). Herz-/Kreislauferkrankungen weiterhin häufigste Todesursache. Pressemitteilung Nr. 385, Statistisches Bundesamt Deutschland.

Schabbauer,G., Schweighofer,B., Mechtcheriakova,D., Lucerna,M., Binder,B.R., and Hofer,E. (2007). Nuclear factor of activated T cells and early growth response-1 cooperate to mediate tissue factor gene induction by vascular endothelial growth factor in endothelial cells. Thromb. Haemost. *97*, 988-997.

Schnur,N., Seuter,S., Katryniok,C., Radmark,O., and Steinhilber,D. (2007). The histone deacetylase inhibitor trichostatin A mediates upregulation of 5-lipoxygenase promoter activity by recruitment of Sp1 to distinct GC-boxes. Biochim. Biophys. Acta *1771*, 1271-1282.

Schreiber,E., Matthias,P., Muller,M.M., and Schaffner,W. (1989). Rapid detection of octamer binding proteins with 'mini-extracts', prepared from a small number of cells. Nucleic Acids Res. *17*, 6419.

Sevetson,B.R., 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*, 9749-9757.

Sharma,A., Trivedi,N.R., Zimmerman,M.A., Tuveson,D.A., Smith,C.D., and Robertson,G.P. (2005). Mutant V599EB-Raf regulates growth and vascular development of malignant melanoma tumors. Cancer Res. *65*, 2412-2421.

Shen,X., Zhou,J., Hathcock,K.S., Robbins,P., Powell,D.J., Jr., Rosenberg,S.A., and Hodes,R.J. (2007). Persistence of tumor infiltrating lymphocytes in adoptive immunotherapy correlates with telomere length. J. Immunother. (1997.) *30*, 123-129.

Shukuwa,T., Katayama,I., and Koji,T. (2002). Fas-mediated apoptosis of melanoma cells and infiltrating lymphocytes in human malignant melanomas. Mod. Pathol. *15*, 387-396.

Silverman,E.S., Khachigian,L.M., Santiago,F.S., Williams,A.J., Lindner,V., and Collins,T. (1999). Vascular smooth muscle cells express the transcriptional corepressor NAB2 in response to injury. Am. J. Pathol. *155*, 1311-1317.

Simpson,A.J., Caballero,O.L., Jungbluth,A., Chen,Y.T., and Old,L.J. (2005). Cancer/testis antigens, gametogenesis and cancer. Nat. Rev. Cancer *5*, 615-625.

Skerka,C., Decker,E.L., and Zipfel,P.F. (1997). Coordinate expression and distinct DNA-binding characteristics of the four EGR-zinc finger proteins in Jurkat T lymphocytes. Immunobiology *198*, 179-191.

Smale,S.T. (1997). Transcription initiation from TATA-less promoters within eukaryotic protein-coding genes. Biochim. Biophys. Acta *1351*, 73-88.

Smale,S.T. and Kadonaga,J.T. (2003). The RNA polymerase II core promoter. Annu. Rev. Biochem. *72*, 449-479.

Srinivasan,R., Mager,G.M., Ward,R.M., Mayer,J., and Svaren,J. (2006). NAB2 represses transcription by interacting with the CHD4 subunit of the nucleosome remodeling and deacetylase (NuRD) complex. J. Biol. Chem. *281*, 15129-15137.

Srivastava,S., Weitzmann,M.N., Kimble,R.B., Rizzo,M., Zahner,M., Milbrandt,J., Ross,F.P., and Pacifici,R. (1998). Estrogen blocks M-CSF gene expression and osteoclast formation by regulating phosphorylation of Egr-1 and its interaction with Sp-1. J. Clin. Invest. *102*, 1850-1859.

Stamm,S., Ben Ari,S., Rafalska,I., Tang,Y., Zhang,Z., Toiber,D., Thanaraj,T.A., and Soreq,H. (2005). Function of alternative splicing. Gene *344*, 1-20.

Stryer,L. and Haugland,R.P. (1967). Energy transfer: a spectroscopic ruler. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A *58*, 719-726.

Suzuki,T., Inoue,A., Miki,Y., Moriya,T., Akahira,J., Ishida,T., Hirakawa,H., Yamaguchi,Y., Hayashi,S., and Sasano,H. (2007). Early growth responsive gene 3 in human breast carcinoma: a regulator of estrogen-meditated invasion and a potent prognostic factor. Endocr. Relat Cancer *14*, 279-292.

Svaren,J., Sevetson,B.R., Apel,E.D., Zimonjic,D.B., Popescu,N.C., 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.R., Golda,T., Stanton,J.J., Swirnoff,A.H., and Milbrandt,J. (1998). Novel mutants of NAB corepressors enhance activation by Egr transactivators. Embo Journal *17*, 6010-6019.

Swirnoff,A.H., Apel,E.D., Svaren,J., Sevetson,B.R., Zimonjic,D.B., Popescu,N.C., and Milbrandt,J. (1998b). Nab1, a corepressor of NGFI-A (Egr-1), contains an active transcriptional repression domain. Mol. Cell Biol. *18*, 512-524.

Swirnoff,A.H., Apel,E.D., Svaren,J., Sevetson,B.R., Zimonjic,D.B., Popescu,N.C., and Milbrandt,J. (1998a). Nab1, a corepressor of NGFI-A (Egr-1), contains an active transcriptional repression domain. Mol. Cell Biol. *18*, 512-524.

Thiel,G. and Cibelli,G. (2002). Regulation of life and death by the zinc finger transcription factor Egr-1. J. Cell Physiol. *193*, 287-292.

Thiel,G., Kaufmann,K., Magin,A., Lietz,M., Bach,K., and Cramer,M. (2000). The human transcriptional repressor protein NAB1: expression and biological activity. Biochim. Biophys. Acta *1493*, 289-301.

Thomassin,H., Flavin,M., Espinas,M.L., and Grange,T. (2001). Glucocorticoid-induced DNA demethylation and gene memory during development. EMBO J. *20*, 1974-1983.

Tourtellotte,W.G., Nagarajan,R., Bartke,A., and Milbrandt,J. (2000). Functional compensation by Egr4 in Egr1-dependent luteinizing hormone regulation and Leydig cell steroidogenesis. Mol. Cell Biol. *20*, 5261-5268.

Tress,M.L., Martelli,P.L., Frankish,A., Reeves,G.A., Wesselink,J.J., Yeats,C., Olason,P.L., Albrecht,M., Hegyi,H., Giorgetti,A., Raimondo,D., Lagarde,J., Laskowski,R.A., Lopez,G., Sadowski,M.I., Watson,J.D., Fariselli,P., Rossi,I., Nagy,A., Kai,W., Storling,Z., Orsini,M., Assenov,Y., Blankenburg,H., Huthmacher,C., Ramirez,F., Schlicker,A., Denoeud,F., Jones,P., Kerrien,S., Orchard,S., Antonarakis,S.E., Reymond,A., Birney,E., Brunak,S., Casadio,R., Guigo,R., Harrow,J., Hermjakob,H., Jones,D.T., Lengauer,T., Orengo,C.A., Patthy,L., Thornton,J.M., Tramontano,A., and Valencia,A. (2007). The implications of alternative splicing in the ENCODE protein complement. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A *104*, 5495-5500.

Turner,B.M. (2002). Cellular memory and the histone code. Cell *111*, 285-291.

Unoki,M. and Nakamura,Y. (2001). Growth-suppressive effects of BPOZ and EGR2, two genes involved in the PTEN signaling pathway. Oncogene *20*, 4457-4465.

Unoki,M. and Nakamura,Y. (2003a). EGR2 induces apoptosis in various cancer cell lines by direct transactivation of BNIP3L and BAK. Oncogene *22*, 2172-2185.

Unoki,M. and Nakamura,Y. (2003b). Methylation at CpG islands in intron 1 of EGR2 confers enhancer-like activity. FEBS Lett. *554*, 67-72.

Varney,M.L., Johansson,S.L., and Singh,R.K. (2005). Tumour-associated macrophage infiltration, neovascularization and aggressiveness in malignant melanoma: role of monocyte chemotactic protein-1 and vascular endothelial growth factor-A. Melanoma Res. *15*, 417-425.

von der Kammer H., Mayhaus,M., Albrecht,C., Enderich,J., Wegner,M., and Nitsch,R.M. (1998). Muscarinic acetylcholine receptors activate expression of the EGR gene family of transcription factors. J. Biol. Chem. *273*, 14538-14544.

Wang,C., Deng,L., Hong,M., Akkaraju,G.R., Inoue,J., and Chen,Z.J. (2001). TAK1 is a ubiquitin-dependent kinase of MKK and IKK. Nature *412*, 346-351.

Weil,D., Garcon,L., Harper,M., Dumenil,D., Dautry,F., and Kress,M. (2002). Targeting the kinesin Eg5 to monitor siRNA transfection in mammalian cells. Biotechniques *33*, 1244-1248.

Wilson,A.J., Byun,D.S., Popova,N., Murray,L.B., L'Italien,K., Sowa,Y., Arango,D., Velcich,A., Augenlicht,L.H., and Mariadason,J.M. (2006). Histone deacetylase 3 (HDAC3) and other class I HDACs regulate colon cell maturation and p21 expression and are deregulated in human colon cancer. J. Biol. Chem. *281*, 13548-13558.

Wittekind Ch., Meyer H-J., and Bootz F. (2002). TNM Klassifikation maligner Tumoren, 6.Aufl. Springer, Berlin.

Wolfe,M.W. and Call,G.B. (1999). Early growth response protein 1 binds to the luteinizing hormone-beta promoter and mediates gonadotropin-releasing hormone-stimulated gene expression. Mol. Endocrinol. *13*, 752-763.

Yagi,R., Tanaka,S., Motomura,Y., and Kubo,M. (2007). The regulation of Il4 gene independently controlled by proximal and distal 3'enhancers in mast cells and basophils. Mol. Cell Biol.

Yang,J., Mani,S.A., and Weinberg,R.A. (2006). Exploring a new twist on tumor metastasis. Cancer Res. *66*, 4549-4552.

Yasunaga,J., Taniguchi,Y., Nosaka,K., Yoshida,M., Satou,Y., Sakai,T., Mitsuya,H., and Matsuoka,M. (2004). Identification of aberrantly methylated genes in association with adult T-cell leukemia. Cancer Res. *64*, 6002-6009.

Yoo,Y.G. and Lee,M.O. (2004). Hepatitis B virus X protein induces expression of Fas ligand gene through enhancing transcriptional activity of early growth response factor. J. Biol. Chem. *279*, 36242-36249.

Yu,J., de,B., I, Liang,H., and Adamson,E.D. (2004). Coactivating factors p300 and CBP are transcriptionally crossregulated by Egr1 in prostate cells, leading to divergent responses. Mol. Cell *15*, 83-94.

Zhang,X. and Liu,Y. (2003). Suppression of HGF receptor gene expression by oxidative stress is mediated through the interplay between Sp1 and Egr-1. Am. J. Physiol. Renal Physiol. *284*, F1216-F1225.

Zimmermann,A. (2000). Funktionelle Charakterisierung von Mader in überexprimierenden Transfektanden und Zelllinien. Dissertation, Ludwig-Maximilians-Universität München.

Publikationen

Kumbrink,J., Gerlinger,M., and Johnson,J.P. (2005). Egr-1 induces the expression of its corepressor nab2 by activation of the nab2 promoter thereby establishing a negative feedback loop. J. Biol. Chem. *280*, 42785-42793.

Kumbrink,J. and Johnson,J.P. (2006a). Influence of the constitutive expression of Egr-2 and Egr-3 on the interactions of melanoma cells with their microenvironment. Abstract, Pezcoller Foundation Journal *06/2006 n.26*.

Kumbrink,J. and Johnson,J.P. (2006b). Influence of the constitutive expression of Egr-2 and Egr-3 on the interactions of melanoma cells with their microenvironment. Poster presentation, 18th Pezcoller Symposium, June 27-29, 2006.

Kumbrink,J. and Johnson,J.P. (2007a). Egr-1, Egr-2, and Egr-3 regulate the expression of their corepressor nab2 by activation of the nab2 promoter thereby establishing a negative feedback loop. In Vorbereitung.

Kumbrink,J. and Johnson,J.P. (2007b). The transcription factors Egr-2 and Egr-3 are over-expressed in malignant melanomas and may contribute to the constitutive high expression of their melanoma-associated corepressor Nab2. In Vorbereitung.

Curriculum vitae

Name : Jörg Kumbrink

Geburtsdatum : 18.11.1973

Geburtsort : Wuppertal

Familienstand : ledig

Staatsangehörigkeit : deutsch

Ausbildung :

06/95 allgemeine Hochschulreife am St. Anna Gymnasium Wuppertal

10/95 – 07/96 Grundwehrdienst 4./PzFlaRakBtl. 100 Wuppertal

10/96 – 03/99 Studium der Biologie an der TU Darmstadt

08/98 Vordiplom

04/99 – 08/02 Studium der Biologie an der LMU München

Hauptfach : Humangenetik

Nebenfächer : Zoologie, Pharmakologie, Immunologie

Abschluss : Dipl. Biol. Univ. , Note 1,4 „sehr gut“

10/01 – 06/02 Diplomarbeit in der AG Prof. Johnson am Institut für Immunologie der LMU München

Titel der Diplomarbeit : „Herstellung und Charakterisierung von dominant-negativen Mutanten des Egr-1 regulierenden Moleküls Mader“

Seit 10/02 wiss. Mitarbeiter/Doktorand in der AG Prof. Johnson am Institut für Immunologie der LMU München

Titel der Doktorarbeit : „Funktion und Regulation des melanomassoziierten transkriptionellen Korepressors Nab2“

Danksagung

Ganz besonders möchte ich mich bei Frau Prof. Dr. Judith Johnson, unter deren Anleitung diese Arbeit durchgeführt wurde, für die ständige Diskussions- und Hilfsbereitschaft sowie insbesondere für ihre Geduld, Toleranz und Ruhe bedanken.

Weiterer Dank geht an Frau Prof. Dr. E. Weiß nicht nur für die Vertretung dieser Arbeit an der Fakultät für Biologie, sondern auch für ihre wertvollen Hinweise und ihre Hilfsbereitschaft.

Herrn Prof. Dr. T. Brocker und Herrn Prof. Dr. G. Riethmüller danke ich für die Möglichkeit der Durchführung dieser Arbeit am Institut für Immunologie der LMU München.

Vielen Dank an meine Eltern, die mich während des Studiums und der Promotion immer unterstützt haben.

Allen aktuellen und ehemaligen Mitgliedern der Arbeitsgruppe JJ für die stetige gegenseitige Hilfsbereitschaft und Elma Proels, Lilli Neumann, Marco Gerlinger und Rüdiger Neef für so manche außerwissenschaftliche „Diskussion“ und Freizeitgestaltung.

Vielen Dank an Barbara Fellerhof für die „all-inclusive“ (egal zu welcher Zeit, ob defekter Reißverschluss oder verwirrende Ergebnisse) Unterstützung.

Ich danke Kathrin Mutze, einer jungen und hochmotivierten Wissenschaftlerin, die sich nicht nur eingehend mit der Korrektur dieser Arbeit beschäftigt hat, sondern auch für so manche lustige aber auch ernste Momente sorgt/e.

Besonderer Dank gilt Stephan Lehmann, den ich am ersten Tag des Biologiestudiums kennengelernt habe und mit ihm durch dick und dünn des Studiums, der Diplomarbeit und der Doktorarbeit ging. ------ Eine Ära geht zu Ende, aber die Freundschaft bleibt.