

Studien zur Regulation des Metastasierungs- assoziierten Oberflächenproteins C4.4A

Zur Erlangung des akademischen Grades eines

DOKTORS DER NATURWISSENSCHAFTEN

(Dr. rer. nat.)

der Fakultät für Chemie und Biowissenschaften der
Universität Karlsruhe (TH)
vorgelegte

DISSERTATION

von

Frank Fries

aus

Creglingen

2005

Studien zur Regulation des Metastasierungs- assoziierten Oberflächenproteins C4.4A

Zur Erlangung des akademischen Grades eines

DOKTORS DER NATURWISSENSCHAFTEN

(Dr. rer. nat.)

der Fakultät für Chemie und Biowissenschaften der
Universität Karlsruhe (TH)
vorgelegte

DISSERTATION

von

Frank Fries

aus

Creglingen

2005

Dekan:	Prof. Dr. M. Kappes
Referent:	Prof. Dr. M. Zöller
Korreferent:	PD Dr. H. König
Tag der mündlichen Prüfung:	27.10.2005

Zusammenfassung

Die Rattenpankreasadenokarzinom-Zelllinien BSp73AS und BSp73ASML unterscheiden sich in ihrem Metastasierungsverhalten. Die an diesen beiden Zelllinien bereits durchgeführten Untersuchungen zur differentiellen Expression von potentiell Metastasierungs-assoziierten Membranrezeptoren hatten u.a. zur Identifikation eines neuen uPAR ähnlichen Moleküls C4.4A geführt. Die Beobachtung der auf nur sehr wenigen Gewebe beschränkten und regulierten Expression von C4.4A, sowie die fehlende Expression auf einer Reihe nicht-metastasierender Tumorzellen war der Ausgangspunkt der vorliegenden Dissertation.

Ziel war es, die Ursachen der differentiellen Expression von C4.4A zu klären. Es konnte gezeigt werden, dass die genomische Integrität des *C4.4A*-Genlokus wie auch posttranskriptionale Ereignisse keinen Einfluss auf die differentielle Expression von C4.4A in BSp73AS bzw. BSp73ASML haben. Deshalb wurde die Frage nach den transkriptionellen Mechanismen der *C4.4A*-Expressionskontrolle in den Mittelpunkt dieser Arbeit gestellt. Die erfolgreiche Klonierung der *C4.4A*-Promotorregion und der Einsatz eines eukaryotischen Reportersystems (CAT) lieferten die Basis zur Suche nach Faktoren, welche an der transkriptionellen Regulation des *C4.4A*-Gens beteiligt sind.

Der *C4.4A*-Promotor induziert die Aktivierung des *C4.4A*-Gens ausschließlich in BSp73ASML nicht aber in BSp73AS. Dies ließ darauf schließen, dass erforderliche Transkriptionsfaktoren für die Aktivierung des *C4.4A*-Gens in BSp73AS fehlen oder nur in inaktiver Form vorhanden sind. Durch Mutagenese der Promotorregion konnten die zur Transkriptions-Regulation des *C4.4A*-Gens relevanten Bereiche definiert werden. So gelang es, den Startpunkt der Transkription im Bereich -47 bis -1 des Promotors zu lokalisieren, sowie die für die Transkription essentiellen Enhancerregionen in einem GC-reichen Bereich an Position -109 bis -81 und ein *CCAAT/TRE*-Element Position -85 bis -74 zu identifizieren. EMSA-Analysen sowie CAT-Studien nach ektopischer Expression ausgewählter Transkriptionsfaktoren belegen, dass ein C/EBP β /JunD-Komplex, der sich an dem *CCAAT/TRE*-Element (-85/-74) ausbildet, für die Aktivierung des *C4.4A*-Gens notwendig ist.

Um physiologische Funktionen dieses Moleküls umfassender zu evaluieren zu können, war die Planung und Generierung einer *C4.4A* k.o.-Maus ein weiterer Inhalt dieser Arbeit. Screenings von mit einem K.o.-Konstrukt transformierten ES-Zellklonen führten zur Isolierung eines positiven Klons, in dem eines der Wildtyp-Allele erfolgreich mit einem *C4.4A*-k.o.-Konstrukt rekombinierte. Die Fortführung dieses Projekts (Blastozysteninjektion etc.) sollte in naher Zukunft wichtige Erkenntnisse bezüglich der Funktion und Expression von C4.4A im Mausmodell liefern können.

Abkürzungen

°C	Grad Celsius
¹⁴ C	radioaktives Kohlenstoffisotop
³² P	radioaktives Phosphorisotop
A	Adenin
Abb.	Abbildung
Amp	Ampicillin
AP-1	„activator protein 1“
APS	Ammoniumpersulfat
ATP	Adenosin-5'-triphosphat
bp	Basenpaare
BSA	Rinderserumalbumin („bovine serum albumin“)
pZIP	„basic leucine-zipper“
bzw.	beziehungsweise
C	Cytidin
CD44v	CD44-Variante(n)
cDNA	komplementäre DNA („complementary DNA“)
C/EBP	„CCAAT/ enhancer binding protein“
CMV	„cytomegalovirus“
cpm	Zerfälle pro Minute („counts per minute“)
CTP	Cytidin-5'-triphosphat
dATP	Desoxy-Adenosin-5'-triphosphat
dCTP	Desoxy-Cytidin-5'-triphosphat
DEPC	Diethylpyrocarbonat
dGTP	Desoxy-Guanosin-5'-triphosphat
d.h.	das heißt
DMEM	„Dulbecco's modified eagle medium“
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoxyribonuklosid-5'triphosphat
DPE	„downstream core promotor element“
ds	Doppelstrang
DTT	Dithiothreitol
dTTP	Desoxy-Tymidin-5'-triphosphat
ECM	extrazelluläre Matrix („extracellular matrix“)
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EGF	„epidermal growth factor“
EGFR	„epidermal growth factor receptor“
ES	embryonale Stammzellen
ERK	„extracellular signal-regulated kinase“
evtl.	eventuell
F	Faraday
Fa.	Firma
FACS	„fluorescence-activated cell sorter“
FCS	fötales Kälberserum („fetal calf serum“)
g	Gramm
G	Guanin
G418	Geneticin
GAPDH	Glycerinaldehydphosphatdehydrogenase

GFP	„green fluorescence protein“
GTP	Guanosin-5'-triphosphat
h	Stunde
H ₂ O _d	Destilliertes Wasser
HEPES	N-2-Hydroxyethylpiperazin-N'-2-Ethansulfonsäure
HUSAR	„Heidelberg UNIX Sequencing Resources“
Inr	Initiator
IPTG	1-Isopropyl-β-D-1-thiogalaktopyranosid
JNK	„Jun amino-terminal kinase“
k	kilo
kb	Kilobase
kg	Kilogramm
l	Liter
LB-Medium	Luria-Bertani-Medium
m	milli
μ	mikro
M	Molar
MAPK	„mitogen-activated protein kinase“
min	Minute
<i>Mm</i>	<i>Mus musculus</i>
MMP	Matrixmetalloproteinase
mRNA	„messenger“-RNA
n	nano
Neo	Neomycin
NP-40	Nonidet P-40
NTP	Nukleosidtriphosphat
OD	optische Dichte
ORF	offenes Leseraster („open reading frame“)
PBS	Phosphat gepufferte Saline
PI3K	Phosphatidylinositol 3-Kinase
PLAG	„pleomorphic adenoma gene“
PMSF	Phenylmethylsulfonylfluorid
<i>Rn</i>	<i>Rattus norvegicus</i>
RNA	Ribonukleinsäure
RNase	Ribonuklease
RT	Raumtemperatur
s	Sekunde
Sp	„specificity protein“
T	Tymidin
Tab.	Tabelle
TBP	„TATA box-binding protein“
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylethylendiamin
TF	Transkriptionsfaktor
TGF	„transforming growth factor“
TPA	„12-O-tetradecamoyl-phorbol-13-acetat“
Tris	Tris(hydroxymethyl)aminoethan
TRE	„TPA-responsive element“
TTP	Thymidin-5'-triphosphat
U	Units (Enzymeinheit)
u.a.	unter anderem
ÜN	über Nacht

uPA	Urokinase-tyt Plasminogenaktivator
uPAR	uPA-Rezeptor
usw.	und so weiter
UTP	Uridintriphosphat
u.U.	unter Umständen
V	Volt
z.B.	zum Beispiel

Inhaltsverzeichnis

1 EINLEITUNG	1
1.1 STADIEN DES METASTASIERUNGS-PROZESSES.....	1
1.2 ORGAN-SPEZIFISCHE METASTASIERUNG: „SEED AND SOIL“-HYPOTHESE.....	2
1.3 MOLEKULARE MECHANISMEN DER ZELLMIGRATION	3
1.4 DAS BSP73-PANKREASTUMORSYSTEM	6
1.5 C4.4A, EIN METASTASIERUNGS-ASSOZIIERTES OBERFLÄCHENMOLEKÜL	7
1.6 DIE SERINPROTEASE UROKINASE-TYP PLASMINOGENAKTIVATOR (UPA) UND SEIN REZEPTOR (UPAR).....	8
1.7 DIE RAS-VERMITTELTE TUMORGENESE DES PANKREASKARZINOMS.....	9
1.7.1 Krebs: eine genetisch verursachte Erkrankung	9
1.7.2 Das onkogene Potential der Ras-Proteinfamilie.....	10
1.8 DAS ONKOGENE POTENTIAL VON TRANSKRIPTIONSFAKTOREN.....	11
1.9 MECHANISMUS DER TRANSKRIPTIONELLEN REGULATION	13
1.9.1 Ausbildung des basalen Transkriptionsapparates	13
1.9.2 Aktivierung des basalen Transkriptionsapparates über Enhancer	15
1.10 ZIELSETZUNG DER ARBEIT.....	17
2 MATERIAL UND METHODEN	18
2.1 CHEMIKALIEN	18
2.2 ENZYME.....	19
2.3 ANTIKÖRPER.....	19
2.4 GEBRAUCHSFERTIGE REAKTIONSSYSTEME:.....	20
2.5 ANTIBIOTIKA	20
2.6 NUKLEINSÄUREN	20
2.6.1 Oligo-Desoxyribonukleotide	20
2.6.1.1 Primer zur Generierung von C4.4A-k.o.-Konstrukten	20
2.6.1.2 Primer zur Identifizierung der 5'flankierenden C4.4A-Sequenz der Ratte ..	21
2.6.1.3 Primer zur Herstellung der C4.4A-Promotorkonstrukte.....	21
2.6.1.4 Im EMSA eingesetzte Oligonukleotidesquenzen	22
2.7 BEZUGSQUELLEN „P1-DERIVED ARTIFICIAL CHROMOSOMES“ PAC'S	22
2.8 PLASMIDE.....	23
2.9 ZELLKULTURMATERIALIEN.....	24
2.10 EUKARYOTISCHE ZELLEN	24
2.11 BAKTERIENSTÄMME.....	24
2.12 COMPUTERSERVER (DATENBANKEN)	25
2.12.1 Promotoranalyseprogramm	25
2.12.2 Sequenzanalyseprogramm.....	25
2.13 LABORGERÄTE.....	25
2.14 ISOLATION REKOMBINANTER DNA	25
2.14.1 Herstellung kompetender Escherichia coli (E. coli)	25
2.14.2 Plasmid-Transformation kompetenter E. coli.....	26
2.15 PLASMID-PRÄPARATIONEN AUS E. COIL	27
2.15.1 Plasmid-Maxi-Präparation.....	27
2.15.2 Präparation von rekombinanter pPAC4-Plasmid-DNA.....	27
2.16 VERDAU VON PLASMID-DNA DURCH RESTRIKTIONSENDONUKLEASEN.....	29
2.17 DNA-MODIFIKATIONEN	29
2.17.1 Präparative Extraktion von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen.....	29
2.17.2 Dephosphorylierung von 5'-DNA-Enden	30

2.17.3 Ligation von DNA-Fragmenten.....	31
2.17.4 In vitro-Mutagenese.....	31
2.18 RADIOAKTIVE MARKIERUNG VON DNA-FRAGMENTEN	33
2.18.1 Radioaktive Markierung von DNA-Strängen durch „random priming“	33
2.18.2 „Endlabeling“ von Oligonukleotid-Sonden.....	33
2.19 PRÄPARATION ZELLULÄRER NUKLEINSÄUREN.....	34
2.19.1 Präparation von genomischer DNA aus Maus-embryonalen Stammzellen (ES-Zellen).....	34
2.19.2 Präparation von genomischer DNA aus Ratten-Tumorzellen	34
2.19.3 Präparation von zellulärer RNA	35
2.20 SEMI-QUANTITATIVE RT-PCR IN RATTEN-TUMORZELLEN.....	36
2.20.1 Entfernung kontaminierender DNA aus RNA-Proben über Desoxyribonuklease I (DNaseI)	36
2.20.2 Reverse Transkription (RT) mit Oligo-dT-Primern.....	37
2.20.3 Semi-Quantitative RT-PCR in Ratten-Tumorzellen.....	37
2.21 SOUTHERN-BLOT	38
2.21.1 Restriktionsverdau genomischer DNA.....	38
2.21.2 Überführung genomischer DNA-Fragmente auf Nylon-Membranen.....	39
2.21.3 Hybridisierung geblotteter DNA mit radioaktiv markierten DNA-Sonden.....	39
2.22 NORTHERN-BLOT	40
2.22.1 Überführung von RNA auf eine Nylon-Membran.....	41
2.22.2 Hybridisierung geblotteter RNA mit DNA-Sonden.....	42
2.23 ZELLKULTUR	43
2.23.1 Kultivierung der Tumorzellen BSp73ASML, BSp73AS und PROb	43
2.23.2 Herstellung von am C4.4A-Lokus heterozygot deletierten Maus-ES-Zell-Klonen	43
2.23.2.1 Herstellung von „Feeder“-Zellschichten	43
2.23.2.2 Kultivierung von Maus-embryonalen Stammzellen	44
2.23.2.3 Elektroporation von ES-Zellen mit C4.4A-k.o.-Konstrukt.....	45
2.23.2.4 Selektion von transformierter ES-Zell-Klone.....	45
2.24 SEQUENZANALYSE	46
2.25 TRANSFEKTION VON RATTEN-PANKREASTUMORZELLEN	46
2.26 PMA-BEHANDLUNG VON TRANSFIZIERTEN BSP73ASML-ZELLEN	47
2.27 QUANTITATIVE BESTIMMUNG DER CHLORAMPHENIKOL-ACETYLTRANS-FERASE-AKTIVITÄT (CAT-ASSAY).....	47
2.27.1 Präparation des CAT-Extrakts.....	47
2.27.2 Normalisierung der CAT-Extrakte	48
2.27.3 CAT-Reaktion nach Gorman (Gorman et al., 1982).....	49
2.27.4 Auftrennung der CAT-Enzym-Produkte über Dünnschicht-chromatographie	50
2.27.5 Quantifizierung des CAT-Substratumsatzes.....	50
2.27.6 Statistik.....	51
2.28 ELECTROPHORETIC MOBILITY SHIFT ASSAY (EMSA)	51
2.28.1 Präparation von Kernextrakten (Andrews and Faller, 1991).....	51
2.28.2 Hybridisierung von komplementären Oligonukleotidsequenzen.....	52
2.28.3 EMSA-DNA-Protein-Bindereaktion	53
3 ERGEBNISSE.....	54
3.1 DER C4.4A-GENLOKUS IST IN DER C4.4A-NEGATIVEN ZELLINIE NICHT DELETIERT	54
3.2 C4.4A WIRD NICHT POST-TRANSKRIPTIONAL REGULIERT	55
3.3 KLONIERUNG UND SEQUENZIERUNG DER GENOMISCHEN DNA DES C4.4A-PROMOTORS DER RATTE	58
3.3.1 Erstellung der C4.4A-Promotorkonstrukte.....	58

3.3.2 Bioinformatisch gewonnene Informationen wurden zur gezielten Konstruktion von Promotorfragmenten herangezogen.....	61
3.3.3 Herstellung in vitro-mutagenisierter Promotor-Konstrukte.....	62
3.4 CHARAKTERISIERUNG DES C4.4A-PROMOTORS.....	63
3.4.1 Der Bereich von -150 bis -1 reicht aus, um die maximale Aktivität des C4.4A-Promotors in BSp73ASML zu gewährleisten.....	63
3.4.2 Der Abschnitt -79 bis -1 des Promotors ist für die Transkription des C4.4A-Gens essentiell.....	64
3.4.3 BSp73ASML bildet einen basalen Transkriptionskomplex in der Region -47 bis -1 des C4.4A-Promotors aus.....	65
3.4.4 Die C4.4A-Transkriptionsstartstelle ist höchstwahrscheinlich im Initiator-Element Position -37/- 33 lokalisiert.....	67
3.5 DIE C4.4A-PROMOTORSEQUENZ ZEIGT IN BSp73AS KEINE TRANSKRIPTIONELLE AKTIVITÄT.....	68
3.6 EIN TRE-ÄHNLICHES ELEMENT AN POSITION -74 IST AN DER ERHÖHTEN PROMOTORAKTIVITÄT IN BSp73ASML BETEILIGT.....	69
3.7 EINE GC-REICHE REGION AN POSITION -120 BIS -88 IST AN DER ERHÖHTEN PROMOTORAKTIVITÄT IN BSp73ASML BETEILIGT.....	72
3.8 MITGLIEDER DER SP-TRANSKRIPTIONSFAKTOR-FAMILIE BINDEN IN BSp73ASML NICHT AN DIE REGION -108 BIS -81.....	74
3.9 AP-1 IST NICHT AN DER BINDUNG EINES TRE-ELEMENTS AN POSITION -81 BIS -74 DES C4.4A-PROMOTORS BETEILIGT.....	77
3.10 C/EBP β UND JUN D SIND FÜR DIE DIFFERENTIELLE EXPRESSION VON C4.4A ENTSCHEIDEND MITVERANTWORTLICH.....	77
3.10.1 Das CCAAT-Element an Position -85 bis -81 bindet den Transkriptionsfaktor C/EBP.....	77
3.10.2 Ausschließlich in BSp73ASML bindet C/EBP β im Komplex mit Jun D an ein CCAAT/TRE-Motiv (-85/-74) im C4.4A-Promotor.....	79
3.10.3 In BSp73ASML wird eine C/EBP-Jun D-Komplex-Bindung durch CCAAT- und TRE-Elemente vermittelt.....	81
3.10.4 C/EBP β und Jun D erhöhen die Aktivität des C4.4A-Promotors durch die Interaktion mit einem CCAAT/TRE-Element an Position -85/-74 in BSp73ASML.....	82
3.10.5 Die ektopische Expression von C/EBP β und Jun D aktiviert den C4.4A-Promotor in BSp73AS um das 42fache.....	84
3.11 EKTOPISCH EXPRIMIERTES SP3 AKTIVIERT DEN C4.4A-PROMOTOR (-150 BIS -1) IN BSp73ASML UND BSp73PAS.....	86
3.12 HERSTELLUNG EINES C4.4A MAUS K.O.-KONSTRUKTES.....	88
4 DISKUSSION.....	94
4.1 DIE EXPRESSION VON C4.4A WIRD AUF TRANSKRIPTIONELLER EBENE REGULIERT.....	94
4.2 CHARAKTERISIERUNG DES C4.4A-PROMOTORS.....	96
4.2.1 Der basale Transkriptionsapparat bildet sich in der Region -47 bis -1 des C4.4A-Promotors aus.....	96
4.2.2 Eine GC-reiche Region (Position -120/-88) ist an der erhöhten Promotoraktivität in BSp73ASML beteiligt.....	98
4.2.3 Ektopisch exprimiertes Sp3 aktiviert den C4.4A-Promotor.....	100
4.2.4 Eine C/EBP β /Jun D-Bindung an ein CCAAT/TRE-Element (-85/-74) ist für Aktivierung des C4.4A-Gens entscheidend mitverantwortlich.....	101
4.2.4.1 Ektopische C/EBP β - und Jun D-Expression erhöhen die Aktivität des C4.4A-Promotors.....	104

4.2.4.2 Hypothese zur C/EBP β /JunD-abhangigen <i>C4.4A</i> -Regulation bei Migrationsprozessen.....	106
4.2.4.3 Indizien fur die Existenz eines C/EBP β /JunD-Heterodimers.....	108
4.3 MODELL ZUR TRANSKRIPTIONELLEN <i>C4.4A</i> -REGULATION	109
4.4 HERSTELLUNG EINES <i>C4.4A</i> MAUS K.O.-KONSTRUKTES	111
5 LITERATURVERZEICHNIS.....	113
6 VERÖFFENTLICHUNG	123
7 DANKSAGUNG.....	124
8 LEBENSLAUF	125

1 Einleitung

Metastasierung ist die Hauptursache für die Letalität von Krebserkrankungen. Sehr viel seltener ist dagegen der Primärtumor selbst für den tödlichen Ausgang malignen Zellwachstum verantwortlich. Der Begriff Metastasierung beschreibt die Ausbreitung und Absiedlung von Tumorzellen in entfernten Organen. Wird Krebs in einem frühen Stadium am Entstehungsort diagnostiziert kann er oftmals über operatives Entfernen und lokale Bestrahlung erfolgreich behandelt werden. Wird Krebs diagnostiziert nachdem sich Metastasen gebildet haben, hat die Behandlung sehr viel geringere Erfolgsaussichten. Trotz der Kenntnis dieser klinischen Relevanz, ist das Verständnis hinsichtlich der Biologie des Metastasierungs-Prozesses noch immer sehr lückenhaft. Dies ist zum einen dadurch zu erklären, dass der Prozess der Metastasierung ein diagnostisch schwierig zu verfolgender Prozess ist. Zum anderen konnten zwar einige der an Metastasierung beteiligten Proteine identifiziert werden, doch ist deren Zusammenspiel und der Einfluß weiterer noch unbekannter Faktoren weitestgehend unbekannt.

1.1 Stadien des Metastasierungs-Prozesses

Der Entstehung von Primärtumoren liegen Störungen in der Wachstumskontrolle von Körperzellen zugrunde: Die Umgehung von Kontrollmechanismen, über die Wachstum, Differenzierung und Apoptose gesteuert werden, führt zu neoplastischem Wachstum. Diese Phänomene beruhen nach gegenwärtiger wissenschaftlicher Auffassung auf akkumulierten, multiplen genetischen Veränderungen, die zur Aktivierung von Proto-Onkogenen und Inaktivierung von Tumorsuppressorgenen führen (Bardeesy and DePinho, 2002; Storchova and Pellman, 2004; Zhivotovsky and Kroemer, 2004).

Ähnlich der initialen Genese eines Tumors beinhaltet der Metastasierungs-Prozess mehrere Stadien, die alle erfolgreich durchlaufen sein müssen, bevor ein Tumor sich im Körper ausbreiten kann (Folkman, 1992; Woodhouse et al., 1997; Fidler et al., 1999; Chambers et al., 2001). Bevor ein primärer Tumor wachsen und sich Zugang zu anderen Geweben verschaffen kann, muss er Zugang zum Blutgefäßsystem gewinnen, um seine Versorgung mit Nährstoffen sicherzustellen. Dieser Prozess wird als Angiogenese bezeichnet. Über die neu ausgebildeten Blutgefäße eröffnet sich den Zellen, welche den Tumor verlassen und das Gefäßendothel überwunden haben, die Möglichkeit in das Blutkreislaufsystem zu gelangen (Wyckoff et al., 2000). Dieser Mechanismus wird auch durch den Begriff Intravasation beschrieben.

Alternativ können Tumorzellen auch über das lymphatische System wandern (Stacker et al., 2002). Die Tumorzellen müssen dann den Attacken der immunologischen Abwehr entkommen, bevor sie sich in einem neuen Organ festheften können: Dort müssen sie dann das Gefäßendothel überwinden, um in das umgebende Gewebe zu gelangen – dieser Prozess wird auch als Extavasation bezeichnet. Desweiteren müssen die Tumorzellen in der neuen Umgebung, die ganz neue Anforderungen an die Wachstumsfaktorabhängigkeit der Zelle stellt, ihre Fähigkeit zur Poliferation bewahrt haben, um sogenannte prä-angiogenetische Mikrometastasen auszubilden. Dieses Wachstumsstadium muss über die Entwicklung neuer Blutgefäße unterstützt werden, damit sich ein makroskopisch sichtbarer Tumor ausbilden kann (Chambers et al., 2002). Dieser Metastasierungs-Prozess ist ineffizient, und nur wenigen Zellen gelingt alle beschriebenen Stadien erfolgreich zu durchlaufen. Eine Studie zur Quantifizierung des Metastasierungsprozesses im Mausmodell ergab, dass 83% muriner Melanomzellen nach Injektion in das Gefäßsystem in das Parenchym der Leber einwandern, 2% sind in der Lage, Mikrometastasen auszubilden, und nur 0,02% erreichen das Wachstumsstadium eines makroskopisch sichtbarer Tumors (Luzzi et al., 1998). Offensichtlich sind das Überleben und die Bildung von Tumoren in sekundären Organen nur wenigen zirkulierenden Tumorzellen vorbehalten.

1.2 Organ-spezifische Metastasierung: „seed and soil“-Hypothese

Es wurde schon früh erkannt, dass viele Krebstypen ein Organ-spezifisches Muster der Metastasierung aufweisen. Brustkrebs metastasiert häufig in Knochen, Leber, Gehirn und Lunge; Prostatakrebs verbreitet sich vorzugsweise in Knochen. Bei Patienten mit kolorektalem Krebs treten anfänglich Metastasen in der Leber auf (Chambers et al., 2002). Schon 1889 beschrieb Stephen Paget (Neuaufgabe, (Paget, 1989), dass verschiedene Krebstypen Metastasen in spezifischen Ziel-Organen bilden und führte dies auf die Abhängigkeit „of the seed (der Tumorzellen) on the soil (vom sekundären Organ)“ zurück. Diese postulierte Kompatibilität der Tumorzellen mit den herrschenden Bedingungen eines Gewebes, in dem sie Metastasen bilden, wurde 1928 jedoch von James Ewing in Frage gestellt. Ewing postulierte, allein die Beschaffenheit des Gefäßsystems zwischen primärem Tumor und spezifischem sekundären Organ sei ausreichend für organspezifische Metastasierung (Ewing, 1928). Tatsächlich kann jedoch keine der beiden Hypothesen Alleingültigkeit für die Erklärung der Ausbreitung von Tumorzellen im Organismus beanspruchen.

So zeigen Brustkrebs und Darmkrebs abhängig von der jeweiligen Anbindung an das Kreislaufsystem ein differenziertes Muster der Metastasierung. Über den Blutstrom transportierte Tumorzellen aus einem Brusttumor gelangen zunächst in die Lunge, während Tumorzellen aus primären Darmtumoren in die Leber transportiert werden (Chambers et al., 2002). Das Festsetzen von im Blutstrom befindlichen Zellen in sekundären Organen hängt ebenfalls von der relativen Größe der Tumorzellen zum Durchmesser der Kapillaren ab. *In vivo*-Videomikroskopie und statistische Analysen belegen, dass Tumorzellen sich generell bevorzugt in den fein ausgeprägten Kapillaren der Lunge und Leber ansiedeln (Chambers et al., 1998; Luzzi et al., 1998; Chambers et al., 2001). Dagegen dokumentiert Leonard Weiss durch Autopsiestudien eine bevorzugte Metastasenbildung in Knochen bei Brustkrebs und Prostatakrebs, die sich alleine über den mechanischen Faktor der Beschaffenheit des Gefäßsystems nicht erklären lassen (Weiss, 1992). Eine beträchtliche Anzahl an experimentellen Hinweisen belegt inzwischen, dass spezielle molekulare Faktoren, die in spezifischen Organen präsent sind, einen determinierenden Einfluss auf die Fähigkeit von verschiedenen Krebszelltypen zur Metastasenbildung haben. In Abhängigkeit von diesen molekularen Faktoren verhalten sich Tumorzellen hinsichtlich der Expression von Genen und folglich ihrer Wachstumsfähigkeit unterschiedlich. So ist z.B. die Wachstumsfähigkeit von Kolonkarzinomzellen von ihrer Fähigkeit der Expression des „epidermal growth-factor receptor“ (EGFR) abhängig. Die durch EGFR hervorgerufene Wirkung ist wiederum an die Präsenz des „transforming growth factor- α “ (TGF- α) im Gewebe gekoppelt. Die Bindung des Liganden an den korrespondierenden Rezeptor induziert schließlich „mitogen-activated protein kinase“ (MAPK)-Signalübertragungsereignisse, welche für Wachstum und Differenzierung des metastasierenden Tumors verantwortlich sind (Radinsky and Ellis, 1996).

1.3 Molekulare Mechanismen der Zellmigration

Als extrazelluläre Matrix (ECM) bezeichnet man die Grundsubstanz, in die Zellen eingebettet sind. Sie bildet u.a. die Unterlage (Basallamina) für Epithelien und füllt den Zwischenraum zwischen den Zellen eines Gewebes (interstitielle Matrix). Die ECM besteht hauptsächlich aus Proteinen (Kollagen, Elastin, Fibronectin und Laminin), Polysacchariden (z.B. Hyaluronsäure) und Proteoglykanen (serinreiche Polypeptidketten mit Glykosaminoglykanseitenketten).

Die extrazellulären Matrixproteine sind für die Struktur der Gewebe von Bedeutung und darüber hinaus an Prozessen wie Zelladhäsion, Zellwanderung und Differenzierung beteiligt

(Friedl and Brocker, 2000). Die ECM stellt für Zellen eine physikalische Barriere dar. Diese Barriere zu überwinden, ist unter normalen Bedingungen nur Zellen, welche physiologische Aufgaben wie embryonale Morphogenese, Wundheilung und Immunabwehr erfüllen, vorbehalten. Diese Zellen sind mit proteolytischen Werkzeugen ausgestattet, die es ihnen ermöglichen, die ECM zu verdauen, um in das angrenzende Gewebe einzuwandern (Lauffenburger and Horwitz, 1996; Bauvois, 2004; Imhof and Aurrand-Lions, 2004). An diesem Prozess wesentlich beteiligt sind zum einen die extrazellulären Matrixproteine, zum andern Adhäsionsmoleküle und Proteaserezeptoren auf der Oberfläche der migrierenden Zelle. Damit die Prozess-einleitende Adhäsion von Zelloberflächenproteinen an die extrazelluläre Matrix stattfinden kann, muss die Zelle zunächst ihre Form und Stabilität modifizieren. Dieser Schritt wird häufig Cytokin- oder Wachstumsfaktor-vermittelt induziert (Burrige and Chrzanowska-Wodnicka, 1996). Auf molekularer Ebene kommt es bei diesem Schritt zur Polymerisation von Aktinfilamenten und deren Verknüpfung mit Membran-assoziierten Adapterproteinen. Diese Vorgänge induzieren charakteristische Ausstülpungen der Membran, die als Filopodien bezeichnet werden. Sie verschmelzen bei Adhäsion an die ECM zu einem sogenannten Lamellipodium (Adams et al., 2001). Die Bildung des Lamellipodium geht mit komplexen Signalübertragungsprozessen („outside in signalling“) einher. Moleküle, die bei diesen Signalübertragungprozessen eine zentrale Rolle spielen, sind beispielsweise die „fokal adhesion kinase“ (FAK), „mitogen-activated protein kinases“ (MAPK), die Proteinkinase C und Rho-GTPasen wie RhoA und Rac1. Die erwähnten Signalübertragungsereignisse sind für die fortschreitende Veränderung des Zellkörpers und das Voranschreiten des Migrations-Prozesses verantwortlich (Hynes, 2002; Lee and Juliano, 2004). Abhängig von Zelltyp und extrazellulärer Matrix wird die über das Lamellipodium gebildete Punktheadhäsion von verschiedenen Oberflächenproteinen gebildet. Wichtige an dieser Zelladhäsion beteiligte Oberflächenproteine gehören zur Familie der Integrine. Integrine sind Heterodimere, die aus nicht-kovalent miteinander verbundenen α - und β -Untereinheiten bestehen, und mit ECM-Komponenten kommunizieren. So interagiert das Integrin $\alpha_v\beta_1$ mit Fibronectin (Cukierman et al., 2001), $\alpha_6\beta_1$ oder $\alpha_6\beta_4$ binden Laminin (Rabinovitz and Mercurio, 1997), $\alpha_v\beta_3$ interagiert mit Fibronectin und Vitronectin (Leavesley et al., 1992) und $\alpha_2\beta_1$ bindet fibrilläres Kollagen (Maaser et al., 1999). Nicht-Integrin Rezeptoren wie z.B. CD44 (Ponta et al., 2003), der „urokinase-typ plasminogen activator receptor“ (uPAR) (Jo et al., 2003), Mitglieder der Immunglobulin-Superfamilie (Barclay, 2003) und Selektine (Panicker et al., 2003) interagieren ebenfalls mit Komponenten der ECM bzw. sind an Signaltransduktionsereignissen beteiligt, die die Zellmigration fördern. Im

nächsten Schritt des Migrationsprozesses kommt es zur Rekrutierung von Oberflächen-Proteasen, die gegen Komponenten der ECM gerichtet sind und diese in der Umgebung der Punktadhäsion degradieren. Dieser auf die Umgebung der Punktadhäsion beschränkte Abbau der ECM wird über die Interaktion von Proteasen mit an der Punktadhäsion beteiligten Integrinen gewährleistet. So bindet zum Beispiel die Seperase (ein Gelatinolytisches-Enzym) an $\alpha_3\beta_1$ -Integrin (Mueller et al., 1999), MMP-1 (eine Matrix-Metalloproteinase, die als Kollagenase wirkt) bindet an $\alpha_2\beta_1$ und MMP-2 (eine Gelatinase) bindet an $\alpha_v\beta_3$ -Integrin (Brooks et al., 1996; Dumin et al., 2001). Bevor und während sich die Punktadhäsion ausbildet, kommt es zu der bereits erwähnten massiven Umstrukturierung des Zytoskeletts. Einige der an dieser Umstrukturierung beteiligter Faktoren, die zur Initiierung einer gerichteten Zellbewegung und schließlich zur Invasion benachbarter Gewebe dienen, sind bereits bekannt. So vermitteln kreuzvernetzende-Proteine wie α -Aktinin und Myosin II die Verlängerung und Aggregation von Aktinfilamente (Verkhovsky et al., 1995; Cramer, 1999). Dieser Prozess wird von dem G-Protein Rho und der Rho-assoziierten Serin/Threonin-Kinase (ROCK) und der „myosin light-chain kinase“ (MLCK) induziert (Totsukawa et al., 2000). Die Aktin/Myosin-Kontraktion bewirkt die Verkürzung der Längsachse der Zelle und führt so zu einem langsamen Vorwärtsgleiten des Zellkörpers in Richtung Punktadhäsion. Gleichzeitig führen proteolytische Prozesse – Calpain und die „focal adhesion kinase“ (FAK) sind an diesem Prozess beteiligt – zur Reduktion der Protein-Protein-Interaktionen zwischen Oberflächenproteinen und ECM entlang des Zellkörpers (Pfaff et al., 1999; Zeng et al., 2003). Die Aktinfilamente werden daraufhin abgebaut und die resultierenden Monomere werden zum erneuten Durchlauf dieses Bewegungs-Vorgangs wiederverwendet. Wie auch die recycelten Oberflächenproteine zur Wiederverwendung an das Kopfende der Zelle transportiert werden, an dem sich erneut ein Lamellipodium ausbildet (Bretscher, 1996). Die vielfache Wiederholungen des Zyklus führen letztendlich zur Einwanderung der Zelle in das angrenzende Gewebe.

Bei nicht-neoplastischen Zellen ist diese Basismaschinerie der Migration, die Anwendung bei physiologischen Prozessen (embryonale Morphogenese, Wundheilung und Immunabwehr) findet, streng reguliert. Dagegen scheint, – dargelegt in einem Übersichtsartikel von Friedl und Wolf – die Migration von Tumorzellen über die Dominanz von pro-migratorischen Aktivierungssignalen gesteuert zu sein. So ist häufig die Expression von ECM-degradierenden Enzymen wie MMP's, Cathepsin und uPA (urokinase-typ plasminogen activator) in Krebszellen hochreguliert. Die Aktivierung und Überexpression von Rac, Rho, ROCK und MLCK, die Signalübertragungsprozesse während der Migration induzieren,

korreliert mit dem Anstieg zellmigratorischen und invasiven Potentials von Tumorzellen *in vitro* und *in vivo*. Darüber hinaus hemmen pharmakologische Inhibitoren, welche Einfluss auf die Funktion von Integrinen, MMP's, ROCK oder MLCK nehmen, den Invasions-Prozess. Die in Tumorzellen bestehende Imbalance von Signalübertragungsprozessen zugunsten der Aktivierung von Migationsprozessen erlaubt es Tumorzellen ein kontinuierliches Migrationspotential aufrechtzuerhalten, welches es ihnen ermöglicht über Gewebsgrenzen hinaus zu expandieren und Metastasen zu bilden (Friedl and Wolf, 2003).

1.4 Das BSp73-Pankreastumorsystem

Für die Untersuchung des Beitrags von Oberflächenproteinen zur Tumorgenese, bilden Zelllinien mit unterschiedlichem Metastasierungspotential, aber gemeinsamer Abstammung von einem Parentaltumor geeignete Untersuchungsobjekte (Schirmacher and Appelhans, 1985). Das BSp73-Tumorsystem, das ursprünglich als spontan aufgetretenes Adenokarzinom des Pankreas in BDX-Ratten isoliert wurde, stellt ein solches Modell dar. Nach mehreren *in vivo*-Passagen konnten Tumorzellen schwacher und hoher metastatischer Kompetenz etabliert werden: Die als BSp73AS bezeichnete Sublinie verfügt über schwaches, die BSp73ASML genannte Sublinie über ein ausgeprägtes Metastasierungsvermögen (Matzku et al., 1983).

Die beiden Zelllinien zeigen Unterschiede bezüglich Morphologie, Wachstums- und Adhärenzverhalten, die mit einer divergenten Expression verschiedener Oberflächenproteine korreliert. Über den Vergleich von Antikörperbanken, die gegen die Oberflächenproteine von einerseits BSp73AS und andererseits von BSp73ASML hergestellt wurden, konnten verschiedene Oberflächenmoleküle identifiziert werden, die mit dem Metastasierungsprozess in Zusammenhang gebracht wurden. Metastasierungs-assoziierte Gene wie z.B. uPAR, C4.4A, D6.1A dem Integrin $\alpha_6\beta_4$ und CD44-Varianten (v4-v7), sind im Gegensatz zu BSp73ASML auf BSp73AS nicht oder nur schwach exprimiert. Darüber hinaus ist das Genom beider Zelllinien durch Anpleuoidie gekennzeichnet: BSp73AS besitzt 47, BSp73ASML 63 Chromosomen (Ben-Ze'ev et al., 1986; Raz et al., 1986; Claas et al., 1996; Herlevsen et al., 2003).

In einer Arbeit, die die Fragestellung des Transkriptionsprofil von 7000 verschiedenen Genen im BSp73ASML/BSp73AS-System zum Inhalt hatte, konnte das unterschiedliche Expressionsprofil oben genannten Metastasierungs-assoziiierter Gene der BSp73ASML/BSp73AS-Zelllinien bestätigt werden. Ebenso wurde eine Überexpression des Oberflächenproteins EGFR und seiner Liganden HB-EGF und TGF α nachgewiesen. Zudem

wurde eine De-Regulation von Transkriptionsfaktoren der AP-1-Familie (insbesondere von Fra-1) und c-myc beobachtet (Tarbe et al., 2002). Diese Erkenntnisse gaben wichtige Hinweise auf den potentiellen Einfluss transkriptioneller Regulationsmechanismen bei der Expression Metastasierungs-assoziiierter Gene in BSp73ASML.

1.5 C4.4A, ein Metastasierungs-assoziiertes Oberflächenmolekül

Die Bedeutung von Oberflächenproteinen beim Prozess der Migration von Zellen wurde in vorangegangenen Kapiteln ausführlich dargelegt. Im Folgenden sollen am Beispiel von C4.4A und später auch uPAR zwei Oberflächenmoleküle eingehender betrachtet werden.

C4.4A wurde aus der metastasierenden Sublinie eines Pankreaskarzinoms der Ratte isoliert (Rosel et al., 1998). Das humane Homolog des Ratten-C4.4A wurde anschließend aus einer cDNA-Bibliothek der Plazenta isoliert (Wurfel et al., 2001). Wie Untersuchungen hinsichtlich der Expression von Ratten und Maus C4.4A zeigten, ist das Protein nur auf den Oberflächen weniger Normalgewebe exprimiert. So ist C4.4A ausschließlich in Normalgeweben der Plazenta, Supra-Basalschichten der Epidermis und auf Schleimhautepithelien des oberen Gastrointestinaltraktes nachweisbar. Dagegen ist die Expression auf einigen Primärtumoren des Menschen signifikant gesteigert. Das Molekül konnte auf humanen Tumoren von Kolon-, Pankreas- und Nierenzellen sowie Melanomen nachgewiesen werden (Seiter et al., 2001; Smith et al., 2001; Wurfel et al., 2001). Durch „FISH“ (Fluoreszenz-*in situ*-Hybridisierung) einer C4.4A-spezifischen DNA-Sonde mit Chromosomen immortalisierter Lymphozyten konnte der humane C4.4A-Genlocus zytogenetisch kartiert werden. Das C4.4A-Gen lokalisiert auf Chromosom 19q13.1-13.2 und befindet sich somit auf dem gleichen Chromosom wie uPAR (Borlum et al., 1992; Wurfel et al., 2001). C4.4A ist ein Glykosylphosphatidylinositol-verankertes (GPI)-Oberflächenprotein, das ebenso wie uPAR zu der Ly-6 Proteinfamilie gehört und über insgesamt drei Domänen verfügt. Das C4.4A-Molekül weist Sequenzhomologien in der ersten und zweiten extrazellulären Domäne zu den uPAR-Domänen auf. Im Gegensatz zu uPAR ist C4.4A jedoch nicht in der Lage, uPA zu binden und somit zu aktivieren (Hansen et al., 2004). Die Metastasierungs-Assoziation von C4.4A konnte von verschiedenen Arbeitsgruppen belegt werden. Zunächst wurde von Mitarbeitern aus der Abteilung gezeigt, dass nach Injektion von C4.4A-transfizierten Tumorzellen in die Fußpfote der Ratte diese Metastasen in der Lunge ausbildet wurden. Dagegen konnten Kontroll-transfizierte Tumorzellen der gleichen Zelllinie keine Metastasenbildung hervorrufen. Auch konnte gezeigt werden, dass C4.4A an der Adhäsion

von Zellen über das ECM-Protein Laminin beteiligt ist (Rosel et al., 1998). Die Arbeitsgruppe um Dr. Southgate demonstrierte die differentielle Expression von C4.4A in humanen Urothelzellen in Abhängigkeit von der Kultivierung der Zellen auf ECM-Proteinen bzw. Plastik (Smith et al., 2001). Ploug und Mitarbeiter konnten zeigen, dass die C4.4A-Expression bei der Wundheilung in suprabasalen Keratinozyten gesteigert ist (Hansen et al., 2004). Eine kürzlich publizierte Arbeit bestätigt zudem die Lamininbindung von C4.4A (Paret et al., 2005). In dieser Arbeit wurden experimentelle Hinweise dafür gesammelt, dass C4.4A bevorzugt an Laminin 1 bzw. 5 bindet. An dieser Interaktion scheint auch Galektin-3 beteiligt zu sein.

Die bis hierhin vorgestellten Daten belegen die Assoziation von C4.4A mit Metastasierungsprozessen. Über welchen molekularen Mechanismus C4.4A an diesen Vorgängen beteiligt ist, konnte allerdings bislang noch nicht aufgeklärt werden. Basierend auf diesen Arbeiten liegt es jedoch nahe zu vermuten, dass C4.4A in engen Zusammenhang mit Mechanismen der Zellmigration steht.

1.6 Die Serinprotease Urokinase-Typ Plasminogenaktivator (uPA) und sein Rezeptor (uPAR)

Im Folgenden soll die Rolle der Serinprotease uPA und ihres Rezeptors bei der Metastasierung eingehender betrachtet werden. Zum einen ist in Hinblick auf Metastasierungsphänomene die uPA/uPAR-Wechselwirkung eines der bestuntersuchten Systeme, zum anderen zeigt uPAR strukturelle Homologien zu C4.4A.

uPA wird zunächst als inaktives Einzelkettenprotein – pro-uPA genannt – synthetisiert, dem sich drei unterschiedliche Regionen zuordnen lassen: Eine amino-terminale Wachstumsfaktordomäne, eine Kringel-Domäne und eine carboxy-terminale katalytische Domäne. Das Molekül bindet über die Wachstumsdomäne spezifisch an uPAR, wo es proteolytisch von Plasmin aktiviert wird. Freies uPA wird zwar auch durch freies Plasmin aktiviert, jedoch nur sehr viel langsamer (Dano et al., 1985). Die aktive Form von uPA besteht aus zwei Polypeptidketten, die über zwei Disulfidbrücken miteinander verknüpft sind. Die carboxy-terminale B-Kette besitzt die Serinproteasedomäne, die amino-terminale A-Kette die Wachstumsfaktordomäne. Die Serinproteasedomäne ist für proteolytische Spaltung von Plasminogen verantwortlich, wodurch die aktive Form Plasmin entsteht. Die gegenseitige Aktivierung von uPA und Plasmin bildet somit eine positive „feedback“ Schleife (Rao, 2003). uPA und Plasmin gehören beide zu den Serinproteasen und sind in der Lage die extrazelluläre

Matrix (ECM) zu degradieren, indem sie Matrixproteine wie Fibronectin spalten. Plasmin ist auch indirekt für die Degradation der ECM verantwortlich, indem es Pro-MMPs (Inaktive Vorstufen von Mitgliedern der Familie der Matrix-Metalloproteinasen) über proteolytische Spaltung aktiviert (Blasi and Carmeliet, 2002). uPAR ist ein Glykosylphosphatidylinositol-verankerter Oberflächenrezeptor, der ein Mitglied der Ly6 Proteinfamilie ist. Das uPAR-Molekül besteht aus drei Domänen (D1, D2 und D3) und bindet mit hoher Affinität pro-uPA. Pro-uPA bindet an die amino-terminale Domäne 1, wobei Domäne 2 und 3 für die hoch-affine Ligandenbindung erforderlich sind (Behrendt et al., 1996). Ein wichtiger Regulator des uPAR/uPA-Systems ist der „plasminogen activator-inhibitor 1“ (PAI1). PAI1 inhibiert sowohl freies als auch rezeptorgebundenes uPA (Nielsen et al., 1986). Neben der Regulation induziert PAI1 die Internalisierung des uPAR/uPA-Komplexes. An diesem Prozess ist wiederum das „low-density lipoprotein (LDL)-receptor-related protein (LRP)“ beteiligt.

Die Interaktion von LRP mit uPAR führt schließlich zur Internalisation des Komplexes (Czekay et al., 2001). Der Komplex wird gelöst und freies uPAR an die Oberfläche zurücktransportiert (Nykjaer et al., 1997). uPAR ist auf normalen und vielen Tumorzellen exprimiert und spielt eine wichtige Rolle beim Teilverdau der ECM. uPAR ist darüber hinaus noch an weiteren Prozessen beteiligt, die für die Migration von Zellen verantwortlich sind. Der Rezeptor verfügt über keine Transmembrandomäne und ist somit nicht direkt an Signalübertragungsprozessen beteiligt. Viele Studien belegen, dass uPAR/uPA über Interaktion mit Integrinen die Fähigkeit besitzt, Signalübertragungsprozesse einzuleiten, die Adhäsion und Migration induzieren (Ossowski and Aguirre-Ghiso, 2000). So ist bekannt, dass uPAR/uPA vermittelt über das Integrin $\alpha_v\beta_3$ an das extrazelluläre Matrixprotein Vitronectin binden kann (Sidenius et al., 2002). Diese Bindung setzt einen FAK-induzierten und Ras/ERK vermittelten Signalübertragungprozess in Gang, worüber die „myosin light-chain kinase“ (MLCK) aktiviert wird. Die MLCK spielt während des Migrationsprozesses eine wichtige Rolle bei der Umstrukturierung des Zytoskelettes (Nguyen et al., 1999).

1.7 Die Ras-vermittelte Tumorgenese des Pankreaskarzinoms

1.7.1 Krebs: eine genetisch verursachte Erkrankung

Krebs wird als eine genetische Krankheit von somatischen Zellen angesehen. Um neoplastisches Wachstum zu verhindern, ist u.a. die Aufrechterhaltung der genomischen Integrität einer Zelle strikt erforderlich. Obwohl Mutation und Selektion die Voraussetzung für genetische Variabilität ist und so die Basis der Evolution bildet, muss die genomische

Integrität der Zellen streng kontrolliert werden. Wichtige Kontrollpunkte zur Aufrechterhaltung der genomischen Integrität sind Mechanismen, die den Zellzyklus, die DNA-Reparatur und Apoptose steuern. Kritische Ereignisse bei der Entstehung von Krebs fundieren auf der Mutation von Genen, die an genannten Kontrollmechanismen beteiligt sind, so dass ihre Kontrollfunktion beeinträchtigt ist (Shiloh, 2003). Störungen der genomischen Integrität reichen von Sequenzmodifikation wie einer einzelnen Nukleotid-Substitution, bis hin zu Umordnung der chromosomalen Struktur einer Zelle (z.B. Aneuploidy) (Motoyama and Naka, 2004; Storchova and Pellman, 2004). Gene, die an der Tumorgenese beteiligt sind, werden grob durch die Klassifizierung in Tumorsuppressor- bzw. Onkogene unterschieden. Der sogenannten „Onkogen-Hypothese“ folgend handelt es sich bei Onkogenen um dominante Gene. Ist eine der beiden zellulären Genkopien beispielweise durch Amplifikation oder Punktmutation mutiert, reicht dies zur Induktion entarteten Wachstums aus (Parada et al., 1982; Shimizu et al., 1986). Tumorsuppressoren hingegen verlangen nach Knudson's „Two-Hit-Hypothese“ die Mutation beider Allele (Knudson, 1971). Erst der vollständige Ausfall der Gen-Funktion führt zunächst zum Verlust der Tumor-supprimierenden Eigenschaften und schließlich zur Ausbildung eines Tumors.

1.7.2 Das onkogene Potential der Ras-Proteinfamilie

Am Beispiel von Ras-Proteinfamilie soll im Folgenden die Bedeutung von Onkogenen bei der Tumorentwicklung etwas näher betrachtet werden. Ras-Proteine spielen eine zentrale Rolle bei der Vermittlung extrazellulärer Signale in der Zelle. So ist es nicht verwunderlich, dass eine über mutiertes Ras verursachte Entkopplung von Signal- und Effektor-Prozessen während Wachstum und Differenzierung signifikant an der Entwicklung von Tumoren beteiligt ist (Barbacid, 1987).

Säugetiere besitzen drei Ras-Proteine (H-, K-, und N-Ras), die zwischen einer GTP- und einer GDP-Nukleotidform pendeln. Normalerweise sind Ras-Proteine streng über „nucleotide exchange factors“ (GEFs) und „GTPase-activating proteins“ (GAPs) reguliert. Die GEFs aktivieren Ras über den Austausch von GDP durch GTP, während GAPs über Hydrolyse von gebundenem GTP Ras in seine inaktive Form überführen. Die durch Mutation verursachte dauerhafte Aktivierung von Ras, die eine nur noch unzureichende Inaktivierung durch GAP's gegenübersteht, fördert die Tumorentstehung beträchtlich (Cox and Der, 2003). Bedingt durch Mutationen liegt K-Ras bemerkenswerterweise in nahezu 100% von Pankreasadenokarzinomen in seiner aktiven Form vor (Rozenblum et al., 1997; Ishino et al., 2002). GTP-Ras aktiviert die „mitogen-activated protein kinase“ (MAPK), worüber wiederum

weitere Signalübertragungsereignisse induziert werden, die Zellverhalten wie Wachstum, Differenzierung und Migration steuern. So ist die Ras/MAPK-Signalkaskade für die Aktivierung von CyclinD verantwortlich. CyclinD bindet und aktiviert die „cyclin-depend protein kinase“ (Cdk) 4 und 6, das die Zelle von der Ruhephase (G_0) in die Wachstumsphase (G_1) überführt und somit wichtige physiologische Prozesse initiiert (Weinstein-Oppenheimer et al., 2000). Weiteren Beobachtungen zufolge ist das GTP-Ras zudem an einem autokrinen Signalübertragungsmechanismus bei Hautkrebs involviert. Dieser Mechanismus verursacht erhöhte Syntheseraten des „epidermal growth-faktor“ (EGF), des „transforming growth-faktor- α “ (TGF- α) und deren Rezeptor (EGFR). Die vom dauerhaft aktivierten Ras verursachte Überexpression von Liganden und Rezeptor in derselben Zelle, führt zu andauernden Aktivierung von Signalwegen, die die gesteigerte Poliferationsrate von Zellen stimulieren. An diesem transformierenden Effekt von Ras-Onkogenen ist die „phosphatidylinositol 3-kinase“ (PI3K) beteiligt (Sibilia et al., 2000). Die von der PI3K vermittelten Signalübertragungsereignisse sind auch für die Aktivierung von Rac1 verantwortlich, das wiederum an der Induktion von Migrationsprozessen beteiligt ist (Lee and Juliano, 2004).

1.8 Das onkogene Potential von Transkriptionsfaktoren

In der Wachstumsphase wird eine Vielzahl von Genen, die die Tumorentwicklung und Metastasierung fördern können, über die Ras/MAPK vermittelte Signalkaskade transkriptional aktiviert. Die transkriptionelle Regulation von Genen hängt von der Interaktion von Transkriptionsfaktoren mit spezifischen Sequenzmotiven der DNA ab. Diese Interaktion ist schließlich für die Inangsetzung der Transkriptionsmaschinerie verantwortlich. Zu den Transkriptionsfaktoren, die über den Ras/MAPK Signalübertragungsweg aktiviert werden, zählen Mitglieder der AP-1-, Ets- (Sap1, Elk-1), Myc-, NF- κ B- und C/EBP β -Proteinfamilie (Sklar et al., 1991; Langer et al., 1992; Johnson et al., 1996; Finco et al., 1997). Am Beispiel der „activator protein 1“ (AP-1)-Familie soll das Funktionsprinzip dieses Mechanismus verdeutlicht werden. Der Begriff „AP-1“ wird vor allem für Homo- oder Hetero-Dimere verwendet, die von monomeren Mitgliedern dieser Proteinfamilie zusammengesetzt werden. Unter anderem wird AP-1 vom Ras/MAPK-Effektor, der „Jun amino-terminal kinase (JNK)“ aktiviert (Behrens et al., 1999). Zu den Mitgliedern der AP-1 Familie zählen u.a. c-Jun, JunB, JunD, c-Fos, FosB und Fra-1. Von aus c-Fos, c-Jun und Fra-1 bestehenden AP-1-Komplexen ist bekannt, dass sie, wenn sie im Mausmodell überexprimiert werden starkes

Transformationspotential besitzen. So verursacht c-Fos die Entwicklung von Knochentumoren (Grigoriadis et al., 1993; Young et al., 1999), c-Jun ist verantwortlich für die Entstehung von Papilloma- und Lebertumoren (Eferl et al., 2003). Fra-1 ist an der Entwicklung von Lungentumoren und Hautkrebs beteiligt (Jochum et al., 2000). C-Jun, c-Fos und Fra-1 sind folglich Onkogene. Demgegenüber werden seit jüngerer Zeit anti-onkogene Effekte von JunB und JunD diskutiert (Eferl and Wagner, 2003). In Mausmodellen konnte gezeigt werden, dass JunB die Fähigkeit hat, dem Transformationspotential von c-Jun entgegenzuwirken, und somit Tumor-Suppressor-ähnliche Aktivität besitzt (Deng and Karin, 1993; Passegue et al., 2001). Von JunD ist bekannt, dass es als negativer Regulator der Zellproliferation agiert (Pfarr et al., 1994) und zusammen mit dem Tumor-Suppressor Meninin neoplastisches Wachstum von Zellen unterdrückt (Agarwal et al., 1999).

Die Effekte von AP-1 sind auf die Regulation von an der Tumorentwicklung involvierten Genen zurückzuführen. So aktiviert c-Jun im AP-1-Komplex den positiven Regulator des Zellzyklus CyclinD und unterdrückt negative Regulatoren wie die Tumorsuppressorgene p53 und „cyclin-dependent kinase inhibitor“ CDKN4A (Bakiri et al., 2000). AP-1 ist in die Regulation von Genen involviert, die an Angiogenese und Metastasierung beteiligt sind. So ist von c-Fos und Fra-1 bekannt, dass sie Gene aktivieren, die an der Degradation der ECM mitwirken (z.B. MMP-3 oder MMP-4) (Hu et al., 1994) und im speziellen auch an der Regulation von uPA und seines Rezeptors uPAR beteiligt sind (Kustikova et al., 1998).

Neben der transkriptionellen Aktivierung von Genen über Onkogene können, wie bereits am Beispiel des Ras-Protoonkogens dargestellt, Gene post-transkriptional reguliert werden. Post-transkriptionelle Ereignisse beinhalten mRNA-Modifizierung, nukleo-zytoplasmatischen Transport, mRNA-Stabilisation und translationale Regulation. In einigen Tumoren ist die Onkogen-kodierende mRNA stabilisiert, so dass es zu einer Überproduktion des korrespondierenden Proteins kommt, welches folglich die Tumorentwicklung begünstigt. Die post-transkriptionale Regulation auf Ebene der mRNA ist vielfältig, basiert aber auf dem einheitlichen Mechanismus, dass spezifische RNA-bindende Proteine über konservierte Sequenzelemente in untranslatierten Regionen mit der mRNA interagieren (Bevilacqua et al., 2003; Audic and Hartley, 2004). Ein Beispiel für eine solche post-transkriptionale Regulation stellt die mRNA-Stabilisierung des Mitglieds der AP-1 Proteinfamilie c-Fos dar. Die c-Fos mRNA ist normalerweise wenig stabil. Verantwortlich für die schnelle Degradierung der c-Fos mRNA ist das AU-reiche Element (ARE) bestehend aus den Nukleotiden AUUUA, das in der 3'untranslatierten Region (UTR) lokalisiert. Das ARE ist verantwortlich für die Abspaltung des poly-A-Schwanzes der c-Fos mRNA über ARE-bindende Nukleasen (Shyu et

al., 1989; Shyu et al., 1991). Generell führt die Verkürzung des poly-A-Schwanzes einer mRNA zu einer Verringerung der Stabilität und somit zu einer reduzierten Translationseffizienz (Audic and Hartley, 2004). Sequenzmodifikationen im ARE, die einen Abbau der mRNA verhindern, tragen zu einer Überexpression von c-Fos im Mausmodell bei. Diese Überexpression von c-Fos resultiert in der Entstehung von Knochenkrebs (Meijlink et al., 1985).

1.9 Mechanismus der transkriptionellen Regulation

Über transkriptionelle Regulation wird die Mehrzahl der Gene aktiviert, die am Zellverhalten wie Wachstum, Differenzierung, Vitalerhaltung und Mobilität beteiligt sind. Im Falle einer funktionellen Imbalance der Transkriptionskontrolle entwickeln solche Gene das Potential, zu Tumorentstehung und Metastasierung beitragen zu können. Die transkriptionale Regulation von Genen in Eukaryoten basiert auf der Interaktion von DNA-bindenden Proteinen mit spezifischen DNA-Elementen. Diese spezifischen DNA-Elemente bestehen aus einer genomischen Nukleotidsequenz (Konsensussequenz), die sich aus meist weniger als 10 Nukleotiden zusammensetzt. Die Summe von genomischen DNA-Elementen, die für die transkriptionelle Aktivierung bzw. Ruhestellung eines Gens notwendig sind, wird mit dem Begriff Promotor umschrieben.

1.9.1 Ausbildung des basalen Transkriptionsapparates

Promotoren sind in der 5'flankierenden Region mRNA-kodierender Sequenzen lokalisiert. Das/die dem Startpunkt am nächsten liegenden DNA-Element(e) bilden den „Core“-Promotor, der etwa –25 Nukleotide vom Startpunkt der Transkription entfernt liegt. Die Core-Promotor-Elemente variieren in eukaryontischen Promotoren. Das erste Core-Promotor-Element, das in eukaryontischen Promotoren identifiziert wurde, war die TATA-Box (Konsensussequenz TATAAA) (Breathnach and Chambon, 1981). Stomaufwärts der TATA-Box schließt sich häufiger das „TFIIB recognition element“ (BRE) an. Die Konsensussequenz von BRE ist G(C/G)CG(G/A)CGCC (Lagrange et al., 1998). Der Initiator (Inr) ist ein weiteres eukaryontisches Core-Promotorelement. Die Konsensussequenz von Inr ist (A/G)(A/G)CA₊₁N(T/A)(A/G)(A/G), wobei das Adenin A₊₁ das erste transkribierte Nukleotid bezeichnet. Das Inr-Motiv ist sowohl in TATA-Box-Promotoren, wie auch in Promotoren, die keine TATA-Box besitzen, zu finden (Javahery et al., 1994). Häufig ist in Promotoren, die

über Inr transkriptional aktiviert werden, das „downstream core promotor element“ (DPE) präsent. Das DPE-Motiv ist dann zwischen 28-32 Nukleotiden relativ vom Inr-Motiv (A_{+1}) entfernt lokalisiert und besitzt die Konsensussequenz $AG_{+28}G(A/T)(C/T)(G/A/C)$ (Burke and Kadonaga, 1997). Diesen bisher beschriebenen Core-Promotorelementen ist gemein, dass sie sich auf definierte DNA-Elemente von weniger als 10 Nukleotiden beschränken. Im Gegensatz dazu, lässt sich in „CpG-island“-Promotoren, der Core-Promotor nicht auf einzelne DNA-Elemente einschränken. „CpG-island“-Promotoren sind definiert als DNA-Sequenzen, in denen gehäuft GC-Box-Motive auftreten. GC-Box-Motive sind Nukleotidsequenzen, die aus GC-Nukleotiden von unterschiedlicher Anzahl bestehen. „CpG-islands“ können sich über 0,5-2kbp Länge erstrecken (Adachi and Lieber, 2002). Ein weiteres Kennzeichen dieses Promotortyps ist, dass er zwar nicht über eine TATA-Box oder ein DPE-Motiv aber häufig über ein Inr-Element verfügt. Es wird vermutet, dass bei diesem Promotor GC-Box und Inr-Element an der Initiierung des basale Transkriptionsniveaus beteiligt sind (Butler and Kadonaga, 2002).

An den Core-Promotorelementen bildet sich ein heterogener Komplex von basalen Transkriptionsfaktoren (TF) und der RNA-Polymerase II aus. Dieser Komplex kann neben der RNA-Polymerase II, aus den Proteinen TFIIA, TFIIB, TFIID, TFIIE, TFIIF und TFIIH bestehen. Die Komplexbildung erfolgt schrittweise und beginnt mit TFIID. TFIID interagiert mit der DNA über die Core-Promotorelemente. TFIID stellt selbst einen Proteinkomplex dar, der aus dem „TATA box-binding protein“ TBP und weiteren 13 TBP-assoziierten Faktoren besteht (Butler and Kadonaga, 2002). Stromaufwärts von TFIID bindet TFIIB an die DNA und an TBP, gefolgt vom RNA-Polymerase II-TFIIF-Komplex. Im nächsten Schritt bindet TFIIE und letztendlich TFIIH (Veenstra and Wolffe, 2001; Tora, 2002). Dieser vervollständigte Proteinkomplex katalysiert schließlich die Synthese der mRNA entlang der DNA-Matrize. Dieser basale Transkriptionsapparat (in der Literatur auch als „pre-initiation complex“ (PIC) beschrieben) kann jedoch nur mit sehr langsamer Geschwindigkeit DNA transkribieren. Um eine mRNA-Synthese mit hoher Rate und Selektivität zu erreichen, müssen zusätzliche regulatorische Transkriptionsfaktoren (Enhancer) stromaufwärts des basalen Transkriptionsapparates an den Promotor binden. Über diese Bindung von regulatorischen Transkriptionsfaktoren an solche Promotor-DNA-Elemente („*cis* acting elements“) werden Gene an oder abgeschaltet.

1.9.2 Aktivierung des basalen Transkriptionsapparates über Enhancer

Die Regulation der mRNA-Synthese erfolgt durch Transkriptionsfaktoren, die durch eine *trans*-Aktivierungsdomäne vermittelt mit dem basalen Transkriptionsapparat interagieren. Diese Interaktion resultiert in einer strukturellen Veränderung der Promotor-DNA, die die Aktivität des basalen Transkriptionsapparates bestimmt (Ogata et al., 2003).

Die transkriptionelle Regulation eines Gens erfolgt normalerweise über mehrere verschiedene „*cis*-acting elements“, an welche spezifische Transkriptionsfaktoren binden können. Somit wird, abhängig von den biologischen Anforderungen, die an die Zelle gestellt werden, eine Vielzahl von Genen durch die Kombination einer limitierten Anzahl von Transkriptionsfaktoren gesteuert (Veenstra and Wolffe, 2001). Mittlerweile wurden einige Transkriptionsfaktoren identifiziert, die die Steuerung von an der Tumorentwicklung beteiligter Gene gewährleisten. Solche Transkriptionsfaktoren werden häufig von Signalübertragungswegen aktiviert, die zentrale Aufgaben in Wachstums- und Differenzierungsprozessen der Zelle übernehmen. Vertreter dieser Gruppe von Transkriptionsfaktoren sind die Mitglieder der AP-1-Familie wie z.B. Jun und Fos (c-Jun, JunB, JunD und c-Fos, Fra-1, Fra-2, FosB). Jun und Fos Proteine bilden über ihre „basic leucine-zipper“ (bZIP)-Domänen homodimere oder heterodimere Komplexe, die im aktivierten Zustand an das DNA-Element „12-O-tetradecanoyl-phorbol-13-acetat (TPA)-responsive element“ (TRE) binden. Das TRE-DNA-Motiv besitzt die Konsensussequenz TGA(C/G)TCA (Eferl and Wagner, 2003). Die für die Krebsentstehung relevanten Kontrollfunktionen der AP-1-Transkriptionsfaktoren wurden im Kapitel 1.9 ausführlich beschrieben. Ein weiterer Vertreter von bZIP-Transkriptionsfaktoren ist das „CCAAT/enhancer-binding protein“ (C/EBP). Die C/EBP-Transkriptionsfaktorfamilie besteht aus fünf Mitgliedern (C/EBP α , C/EBP β , C/EBP γ , C/EBP δ , C/EBP ϵ und C/EBP ζ), die über ihre bZIP-Domäne Homodimere oder Heterodimere ausbilden. Ein C/EBP-Komplex muss über Signalübertragungsereignisse aktiviert werden, um dann an das DNA-Konsensusmotiv CCAAT binden zu können (Ramji and Foka, 2002). C/EBP ist an der Aktivierung einer relativ großen Anzahl von Genen beteiligt, die multiple physiologische Funktionen erfüllen. Hinsichtlich des neoplastischen Wachstums von Zellen ist das C/EBP β -Mitglied von besonderer Relevanz. C/EBP β wird u.a. über den Ras/MAPK Signalübertragungsweg via „extracellular signal regulated kinase“ (ERK1/ERK2) aktiviert (Nakajima et al., 1993; Zhu et al., 2002). Wie Studien belegen, ist C/EBP β an der Aktivierung von Genen beteiligt, die Wachstum und Differenzierung von Zellen steuern. So konnte in Mausmodellen gezeigt

werden, dass C/EBP β sowohl bei der Entwicklung und Differenzierung der Brustdrüse, als auch an der Regeneration der Leber, entscheidend beteiligt ist (Screpanti et al., 1995; Tanaka et al., 1997; Greenbaum et al., 1998). Störungen bei der Regulation dieser Prozesse führen häufig zu neoplastischem Wachstum von Zellen und sind mit einer Überexpression von C/EBP β verknüpft (Buck et al., 1999; Zahnow et al., 2001; Zhou et al., 2001; Zhu et al., 2002).

Weitere Vertreter von Transkriptionsfaktoren sind die sogenannten Zinkfinger-Proteine. Eine erst vor kurzem identifizierte Familie von Zinkfingerproteinen stellt beispielsweise die Klasse der „pleomorphic adenoma gene“ (PLAG) dar. Die PLAG-Familie besteht aus PLAG, „PLAG-like 1“ (PLAGL1) und PLAGL2, die an die GC-Box-Konsensussequenz GGGGGGCCCC binden (Varrault et al., 1998). PLAG-Transkriptionsfaktoren sind hauptsächlich in fötalem Gewebe exprimiert. Störungen in der Regulation der PLAG-Gene führen zu einer Überexpression derselbigen, welches wiederum zu einer vermehrten Aktivierung von PLAG-Zielgenen in den Speicheldrüsengeweben führen kann. Diese Überexpression von PLAG ist mit dem verstärktem Wachstum von polymorphen Drüsenzellen in Gewebsdrüsengeschwulsten verbunden. Für die transformierende Wirkung von PLAG ist eine Überexpression von Wachstums-assoziierten Genen verantwortlich, die unter der Kontrolle von PLAG-Transkriptionsfaktoren stehen. Zu diesen PLAG-aktivierten Genen zählt z.B. das „insulin-like growth factor-II“ (IGF-II)-Gen (Kas et al., 1998; Hensen et al., 2002; Van Dyck et al., 2004).

Zu den Vertretern der Zinkfingerproteine zählen auch die Vertreter der „specificity protein“ (Sp)-Transkriptionsfaktoren. Diese Transkriptionsfaktorfamilie besteht aus den Mitgliedern Sp1, Sp2, Sp3 und Sp4, die an die GC-Box-Konsensussequenz GGGCGGGG oder G(T/C)ACCC binden. Die Sp-Faktoren stehen in keinem direkten Zusammenhang mit neoplastischem Wachstum von Zellen, sind aber allgemein an der transkriptionalen Aktivierung einer Vielzahl von Genen beteiligt. Darum gelten sie gemeinhin als „house keeping“ Transkriptionsfaktoren. Sie sind an der Ausbildung des basalen Transkriptionsapparates der bei Eukaryoten weitverbreiteten „CpG-island“-Promotoren beteiligt (Suske, 1999). Mausmodelle zeigen, dass eine Deletion des Sp1-Gens im Mausmodell innerhalb der ersten zehn Tage zum Abbruch der Embryogenese führt (Marin et al., 1997).

1.10 Zielsetzung der Arbeit

Membranproteine auf Tumorzellen tragen entscheidend zu deren metastatischem Potential bei. Evidenzen für die Stichhaltigkeit dieser These konnten u.a. mithilfe des Systems der Pankreasadenokarzinomzelllinien BSp73AS und BSp73ASML der Ratte gefunden werden. Die besondere Eignung dieses Modellsystems für das Studium maligner Prozesse resultiert aus dem unterschiedlichen Metastasierungsverhalten dieser Sublinien. Untersuchungen zur differentiellen Expression von Membranrezeptoren haben u.a. zur Identifikation des C4.4A-Moleküls geführt. Von dem C4.4A-ähnlichen gut untersuchten uPAR-Molekül ist bekannt, dass eine gesteigerte Expression mit dem Metastasierungsverhalten von Tumorzellen korreliert. Die Beobachtung der sehr beschränkten aber regulierten Expression von C4.4A auf nicht transformierten Zellen, sowie die fehlende Expression auf einer Reihe nicht-metastasierender Tumorzellen waren der Ausgangspunkt dieser Arbeit, die erstmals nach den Ursache(n) dieser Expressionsunterschiede fragte. Dies schließt die Analyse möglicher Mechanismen ein, die zu den erwähnten Expressions-Unterschieden von C4.4A führen.

Die Planung und Klonierung eines *C4.4A*-k.o.-Maus-Konstruktes, war ebenfalls Gegenstand dieser Arbeit. Die Arbeiten sollten die Basis zur Herstellung eines *C4.4A*-Mausmodell liefern, das in naher Zukunft weitere detaillierten Einsichten bezüglich physiologischer Funktionen des *C4.4A*-Proteins erlauben sollte.

2 Material und Methoden

2.1 Chemikalien

α -D-Glukose	Serva, Heidelberg
Acetyl-CoA	Calbiochem, Bad Soden
Acrylamid	Serva, Heidelberg
Agarose	Appligene, Heidelberg
Bacto-Agar	Fluka, Steinheim
Bromphenolblau	Serva, Heidelberg
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Sigma, München
dNTPs	Roche Diagnostics, Mannheim
Dünnschichtchromotographie -Alufolien Kieselgel 60 F ₂₅₄	Merck, Darmstadt
Ethanol	Sigma, München
Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA)	Arcos, Geel (Belgien)
Exgen 500	MBI-Fermentas, St. Leon-Rot
Ficoll 400	Pharmacia, Freiburg
Formaldehyd	Sigma, München
Glyzerin	Serva, Heidelberg
Guanidinthiocyanat	Carl Roth, Karlsruhe
Hefeextrakt	AppliChem, Darmstadt
Natriumdodecylsulfat (SDS)	Serva, Heidelberg
Natronlauge	J.T. Baker, Deventer, NL
N-2-hydroxymethylpiperazin-N'-2-ethansulfonsäure (HEBES)	Roth, Karlsruhe
Nonidet P-40	Fluka, Steinheim
Phenylmethansulfonylfluorid (PMSF)	Sigma, München
Rinderserumalbumin	Roche Diagnostic, Mannheim
Proteinaseinhibitor	Roche Diagnostic, Mannheim

Salzsäure	J.T. Baker, Deventer, NL
Schwefelsäure	J.T. Baker, Deventer, NL
N,N,N',N'-Tetramethylethylendiamin (TEMED)	Sigma, München
Trypton	AppliChem, Darmstadt

Nichtaufgeführte Chemikalien wurden von Merck (Darmstadt), sämtliche Radiochemikalien von Amersham Life Science (Braunschweig) bezogen.

2.2 Enzyme

Platinum [®] <i>Taq</i> DNA Polymerase	Invitrogen
<i>Taq</i> DNA Polymerase	PeqLab, Erlangen
SAWADY “Mid Range PCR”-System	PeqLab, Erlangen
PWO-Polymerase	PeqLab, Erlangen
Long Range PCR-System	MBI-Fermentas, St. Leon-Rot
Restriktionsenzyme	MBI-Fermentas, St. Leon-Rot; New England Biolabs, Frankfurt Roche Diagnostics, Mannheim
T4-DNA-Ligase	New England Biolabs, Frankfurt
Proteinase K	Roche Diagnostics, Mannheim
Alkalische Phosphatase (Garnele)	Roche Diagnostics, Mannheim
DNase-freie RNase	Roche Diagnostics, Mannheim
AMV-Reverse Transkriptase	Stratagene, Heidelberg

2.3 Antikörper

Jun B (N-17): sc-46	Santa Cruz Biotechnology, Heidelberg
Jun B (C-11): sc-8051	Santa Cruz Biotechnology, Heidelberg
Fra-1 (N-17): sc-183	Santa Cruz Biotechnology, Heidelberg
c-Jun (D): sc-44	Santa Cruz Biotechnology, Heidelberg
c-Fos (4): sc-52	Santa Cruz Biotechnology, Heidelberg
Jun D (329): sc-74	Santa Cruz Biotechnology, Heidelberg
C/EBPbeta (C-19): sc-150	Santa Cruz Biotechnology, Heidelberg
Sp1 (PEP 2): sc-59	Santa Cruz Biotechnology, Heidelberg

Sp2 (K-20): sc-643	Santa Cruz Biotechnology, Heidelberg
Sp3 (D-20): sc-644	Santa Cruz Biotechnology, Heidelberg

2.4 Gebrauchsfertige Reaktionssysteme:

Qiagen Plasmid Midi Kit	Qiagen, Hilden
Quiagen Plasmid Maxi Kit	Qiagen, Hilden
Quiagen Gel Extraction Kit	Qiagen, Hilden
Qiagen Nukleotide Removal Kit	Qiagen, Hilden
Rediprime II Random Prime Labelling System	Amersham Life Science, Braunschweig
Bio-Rad Protein Assay	Bio-Rad, Heidelberg

2.5 Antibiotika

Ampicillin	Serva, Heidelberg
Penicillin	Serva, Heidelberg
Streptomycin	Serva, Heidelberg
Kanamycin	Serva, Heidelberg

2.6 Nukleinsäuren

2.6.1 Oligo-Desoxyribonukleotide

Alle Oligo-Desoxyribonukleotide wurden von Operon GmbH (Köln) bezogen.

2.6.1.1 Primer zur Generierung von C4.4A-k.o.-Konstrukten

Tabelle 1: Primer zur Generierung der 5'- und 3'-Homologiearme

Primersequenz	Interner-Primer-Name	Primerposition im MmC4.4A-Lokus; Konstruktnamen
5'-ATATATC <u>ACGTGG</u> ATAGAAGCCAGGCTTCATCC-3' 5'-ATATATC <u>ACGTG</u> ATCCATAGCTGTGTCCTGCTCTCTCC-3'	5' koPmlI.for 5' koPmlI.rev	-2200 bis +1 5' Homologiearm-ko-LacZ
5'-GAAGGCCAGT <u>CGACCG</u> TTGTTAAGAGCGTAGATC-3' 5'-ACCTTGGG <u>TCGACG</u> ACAGGATTGGAGTGGGGCT-5'	3' koSalI.for 3' koSalI.rev	+5015 bis +13771 3' Homologiearm-ko-LacZ
5'-ATATATATAT <u>GCGGCCG</u> CAGGGACTCCACTGTTGACCCCTA-3' 5'-ATATATA <u>CTAGTTG</u> CACGCAGCTGTAGCACTCCAG-3'	5' koNotI.for 5' koSpeI.rev	-945 bis +569 5' Homologiearm-ko-DTA

Tabelle 2: Primer zur Überprüfung der homologen Rekombination des 3' Homologiearmes

Primersequenz	Interner-Primer-Name	Primerposition
5'-TGGAGAGGCTATTCGGCTATGACT-3'	ESScreenNmStart.for	Anfang des Neomycingens
5'-GTGATATTGCTGAAGAGCTTGCGGGC-3'	ESScreenNmEnde.for	Ende des Neomycingens
5'-GAATATCTCTTAATAAACTCTAGACACATACAGG-3'	ESScreen.rev	Stromaufwärts des 3' Homologiearms +13845

2.6.1.2 Primer zur Identifizierung der 5' flankierenden C4.4A-Sequenz der Ratte

Tabelle 3: Primer zum Gegenteilstesten der PAC-Klone, die den RnC4.4A-Lokus repräsentierten

Primersequenz	Interner-Primer-Name	Primerposition im RnC4.4A-Lokus
5'-TCAGGTAAGAGGGCCCGGG-3' 5'-CACACAGCAGTAGCGGTAGC-3'	5'RnC4.4A.for 5'RnC4.4A.rev	-68 bis +68
5'-AGTCATACTTCTTCAACCCATG-3' 5'-GGCAAGACCCTGTCGTGGAG-3'	3'RnC4.4A.for 3'RnC4.4A.rev	+844 bis +1494

2.6.1.3 Primer zur Herstellung der C4.4A-Promotorkonstrukte

Tabelle 4: Primer zur Generierung von 5'- bzw. 3'-Deletionsmutanten

Primersequenz	Interner-Primer-Name	Position der 5'- flankierenden RnC4.4A-Sequenz
5'-ATATATACTCTAGAATTTTAAGCAGGAGCCA-3' 5'-AGCTCCTCGAGCTGTGTCCTGCTCTCTCCAG-3'	RnC4.4-1975/XbaI/for RnC4.4-1/XhoI/rev	-1985 bis -1
5'-ATATATAGATCTGACTGGGAGCTCTGCGAAG-3' 5'-AGCTCCTCGAGCTGTGTCCTGCTCTCTCCAG-3'	RnC4.4C4.4 -421/BglII/for RnC4.4XhoI/-1/rev	-421 bis -1
5'-ATATATAGATCTCAAAGGCACAGGGCAGGG-3' 5'-AGCTCCTCGAGCTGTGTCCTGCTCTCTCCAG-3'	RnC4.4-200/BglII/for RnC4.4-1/XhoI/rev	-200 bis -1
5'-ATATATAGATCTCGGGCCCGCCCCACAG-3' 5'-AGCTCCTCGAGCTGTGTCCTGCTCTCTCCAG-3'	RnC4.4-150/BglII/for RnC4.4-1/XhoI/rev	-150 bis -1
5'-ATATATAGATCTCGGACGCTGAGTTGGCC-3' 5'-AGCTCCTCGAGCTGTGTCCTGCTCTCTCCAG-3'	RnC4.4-134/BglII/for RnC4.4-1/XhoI/rev	-134 bis -1
5'-ATATATAGATCTTTGCCCGGGGTAGTTAC-3' 5'-AGCTCCTCGAGCTGTGTCCTGCTCTCTCCAG-3'	RnC4.4-98/BglII/for RnC4.4-1/XhoI/rev	-98 bis -1
5'-TATATAGATCTATCTAAGGCTCAGGTAAGAGG-3' 5'-AGCTCCTCGAGCTGTGTCCTGCTCTCTCCAG-3'	RnC4.4-79/BglII/for RnC4.4-1/XhoI/rev	-79 bis -1
5'-ATATATAGATCTCAAAGGCACAGGGCAGGG-3' 5'-TATATATCTAGACAAAGGCACAGGGCAGGG-3'	RnC4.4-79/XhoI/rev RnC4.4-200/BglII/for	-200 bis -78
5'-ATATATAGATCTCAAAGGCACAGGGCAGGG-3' 5'-TATATACTCGAGCGGGCCCTTACCTGAG-3'	RnC4.4-200/BglII/for RnC4.4-47/XhoI/rev	-200 bis -47
5'-ATATATAGATCTCAAAGGCACAGGGCAGGG-3' 5'-TATATAGGATCCCGGGCCCTTACCTGAG-3'	RnC4.4-200/BglII/for RnC4.4-47/BamHI/rev	-200 bis -47

Tabelle 5: Primer zur Generierung von Punktmutationen

Primer	Interner-Primernamen	Position; DNA-Element
5'-GGGTAGGTTAATAATATAAGGCTCAG-3' 5'-TGGGATATATCAACGGTGGT-3' 5'-CCCAGTCACGACGTTGTAA-3' 5'-CTGAGCCTTATATTATTAACCTACCC-3'	-74/MutTRE/for 3pBLCATseqrev 5pBLCATseqfor -74/MutTRE/rev	Sequenz: -200 bis -1 Punktmutation: -74, -78, -80; TRE
5'-AGGTAAGAGGAAAAGGGTTGGAAG-3' 5'-TGGGATATATCAACGGTGGT-3' 5'-CCCAGTCACGACGTTGTAA-3' 5'-CTTCCAACCCTTTTCTTACCT-3'	-50/MutGC/for 3pBLCATseqrev 5pBLCATseqfor -50/MutGC/rev	Sequenz: -200 bis -1 Punktmutation: -53,-54,-55,-56; GC-Box
5'-GGTGGCACACAAAAAGGGACTCGGA-3' 5'-TGGGATATATCAACGGTGGT-3' 5'-CCCAGTCACGACGTTGTAA-3' 5'-TCCGAGTCCCTTTTTTGTGTGCCACC-3'	-25/MutGC/for 3pBLCATseqrev 5pBLCATseqfor -25/MutGC/rev	Sequenz: -200 bis -1 Punktmutation: -28, -29, -30, -32, -33; GC-Box
5'-GGGTAGGTTAATAATATAAGGCTCAGGTAAGAG GAAAAGGGTTGGAAG-3' 5'-TGGGATATATCAACGGTGGT-3' 5'-CCCAGTCACGACGTTGTAA-3' 5'-CTTCCAACCCTTTTCTTACCTGAGCCTTATAT TATTAACCTACCC-3'	-74/-50/TRE/GC/for 3pBLCATseqrev 5pBLCATseqfor -74/-50/TRE/GC/rev	Sequenz: -200 bis -1 Punktmutation: -74, -78, -80; Punktmutation: -53,-54,-55,-56; TRE und GC-Box

Tabelle 6: Primer zur Generierung von Deletionsmutanten

Primer	Interner-Primernamen	Position
5'-CGCTGAGTTTAGGTTAATCATCTAAGGCT-3' 5'-TGGGATATATCAACGGTGGT-3' 5'-CCCAGTCACGACGTTGTAA-3' 5'-ATTAACCTAAACTCAGCGTCCGCTGTGGG-3'	-139/Del/for 3pBLCATseqrev 5pBLCATseqfor -139/Del/rev	Sequenz: -200 bis -1 Deletion: -121 bis -88
5'-GCACCTAGAACAGCGGACGCTGAGTT-3' 5'-TGGGATATATCAACGGTGGT-3' 5'-CCCAGTCACGACGTTGTAA-3' 5'-CAGGCGACATCTAGGTGCGTCACCCACAG-3'	-88/Del/for 3pBLCATseqrev 5pBLCATseqfor -139/Del/rev	Sequenz: -200 bis -1 Deletion: -153 bis -139

2.6.1.4 Im EMSA eingesetzte Oligonukleotidsequenzen

Tabelle 8: Synthetisierte Oligonukleotide die im EMSA Verwendung fanden

Oligonukleotidsequenz	Ziel-DNA Sequenz	Aktivatoren-Familie	C4.4A-Sequenz Position	DNA-Molekül-Bezeichnung
5'-GTAGGTTACTCATCTAAGGCTCAGGTAA-3' 5'-TTACCTGAGCCTTAGATGAGTAACCTAC-3'	CCAAT TRE	C/EBP AP-1	-88 bis -60	C4.4A- CCAAT/TRE
5'-GTAGGTTAATAATATAAGGCTCAGGTAA-3' 5'-TTACCTGAGCCTTATATTATTAACCTAC-3'	CCAAT MutTRE	C/EBP AP-1	-88 bis -60	C4.4A- CCAAT/ MutTRE
5'-CAAGGCCAGGGTTGCCCGGGGTAGGTTA-3' 5'-TAACCTACCCCGGGGCAACCCTGGCCTTG-3'	GC-Box	Sp PLAG	-80 bis -108	C4.4A GC-Box
5'-AGTAGTAGTCGGGGCGGGGCGAGTAGT-3' 5'-ACTACTCGCCCCGCCCGACTACTACT-3'	GC-Box	Sp		GC-Box-Sp- Konsensus
5'-ATGATGGAGATTGCGCAATTCGAGAA-3' 5'-TTCTCGAATTGCGCAATCTCCATCAT-3'	C/CAAT	C/EBP		C/EBP- Konsensus
5'-ATGATGACGGGGGCCCTTTAGTAGTA-3' 5'-TACTACTAAAGGGGCCCGTCATCAT-3'	GC-Box	PLAG		GC-Box- PLAG- Konsensus

2.7 Bezugsquellen „P1-derived artificial chromosomes“ PAC's

Zur Verwendung kamen Bibliotheken, die am Roswell Park Cancer Institute hergestellt wurden. Die genomischen DNA-Fragmente der Bibliotheken sind im Vektor pPAC4 kloniert und in den *E. coli*

Stamm DH10B transformiert worden. Die Bibliothek der Ratte (712-RPCI31RPAC) wurde aus dem Gehirn einer weiblichen Ratte (Stamm: BN/ssNHsd) generiert und bestand aus ~235776 PAC-Klonen, die auf 17 „high density“-Filter geblottet waren (Woon et al., 1998). Die verwendete Maus-PAC-Klone wurden aus der Leber einer weiblichen Maus (Stamm: C57BL/6J) generiert (Osoegawa et al., 1998) und stammte aus der Bibliothek 711-RPCI21MPAC. Alle PAC's, wie auch die Bibliothek der Ratte, wurden vom Deutsches Ressourcenzentrum für Genomforschung (Berlin) bezogen.

2.8 Plasmide

pBLCAT3 und pBLCAT2: Die Plasmide wurden freundlicherweise von der Abteilung Günther Schütz (Deutsches Krebsforschungszentrum, Heidelberg) zur Verfügung gestellt. Die Plasmid-Details sind der Veröffentlichung von Luckow und Schütz beschrieben (Luckow and Schutz, 1987).

pHM2: Das Plasmid wurde ebenfalls freundlicherweise von der Abteilung Günther Schütz zur Verfügung gestellt. Die Konstruktbeschreibung ist in einer Veröffentlichung ausführlich dargestellt (Kaestner et al., 1994).

pBS-pgk-Nm^R-Plasmid: Das Plasmid wurde freundlicherweise von der Abteilung Gröhne (Deutsches Krebsforschungszentrum, Heidelberg) zur Verfügung gestellt. Basierend auf dem pBluescript II SK⁺-Plasmid (Stratagene) enthält das Konstrukt ein *Neomycin-Phosphotransferasegen* (Nm^R), das unter der Kontrolle eines *Phosphoglyceratkinase (pgk)-Promotors* steht und dem sich ein Transkriptionsterminationssignal in Form eines *SV40-Polyadenylierungssignals* anschließt. Das *Neomycin-Resistenzgen* erlaubte die Selektion von transformierten eukaryontischen Zellen. Darüberhinaus stellte der „f1 filamentous phage origin of replication“ und ein *Ampicillin-Resistenzgen* die Vervielfältigung des Plasmids in *E. coli* sicher.

pBS-DTA-Plasmid: Das Plasmid wurde von Tim Wintermantel (Abteilung Schütz, Deutsches Krebsforschungszentrum) konstruiert und freundlicherweise zur Verfügung gestellt. Die MCI-DTA-Kassette beinhaltet das *Diphtheriatoxigen A*, das unter der Kontrolle eines „polyoma enhancer/herpes simplex virus thymidin kinase“ (MC1)-Promotors steht und dem sich ein *SV-40 Polyadenylierungssignal* anschließt. Die Kassette wurde über die Restriktionsenzyme BamHI und PstI in den pBluescript II KS⁺-Plasmid (Stratagene) kloniert.

pcDNA3.1/CAT (Invitrogen, San Diego): Eukaryontischer Expressionsvektor (6,2kb) mit einem *Chloramphenicol-Transferasegen* (CAT), das unter der Kontrolle eines CMV-Promotors steht und die Expression des CAT-Gens in eukaryontischen Zellen ermöglicht.

pEGFP-C1-Plasmid (Clontech, Palo Alto): Der Vektor codiert eine Variante von *Aequorea victoria* „green fluorescent protein“ (GFP) das unter Kontrolle eines CMV-Promotors steht und die Expression von GFP in mammalischen Zellen ermöglicht.

pUC-C/EBPβ-Expressionsplasmid: Der Expressionsvektor kodiert das humane „CAAT/enhancer binding protein beta“ (C/EBPbeta) und ermöglicht die Expression von C/EBPbeta in eukaryontischen Zellen. Die Herstellung des Konstrukts ist in einer Veröffentlichung beschrieben (Akira et al., 1990). Das Konstrukt wurde freundlicherweise von der Abteilung Kramer (Deutsches Krebsforschungszentrum, Heidelberg) zur Verfügung gestellt.

pcDNA1-Sp2 und pcDNA1-Sp3: Die Expressionsplasmide kodieren das humane „specificity protein“ (Sp) 2 bzw. 3 und wurde freundlicherweise von Astar Winoto (Dept. Of Molecular and Cell Biology, Berkeley, USA) zur Verfügung gestellt. Die Herstellung der Konstrukte ist in der Veröffentlichung von Kingsley und Winoto beschrieben. (Kingsley and Winoto, 1992).

pN3-Sp4 und pRC-Sp1: Die Expressionsplasmide kodieren das humane „specificity protein“ (Sp) 4 bzw. 1 und wurde freundlicherweise von Guntram Suske (Institut für Molekularbiologie und

Tumorforschung Philipps-Universität, Marburg) zur Verfügung gestellt. Die Details Plasmide sind publiziert. (Hagen et al., 1994; Hagen et al., 1995).

pRC-JunD, pRC-JunB und pRC-c-Jun: Diese Expressionsplasmide wurden freundlicherweise von Jochen Hess (Abteilung Signaltransduktion & Wachstumskontrolle, Deutsches Krebsforschungszentrum, Heidelberg) zur Verfügung gestellt.

2.9 Zellkulturmaterialien

Zellkulturschalen	Greiner, Nürtingen
Fötales Kälberserum (FKS)	Sigma-Aldrich, Deisenhofen
RPMI	Gibco, Eggenstein
DMEM	Gibco, Eggenstein
L-Glutamin	Gibco, Eggenstein
LIF „ESGRO“	Gibco, Eggenstein

2.10 Eukaryotische Zellen

BSp73AS und BSp73ASML (Matzku et al., 1983)

Adhärenz wachsende Rattenzelllinien, isoliert aus dem Aszites eines spontanen Pankreasadenokarzinoms eines BDX-Ratten-Hintergrund. Die AS-Linie („ascites variant adapted to solid growth“) wurde adaptiert über die Bildung solider Tumoren. Die ASML-Linie („ascites variant adapted to solid growth metastasizing via the lymphatics“) wurde über die Isolation von Lungenmetastasen gewonnen. Beide Zelllinien wurden in RPMI-1640 kultiviert.

Progressor (PROb) (Reisser et al., 1993)

Adhärenz wachsende Kolonkarzinomlinie aus BDX-Rattenstamm, die über das lymphatische System metastasiert. Die Zelllinie wurde in RPMI-1640 Medium kultiviert.

Maus-embryonale Fibroblasten

Zur Herstellung Maus-embryonaler Fibroblasten wurde zunächst ein Embryo am Tag 13 nach der Befruchtung aus dem Mutterleib einer G418-resistenten, Neomycin-transgenen Maus entnommen. Aus diesem Embryo wurden dann die embryonalen Fibroblasten gewonnen. Die Maus-embryonalen Fibroblasten wurden vom Zentralen Transgen-Service (Deutsches Krebsforschungszentrum, Heidelberg) zur Verfügung gestellt.

Maus-embryonale Stammzellen (Blendy et al., 1996)

Die Maus-embryonalen Stammzellen mit der Bezeichnung E14-1 stammten aus dem Mausstamm 129/OlaHsd. Die Zellen wurden vom Zentralen Transgen-Service (Deutsches Krebsforschungszentrum, Heidelberg) zur Verfügung gestellt.

2.11 Bakterienstämme

E. coli/DH5a

Genotyp: F⁻; *endA1*; *hsdR17* (*rk⁻*, *mk⁺*), *supE44*; *thi-1*; λ , *recA1*; *gyrA96*; *relA1*

E. coli/DH10

Genotyp: *tonA*, *endA1*, *recA1*, *hsdR*, *LacZΔM15*, *mcrA*, *mcrBC*, *hsdRMS*

2.12 Computerserver (Datenbanken)

2.12.1 Promotoranalyseprogramm

Alibaba2.1:

http://darwin.nmsu.edu/~molb470/fall2003/Projects/solorz/aliBaba_2_1.htm

2.12.2 Sequenzanalyseprogrampaket

Heidelberg Unix Sequence Analysis Resources (HUSAR) Genetics Computer Group, Heidelberg
<http://genome.dkfz-heidelberg.de>

2.13 Laborgeräte

Elektroporator Easyject T-Plus	EquiBio, Needham Heights (USA)
Elisa Reader Multiscan Ascent	Thermo Labsystems, Helsinki (Finnland)
Phosphorimager Fuji Film BAS-1800II	Fuji Photo Film, Düsseldorf
Fuji Film Imaging Plate BAS-MS 2325	Fuji Photo Film, Düsseldorf
PCR-Heizblock System 2400	Perkin-Elmer, Weiterstadt
Tischzentrifuge Biofuge fresco	Heraeus, Osterode
Zentrifuge RC5B Plus	Sorvall, Langenselbold

2.14 Isolation rekombinanter DNA

2.14.1 Herstellung kompetender *Escherichia coli* (*E. coli*)

LB-Medium:	0,5%	Hefeextrakt
	1%	Trypton
	0,5%	NaCl
<i>E. coli</i> –Stamm DH5α und DH10B in Glycerinkultur (zur Langzeitlagerung bei –80°C) 37°C Schüttelinkubator		
Agarplatte:	1 %	Tryton
	1 %	Hefeextrakt
	1 %	NaCl
	1,5 %	Agar

Für die Herstellung von kompetenten Bakterien wurden ausschließlich autoklavierte Gegenstände und Lösungen verwendet. Diese wurden auf 4°C vorgekühlt und die einzelnen Arbeitsschritte im Kühlraum durchgeführt.

Zur Herstellung kompetenter Zellen eines Labor-geeigneten *E. coli*-Stamms wurde zunächst eine Probe einer Glycerinkultur mit der Impfoese auf einer Agarplatte vereinzelt. Nach der Übernacht-Inkubation bei 37°C erfolgte das Animpfen einer einzelnen Kolonie in 5ml LB-Medium mit anschließender 12stündiger Kultivierung bei 37°C in einem Schüttelinkubator. 4ml der Bakteriensuspension genügte, um nach 3-4h in 400ml LB-Medium eine Bakteriendichte zu erzielen, die bei einer Wellenlänge von 600 nm einer optischen Dichte von 0,5 entspricht. Anschließend erfolgte das Abkühlen der Suspension für 30 Minuten auf Eis. Im nächsten Schritt erfolgte das Pelletieren der Suspension bei 4°C und 4000 x g für 15 Minuten in einer Kühlzentrifuge. Das Pellet wurde mit einer Pipette in 400ml gekühlten H₂O mit einer Pipette resuspendiert und erneut die Suspension zentrifugiert. Dieser Vorgang wurde mit 200ml H₂O wiederholt. Anschließend erfolgte die Resuspendierung in 10ml 10% Glycerol und einem erneuten Zentrifugationsschritt. Das Bakterienpellet wurde in 2ml 10% Glycerol resuspendiert, die Suspension zu je 40µl in Eppendorfgefäße aliquotiert und in flüssigen Stickstoff eingefroren. Die kompetenten Bakterien konnten mehrere Monate bei –80°C ohne signifikanten Verlust der Transformationskapazität werden.

2.14.2 Plasmid-Transformation kompetenter *E. coli*

Elektrokompetente *E. coli* vom Stamm DH5α oder DH10B
Membranfilter (Millipore, 0,025µm VSWP04700)
Elektroporations-Küvette (1mm)
Elektroporator

SOC-Medium:

2 %	Trypton
1 %	Hefeextrakt
1 %	NaCl
20 mM	Glukose

Mit Antibiotika versetzte Agarplatte:

(Der flüssige Agar wurde vor der Zugabe der notwendigen Menge Antibiotikum auf 50°C abgekühlt.)

1 %	Trypton
1 %	Hefeextrakt
1 %	NaCl
1,5 %	Agar

Der Vermehrung rekombinanter DNA-Plasmide im *E. coli*-Stamm DH5α und DH10B ging die Transformation der Plasmide in den jeweiligen Bakterienstamm voraus.

Die Aufnahme von Plasmid-DNA in Bakterienzellen erfolgt durch Elektroporation mittels Elektroporator. Ein eventueller Überschuss an gelösten Salzen muss vor der Transformation aus der DNA-Lösung entfernt werden, da dieser zu einem unerwünschten Stromfluss in der Küvette führen könnte. Hierzu wurde ein Membranfilter mit einer Porengröße von 0,025µm vorsichtig auf eine ddH₂O Oberfläche platziert, anschließend wurden 4µl DNA-Lösung (40-50ng DNA) auf die Oberfläche des Membranfilters überführt und für 15 Minuten dialysiert. Daraufhin wurden 4µl der entsalzten, dialysierten DNA-Lösung in 40µl einer Suspension kompetente Bakterien überführt. Zur Transformation war es notwendig, das Gemisch in eine auf Eis vorgekühlte Küvette zu überführen. Die Transformation erfolgte mit einem Elektroporator unter folgender Bedingungen: 2,5kV, 25µF und einer Zeitkonstante von ~ 2,5ms. Nach der Transformation wurde die Bakteriensuspension in 1ml SOC-Medium aufgenommen, in ein Eppendorfgefäß überführt und für 1h bei 37°C inkubiert. Nach der Regenerationszeit erfolgte das Pelletieren der transformierten Zell-Suspension bei 13000xg für 20s. In ~100µl Restüberstand wurde das Bakterienpellet resuspendiert und auf eine Agarplatte ausplattiert. Die transformierten Bakterienzellen bildeten bei 37°C über Nacht Kolonien. Mit einer Kolonie wurden 5ml Antibiotika-versetztes LB-Medium angeimpft und über Nacht im Schüttelinkubator bei 37°C inkubiert.

2.15 Plasmid-Präparationen aus *E. coli*

2.15.1 Plasmid-Maxi-Präparation

DNA-Plasmid-transformierte Bakteriensuspension
Qiagen Plasmid Maxi Kit
Faltenfilter
Gaze

200ml einer über Nacht kultivierte Bakteriensuspension wurden nach den Herstellerangaben für den „Qiagen Plasmid Maxi Kit“ lysiert. Anschließend wurde das Lysat bei 4°C und 20000xg für 30Minuten zentrifugiert. Der von grobem Zelldebris geklärten Überstand wurde dann über eine Lage Gaze und einen Faltenfilter direkt auf die „Qiagen-Tip 500“-Säule filtriert. Im weiteren Verlauf wurde den Herstellerempfehlungen folgegeleistet.

2.15.2 Präparation von rekombinanter pPAC4-Plasmid-DNA

Qiagen Plasmid Maxi Kit
100 mM IPTG (sterilfiltriert)

Faltenfilter
Gaze

Die Präparation von rekombinanter-pPAC4-DNA aus *E. coli* DH10B erfolgte mit dem „Qiagen Plasmid Maxi Kit“. Vor der DNA-Isolation wurden zunächst 5ml LB-Medium inklusive Kanamycin (20µg/ml) mit einem PAC-Klon angeimpft und für 12 Stunden bei 37°C im Schüttelinkubator inkubiert. Eine Kultur von 400ml (LB-Medium mit Kanamycin, 20µg/ml) wurde mit 1ml Übernachtskultur angeimpft. Nach 12 Stunden Inkubation bei 37°C im Schüttelinkubator wurde diese Kultur mit 4 ml einer 100mM IPTG-Lösung induziert und die Inkubation für mindestens drei weitere Stunden fortgesetzt.

Die Ernte der Bakterien erfolgte durch Zentrifugation bei 6000xg/4°C für 15 Minuten. Nach dem Abgießen des Überstands wurde das Pellet in 20ml P1-Buffer resuspendiert. Anschließend wurden 20ml P2-Puffer zugegeben, die Bakteriensuspension kurz geschwenkt und die Lyse für 5Minuten bei Raumtemperatur vollzogen. Daraufhin wurden 20ml eiskalten P3-Buffer hinzugegeben, kurz geschwenkt und das Lysat für 20 Minuten auf Eis stehen gelassen. Zur Abtrennung unlöslicher Zellbestandteile wurde das Lysat für 30Minuten bei 20000xg/4°C zentrifugiert und der Überstand durch einen Gaze-ausgekleideten Faltenfilter gegeben, der vorher mit destilliertem H₂O angefeuchtet wurde. Das Eluat wurde mit 0,7 Volumenanteilen Isopropanol versetzt und bei 20000xg/4°C für 30 Minuten zentrifugiert. Der Überstand wurde abgegossen und das Präzipitat in 1ml TE gelöst, nachdem es für 5 Minuten im Chemikalien-Abzug getrocknet wurde. Das gelöste Präzipitat wurde mit 6ml QBT-Buffer versetzt auf eine equilibrierte „Qiagen-Tip 500-Säule“ gegeben. Alle weiteren Schritte folgten den Anweisungen des „Qiagen Plasmid Maxi Kid“-Protokolls bis auf die Elution der DNA von der Säule, die mit auf 65°C vorgewärmtem QF-Buffer durchgeführt wurde. Erneut wurde in 0,7 Volumenanteilen Isopropanol gefällt und zentrifugiert (20000xg, 30min, 4°C). Ein Waschschrift in 70% igen Ethanol und eine wiederholte Zentrifugation schlossen sich an. Die aufgereinigte und präzipitierte DNA wurde schließlich in 200µl 10mM Tris/Cl (pH 8,5) gelöst und anschließend zur Konzentrationsbestimmung photometrisch vermessen. Um genügend DNA zu erhalten, wurden bis zu drei Kulturen parallel angeimpft und über eine Säule aufgereinigt. Bis zu 150µg rekombinanter pPAC4-DNA konnten nach diesem Protokoll isoliert werden.

2.16 Verdau von Plasmid-DNA durch Restriktionsendonukleasen

6x Probenpuffer: 50% Glycerol
50mM EDTA
0,05% Bromphenol Blau

TAE (Tris/Acetat/EDTA) Elektrophorese-Puffer: 50x Stammlösung:
242g Tris-Base
57,1ml Eisessig
37,2g Na₂EDTA 2H₂O
1x Arbeitslösung, pH~8,5:
40mM Tris-Azetat
2mM Na₂EDTA 2H₂O

Generell wurde der Verdau von DNA durch Restriktionsenzyme mit vom Hersteller empfohlenen Pufferlösungen und Temperaturen durchgeführt. Die Restriktion von DNA zu Analysezwecken wurde in einem Volumen von 25µl durchgeführt. Dabei wurden 200ng DNA, 2,5µl 10x Reaktionsbuffer und 10Units Restriktionsenzym eingesetzt. Die Reaktion wurde für 1h bei der vom Hersteller empfohlenen Temperatur inkubiert. Zur elektrophoretischen Auftrennung der zu analysierenden DNA-Fragmente fanden, abhängig von der molekularen Masse der Fragmente, 0,8 bis 1,5%ige Agarosegele Verwendung. Sowohl für die Herstellung der Gele als auch für die Gelelektrophorese wurde autoklavierter TAE-Puffer verwendet. Nach der Gelelektrophorese und der Färbung mit Ethidiumbromid konnte die DNA unter UV-Licht analysiert und gegebenenfalls dokumentiert werden.

2.17 DNA-Modifikationen

2.17.1 Präparative Extraktion von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen

QIAquick Gel Extraction Kit
Langwellige UV-Lichtquelle

6x Probenpuffer: 50% Glycerol
50 mM EDTA
0,05% Bromphenol Blue

TAE (Tris/Acetat/EDTA) Elektrophorese-Puffer: 50x Stammlösung:
242g Tris Base
57,1ml Eisessig
37,2g Na₂EDTA 2H₂O
1x Arbeitslösung, pH~8,5:
40mM Tris Acetat
2mM Na₂EDTA 2H₂O

Agarosegel

3g Agarose
300ml TAE-Buffer

Die Restriktion von DNA zu präparativen Zwecken wurde in einem Reaktionsvolumen von 50 μ l durchgeführt. Die Enzymreaktion setzte sich zusammen aus 5 μ l 10x Reaktionspuffer; 5 μ g der zu spaltenden DNA und 30Units Restriktionsenzym. Die Reaktion erfolgte innerhalb von 3-12Stunden bei der vom Hersteller empfohlenen Temperatur. Die Enzyme wurden, wenn möglich, Hitze inaktiviert und zur Analyse mit Probenpuffer versetzt. Für ein präparatives Gel wurde eine Geltasche von ~2cm Länge durch Abkleben eines Kammes geschaffen. 25 μ l eines 50 μ l präparativen Restriktionsverdau wurden mit Probenpuffer versetzt, in die Geltasche überführt und bei 80-100Volt elektrophoretisiert (5Volt/cm). Um einen negativen Einfluß von Ethidiumbromid bei der Ligation auszuschließen, erfolgte das Ausschneiden der DNA-Bande zunächst entlang der DNA Laufspur, so dass nur am Rand die aufgetrennte DNA-Bande im ursprünglichen Gel zurückblieb (analytische DNA-Bande). Das Gel wurde mit einer Ethidiumbromid-Lösung (0,5 μ g/ml) angefärbt, anschließend das ausgeschnittene ungefärbte Gelstück wieder in das angefärbte Gel eingefügt und die präparative DNA-Bande, anhand der angefärbten analytischen DNA-Bande, unter langwelligem UV-Licht ausgeschnitten. Die DNA wurde aus der Agarose mit dem „QIAquick Gel Extraction Kit“ von Qiagen nach Herstellerangaben extrahiert.

2.17.2 Dephosphorylierung von 5'-DNA-Enden

Garnelen alkalische Phosphatase
QIAquick PCR Purification Kit

Zur Verhinderung der Religation eines linearisierten Vektors wurde das 5'-Ende des Vektors dephosphoryliert. Nach Ablauf der restriktionsenzymatischen Reaktion wurde zu einem 50 μ l Ansatz 1 μ l (1Unit) alkalische Phosphatase (arktische Garnele) zugegeben und der Ansatz 30Minuten bei 37°C inkubiert. Nach 30Minuten wurde erneut 1 μ l (1 Unit) alkalische Phosphatase zugegeben und die Reaktion für weitere 30Minuten bei 37°C inkubiert. Die Phosphatase wurde anschließend für 25Minuten bei 65°C inaktiviert. Die dephosphorylierte DNA wurde mit dem „QIAquick Gel PCR Purification Kit“ nach Herstellerangaben aus dem Reaktionsansatz extrahiert.

2.17.3 Ligation von DNA-Fragmenten

T4 DNA-Ligase

T4 DNA-Ligase katalysiert das Zusammenfügen von zwei DNA-Strängen zwischen der 5'-Phosphat- und der 3'-Hydroxylgruppe von benachbarten Nukleotiden. Diese Reaktion erfolgte sowohl bei einer vorliegenden Konfiguration von kohäsiver als auch von „blunt“-Enden. Mitentscheidend für eine erfolgreiche Ligation ist das molare Verhältnis zwischen Vektor und zu inserierendem DNA-Fragment. Routinemässig wurden 100ng Vektor im Verhältnis 1:3 zum DNA-Fragment (Insert) eingesetzt. Die eingesetzt DNA-Fragmentmenge wurde wie folgt berechnet:

$$[(100\text{ng Vektor}) \times (\text{kb Größe Insert}) \times 3] / [\text{kb Größe Vektor}] = [\text{ng Insert}]$$

Eine Reaktion setzte sich aus 100ng Vektor-DNA, der ermittelten Menge Insert-DNA, 1µl 10x Ligasepuffer, 1,5Unit T4 DNA Ligase und autoklaviertem ddH₂O zu einem finalen Volumen von 10µl zusammen. Abhängig von der Konfiguration der DNA-Enden wurde die Ligation bei Verwendung kohäsiver Enden für 3h bei Raumtemperatur oder bei „blunt“-Enden für 12h bei 16°C durchgeführt.

2.17.4 *In vitro*-Mutagenese

Midi Range System
PWO-Polymerase
pBLCAT3 und pBLCAT2-Vektor
RnC4.4A sequenzspezifische Primer

Zur Einführung von Punktmutationen in die 5' flankierende *C4.4A*-Sequenz wurde als DNA-Zielsequenz das Konstrukt pBLCAT3-200/-1 in der PCR verwendet (Kapitel 3.3.2). Zur Einführung von Punktmutationen waren vier Primer notwendig. Zwei komplementäre Primer hybridisierten den Matrizenstrang der 5' flankierende *C4.4A*-Sequenz und enthielten mittig die Punktmutationen. Die anderen zwei Primer flankierten die *C4.4A*-Promotorsequenz und hybridisierten in der pBLCAT3-Vektorsequenz. In der ersten PCR wurde die DNA-Sequenz, die sich zwischen dem pBLCAT3-Primer am 5'-Ende und dem Strang der mit der *C4.4A*-Promotorsequenz hybridisierenden Primer amplifiziert. In der zweiten PCR wurde die DNA-Sequenz vervielfältigt, die zwischen *C4.4A*-Promotorsequenz-hybridisierenden Primer und

dem pBLCAT3-Primer am 3'-Ende flankiert wurde. Die PCR-Produkte aus beiden PCR's wurden in der dritten PCR als Matrize eingesetzt. In der dritten PCR hybridisierte der DNA-Strang des ersten PCR-Produkts mit dem DNA-Strang des zweiten PCR-Produkts an der komplementären Stelle überlappenden Primer-Sequenzen. Die punktmutierte Zielsequenz wurde über die die Zielsequenz flankierenden pBLCAT3-Primern amplifiziert. Das PCR-Produkt enthielt die Restriktionsenzymststellen des pBLCAT3-Vektors und wurde über die Restriktionsenzyme BglIII am 5'-Ende und XhoI am 3'-Ende in den pBLCAT3-Vektor kloniert.

Zur Einführung von Deletionen von GC-reichen Sequenzen (GC-Box) wurde als Ziel-DNA das Konstrukt pBLCAT3-200/-1 in der PCR verwendet. Zur Herstellung der GC-Box-Deletionsmutanten wurden ebenfalls vier Primer verwendet. Zwei Primer flankierten sequenzspezifisch die zu deletierende GC-Box auf dem Matrizenstrang der *C4.4A*-Promotorsequenz. Diese Primersequenz wurde so gewählt, dass sie den zu deletierenden Bereich überbrückten. Der spezifischen Primersequenz folgten an dem zu deletierenden Bereich zugewandten Ende weitere 10 Basennukleotide die komplementär zu der jeweils anderen GC-Box flankierenden Primersequenz waren. Die beiden anderen Primer flankierten die *C4.4A*-Promotorsequenz und hybridisierten in der pBLCAT3-Vektor-Sequenz. Zur Generierung der GC-Box-Deletionsmutanten waren drei PCR's notwendig. In der ersten PCR wurde die DNA-Sequenz amplifiziert, die sich zwischen dem pBLCAT3-Primer am 5'-Ende und dem die Deletion flankierenden Primer befand. In der zweiten PCR wurde die DNA-Sequenz amplifiziert, die sich zwischen dem die Deletion flankierenden Primer und dem pBLCAT3-Primer am 3'-Ende befand. Die PCR-Produkte aus beiden PCR's wurden in der dritten PCR als Matrize eingesetzt. In der dritten PCR hybridisierte der DNA-Strang der ersten PCR mit dem DNA-Strang der zweiten PCR über die jeweils komplementären 5'-Enden der Deletion flankierenden Primer. Die GC-Box-deletierte Zielsequenz wurde über die *C4.4A*-Promotoresequenz-flankierenden pBLCAT3-Primer amplifiziert. Das PCR-Produkt enthielt die Restriktionsenzymststellen des pBLCAT3-Vektors und wurde über die Restriktionsenzyme BglIII am 5'-Ende und XhoI am 3'-Ende des PCR-Produkts in den pBLCAT3-Vektor kloniert.

2.18 Radioaktive Markierung von DNA-Fragmenten

2.18.1 Radioaktive Markierung von DNA-Strängen durch „random priming“

Rediprime II Random Prime Labelling System (Amersham)
[α -³²P]dCTP ~3000Ci/mM, 10mCi/ml
DNA-Fragment
QIAquick Nucleotide Removal Kit

Zur Hybridisierung eines Polynukleotids mit einer komplementären DNA durch die Southern-Methode musste die eingesetzte Sonden-DNA zuvor radioaktiv markiert werden. Hierfür wurden ca. 100ng DNA-Fragment in 45 μ l TE-Puffer gelöst und für 5 Minuten bei 95°C denaturiert. Zur Vermeidung einer Renaturierung des DNA-Doppelstranges wurde die Probe für 5 Minuten auf Eis inkubiert. Die denaturierte DNA wurde zum „Rediprime II Random Prime“-Reaktionsansatz gegeben, der durch Zugabe von 5 μ l [α -³²P]dCTP (0,05 mCi) komplettiert wurde. Der Einbau des [α -³²P]dCTP in den DNA-Strang erfolgte innerhalb 1 Stunde bei 37°C. Ausgehend von zufällig hybridisierten Hexanukleotid-Primern (pd(N)₆) synthetisiert die Klenow-Polymerase den komplementären Strang der DNA-Matrize. Das markierte DNA-Fragment wurde Herstellerangaben folgend von den nicht eingebauten radioaktiven Nuklotiden über den „QIAquick Nucleotide Removal Kit“ von Qiagen getrennt.

2.18.2 „Endlabeling“ von Oligonukleotid-Sonden

Hybridisiertes Oligonukleotid
T4-Polynukleotidkinase
[γ -³²P]dATP ~3000Ci/mM, 10mCi/ml
QIAquick Nucleotide Removal Kit

Für die T4-Polynukleotidkinasereaktion wurden 40pM Oligonukleotid (1 μ l) in 42 μ l ddH₂O aufgenommen. Die weiteren Komponenten der Reaktion bestanden aus 5 μ l 10x Puffer, 4 μ l [γ -³²P]dATP (0,04 mCi) und 3 μ l T4-Polynukleotidkinase (30 Units). Die Reaktion verlief bei 37°C für 30 Minuten. Anschließend erfolgte die Aufreinigung der [γ -³²P]dATP markierten DNA über den „QIAquick Nucleotide Removal Kit“ nach dem Protokoll des Herstellers. Der Einbau des [γ -³²P]dATP am 5'-Ende des DNA-Fragments wurde im Szintillationszähler (Beta-Couter) bestimmt. 2 μ l der Probe wurde in ein Gefäß mit Szintillationsflüssigkeit überführt. Der Szintillationszähler vermaß das Gefäß eine Minute lang und errechnete aus der

in Zeitabhängigen detektierten Lichtemission die Dosis, die das markierte DNA-Fragment inkorporierte [γ - ^{32}P]dATP erzeugte. Das Gerät gibt schließlich das Ergebnis in Form von „Counts per Minute“ (CPM) an den angeschlossenen Drucker weiter.

2.19 Präparation zellulärer Nukleinsäuren

2.19.1 Präparation von genomischer DNA aus Maus-embryonalen Stammzellen (ES-Zellen)

Lysisbuffer: 100mM Tris/HCl, pH 8,5
5mM EDTA
0,2% SDS
200mM NaCl
100 $\mu\text{g/ml}$ Proteinase K

Unter G-418 selektionierte ES-Zell-Klone wurden in Gelatine-behandelte 24well Platten kultiviert. Bei Erreichen von 80-100% konfluenten Wachstums wurde ein ES-Zell-Klon, nach Medientnahme und einmaligen waschen mit PBS, in 500 μl Lysispuffer für 12h bei 37°C im Brutschrank lysiert. Anschließend wurde das ES-Zell-Lysat aus der 24well Platte in ein Eppendorfgefäß überführt und die genomische DNA isoliert. Hierfür wurde das Lysat mit 200 μl 6M NaCl versetzt und intensiv per Hand geschüttelt. Unerwünschte Zelltrümmer wurden über eine Zentrifugation bei 13000xg für 5Minuten abgetrennt und der Überstand mit 400 μl Isopropanol versetzt. Anschließend wurde die genomische DNA über Zentrifugation bei 13000xg für 10Minuten gefällt und das Pellet zweimal mit 70% EtOH gewaschen. Nach Abnahme des Ethanols wurde das Pellet für 2-3Minuten getrocknet und in 200 μl TE (10mM Tris/1mM EDTA) gelöst. Die genomische DNA wurde bei 4°C gelagert.

2.19.2 Präparation von genomischer DNA aus Ratten-Tumorzellen

Ratten Tumorzellen (BSpASML, BSpAS, PROb)

Lyselösung: 0,2% SDS
40mM Tris/HCl (pH 8,0)
40mM EDTA (pH 8,0)

Proteinase K: 20mg/ml
Phenol (TE-equilibriert)
Phenol-Chloroform-Isoamylalkohol (25 : 24 : 1)

Zur Isolierung von genomischer DNA wurden 5×10^7 Zellen eingesetzt. Die Zellen wurden bei 500xg für 5 Minuten bei Raumtemperatur pelletiert und einmal in 5 ml PBS gewaschen. Nachdem das Pellet in 10ml Lyselösung resuspendiert wurde erfolgte die Zugabe von Proteinase K (200 μ g/ml). Die Lyse vollzog sich innerhalb einer zweistündigen Inkubation bei 56°C. Zur Abtrennung des Proteinanteils wurde die Probe einmal mit TE-aquiliertem Phenol, zweimal mit Phenol-Chloroform-Isoamylalkohol (25:24:1) und einmal mit Chloroform extrahiert. Zur Trennung der phenolischen von der wässrigen Phase wurde jeweils eine Zentrifugation bei 4000xg für 10 Minuten durchgeführt.

Der wässrige DNA-Phase wurde 1/10 Volumen Ammoniumacetat (3M) zugegeben und mit eiskaltem Ethanol (100%) auf 50ml aufgefüllt. Die hochpolymere DNA wurde im Erlenmeyerkolben durch kreisende Bewegungen ausgespindelt, mit einer Pipette vorsichtig aufgenommen, 5 Minuten unter dem Abzug getrocknet und in 1 ml TE (10mM Tris/ 1mM EDTA) gelöst. Die DNA-Konzentration wurde anschließend photometrisch bestimmt.

2.19.3 Präparation von zellulärer RNA

Ratten-Tumorzellen (BSpASML, BSpAS, Progressor)
Wassergesättigtes Phenol
Chloroform/Isoamylalkohol (49:1)
Diethylpyrocarbonat (DEPC)

Guanidinthiocyanat-Stammlösung:	4M Guanidiniumthiocyanat 25mM NaCitrat 0,5% N-Lauroylsarcosin (Sarcosyl)
Lyselösung:	Guanidinthiocyanat-Stammlösung 0,1% (V/V) β -Meracptoethanol

Alle verwendeten Lösungen wurden mit DEPC zur Eliminierung von kontaminierender RNase behandelt. Hiefür wurde 0,2ml DEPC zu 100ml Lösung gegeben. Kräftigem Mischen schloss sich die Autoklavierung der DEPC-Lösung an. 1×10^8 über Trypsin-Behandlung geerntete Zellen wurden zweimal mit PBS gewaschen. Die Zellen wurden pelletiert, einmal mit PBS gewaschen, in 4ml Lyselösung aufgenommen und resuspendiert. Anschließend wurden 250 μ l 3M Natriumacetat zugegeben und gemischt. Im nächsten Schritt wurden die Proteine und Membranen über eine Phenolextraktion entfernt. Hierzu wurden 2ml wassergesättigtes Phenol zu dem Ansatz gegeben und auf dem Vortex-Schüttler gemischt. Anschließend wurden 2ml Chloroform/Isoamylalkohol (24:1) zugegeben, für 10 Sekunden auf dem Vortex-Schüttler gemischt und für 15 Minuten auf Eis stehen gelassen. Die

Abtrennung der wässrigen von der Phenolphase erfolgte bei 8000xg für 20Minuten. Die wässrige Phase wurde in ein neues Zentrifugen-Röhrchen überführt, ein gleiches Volumen an Isopropanol zugegeben und das Gemisch über Nacht bei -20°C inkubiert. Am nächsten Tag folgte eine erneute Zentrifugation bei 10000xg für 30Minuten. Das RNA-Pellet wurde in 400 μl Lyselösung gelöst und die RNA mit 400 μl Isopropanol erneut für 2h bei -20°C gefällt. Anschließend wurde mit einer Tischzentrifuge bei 4°C und voller Geschwindigkeit für 30 Minuten pelletiert. Das Pellet wurde mit 1ml 70% Ethanol gewaschen und in DEPC-behandeltem H_2O gelöst. Die Konzentration der RNA wurde photomerisch bestimmt und die RNA bei -80°C gelagert.

2.20 Semi-Quantitative RT-PCR in Ratten-Tumorzellen

2.20.1 Entfernung kontaminierender DNA aus RNA-Proben über Desoxyribonuklease I (DNaseI)

Dithiothreitol (DTT)
RNase freie DNaseI
Ribonuclease-Inhibitor
Tris gesättigtes Phenol
Isoamylalkohol
Dimethylsulfoxid (DMSO)

DNase-Stop-Mix:

50mM EDTA
1,5M Natriumacetat
1% SDS

TE-Puffer:

10mM Tris/HCl (pH 8)
1mM EDTA

Die DNase I-Behandlung der RNA-Probe diente der Entfernung von DNA-Kontaminationen in der RNA-Probe. Alle verwendeten Lösungen wurden mit DEPC behandelt. Eingesetzt wurden 20 μg RNA in 100 μl DNase I-Reaktionsansatz, der aus folgenden Bestandteilen zusammengesetzt wurde: 50mM MgCl_2 , 5mM DDT, 10mM Tris/HCl (pH 8), 1mM EDTA, 5Units Ribonuklease-Inhibitor und 30 Units RNase freie DNase I. Der Ansatz wurde für 15Minuten bei 37°C inkubiert und die Reaktion durch Zugabe von 25 μl DNase-Stop-Mix gestoppt. Anschließend wurde die Probe mit TE-Buffer auf ein Volumen von 200 μl ergänzt. Eine Proteinfällung mit 100 μl Phenol und 100 μl Chloroform/Isoamylalkohol (24:1) folgte. Die obere wässrige Phase wurde abgenommen und daraufhin mit 20 μl 4M Natriumacetat und 500 μl EtOH versetzt und auf Eis für 30Minuten ruhen gelassen. Anschließend wurde die

RNA bei 4°C für 30 Minuten bei 13000xg pelletiert, mit 70%igem EtOH gewaschen und schließlich in 20µl DEPC-behandeltem H₂O resuspendiert. Die RNA-Konzentration wurde photometrisch bestimmt und 10µg direkt für die RT-Strang-Synthese eingesetzt.

2.20.2 Reverse Transkription (RT) mit Oligo-dT-Primern

10µg DNase I behandelte RNA
PCR-Heizblock
Oligo d(T)-Primer
Dithiothreitol (DTT)
Reverse Transkriptase

10µg DNase I-behandelte RNA wurde in 14,25µl DEPC-behandeltem ddH₂O gelöst, 100pM Oligo d(T)-Primer (1 µl) zugegeben und die RNA im PCR-Heizblock für 5 Minuten bei 65°C denaturiert. Die Reverse Transkription erfolgte durch die Zugabe des RT- Reaktionsansatzes bestehend aus: 5µl 5x Enzympuffer, 0,2mM von jedem dNTP, 10mM DTT und 30Units Reverse Transkriptase in einem Volumen von 9,75µl bei 42°C für 1h. Im letzten Schritt wurde der PCR-Heizblock auf 70°C hochgeheizt und die Probe für 10 Minuten inkubiert.

2.20.3 Semi-Quantitative RT-PCR in Ratten-Tumorzellen

RT-Produkt
PCR-Heizblock
Taq-Polymerase

Die Semi-Quantitative Reverse Transkription (RT)-PCR diente dem relativen Vergleich der Expression von spezifischen Transkriptionsprodukten verschiedener Zelllinien.

Hierfür wurden die synthetisierten RT-Stränge mit den folgend genannten sequenzspezifischen Primern in einer PCR eingesetzt. Im Falle der Amplifikation von *C4.4A* +345 und +718 („Forward“: 5'-GCAACGCCAAACTCAACCTC-3' und „Reverse“: 5'-GGGGTGGGATTCGAGGGG-3') und zur Amplifikation des zur internen Kontrolle dienenden *β-Actin* sequenzspezifischen Primern des Primerpaar an Position +122 und +642 („Forward“: 5'-GTGGGGCGCCCCAGGCACCA-3' und „Reverse“: 5'-CTCCTTAATGTCACGCACGATTTC-3') verwendet. Insgesamt wurden je untersuchter Tumorzelllinie 10 PCRs mit unterschiedlicher Zyklenzahl im PCR-Heizblock gefahren. Eine PCR setzte sich aus 1µl RT-Erststrang-DNA, 5µl 10x PCR-Puffer, 0,2mM von jedem dNTPs,

1,5mM MgCl₂, 0,2µM jedes Primers und 2,5Units Taq-Polymerase in einem Reaktionsvolumen von 50µl zusammen. Die RT-PCR erfolgte unter folgenden Bedingungen:

94°C/5 Minuten	initiale Denaturierung	} 20-29 Zyklen
94°C/30 Sekunden	Denaturierungsphase	
58°C/30 Sekunden	Hybridisierungsphase	
74°C/5 Minuten	Polymerisationsphase	
74°C/10 Minuten	abschließende Polymerisation	
4°C	Reaktionsende	

Nach 20 Zyklen wurde je eine PCR-Probe der verschiedenen Tumorzelllinien ohne Unterbrechung der PCR aus dem PCR-„Cycler“ entnommen. Dieser Vorgang wurde bis zum 29 Zyklen wiederholt. Die PCR-Produkte wurden über Gelelektrophorese in einem 0,8%igem Agarosegel aufgetrennt. Nach EtBr-Anfärbung wurden dann die Intensitäten der detektierten Banden einer quantitativen Analyse unterzogen.

2.21 Southern-Blot

2.21.1 Restriktionsverdau genomischer DNA

Agarosegel:

350ml TAE-Buffer
3,5g Agarose

TAE (Tris/Acetat/EDTA)-Puffer:

50x Stocklösung:
242g Tris Base
57,1ml Eisessig
37,2g Na₂EDTA 2H₂O
1x Arbeitslösung, pH~8,5:
40mM Tris Azetat
2mM Na₂EDTA 2H₂O

Genomische DNA wurde mittels Restriktionsenzymen in Fragmente geschnitten. Hierfür wurde für genomische „Southern Blots“ 20µg DNA in 68,5µl ddH₂O gelöst. Der Lösung wurden 8µl 10x Restriktionspuffer und 35Units (3,5µl) Restriktionsenzym zugegeben. Der Restriktionsverdau erfolgte bei 37°C für 12Stunden. Die Auftrennung der DNA-Fragmente erfolgte über Gelelektrophorese in einem 1%igem Agarosegel bei 100Volt für 5,5Stunden (5 Volt/cm).

2.21.2 Überführung genomischer DNA-Fragmente auf Nylon-Membranen

Depurinierungslösung:	0,25N HCl
Denaturierungslösung:	0,4N NaOH
Hybond-N ⁺ -Membran	
20 x SSC:	3M NaCl 0,3M Na ₃ Citrat pH 7.0 mit HCL eingestellt

Die DNA-Fragmente wurden nach der Gelelektrophorese in Ethidiumbromid (0,5µg/ml H₂O) gefärbt. Zur späteren genauen Größenbestimmung wurde das Gel mit angelegtem Lineal unter UV-Licht photographiert. Um den Transfer der DNA von Gel zu Membran zu erleichtern, wurde die DNA durch saure Hydrolyse weiter zerkleinert. Dazu wurde das Gel für 10 Minuten in 500ml Depurinierungslösung geschwenkt. Anschließend wurde das Gel dreimal für 15 Minuten in 500ml Denaturierungslösung geschwenkt. Währenddessen wurde der Blot in einer Plastikwanne aufgebaut. Der Blot bestand aus vier übereinander gelegten Schwammtüchern mit den Abmessungen 20x 18 cm, drei Blatt Whatman-Filterpapier der gleichen Abmessung, gefolgt von dem depurinierten Gel. Darüber wurde die passend zugeschnittene Hybond-N⁺-Membran zugeschnitten und erneut 5Blatt Whatman-Papier gelegt. Jede Lage wurde ausreichend mit 20x SSC getränkt - Luftblasen durch Ausrollen mit einer Glaspipette entfernt. Saugpapier wurde in der Größe des Gels zugeschnitten und ~4cm hoch auf den Blot geschichtet. Anschließend wurde der Blot mit einer Glasscheibe und 0,5kg Gewicht beschwert. Als Transferpuffer diente 20 x SSC. Der Transfer der DNA-Fragmente vom Gel auf die Membran erfolgte über die Kapillarkräfte des Saugpapiers und dauerte 12 h. Nach dem Abbau des Blots wurde die Position der Geltaschen mit einem Kugelschreiber auf die Nylonmembran vermerkt. Die Nylonmembran für eine Minute in 3x SSC geschwenkt und anschließend bei Raumtemperatur getrocknet. Die DNA wurde durch eine 20minütigen Inkubation bei 120°C auf die Membran fixiert.

2.21.3 Hybridisierung geblotteter DNA mit radioaktiv markierten DNA-Sonden

Hybridisierungsöfen
Hybridisierungszylinder
100ng radioaktivmarkierte DNA-Sonde
Nylonmembran mit geblotteter DNA (Filter)

Church-Gilbert-Buffer:	0,5M Natriumphosphatbuffer (pH 7,2) 7% SDS 1mM EDTA (pH 8,0)
Waschlösung:	80mM Natriumphosphatbuffer (pH 7,2) 1% (V/V) SDS 1mM EDTA (pH 8,0)

Der Filter wurde mit Church-Gilbert-Buffer angefeuchtet und mithilfe einer Glas-Pipette in einen Hybridisierungszylinder überführt. Zur Prähybridisierung des Blottes wurden 12 ml Church-Gilbert-Buffer in den Zylinder gegeben, der für 2h bei 64 °C im Hybridisierungssofen rotiert wurde. Im Anschluß an die Prähybridisierung wurde der Buffer durch 12 ml frischem auf 64°C vorgewärmten Church-Gilbert-Puffer ersetzt. Die radioaktiv markierte DNA-Sonde wurde für 5Minuten bei 95°C denaturiert für 5 Minuten auf Eis abgekühlt, um schließlich in den Church-Gilbert-Buffer des Hybridisierungszylinders überführt zu werden. Die Hybridisierung erfolgte für 12Stunden bei 64°C unter Rotieren im Hybridisierungssofen. Die Membran wurde zweimal mit 100ml auf 80°C vorgewärmter Waschlösung bei 64°C für 10Minuten gewaschen. Die gewaschene Membran wurde im feuchten Zustand in Klarsichtfolie eingeschweißt und in einer lichtgeschützten Kassette mit Verstärkerfolie zwischen zwei Röntgen-Filmen fixiert. Die Autoradiographie erfolgte bei -80°C für 24-96 Stunden.

2.22 Northern-Blot

100 ng radioaktivmarkiertes DNA-Fragment
RNA-Probe

10 x MOPS:	200mM MOPS (3-(N-mopholino)-propansulfonische Säure) 50mM Natriumacetat 10mM EDTA pH 7.0 (mit NaOH eingestellt)
MOPS-Laufpuffer 10x:	400mM MOPS (3-(N-mopholino)-propansulfonische Säure) 400mM Natriumacetat 10mM EDTA pH 7.0 (mit NaOH eingestellt)
6x Probenpuffer:	1mM EDTA, pH 8.0 0,25% (w/v) Bromphenol Blau 50% (w/v) Glycerol
20x SSC:	3M NaCl 0,3M Na ₃ Citrat

pH 7.0 mit HCL eingestellt

Alle verwendeten Lösungen wurden mit DEPC zur Eliminierung von kontaminierender RNase behandelt. Hiefür wurden 0,2ml DEPC zu 100ml Lösung gegeben, kräftig geschüttelt und anschließend autoklaviert. Zunächst wurde für die Auftrennung der RNA-Probe ein Agarose/Formaldehydgel gegossen. Hierfür wurden 0,8g Agarose in 72ml Wasser gelöst, aufgekocht und anschließend in einem 60°C Wasserbad abgekühlt. Der 60°C warmen Agarose wurden 10ml 10x MOPS und 17ml Formaldehyd (37% v/v) zugegeben. Alle Komponenten wurden sorgfältig gemischt und das Gel in einen mit DEPC-H₂O gewaschenen Gelschlitten gegossen. Das Gel hatte eine Dicke von 4mm. Die zuvor isolierte zelluläre RNA wurde wie folgt für die Gelelektrophorese vorbereitet: 10µg RNA wurde in 11µl DEPC-Wasser gelöst, 5µl 10x MOPS, 9µl Formaldehyd (37% v/v) und 25µl Formamide gemischt und schließlich für 15 Minuten bei 55°C inkubiert. Dem Ansatz wurden 4µl 6x Probenpuffer zugegeben bevor er in eine Geltasche des Formaldehydgels überführt wurde. Um die RNA über Gelelektrophorese aufzutrennen, wurde eine Spannung von 80Volt (5Volt/cm) für 3 Stunden angelegt. Nach der Gelelektrophorese wurde das Gel für 1Minute in DEPC-H₂O, anschließend in 500ml 0,05M NaOH/1,5M NaCl, dann in 500ml 0,5M Tris (pH 7,4)/1,5M NaCl geschwenkt. Während dieser Behandlung wird die RNA über partielle saure Hydrolyse in kleinere, besser diffundierende Stücke zerlegt. Das Gel wurde in 0,5M Tris (pH 7,4) und Ethidiumbromid (0,5µg/ml) für 5Minuten gefärbt bevor die RNA unter UV-Licht visualisiert und dokumentiert werden konnte.

2.22.1 Überführung von RNA auf eine Nylon-Membran

Zum Transfer der RNA vom Gel auf eine Membran wurde zunächst ein Blot aufgebaut. Der Blot bestand aus einer Brücke von zwei übereinander gelegten Streifen Whatman-Papier, die mit ihren Enden in den Transferbuffer ragten, drei Blatt Whatman-Papier in der Größe des Gels, dem Gel, der Hybond-N⁺-Membran in der Größe des Gels und erneut 5 Blatt Whatman-Papier. Jede Lage wurde ausreichend mit 20x SSC getränkt und Luftblasen durch Ausrollen mit einer Glaspipette entfernt. Saugpapier wurde in der Größe des Gels zugeschnitten und ~4cm hoch auf den Blot geschichtet, um anschließend mit einer Glasscheibe sowie 0,5kg Gewicht beschwert zu werden. Als Transferpuffer diente 10x SSC. Der Transfer der RNA-Fragmente vom Gel auf die Membran erfolgte über die Kapillarkräfte des Saugpapiers und dauerte 12h. Nach dem Abbau des Blots wurde die Position der Geltaschen mit einem

Kugelschreiber auf die Nylonmembran vermerkt. Die Nylonmembran wurde für eine Minute in 3x SSC geschwenkt und anschließend bei Raumtemperatur getrocknet. Schließlich wurde die RNA durch eine 20minütige Inkubation von bei 120°C auf der Membran fixiert.

2.22.2 Hybridisierung geblotteter RNA mit DNA-Sonden

Hybridisierungssofen
Hybridisierungszylinder
100ng radioaktiv markierte DNA-Sonde
Nylonmembran mit geblotteter RNA

5x Denhardt-Lösung I:	1g Ficoll 400 1g Polyvinylpyrrolidone 5g SDS 3,35ml 30 % BSA 300ml 20x SSC auf 1000ml Gesamtvolumen mit H ₂ O ergänzt
10x Denhardt-Lösung II:	1g Ficoll 400 1g Polyvinylpyrrolidone 3,35ml 30 % BSA 25g SDS 50ml 0,1 M EDTA auf 500ml Gesamtvolumen mit H ₂ O ergänzt
20x SSC:	3M NaCl 0,3M Na ₃ Citrat pH 7.0 mit HCL eingestellt
Waschlösung I:	1x Denhard I 0,1% SDS 3x SSC
Waschlösung II:	0,1% SDS 0,1x SSC

Die Membran wurde mit 5x Denhardt-Lösung I angefeuchtet und mithilfe einer Glas-Pipette in einen Hybridisierungszylinder überführt. Daraufhin wurden 10ml 5x Denhardt-Lösung I in den Zylinder gegeben, um die Membran bei 65 °C rotierend im Hybridisierungssofen für 2h zu prähybridisieren. Anschließend wurde die Prähybridisierungslösung durch Hybridisierungslösung (1ml 10 x Denhardt-Lösung II, 3ml 20x SSC und 7ml H₂O) ersetzt. Die radioaktive DNA-Sonde wurde für 5Minuten gekocht, anschließend für 5Minuten auf Eis gekühlt bevor sie zur Hybridisierungslösung gegeben wurde. Die Hybridisierung erfolgte bei 60°C rotierend im Hybridisierungssofen für 12 Stunden. Das Waschen des Filters erfolgte bei 60°C in rechtzeitig vorgewärmten Waschlösungen. Zunächst wurde der Filter sechsmal für

10Minuten mit Waschlösung I, dann für 20 Minuten mit Waschlösung II und dreimal für 10Minuten mit 3x SSC gewaschen. Der Filter wurde feucht in Folie eingeschweißt und bei –80°C auf Röntgenfilm autoradiographiert.

2.23 Zellkultur

2.23.1 Kultivierung der Tumorzellen BSp73ASML, BSp73AS und PROb

Kulturmedium:	RPMI-1640 10% Fötale Kälberserum (FKS) 4mM L-Glutamin 100units/ml Penicillin G, 0,1mg/ml Streptomycin
Trypsin/EDTA:	0,14M NaCl 5mM KCl 0,5mM NaHPO ₄ 25mM Tris 5mM EDTA 5mM Glukose 0,25% Trypsin

Die Zellen wurden in 250ml Zellkulturflaschen als Monolayer bei 37°C in einem mit 5% CO₂ begasten Brutschrank kultiviert. Nachdem die Zellen 80-100% konfluent erreicht hatten wurden sie mit PBS gewaschen und anschließend mit 3ml Trypsin überschichtet. Nach Abnahme des Trypsins wurden die Zellen für 10Minuten im Brutschrank inkubiert, die abgelösten Zellen in 4ml RPMI-Medium aufgenommen und im Verhältnis 1:4 auf neue Zellkulturflaschen verteilt. Diese Zellen wurden nach Zugabe von 20ml Kulturmedium im Brutschrank kultiviert.

Zum Einfrieren der Zellen wurden trypsinisierte Zellen in 4ml kaltem FKS/10% DMSO aufgenommen. Diese Zellsuspension wurde gleichmäßig auf vier Kryoröhrchen verteilt, für die Kurzzeitlagerung bei –80°C eingefroren oder zur langfristigen Archivierung in flüssigem Stickstoff gelagert. Alle Arbeiten wurden unter sterilen Bedingungen durchgeführt.

2.23.2 Herstellung von am *C4.4A*-Lokus heterozygot deletierten Maus-ES-Zell-Klonen

2.23.2.1 Herstellung von „Feeder“-Zellschichten

Kulturmedium :	DMEM („high glucose“) 10% Fötale Kälber Serum
----------------	--

100units/ml Penicillin G, 0,1mg/ml Streptomycin
2mM L-Glutamin

Eine 15cm Zellkulturplatte zu 80-100% konfluent gewachsenen G-418-resistente Maus-embryonale Fibroblasten wurden zweimal mit PBS gewaschen, mit 5 ml Trypsin überschichtet und für 1-2Minuten bei 37°C im Brutschrank inkubiert. Anschließend wurden 10ml Kulturmedium zugegeben und die abgelösten Zellen über Zentrifugation bei 500xg für 5Minuten pelletiert. Der Überstand wurde entfernt und das Pellet in 1ml Medium resuspendiert. Anschließend wurden die Zellen über radioaktive Bestrahlung (Cs135, 60Gy, 8Minuten) inaktiviert. Den „feeder“-Zellen wurde kaltes 1 ml 2x Einfriermedium (50 % FCS, 20 % DMSO, 30 % Kulturmedium) zugegeben, die Zellsuspension auf zwei Kryoröhrchen verteilt und bei -80°C bzw. in flüssigem Stickstoff gelagert.

2.23.2.2 Kultivierung von Maus-embryonalen Stammzellen

Kulturmedium: DMEM („high glucose“)
10% Fötale Kälber Serum
100units/ml Penicillin G, 0,1 mg/ml Streptomycin
2mM L-Glutamin
500units/ml LIF “ESGRO”

Die in Kryoröhrchen gelagerten „Feeder“-Zellen wurden im 37°C Wasserbad aufgetaut und in 25ml Kulturmedium aufgenommen. 5ml der Zellsuspension ($\sim 10^6$ Zellen) wurden auf eine 6cm Zellkulturschale überführt und für 12h bei 37°C in einem mit 5% CO₂ begasten Brutschrank kultiviert. Ein weiteres Aliquot von 10ml der Zellsuspension ($\sim 2 \times 10^6$ Zellen) wurden auf eine 10cm Zellkulturschale überführt und für 24h bei 37°C im Brutschrank kultiviert. Nach Ablauf der genannten Kultivierungszeiten wurden 2×10^6 Maus embryonale Stammzellen (ES-Zellen) wurden im 37°C Wasserbad aufgetaut und in 5ml Kulturmedium aufgenommen. Die ES-Zellsuspension wurde auf die mit „Feeder“-Zellen bewachsene Zellkulturplatte von 6cm Durchmesser verteilt nachdem das Medium der „Feeder“-Zellen entfernt wurde. Eine zwölfstündige Wachstumsphase bei 37°C im Brutschrank schloss sich an. Darauffolgend wurden diese ES-Zellen trypsiniert, in 10ml Medium aufgenommen und in die mit „Feeder“-Zellen bewachsene Zellkulturschale von 10cm Durchmesser (s.o.) überführt und für weitere 12h im Brutschrank kultiviert.

2.23.2.3 Elektroporation von ES-Zellen mit C4.4A-k.o.-Konstrukt

Die zu 30-60% Konfluenz gewachsenen ES-Zellen (s.o) wurden trypsiniert und die Zellen in 500µl PBS aufgenommen. 50 µg linearisierten MmC4.4A-„k.o.“-Konstrukts wurden nach Ethanol-fällung in 250µl PBS aufgenommen. ES-Zellen und „k.o.“-Konstrukt wurden in eine „Gene Pulser Cuvette“ überführt und in einem Biorad Elektroporator (240V, 500µF, Zeitkonstante 5-7 Sekunden) elektroporiert. Die elektroporierten ES-Zellen wurden für 20Minuten bei Raumtemperatur stengelassen. Anschließend wurden die Zellen in 80ml Medium aufgenommen und die Zellsuspension auf 8 mit „Feeder“-Zellen bewachsenen Zellkulturplatten (10cm Durchmesser) verteilt. Die ES-Zellen wurden für 24h im Brutschrank inkubiert.

2.23.2.4 Selektion von transformierter ES-Zell-Klone

Die ES-Zellen wurden für 8 Tage in 10ml G-418-versetztem Medium (350 µg/ml) im Brutschrank inkubiert. Das Medium wurde täglich durch frisches G-418-versetztes Medium ersetzt. Nach diesen 8 Tagen wurden zwei Kryoröhrchen „Feeder“-Zellen im 37°C Wasserbad aufgetaut. Die Zellen wurden in 3 ml Medium aufgenommen und bei 500x g für 5Minuten pelletiert, um schließlich in 30 ml Medium resuspendiert zu werden. Die Zellsuspension wurde auf 60 „wells“ von 48-„well“-Zellkulturplatten verteilt (500µl/„well“). Insgesamt wurden sechs 48-„well“-Zellkulturplatten mit „Feeder“-Zellen bestückt und bei 37°C für 12 h im Brutschrank kultiviert. Nach 8 Tagen wurden 288 ES-Klone isoliert und auf die sechs 48-„well“-Zellkulturplatten verteilt (pro „well“ ein ES-Klon). Die ES-Klone wurden für 48h im Brutschrank inkubiert. Die ES-Klone wurden trypsiniert (100µl Trypsin/„well“) und die Zellsuspension in sechs neue 48-„well“ Platten mit „Feeder“-Zellen überführt. Erneut wurde für weitere 48h im Brutschrank kultiviert. Daraufhin wurden zwölf 24-„well“-Zellkulturplatten mit 1%iger Gelatine behandelt und nach Trocknen der Gelatine mit 1ml Medium/ „well“ überschichtet. Die ES-Klone wurden für 5Minuten im Brutschrank trypsiniert (100µl Trypsin/ „well“). Um den durch das Trypsinieren verursachten Stress für die Zellen zu verringern, wurden maximal 8 Klone parallel behandelt. Anschließend wurden der Zellsuspension 200µl Lösung A (70% Medium, 30% FCS) zugegeben. 100µl der Zellsuspension wurden dann in jeweils ein „well“ der zuvor mit Gelatine behandelten 24-„well“-Zellkulturplatte überführt. Die verbliebenen 200µl ES-Zell-Suspension wurden 200µl Lösung B (50% Medium, 30% FCS, 20% DMSO) zugegeben. Die 24-„well“-

Zellkulturplatten wurden zwischen zwei und sechs Tage im Brutschrank kultiviert. Die zu 80-100% konfluent gewachsenen ES-Zellklone wurden daraufhin lysiert und die genomische DNA isoliert. Die in den 24-„well“-Zellkulturplatten verbliebene ES-Zellen wurden bei -80°C eingefroren. Alle Arbeiten wurden unter sterilen Bedingungen durchgeführt.

2.24 Sequenzanalyse

Genomische Bibliothek der Ratte

PAC-Klone, die den *C4.4A*-Lokus repräsentieren, wurden durch Southern-Hybridisierung von Kolonie-Filtern mit einer genspezifischen cDNA-Sonde (Rösel *et. al.*, 1998) identifiziert. Positive Klone wurden per PCR (Material) gegengetestet und schließlich zur Sequenzierung des 5'flankierenden Bereichs des *C4.4A*-Lokus an Genotyp GmbH (Hirschhorn) weitergeleitet.

2.25 Transfektion von Ratten-Pankreastumorzellen

Exgen 500

RnC4.4A-Promotorkonstrukte

Ratten-Pankreastumorzellen (BSp73ASML, BSp73AS)

Für die Transfektion der BSp73ASML-Zelllinie wurden 3×10^6 Zellen, für die BSp73AS-Zelllinie $1,6 \times 10^6$ Zellen in jeweils 10ml RPMI-Medium (inklusive 10% FKS) aufgenommen. Die Zellsuspension wurde auf eine 100mm Zellkulturpetrischale gleichmäßig verteilt und im Brutschrank bei 37°C und 5% CO_2 über Nacht kultiviert. Die Zellen wurden zweimal mit PBS gewaschen und mit 5ml frischem FKS supplementierten Medium überschichtet. $15\mu\text{g}$ pBLCAT-C4.4A-Promotorkonstrukt beziehungsweise des Kontrollplasmid (pBLCAT3, pCDNA3/CAT) wurden zusammen mit jeweils $5\mu\text{g}$ pEGFP-C1-Plasmid (zur Kontrolle der Transfektions-Effizienz) in $500\mu\text{l}$ 150mM NaCL aufgenommen. $50\mu\text{l}$ „ExGen 500“ wurden dem Gemisch zugegeben und sofort für 10Sekunden auf dem Vortex-Schüttler gemischt. Der Transfektionsansatz wurde für 10Minuten bei Raumtemperatur ruhen lassen bevor er gleichmäßig auf die vorbereitete Zellkulturpetrischale verteilt wurde. In Transfektionen, bei denen verschiedenen Transkriptionsfaktor-exprimierende Plasmide zum Einsatz kamen, wurden $8\mu\text{g}$ pBLCAT-C4.4A-Promotorkonstrukt, $4\mu\text{g}$ pEGFP-C1-Plasmid und $8\mu\text{g}$ Transkriptionsfaktor-kodierendes

Expressionsplasmid bzw. Kontrollplasmid pCDNA3 (Mock) verwendet. In Transfektionsexperimenten in denen gleichzeitig zwei Transkriptionsfaktoren ektopisch exprimiert wurden, setzte sich der Transfektionsansatz aus aus 7µg pBLCAT-C4.4A-Promotorkonstrukt und je 7µg Transkriptionsfaktor-kodierendem Expressionsplasmid bzw. Kontrollplasmid pCDNA3 (Mock) zusammen. Nach 12h Inkubation der Zellen im Brutschrank wurde das Medium durch frisches 10ml RPMI-Medium (inkl. 10% FKS) ersetzt und die Zellen für weitere 12 h im Brutschrank inkubiert.

2.26 PMA-Behandlung von transfizierten BSp73ASML-Zellen

0,1 mM PMA (in DMSO)

DMSO

Mit Promotorkonstrukten transfizierte BspASML-Zellen

Die Transfektion erfolgte wie bereits im vorangegangenen Abschnitt beschrieben. Einziger Unterschied war, dass in diesen Experimenten Zellen unter Serum-Entzug kultiviert wurden. Anstelle von PPMI mit 10% FKS wurde RPMI mit nur 0,5% FKS verwendet.

Die unter Serum-Entzug kultivierten Zellen wurden mit dem pBLCAT-C4.4A-Promotorkonstrukt transfiziert. Die transfizierten Zellen wurden für weitere 12 Stunden im Brutschrank kultiviert und anschließend einer PMA-Behandlung unterzogen. Zur PMA-Behandlung wurden die Zellen zunächst zweimal mit PBS gewaschen. Anschließend wurden die Zellen mit 10ml RPMI/0,5% FKS inklusive 0,2µM PMA überschichtet. Zur Kontrolle wurden transfizierte Zellen mit Medium einer 1:1000 DMSO-Verdünnung gleichen Volumens überschichtet.

2.27 Quantitative Bestimmung der Chloramphenikol-Acetyltransferase-Aktivität (CAT-Assay)

2.27.1 Präparation des CAT-Extrakts

Mit pBLCAT-C4.4A-Promotorkonstrukt und pGFP-C1-Plasmid transfizierte Zellen

Gummischaber

PBS (phosphate-buffered saline):

137mM NaCl

2,7mM KCl

4,3mM Na₂HPO₄ 7H₂O

1,4mM KH₂PO₄

TEN (Tris/EDTA/NaCl) Lösung:

40mM Tris/Cl, pH 7.5
1mM EDTA, pH 8.0
150mM NaCl

Die mit pBLCAT-C4.4A-Promotorkonstrukt transfizierten Pankreastumorzellen wurden zweimal mit je 5 ml PBS gewaschen. Dann wurden die Zellen mit 1ml TEN überschichtet und für 5Minuten auf Eis inkubiert. Anschließend wurden die Zellen mit einem Gummischaber von der Petrischale gelöst und die Zellsuspension in ein Eppendorfgefäß überführt. 900µl der Zellsuspension wurden 5Minuten bei 5000rpm zentrifugiert. Das resultierende Zellpellet in 80µl eiskalter 0,25M Tris/Cl-Lösung (pH 7.5) resuspendiert. Zum Aufschluss der Zellen wurden diese 5Minuten in flüssigen Stickstoff schockfroren und anschließend für 5Minuten im 37°C-Wasserbad wieder aufgetaut. Dieser Einfrier/Auftau-Zyklus wurde zweimal wiederholt. Das Lysat wurde auf Eis abgekühlt, um dann für 5Minuten mit einer auf 4°C vorgekühlte Tischzentrifuge bei maximaler Geschwindigkeit Zellkerne und unlösliche Bestandteile abzutrennen. Der Überstand enthielt den cytoplasmatischen Extrakt mit dem CAT-Enzym, der in ein neues Eppendorfgefäß überführt wurde. Die so gewonnenen Extrakte wurden in flüssigem Stickstoff schockgefrostet und bei -20°C gelagert.

2.27.2 Normalisierung der CAT-Extrakte

FACSCalibur „Flow Cytometer“
100µl Zellsuspension transfizierter Zellen
CAT-Lysate
Bio-Rad Protein-Assay

Die Normalisierung verschiedener transfizierter Proben erfolgte über die Bestimmung der Transfektionseffizienzen und Gesamtproteinkonzentrationen. Bei der folgend beschriebenen Versuchsanordnung wurde zugrundegelegt, dass die Anzahl der mit dem pEGFP-C1-Vektor ko-transfizierten Zellen die Anzahl der mit dem pBLCAT-Promotorkonstrukt (oder Kontrollplasmid) transfizierter Zellen widerspiegelt.

Die Bestimmung der Transfektionseffizienz erfolgte über den Nachweis des vom ko-transfizierten Vektor pEGFP-C1 translatierten „enhanced green fluorescent protein“ (EGFP). Transfizierte Zellen produzieren EGFP, das bei einer Anregungswellenlänge von 488nm grünes Licht emittiert. Zur Bestimmung des Anteils von EGFP-positiven zu den nicht-transfizierten EGFP-negativen Zellen wurde ein „Fluorescence activated cell sorter“ (FACS) verwendet. 100µl (von 1000µl Gesamtvolumen) der von der 100mm Zellkulturpetrischale geernteten, zuvor transfizierten Zellsuspension wurde über Zentrifugation bei 6000xg für

5 Minuten pelletiert. Das Zellpellet wurde einmal mit PBS gewaschen und in 400 µl PBS resuspendiert. Die prozentuale Anteil pEGFP-C1-transfizierter zu nicht-transfizierten Zellen einer Probe wurde anschließend im FACS bestimmt.

Die Gesamtproteinkonzentration der CAT-Lysate wurde mit dem Bio-Rad Protein-Assay nach Herstellerangaben bestimmt. Ausgehend von der Gesamtproteinkonzentration einer Probe wurde das Lysatvolumen berechnet und so eingestellt, dass es 100 µg Gesamtprotein enthielt. Die Volumen, der für den CAT-Assay eingesetzten Lysate, wurden schließlich abhängig von der gemessenen Transfektionseffizienz modifiziert. Das jeweilige Volumen wurde so verändert, dass es eine Gesamtproteinkonzentration repräsentierte, die einem Anteil von 10% transfizierter Zellen entspricht.

$$\text{Eingesetztes Volumen} = \frac{10\% \times \text{Lysatvolumen (100}\mu\text{g Gesamtprotein)}}{\text{gemessene Transfektionseffizienz}}$$

In der Regel betrug die Bandbreite des eingesetzten Gesamtproteins der verschiedenen CAT-Lysate zwischen 200-230 µg.

2.27.3 CAT-Reaktion nach Gorman (Gorman et al., 1982)

58 mCi/mmol D-threo-[dichloroacetyl-1-¹⁴C] Chloramphenicol
Acetyl-CoA
37°C-Inkubator

Die CAT-Reaktion wurde in einem Volumen von 150 µl durchgeführt und hatte folgende Zusammensetzung:

2 µl 58 mCi/mmol D-threo-[dichloroacetyl-1-¹⁴C] Chloramphenicol
20 µl 4 mM Acetyl-CoA (gelöst in 0,25 M Tris/Cl pH 7.5)
x µl 0,25 M Tris/Cl pH 7.5
x µl Cytoplasmatischer Extrakt

150 µl Gesamtvolumen

Die CAT-Reaktion wurde für 3h bei 37°C inkubiert. In dieser Reaktion acetyliert die Chloramphenicol-Acetyltransferase das Kohlenstoffatom C₁ oder C₃ des [¹⁴C]Chloramphenicolmolekül, sodass die Produkte 1- und 3-Acetyl-[¹⁴C]Chloramphenicol entstehen. Bei zu niedriger Substratkonzentration acetyliert CAT beide C-Atome des Chloramphenicolmoleküls, so dass 1,3-Di-Acetyl-[¹⁴C]Chloramphenicol entsteht und die CAT-Reaktion nicht mehr im linearen Messbereich verläuft. Nach Ablauf der Inkubationszeit

wurden dem Reaktionsansatz 800µl Ethylacetat zugegeben, um die Reaktion zu stoppen. Der Ansatz wurde auf dem Vortex-Schüttler gemischt und anschließend zur Phasentrennung für 5 Minuten bei 4°C und 13000 x g zentrifugiert. Die oberen Ethylacetat-Phase enthielt das acetylierte und nicht-acetylierte Chloramphenicol und wurde in ein neues Eppendorfgefäß überführt. Schließlich wurde das Ethylacetat in einer Unterdruck-erzeugenden Zentrifuge („Speedvac evaporator“) verdampft und das Chloramphenicol-Pellet in 12µl frischem Ethylacetat resuspendiert.

2.27.4 Auftrennung der CAT-Enzym-Produkte über Dünnschichtchromatographie

Whatman 3 MM Filterpapier
19:1 (V/V) Chloroform/Methanol
Dünnschicht-Chromatographie-Tank
Dünnschicht-Chromatographie Platte (Kieselgel)
Fujifilm “Imaging Plate” BAS-MS 2325

Ein Dünnschicht-Chromatographietank wurde für eine Stunde vor der Dünnschichtchromatographie mit 150ml Chloroform/Methanol im Verhältnis 19:1 (V/V) und zwei Whatman-Papier (20x20 cm) äquilibriert. Die [¹⁴C]Chloramphenicol-Ethylacetatprobe wurde punktuell und in 2µl Schritten auf eine Dünnschichtchromatographieplatte aufgetragen. Die Auftrennung der in der CAT-Enzymreaktion entstandenen Produkte erfolgte in dem Chloroform/Methanol-Laufmittel für 45Minuten im Dünnschicht-Chromatographietank. Anschließend wurde die Chromatographie-Platte unter einem Abzug getrocknet und auf einer Fujifilm “Imaging Plate” für 12 Stunden zur Autoradiographie exponiert.

2.27.5 Quantifizierung des CAT-Substratumsatzes

Fujifilm Bas-1800 II “Phosphor Imaging System”

Die Quantifizierung des Autoradiogramms erfolgt über das „Fujifilm Bas-1800II Phosphor Imaging System“.

Typischerweise zeigt das Autoradiogramm einer aufgetragenen Probe drei drei punktförmige [¹⁴C]Chloramphenicol-Signale in einer chromatographierten Spur. Das erste Signal über dem Ausgangspunkt der Chromatographie entsprach dem nicht-acetylierten [¹⁴C]Chloramphenicol und die zwei darüberliegenden Signale zeigten die monoacetylierten [¹⁴C]Chloramphenicol-

Derivate. Das acetylierte Chloramphenicol ist das Produkt des CAT-Enzyms. Proben, in denen während der CAT-Reaktion Diacetylierte [¹⁴C]Chloramphenicol entstanden ist, wurden nicht quantifiziert. Die Intensität der durch das [¹⁴C]Chloramphenicol verursachten energetischen Aufladung der Image-Platte wurden über die Software Fujifilm „Image Reader V1.8E“ erfasst und über die Software Fujifilm „ImageGauge“ quantifiziert. Die CAT-Substratumsetzung einer Probe wurde basierend auf diese Daten wie folgt berechnet: (% Substratumsatz ist die Summe der Signalintensitäten der acetylierten Produkte geteilt durch die Summe aller Signalintensitäten mal 100)

$$\% \text{ Substratumsatz} = a+b / (a+b+c) \times 100$$

a: Signalintensität von 1-Acetyl-[¹⁴C]Chloramphenicol verursacht

b: Signalintensität von 1-Acetyl-[¹⁴C]Chloramphenicol verursacht

c: Signalintensität von nicht-acetylierten Chloramphenicol verursacht

Die relative CAT-Aktivierung einer Probe wurde über deren prozentualen Substratumsatz relativ zur prozentualen Substratumsatz der Kontrolle (pBLCAT3, Mock) berechnet. Hierfür wurde der Substratumsatz der Kontrolle mit dem Wert Eins besetzt. Ausgehend von diesem Basiswert wurde die CAT-Aktivität der verschiedenen Promotorkonstrukte berechnet. Die CAT-Aktivität wurde durch den Mittelwert mindestens drei unabhängigen Experimenten bestimmt.

2.27.6 Statistik

Die Signifikanz der beobachteten Unterschiede im Substratumsatz zweier verschiedener C4.4A-Promotorkonstrukte, wurde über den einseitigen Student-t-Test (Statistikprogramm EXEL) analysiert. Unterschiede im Substratumsatz, die Werte von $p \leq 0,05$ produzierten, wurden als signifikant akzeptiert.

2.28 Electrophoretic Mobility Shift Assay (EMSA)

2.28.1 Präparation von Kernextrakten (Andrews and Faller, 1991)

Gummischaber
BioRad Protein Assay

Buffer A: 10mM HEBES/KOH (pH 7,9)

1,5mM MgCl
10mM KCl
0,5mM Dithiothreitol
0,2mM PMSF
1 x Proteinaseinhibitor (Roche)
0,5% Nonidet P-40

Buffer C: 20mM HEBES/KOH (pH 7,9)
25% (v/v) Glycerol
420mM NaCl
1,5mM MgCl
0,2mM EDTA
0,5mM Dithiothreitol
0,5mM PMSF
1x Proteinaseinhibitor (Roche)

Für die Herstellung von Kernextrakten wurden von der BSpASML-Zelllinie 5×10^6 Zellen, von der BSpAS-Zelllinie 3×10^6 Zellen in 10ml RPMI/10% FKS aufgenommen. Die Zellsuspension wurde auf eine 100mm Zellkulturpetrischale gleichmäßig verteilt und im Brutschrank bei 37° C und 5 % CO₂ für 12Stunden kultiviert. Die Zellen wurden zweimal mit PBS gewaschen und mit 1 ml eiskaltem PBS überschichtet. Anschließend wurden die Zellen mit einem Gummischaber von der Petrischale gelöst und die Zellsuspension in ein Eppendorfgefäß überführt. Die Zellen wurden durch Zentrifugation für 10Sekunden und 4°C bei 13000xg pelletiert. Das Zellpellet wurde zur Lyse der Zellen in 500µl kaltem Puffer A vorsichtig resuspendiert und für 10Minuten auf Eis inkubiert. Der Ansatz wurde für 10Sekunden auf dem Vortex-Schüttler gemischt, anschließend für 10Sekunden bei 13000xg und 4°C erneut zentrifugiert. Das die Nuklei enthaltene Pellet wurde zur Hoch-Salz-Extraktion in 60µl kaltem hypotonischem Puffer C resuspendiert und für 20Minuten auf Eis inkubiert. Die Zelltrümmer des Ansatzes wurden durch Zentrifugation für 2Minuten bei 13000 x g und 4°C entfernt. Die Gesamtproteinkonzentration des Nukleusextrakts wurde mit dem BioRad Protein Assay bestimmt und bei -80°C gelagert.

2.28.2 Hybridisierung von komplementären Oligonukleotidsequenzen

Solche Regionen der *C4.4A*-Promotorsequenz, die für die im CAT-Assay beobachteten Promotor-Aktivitätsschwankungen verantwortlich gemacht werden konnten, wurden später zu Bindungsstudien in EMSA-Reaktionen eingesetzt. Alle Sequenz-Details zu den Oligonukleotiden, sind neben den spezifischen Bezeichnungen für die von ihnen kodierten DNA-Bindungsstellen für Transkriptionsaktivatoren unter dem Kapitel 2.6.1.3 zu finden.

Zur Hybridisierung der Oligonukleotide zu einem doppelsträngigen DNA-Molekül wurden je 1nM der komplementären Oligonukleotidstranges in 25µl 0,01mM Tris/HCl (pH 8), 10mM MgCl und 1mM Dithiothreitol aufgenommen. Der Hybridisierungsansatz wurde bei 95°C für 5 Minuten auf dem Heizblock inkubiert. Anschließend wurde in 20Minuten-Abständen schrittweise die Temperatur auf 70 °C, 65°C, 55°C und 25°C reduziert. Die so erhaltenen doppelsträngigen DNA-Fragmente wurden bei -20°C gelagert.

2.28.3 EMSA-DNA-Protein-Bindereaktion

Bindungspuffer:

10mM Tris/HCl (pH8)
1mM EDTA
1mM Dithiothreitol
10% Glycerin (V/V)
100mM NaCl
2x10² units Poly(dI-dC)

Die im EMSA verwendeten hybridisierten Oligonukleotid-Fragmente wurden mit [γ -³²P]-ATP über T4-Polynukleotidkinase markiert. Das Volumenäquivalent von 2x10⁶ „counts per minute“ (cpm) markierter DNA-Fragmente wurde mit 15µg Nukleus-Extrakt in 20µl Bindungspuffer gemischt. Für Kompetitions-Experimente wurden zwischen 4pM -160pM von nicht-markierten Kompetitor-DNA mit den markierten DNA-Fragmenten vermischt, bevor sie dem Bindungs-Ansatz zugegeben wurde. Die Protein-DNA-Bindereaktion wurde für 20Minuten auf Eis inkubiert.

In „Supershift“-Experimenten wurden 2µg spezifischer Antikörper mit 15µg Nukleus-Extrakt in 20µl Bindungspuffer für 20Minuten auf Eis inkubiert. Nach Zugabe des markierten DNA-Fragments folgte eine weitere 20minütige Inkubation auf Eis. Alle Bindungsmischungen wurden in einem nicht-denaturierenden 4 bzw. 6%igem Polyacrylamid/TBE-Gel elektrophoretisch aufgetrennt. Daraufhin wurde das Polyacrylamidgel getrocknet und auf Röntgenfilm exponiert.

3 Ergebnisse

Der Prozess der Metastasierung von Tumorzellen ist noch weitgehend unbekannt. Modellsysteme zur Untersuchung dieses Mechanismus sind rar. Deshalb hat die Beobachtung des unterschiedlichen Metastasierungspotentials zweier Ratten-Pankreasadenokarzinom-Zelllinien, die ursprünglich vom gleichen Primärtumor abstammen, besonderes Interesse geweckt (Matzku et al., 1983). Diese unter den Namen BSp73AS (nicht-metastasierend) und BSp73ASML (metastasierend) bekannten Zelllinien wurden bereits eingehenden Untersuchungen unterworfen. Eines der Ergebnisse dieser Arbeiten war die Identifikation der differentiellen Expression verschiedener Oberflächenantigene, die für Modulation des Metastasierungspotentials mitverantwortlich gemacht werden konnten (Claas et al., 1996; Rosel et al., 1998). So wurde neben dem CD44v4-v7, dem Tetraspanin D6.1A (Human CO-029), auch das GPI-Linker-Protein C4.4A mit einem erhöhten Metastasierungsvermögen von BSp73ASML in Verbindung gebracht. Mit Ausnahme von C4.4A ist die Assoziation der genannten Moleküle mit dem metastatischen Phänotyp auch im humanen System hinlänglich bekannt. Das C4.4A Molekül wurde erstmals in dem erwähnten Rattenmodell beschrieben. Inzwischen weiß man, dass das Molekül auch auf einer Reihe metastasierender humaner Tumoren überexprimiert wird. Über die Mechanismen der Induktion der Expression von C4.4A war zu Beginn meiner Dissertationsarbeit bislang nichts bekannt.

Die folgende Beschreibung der erzielten Ergebnisse soll dokumentieren, warum sich diese Arbeit speziell auf das Gebiet der Transkriptionskontrolle des C4.4A-Gens konzentrierte und welche an diesen Regulationsmechanismen beteiligte Faktoren identifiziert werden konnten.

3.1 Der *C4.4A*-Genlokus ist in der *C4.4A*-negativen Zelllinie nicht deletiert

Die Karyotypen der Zelllinien BSp73ASML und BSp73AS unterscheiden sich deutlich voneinander (Matzku et al., 1983; Raz et al., 1986). Keine ungewöhnliche Beobachtung, da bekannt ist, dass genetische Instabilität eine entscheidende Ursache für die Evolution divergenter Tumorzell-Populationen darstellt (Zhivotovsky and Kroemer, 2004).

Da das *C4.4A* im Rattengenom auf dem Chromosom 1q21 lokalisiert, das dem chromosomalen Abschnitt 19q13.1-q13.2 des humanen *C4.4A*-Homologs synten ist (Wurfel

et al., 2001), sollte dieser Abschnitt einer näheren Analyse unterzogen werden, bevor detaillierte Studien ihren Fortgang nehmen konnten.

So sollte ausgeschlossen werden, dass die beobachteten Expressions-Unterschiede des *C4.4A*-Gens auf eine mögliche Deletion korrespondierender chromosomaler Bereiche des Abschnitts 1q21 im Genom der Zelllinie BSp73AS zurückzuführen sind. Dazu wurden der genomische *C4.4A*-Lokus der *C4.4A*-positiven Tumorzelllinien BSp73ASML, PROb mit dem der *C4.4A*-negativen BSp73AS-Zelllinie verglichen.

Zur Untersuchung der genomischen Integrität des *C4.4A*-Genlokus wurden die genannten Zelllinien mit der Southern-Hybridisierungsmethode untersucht. Dazu wurden Restriktionsverdauungen der genomischen DNAs der genannten Zelllinien mit *C4.4A*-spezifischen cDNA-Sonden hybridisiert (Rosel et al., 1998). Das Ergebnis ist in Abbildung 1 dokumentiert. Die mit den Restriktionsenzymen EcoRI, HindIII und PstI verdauten DNAs ließen dabei keine Unterschiede zwischen den verwendeten Zelllinien erkennen. Die in den ersten drei Spuren aufgetrennte DNA der BSp73AS-Zellen zeigt in der Autoradiographie das gleiche Bandenmuster wie die DNA der BSp73ASML-Zellen (Spur 4-6) und PROb-Zellen (Spur 7-9) (Abbildung 1). Folglich ist eine Deletion des *C4.4A*-Lokus nicht die Ursache der Absenz des *C4.4A*-Proteins in der Zelllinie BSp73AS.

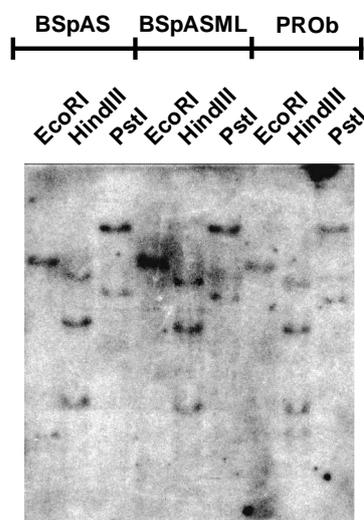


Abbildung 1: ***C4.4A*-Genlokus-Analyse.** 15 µg genomische DNA aus BSp73AS, BSp73ASML und PROb-Zellen wurden mit den Restriktionsenzymen EcoRI, HindIII und PstI verdaut. Nach Auftrennung der Fragmente im 1% Agarosegel erfolgte mittels Southern-Blot der Transfer auf eine Nylon-Membran. Die Membran wurde im Anschluss mit einer *C4.4A*-cDNA-Sonde hybridisiert. Das Autoradiogramm zeigt die Hybridisierung der ³²P-markierten Sonde an den DNA-Fragmenten des *C4.4A*-Genlokus.

3.2 *C4.4A* wird nicht post-transkriptional reguliert

Da eine Deletion nicht für das Fehlen der *C4.4A*-Expression verantwortlich gemacht werden konnte, mussten andere – entweder transkriptionale bzw. post-transkriptionale – Mechanismen an der Modulation der *C4.4A*-Expression beteiligt sein. Zunächst wurde

überprüft, ob die divergente C4.4A-Expression in BSp73ASML und BSp73AS auf post-transkriptionale Ereignisse zurückzuführen ist. Post-transkriptionale Ereignisse beinhalten Vorgänge wie mRNA-Prozessierung, den Transport vom Nukleus ins Zytoplasma, RNA-Stabilität, translationale Regulation sowie post-translationale Mechanismen, welche die Proteinstabilität beeinflussen. Durch Integration der Erkenntnisse vorhergegangener Studien (ektopische Expression von C4.4A) scheinen jedoch allein transkriptionale oder aber post-transkriptionale Mechanismen für eine eventuelle Regulation von C4.4A verantwortlich zu sein. Zur Kontrolle der posttranskriptionelle Regulation wurden die Transkriptionsprodukte der C4.4A-positiven Zelllinien BSp73ASML/PROb und der C4.4A-negativen Zelllinie BSp73AS untersucht. Zur Analyse der C4.4A-mRNA wurde zunächst Gesamt-RNA der verschiedenen Zellen isoliert und diese sowohl einer Northern-Blot-Analyse, als auch einer semi-quantitativen RT-PCR unterworfen.

Die Ergebnisse der Northern-Blot-Analyse sind in Abbildung 2 dargestellt. Die elektrophoretisch aufgetrennten RNA-Proben wurden in diesem Experiment mit Ethidiumbromid angefärbt, wobei die Fluoreszenz-Intensität der ubiquitären 28sRNA die Äquivalenz der eingesetzten RNA-Mengen bestätigte. Anschließend wurden die geblotteten RNA-Proben mit einer radioaktiv markierten C4.4A-cDNA-Sonde hybridisiert. In der BSp73AS-RNA-Probe (Spur 1) konnte im Gegensatz zu den aus BSp73ASML und PROb (Spur 2 und 3) isolierten RNAs kein Signal im Autoradiogramm detektiert werden (Abbildung 2). Folglich wird in den BSp73AS Zellen kein C4.4A-Transkript synthetisiert.

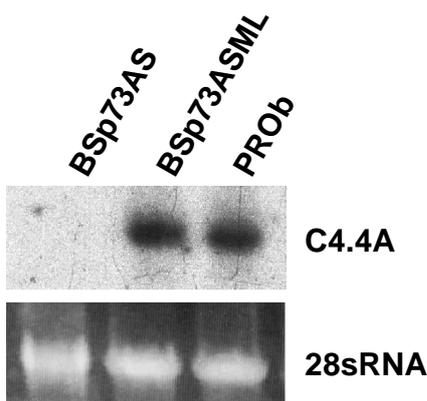


Abbildung 2: **C4.4A-mRNA-Analyse mittels Northernblot.** 10 µg Gesamt-RNA aus BSp73AS, BSp73ASML und PROb-Zelllinien wurden über ein 0,8 % Formaldehyd-Agarosegel aufgetrennt, die RNA über Ethidiumbromid angefärbt und unter UV-Licht dokumentiert. Die ubiquitäre 28s RNA diente als Ladungskontrolle der verschiedenen RNA-Proben. Die RNA wurde auf eine Nylon-Membran geblottet und mit einer C4.4A-cDNA-Sonde hybridisiert. Das Autoradiogramm zeigt die Signale, der über ³²P-markierten, an die C4.4A-mRNA hybridisierte Sonde.

Dieses Ergebnis konnte durch die weitaus sensitivere Methodik der semi-quantitativen RT-PCR bestätigt werden (Abbildung 3). Für die RT-PCR wurden gleiche Volumina an revers transkribierter RNA eingesetzt und mit C4.4A-sequenzspezifischen Primern untersucht. Zur

Qualitätskontrolle der eingesetzten RNA-Templates dienten Primern zur Amplifikation des ubiquitär exprimierten β -Aktins. Die Variation der PCR-Zyklenzahlen (20-29) sollte in diesem Versuch dafür sorgen, dass eine aussagefähige Messung der PCR-Produktmenge im exponentiellen Bereich und somit außerhalb des Sättigungsbereichs der PCR-Reaktion garantiert werden konnte. Wie der Abbildung 3 zu entnehmen ist, wurde die β -Aktin-cDNA mittels PCR in vergleichbaren Mengen aus den Erststrang-Präparationen aller untersuchten Zelllinien (BSp73AS, BSp73ASML und PROb) amplifiziert.

Anders verhielt sich dagegen die gemessene Produktmenge der *C4.4A*-spezifischen PCRs. Das *C4.4A*-PCR-Produkt der BSp73AS-Probe wurde im Vergleich zu Präparationen von BSp73ASML und PROb in nur verschwindend geringem Anteil amplifiziert (Abbildung 3). Wie in der Einleitung dargelegt, findet post-transkriptionale Regulation auf Ebene der mRNA statt. Dies setzt logischerweise die Synthese der betreffenden mRNA voraus. Die hier präsentierten Ergebnisse aus der indirekten quantitativen Bestimmung der synthetisierten *C4.4A*-mRNA zeigen jedoch, dass BSp73AS keine oder nur verschwindend wenig *C4.4A*-mRNA synthetisiert. Die gemessenen relativen *C4.4A*-mRNA-Mengen der verschiedenen Zelllinien entsprechen somit den relativen Mengen an gemessenem *C4.4A*-Protein.

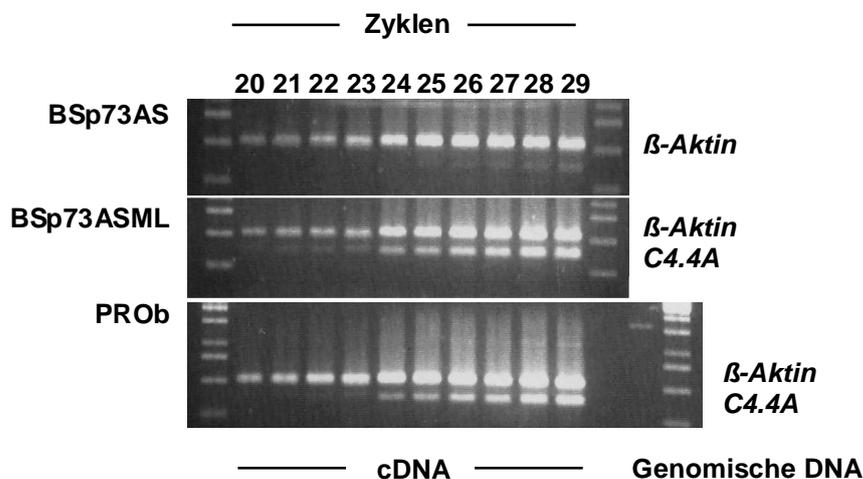


Abbildung 3: *C4.4A*-mRNA-Analyse über RT-PCR. Gesamt RNA wurde aus BSp73AS, BSp73ASML und PROb extrahiert. 10 μ g RNA-Probe wurden für einen Reversen-Transkriptase-Ansatz (20 μ l) mit Oligo d(T)-Primer eingesetzt. 1 μ l der cDNA-Produkte wurden in einer PCR mit *C4.4A*-Primern und β -Aktin-Primern amplifiziert, die PCR-Produkte in einem 0,8 % Agarosegel aufgetrennt und mit Ethidiumbromid angefärbt. Die β -Aktin-Primer dienten als Kontrolle. Die Gel-Dokumentation zeigt die zyklusabhängigen PCR-Produkte der verschiedenen Proben.

Folglich spielen post-transkriptionale Regulationsmechanismen keine Rolle in der C4.4A-Expressionskontrolle. Die bisher beschriebenen Ergebnisse dirigierten das weitere Vorgehen in Richtung der transkriptionellen Aktivierungs- bzw. Deaktivierungs-Potentiale von BSp73AS und BSp73ASML. Dazu musste zunächst die genomische Sequenz des Ratten C4.4A-Promotorbereichs definiert werden.

3.3 Klonierung und Sequenzierung der genomischen DNA des C4.4A-Promotors der Ratte

Zur vergleichende Untersuchung der transkriptionalen C4.4A-Regulation in der BSp73ASML und BSp73AS-Zelllinie, musste zunächst der Promotor des C4.4A-Locus identifiziert und sequenziert werden. Um einen repräsentativen Klon des C4.4A-Gens zu identifizieren, wurde zunächst ein „Screening“ einer genomischen DNA-Bibliothek der Ratte durchgeführt. Diese auf „high density gridded“-Koloniefilter geblottete „P1 derived artificial chromosome“ (PAC)-Bibliothek (712-RPCI31RPAC) wurde mit einer C4.4A-spezifischen cDNA-Sonde voller Länge hybridisiert (Rösel et al., 1998). Die positiven reagierenden PAC-Klone (P07321Q2, N13342Q2, K09257Q2, N16180Q2, J24448Q2, B07391Q2, D07308Q2, P05390Q2, N27328Q2 und E04301Q2) wurden in einem PCR-Ansatz mit C4.4A-sequenzspezifischen Primern auf die Anwesenheit des kompletten C4.4A-kodierenden Abschnitts überprüft. Drei PAC-Klone (N16180Q2, B07391Q2 und P05390Q2) waren in diesen PCRs, sowohl für das 5' als auch das 3'-Ende des C4.4A-ORFs positiv.

Diese PAC-Klone wurden zur Sequenzierung von 5Kbp genomischer Sequenz stromaufwärts des C4.4A-Translationsstart-Signals an die Genotype GmbH (Hirschhorn) weitergegeben. Das Ergebnis, 4976bp zu 99,9% fehlerfrei sequenzierter genomischer Nukleotidsequenz aus dem Promotor-Bereich des C4.4A-Gens, befindet sich in der „EMBL Nucleotide Sequenz Database“ (<http://www.ebi.ac.uk/embl/>) unter der „Accession No. AM075190“.

3.3.1 Erstellung der C4.4A-Promotorkonstrukte

Zur Identifizierung der für die Transkription von C4.4A notwendigen DNA-Abschnitte wurden CAT-Konstrukte unterschiedlicher Länge stromaufwärts des Translationsstart-Signals erstellt (Abbildung 4).

Das Promotor-defiziente und somit für Promotorsequenzuntersuchungen geeignete pBLCAT3-Plasmid war dabei das Werkzeug der Wahl. Die Übersichtskarte des Plasmids ist in Abbildung 4 schematisch dargestellt. Das pBLCAT3-Plasmid kodiert das Reportergen *Chloramphenicoltransferase* (CAT) dessen Translationsprodukt die Quantifizierung der Transkriptionsaktivität klonierter Insertionen erlaubte. Die Quantifizierung der Transkriptionsaktivität einer Promotorsequenz basiert auf der Strategie, dass nach Transfektion des Promotor-Konstrukts die Aktivierung eines spezifischen Reportergens in Abhängigkeit von der vorgeschalteten Promotorsequenz erfolgt. Der indirekte Nachweis einer eventuellen Transkriptionsaktivierung wird im Falle des CAT-Reportergens schließlich durch die Bestimmung der relativen enzymatischen Aktivität resultierender CAT-Translationsprodukte im sogenannten CAT-Assay ermittelt.

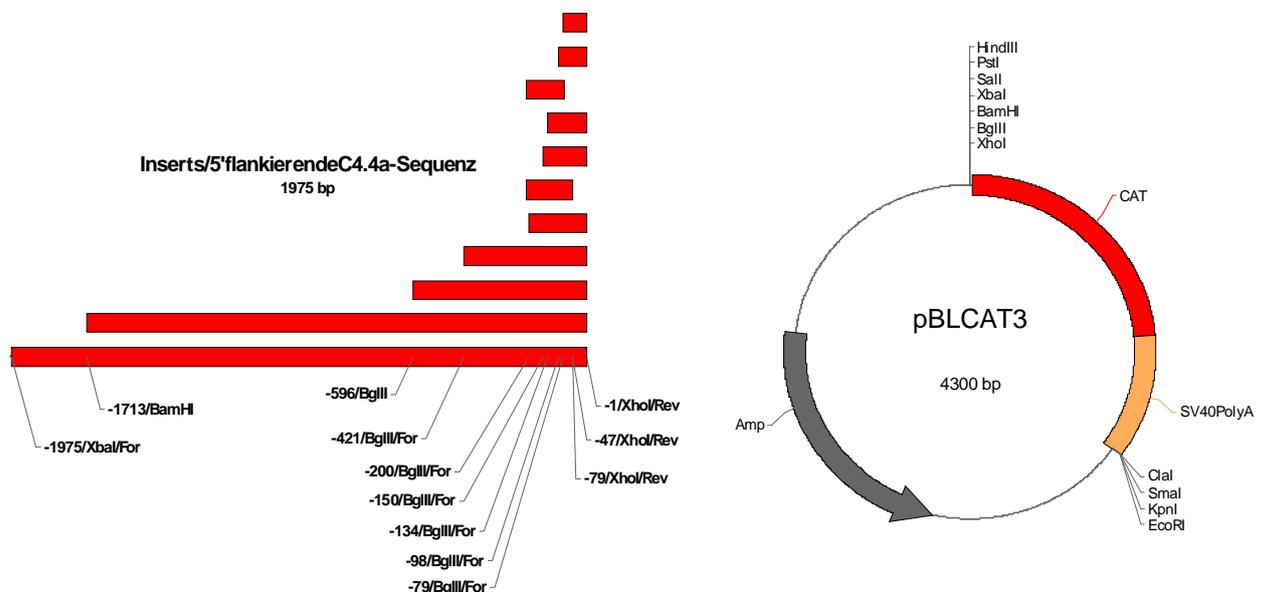


Abbildung 4: **Schematische Darstellung der generierten C4.4A-CAT-Konstrukte.** 1975bp der 5' flankierende C4.4A-Sequenz wurde an beiden Enden verkürzt. Die Position der hierfür verwendeten Primer (mit dem Kürzel For bzw. Rev markiert) als auch der Restriktionsenzyme ist in der 5' flankierenden C4.4A-Sequenz gekennzeichnet. Die daraus resultierenden DNA-Abschnitte sind schematisch als Balken dargestellt. Über die gekennzeichneten Restriktionsschnittstellen –sowohl den nativen als auch den über Primer eingeführten – wurden die DNA-Abschnitte in das Plasmid pBLCAT3 kloniert. Das Plasmid codierte ein CAT-Gen, das die Untersuchung bezüglich der Promotoraktivität der 5' flankierenden C4.4A-Sequenz ermöglichte.

Zur Untersuchung der Promotoraktivität der 5'flankierenden *C4.4A*-Sequenz wurden zunächst 1975bp schrittweise aus 5'-Richtung auf 1713bp, 596bp, 421bp, 200bp, 150bp, 134bp, 98bp bzw. 79bp verkürzt. Die 1975bp Länge umfassende Sequenz wurde durch PCR mit den Primern (-1975bp/*XbaI*/For und -1/*XhoI*/Rev) vom PAC-Klon N16180Q2 amplifiziert und über die artifiziiell eingefügten Restriktionsschnittstellen *XbaI* und *XhoI* in das pBLCAT3-Plasmid kloniert.

Ausgehend von diesem Konstrukt wurde über die nativen Restriktionsenzymstellen *BamHI* (-1713) und *BglIII* (-596) im Restriktionsverdau die Sequenz weiter verkürzt (Abbildung 4). Unter Verwendung der zweiten Restriktionsenzymstelle *XhoI* (-1) wurden diese DNA-Fragmente von 1713bp und 596bp dann in pBLCAT3 kloniert. Zur weiteren Verkürzung des DNA-Abschnitts wurden schließlich verschiedene sequenzspezifische Primer (-421/*BglIII*/For, -200/*BglIII*/For, -150/*BglIII*/For, -134/*BglIII*/For, -98/*BglIII*/For bzw. -79/*BglIII*/For) in Kombination mit dem Primer -1/*XhoI*/Rev eingesetzt. Die resultierenden PCR-Produkte wurden, nach Verdau mit *BglIII* und *XhoI*, dem *CAT*-Gen im Plasmid vorangestellt. Durch Einsatz der Kombination von reversen Primern (-47/*XhoI*/Rev und -79/*XhoI*/Rev) in Kombination mit dem Primer (-200/*BglIII*/For) wurden mittels PCR kürzere Fragmente generiert, die schließlich nach beschriebenen Vorbild zur Herstellung der *CAT*-Konstrukte -200/-47*CAT3* bzw. -200/-79*CAT3* führten.

Zudem wurde über die Primer (-200/*XbaI*/For) und (-47/*BamHI*/Rev) ein weiteres DNA-Fragment amplifiziert, dessen Restriktionsschnittstellen eine Klonierung in das pBLCAT2-Plasmid ermöglichen. Das pBLCAT2-Plasmid (Abbildung 5) unterscheidet sich von dem pBLCAT3-Plasmid im Wesentlichen durch eine Insertion eines *Tymidinkinase* (*Tk*)-Minimal-Promotors, der die Unterscheidung zwischen regulatorischen Transkriptionselementen von Core-Promotorelementen in der 5'flankierenden *C4.4A*-Sequenz ermöglichte. Die für die Sequenzmodifikationen eingesetzten Primer, ihre Position und die daraus resultierenden DNA-Abschnitte sind in Abbildung 4 dargestellt. Die Primersequenzen sind im Materialteil (Kapitel 2.6.1.2) aufgelistet.

Basierend auf den erzielten Ergebnissen von Experimenten, in denen die bisher genannten Promotorkonstrukte eingesetzt wurden (Kapitel 3.4.1), wurden später genauer definierte Regionen weiteren Untersuchungen unterworfen. Diese Untersuchungen sollten zur Identifikation von für die *C4.4A*-Promotoraktivität relevanten potentiellen „*cis acting elements*“ beitragen.

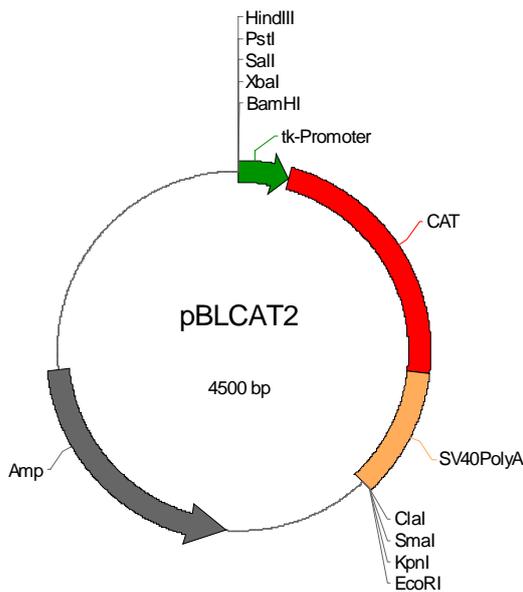


Abbildung 5: **Kartierung des pBLCAT2-Plasmids.** Das pBLCAT2-Plasmid unterscheidet sich im Wesentlichen von dem pBLCAT3-Plasmid durch einen inserierten *Tymidinkinase* (tk)-Minimalpromotor (grün dargestellt). Dieser Promotor ermöglichte die Untersuchung von Promotorsequenzen bezüglich der regulatorischen Enhancerelementen und Core-Promotorelementen.

3.3.2 Bioinformatisch gewonnene Informationen wurden zur gezielten Konstruktion von Promotorfragmenten herangezogen

Um sich einen ersten Überblick über die Struktur des *C4.4A*-Promotors verschaffen zu können, wurde der Abschnitt -150 bis -1 mit der Datenbank bereits bekannter Transkriptionsrelevanter DNA-Motive verglichen.

Hierfür wurde diese Sequenz mit dem Computersoftwareprogramm ALIBABA2.1 untersucht. Das Programm ALIBABA2.1 generiert einen Ausdruck, der detaillierte Informationen über Homologien zu bekannten *cis*-aktivierenden Nukleotidsequenz-Motiven und potentiell interagierenden Transkriptionsfaktoren beinhaltet. Die so produzierte Flut an Informationen konnte durch gezielte Auswahl relevanter Informationen erfolgreich innerhalb des Projekts kanalisiert werden. So war die *in silico*-Prognose über ALIBABA2.1 ein unerlässliches Werkzeug bei der Planung und Durchführung der in Kapitel 3.6 bzw. 3.7 beschriebenen Experimente, in denen u.a. gezielt *in-vitro*-mutagenisierte Promotorfragmente zum Einsatz kamen. Die durch *in-vitro*-Mutagenese eingeführten Modifikationen beinhalteten den Nukleotid-Austausch in potentiellen DNA-*cis*-Elementen bzw. die komplette Deletionen derselbigen. So wurde neben diversen GC-Box-Elementen an denen potentiell Sp-Proteine (Position -25 , -50) binden, auch ein *TRE*-Element (Position -74) an dem potentiell AP-1 bindet, über Nukleotidaustausch modifiziert. Besonders GC-reiche Regionen, an denen mehrere überlappende prognostiziert Sp-Bindungsstellen auftraten (Position -152 bis -139

bzw. -119 bis -88), wurden ganz entfernt. Die an der *C4.4A*-Promotorsequenz vorgenommenen Sequenzmodifikationen sind zusammengefasst in Abbildung 6 dargestellt.

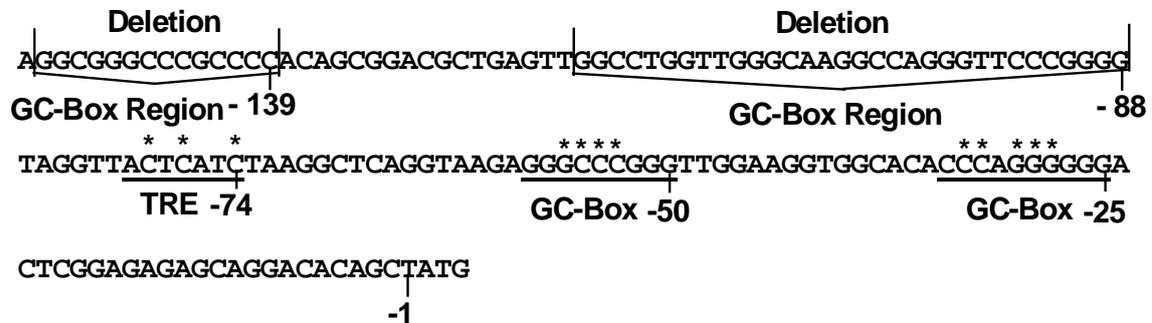


Abbildung 6: **Darstellung der Sequenzmodifikationen in der *C4.4A*-Promotorregion.** Die deletierten – GC-Box-Elemente angereicherten Regionen – sind gekennzeichnet. Stromabwärts liegende DNA-Elemente (TRE, GC-Box) sind unterstrichen dargestellt. Nukleotide, die in diesen Elementen über das Nukleotid Adenin ausgetauscht wurden, sind mit Stern markiert. Die Positionsangaben beziehen sich auf das Translationstartcodon ATG.

3.3.3 Herstellung *in vitro*-mutagenisierter Promotor-Konstrukte

Zur Einführung der Punkt-Mutationen in spezifische, zuvor durch ALIBABA2.1 identifizierte DNA-Elemente (z.B. TRE-Element, GC-Box-Elemente) war es erforderlich sequenzspezifische komplementäre Primerpaare (-25/MutGC/For, -25/MutGC/Rev; -50/MutGC/For, -50/MutGC/Rev; -74/MutTRE/For, -74/MutTRE/Rev) zur *in vitro*-Mutagenese des pBLCAT3-200bp-Konstrukts zu verwenden. Die in Abbildung 6 durch Sternchen gekennzeichneten Nukleotid-Positionen wurden jeweils durch das Nukleotid Adenin ersetzt. Die resultierenden DNA-Fragmente (-200 bis -1) wurden anschließend so restringiert, dass die die Mutation enthaltende Insertion in ein frisch präpariertes pBLCAT3-Plasmid kloniert werden konnte.

Zur Einführung von Sequenz-Deletionen wurden folgende Primersequenzen verwendet: -139/Del/For, -139/Del/Rev; -88/Del/For, -88/Del/Rev. Durch den Einsatz dieser Oligonukleotide wurden die jeweils ausgewählte Region bei der Synthese der mutagenisierten PCR-Fragmente (-200 bis -1) deletiert (Abbildung 6). Die resultierenden DNA-Fragmente wurden dann in das pBLCAT3-Plasmid eingefügt. Alle in der *in vitro*-Mutagenese verwendeten Primern sind im Kapitel 2.6.1.2 aufgeführt. Die Methode ist im Detail in Kapitel 2.17.4 beschrieben. Alle Insertionen der Promotor-CAT-Konstrukte wurden nach Fertigstellung sequenziert und in den nachfolgend beschriebenen CAT-Assays eingesetzt.

3.4 Charakterisierung des *C4.4A*-Promotors

Zur Charakterisierung des *C4.4A*-Promotors wurden zunächst die in Abbildung 4 dargestellten pBLCAT3-*C4.4A*-Promotorkonstrukte transient in BSp73ASML-Zellen transfiziert. Der Transfektion der pBLCAT3-Promotorkonstrukte folgend wurde die enzymatische Aktivität des Reporters Chloramphenicoltransferase (CAT) bestimmt, die schließlich zur Definition der relativen transkriptionellen Aktivität der verschiedenen klonierten *C4.4A*-Promotorbereiche herangezogen wurde.

Zur Bestimmung der Hintergrundaktivität wurde als Negativ-Kontrolle der leere pBLCAT3-Vektor zur Transfektion eingesetzt.

3.4.1 Der Bereich von –150 bis –1 reicht aus, um die maximale Aktivität des *C4.4A*-Promotors in BSp73ASML zu gewährleisten

Um die für die maximale Transkriptionsaktivität minimal notwendige DNA-Sequenz des *C4.4A*-Promotors zu bestimmen, wurde die dem CAT-Reportergen vorgeschaltete Sequenz sukzessive verkürzt. Diese Vorgehensweise sollte garantieren, dass sich anschließende Experimente auf einen möglichst kleinen Abschnitt der initial untersuchten ca. 2Kbp langen *C4.4A*-Promotorsequenz konzentrieren konnten. Abbildung 7 zeigt exemplarisch das Ergebnis der CAT-Assay-Experimente, die zur Bestimmung der transkriptionellen Aktivität von pCAT3-Promotorkonstrukte mit Insertionen verschiedener Längen durchgeführt wurde. Am 5'-Ende eingeführte Deletionen des Bereichs von –1975 bis –150 verursachten keine Reduktion der Promotoraktivität. Die Promotoraktivität jedes einzelnen dieser Sequenzbereiche ist ~14fache stärker als die Aktivität der Negativkontrolle. Im Folgenden wurde deshalb die Aktivität des Bereichs –1975 bis –1 mit 100% und die der Negativkontrolle mit 7% besetzt.

Eine schrittweise Reduzierung der Promotoraktivität konnte erst beobachtet werden, wenn die 5'-Grenze der untersuchten Regionen von –150 auf –79 sukzessive verkleinert wurde. Eine Sequenzverkürzung von –150 auf –134 zog eine Reduktion der transkriptionellen Aktivierung des *CAT*-Gens auf das 8,4fache zur Negativkontrolle nach sich, was einer Verringerung der Promotoraktivität von 40% entspricht. Die Deletion von weiteren 36bp, aus der eine Sequenz von nur noch 98bp Länge resultierte, reduzierte das Aktivierungspotential des Promotors auf das 5fache der Basisaktivität des pBLCAT3-Plasmids, das einer Promotoraktivität von jetzt nur noch 36% entspricht.

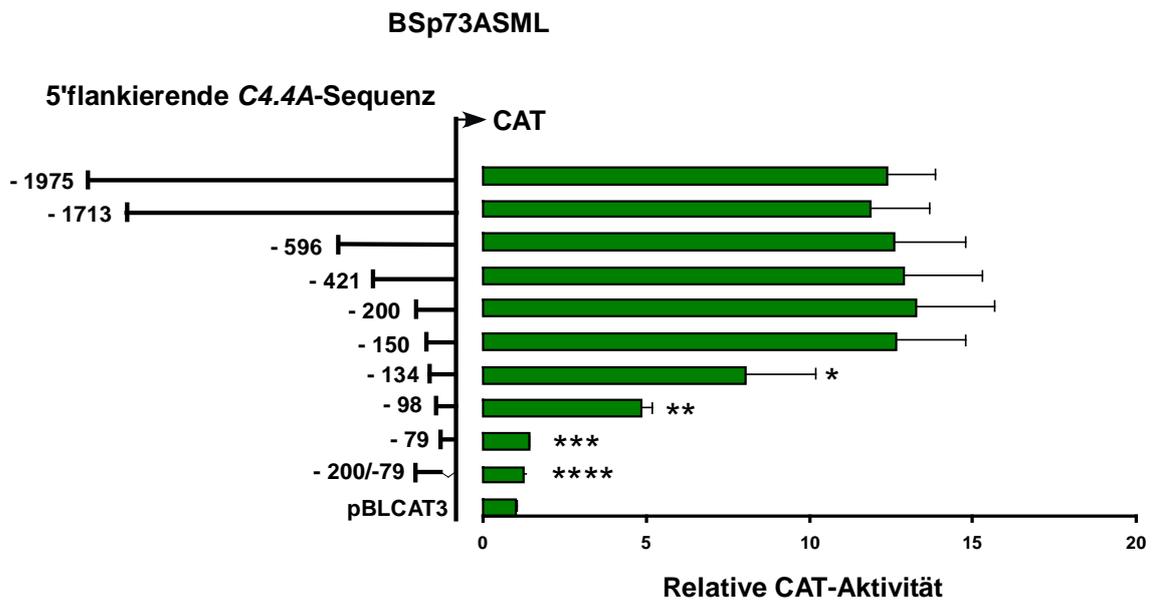


Abbildung 7: **Promotoraktivität 5'flankierender C4.4A-Sequenzen.** In pBLCAT3 klonierte 5'flankierende Sequenzen verschiedener Länge wurden zusammen mit dem pEGFP-Vektor in BSpASML ko-transfiziert und die Zellen nach 48 h lysiert. Die normalisierten Lysat-Proben wurden im CAT-Assay untersucht. In dem Diagramm ist die Promotoraktivität der transfizierten Proben dargestellt. Die Promotoraktivität wurde über die CAT-enzymatischen Substratumsetzung transfizierten Probe relativ zur Substratumsetzung der pBLCAT3-Probe ermittelt. Die Promotoraktivität wurde aus mindestens drei unabhängigen Proben bestimmt. Die statistische Analyse erfolgte über den Student's t-Test. Bei einer Irrtumswahrscheinlichkeit von $p \leq 0,05$ wurde ein signifikanter Effekt zwischen dem pBLCAT3-1975/-1-Konstrukt und den anderen Promotorkonstrukten akzeptiert ($p^* = 0,002$; $p^{**} < 0,002$; $p^{***} < 0,002$ und $p^{****} < 0,002$).

Das Promotorkonstrukt mit nur noch 79bp an C4.4A-Promotorsequenz konnte schließlich nur noch zu einer Rest-Promotoraktivität von 10% beitragen und weist somit nahezu keine Promotoraktivität mehr auf.

3.4.2 Der Abschnitt -79 bis -1 des Promotors ist für die Transkription des C4.4A-Gens essentiell

Um herauszufinden, ob die Region von -79 bis -1 für die Transkription von C4.4A essentiell notwendig sein sollte, wurde dieser DNA-Abschnitt aus einem initial 200bp Fragment des C4.4A-Promotors deletiert (pBLCAT3-200/-79). Interessanterweise konnte in diesem Experiment ebenfalls der totale Verlust der Promotoraktivität registriert werden (Abbildung

4). Betrachtet man die Ergebnisse der CAT-Assays mit den Konstrukten pBLCAT3-150/-1, pBLCAT3-134/-1, pBLCAT3-98/-1, pBLCAT3-79/-1 und pBLCAT3-200/-79, so wird deutlich, dass der Abschnitt -79 bis -1 für die Transkription des *C4.4A*-Gens essentiell ist aber nicht ausreicht, um die maximale Transkriptionsaktivität des *C4.4A*-Gen zu gewährleisten. Diese Beobachtung legt den zwingenden Schluss nahe, dass sich in diesem Abschnitt der basale Transkriptionskomplex ausbildet, der für die RNA-Polymerase II vermittelten Transkription erforderlich ist. Dagegen sind die stromaufwärts liegenden Sequenzbereiche (-150 bis -134, -134 bis -98 und -98 bis -79) offensichtlich für Modulation der *C4.4A*-Transkriptionsaktivität mitverantwortlich.

3.4.3 BSp73ASML bildet einen basalen Transkriptionkomplex in der Region -47 bis -1 des *C4.4A*-Promotors aus

Wie in der Einleitung beschrieben, wird die eukaryotische Transkription durch Enhancer-DNA-Interaktionen reguliert und durch die Ausbildung des basalen Transkriptionskomplexes an der Transkriptionsstartstelle initiiert.

Die Transkriptionsstart-Stelle von *C4.4A* konnte durch die vorausgegangenen Versuche in der Promotor-Region von -79 bis -1 lokalisiert werden. Die Größe des Fragments erschwerte jedoch eine eindeutige Sequenzhomologie-Zuordnung dieses Abschnitts zu einem der bekannten „core promoter“-Konsensussequenzen (TATA-Box, Inr-Motiv, DPE-Motiv, GC-Boxen oder BRE-Motiv). Um den DNA-Abschnitt, der an der Bildung des basalen Transkriptionskomplexes der *C4.4A*-Transkription beteiligt ist, weiter einzugrenzen, wurden ein Abschnitt von -200 bis -47 sowohl in das pBLCAT3- als auch in das pBLCAT2-Plasmid kloniert. Die Herstellung dieser mit pBLCAT3-200/-47 und pBLCAT2-200/-47 bezeichneten Konstrukte ist im Kapitel 3.3.1 beschrieben.

Der wichtigste Unterschied dieser beiden Konstrukte bestand im wesentlichen darin, dass im pBLCAT2-Konstrukt dem CAT-Reportergen ein Thymidinkinase (*Tk*)-„core promoter“-Element direkt vorgeschaltet ist (Abbildung 4 und 5). Sollte die Region -47 bis -1 den vermuteten Transkriptionsstart des *C4.4A*-Gens beinhalten, könnte man erwarten, dass das pBLCAT3-200/-47-Konstrukt keine signifikant über den Hintergrund hinausgehende CAT-Aktivität hervorruft. Dagegen sollte durch das *Tk*-„core promoter“-Element des pBLCAT2-Plasmids die Rekonstitution der CAT-Aktivität auf ein Niveau erlangt werden können, das ungefähr dem des pBLCAT3-200/-1-Konstruktes entspräche.

Zur Durchführung dieses Experiments wurden die erwähnten Konstrukte in BSp73ASML transfiziert und die normalisierten Lysate im CAT-Assay analysiert.

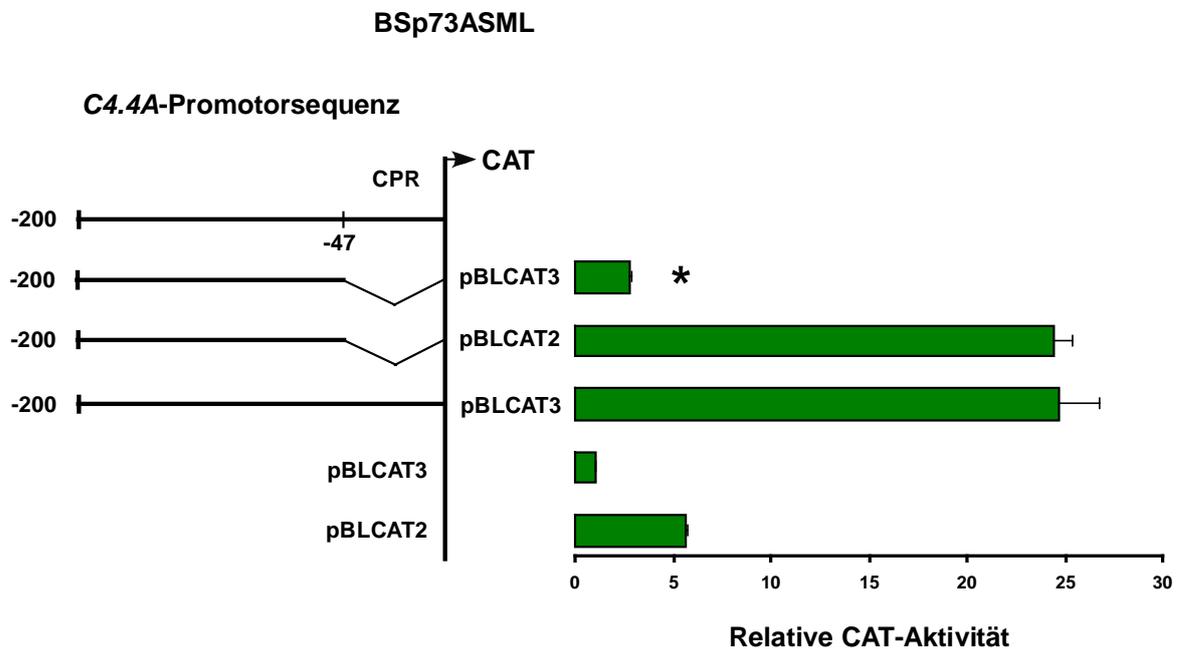


Abbildung 8: **Identifikation des basalen Transkriptionskomplexes ausbildenden „core promoter“ Region (CPR) im C4.4A-Promotor.** 47 bp der vermuteten CPR-Region wurden am 3'-Ende der 198 bp 5'flankierenden C4.4A-Sequenz deletiert und in das Reporterplasmid pBLCAT3 und in den zusätzlich ein *Tymidinkinase* (tk)-„core promotor“-Element enthaltenden pBLCAT2-Vektor kloniert. In drei unabhängigen Experimenten wurde die Promotoraktivität der Promotorkonstrukte nach transienter Transfektion in BSp73ASML ermittelt. Die Promotoraktivität der C4.4A-Promotorsequenz in den CAT-Konstrukten relativ zum pBLCAT3-Vektor ist im Diagramm dargestellt. In der Promotoraktivität signifikante Unterschiede zwischen zwei Promotorkonstrukten sind gekennzeichnet. Die statistische Analyse zeigt ein Signifikanzniveau von $p^* = 0,01$ zwischen dem pBLCAT3 und pBLCAT2-Promotorkonstrukt.

Das in Abbildung 8 dargestellte Resultat dieses Versuchs zeigt, dass die Promotoraktivität des pBLCAT3-200/-47-Konstrukts (1. Probe) nur wenig höher ist als die des leeren pBLCAT3-Plasmids (Basisaktivität; 4. Probe). Das pBLCAT2-200/-47-Konstrukt bewirkte im Vergleich dazu eine 25fache höhere Promotorintensität, die somit wieder der des nativen C4.4A-Promotor inserierten pBLCAT3-200/-1-Konstrukts entsprach (3. Probe). Die fehlende Promotoraktivität des Abschnitts von -200/-47 konnte also durch die Einführung des *Tk*-„core promotor element“ auf das Ursprungsniveau des pBLCAT3-200/-1-Konstrukts

zurückgebracht werden (Abbildung 8, Probe 2 und 3). Dieses Ergebnis lässt vermuten, dass der Transkriptionsstart des *C4.4A*-Gens in der Region $-47/-1$ lokalisiert ist.

3.4.4 Die *C4.4A*-Transkriptionsstartstelle ist höchstwahrscheinlich im Initiator-Element Position $-37/-33$ lokalisiert

Da die Kartierung des *C4.4A*-„core promoter elements“ sich nun anstatt auf 79bp auf ein Intervall von nur noch 47bp fokussierte, konnte nun ein aussagekräftiger Homologieabgleich dieser 47 Basenpaare langen Abschnittes mit verschiedenen Sequenzen bekannter „core promoter elements“ vorgenommen werden.

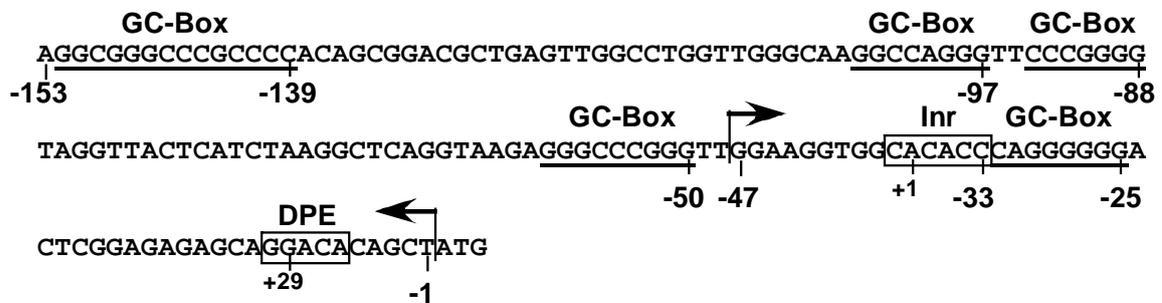


Abbildung 9: Darstellung potentieller „core promoter“-Elemente im *C4.4A*-Promotor. Die GC-Box-Motive sind unterstrichen dargestellt. Das „initiator“ (Inr) und das „downstream promoter element“ (DPE) sind gekästelt gekennzeichnet. Die Pfeile kennzeichnen die deletierte Sequenz am 3'-Ende des *C4.4A*-Promotors.

Zwar konnte kein TATA-Box-Element identifiziert werden, es besteht jedoch eine signifikante Übereinstimmung des Bereichs -47 bis -1 mit den Konsensussequenzen von Initiator (Inr) und „downstream core promoter element“ (DPE). Im *C4.4A*-Promotor ist an Position -33 bis -38 das DNA-Motiv $CA_{+1}CACC$ vorhanden, das bis auf die erste fehlende Pyrimidinbase der Inr-Konsensussequenz entspricht. 28 Nukleotide stromabwärts vom potentiellen Inr A_{+1} -Motiv (potentielle Transkriptionsstartstelle) folgt ein DPE-Motiv (-10 bis -6) mit der übereinstimmenden Konsensussequenz $GG_{+29}ACA$ (Abbildung 9). Zudem wurden mehrere GC-Boxen (-25 , -50 , -88 , -97 und -139), die potentiell bei der Ausbildung des basalen Transkriptionskomplexes unterstützende Funktion haben könnten, in der Promotorregion identifiziert (Abbildung 9).

Die zur Kartierung des *C4.4A*-„core promoter elements“ gesammelten Ergebnisse lassen den Schluss zu, dass der basale Transkriptionsapparat des *C4.4A*-Promotors sich in der Region zwischen -47 und -1 ausbildet und die Transkriptionsstartstelle wahrscheinlich im Initiator-Element Position -37 bis -31 anzusiedeln ist. Folglich sollten stromaufwärts von Position -47 die regulatorischen Transkriptionsfaktor-DNA-Interaktionen stattfinden.

3.5 Die *C4.4A*-Promotorsequenz zeigt in BSp73AS keine transkriptionelle Aktivität

Die bis hierhin erzielten Ergebnisse zeigen, dass die Varianz der *C4.4A*-Expression in den Rattentumorlinien BSp73ASML/BSp73AS nicht auf eine veränderte post-transkriptionale Regulation oder auf die Deletion des *C4.4A*-Genlokus zurückzuführen ist. Zudem konnte bewiesen werden, dass regulatorische Transkriptionsfaktoren-Bindestellen der Region zwischen -150 und -47 stromaufwärts des *C4.4A*-„core promoter elements“ für die Aktivierung des *C4.4A*-Gens regulativ beteiligt sind. Aufgrund dieser Erkenntnisse erfolgte eine detaillierte Untersuchung, welche Transkriptionsfaktoren für die transkriptionelle Aktivierung von *C4.4A*-Gens in BSp73AS bzw. BSp73ASML potentiell verantwortlich sind. Dazu wurden BSp73ASML- und BSp73AS-Zellen zunächst mit dem Promotorkonstrukt pBLCAT3-596/-1 (Abbildung 4) transient transfiziert und die normalisierten Lysate im CAT-Assay analysiert. Als Positivkontrolle wurde das CAT-Expressionsplasmid pCDNA/CAT (das *CAT*-Gen steht hier unter der Kontrolle des Cytomegalovirus-Promotors (CMV)) eingesetzt. Der leere pBLCAT3-Vektor diente wie in den vorangegangenen Experimenten als Negativkontrolle.

Abbildung 10 zeigt das Ergebnis des CAT-Experiments, das zur Bestimmung der transkriptionellen Aktivität des Konstrukts pBLCAT3-596/-1 in beiden Zelllinien durchgeführt wurde. Deutlich sind die Unterschiede zwischen den Signalintensitäten in den Spuren zu erkennen, die aus den Reaktionsansätzen von BSp73ASML bzw. BSp73AS mit pBLCAT3-596/-1 stammten (Spur 1 und 4). So war der quantifizierte Substratumsatz von BSp73AS-Zellen nach Transfektion mit pBLCAT3-596/-1 dem der Negativkontrolle des leeren pBLCAT3-Vektors äquivalent. Hingegen ergab die Quantifizierung der Signalintensitäten aus den Ansätzen, in denen Extrakte von BSp73ASML zur Verwendung kamen, eine 14fach höhere Transkriptionsaktivität des pBLCAT-596/-1-Promotorkonstrukts gegenüber der Leerkontrolle (pBLCAT3).

Die Positivkontrolle, in der das pCDNA/CAT-Konstrukt zur Verwendung kam, zeigte keinen Unterschied der *CMV*-abhängigen Promotoraktivität in BSp73AS und pBSp73ASML.

Im Gegensatz zu BSp73ASML verfügt BSp73AS also nicht über den/die für die *C4.4A*-spezifischen Transkription notwendigen Faktor/en. Alle weiteren Analysen hatten deshalb die Identifikation eines oder mehrerer dieser Faktoren zum Ziel.

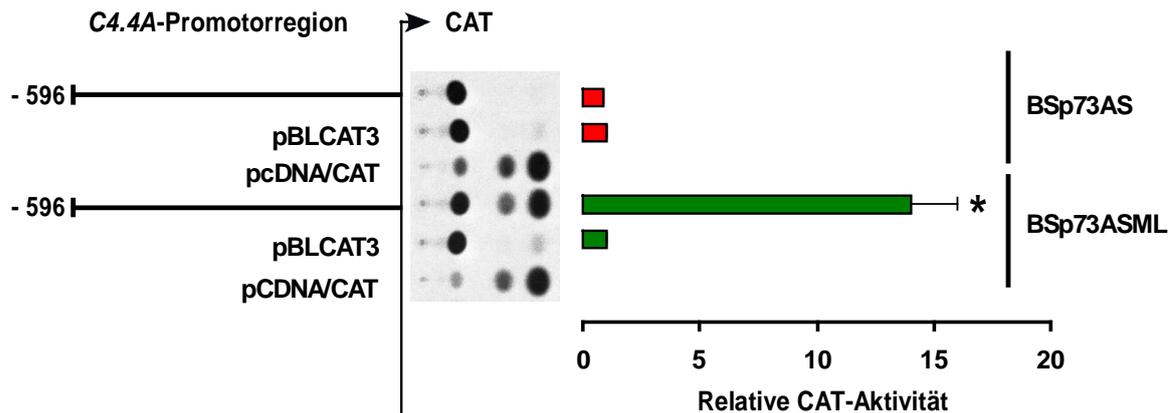


Abbildung 10: ***C4.4A*-Promotoranalyse in BSp73ASML und BSp73AS**. Der 596bp der *C4.4A*-Promotorregion enthaltende pBLCAT3-Vektor wurde zusammen mit dem pEGFP-Vektor in BSp73ASML und BSp73AS ko-transfiziert und die Zellen nach 48 h lysiert. Die Lysate über Transfektionseffizienz und Gesamtproteinkonzentration normalisiert. Die Promotoraktivität des Promotorkonstrukts wurde anschließend über die enzymatische Aktivität des CAT-Enzyms im CAT-Assay bestimmt. Als Positivkontrolle diente das CAT-Expressionsplasmid pCDNA/CAT, als Negativkontrolle der pBLCAT3-Vektor. Das Autoradiogramm zeigt die in der CAT-Reaktion entstandenen ^{14}C -markierten CAT-Produkte nach Auftrennung über Dünnschichtchromatographie. Das Diagramm zeigt die Substratumsetzung der *C4.4A*-Promotor-pBLCAT3-Probe relativ zur pBLCAT3-Probe nach quantitativer Bestimmung der CAT-Produkte im Phosphorimager. Die Promotoraktivität wurde aus drei unabhängigen Proben ermittelt. Die statistische Analyse erfolgte über den Student's t-Test. Bei einer Irrtumswahrscheinlichkeit von $p \leq 0,05$ wurde ein signifikanter Effekt akzeptiert ($p^* = 0,02$).

3.6 Ein TRE-ähnliches Element an Position -74 ist an der erhöhten Promotoraktivität in BSp73ASML beteiligt

Die Unfähigkeit der BSp73AS-Zellen, den *C4.4A*-Promotor zu aktivieren (Abbildung 10), lässt sich über das zu BSp73ASML unterschiedliche Profil von *cis*-agierenden Faktoren erklären. Die Bestimmung von solchen, alleine in BSp73ASML-Zellen vorhandenen

Transkriptions-regulatorischen Faktoren sollte durch die in diesem Kapitel beschriebenen Versuche vorangebracht werden.

Zum Verständnis des im folgenden beschriebenen Versuchsaufbaus soll nochmals kurz in Erinnerung gebracht werden, dass schrittweise Verkürzungen zwischen -150 und -79 des *C4.4A*-Promotors die Promotoraktivität in BSp73ASML signifikant reduzieren konnten (Abbildung 7). In diesem Zusammenhang ist ebenso wichtig, dass sich der basale Transkriptionsapparat im Bereich der ersten 47bp vor dem Start-ATG des *C4.4A*-Gens ausbildet (Abbildung 8).

Die Identifizierung der für die *C4.4A*-Promotoraktivität potentiell relevanten „*cis* acting elements“ wurde deshalb zunächst auf das Ergebnis der ALIBABA-Analyse des Abschnitts -150 bis -1 zurückgegriffen. Darauffolgend wurden mehrere auf dem pBLCAT3-200/-1-Konstrukt basierende Mutanten generiert, die über Nukleotid-Austausch modifizierte, „*cis* acting elements“ präsentierten. (In Abbildung 11A zusammengefasst dargestellt). Die mutierten pBLCAT3-Konstrukte pBLCAT3-25MutGC (GC-Box, Position -25), pBLCAT3-50MutGC (GC-Box, Position -50), pBLCAT3-74MutTRE (TRE-Element, Position -74) bzw. pBLCAT3-74MutTRE/-50MutGC (TRE-Element -74 und GC-Box -50) wurden in BSp73ASML transfiziert und die transkriptionsabhängigen Effekte der modifizierten DNA-Motive im CAT-Assay analysiert.

Die Ergebnisse dieser CAT-Assays sind in Abbildung 11 dargestellt. Das unveränderte pBLCAT3-200/-1-Konstrukt diente in diesem Experiment als Positivkontrolle und induzierte die 20fache Promotoraktivität im Vergleich zur Negativkontrolle (pBLCAT3) (Abbildung 11B). Das pBLCAT3-25MutGC-Promotorkonstrukt zeigte im CAT-Assay eine zum pBLCAT3-200/-1-Promotorkonstrukt äquivalente Promotoraktivität (Abbildung 11B), folglich hatte die Modifikationen im GC-Box-Element -35 bis -25 (Abbildung 11A) keinen Effekt auf die *C4.4A*-Promotorfunktion. Dieses DNA-Element ist somit nicht an der transkriptionalen Aktivierung des *C4.4A*-Gens in BSp73ASML beteiligt.

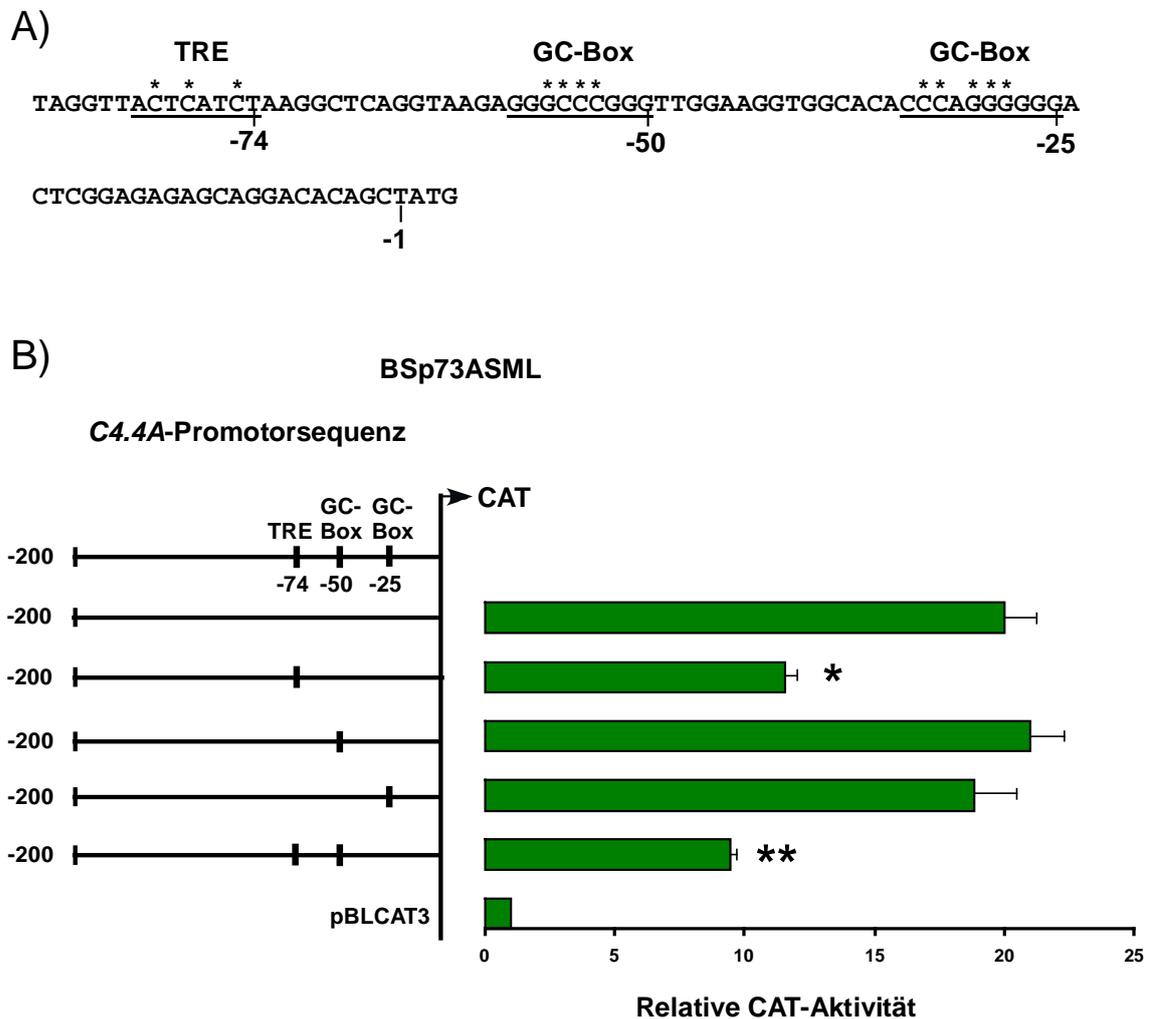


Abbildung 11: **Effekte der modifizierten „cis acting“-Elemente auf die Promotoraktivität des C4.4A-Promotors.** **A)** Die über ALIBABA 2.1 identifizierten „cis acting“-Elemente in der C4.4A-Promotorsequenz sind unterstrichen dargestellt. Die über Adenin ausgetauschte Base innerhalb der Elemente ist gekennzeichnet (Stern). **B)** Die modifizierten C4.4A-Promotorsequenzen wurden transient in BSp73ASML-Zellen transfiziert. Die Bestimmung der Promotoraktivität erfolgte im CAT-Assay. Die Promotoraktivität der aufgezeigten Promotorkonstrukte relativ zur Kontroll-Promotoraktivität des pBLCAT3-Vektors ist im Diagramm dargestellt. Die Promotoraktivität wurde aus sechs unabhängigen Proben ermittelt. Bei einer abweichenden Promotoraktivität zwischen zwei Promotorkonstrukten wurde auf einem Signifikanzniveau von $p \leq 0,05$ eine durch Modifikation verursachte Reduktion akzeptiert ($p^* = 0,0002$ und $p^{**} < 0,0002$).

Eine ähnliche Beobachtung konnte für das Promotorkonstrukt pBLCAT3-50MutGC gemacht werden. Dieses Konstrukt repräsentiert Sequenzmodifikationen in einem weiteren GC-Box-Element -50 bis -58 im C4.4A-Promotor (Abbildung 11A) und hatte bezüglich der

Promotorfunktion keinen signifikant reduzierenden Effekt (19fach erhöhte Promotoraktivität zur Negativkontrolle) (Abbildung 11B).

Anders verhielt sich das pBLCAT3-75MutTRE-Promotorkonstrukt. Dieses Konstrukt beinhaltet eine Nukleotid-Modifikationen des TRE-Elements –81 bis –74 (Abbildung 11A). Über diese Modifikation wurde die Promotoraktivität auf das 12fache (bezogen auf die Basisaktivität des pBLCAT3-Vektors) reduziert. Dies entspricht einer Rest-Promotoraktivität von 60% des Wildtyp-Konstrukts pBLCAT3-200/-1 (Abbildung 11B).

Diese Beobachtung wurden mittels der Verwendung des Konstrukts pBLCAT3-74TRE/-50GC bestätigt. Dieses Konstrukt enthielt sowohl das mutierte TRE-Element als auch die –50-GC-Box-Mutation (Abbildung 11A). Die vermittelte Promotoraktivität dieses mutanten Konstrukts betrug 10fache Promotoraktivität zur Basisaktivität und unterschied sich nicht signifikant zur vermittelten Promotoraktivität des ausschließlich TRE-Element mutierten Konstrukts (Abbildung 11B). So ist also das TRE-ähnliche Element an Position –74, nicht aber die GC-Box-Elemente der Positionen –50 bzw. –25, an der erhöhten Promotoraktivität in BSp73ASML beteiligt.

3.7 Eine GC-reiche Region an Position –120 bis –88 ist an der erhöhten Promotoraktivität in BSp73ASML beteiligt

Da die Mutation des im vorherigen Kapitel beschriebenen TRE-Elements nur eine 40%ige Reduktion der Promotoraktivität bewirken kann, müssen notwendiger Weise weitere, für 60% der Rest-Promotoraktivität verantwortliche, „*cis* acting elements“ im *C4.4A*-Promotor vorhanden sein. Zur Identifikation dieser *cis*-aktivierenden Elemente wurden hierfür die in Kapitel 3.3.3 beschriebenen pBLCAT3-120/-88Del und pBLCAT3-153/-139Del Promotorkonstrukte in BSp73ASML-Zellen transfiziert und im CAT-Assay analysiert.

Die Ergebnisse dieser CAT-Assays sind in Abbildung 12 dargestellt. Das erneut als Positivkontrolle eingesetzte pBLCAT3-200/-1 Konstrukt konnte in diesem Experiment das 22fache (100%) im Vergleich zur Hintergrundaktivität der Negativkontrolle (pBLCAT3-Vektors) produzieren. Das pBLCAT-120/-88Del Konstrukt unterschied sich von dem pBLCAT-200/-1 Konstrukts durch eine Sequenz-Deletion in einer GC-reichen Region von –120 bis –88 (Abbildung 12A). Diese Deletion verursachte eine Reduktion der Promotoraktivität auf das 7fache (auf die Basisaktivität der Negativkontrolle bezogen), welches nur noch 32% der Aktivität des Wildtyp-Kontrollvektors entsprach (Abbildung 12B).

bewirkte keinen signifikanten Effekt auf die Promotoraktivität (19fache Promotoraktivität bezogen auf die Negativkontrolle) im CAT-Assay (Abbildung 12B).

Diese Beobachtungen wurden durch ein drittes Promotorkonstrukt pBLCAT3Del1/Del2 bestätigt, welches beide Deletionen der GC-reichen Regionen repräsentierte (Abbildung 12A). Die gleichzeitige Deletion beider Abschnitte führte zu keinem signifikant kumulativen Effekt (4,5fache Aktivität) auf die Promotoraktivität (Abbildung 12B).

Diese Ergebnisse belegen, dass eine GC-reiche Region an Position -120 bis -88 an der erhöhten Promotoraktivität in BSp73ASML beteiligt ist.

3.8 Mitglieder der Sp-Transkriptionsfaktor-Familie binden in BSp73ASML nicht an die Region -108 bis -81

Wie in Abbildung 12 gezeigt, führt eine Deletion in der GC-reichen Region zwischen -120 bis -88 zu einer 68%igen Reduktion der *C4.4A*-Promotoraktivität. Um Hinweise dafür zu erhalten, ob und welche spezifischen Charakteristika der Region -120/-88 für die beobachtete Reduktion verantwortlich sein könnten, wurde die an potentiellen Sp-Bindungsstellen reiche Region -108/-81 näher untersucht. Hierfür wurde die Region auf Diskrepanzen der Interaktion der Sp-Faktorfamilie mit dem *C4.4A*-Promotor in BSp73ASML und BSp73AS untersucht. Dies erfolgte über die Anwendung des „elektrophoretic mobility shift assays“ (EMSA).

Zur Überprüfung möglicher Unterschiede von Transkriptionsfaktor-DNA-Interaktionen zwischen BSp73ASML und BSp73AS wurde ein Oligonukleotid, das die Sequenz von -108 bis -81 repräsentierte, im EMSA eingesetzt (Abbildung 13A). Als Positivkontrolle diente ein weiteres DNA-Testfragment, das eine Konsensussequenz (spezifische GC-Box) der Bindungsstelle für Mitglied der Sp-Proteinfamilie enthält.

Die radioaktiv markierten DNA-Fragmente (Kapitel 2.6.1.3) wurden mit normalisierten Nukleus-Lysaten von BSp73ASML bzw. BSp73AS inkubiert und elektrophoretisch in einem 4%igen Polyacrylamidgel aufgetrennt. In Abbildung 13 ist zu erkennen, dass die Mobilität der Sp-Konsensus-Oligonukleotids nach Behandlung mit Lysaten von BSp73ASML und BSp73AS zu gleichen Massen verringert ist (Abbildung 13B, Spur 2 und 3).

Im Vergleich ist die Mobilität des GC-Box-C4.4A-Fragments ist dagegen unbeeinträchtigt, wenn es zuvor anstelle des Lysats von BSp73ASML- mit dem Lysat von BSp73AS-Zellen inkubiert wurde (Abbildung 13B, Spur 5 und 6).

An dieser Stelle muss erwähnt werden, dass das eingesetzte Kontroll-Nukleotid potentiell in der Lage ist, verschiedene Mitglieder der Sp-Proteinfamilie zu binden – eine Tatsache, welche nicht unbedingt auch auf das GC-Box-C4.4A-Fragment zutreffen musste. Deshalb musste erwogen werden, dass der im BSp73ASML-Lysat beobachtete reduzierte Shift des GC-Box-C4.4A-Fragments im EMSA durch die Bindung nur eines Mitglieds der Sp-Proteinfamilie oder eines anderen Faktors verursacht sein könnte. Diese Problematik wurde durch den Einsatz von Antikörpern, welche gegen die Sp-Familienmitglieder Sp3, Sp2 und Sp1 gerichtet sind, in Supershift-Experimenten Rechnung getragen.

Zur näheren Charakterisierung der beobachteten Interaktionen des GC-Box-C4.4A-Fragments mit Bestandteilen des Nukleus-Lysats von BSp73ASML, wurde deshalb Nukleus-Lysat aus BSp73ASML nach Zugabe von Sp3-Antikörpern mit dem GC-Box-C4.4A-Fragment inkubiert. Zur Kontrolle der Versuchsbedingungen wurde GC-Box/Sp-Konsensus-Fragment mit dem Nukleus-Lysat aus BSpASML- und BSp73AS-Zellen mit zugegebenem Antikörper inkubiert. Nach Auftrennung der Proben, erwies sich die Mobilität des GC-Box-C4.4A-Fragments von der Sp3-Antikörper Behandlung unbeeinträchtigt (Abbildung 13B, Spur 7). Auch wurde die Bindung des Faktors an das GC-Box-C4.4A-Fragment weder von Sp1- noch von Sp2-Antikörpern im BSp73ASML-Lysat beeinträchtigt (Abbildung 13C, Spur 1-3). Die GC-Box/Sp-Sonden erhielten dagegen ihre volle Mobilität nach der Sp3-Antikörper Behandlung in beiden Lysaten zurück (Abbildung 13B, Spur 8 und 9). Hinsichtlich der Laufgeschwindigkeit von mit BSp73ASML-Kernlysaten inkubiertem, markiertem GC-Box-C4.4A-Fragment hatte die Zugabe von nicht-markiertem GC-Box/Sp-Konsensus-Fragment (Kompetitor, in 10fachem, 20fachem und 40fachem molarem Überschuss) keinen Effekt. (Abbildung 13 C, Spur 4-7).

Diese Ergebnisse belegen die Bindung eines Transkriptionsfaktors in der Region von -109 bis -81, die in BSp73AS fehlt. Obwohl diese Region Ähnlichkeiten mit bekannten GC-Box-Motiven aufweist und auch Sp3 in beiden Zelllinien in vergleichbaren Mengen vorhanden ist, konnte eine Bindung der Sp-Proteinfamilie in dieser Promotorregion nicht nachgewiesen werden.

3.9 AP-1 ist nicht an der Bindung eines *TRE*-Elements an Position –81 bis –74 des *C4.4A*-Promotors beteiligt

Wie in Abbildung 6 gezeigt, ist über Punktmutationen eines *TRE*-ähnlichen Elements an Position –74 die *C4.4A*-Promotoraktivität negativ beeinflussbar. Folglich konnte man von der durch ALIBABA-Daten gestützten Hypothese ausgehen, dass an diesem Element möglicherweise ein AP-1 Protein bindet, um eine Aktivierung des *C4.4A*-Gens in BSp73ASML zu gewährleisten (siehe auch Einleitung, Kapitel 1.10.2). Zur Charakterisierung einer potentiellen AP-1-*TRE*-Interaktion an Position –74 wurde deshalb ein DNA-Fragment synthetisiert, das der *C4.4A*-Promotorsequenz der Position –88 und –61 entspricht (*TRE-C4.4A*-Fragment) (Abbildung 10A). Als Positivkontrolle wurde ein DNA-Fragment eingesetzt, das der Sequenz zwischen –54 und –34 des murinen Matrix-Metalloproteinase (*MMP*)-1-Promotors entspricht, das ebenfalls ein *TRE*-Motiv enthält und nachgewiesen AP-1 bindet (Schorpp et. al., 1995). Die DNA-Fragmente wurden radioaktiv markiert, mit Nukleus-Lysat aus BSp73ASML- bzw. BSp73AS-Zellen inkubiert und die Proben schließlich in einem 4%igen Polyacrylamidgel elektrophoretisch aufgetrennt. Im Nukleus-Lysat aus BSp73ASML und BSp73AS interagieren AP-1-Proteine mit dem *TRE-MMP1*-Promotorfragment wie erwartet. Es ist zudem zu beobachten, dass diese Interaktion im BSp73ASML-Lysat ähnlich ausgebildet ist wie im BSp73AS-Lysat (Abbildung 14B, Spur 2 und 3). An dem *TRE-C4.4A*-Fragment bildet sich zwar eine Protein-DNA-Interaktion aus, wodurch die Mobilität des Fragments verringert wurde, sie hebt sich aber im Vergleich zum *TRE-MMP1*-Fragment bezüglich des Mobilitätsverhaltens signifikant ab (Abbildung 14, Spur 5 und 6). Es besteht somit Grund zur Annahme, dass AP-1 nicht an das *TRE*-Motiv im *C4.4A*-Promotorfragment bindet.

3.10 C/EBP β und JunD sind für die differentielle Expression von *C4.4A* entscheidend mitverantwortlich

3.10.1 Das *CCAAT*-Element an Position –85 bis –81 bindet den Transkriptionsfaktor C/EBP

Den im vorangegangenen Kapitel beschriebenen Experimenten folgend, wurde der Abschnitt –81 bis –85 einer genaueren Analyse unterzogen. Dieser Abschnitt wurde ausgewählt, da die

ALIBABA-*in-silico*-Daten besagten, dass an dieser Position der *C4.4A*-Promotorsequenz ein mit dem *TRE*-Element (-81/-74) überlappendes *CCAAT*-Motiv lokalisiert ist (Abbildung 14A). Dieses *CCAAT*-Motiv könnte somit als potentielle Bindestelle für das *CCAAT*-, „enhancer binding protein“ (*C/EBP*) β dienen.

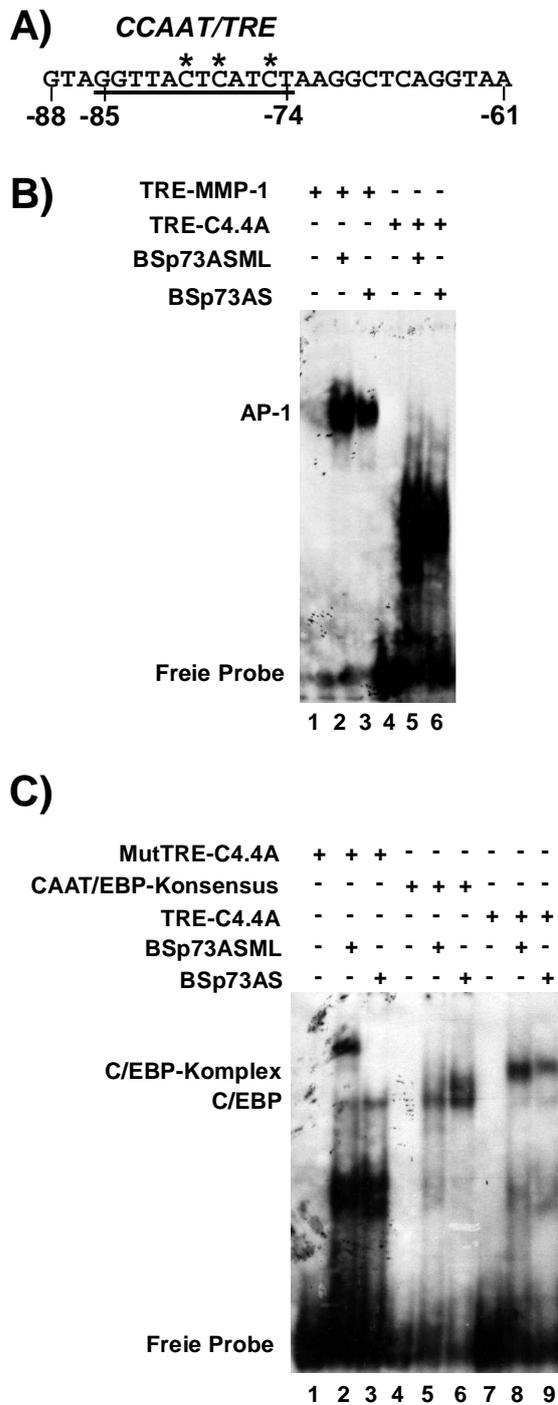


Abbildung 14: Affinität von C/EBP zu einem CCAAT-Element im C4.4A-Promotor unterscheidet sich signifikant.

A) Das überlappende *CCAAT/TRE*-Element im *C4.4A*-Promotorfragment zwischen -88 und -61 ist unterstrichen dargestellt. Die durch Adenin ausgetauschte Base im *TRE*-Element ist gekennzeichnet (Stern). **B)** Das Promotorfragment zwischen -88 und -61 des *C4.4A*-Promotors (*TRE-C4.4A*) wurde markiert und als Probe im EMSA mit Nukleus-Extrakten aus BSp73ASML und BSp73AS eingesetzt. Als Kontrolle der potentiellen AP-1-Bindung an das *C4.4A-TRE*-Motiv an Position -74 wurde ein markiertes DNA-Fragment eingesetzt, das der Sequenz zwischen -54 und -34 des murinen *Matrix-Metalloproteinase (MMP)*-1-Promotors entsprach und ein *TRE*-Motiv enthielt. Die Proben wurden in einem 4%igen Polyacrylamidgel aufgetrennt und die Faktor-DNA-Interaktionen im Autoradiogramm gezeigt. **C)** Zur Charakterisierung des Protein-DNA-Komplexes zwischen -88 und -61 an den *C4.4A*-Promotor wurde zum *TRE-C4.4A*-Fragment noch ein weiteres markiertes DNA-Fragment eingesetzt, das die *C/EBP*-Konsensus-Sequenz *CCAAT* enthielt (*CAAT/EBP*-Konsensus). Das Promotorfragment zwischen -88 und -61 wurde im *TRE*-Element darüber hinaus punktmutiert (*MutTRE-C4.4A*). Die markierten DNA-Fragmente mit Kern-Extrakt aus BSp73ASML und BSp73AS inkubiert und in einem 6%igen Polyacrylamidgel aufgetrennt. Das Experiment wurde wiederholt und die Protein-DNA-Interaktionen sind in einem repräsentativen Autoradiogramm dargestellt.

Zur Bestimmung potentieller Faktor-Bindungen in diesem Bereich des Promotors wurden neben dem TRE-C4.4A-Fragment noch andere DNA-Fragmente synthetisiert, die zum einen die Konsensus-Bindungssequenz (CCAAT) der C/EBP-Proteine (CAAT/EBP-Konsensus) und zum anderen Punktmutationen im *TRE*-Element (Position -80, -78, -75; MutTRE-C4.4A) enthielten. Die DNA-Fragmente wurden radioaktiv markiert, jeweils mit Nukleus-Lysat von BSp73ASML bzw. BSp73AS inkubiert und die Proben in einem 6%igen Polyacrylamidgel elektrophoretisch aufgetrennt. Die Ergebnisse dieses EMSA-Experiments sind in Abbildung 14C dargestellt. An dem MutTRE-C4.4A-Fragment bildet sich eine Faktor-DNA-Interaktion aus (Abbildung 14C, Spur 2 und 3), dessen Mobilitäten mit dem der CAAT/EBP-Konsensus-Fragmente korrespondieren (Abbildung 14C, Spur 5 und 6). Die Mobilität des Wildtyp-TRE-C4.4A-Fragments unterscheidet sich hingegen von diesen deutlich. Der an TRE-C4.4A bindende Proteinkomplex verursacht im Vergleich zu MutTRE-C4.4A jeweils einen „shift“ nach oben (Abbildung 14C, Spur 7 und 8).

Darüber hinaus wurden weitere Unterschiede beim Vergleich von BSp73ASML- und BSp73AS-Lysat beobachtet. In den CAAT/EBP-Konsensus-Proben ist die Proteininteraktion im BSp73AS-Lysat verstärkt gegenüber dem BSp73ASML-Lysat ausgebildet (Abbildung 14C, Spur 5 und 6), während in den TRE-C4.4A-Proben die Proteininteraktion im Vergleich zum BSp73ASML-Lysat im BSp73AS-Lysat gehemmt ist (Abbildung 14C, Spur 8 und 9).

Diese Ergebnisse erlauben es, die Arbeitshypothese aufzustellen, dass sich in der *C4.4A*-Promotorsequenz unter Beteiligung von C/EBP ein Proteinkomplex am *CCAAT/TRE*-Element -85/-74 ausbildet, dessen Zusammensetzung sich aber in den Zelllinien BSp73AS und BSp73ASML unterscheidet. Diese Ergebnisse stellen somit einen ersten konkreten Hinweis auf die Existenz eines spezifischen Transkriptionsfaktors dar, der für die transkriptionale Aktivierung des *C4.4A*-Gens in BSp73ASML mitverantwortlich sein könnte.

3.10.2 Ausschließlich in BSp73ASML bindet C/EBP β im Komplex mit JunD an ein CCAAT/TRE-Motiv (-85/-74) im C4.4A-Promotor

Im Folgenden wurde der zuvor identifizierte C/EBP-Komplex weiter charakterisiert. Wie bereits in der Einleitung beschrieben, kann die Zusammensetzung der Proteine, die an der Ausbildung eines C/EBP-Komplexes beteiligt sind, stark variieren.

Hinsichtlich der C/EBP-Bindung an das *CCAAT*-Motiv an Position -85/-81 und mit Rücksicht auf die variable C/EBP-Komplex-Bindung an TRE-C4.4A- (das den Erkenntnissen folgend jetzt als CAAT/TRE-C4.4A bezeichnet wird) und MutTRE-C4.4A-Fragment könnte

beispielsweise ein Komplex bestehend aus C/EBP- und AP-1-Proteinfamilienmitgliedern für die Regulation des *C4.4A*-Gens beteiligt sein.

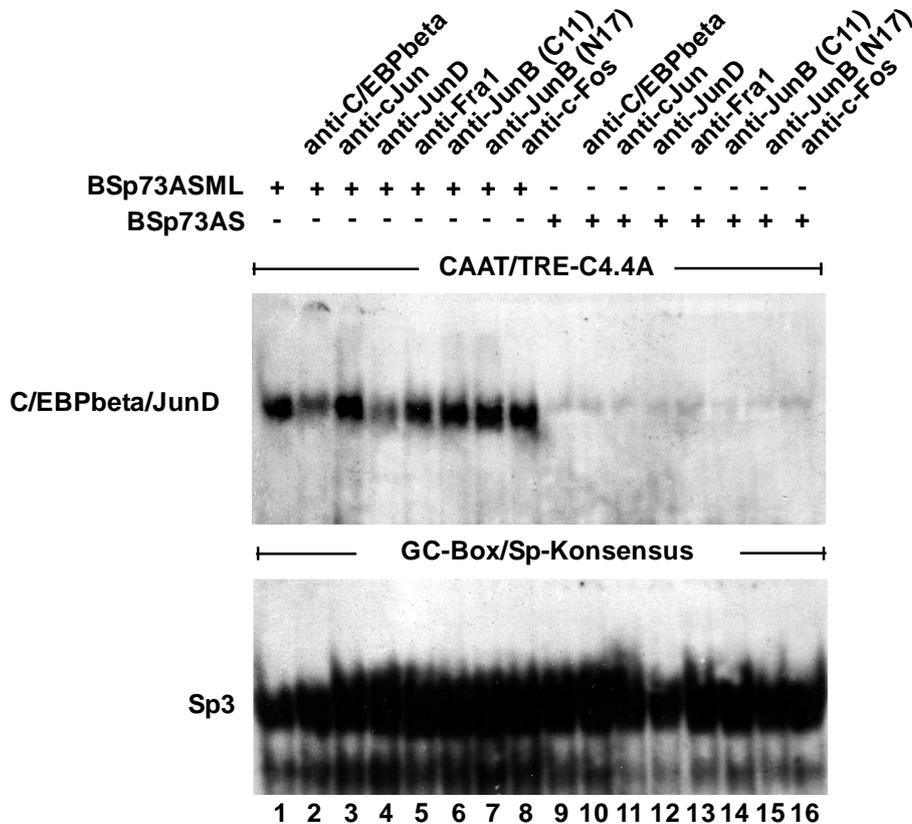


Abbildung 15: C/EBP β und JunD binden im Komplex an ein überlappendes CCAAT/TRE-Motiv zwischen -85 und -74 an den *C4.4A*-Promotor. Das *C4.4A*-Promotorfragment zwischen -88 und -61 (CAAT/TRE-C4.4A) wurde markiert und mit Kern-Extrakt aus BSp73ASML und BSp73AS nach 2 μ g Antikörperzugabe (α -C/EBP β , α -c-Jun, α -JunD, α -Fra-1, α -JunB, α -c-Fos) inkubiert und im EMSA aufgetrennt. Als Kontrollen dienten das GC-Box/Sp-Konsensus-Fragment und Antikörper unbehandelte Proben. Das Experiment wurde zweimal wiederholt und ein repräsentative Autoradiogramm gezeigt.

Die Charakterisierung des C/EBP-Komplexes am CCAAT/TRE-Element erfolgte im EMSA. Dazu wurden Nukleus-Lysate mit spezifisch gegen C/EBP β , c-Jun, JunD, Fra-1, JunB bzw. c-Fos gerichteten Antikörper vorbehandelt und mit markierten CAAT/TRE-C4.4A- und GC-Box/Sp-Konsensus-Fragment inkubiert. Das GC-Box/Sp-Konsensus-Fragments diente in diesem Experiment als Kontrolle. Die Vergleichbarkeit der Bindung von Sp3 im BSp73ASML- bzw. BSp73AS-Lysat am GC-Box-Motiv dieses Fragments wurde bereits gezeigt (Abbildung 13B).

Die Ergebnisse dieses Experiments sind in Abbildung 15 dargestellt. Wie erwartet, hatte die Behandlung mit den verschiedenen Antikörpern keinen Effekt auf die Reduktion der Mobilitäten des GC-Box/Sp-Konsensus-Fragments in den BSp73ASML bzw. BSp73AS-Lysaten. Zudem war die Reduzierung der Mobilität des GC-Box/Sp-Konsensus-Fragments vergleichbar zwischen BSp73AS und BSp73ASML-Lysat ausgeprägt (Abbildung 15, Spur 1-16). Demgegenüber vermochte das BSp73AS-Lysat, das CAAT/TRE-C4.4A-Fragments in seiner Mobilität nicht zu beeinflussen. Das BSp73ASML-Lysat war dagegen durchaus in der Lage, die Mobilität dieses Fragments zu reduzieren (Abbildung 15, Spur 1-16). Bezüglich der Antikörperbehandlung ist zu beobachten, dass ausschließlich C/EBP β und JunD spezifische Antikörper die Mobilität des CAAT/TRE-C4.4A-Fragment im BSp73ASML-Lysat erhöhten (Abbildung 15, Spur 2 und 4).

Somit kann davon ausgegangen werden, dass zwar im BSp73ASML- nicht aber im BSp73AS-Lysat C/EBP β und JunD an die überlappenden CAAT/TRE-Elemente zwischen -85 und -74 der C4.4A-Promotorsequenz binden.

3.10.3 In BSp73ASML wird eine C/EBP-JunD-Komplex-Bindung durch CCAAT- und TRE-Elemente vermittelt

Wie im vorangegangenen Kapitel gezeigt, bindet C/EBP β und JunD an das CCAAT/TRE-Element zwischen -85 und -74 des C4.4A-Promotor von BSp73ASML. Deshalb sollte diese Komplex-Bindung über Inkubation mit Nukleus-Lysat aus BSp73ASML mit markiertem CAAT/TRE-C4.4A-Fragment näher charakterisiert werden. Dazu wurde ein EMSA mit zunehmender Mengen von unmarkierten CAAT/EBP-Konsensus-, TRE-MMP-1- (Matrix-Metalloprotease-1-Promotorfragment) bzw. MutTRE-MMP-1-Kompetitor-Fragment durchgeführt. Ein Überschuss an Konsensus-Fragmenten (CAAT/EBP-Konsensus, TRE-MMP1), sollte eine potentielle Bindung des C/EBP β -JunD-Komplexes an das markierte CAAT/TRE-C4.4A-Fragment kompensieren können. Das unmarkierte MutTRE-MMP-1-Fragment sollte dagegen keinen kompetitiven Effekt auf eine etwaige Bindung des C/EBP β -JunD-Komplex haben.

Die Ergebnisse dieses Experiments sind in Abbildung 16 dargestellt. Die Mobilität des CAAT/TRE-C4.4A-Fragments wurde in Anwesenheit von BSp73ASML-Lysat durch die Zugabe von 2, 4, 8 bzw. 10facher molekularer Menge von TRE-MMP-1-Promotorfragment schrittweise gesteigert (Abbildung 16, Spur 2-6). Dagegen konnte eine Zugabe gleicher Mengen MutTRE/MMP-1-Fragment die Mobilität des CAAT/TRE-C4.4A-Fragments nicht

beeinflussen (Abbildung 16, Spur 7-10). Die Zugabe von jeweils 5, 10, 20 und 40facher molekularer Menge von CAAT/EBP-Konsensusfragment erhöhte ebenfalls mengenabhängig die Mobilität des CAAT/TRE-C4.4A-Fragments (Abbildung 16, Spur 12-15).

Diese Ergebnisse weisen deutlich darauf hin, dass sich in BSp73ASML ein aus C/EBP β -JunD bestehender Komplex zwischen der Position -81 und -74 des *C4.4A*-Promotors ausbildet.

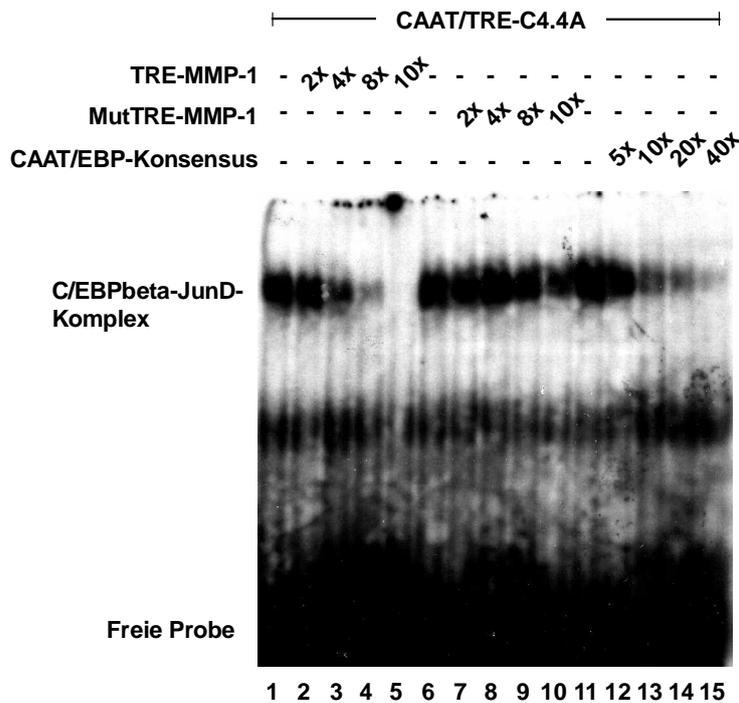


Abbildung 16: **Bindung von C/EBP β und JunD an das CCAAT/TRE-Motiv im C4.4A-Promotorfragment ist kompensierbar.** In einem Kompetitions-Assay wurde markiertes CAAT/TRE-C4.4A-Fragment mit Nuklear-Extrakt aus BSp73ASML inkubiert. Nachdem ansteigende Menge von nicht-markiertem TRE-MMP-1-, MutTRE-MMP1- und CAAT/EBP-Konsensus-Fragment zugegeben wurden. Die Proben wurden in einem 6%igen Polyacrylamidgel im EMSA aufgetrennt. Das Experiment wurde zweimal wiederholt und die repräsentativen Ergebnisse der Faktor-DNA-Interaktion im Autoradiogramm gezeigt.

3.10.4 C/EBP β und JunD erhöhen die Aktivität des *C4.4A*-Promotors durch die Interaktion mit einem CCAAT/TRE-Element an Position $-85/-74$ in BSp73ASML

Wie die EMSA-Analysen in den vorangegangenen Kapiteln zeigten, bindet C/EBP β und JunD über ein überlappendes CCAAT/TRE-Element (Position $-85/-74$) an die *C4.4A*-Sequenz

(Abbildung 15). Darüber hinaus reduzierten Punktmutationen in diesem *TRE*-Element die Promotoraktivität (Abbildung 11).

Ist die Bindung von C/EBP β und JunD hinsichtlich der Aktivierung des *C4.4A*-Gens funktional relevant, sollten C/EBP β und JunD-kodierende Expressionsplasmide die *C4.4A*-Promotorsequenz aktivieren können. Deshalb folgte eine genauere Untersuchung des *C4.4A*-spezifischen Aktivierungspotentials von C/EBP β und JunD anhand von Ko-Expressionsanalysen. Dazu wurden BSp73ASML-Zellen sowohl mit den *C4.4A*-Promotor-CAT-Konstrukten pBLCAT3-150/-1 bzw. pBLCAT3-74MutTRE (Kapitel 3.3) als auch mit Transkriptionsfaktor-kodierenden Expressionsplasmiden ko-transfiziert.

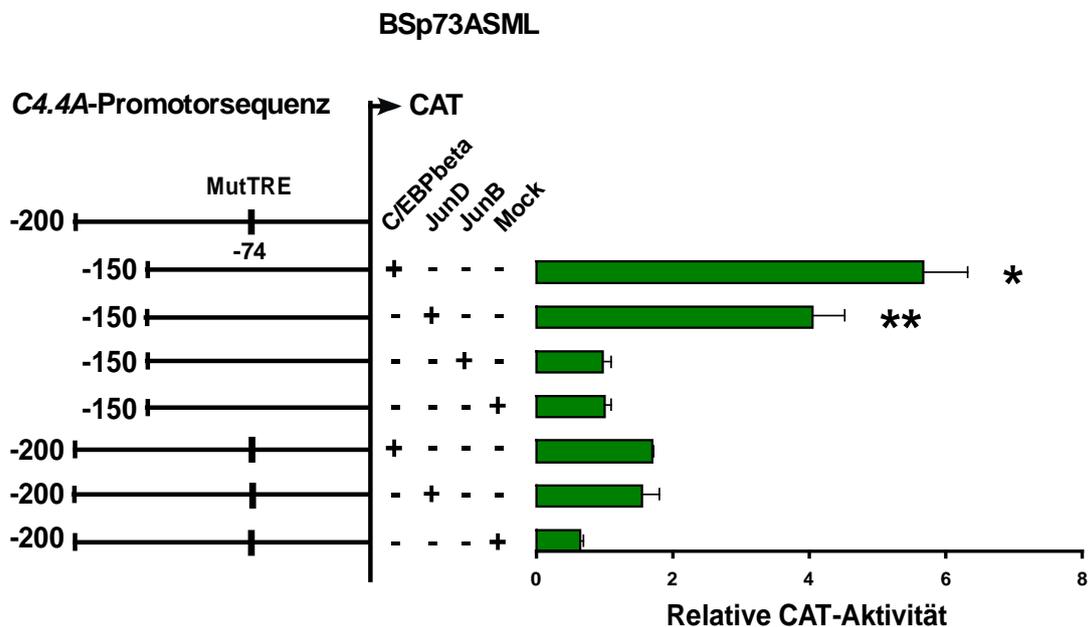


Abbildung 17: C/EBP β und JunD aktivieren den *C4.4A*-Promotor über Bindung an das *CCAAT/TRE*-Element Position -74. Das pBLCAT3-150/-1 bzw. pBLCAT3-74MutTRE Promotorkonstrukt wurde mit C/EBP β - oder JunD-kodierende Expressionsplasmid in BSp73ASML ko-transfiziert. Der pCDNA3-Leervektor (Mock) und das JunB-kodierende Expressionsplasmid dienten als Negativkontrollen. Die Promotorkonstrukte und die ko-transfizierten Expressionsplasmide sind dargestellt. Die Promotoraktivität der Promotorkonstrukte transfizierten Proben wurde anschließend über die enzymatische Aktivität des CAT-Enzyms im CAT-Assay bestimmt. Das Diagramm zeigt die Substratumsetzung der *C4.4A*-Promotor-CAT3-Proben relativ zur Mock-Probe nach quantitativer Bestimmung der CAT-Produkte im Phosphorimager. Die Promotoraktivität wurde aus drei unabhängigen Proben ermittelt. Signifikante Unterschiede der untersuchten Proben bezüglich der Promotoraktivität zur Mock-Probe sind durch Stern(e) gekennzeichnet ($p^* < 0,0003$, $p^{**} = 0,0003$).

Dazu muss erwähnt werden, dass die verwendeten Expressionsplasmide auch einige humane Homologe kodieren. Die Überexpression speziessfremder Proteine stellt jedoch in diesem Falle kein Problem hinsichtlich der Aussagekraft der erzielten Ergebnisse dar, da die phylogenetisch eng verwandten Transkriptionsfaktoren sowohl strukturell als auch funktionell stark konserviert sind.

Das JunB-kodierende Expressionsplasmid und der pCDNA3-Leervektor (Mock) dienen in diesem Experiment als Negativkontrollen. Daraufhin wurden die Effekte der ektopischen Expression eingesetzter Transkriptionsfaktoren auf die Promotoraktivität im CAT-Assay analysiert.

Die Ergebnisse dieses Experiments sind in Abbildung 17 ersichtlich. Die ektopische Expression von C/EBP β steigert signifikant die Promotoraktivität des Wildtyp-Konstrukts pBLCAT3-150/-1 um das 5,5fache im Vergleich zur Mock-Kontrollprobe (Abbildung 17, 1. und 4. Probe). Die ektopische Expression von JunD bewirkte im Vergleich zum pCDNA3-Leervektor eine signifikante 4fache Erhöhung der Promotoraktivität der ko-transfizierten pBLCAT3-150/-1-Probe (Abbildung 17, 2. Probe). Demgegenüber konnte die eingesetzte JunB-Expressionsplasmid-Negativkontrolle die Promotoraktivität des pBLCAT3-150/-1-Konstrukts erwartungsgemäß nicht erhöhen (Abbildung 17, 3. Probe). Die von C/EBP β bzw. JunD hervorgerufenen *C4.4A*-Promotor-aktivierenden signifikanten Effekte auf das Wildtyp-Promotorkonstrukt traten bei Verwendung des im TRE-Element (Position -81/-74) mutierten Promotorkonstrukts pBLCAT3-74MutTRE nicht auf. So konnte weder C/EBP β noch JunD signifikant die Promotoraktivität des pBLCAT3-74MutTRE-Konstrukts über die Basisaktivität hinaus aktivieren (Abbildung 17, Probe 5 und 6).

Diese Ergebnisse sind Beleg für die Richtigkeit der Vermutung, dass eine Regulation des *C4.4A*-Promotors über die Interaktion von C/EBP β und JunD mit einem *CAAT/TRE*-Element Position -85/-74 der Promotorsequenz stattfindet.

3.10.5 Die ektopische Expression von C/EBP β und JunD aktiviert den *C4.4A*-Promotor in BSp73AS um das 42fache

Die in das Reporterplasmid pBLCAT3 klonierte *C4.4A*-Promotorsequenz zeigte alleine in BSp73ASML nicht aber in BSp73AS Promotoraktivität (Abbildung 10).

Weitere, zuvor beschriebene Ergebnisse sprechen für die durch ein *CCAAT/TRE*-Element (Position -85/-74) vermittelte Beteiligung von C/EBP β und JunD speziell an der Aktivierung des *C4.4A*-Promotors in BSp73ASML (Abbildung 17). Zur Überprüfung der Aussagekraft

dieser Beobachtungen, wurde deshalb untersucht, ob die ektopische Expression dieser beiden Transkriptionsfaktoren einen positiven Einfluss auf die Aktivität des *C4.4A*-Promotors in BSp73AS auszuüben in der Lage ist.

Deshalb wurden BSp73AS-Zellen mit einem 150bp enthaltenden *C4.4A*-CAT3-Konstrukt (pBLCAT3-150/-1) sowie mit C/EBP β - und/oder JunD kodierenden Expressionsplasmiden ko-transfiziert. Die durch diese Behandlung speziell in BSp73AS hervorgerufenen Effekte, wurden über CAT-Assays analysiert.

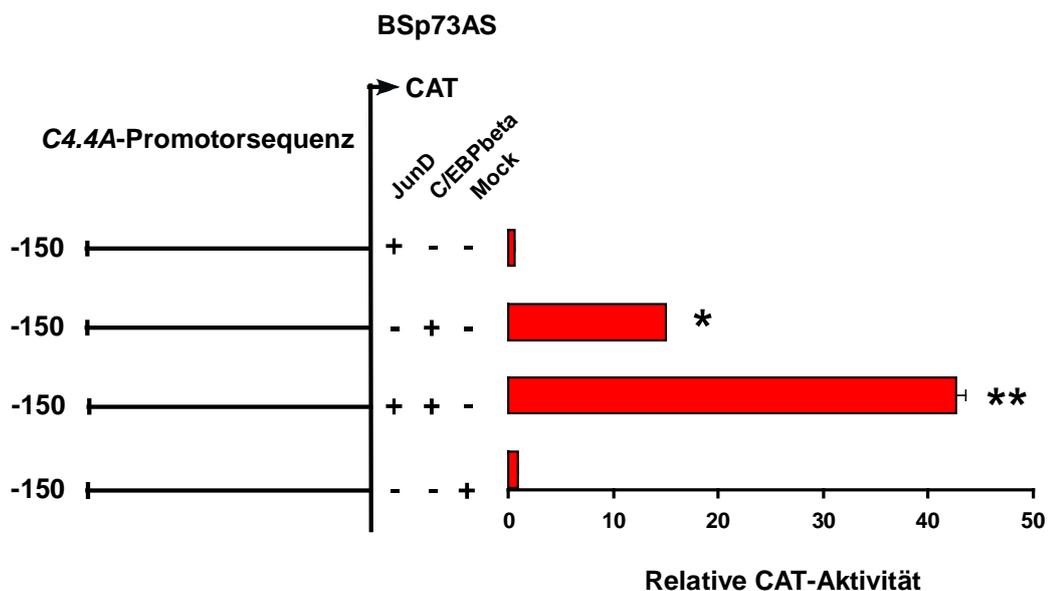


Abbildung 18: **Ektopische Expression von C/EBP β und JunD aktivieren den *C4.4A*-Promotor in BSp73AS.** BSp73AS-Zellen wurden mit dem pBLCAT3-150/-1-Promotorkonstrukt und C/EBP β und/oder JunD kodierenden Expressionsplasmid ko-transfiziert. Mit pCDNA3-Leervektor transfizierte Zellen dienten als Kontrolle (Mock). Die Promotoraktivität der transfizierten normalisierten Proben wurde anschließend über die enzymatische Aktivität des CAT-Enzyms im CAT-Assay bestimmt. Das Diagramm zeigt den Effekte der ektopischen Expression von C/EBP β und JunD relativ zur Mock-Probe auf den *C4.4A*-Promotor. Die Promotoraktivität wurde aus vier unabhängigen Proben ermittelt. $p^* = 0,002$ beschreibt den signifikanten Effekt zwischen den Mock-Proben zu dem Expressionplasmid C/EBP β , und $p^{**} = 0,02$ das der C/EBP β -Proben zu C/EBP β und JunD transfizierter Proben.

Als Negativkontrolle zu den Expressionsplasmiden diene auch in diesem Experiment der pCDNA3-Leervektor (Mock). Die Menge an acetyliertem CAT-Produkt unterschied sich in zuvor mit JunD-transfizierten BSp73AS-Zellen nicht von den Mock-transfizierten Zellen (Abbildung 18, Probe 1 und 4). Jedoch konnte in BSp73AS-Zellen nach ko-Transfektion von *C4.4A*-CAT3-Konstrukt und C/EBP β -Expressionsplasmid eine 15fache erhöhte Intensität der

durch CAT-Reaktionsprodukte hervorgerufenen radioaktiven Signale gegenüber der Negativkontrolle gemessen werden (Abbildung 18, Probe 2 und 4). Das Aktivierungspotential von C/EBP β auf den *C4.4A*-Promotor konnte darüber hinaus noch über JunD um das 2,8fache gesteigert werden (Abbildung 18, Probe 3).

Die ektopische Expression von C/EBP β und JunD konnte somit die Aktivität des *C4.4A*-Promotors in BSp73AS um das 42fache erhöhen.

3.11 Ektopisch exprimiertes Sp3 aktiviert den *C4.4A*-Promotor (-150 bis -1) in BSp73ASML und BS73pAS

Zuvor wurde erwähnt, dass keines der bisher untersuchten Mitglieder der Familie der Sp-Transkriptionsfaktoren (Sp1, Sp2 bzw. Sp3) mit dem Promotorfragment an Position -109 bis -81 interagiert (Abbildung 13). Da dieser DNA-Abschnitt allerdings zu kurz ist, um eine endgültige Aussage über den Einfluss von Sp-Proteinen auf die *C4.4A*-Promotoraktivität zuzulassen, wurde die Fragestellung der Sp-abhängigen *C4.4A*-Aktivierung durch einen alternativen experimentellen Ansatz adressiert.

Hierfür wurde das pBLCAT3-150/-1-Promotorkonstrukt mit Sp1-, Sp2-, Sp3- bzw. Sp4-kodierenden Expressionsplasmiden ko-transfiziert. Die in so transfizierten BSp73ASML-Zellen beobachteten Effekte auf die Aktivität der Chloramphenicoltransferase wurden im CAT-Assay quantifiziert. Die mit jeweils Sp1-, Sp2- bzw. Sp4-Expressionsplasmiden transfizierten Proben zeigten keinen Effekt hinsichtlich der Mengen gebildeter Reaktionsprodukte (Abbildung 19A). Dagegen folgte der Transfektion von BSp73ASML mit Sp3 eine Aktivierung des *C4.4A*-Promotors auf das 3fache der Basispromotoraktivität (pCDNA3-Negativkontrolle) (Abbildung 19A). Auch in Sp3-transfizierten BSp73AS-Zellen konnte ein um einen ähnlichen Faktor (2,5) erhöhter Substratumsatz der Chloramphenicoltransferase festgestellt werden (Abbildung 19B).

Dieses Experiment zeigt, dass ektopisch exprimiertes Sp3 ein Aktivierungspotential auf die *C4.4A*-Promotorsequenz (-150 bis -1) ausübt.

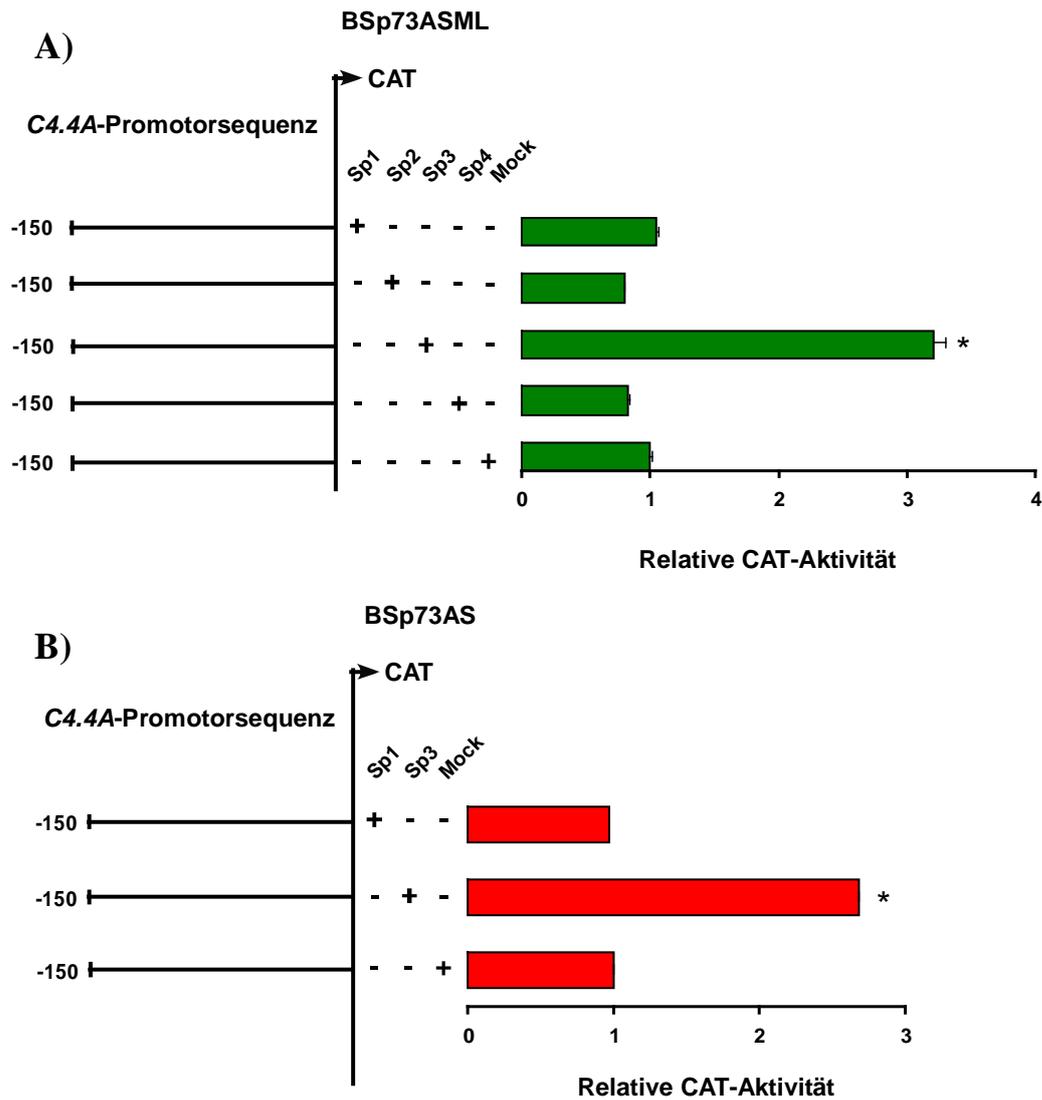


Abbildung 19: Ektopisch exprimiertes Sp3 aktiviert den *C4.4A*-Promotor in **BSp73ASML** und **BSp73AS**. **A)** BSp73ASML-Zellen wurden mit dem pBLCAT3-150/-1-Promotorkonstrukt und dem Sp-kodierenden Expressionsplasmid (Sp1, Sp2, Sp3 oder Sp4) ko-transfiziert. **B)** Ebenso BSp73AS-Zellen mit dem Sp1- oder Sp3-kodierenden Expressionsplasmid. **A) und B)** Die mit pCDNA3-Leervektor transfizierten Zellen dienten als Negativkontrolle (Mock). Das Diagramm zeigt die prozentuale Substratumsetzung der mit dem *C4.4A*-Promotorkonstrukt ko-transfizierten Expressionsplasmidproben relativ zu den Mock-Proben nach quantitativer Bestimmung der CAT-Produkte im Phosphorimager. Die Promotoraktivität wurde aus drei unabhängigen Proben ermittelt (geringe Abweichungen zwischen den Werten resultierte in nicht sichtbaren Fehlerbalken). Die signifikanten Effekte in diesem Experiment zwischen den Mock-Kontrollproben und kodierenden Expressionsplasmidproben sind gekennzeichnet ($p^*_A = 0,001$, $p^*_B = 0,005$).

3.12 Herstellung eines *C4.4A* Maus k.o.-Konstruktes

Um neben den Metastasierungs-assoziierten Funktionen das physiologisches Funktionsspektrum von *C4.4A* zu untersuchen, wurde die Konstruktion einer *C4.4A*-„knock out“(k.o.)-Maus in Angriff genommen. Dieses Maus-Modell sollte zur eingehenden Analyse der von *C4.4A* ausgehenden potentiellen Effekte in der Mausentwicklung beitragen und durch die Analyse eventuell auftretender Phänotypen weitere Einblicke in die Funktion dieses Proteins erlauben.

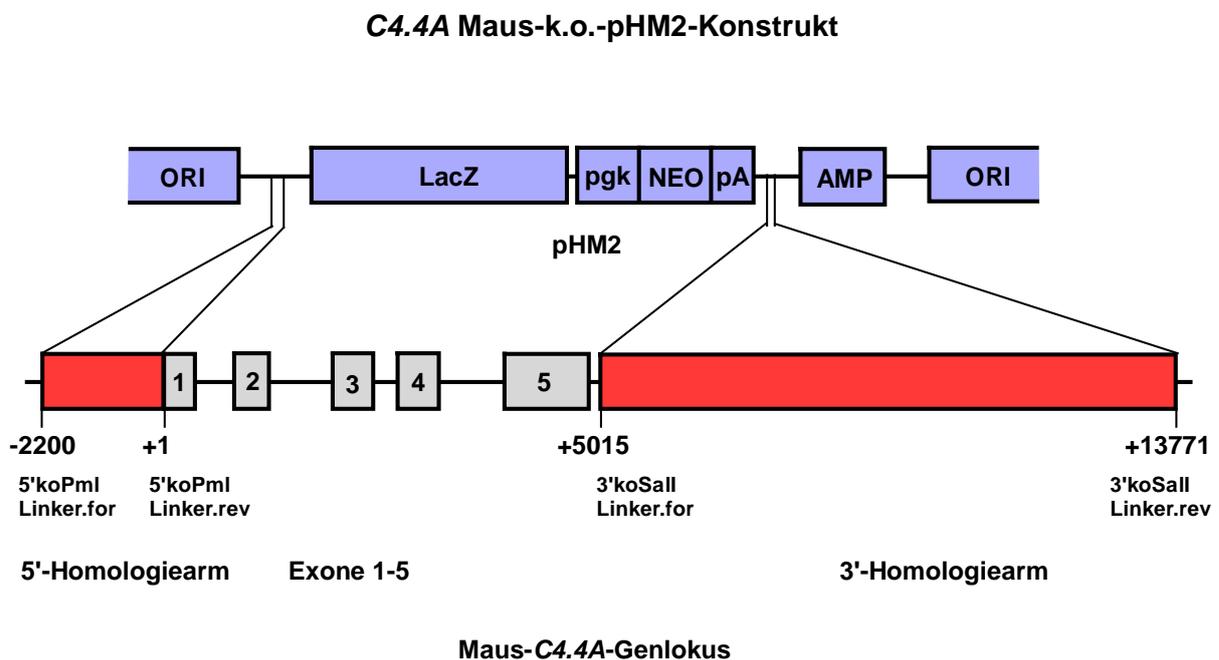


Abbildung 20: **Schematische Darstellung des *C4.4A* Maus-k.o.pHM2-Konstrukts.** Der genomische *C4.4A*-Lokus ist gekennzeichnet. Rot unterlegte Sequenzen zeigen die *C4.4A*-flankierende Regionen, die über PCR amplifiziert und in den pHM2-Vektor kloniert wurden. Die Positionsangaben der Primer beziehen sich auf das *C4.4A*-Startcodon. Hellgrau unterlegte Boxen kennzeichnen die *C4.4A*-kodierende Sequenz (Exon 1-5)

Da die initial geplante Verwendung des Maus-k.o.-pHM2-Vektors (Abbildung 20) leider nicht zur Isolation eines homolog rekombinierten embryonalen Stammzell (ES)-Klons führte, wurde eine Strategie zur stringenteren Selektion positiver embryonaler Stammzellklone entworfen. Hierzu wurde ein neues Maus *C4.4A*-k.o.-Konstrukt – neben dem Neomycin-Phosphotransferasegen mit einem *Diphtheriatoxingen A* (DTA) als zweitem Selektionsmarker ausgerüstet – konstruiert. Das Neomycin-Phosphotransferase (Nm^R)-Gen sollte als Marker zur Selektion solcher ES-Klone dienen, die das Konstrukt nach Transfektion Lokus-unabhängig

in das Genom inseriert hatten. Die MC1-DTA-Kassette sollte der Eliminierung solcher Klone dienen, die den Vektor willkürlich und nicht am *C4.4A*-Lokus inseriert hatten. Die MC1-DTA-Kassette würde im Falle einer geglückten homologen Rekombination nicht ins Genom inserieren und nur so das Überleben der individuellen ES-Zelle gewährleisten.

Zur Planung und Herstellung des k.o.-Konstrukts (wie auch schon beim ersten Konstrukt) wurde die Sequenz des *C4.4A*-Genlokus (Genbank-Nummer: AC073738.gb_htg16) verwendet. Die diesen Lokus repräsentierenden „P1 derived artificial chromosomes“ (PAC)-Klone wurden vom Ressourcen Zentrum des Deutschen Humanen Genomprojekts bezogen. Der PAC-Klon mit der Bezeichnung RPCIP711I06302 wurde schließlich als Matrize für die PCR-Amplifikation der *C4.4A*-spezifischen Sequenzabschnitte des k.o.-Konstruktes ausgewählt. Als Basisvektor diente ein pBlueskript-Vektor (pBS) mit einem Neomycin-Phosphotransferasegen (Nm^R), das unter Kontrolle eines universalen Maus Phosphoglyceratkinase (pgk)-Promotor steht.

Ein schematischer Überblick der Klonierungsstrategie ist in Abbildung 21 dargestellt und soll hier kurz beschrieben werden. Über die Primer (5'koNotI-Linker.for, 5'koSpeI-Linker.rev; Material, Kapitel 2.6.1.1) wurde eine 1514bp überspannende Region von -945 bis +569 in einer PCR synthetisiert. Über die in den Primern vorhandenen Restriktionsschnittstellen *NotI* und *SpeI* wurde dieses DNA-Fragment (5'-Homologiearm) in den Basisvektor pBS- Nm^R kloniert. Das resultierende Konstrukt wurde mit dem Namen pBS-5'C4.4A-pgk- Nm^R belegt. Zur Insertion des 3'-Homologiearms wurden folgende Schritte unternommen: Zunächst wurde der 3'-Homologiearm des ursprünglichen pHM2-C4.4A-k.o.-Konstrukt über die Verwendung von *SalI*-Schnittstellen isoliert und in den pBlueskript-Vektor zwischenkloniert. Aus dem resultierenden pBlueskript-Derivat wurde der 3'-Homologiearm mit den Enzymen *XbaI* und *XhoI* wieder herausgeschnitten. Das resultierende Fragment überspannte einen Bereich von 7307kb *C4.4A*-genomischer Sequenz von +6464 bis +13771 und wurde in die *SalI*/*NheI*-erzeugten (kompatibel zu *XhoI*/*XbaI*) Restriktionsstellen des pBS-5'C4.4A-pgk- Nm^R -Konstrukt inseriert (Abbildung 21).

Daraufhin wurde eine Kassette bestehend aus *Diphtheriatoxigen A* (DTA) und MC1-Promotor eingefügt. Die MCI-DTA-Kassette wurde über *SalI* und *KpnI*-Restriktionsschnittstellen aus dem Ursprungsvektor pBS-MC1-DTA herausgeschnitten. Um die MCI-DTA-Kassette am 3'Ende des 3'-Homologiearms im Maus k.o.-Konstrukt zu positionieren wurde diese Kassette über die kompatiblen *SalI* und *Asp718*-Schnittstellen des bis hierhin fertiggestellten k.o.-Konstrukts kloniert. Die Klonierungsstrategie des resultierenden, fertigen k.o.-Konstrukts ist in Abbildung 21 schematisch dargestellt.

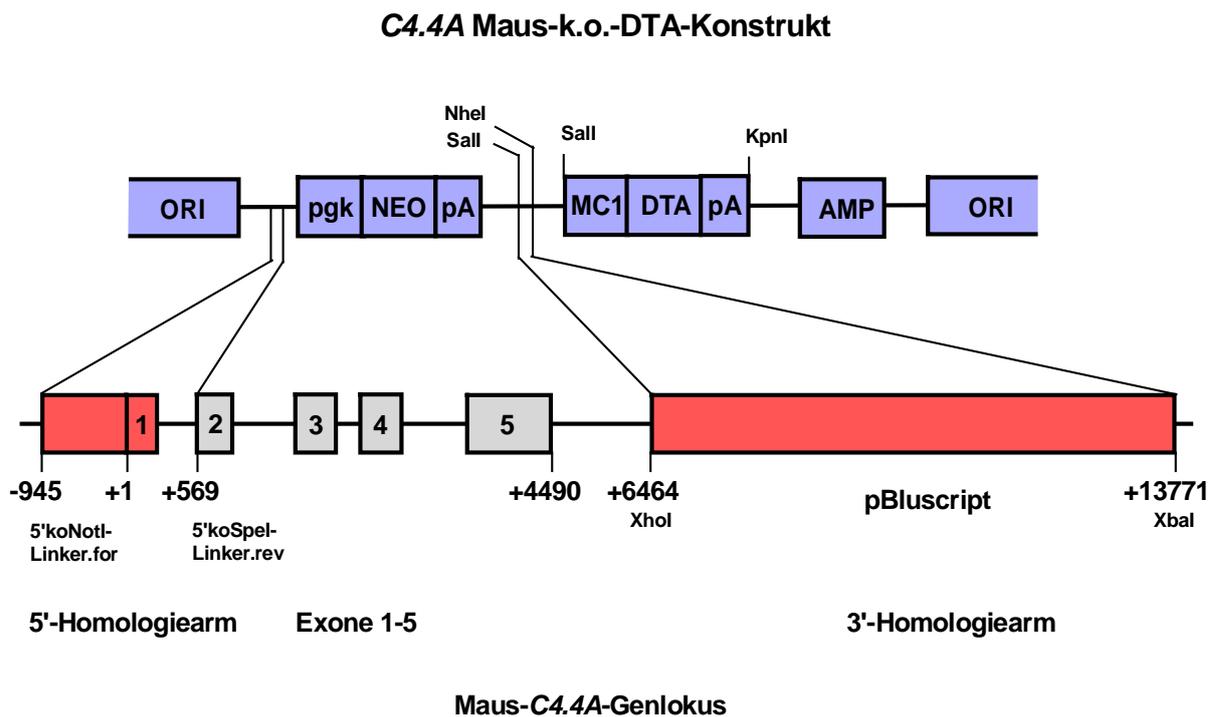


Abbildung 21: **Schematische Darstellung des C4.4A Maus-„knock out“-DTA-Konstrukts.** Der genomische C4.4A-Lokus ist gekennzeichnet. Sequenzen des C4.4A-Genlokus, die in den KO-Vektor kloniert wurden, sind rot unterlegt. Die C4.4A-kodierende Sequenz ist ebenfalls gekennzeichnet (Exon 1-5). Die Positionsangaben der Restriktionsschnittstellen beziehen sich auf das C4.4A-Start-Kodon.

Die zur Integration in das eukaryotische Genom überflüssigen Anteile des Maus C4.4A-k.o.-DTA-Konstrukts wurden über Acc651 und NotI aus dem Konstrukt entfernt. Das linearisierte Maus C4.4A-k.o.-DTA-Konstrukt wurde durch Elektrophorese in Maus-embryonale Stammzellen eingeschleust. Zur Überprüfung der korrekten genomischen Insertion des k.o.-Konstrukts wurde die DNA positiver ES-Zell-Klone schließlich über die Southern-Methode getestet. Dazu wurde ein Restriktionsverdau mit BglII durchgeführt und die resultierenden Fragmente im Southern mit einer dem 5' Homologiearm identischen Sonde hybridisiert.

Im Wildtyp schneidet BglII an den Positionen -5504 und +1210 des C4.4A-Genlokus und erzeugt so ein charakteristisches Restriktionsfragment von 6714bp Länge. Im Falle einer erfolgreichen homologen Rekombination schneidet BglII dagegen innerhalb des pgk-Promotors des inserierten k.o.-Konstrukts und generierte so ein verkürztes DNA-Fragment von nur noch 6125bp (Abbildung 22).

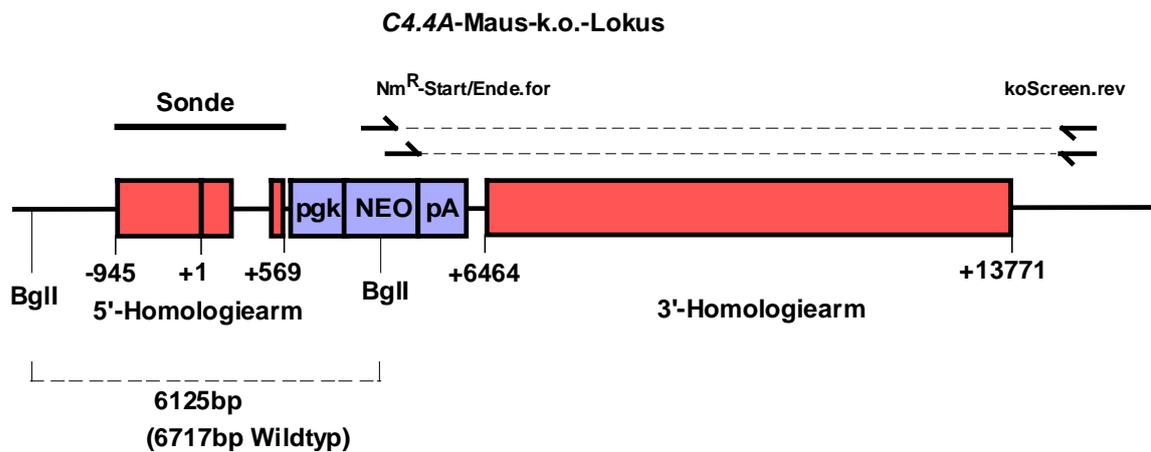


Abbildung 22: **Schematische Darstellung des rekombinanten C4.4A-k.o.-Lokus.** Der über homologe Rekombination veränderte C4.4A-Genlocus ist schematisch dargestellt. Rot unterlegt ist die zum C4.4A-Genlocus homologe Sequenz. Blau unterlegt kennzeichnet die C4.4A-Lokus veränderte Sequenz. Die Positionsangaben beziehen sich auf das C4.4A-Start-Kodon. Das über BglII-Restriktionsenzym generierte DNA-Fragment und die Region der Sonden-Hybridisierung sind gekennzeichnet. Die divergente Größe der DNA-Fragmente zwischen homolog rekombinierten C4.4A-k.o.-DNA und Wildtyp C4.4A-Lokus sind angegeben. Sowohl die im Neomycingen hybridisierenden Primer, als auch der stromaufwärts vom 3'Homologiearm-bindende Primer, sind als Pfeile dargestellt. Das Primer begrenzende DNA-Fragment ist gestrichelt gekennzeichnet.

Einer der 298 getesteten ES-Klone wies ein solches Produkt auf. Somit hatte eine homologe Rekombination zumindest am 5'Homologiearm des Maus k.o.-Konstrukt stattgefunden (Abbildung 23).

Um sicherzustellen, dass der 3'Arm des k.o.-Konstrukts ebenfalls erfolgreich rekombinierte, wurde dieser als „Klon 283“ gekennzeichnete ES-Klon mittels PCR überprüft. Hiefür wurden Primer zur Generierung zweier unabhängiger PCR-Produkte entworfen. Die Primer „Nm^R-Start.for“ und „Nm^R-Ende.for“ hybridisieren innerhalb des Nm^R-Gens. Der „reverse“ Primer „koScreen.rev“ hybridisiert mit der Sequenz an Position 13845 stromabwärts des C4.4A-ATGs (Primersequenzen, Kapitel 2.6.1.1). Im Falle einer erfolgreichen homologen Rekombination des 3'Homologiearms würde über „Nm^R-StartFor“ und „koScreen.rev“ ein DNA-Fragment von 8,1 kb amplifiziert. Dementsprechend würde das Primerpaar „Nm^R-EndeFor“/ „koScreen.rev“ ein DNA-Fragment von 7,5kb erzeugen. Als Negativkontrolle wurde nicht homolog rekombinierte ES-Klon-DNA verwendet (Abbildung 22). Die bereits für die Rekombination des 5'Homologiearm positiv getesteten ES-Klon-DNA (Klon 283) wurden in diesen PCRs als Matrize eingesetzt.

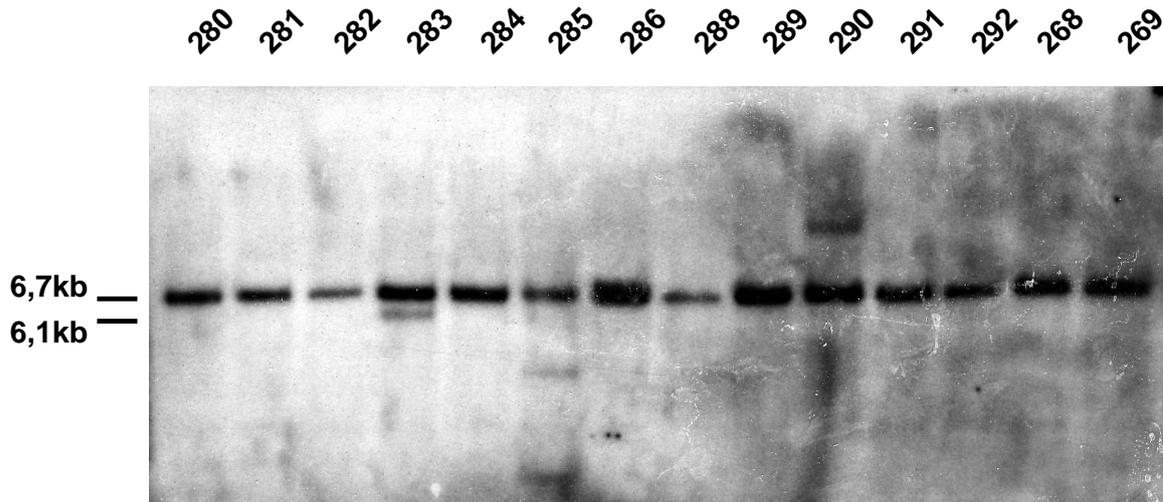


Abbildung 23: **Analyse bezüglich der homologen Rekombination des 5'Homologiearms der C4.4A-k.o.-DNA von transformierten ES-Klonen.** ~ 15µg genomische ES-Klon-DNA (Klon-Nummer 280-269) aus unter Selektion gewachsener Zellen wurde mit BglII-Restriktionsenzym geschnitten, elektrophoretisch aufgetrennt, die DNA auf eine Membran geblotet und mit einer dem 5'Homologiearm homologen Sonde untersucht. Das Autoradiogramm zeigt die Hybridisierung der Sonde an das 6,7 kb Wildtyp-DNA-Fragment und an das homolog rekombinierte 6,1kb C4.4A-k.o.-DNA-Fragment.

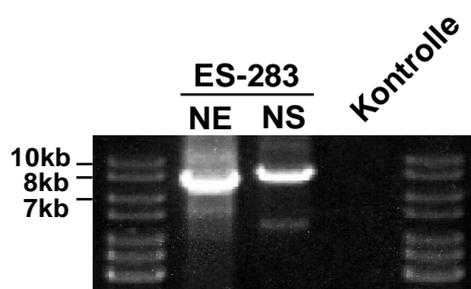


Abbildung 24: **Analyse bezüglich homologer Rekombination des 3'Homologiearms von ES-Klon 283.** ~1µg genomische DNA von einem ES-Klon wurden in einem LongRange PCR-System-Ansatz untersucht. Die amplifizierten DNA-Fragmente nach elektrophoretischer Auftrennung in einem 1% Agarosegel sind dokumentiert. Die ES-Klon 283-DNA enthaltenen Proben sind gekennzeichnet. Der NE (Nm^R-Ende.for) Ansatz bezeichnet den am Ende, der NS (Nm^R-Start.for) den am Anfang des Neomycingen hybridisierenden „forward“ Primer. Als Kontrolle wurde DNA aus einem ES-Klon eingesetzt, in dem eine illegale homologe Rekombination stattgefunden hatte und entsprach dem NE-PCR-Ansatz. Der für die PCR-Reaktionen eingesetzte „reverse“ Primer (koScreen.rev) hybridisierte an die Sequenz stromaufwärts des 3'Homologiearms.

Ansatz bezeichnet den am Ende, der NS (Nm^R-Start.for) den am Anfang des Neomycingen hybridisierenden „forward“ Primer. Als Kontrolle wurde DNA aus einem ES-Klon eingesetzt, in dem eine illegale homologe Rekombination stattgefunden hatte und entsprach dem NE-PCR-Ansatz. Der für die PCR-Reaktionen eingesetzte „reverse“ Primer (koScreen.rev) hybridisierte an die Sequenz stromaufwärts des 3'Homologiearms.

Die resultierenden PCR-Produkte entsprachen den erwarteten Fragmentgrößen von 8,1kb bzw. 7,5kb. In der Negativkontrolle wurde kein DNA-Fragment amplifiziert (Abbildung 24). Somit hatte in ES-Klon 283 also eine homologe Rekombination des 3'-Homologiearms mit

der chromosomalen Ziel-DNA stattgefunden. Eine Bestätigung dieses Ergebnisses mit einer für das Neomycingen-spezifischen Sonde im Southern-Blot steht momentan noch aus.

Die Grundlage für eine sich in naher Zukunft anschließende Blastozysten-Implantation in den Mausstamm (C57BL/6) ist somit geschaffen. Die weitere labortechnische Bearbeitung zur Generierung einer *C4.4A*-k.o.-Maus sollte in naher Zukunft in die Hände des zentralen Service zur Herstellung transgener Mäuse am DKFZ übergeben werden. Der erfolgreiche Abschluss der Arbeiten wird innerhalb der nächsten 8-10 Monate erwartet.

4 Diskussion

Eine der Ursachen des unterschiedlichen metastatischen Verhaltens der Pankreasadenokarzinom-Sublinien BSp73AS und BSp73ASML liegt in der differentiellen Expression spezifischer Oberflächenproteine u.a. C4.4A begründet. Die C4.4A-Expression fehlt in BSp73AS vollständig. Die hohe Expression von C4.4A ist dagegen in BSp73ASML an der Vermittlung eines erhöhten Metastasierungspotentials beteiligt (Rosel et al., 1998).

C4.4A wird in einer beschränkten Anzahl von Geweben der Maus und Ratte exprimiert. So findet man C4.4A auf dem Fruchtblasenepithel der Plazenta, dem oberen Gastrointestinaltraktes und Supra-Basalschichten der Epidermis. Demgegenüber ist die Expression signifikant auf Tumoren (Kolon-, Pankreas-, Nierenzellkarzinom) gesteigert (Seiter et al., 2001; Wurfel et al., 2001; Hansen et al., 2004).

Weitere Untersuchungen belegen die Regulierbarkeit der C4.4A-Expression. So konnte eine gesteigerte Expression von C4.4A in humanen Urothelzellen nach Kultivierung auf extrazellulären Matrix-Proteinen, wie auch in suprabasalen migrierenden Keratinozyten nach Verletzungen der Haut im Mausmodell beobachtet werden (Smith et al., 2001; Hansen et al., 2004). Dies deutet darauf hin, dass C4.4A an Migrationsprozessen beteiligt sein könnte.

Zur Bestimmung von an der Expression von C4.4A beteiligten Regulationsfaktoren stellte eine detaillierte Promotoranalyse eine unabdingbare Voraussetzung dar. Diese experimentelle Vorgehensweise hatte u.a. die Identifizierung der Komplexbindung von C/EBP β /JunD – ein bisher in der Literatur noch nicht beschriebenes Heterodimer – mit einem zentralen Enhancerelement des *C4.4A*-Promotors möglich gemacht. Im folgenden sollen die Resultate der Promotoranalyse besprochen und die Relevanz identifizierter Faktoren bei der Regulation der C4.4A Expression diskutiert werden.

4.1 Die Expression von *C4.4A* wird auf transkriptioneller Ebene reguliert

Unterschiede in der Expression bestimmter Gene können sehr verschiedene Ursachen haben. Transkriptionale, post-transkriptionale und post-translationale Mechanismen können zu Expressionsunterschiede beitragen. Im Zusammenhang mit der vor allem in Tumorzellen beobachteten hohen genomisch-rekombinativen Aktivität müssen jedoch auch Haplo-Insuffizienz und Deletion als mögliche Parameter in Erwägung gezogen werden.

Da sich die Karyotypen von BSp73AS und BSp73ASML deutlich unterscheiden, wäre es theoretisch möglich, dass eine Deletion des *C4.4A*-Genlokus in BSp73AS die fehlende *C4.4A*-Expression in BSp73AS verursacht. Diese Möglichkeit konnte jedoch durch die in Kapitel 3.1 beschriebene Southern-Analyse ausgeschlossen werden. Durch die Hybridisierung mit einer *C4.4A*-spezifischen Sonde konnte die genomische Integrität des *C4.4A*-Genlokus in BSp73AS nachgewiesen werden (Kapitel 3.1; Abb. 1).

Deshalb wurde daraufhin die Möglichkeit der *C4.4A*-Expressionsregulation auf putative post-transkriptionale Mechanismen untersucht. Wie eine Vielzahl von Studien zeigt, setzen Mechanismen der post-transkriptionalen Regulation generell das Vorhandensein des mRNA-Moleküls voraus (siehe Übersichtsartikel: (Audic and Hartley, 2004). Eine Möglichkeit eines post-transkriptionalen Mechanismus zur Stabilisierung der mRNA besteht in der Interaktion sogenannter „*trans*-acting RNA binding factors“ mit spezifischen Regionen im untranslatierten Bereichen der mRNA. So ist z.B. die Stabilität der uPA-mRNA an eine Faktorbindung am 3'-untranslatierten Bereich gekoppelt. Dieser über den p38 MAPK-Signalübertragungsweg aktivierbare Faktor erhöht die Stabilität der uPA-mRNA in Brustkrebszellen (Han et al., 2002).

Bezüglich der *C4.4A*-Regulation konnten allerdings keine Hinweise für post-transkriptionale Mechanismen gefunden werden. Die mittels Northern-Blot- und semi-quantitativer RT-PCR-Analyse gewonnenen Ergebnisse belegen, dass BSp73AS- im Gegensatz zu BSp73ASML-Zellen kein *C4.4A*-Transkriptionsprodukt enthalten (Kapitel 3.2; Abb. 2 und 3). Da die mRNA von *C4.4A* in BSp73AS selbst in der sehr sensitiven semi-quantitativen RT-PCR-Analyse nicht detektiert werden konnte und *C4.4A*-mRNA damit logischerweise nicht für post-transkriptionale Regulationsmechanismen zur Verfügung steht, spielen post-transkriptionale Regulationsmechanismen keine Rolle bei der *C4.4A*-Expressionskontrolle.

Da in BSp73AS-Zellen weder *C4.4A*-mRNA noch -Protein nachweisbar sind, konnte eine Beteiligung post-translationale Regulationsmechanismen an der *C4.4A*-Regulation ebenfalls ausgeschlossen werden.

Diese Ergebnisse dirigierten die weitere Untersuchungen in die Richtung der Analyse transkriptioneller Mechanismen zur Regulation des *C4.4A*-Gens. Die experimentielle Bestätigung dieser Annahme gelang durch Verwendung des *C4.4A*-Promotorkonstrukts pBLCAT3-596/-1 im CAT-Assay. Nur in Lysaten von BSp73ASML- nicht aber von BSp73AS-Zellen konnte die Aktivierung des CAT-Reportergens dieses Konstrukts nachgewiesen werden (Kapitel 3.5; Abb. 10).

4.2 Charakterisierung des *C4.4A*-Promotors

Die effektive Transkription von Genen beruht auf der Interaktion von meist mehreren im Promotor-bindenden regulatorischen Faktoren mit dem basalen Transkriptionsapparat. Somit besteht die Möglichkeit, dass der BSp73AS-Zelllinie bestimmte regulatorische Transkriptionsfaktoren im Gegensatz zur BSp73ASML-Zelllinie nicht zur Verfügung stehen, um das *C4.4A*-Gen aktivieren zu können. Eine weitere Möglichkeit wäre, dass reprimierende Transkriptionsfaktoren die transkriptionelle Aktivierung des *C4.4A*-Gens in BSp73AS verhindern. Zur Identifikation solcher putativ regulatorischen Transkriptionsfaktoren wurden deshalb folgende experimentelle Vorgehensweise gewählt: 1) Die Eingrenzung des für die Aktivierung des *C4.4A*-Gens relevanten Promotorbereichs. 2) Die Lokalisation des basalen Transkriptionsapparats, um bestimmte Transkriptionsfaktoren leichter identifizieren zu können. 3) Die Identifizierung der *C4.4A*-Promotor-relevanten regulatorischer Transkriptionsfaktoren.

Anhand der identifizierten Transkriptionsfaktoren sollten dann Rückschlüsse auf mögliche Signalübertragungswege zu ziehen sein, die für die regulierte Expression von *C4.4A* verantwortlich sind und unter Umständen mit dem Migrationsverhalten der Zellen in Zusammenhang stehen.

Der für die Aktivierung des *C4.4A*-Gens relevante Promotorbereich konnte über Promotorkonstrukte, die unterschiedlich lange 5' *C4.4A*-flankierende Bereiche repräsentierten auf -150 bis -1 in BSp73ASML-Zellen mittels CAT-Assay eingegrenzt werden. Weitere 5'-Verkürzungen der Promotorsequenz auf -134/-1, -98/-1 und -79/-1 führen zu einer schrittweisen Reduzierung der Promotoraktivität in BSp73ASML-Zellen (Kapitel 3.4.1; Abb. 7). Diese Beobachtung deutete darauf hin, dass das Zusammenspiel mehrerer Transkriptionsfaktoren an der Aktivierung des *C4.4A*-Promotors in BSp73ASML-Zellen verantwortlich ist.

4.2.1 Der basale Transkriptionsapparat bildet sich in der Region -47 bis -1 des *C4.4A*-Promotors aus

Der basale Transkriptionsapparat besteht aus einem Proteinkomplex – einschließlich der RNA-Polymerase II – der sich an spezifischen DNA-Elementen ausbildet und für die mRNA-Synthese verantwortlich ist. Regulatorische Transkriptionsfaktoren binden grundsätzlich in

der 5' flankierenden Region des basalen Transkriptionsapparats an den Promotor. Deshalb würde die Lokalisation des basalen Transkriptionsapparates die Identifizierung der regulatorischer Transkriptionsfaktor-Bindestellen erheblich erleichtern.

Der für den Transkriptionsstart essentielle basale Transkriptionsapparat bildet sich an spezifische Core-Promotorelemente aus. Zu diesen Elementen zählen die TATA-Box, das „Initiator“(Inr)-Element, das „down stream core promoter element“ (DPE) und GC-Box-Motive. So ist z.B ein Inr-Element in dem TATA-Box-losen *uPAR*-Promotors für den Transkriptionsstart des *uPAR*-Gens verantwortlich (Dang et al., 1999; Okan et al., 2001). Im Bereich von -47 bis -1 konnte der basale Transkriptionsapparat des *C4.4A*-Promotor lokalisiert werden. In Übereinstimmung mit der funktionellen Relevanz diese Region für den *C4.4A*-Promotor beinhaltet dieser Bereich auch potentielle Core-Promotorelemente wie Inr-Element, DPE-Element und GC-Box-Elemente, die den Transkriptionsstartpunkt bestimmen könnten (Kapitel 3.4.4; Abb. 9). Da die Deletion der Region von -47/-1 mit dem Verlust der *C4.4A*-Promoteraktivität Thymidinkinase (*Tk*)-Minimal-Promotors voll wiederhergestellt werden kann, konnte gefolgert werden, dass die Region -47/-1 tatsächlich alle Elemente des zur *C4.4A*-Transkription essentiellen basalen Transkriptionsapparates beinhaltet (Kapitel 3.4.3; Abb. 8).

Möglichweise ist ein Inr-Element an Position -38 bis -33 zusammen mit einem DPE-Element (Position -10 bis -6) für die Ausbildung des basalen Transkriptionsapparats und somit für den Transkriptionsstart verantwortlich. Diese Hypothese wird indirekt von der Beobachtung gestützt, dass verschiedene punktmutierte GC-Box-Elemente des *C4.4A*-Promotor (an Position -33/-25 bzw. -58/-50) keinen Effekt auf die Promotoraktivität hatten und somit vermutlich auch keinen Einfluss auf die Ausbildung des basalen Transkriptionsapparates haben (Kapitel 3.6; Abb. 11). Da neben den, als für den Transkriptionsstart irrelevant eingestuften, GC-Box-Motiven in dieser Promotorregion ausschließlich erwähnten Inr- bzw. das DPE-Elemente identifiziert werden konnten, kann man annehmen, dass sich an diesen Elementen der basale Transkriptionsapparat ausbildet. Eine präzisere Lokalisation der Position des Core-Promotorelements, welches für die Ausbildung des basalen Transkriptionsapparats verantwortlich ist, wurde bislang nicht angestrengt, sollte aber über ein 5' „rapid amplification of cDNA ends“ (RACE) auf der *C4.4A*-mRNA erfolgen können.

4.2.2 Eine GC-reiche Region (Position -120/-88) ist an der erhöhten Promotoraktivität in BSp73ASML beteiligt

Wie bereits erwähnt, führten Verkürzungen am 5'-Ende der Promotorsequenz (-150/-1) auf -134/-1, -98/-1 und -79/-1 zu einer schrittweisen Reduzierung der Promotoraktivität. Diese Beobachtung deutet darauf hin, dass das in dem Kapitel 3.10 beschriebene *CCAAT/TRE*-Element (-85/-74) und die daran bindende C/EBP β /JunD-Proteine zwar notwendig, aber nicht für die Aktivierung des *C4.4A*-Promotors in BSp73ASML-Zellen alleinverantwortlich sind. Deshalb wurden Experimente durchgeführt, die zeigen sollten, welche weiteren regulatorische Transkriptionsfaktoren stromaufwärts des *CCAAT/TRE*-Elements binden. Es konnte gezeigt werden, dass eine GC-reiche Region an Position -120 bis -88 an der Aktivierung des *C4.4A*-Promotors beteiligt ist (Kapitel 3.7; Abb. 12). Die im Promotokonstrukt pBLCAT3-120/-88Del vorgenommene Deletion dieser GC-reichen Sequenz (-120/-88) führte im Vergleich zur Wildtyp-Promotorsequenz in BSp73ASML zu einer signifikanten Reduktion der Promotoraktivität. So ist in dieser GC-reichen Region (-120/-88) also mindestens ein *cis*-agierendes Element vorhanden, welches an der Vermittlung einer erhöhten Aktivität des *C4.4A*-Promotor beteiligt ist.

EMSA-Analysen konnten zeigen, dass die Mobilität des diesen Bereich repräsentierenden Promotor-Fragments (-108/-81) – das im folgenden als GC-Box-C4.4A bezeichnet werden soll – durch BSp73ASML-Lysat wesentlich stärker als durch BSp73AS-Lysat beeinträchtigt ist (Kapitel 3.8; Abb. 13B). Zudem korrespondiert die Mobilität dieses im BSp73AS-Lysat sehr schwach ausgeprägten Mobilitätshifts nicht mit der Mobilität des Protein-DNA-Komplexes im BSp73ASML-Lysat (Abb. 13B). Offensichtlich besteht somit ein Unterschied zwischen BSp73ASML- und BSp73AS-Lysaten bezüglich der Transkriptionsfaktorbindung an diesem *C4.4A*-Promotorfragment.

In daraufhin durchgeführten, detaillierteren EMSA Studien sollten mögliche Transkriptionsfaktoren, die in dieser Region an das Promotorfragment (-108/-81) binden, identifiziert werden. Die sogenannten Zinkfingerproteine wie z.B die Sp-Familie bzw. PLAG-Familie von Transkriptionsfaktoren binden an Konsensussequenzen von GC-Box-Motiven. Das macht sie zu potentiellen Kandidaten für die Interaktion an die GC-reiche Region dieses *C4.4A*-Promotorfragments. Die über das ALIBABA-Programm prognostizierte Interaktion von Sp-Transkriptionsfaktoren mit diesem *C4.4A*-Promotorfragment konnte jedoch experimentell nicht bestätigt werden (Abb. 13B und 13C). Weder gegen verschiedene Sp-Proteine (Sp1, Sp2 und Sp3) gerichtete Antikörper, noch ein Konkurrenzexperiment mit

einem die Sp-Konsensussequenz (GGGGCGGGG) repräsentierenden unmarkierten DNA-Fragment konnten die Mobilität des mit BSp73ASML-Lysat inkubierten markierten *C4.4A*-Promotorfragments verändern (Abb. 13B und 13C). An dieser Stelle muss erwähnt werden, dass eine mögliche Sp4-Bindung an das GC-Box-*C4.4A*-Fragment nicht untersucht wurde, da eine hohe Sp4-Expression bisher nur im Gehirn nachgewiesen werden konnte und folglich eine Beteiligung von Sp4 an der transkriptionellen Regulation in Pankreaszellen eher unwahrscheinlich ist (Hagen et al., 1995; Supp et al., 1996). Gegen eine Bindung von Sp4 an dieses *C4.4A*-Promotorfragment spricht auch, dass im Konkurrenzexperiment mit Sp-Konsensussequenz repräsentierende DNA-Fragment kein Effekt auf die Mobilität des GC-Box-*C4.4A*-Fragment beobachtet werden konnte. Dies wäre allerdings im Falle einer Sp4-Bindung zu erwarten gewesen, da Sp4 bevorzugt an dieses Sp-Konsensussequenzmotiv bindet (Hagen et al., 1994; Hagen et al., 1995).

Aus diesen Ergebnissen resultiert deshalb der Schluss, dass die Bindung von Sp-Proteinen an diesem *C4.4A*-Promotorbereich (-108/-81) in BSp73-ASML-Zellen mit hoher Wahrscheinlichkeit ausgeschlossen werden kann.

Mitglieder der PLAG-Transkriptionsfaktorfamilie können möglicherweise ebenfalls an den GC-reichen *C4.4A*-Promotorbereich (-108/-81) binden. Die PLAG-Transkriptionsfaktoren interagieren über eine GC-Box-Konsensussequenz (GGGGGGCCCC) mit Promotoren und sind an der Regulation von unter der Kontrolle von PLAG stehenden Zielgenen beteiligt (Kas et al., 1998; Varrault et al., 1998). Ein zum PLAG-Konsensus-Element ähnliches GC-Box-Motiv – beide Motive unterscheiden sich nur in den ersten drei Basen voneinander – konnte im *C4.4A*-Promotor an Position -96 bis -88 (CAAGGGCCCC) identifiziert werden. In einem EMSA-Konkursions-Assay konnte beobachtet werden, dass die Mobilität des GC-Box-*C4.4A* durch mengenabhängige Zugabe (10, 20, 40fachen Überschuss) von PLAG-Konsensusfragment graduell im BSp73ASML-Lysat erhöht werden konnte (Abb. nicht gezeigt). Diese Beobachtung gibt einen ersten experimentiellen Hinweis auf die Bindung von PLAG-Proteinen an den *C4.4A*-Promotor. Allerdings muss an dieser Stelle daraufhin gewiesen werden, dass das nach Inkubation mit BSp73ASML-Lysat im EMSA hervorgerufene Mobilitätsverhalten der markierten PLAG-Konsensussequenz nicht mit dem des markierten GC-Box-*C4.4A* korrespondiert (Abb. nicht gezeigt). Vorausgesetzt ein PLAG-Protein ist tatsächlich an der Bindung des *C4.4A*-Promotorfragmentes beteiligt, müsste folglich ein weiterer Transkriptionsfaktor postuliert werden, der neben den PLAG-Protein ebenfalls an dieses *C4.4A*-Promotorfragment bindet. Ein solches Szenario könnte jedenfalls

die beobachtete Divergenz im Mobilitätsverhalten zwischen PLAG-Konsensus und GC-Box-C4.4A im BSp73-ASML-Lysat erklären.

Die Subgruppe der C₂H₂ Zinkfinger-PLAG-Proteine wurde erst kürzlich identifiziert (Kas et al., 1997a; Kas et al., 1997b; Kas et al., 1998). Diese Proteine fungieren als Transkriptionsfaktoren (Kas et al., 1998) und besitzen nach Überexpression das Potential Zellen zu transformieren (Hensen et al., 2002). Das Fehlen von gegen PLAG-Proteine gerichteten spezifischen Antikörpern schließt zurzeit noch eine genaue Untersuchung von PLAG-Proteinen über EMSA-Analyse aus. Eine Alternative hierzu wäre die Kopplung des GC-Box-C4.4A-Promotor-Fragments an Sepharose-Kügelchen, die eine Isolierung der Transkriptionsfaktoren aus dem BSp73ASML-Lysat ermöglichen würde. Die anschließende Sequenzierung dieser Faktor(en) über „matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry“ (MALDI-TOF-MS)-Analyse sollte die Proteinsequenz(en) entschlüsseln helfen, die weitere Hinweise auf diese Protein-Interaktion mit dem *GC-Box-C4.4A*-Motiv lieferten.

4.2.3 Ektopisch exprimiertes Sp3 aktiviert den *C4.4A*-Promotor

Eine direkte Interaktion der Sp-Proteine mit dem *C4.4A*-Promotorbereich (-109 bis -81) konnte nicht nachgewiesen werden (Kapitel 3.8; Abb. 13). Jedoch konnte durch ektopisch exprimiertes Sp3-Protein eine Aktivierung des *C4.4A*-Promotors (-150 bis -1) erzielt werden. Somit besitzt Sp3 als einziges Mitglied der Sp-Proteinfamilie (Sp1, Sp2, Sp4) nach ektopischer Expression das Potential den *C4.4A*-Promotor sowohl in BSp73ASML- als auch in BSp73AS-Zellen zu aktivieren (Kapitel 3.11; Abb. 19). Allerdings kann man dem Aktivierungspotential von Sp3 auf die *C4.4A*-Genregulation eine eher nur untergeordnete Rolle zuteilen. Betrachtet man im Vergleich das Aktivierungspotential von C/EBP β /JunD und Sp3 auf den *C4.4A*-Promotor in BSp73AS-Zellen, so konnte nach ektopischer Ko-Expression von C/EBP β und JunD eine 42fach erhöhte Aktivierungspotential erzielt werden. Die transient Expression von Sp3 konnte dagegen nur eine 2,8fach erhöhte Transkriptionsaktivität des *C4.4A*-Promotors verursachen.

Anhand der bisher beschriebenen Experimente, ist schwer zu erklären, auf welche Art und Weise Sp3 an der Regulation des *C4.4A*-Promotors beteiligt sein könnte. Die Tatsache, dass nicht alle GC-Box-Motive im *C4.4A*-Promotor untersucht wurden und die untersuchten Motive keinen Hinweis auf eine Sp-Interaktion ergaben, erschwert eine Interpretation der Aktivierung des *C4.4A*-Promotors über Sp3. Möglicherweise führt die Überexpression von

Sp3 zu einer vermehrten Interaktion mit den im *C4.4A*-Promotor vielzählig auftretenden GC-Box-Motiven (Kapitel 3.4.4; Abb. 9), die dann eine verstärkte Transkription des *C4.4A*-Promotors vermitteln könnte. Ein GC-Box-Motiv (CGGGCGGGG) an Position -147 bis -139 könnte ein solches sein. Dieses GC-Box-Motiv unterscheidet sich nur in einer Base vom Sp-Konsensus-Motiv (GGGGCGGGG). Die Deletion dieser GC-Box (pBLCAT3-153/-139Del, pBLCAT3Del1/Del2) führte im Vergleich zu nicht-mutierten Promotorkonstrukten zu einer nur sehr geringen Reduktion der Promotoraktivität, warum es auch zu diesem Zeitpunkt nicht näher untersucht wurde (Kapitel 3.7; Abb. 12). Eine detaillierte Untersuchung aller im *C4.4A*-Promotor vorhandenen GC-Box-Motive mittels EMSA-Analysen und der Einsatz gegen Sp3 gerichteten Antikörper in BSp73AS- bzw. BSp73ASML-Lysaten sollte klären können, ob Sp3 am *C4.4A*-Promotor bindet oder nicht.

Neben einer Aktivierung durch direkte Bindung des *C4.4A*-Promotors kann eine indirekte Aktivierung der *C4.4A*-Expression durch Sp3 nicht ausgeschlossen werden. Transkriptionsfaktoren der Sp-Familie (Sp1 bzw. Sp3) sind nämlich an der Aktivierung einer Anzahl weiterer Transkriptionsfaktoren beteiligt, die dann einen potentiell aktivierenden Einfluss auf die *C4.4A*-Transkription nehmen könnten. Besonderen Stellenwert erlangt in diesem Zusammenhang die Tatsache, dass Sp3 die transkriptionelle Aktivierung sowohl des *C/EBPβ*-Promotors als auch an der Aktivierung des *JunD*-Promotors zu verursachen in der Lage ist (de Groot et al., 1991; Berrier et al., 1998; Yang et al., 2002). Die funktionelle Verknüpfung der *C4.4A*-Transkription mit diesen beiden spezifischen Transkriptionsfaktoren wird im folgenden Kapitel eingehend behandelt.

4.2.4 Eine C/EBPβ/JunD-Bindung an ein CCAAT/TRE-Element (-85/-74) ist für Aktivierung des C4.4A-Gens entscheidend mitverantwortlich

Die zur Identifizierung *C4.4A*-relevanter, regulatorischen Transkriptionsfaktoren durchgeführten Experimente belegen, dass die Interaktion von C/EBPβ und JunD an einem CCAAT/TRE-Element (-85/-74), dessen indizierte Bindemotive in einer Base überlappenden, entscheidend zur Aktivierung des *C4.4A*-Gens beiträgt.

So zeigte zunächst ein CAT-Assay, dass das *TRE*-ähnlichen Element (-81/-74) in diesem CCAAT/TRE-Motiv essentiell für die volle Aktivierung des *C4.4A*-Promotors ist (Kapitel 3.6; Abb. 11). *TRE*-Elemente treten häufig in Promotoren von Krebs-assoziierten Genen auf, die bei Migrationsprozessen von Zellen eine Rolle spielen. So sind AP-1-Transkriptionsfaktoren, die mit der Konsensussequenz von *TRE*-Elementen interagieren wesentlich für die Überexpression

von uPAR, CD44 bzw. MMP-1 in Tumorzellen verantwortlich (Hu et al., 1994; Lamb et al., 1997; Kustikova et al., 1998).

Eine EMSA-Studie diente zur Bestimmung einer potentiellen AP-1-Interaktion an das *CCAAT/TRE*-Element (-85/-74) des *C4.4A*-Promotors. Es konnte gezeigt werden, dass kein aus AP-1-Mitgliedern bestehender dimerer Transkriptionsfaktor an das getestete *C4.4A*-Promotorfragment (-88/-61), welches dieses *CCAAT/TRE*-Element (-85/-74) repräsentierte, bindet (Kapitel 3.10.1; Abb. 14B). So unterschied sich der Mobilitätsshift des *C4.4A*-Promotorfragments von dem als positiv Kontrolle eingesetztes *MMP-1*-Promotorfragment, dessen *TRE*-vermittelte Bindung von AP-1 bereits beschrieben wurde (Schorpp et al., 1995). Die zurückgelegte Laufstrecke des *C4.4A*-Promotorfragment war im Vergleich zum *MMP-1*-Promotorfragment mitsamt gebundenen AP-1-Transkriptionsfaktorkomplex deutlich verlängert. Homo- bzw. Heterodimere AP-1-Transkriptionsfaktorkomplexe unterscheiden sich bezüglich der Mobilität in EMSA-Analysen jedoch nicht (Persönliche Auskunft Dr. Marina Schorpp-Kistner, Abteilung Signaltransduktion & Wachstumskontrolle, DKFZ). Somit muss davon ausgegangen werden, dass kein aus AP-1-Familienmitgliedern bestehender dimerer AP-1-Transkriptionsfaktor an das *TRE*-ähnliche Motiv des *C4.4A*-Promotorfragments bindet.

Diese Annahme wird von der Beobachtung untermauert, dass die *C4.4A*-Promoteraktivität in BSp73ASML-Zellen nicht über eine für die AP-1-aktivierende Phorbolster (PMA)-Behandlung stimuliert werden konnte (Abb. nicht gezeigt) (siehe Übersichtsartikel; (Eferl and Wagner, 2003).

Weitere EMSA-Studien sollten zeigen, ob möglicherweise ein monomeres AP-1-Familienmitglied über das *TRE*-Element bzw. C/EBP-Proteine über das *CCAAT*-Element an die Sequenz -85/-74 des *C4.4A*-Promotors binden können.

In diese Richtung dirigierte EMSA-Studien konnten zeigen, dass die Mobilität des *CCAAT*-Konsensus-Fragment (Positivkontrolle) mit der des im *TRE*-Element (-81/-74) mutierten *C4.4A*-Promotorfragment (-88/-61) – das ein *CCAAT*-Element an Position -85/-81 besitzt – korrespondiert (Kapitel 3.10.1; Abb. 14). Von mindestens ebenso großer Bedeutung ist die Tatsache, dass Wildtyp-Promotorfragment sehr viel weniger mobil ist als das mutierte *C4.4A*-Promotorfragment.

So konnten aus den Resultaten dieses Versuchsaufbaus gleich mehrere äußerst hilfreiche Arbeitshypothesen aufgestellt werden. 1) C/EBP-Transkriptionsfaktoren können über das *CCAAT*-Element (-85/-81) an den *C4.4A*-Promotor binden. 2) Neben der *CCAAT*-

vermittelten C/EBP-Bindung interagiert ein monomeres AP-1-Familienmitglied mit dem *TRE*-Element an Position -81/-74 des *C4.4A*-Promotors.

Auf Basis dieser Interpretationen wurden neue Experimente aufgebaut, die schließlich zum Nachweis der Bindung von C/EBP β und zur Identifizierung von JunD als postuliertem monomer bindenden AP-1-Faktor führte (Kapitel 3.10.2; Abb. 15).

Beide Transkriptionsfaktoren binden also an die aus kombinierten *CCAAT* und *TRE*-Motiv zusammengesetzten Sequenz (-85/-74) des *C4.4A*-Promotors. Mittels Prä-Inkubation von BSp73ASML-Lysat mit C/EBP β - bzw. JunD-spezifischen Antikörpern gelang es, die Mobilität des *C4.4A*-Promotor-Fragments (-88/-61) in EMSA-Studien zu erhöhen. Die Erklärung für die erhöhte elektrophoretische Mobilität ist, dass die C/EBP β und JunD-Proteine über die jeweilige Antikörperbindung an der Interaktion mit dem *CCAAT/TRE*-Element gehindert werden. Dabei ist es nebensächlich, ob die Antikörper ihre Wirkung durch die negative Beeinflussung der Proteinstabilität – bZIP-Proteindimere benötigen für ihre dauerhafte Stabilität die Bindung an ihr Konsensussequenzmotiv (Turner and Tjian, 1989; Patel et al., 1990) – oder aber durch die direkte Blockierung der DNA-Transkriptionsfaktor-Interaktion entfalten.

Die beschriebene C/EBP β -Bindung an das *CCAAT*-Motiv bzw. die Bindung des JunD an das *TRE*-Motiv konnte ebenfalls durch DNA-Kompetitions-Experimente bestätigt werden. Die Interaktion dieser Proteine mit markiertem *C4.4A*-Promotorfragment (-88/-61) konnte jeweils erfolgreich durch den Einsatz von Überschüssen an unmarkierten *CCAAT*- bzw. *TRE*-Konsensuselementen kompensiert werden (Kapitel 3.10.3; Abb. 16).

Zwar konnte die Beteiligung von C/EBP β und JunD an die Bindung des *C4.4A*-Promotorfragments (-88/-61) nachgewiesen werden, doch bleibt weiterhin unklar, ob C/EBP β und JunD in der Form eines Heterodimers an dieses *CCAAT/TRE*-Element binden. Wie Literaturrecherchen ergaben, wurde bisher noch keine für die Aktivierung von Genen verantwortliche C/EBP β /JunD-Bindung an ein Motiv mit sich überlappenden *CCAAT/TRE*-Bindesequenzen beschrieben. Dieser Umstand könnte jedoch mit der sehr streng regulierten Expression von *C4.4A* in einer nur begrenzten Anzahl von gesunden Geweben in Einklang stehen. Von C/EBP β -Monomeren ist bekannt, dass sie Familien-übergreifend mit Mitgliedern der AP-1-Proteinfamilien interagieren können. So interagiert C/EBP β in *in vitro* Experimenten mit c-Fos bzw. c-Jun (Hsu et al., 1994). Auch wird der „tumor necrosis faktor α “ (TNF α) von einem C/EBP β /c-Jun-Dimer in Jurkat T-Zellen aktiviert (Zagariya et al., 1998). Zukünftige *in vitro* Experimente mit ektopisch exprimiertem JunD- bzw. C/EBP β und sich daran anschließende Immunpräzipitations-Analysen, die auch chromosomale-

Immunoprecipitationen (ChIP) beinhalten sollen, könnten die Existenz einer Interaktion eines C/EBP β /JunD Heterodimers mit dem *CCAAT/TRE*-Element des *C4.4A*-Promotors belegen. In Hinblick auf die Fragestellung dieser Arbeit ist jedoch die Beobachtung von besonderer Relevanz, dass das Lysat der BSp73AS- im Gegensatz zur BSp73ASML-Zelllinie keinen vergleichbaren Mobilitätsshift dieses *CCAAT/TRE*-Element repräsentierenden *C4.4A*-Promotorfragment hervorrufen konnte (Kapitel 3.10.2; Abb. 15). Die C/EBP β /JunD-Interaktion mit diesem *C4.4A*-Promotorfragment ist folglich vom eingesetzten Zelllysat abhängig, da sie im BSp73ASML-Lysat nicht aber im BSp73AS-Lysat nachgewiesen werden konnte. Daraus läßt sich ableiten, dass der BSp73AS-Zelllinie die notwendigen C/EBP β und/oder JunD-Proteine fehlen oder nicht in der Form zur Verfügung stehen, die für die Bindung dieser Promotorregion notwendig sind. Zum besseren Verständnis der letzteren Möglichkeit ist es notwendig zu erwähnen, dass die C/EBP β -mRNA in drei Isotypen LAP1, LAP2 (42-46 kDA) („liver-enriched activating protein“) und LIP (20 kDA) („liver-enriched inhibitor protein“) translatiert werden kann (Descombes and Schibler, 1991). Möglicherweise ist für die C/EBP β /JunD-Bindung an das *C4.4A*-Promotorfragment eine spezifische C/EBP β -Isoform notwendig, die in der BSp73AS-Zelllinie nicht vorhanden ist. Nachweislich unterscheidet sich z.B. die LIP-Isoform funktional erheblich von den Isoformen LAP1 und LAP2. So kann zwar ein aus LIP bestehendes Homo- bzw. Heterodimer mit vergleichbarer Affinität wie die LAP-Isoformen an die *CCAAT*-Konsensussequenz binden, aber aufgrund der fehlenden *trans*-Aktivierungsdomäne nicht mit dem basalen Transkriptionsapparat interagieren und daraus folglich die Transkription auch nicht aktivieren. LIP agiert im Gegensatz zu den LAP-Isoformen also als Repressor der Transkription. (Descombes and Schibler, 1991; Ossipow et al., 1993; Timchenko et al., 1999). Die anhand der *C4.4A*-*CCAAT*-Sequenz erzielten Ergebnisse schließen somit eine Regulation des *C4.4A*-Gens über das Verhältnis der LIP:LAP-Isoformen in BSp73AS- bzw. BSp73ASML-Zellen nicht aus.

4.2.4.1 Ektopische C/EBP β - und JunD-Expression erhöhen die Aktivität des *C4.4A*-Promotors

Die im Folgenden diskutierten Experimente sollten das Aktivierungspotential von C/EBP β und JunD auf den *C4.4A*-Promotor klären. Hierzu wurden Effekte auf die *C4.4A*-Promotoraktivität nach ektopischer Expression von C/EBP β bzw. JunD im CAT-Assay gemessen. So erhöht die ektopische Expression von C/EBP β bzw. JunD die Aktivität des *C4.4A*-Wildtyppromotors in BSp73ASML-Zellen signifikant. Dieses Ergebnis kann im

direkten Zusammenhang mit der Beobachtung gesetzt werden, dass C/EBP β und JunD spezifisch an das *CCAAT/TRE*-Motiv (-85/-74) binden können, da die Mutation des *TRE*-Elements die mit dem Wildtyp-CAT-Konstrukt gemessene Steigerung der Promotoraktivität selbst bei Überexpression von C/EBP β bzw. JunD verhindert (Kapitel 3.10.4; Abb. 17).

Die in BSp73ASML-Zellen erfolgte Identifikation der C/EBP β /JunD-Bindung am *CCAAT/TRE*-Element begründet den Verdacht, dass auf dieser spezifischen Interaktion eine mögliche Ursache für die in BSp73AS-Zellen beobachteten Unterschiede der *C4.4A*-Transkription basieren könnte. Zur Bearbeitung dieses Problems wurden deshalb CAT-Assays mit den Lysaten von BSp73AS nach Transfektion mit C/EBP β und/oder JunD-Expressionskonstrukten durchgeführt. In der Tat führte die ektopische C/EBP β -Expression zu einer signifikanten Aktivierung des *C4.4A*-Promotors in BSp73AS-Zellen (Kapitel 3.10.5; Abb. 18). Zudem konnte in einem weiteren Experiment gezeigt werden, dass über die ektopische Ko-Expression von C/EBP β und JunD die Promotoraktivität noch um das 2,8fache erhöht werden konnte. Interessanterweise führt im Gegensatz zu BSp73ASML-Zellen eine ektopische JunD-Expression alleine nicht zu einer Aktivierung des *C4.4A*-Promotors in BSp73AS-Zellen. JunD vermag also ohne C/EBP β eine Aktivierung des *C4.4A*-Promotors über das *CCAAT/TRE*-Motiv in BSp73AS nicht zu induzieren. Deshalb ist C/EBP β für die divergente *CCAAT/TRE*-abhängige Aktivierung des *C4.4A*-Gens in BSp73AS bzw. BSp73ASML maßgebend. Für diese Annahme spricht auch ein spezielles Charakteristikum von JunD. JunD unterscheidet sich von seinen AP-1-Familienmitgliedern durch das Fehlen der Andockdomäne für Serin/Threoninkinasen. Aus JunD bestehende Dimere können von der „Jun N-terminale Kinase“ (JNK1/JNK2) bzw. der „extracellular signal regulated kinase“ (ERK1/ERK2) nicht aktiviert werden und somit auch nicht als funktionale Transkriptionsaktivierende Einheit agieren. Jedoch verfügt das Molekül über Phosphoakzeptor-Peptide, die identisch zu denen von z.B. c-Jun sind. Das JunD-Substrat kann von JNK/ERK nur dann phosphoryliert werden nachdem eine Heterodimerisation mit einem Partner stattgefunden hat, der über eine Kinase-Andockstelle verfügt (Kallunki et al., 1996; Morton et al., 2003). So befindet sich z.B. im *uPAR*-Promotor ein *TRE*-Element (Position -184) an dem ein AP-1-Heterodimer bestehend aus JunD/Fra-1 bindet. In diesem Fall stellt Fra-1 die Kinase-Andockdomäne für die Phosphorylierung des Fra-1/JunD-Heterodimers zur Verfügung. Fra-1 ist folglich der maßgebende Faktor in diesem Heterodimer über das schließlich die Aktivierung des *uPAR*-Gens erfolgt (Lengyel et al., 1996; Kustikova et al., 1998). Es wäre vorstellbar, dass C/EBP β – der Rolle von Fra-1 bei der *uPAR*-Transkription analog – durch eine C/EBP β /JunD-Komplexbindung am *CAAT/TRE*-Element den *C4.4A*-Promotor in

BSp73ASML aktiviert. Zumindest sprechen die vorhandene Kinase-Andockstelle des C/EBP β -Proteins und die Aktivierbarkeit des C/EBP β über ERK1/ERK2 für diese Möglichkeit (Nakajima et al., 1993; Trautwein et al., 1993; Shuman et al., 2004).

4.2.4.2 Hypothese zur C/EBP β /JunD-abhängigen C4.4A-Regulation bei Migrationsprozessen

Mit Augenmerk auf die gezeigte Bedeutung von C/EBP β /JunD soll im folgenden veranschaulicht werden, welche möglichen Konsequenzen sich für die C4.4A-Genregulation aus Signalübertragungsprozessen ergeben könnten. Zudem soll im folgenden diskutiert werden, welche funktionellen Zusammenhänge zwischen der gesteigerten Expression von C4.4A und extrazellulären Matrix-Proteinen von Urothelzellen sowie von migrierenden basalen Kerationzyten nach Verwundung besteht könnte (Smith et al., 2001; Hansen et al., 2004).

C/EBP β spielt eine wichtige Rolle bei der Steuerung von Wachstums- und Differenzierungsprozessen von Brustdrüsen-, Leber- und Epithelzellen und steht im Zusammenhang mit neoplastischem Wachstum dieser Zellen (Greenbaum et al., 1998; Robinson et al., 1998; Seagroves et al., 1998; Zhu et al., 2002). Die Steuerungsfunktionen von C/EBP β auf Transkriptionsebene werden über den Ras/MEK/ERK-Signalübertragungsweg reguliert. Über durch Ca²⁺, IL-6, IL-1 und MAPK-Aktivatoren vermittelte Signaltransduktionswege kommt es zur Phosphorylierung von C/EBP β . Dies geschieht durch aktiviertes ERK, PKC und „Ca²⁺-calmodulin-dependent kinase II“ sodass die Transkription von unter der Kontrolle von C/EBP β stehenden Zielgenen reguliert wird (Akira et al., 1990; Poli et al., 1990; Wegner et al., 1992; Nakajima et al., 1993; Ramji et al., 1993; Trautwein et al., 1993; Zhu et al., 2002). Durch diesen Ras/MEK/ERK/C/EBP β -Pathway lässt sich hypothetisch die Stimulation der C4.4A-Expression nach Aussaat von Urothelzellen auf ECM-Proteinen erklären. Vorstellbar ist, dass diese Inkubation mit extrazellulären Matrix-Proteinen zu Integrin/ECM-Proteininteraktionen führt, welche nach der Ausbildung von Punktadhäsionen den Anfang einer Signaltransduktionskette darstellen. So führt z.B. die Integrine-vermittelte Signalweiterleitung zur Aktivierung von FAK („focal adhesion kinase“) und PI3K („phosphoinositide 3-kinase“), wodurch die Aktivierung des Ras/MAPK-Pathway erfolgt, die u.a. in die Phosphorylierung von ERK mündet (siehe Übersichtsartikel: (Campbell and Der, 2004; Sebolt-Leopold and Herrera, 2004). Ein so durch ERK aktivierte C/EBP β

könnte dann die transkriptionelle Aktivierung des *C4.4A*-Gens einleiten (siehe auch Abbildung 24).

Ein aktivierter Ras/MEK/ERK/C/EBP β -Pathway könnte auch die gesteigerte Expression von *C4.4A* bei Wundheilungsprozessen von migrierenden basalen Keratinozyten erklären (Hansen et al., 2004). So ist C/EBP β an der Ca²⁺-induzierten Modulation des frühen Stadiums der Keratinozytendifferenzierung in der Epidermis beteiligt. Dies beinhaltet Wachstumsarretierung aber auch die Aktivierung der Expression von Keratin 1- bzw. Keratin 2 beim Übergang von primären Keratinozyten zu höheren Differenzierungsstadien (Oh and Smart, 1998; Zhu et al., 1999; Zhu et al., 2002). Auch könnte die bei Wundheilungsprozessen charakteristische Freisetzung inflammatorischer Signale, wie der Interleukine IL-1 und IL-6, von Fibroblasten und Makrophagen zur Aktivierung des Ras/MEK-Pathways führen, der dann in die Phosphorylierung von C/EBP β und folglich zur Aktivierung des *C4.4A*-Gens in Keratinozyten mündet (Akira et al., 1990; Poli et al., 1990; Niehof et al., 2001; Zhu et al., 2002). Für diese Annahme spricht ebenfalls die Tatsache, dass C/EBP β u.a. Gene reguliert, die im Zusammenhang mit dem Mobilitäts- und Differenzierungsverhalten von an Entzündungsreaktionen beteiligten Zellen (z.B. myeloiden Zellen) stehen. So belegen Studien, dass C/EBP β u.a. an der Regulation von Interleukin-1 β (IL-1 β), IL-6, IL-8 und „tumor necrosis factor α “ (TNF- α) beteiligt ist (Akira et al., 1990; Mukaida et al., 1990; Drouet et al., 1991; Natsuka et al., 1992; Zagariya et al., 1998).

Die Aktivierung des *C4.4A*-Gens über C/EBP β könnte folglich erklären, warum eine gesteigerte Expression von *C4.4A* auf der Oberfläche migrierender basaler Keratinozyten bei der Wundheilungsprozessen im Mausmodell beobachtet werden konnte. In diesem Zusammenhang ist auch die Beteiligung von JunD an der transkriptionellen Regulation von *C4.4A* interessant. So zeigen Studien, dass die JunD-Expression vor allem in frühen Differenzierungsstadien von Keratinozyten, die u.a. das *stratum basale* und *stratum spinosum* der Epidermis bilden, im Vergleich zu anderen AP-1-Familienmitgliedern (z.B. c-Jun, c-Fos, FosB) wesentlich erhöht ist (siehe Übersichtsartikel; (Angel et al., 2001). Diese Beobachtung stimmt mit der erwähnten C/EBP β -Beteiligung an Differenzierungsprozessen von wenig differenzierten Keratinozyten überein und könnte im kausalem Zusammenhang mit der gesteigerten Expression von *C4.4A* auf migrierenden basalen Keratinozyten stehen.

Bei zukünftigen Experimenten bezüglich der Regulation von *C4.4A* bei Wundheilungsprozessen könnte die in Arbeit befindliche *C4.4A*-K.o.-Maus nützliche Dienste leisten. Eine der Fragestellung, die sich in einem *in vivo*-Modell bearbeiten ließe, wäre

inwieweit C4.4A das Mobilitätsverhalten von migrierenden basalen Keratinozyten in Abhängigkeit vom Ras/MAPK/C/EBP β -Pathway beeinflussen kann.

4.2.4.3 Indizien für die Existenz eines C/EBP β /JunD-Heterodimers

Die bishierhin produzierten Daten lieferten mehrere, aus verschiedenen Richtungen stammende Indizien für die potenzielle Existenz einer C/EBP β /JunD-Heterodimer-Interaktion mit dem *CCAAT/TRE*-Motiv des *C4.4A*-Promotors. Da die Existenz eines C/EBP β /JunD-Dimers bislang noch nicht beschrieben wurde, und dessen Identifizierung einen bedeutenden Fortschritt nicht allein für das nähere Verständnis der *C4.4A*-Regulation darstellt, soll diese Kapitel dazu dienen, nochmals alle in diesem Zusammenhang wichtige Daten herauszustellen und zu diskutieren.

Wie bereits erwähnt, hemmt die Mutation am *TRE*-Element (-81/-74) den aktivierenden Einfluß von sowohl C/EBP β als auch JunD auf den *C4.4A*-Promotor in BSp73ASML-Zellen (Kapitel 3.10.4; Abb. 17). Es überrascht allerdings, dass C/EBP β dessen Bindestelle im *CCAAT*-Motiv (-85/-81) nicht aber im *TRE*-Motiv lokalisiert ist sein Aktivierungspotential auf den *C4.4A*-Promotor einbüßt. Die Interaktion von C/EBP β und *CCAAT*-Motiv kann also die Aktivierung des *C4.4A*-Promotors in BSp73ASML nicht alleine gewährleisten, sondern ist auf das unmittelbar benachbarte *TRE*-Motiv angewiesen. Es lässt sich dabei mit großer Sicherheit ausschließen, dass die DNA-Bindung von C/EBP β direkt durch die Mutation im *TRE*-Motiv beeinflusst wird, da diese außerhalb des *CCAAT*-Bindemotivs lokalisiert ist. Darum muss davon ausgegangen werden, dass das *TRE*-Element von JunD und das *CCAAT*-Element von C/EBP β gleichzeitig gebunden sein müssen, um ihr aktivierendes Potential vollständig ausschöpfen zu können.

Diese Sichtweise wird durch die Tatsache gestützt, dass keine Aktivierung des *C4.4A*-Promotors erfolgt, wenn JunD alleine in BSp73AS-Zellen überexprimiert wird (Kapitel 3.10.5, Abb. 18). Dies lässt sich wiederum nur durch Abwesenheit einer Interaktion mit einem heterologen Transkriptionsfaktorpartner (in diesem Falle wahrscheinlich eine C/EBP β -Isoform) erklären. Da JunD-Dimere die aktivierende Andockstelle für aktivierende Kinasen (JNK bzw. ERK) fehlt, muss JunD also mit einem heterologen Partner dimerisieren, um seinen Transkriptions-aktivierenden Einfluss ausüben zu können. Die vorliegenden Informationen lassen die Vermutung zu, dass C/EBP β dieser heterologe Partner sein könnte. Dies wird unter anderem durch die Beobachtung bestätigt, dass erst wenn C/EBP β in BSp73AS ektopisch ko-exprimiert wurde, JunD Transkriptions-aktivierendes Potential erlangte (Abb.18). Eine naheliegende Erklärung für diese Abhängigkeit wäre eine

C/EBP β /JunD-Heterodimerbindung an das *CCAAT/TRE*-Motiv des *C4.4A*-Promotors und somit die Beteiligung eines solchen Dimers an der *C4.4A*-Regulation.

4.3 Modell zur transkriptionellen *C4.4A*-Regulation

Ein vorläufiges Modell zur Aktivierung der Transkription des *C4.4A*-Gens ist in Abbildung 24 gezeigt. Diese Modell ist zugegebenermaßen noch hypothetisch. Es erlaubt jedoch die bereits gesammelten zellbiologischen Daten mit den hier vorgestellten Informationen zur transkriptionellen Regulation von *C4.4A* kausal zu verknüpfen. Hier postulierte Zusammenhänge sollen als Leitfaden für die Planung zukünftiger Versuche dienen und ermöglichen, Fragen zu adressieren, die sich in naher Zukunft mit Unterstützung der Daten aus Untersuchungen des Maus *C4.4A*-k.o.-Modells beantworten lassen.

Die Aktivierung des Ras/MEK/ERK-Signalübertragungswegs erfolgt über extrazelluläre Signale, wie sie u.a. bei der Migrationsprozessen von Zellen auftreten. Der Ras/MEK/ERK-Pathway kann sowohl durch die Interaktion von Cytokinen (z.B. TGF α) mit Rezeptorkinasen (z.B. EGFR) als auch über Integrinsignaling mittels PI3K und FAK aktiviert werden. Die ERK-vermittelte Phosphorylierung von C/EBP β mündet dann in die transkriptionelle Aktivierung C/EBP β -spezifischer Zielgene.

Die über ein Ras/MEK/ERK-Signal aktivierten C/EBP β /JunD-Proteine könnten dann an das *CCAAT/TRE*-Element (Position –85 bis –74) des *C4.4A*-Promotors binden.

Unter der Beteiligung von Mitgliedern der PLAG-Proteinfamilie und mindestens eines weiteren Transkriptionsfaktors, die an einer sich dem *CCAAT/TRE*-Element anschließenden GC-Box-reichen Region (Position –109 bis –81) binden, kommt es zur Interaktion mit dem basalen Transkriptionsapparat, der sich an einem „Initiator“-Element im Bereich (–47 bis –1) des *C4.4A*-Promotors ausbildet. Diese Wechselbeziehung führt zu einer strukturellen Umformung der DNA, die schließlich die Aktivierung des basalen Transkriptionsapparates zur Folge hat und so zur verstärkten Expression von *C4.4A*-Protein führt.

Die resultierende erhöhte Expression von *C4.4A* auf der Zelloberfläche von z.B. basalen Keratinozyten bei Wundheilungsprozessen korreliert mit einem erhöhten Migrationspotential dieser Zellen. Ein denkbare Szenario die Ursachen des erhöhten Migrationspotentials in Tumorzellen wäre, dass Mutationen von Proto-Onkogenen, wie beispielsweise Ras, für eine kontinuierliche Aktivierung des Ras/MEK/ERK-Pathway und so schließlich auch von CEBP β

ermöglicht. Logische Folge dieser Kausalkette wäre dann das durch C4.4A mitverantwortete, kontinuierlich erhöhte Migrationspotential von Tumorzellen.

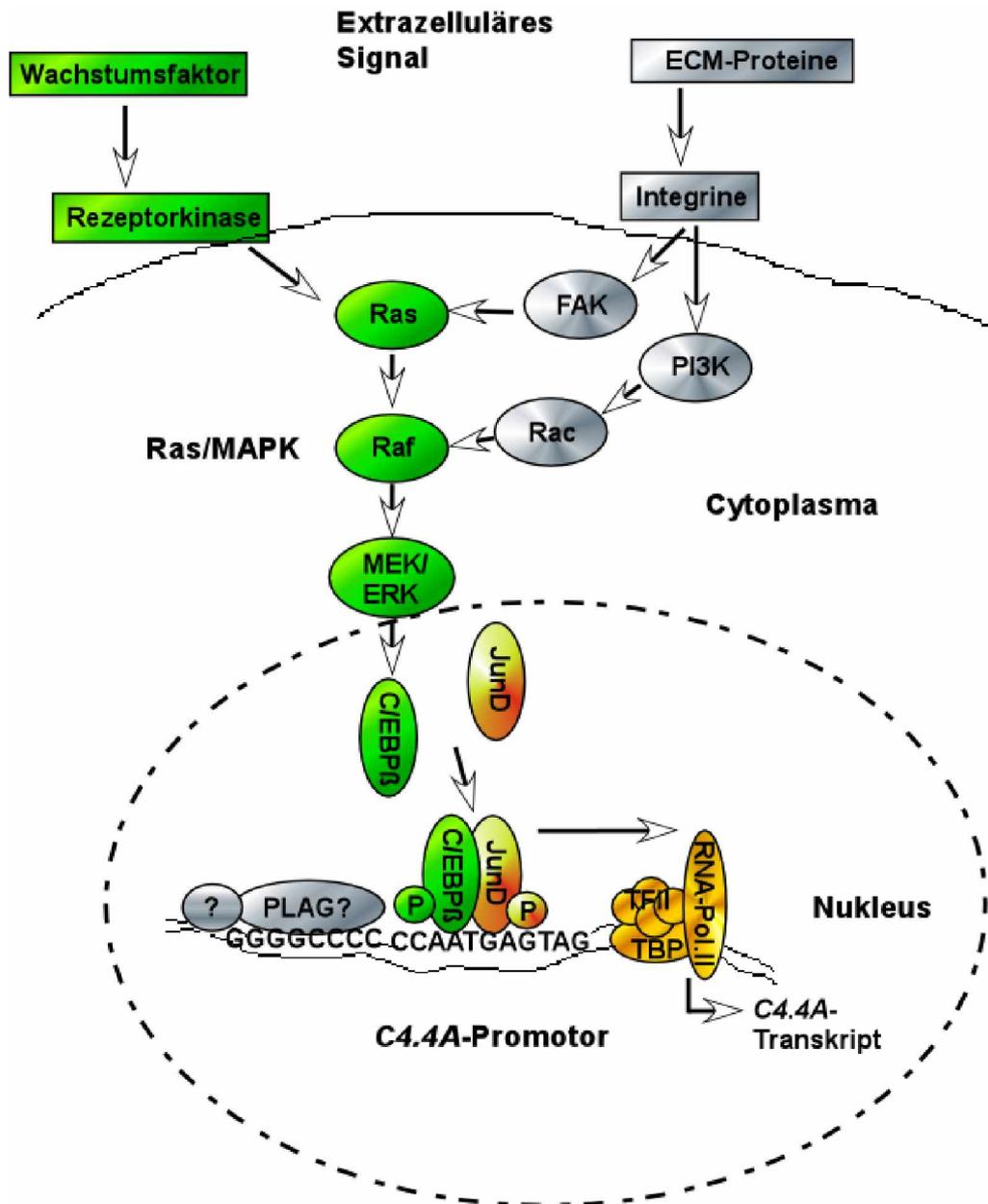


Abbildung 24: **Modell der transkriptionellen C4.4A-Regulation.** Über den Ras/MAPK-Signalübertragungsweg wird der C/EBP β /JunD-Komplex aktiviert. Durch die Bindung dieses Komplex an ein überlappendes CCAAT/TRE-Element (-85/-74) und die Bindung von weiteren Transkriptionsfaktoren (möglicherweise unter Beteiligung von PLAG) an einer GC-reichen Region (-109/-81) bildet sich ein Enhancersom am C4.4A-Promotors aus. Dies führt zu einer Umformung der Promotor-DNA, wodurch der basale Transkriptionsapparat aktiviert wird, der schließlich das C4.4A-Transkript synthetisiert.

4.4 Herstellung eines *C4.4A* Maus k.o.-Konstruktes

Um einen umfassenderen Einblick in die physiologische Funktion des noch weitgehend unerforschten *C4.4A*-Gens zu erhalten, wurde neben der *C4.4A*-Promotoranalyse mit der Herstellung einer *C4.4A*-k.o.-Maus begonnen.

Als Stammzellen wurden männlichen embryonale Stammzellen vom Mausstamm 129/OlaHsd (Cinchilla/Agouti Fellfarbe) ausgewählt. Nach der Blastozysteninjektion in ein scheinschwangeres Weibchen vom Mausstamm C57Bl/6 (schwarze Fellfarbe) sollten dann die chimären Nachkommen anhand der Cinchilla/Agouti Fellfarbanteile identifiziert werden können.

Das initial hergestellte Maus-*C4.4A*-k.o.-pHM2-Konstrukt (Kapitel 3.12; Abb. 20) beinhaltet eine Neo-Kassette als Selektionsmarker und kodiert zudem ein LacZ-Gen, das unter der Kontrolle des *C4.4A*-Promotors stand. Diese Reporter-Gen-Strategie hätte es ermöglicht, die Expression von *C4.4A* *in vivo* zu verfolgen. Die Homologiearme dieses Konstrukts waren so gewählt, dass sie das komplette Protein-kodierende Region des *C4.4A*-Gen „ausgeknockt“ hätten. Die Transformation dieses Konstrukts in embryonalen Stammzellen führte jedoch nicht zu einer erfolgreichen homologen Rekombination am *C4.4A*-Genlocus.

Daraufhin wurde ein neuer Vektor konstruiert, der an Stelle eines LacZ-Gens eine Diphtheriatoxin-Kassette als zweiten Selektionsmarker inseriert hat. Außerdem war in diesem Konstrukt der 5'-Homologiearm bis zum zweiten Exon der *C4.4A*-kodierenden Sequenz verlängert. Stromaufwärts des zweiten Exon wurde die Neo-Kassette positioniert (Kapitel 3.12; Abb. 21).

Diese am neuen Konstrukt vorgenommenen Modifikationen führten nach Transformation des Maus-*C4.4A*-k.o.-Vektors in embryonale Maus-Stammzellen zur Identifizierung eines am *C4.4A*-Lokus homolog rekombinierten ES-Klons. Das Southern-Experiment in Abbildung 23 beweist, dass im „ES-Klon 283“ eine für das 5'-Ende homologe Rekombination stattgefunden hat (Kapitel 3.12; Abb. 23). Die über Restriktionsverdau generierten DNA-Fragmente entsprachen nach Hybridisierung mit einer für den 5'-Homologiearm spezifischen Sonde sowohl der zu erwartenden Größe des *C4.4A*-k.o.-Allels (6,1kb) als auch der des *C4.4A*-Wildtyp-Allels (6,7kb). Unterschiede der Signalintensitäten von *C4.4A*-Wildtyp-Allel und *C4.4A*-k.o.-Allele lassen sich über den unterschiedlichen DNA-Anteil nicht-transformierter Neomycin-resistenter „Feeder“-Zellen erklären, die notwendigerweise zur Kultivierung der ES-Zellen eingesetzt wurden. Die Ergebnisse der Southern-Hybridisierung konnten durch eine speziell für das 3'-Ende des *C4.4A*-k.o.-Allels entworfene PCR-Strategie bestätigt

werden. Die resultierten PCR-Produkte entsprechen den nach erfolgreicher homologer Rekombination erwarteten Fragmentgrößen (Kapitel 3.12; Abb. 24). Eine in Prozess befindliche Southernblot-Analyse mit einer für das Neomycingen spezifische Sonde, soll dieses Ergebnis nochmals bestätigen.

Die zur Generierung einer *C4.4A*-k.o.-Maus weiteren notwendigen Arbeiten sollten von der hauseigenen Serviceeinrichtung des DKFZ durchgeführt werden.

Nach Fertigstellung der *C4.4A* k.o.-Maus sind Experimente geplant, die dazu beitragen sollen, die physiologische Funktion des *C4.4A* näher zu charakterisieren. Von speziellem Interesse werden hier weitere Untersuchungen zur Transkription von *C4.4A* und zur vermuteten Funktion des Moleküls bei der Zellmigration sein. Vergleichende Untersuchungen zur Wundheilung in *C4.4A*-kompetenten und „knockout“ Tieren sollen Gegenstand weiterer Studien sein.

5 Literaturverzeichnis

- Adachi, N. and Lieber, M.R.: Bidirectional gene organization: a common architectural feature of the human genome. *Cell* 109 (2002) 807-9.
- Adams, R.H., Diella, F., Hennig, S., Helmbacher, F., Deutsch, U. and Klein, R.: The cytoplasmic domain of the ligand ephrinB2 is required for vascular morphogenesis but not cranial neural crest migration. *Cell* 104 (2001) 57-69.
- Agarwal, S.K., Guru, S.C., Heppner, C., Erdos, M.R., Collins, R.M., Park, S.Y., Saggar, S., Chandrasekharappa, S.C., Collins, F.S., Spiegel, A.M., Marx, S.J. and Burns, A.L.: Menin interacts with the AP1 transcription factor JunD and represses JunD-activated transcription. *Cell* 96 (1999) 143-52.
- Akira, S., Isshiki, H., Sugita, T., Tanabe, O., Kinoshita, S., Nishio, Y., Nakajima, T., Hirano, T. and Kishimoto, T.: A nuclear factor for IL-6 expression (NF-IL6) is a member of a C/EBP family. *Embo J* 9 (1990) 1897-906.
- Andrews, N.C. and Faller, D.V.: A rapid micropreparation technique for extraction of DNA-binding proteins from limiting numbers of mammalian cells. *Nucleic Acids Res* 19 (1991) 2499.
- Angel, P., Szabowski, A. and Schorpp-Kistner, M.: Function and regulation of AP-1 subunits in skin physiology and pathology. *Oncogene* 20 (2001) 2413-23.
- Audic, Y. and Hartley, R.S.: Post-transcriptional regulation in cancer. *Biol Cell* 96 (2004) 479-98.
- Bakiri, L., Lallemand, D., Bossy-Wetzel, E. and Yaniv, M.: Cell cycle-dependent variations in c-Jun and JunB phosphorylation: a role in the control of cyclin D1 expression. *Embo J* 19 (2000) 2056-68.
- Barbacid, M.: ras genes. *Annu Rev Biochem* 56 (1987) 779-827.
- Barclay, A.N.: Membrane proteins with immunoglobulin-like domains--a master superfamily of interaction molecules. *Semin Immunol* 15 (2003) 215-23.
- Bardeesy, N. and DePinho, R.A.: Pancreatic cancer biology and genetics. *Nat Rev Cancer* 2 (2002) 897-909.
- Bauvois, B.: Transmembrane proteases in cell growth and invasion: new contributors to angiogenesis? *Oncogene* 23 (2004) 317-29.
- Behrendt, N., Ronne, E. and Dano, K.: Domain interplay in the urokinase receptor. Requirement for the third domain in high affinity ligand binding and demonstration of ligand contact sites in distinct receptor domains. *J Biol Chem* 271 (1996) 22885-94.
- Behrens, A., Sibilio, M. and Wagner, E.F.: Amino-terminal phosphorylation of c-Jun regulates stress-induced apoptosis and cellular proliferation. *Nat Genet* 21 (1999) 326-9.
- Ben-Ze'ev, A., Zoller, M. and Raz, A.: Differential expression of intermediate filament proteins in metastatic and nonmetastatic variants of the BSp73 tumor. *Cancer Res* 46 (1986) 785-90.
- Berrier, A., Siu, G. and Calame, K.: Transcription of a minimal promoter from the NF-IL6 gene is regulated by CREB/ATF and SP1 proteins in U937 promonocytic cells. *J Immunol* 161 (1998) 2267-75.
- Bevilacqua, A., Ceriani, M.C., Capaccioli, S. and Nicolini, A.: Post-transcriptional regulation of gene expression by degradation of messenger RNAs. *J Cell Physiol* 195 (2003) 356-72.
- Blasi, F. and Carmeliet, P.: uPAR: a versatile signalling orchestrator. *Nat Rev Mol Cell Biol* 3 (2002) 932-43.

- Blendy, J.A., Kaestner, K.H., Weinbauer, G.F., Nieschlag, E. and Schutz, G.: Severe impairment of spermatogenesis in mice lacking the CREM gene. *Nature* 380 (1996) 162-5.
- Borglum, A.D., Byskov, A., Ragno, P., Roldan, A.L., Tripputi, P., Cassani, G., Dano, K., Blasi, F., Bolund, L. and Kruse, T.A.: Assignment of the urokinase-type plasminogen activator receptor gene (PLAUR) to chromosome 19q13.1-q13.2. *Am J Hum Genet* 50 (1992) 492-7.
- Breathnach, R. and Chambon, P.: Organization and expression of eucaryotic split genes coding for proteins. *Annu Rev Biochem* 50 (1981) 349-83.
- Bretscher, M.S.: Moving membrane up to the front of migrating cells. *Cell* 85 (1996) 465-7.
- Brooks, P.C., Stromblad, S., Sanders, L.C., von Schalscha, T.L., Aimes, R.T., Stetler-Stevenson, W.G., Quigley, J.P. and Chersesh, D.A.: Localization of matrix metalloproteinase MMP-2 to the surface of invasive cells by interaction with integrin alpha v beta 3. *Cell* 85 (1996) 683-93.
- Buck, M., Poli, V., van der Geer, P., Chojkier, M. and Hunter, T.: Phosphorylation of rat serine 105 or mouse threonine 217 in C/EBP beta is required for hepatocyte proliferation induced by TGF alpha. *Mol Cell* 4 (1999) 1087-92.
- Burke, T.W. and Kadonaga, J.T.: The downstream core promoter element, DPE, is conserved from *Drosophila* to humans and is recognized by TAFII60 of *Drosophila*. *Genes Dev* 11 (1997) 3020-31.
- Burridge, K. and Chrzanowska-Wodnicka, M.: Focal adhesions, contractility, and signaling. *Annu Rev Cell Dev Biol* 12 (1996) 463-518.
- Butler, J.E. and Kadonaga, J.T.: The RNA polymerase II core promoter: a key component in the regulation of gene expression. *Genes Dev* 16 (2002) 2583-92.
- Campbell, P.M. and Der, C.J.: Oncogenic Ras and its role in tumor cell invasion and metastasis. *Semin Cancer Biol* 14 (2004) 105-14.
- Chambers, A.F., Groom, A.C. and MacDonald, I.C.: Dissemination and growth of cancer cells in metastatic sites. *Nat Rev Cancer* 2 (2002) 563-72.
- Chambers, A.F., MacDonald, I.C., Schmidt, E.E., Morris, V.L. and Groom, A.C.: Preclinical assessment of anti-cancer therapeutic strategies using in vivo videomicroscopy. *Cancer Metastasis Rev* 17 (1998) 263-9.
- Chambers, A.F., Naumov, G.N., Varghese, H.J., Nadkarni, K.V., MacDonald, I.C. and Groom, A.C.: Critical steps in hematogenous metastasis: an overview. *Surg Oncol Clin N Am* 10 (2001) 243-55, vii.
- Claas, C., Herrmann, K., Matzku, S., Moller, P. and Zoller, M.: Developmentally regulated expression of metastasis-associated antigens in the rat. *Cell Growth Differ* 7 (1996) 663-78.
- Cox, A.D. and Der, C.J.: The dark side of Ras: regulation of apoptosis. *Oncogene* 22 (2003) 8999-9006.
- Cramer, L.P.: Organization and polarity of actin filament networks in cells: implications for the mechanism of myosin-based cell motility. *Biochem Soc Symp* 65 (1999) 173-205.
- Cukierman, E., Pankov, R., Stevens, D.R. and Yamada, K.M.: Taking cell-matrix adhesions to the third dimension. *Science* 294 (2001) 1708-12.
- Czekay, R.P., Kuemmel, T.A., Orlando, R.A. and Farquhar, M.G.: Direct binding of occupied urokinase receptor (uPAR) to LDL receptor-related protein is required for endocytosis of uPAR and regulation of cell surface urokinase activity. *Mol Biol Cell* 12 (2001) 1467-79.
- Dang, J., Boyd, D., Wang, H., Allgayer, H., Doe, W.F. and Wang, Y.: A region between -141 and -61 bp containing a proximal AP-1 is essential for constitutive expression of urokinase-type plasminogen activator receptor. *Eur J Biochem* 264 (1999) 92-9.

- Dano, K., Andreasen, P.A., Grondahl-Hansen, J., Kristensen, P., Nielsen, L.S. and Skriver, L.: Plasminogen activators, tissue degradation, and cancer. *Adv Cancer Res* 44 (1985) 139-266.
- de Groot, R.P., Karperien, M., Pals, C. and Kruijer, W.: Characterization of the mouse junD promoter--high basal level activity due to an octamer motif. *Embo J* 10 (1991) 2523-32.
- Deng, T. and Karin, M.: JunB differs from c-Jun in its DNA-binding and dimerization domains, and represses c-Jun by formation of inactive heterodimers. *Genes Dev* 7 (1993) 479-90.
- Descombes, P. and Schibler, U.: A liver-enriched transcriptional activator protein, LAP, and a transcriptional inhibitory protein, LIP, are translated from the same mRNA. *Cell* 67 (1991) 569-79.
- Drouet, C., Shakhov, A.N. and Jongeneel, C.V.: Enhancers and transcription factors controlling the inducibility of the tumor necrosis factor-alpha promoter in primary macrophages. *J Immunol* 147 (1991) 1694-700.
- Dumin, J.A., Dickeson, S.K., Stricker, T.P., Bhattacharyya-Pakrasi, M., Roby, J.D., Santoro, S.A. and Parks, W.C.: Pro-collagenase-1 (matrix metalloproteinase-1) binds the alpha(2)beta(1) integrin upon release from keratinocytes migrating on type I collagen. *J Biol Chem* 276 (2001) 29368-74.
- Eferl, R., Ricci, R., Kenner, L., Zenz, R., David, J.P., Rath, M. and Wagner, E.F.: Liver tumor development. c-Jun antagonizes the proapoptotic activity of p53. *Cell* 112 (2003) 181-92.
- Eferl, R. and Wagner, E.F.: AP-1: a double-edged sword in tumorigenesis. *Nat Rev Cancer* 3 (2003) 859-68.
- Ewing, J.: *A Treatise on Tumors. Neoplastic Diseases* 77-89 (1928).
- Fidler, I.J., Schackert, G., Zhang, R.D., Radinsky, R. and Fujimaki, T.: The biology of melanoma brain metastasis. *Cancer Metastasis Rev* 18 (1999) 387-400.
- Finco, T.S., Westwick, J.K., Norris, J.L., Beg, A.A., Der, C.J. and Baldwin, A.S., Jr.: Oncogenic Ha-Ras-induced signaling activates NF-kappaB transcriptional activity, which is required for cellular transformation. *J Biol Chem* 272 (1997) 24113-6.
- Folkman, J.: The role of angiogenesis in tumor growth. *Semin Cancer Biol* 3 (1992) 65-71.
- Friedl, P. and Bocker, E.B.: The biology of cell locomotion within three-dimensional extracellular matrix. *Cell Mol Life Sci* 57 (2000) 41-64.
- Friedl, P. and Wolf, K.: Tumour-cell invasion and migration: diversity and escape mechanisms. *Nat Rev Cancer* 3 (2003) 362-74.
- Gorman, C.M., Moffat, L.F. and Howard, B.H.: Recombinant genomes which express chloramphenicol acetyltransferase in mammalian cells. *Mol Cell Biol* 2 (1982) 1044-51.
- Greenbaum, L.E., Li, W., Cressman, D.E., Peng, Y., Ciliberto, G., Poli, V. and Taub, R.: CCAAT enhancer-binding protein beta is required for normal hepatocyte proliferation in mice after partial hepatectomy. *J Clin Invest* 102 (1998) 996-1007.
- Grigoriadis, A.E., Schellander, K., Wang, Z.Q. and Wagner, E.F.: Osteoblasts are target cells for transformation in c-fos transgenic mice. *J Cell Biol* 122 (1993) 685-701.
- Hagen, G., Dennig, J., Preiss, A., Beato, M. and Suske, G.: Functional analyses of the transcription factor Sp4 reveal properties distinct from Sp1 and Sp3. *J Biol Chem* 270 (1995) 24989-94.
- Hagen, G., Muller, S., Beato, M. and Suske, G.: Sp1-mediated transcriptional activation is repressed by Sp3. *Embo J* 13 (1994) 3843-51.
- Han, Q., Leng, J., Bian, D., Mahanivong, C., Carpenter, K.A., Pan, Z.K., Han, J. and Huang, S.: Rac1-MKK3-p38-MAPKAPK2 pathway promotes urokinase plasminogen

- activator mRNA stability in invasive breast cancer cells. *J Biol Chem* 277 (2002) 48379-85.
- Hansen, L.V., Gardsvoll, H., Nielsen, B.S., Lund, L.R., Dano, K., Jensen, O.N. and Ploug, M.: Structural analysis and tissue localization of human C4.4A: a protein homologue of the urokinase receptor. *Biochem J* 380 (2004) 845-57.
- Hensen, K., Van Valckenborgh, I.C., Kas, K., Van de Ven, W.J. and Voz, M.L.: The tumorigenic diversity of the three PLAG family members is associated with different DNA binding capacities. *Cancer Res* 62 (2002) 1510-7.
- Herlevsen, M., Schmidt, D.S., Miyazaki, K. and Zoller, M.: The association of the tetraspanin D6.1A with the alpha6beta4 integrin supports cell motility and liver metastasis formation. *J Cell Sci* 116 (2003) 4373-90.
- Hsu, W., Kerppola, T.K., Chen, P.L., Curran, T. and Chen-Kiang, S.: Fos and Jun repress transcription activation by NF-IL6 through association at the basic zipper region. *Mol Cell Biol* 14 (1994) 268-76.
- Hu, E., Mueller, E., Oliviero, S., Papaioannou, V.E., Johnson, R. and Spiegelman, B.M.: Targeted disruption of the c-fos gene demonstrates c-fos-dependent and -independent pathways for gene expression stimulated by growth factors or oncogenes. *Embo J* 13 (1994) 3094-103.
- Hynes, R.O.: Integrins: bidirectional, allosteric signaling machines. *Cell* 110 (2002) 673-87.
- Imhof, B.A. and Aurrand-Lions, M.: Adhesion mechanisms regulating the migration of monocytes. *Nat Rev Immunol* 4 (2004) 432-44.
- Ishino, K., Fukazawa, H., Shikano, M., Ohba, M., Kuroki, T. and Uehara, Y.: Enhancement of anchorage-independent growth of human pancreatic carcinoma MIA PaCa-2 cells by signaling from protein kinase C to mitogen-activated protein kinase. *Mol Carcinog* 34 (2002) 180-6.
- Javahery, R., Khachi, A., Lo, K., Zenzie-Gregory, B. and Smale, S.T.: DNA sequence requirements for transcriptional initiator activity in mammalian cells. *Mol Cell Biol* 14 (1994) 116-27.
- Jo, M., Thomas, K.S., Wu, L. and Gonias, S.L.: Soluble urokinase-type plasminogen activator receptor inhibits cancer cell growth and invasion by direct urokinase-independent effects on cell signaling. *J Biol Chem* 278 (2003) 46692-8.
- Jochum, W., David, J.P., Elliott, C., Wutz, A., Plenk, H., Jr., Matsuo, K. and Wagner, E.F.: Increased bone formation and osteosclerosis in mice overexpressing the transcription factor Fra-1. *Nat Med* 6 (2000) 980-4.
- Johnson, R., Spiegelman, B., Hanahan, D. and Wisdom, R.: Cellular transformation and malignancy induced by ras require c-jun. *Mol Cell Biol* 16 (1996) 4504-11.
- Kaestner, K.H., Montoliu, L., Kern, H., Thulke, M. and Schutz, G.: Universal beta-galactosidase cloning vectors for promoter analysis and gene targeting. *Gene* 148 (1994) 67-70.
- Kallunki, T., Deng, T., Hibi, M. and Karin, M.: c-Jun can recruit JNK to phosphorylate dimerization partners via specific docking interactions. *Cell* 87 (1996) 929-39.
- Kas, K., Roijer, E., Voz, M., Meyen, E., Stenman, G. and Van de Ven, W.J.: A 2-Mb YAC contig and physical map covering the chromosome 8q12 breakpoint cluster region in pleomorphic adenomas of the salivary glands. *Genomics* 43 (1997a) 349-58.
- Kas, K., Voz, M.L., Hensen, K., Meyen, E. and Van de Ven, W.J.: Transcriptional activation capacity of the novel PLAG family of zinc finger proteins. *J Biol Chem* 273 (1998) 23026-32.
- Kas, K., Voz, M.L., Roijer, E., Astrom, A.K., Meyen, E., Stenman, G. and Van de Ven, W.J.: Promoter swapping between the genes for a novel zinc finger protein and beta-catenin in pleiomorphic adenomas with t(3;8)(p21;q12) translocations. *Nat Genet* 15 (1997b) 170-4.

- Kingsley, C. and Winoto, A.: Cloning of GT box-binding proteins: a novel Sp1 multigene family regulating T-cell receptor gene expression. *Mol Cell Biol* 12 (1992) 4251-61.
- Knudson, A.G., Jr.: Mutation and cancer: statistical study of retinoblastoma. *Proc Natl Acad Sci U S A* 68 (1971) 820-3.
- Kustikova, O., Kramerov, D., Grigorian, M., Berezin, V., Bock, E., Lukanidin, E. and Tulchinsky, E.: Fra-1 induces morphological transformation and increases in vitro invasiveness and motility of epithelioid adenocarcinoma cells. *Mol Cell Biol* 18 (1998) 7095-105.
- Lagrange, T., Kapanidis, A.N., Tang, H., Reinberg, D. and Ebright, R.H.: New core promoter element in RNA polymerase II-dependent transcription: sequence-specific DNA binding by transcription factor IIB. *Genes Dev* 12 (1998) 34-44.
- Lamb, R.F., Hennigan, R.F., Turnbull, K., Katsanakis, K.D., MacKenzie, E.D., Birnie, G.D. and Ozanne, B.W.: AP-1-mediated invasion requires increased expression of the hyaluronan receptor CD44. *Mol Cell Biol* 17 (1997) 963-76.
- Langer, S.J., Bortner, D.M., Roussel, M.F., Sherr, C.J. and Ostrowski, M.C.: Mitogenic signaling by colony-stimulating factor 1 and ras is suppressed by the ets-2 DNA-binding domain and restored by myc overexpression. *Mol Cell Biol* 12 (1992) 5355-62.
- Lauffenburger, D.A. and Horwitz, A.F.: Cell migration: a physically integrated molecular process. *Cell* 84 (1996) 359-69.
- Leavesley, D.I., Ferguson, G.D., Wayner, E.A. and Cheresch, D.A.: Requirement of the integrin beta 3 subunit for carcinoma cell spreading or migration on vitronectin and fibrinogen. *J Cell Biol* 117 (1992) 1101-7.
- Lee, J.W. and Juliano, R.: Mitogenic signal transduction by integrin- and growth factor receptor-mediated pathways. *Mol Cells* 17 (2004) 188-202.
- Lengyel, E., Wang, H., Stepp, E., Juarez, J., Wang, Y., Doe, W., Pfarr, C.M. and Boyd, D.: Requirement of an upstream AP-1 motif for the constitutive and phorbol ester-inducible expression of the urokinase-type plasminogen activator receptor gene. *J Biol Chem* 271 (1996) 23176-84.
- Luckow, B. and Schutz, G.: CAT constructions with multiple unique restriction sites for the functional analysis of eukaryotic promoters and regulatory elements. *Nucleic Acids Res* 15 (1987) 5490.
- Luzzi, K.J., MacDonald, I.C., Schmidt, E.E., Kerkvliet, N., Morris, V.L., Chambers, A.F. and Groom, A.C.: Multistep nature of metastatic inefficiency: dormancy of solitary cells after successful extravasation and limited survival of early micrometastases. *Am J Pathol* 153 (1998) 865-73.
- Marin, M., Karis, A., Visser, P., Grosveld, F. and Philipsen, S.: Transcription factor Sp1 is essential for early embryonic development but dispensable for cell growth and differentiation. *Cell* 89 (1997) 619-28.
- Matzku, S., Komitowski, D., Mildenerger, M. and Zoller, M.: Characterization of BSp73, a spontaneous rat tumor and its in vivo selected variants showing different metastasizing capacities. *Invasion Metastasis* 3 (1983) 109-23.
- Meijlink, F., Curran, T., Miller, A.D. and Verma, I.M.: Removal of a 67-base-pair sequence in the noncoding region of protooncogene fos converts it to a transforming gene. *Proc Natl Acad Sci U S A* 82 (1985) 4987-91.
- Morton, S., Davis, R.J., McLaren, A. and Cohen, P.: A reinvestigation of the multisite phosphorylation of the transcription factor c-Jun. *Embo J* 22 (2003) 3876-86.
- Motoyama, N. and Naka, K.: DNA damage tumor suppressor genes and genomic instability. *Curr Opin Genet Dev* 14 (2004) 11-6.

- Mueller, S.C., Ghersi, G., Akiyama, S.K., Sang, Q.X., Howard, L., Pineiro-Sanchez, M., Nakahara, H., Yeh, Y. and Chen, W.T.: A novel protease-docking function of integrin at invadopodia. *J Biol Chem* 274 (1999) 24947-52.
- Mukaida, N., Mahe, Y. and Matsushima, K.: Cooperative interaction of nuclear factor-kappa B- and cis-regulatory enhancer binding protein-like factor binding elements in activating the interleukin-8 gene by pro-inflammatory cytokines. *J Biol Chem* 265 (1990) 21128-33.
- Nakajima, K., Kusafuka, T., Takeda, T., Fujitani, Y., Nakae, K. and Hirano, T.: Identification of a novel interleukin-6 response element containing an Ets-binding site and a CRE-like site in the junB promoter. *Mol Cell Biol* 13 (1993) 3027-41.
- Natsuka, S., Akira, S., Nishio, Y., Hashimoto, S., Sugita, T., Isshiki, H. and Kishimoto, T.: Macrophage differentiation-specific expression of NF-IL6, a transcription factor for interleukin-6. *Blood* 79 (1992) 460-6.
- Nguyen, D.H., Catling, A.D., Webb, D.J., Sankovic, M., Walker, L.A., Somlyo, A.V., Weber, M.J. and Gonias, S.L.: Myosin light chain kinase functions downstream of Ras/ERK to promote migration of urokinase-type plasminogen activator-stimulated cells in an integrin-selective manner. *J Cell Biol* 146 (1999) 149-64.
- Niehof, M., Streetz, K., Rakemann, T., Bischoff, S.C., Manns, M.P., Horn, F. and Trautwein, C.: Interleukin-6-induced tethering of STAT3 to the LAP/C/EBPbeta promoter suggests a new mechanism of transcriptional regulation by STAT3. *J Biol Chem* 276 (2001) 9016-27.
- Nielsen, L.S., Andreasen, P.A., Grondahl-Hansen, J., Skriver, L. and Dano, K.: Plasminogen activators catalyse conversion of inhibitor from fibrosarcoma cells to an inactive form with a lower apparent molecular mass. *FEBS Lett* 196 (1986) 269-73.
- Nykjaer, A., Conese, M., Christensen, E.I., Olson, D., Cremona, O., Gliemann, J. and Blasi, F.: Recycling of the urokinase receptor upon internalization of the uPA:serpin complexes. *Embo J* 16 (1997) 2610-20.
- Ogata, K., Sato, K. and Tahirov, T.H.: Eukaryotic transcriptional regulatory complexes: cooperativity from near and afar. *Curr Opin Struct Biol* 13 (2003) 40-8.
- Oh, H.S. and Smart, R.C.: Expression of CCAAT/enhancer binding proteins (C/EBP) is associated with squamous differentiation in epidermis and isolated primary keratinocytes and is altered in skin neoplasms. *J Invest Dermatol* 110 (1998) 939-45.
- Okan, E., Drewett, V., Shaw, P.E. and Jones, P.: The small-GTPase RalA activates transcription of the urokinase plasminogen activator receptor (uPAR) gene via an AP1-dependent mechanism. *Oncogene* 20 (2001) 1816-24.
- Osoegawa, K., Woon, P.Y., Zhao, B., Frengen, E., Tateno, M., Catanese, J.J. and de Jong, P.J.: An improved approach for construction of bacterial artificial chromosome libraries. *Genomics* 52 (1998) 1-8.
- Ossipow, V., Descombes, P. and Schibler, U.: CCAAT/enhancer-binding protein mRNA is translated into multiple proteins with different transcription activation potentials. *Proc Natl Acad Sci U S A* 90 (1993) 8219-23.
- Ossowski, L. and Aguirre-Ghiso, J.A.: Urokinase receptor and integrin partnership: coordination of signaling for cell adhesion, migration and growth. *Curr Opin Cell Biol* 12 (2000) 613-20.
- Paget, S.: The distribution of secondary growths in cancer of the breast. 1889. *Cancer Metastasis Rev* 8 (1989) 98-101.
- Panicker, A.K., Buhusi, M., Thelen, K. and Maness, P.F.: Cellular signalling mechanisms of neural cell adhesion molecules. *Front Biosci* 8 (2003) d900-11.
- Parada, L.F., Tabin, C.J., Shih, C. and Weinberg, R.A.: Human EJ bladder carcinoma oncogene is homologue of Harvey sarcoma virus ras gene. *Nature* 297 (1982) 474-8.

- Paret, C., Bourouba, M., Beer, A., Miyazaki, K., Schnolzer, M., Fiedler, S. and Zoller, M.: Ly6 family member C4.4A binds laminins 1 and 5, associates with galectin-3 and supports cell migration. *Int J Cancer* 115 (2005) 724-33.
- Passegue, E., Jochum, W., Schorpp-Kistner, M., Mohle-Steinlein, U. and Wagner, E.F.: Chronic myeloid leukemia with increased granulocyte progenitors in mice lacking junB expression in the myeloid lineage. *Cell* 104 (2001) 21-32.
- Patel, L., Abate, C. and Curran, T.: Altered protein conformation on DNA binding by Fos and Jun. *Nature* 347 (1990) 572-5.
- Pfaff, M., Du, X. and Ginsberg, M.H.: Calpain cleavage of integrin beta cytoplasmic domains. *FEBS Lett* 460 (1999) 17-22.
- Pfarr, C.M., Mechta, F., Spyrou, G., Lallemand, D., Carillo, S. and Yaniv, M.: Mouse JunD negatively regulates fibroblast growth and antagonizes transformation by ras. *Cell* 76 (1994) 747-60.
- Poli, V., Mancini, F.P. and Cortese, R.: IL-6DBP, a nuclear protein involved in interleukin-6 signal transduction, defines a new family of leucine zipper proteins related to C/EBP. *Cell* 63 (1990) 643-53.
- Ponta, H., Sherman, L. and Herrlich, P.A.: CD44: from adhesion molecules to signalling regulators. *Nat Rev Mol Cell Biol* 4 (2003) 33-45.
- Rabinovitz, I. and Mercurio, A.M.: The integrin alpha6beta4 functions in carcinoma cell migration on laminin-1 by mediating the formation and stabilization of actin-containing motility structures. *J Cell Biol* 139 (1997) 1873-84.
- Radinsky, R. and Ellis, L.M.: Molecular determinants in the biology of liver metastasis. *Surg Oncol Clin N Am* 5 (1996) 215-29.
- Ramji, D.P. and Foka, P.: CCAAT/enhancer-binding proteins: structure, function and regulation. *Biochem J* 365 (2002) 561-75.
- Ramji, D.P., Vitelli, A., Tronche, F., Cortese, R. and Ciliberto, G.: The two C/EBP isoforms, IL-6DBP/NF-IL6 and C/EBP delta/NF-IL6 beta, are induced by IL-6 to promote acute phase gene transcription via different mechanisms. *Nucleic Acids Res* 21 (1993) 289-94.
- Rao, J.S.: Molecular mechanisms of glioma invasiveness: the role of proteases. *Nat Rev Cancer* 3 (2003) 489-501.
- Raz, A., Zoller, M. and Ben, Z.e.: Cell configuration and adhesive properties of metastasizing and non-metastasizing BSp73 rat adenocarcinoma cells. *Exp Cell Res* 162 (1986) 127-41.
- Reisser, D., Olsson, N.O. and Martin, F.: In vivo and in vitro reactivity of rat spleen cells against regressor and progressor colon-cancer cell variants. *Int J Cancer* 53 (1993) 651-6.
- Robinson, E.K., Sneige, N. and Grimm, E.A.: Correlation of interleukin 6 with interleukin 1alpha in human mammary tumours, but not with oestrogen receptor expression. *Cytokine* 10 (1998) 970-6.
- Rosel, M., Claas, C., Seiter, S., Herlevsen, M. and Zoller, M.: Cloning and functional characterization of a new phosphatidyl-inositol anchored molecule of a metastasizing rat pancreatic tumor. *Oncogene* 17 (1998) 1989-2002.
- Rozenblum, E., Schutte, M., Goggins, M., Hahn, S.A., Panzer, S., Zahurak, M., Goodman, S.N., Sohn, T.A., Hruban, R.H., Yeo, C.J. and Kern, S.E.: Tumor-suppressive pathways in pancreatic carcinoma. *Cancer Res* 57 (1997) 1731-4.
- Schirmacher, V. and Appelhans, B.: Interaction of high or low metastatic related tumor lines with normal or lymphokine-activated syngeneic peritoneal macrophages: in vitro analysis of tumor cell binding and cytostasis. *Clin Exp Metastasis* 3 (1985) 29-43.

- Schorpp, M., Mattei, M.G., Herr, I., Gack, S., Schaper, J. and Angel, P.: Structural organization and chromosomal localization of the mouse collagenase type I gene. *Biochem J* 308 (Pt 1) (1995) 211-7.
- Screpanti, I., Romani, L., Musiani, P., Modesti, A., Fattori, E., Lazzaro, D., Sellitto, C., Scarpa, S., Bellavia, D., Lattanzio, G. and et al.: Lymphoproliferative disorder and imbalanced T-helper response in C/EBP beta-deficient mice. *Embo J* 14 (1995) 1932-41.
- Seagroves, T.N., Krnacik, S., Raught, B., Gay, J., Burgess-Beusse, B., Darlington, G.J. and Rosen, J.M.: C/EBPbeta, but not C/EBPalpha, is essential for ductal morphogenesis, lobuloalveolar proliferation, and functional differentiation in the mouse mammary gland. *Genes Dev* 12 (1998) 1917-28.
- Sebolt-Leopold, J.S. and Herrera, R.: Targeting the mitogen-activated protein kinase cascade to treat cancer. *Nat Rev Cancer* 4 (2004) 937-47.
- Seiter, S., Stassar, M., Rappl, G., Reinhold, U., Tilgen, W. and Zoller, M.: Upregulation of C4.4A expression during progression of melanoma. *J Invest Dermatol* 116 (2001) 344-7.
- Shiloh, Y.: ATM and related protein kinases: safeguarding genome integrity. *Nat Rev Cancer* 3 (2003) 155-68.
- Shimizu, K., Ren, L., Ayusawa, D., Seno, T., Balzarini, J. and De Clercq, E.: Establishment of mutant murine mammary carcinoma FM3A cell strains transformed with the herpes simplex virus type 2 thymidine kinase gene. *Cell Struct Funct* 11 (1986) 295-301.
- Shuman, J.D., Sebastian, T., Kaldis, P., Copeland, T.D., Zhu, S., Smart, R.C. and Johnson, P.F.: Cell cycle-dependent phosphorylation of C/EBPbeta mediates oncogenic cooperativity between C/EBPbeta and H-RasV12. *Mol Cell Biol* 24 (2004) 7380-91.
- Shyu, A.B., Belasco, J.G. and Greenberg, M.E.: Two distinct destabilizing elements in the c-fos message trigger deadenylation as a first step in rapid mRNA decay. *Genes Dev* 5 (1991) 221-31.
- Shyu, A.B., Greenberg, M.E. and Belasco, J.G.: The c-fos transcript is targeted for rapid decay by two distinct mRNA degradation pathways. *Genes Dev* 3 (1989) 60-72.
- Sibilia, M., Fleischmann, A., Behrens, A., Stingl, L., Carroll, J., Watt, F.M., Schlessinger, J. and Wagner, E.F.: The EGF receptor provides an essential survival signal for SOS-dependent skin tumor development. *Cell* 102 (2000) 211-20.
- Sidenius, N., Andolfo, A., Fesce, R. and Blasi, F.: Urokinase regulates vitronectin binding by controlling urokinase receptor oligomerization. *J Biol Chem* 277 (2002) 27982-90.
- Sklar, M.D., Thompson, E., Welsh, M.J., Liebert, M., Harney, J., Grossman, H.B., Smith, M. and Prochownik, E.V.: Depletion of c-myc with specific antisense sequences reverses the transformed phenotype in ras oncogene-transformed NIH 3T3 cells. *Mol Cell Biol* 11 (1991) 3699-710.
- Smith, B.A., Kennedy, W.J., Harnden, P., Selby, P.J., Trejdosiewicz, L.K. and Southgate, J.: Identification of genes involved in human urothelial cell-matrix interactions: implications for the progression pathways of malignant urothelium. *Cancer Res* 61 (2001) 1678-85.
- Stacker, S.A., Baldwin, M.E. and Achen, M.G.: The role of tumor lymphangiogenesis in metastatic spread. *Faseb J* 16 (2002) 922-34.
- Storchova, Z. and Pellman, D.: From polyploidy to aneuploidy, genome instability and cancer. *Nat Rev Mol Cell Biol* 5 (2004) 45-54.
- Supp, D.M., Witte, D.P., Branford, W.W., Smith, E.P. and Potter, S.S.: Sp4, a member of the Sp1-family of zinc finger transcription factors, is required for normal murine growth, viability, and male fertility. *Dev Biol* 176 (1996) 284-99.
- Suske, G.: The Sp-family of transcription factors. *Gene* 238 (1999) 291-300.

- Tanaka, T., Yoshida, N., Kishimoto, T. and Akira, S.: Defective adipocyte differentiation in mice lacking the C/EBPbeta and/or C/EBPdelta gene. *Embo J* 16 (1997) 7432-43.
- Tarbe, N., Losch, S., Burtscher, H., Jarsch, M. and Weidle, U.H.: Identification of rat pancreatic carcinoma genes associated with lymphogenous metastasis. *Anticancer Res* 22 (2002) 2015-27.
- Timchenko, N.A., Welm, A.L., Lu, X. and Timchenko, L.T.: CUG repeat binding protein (CUGBP1) interacts with the 5' region of C/EBPbeta mRNA and regulates translation of C/EBPbeta isoforms. *Nucleic Acids Res* 27 (1999) 4517-25.
- Tora, L.: A unified nomenclature for TATA box binding protein (TBP)-associated factors (TAFs) involved in RNA polymerase II transcription. *Genes Dev* 16 (2002) 673-5.
- Totsukawa, G., Yamakita, Y., Yamashiro, S., Hartshorne, D.J., Sasaki, Y. and Matsumura, F.: Distinct roles of ROCK (Rho-kinase) and MLCK in spatial regulation of MLC phosphorylation for assembly of stress fibers and focal adhesions in 3T3 fibroblasts. *J Cell Biol* 150 (2000) 797-806.
- Trautwein, C., Caelles, C., van der Geer, P., Hunter, T., Karin, M. and Chojkier, M.: Transactivation by NF-IL6/LAP is enhanced by phosphorylation of its activation domain. *Nature* 364 (1993) 544-7.
- Turner, R. and Tjian, R.: Leucine repeats and an adjacent DNA binding domain mediate the formation of functional cFos-cJun heterodimers. *Science* 243 (1989) 1689-94.
- Van Dyck, F., Delvaux, E.L., Van de Ven, W.J. and Chavez, M.V.: Repression of the Transactivating Capacity of the Oncoprotein PLAG1 by SUMOylation. *J Biol Chem* 279 (2004) 36121-31.
- Varrault, A., Ciani, E., Apiou, F., Bilanges, B., Hoffmann, A., Pantaloni, C., Bockaert, J., Spengler, D. and Journot, L.: hZAC encodes a zinc finger protein with antiproliferative properties and maps to a chromosomal region frequently lost in cancer. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95 (1998) 8835-40.
- Veenstra, G.J. and Wolffe, A.P.: Gene-selective developmental roles of general transcription factors. *Trends Biochem Sci* 26 (2001) 665-71.
- Verkhovskiy, A.B., Svitkina, T.M. and Borisy, G.G.: Myosin II filament assemblies in the active lamella of fibroblasts: their morphogenesis and role in the formation of actin filament bundles. *J Cell Biol* 131 (1995) 989-1002.
- Wegner, M., Cao, Z. and Rosenfeld, M.G.: Calcium-regulated phosphorylation within the leucine zipper of C/EBP beta. *Science* 256 (1992) 370-3.
- Weinstein-Oppenheimer, C.R., Blalock, W.L., Steelman, L.S., Chang, F. and McCubrey, J.A.: The Raf signal transduction cascade as a target for chemotherapeutic intervention in growth factor-responsive tumors. *Pharmacol Ther* 88 (2000) 229-79.
- Weiss, L.: Comments on hematogenous metastatic patterns in humans as revealed by autopsy. *Clin Exp Metastasis* 10 (1992) 191-9.
- Woodhouse, E.C., Chuaqui, R.F. and Liotta, L.A.: General mechanisms of metastasis. *Cancer* 80 (1997) 1529-37.
- Woon, P.Y., Osoegawa, K., Kaisaki, P.J., Zhao, B., Catanese, J.J., Gauguier, D., Cox, R., Levy, E.R., Lathrop, G.M., Monaco, A.P. and de Jong, P.J.: Construction and characterization of a 10-fold genome equivalent rat P1-derived artificial chromosome library. *Genomics* 50 (1998) 306-16.
- Wurfel, J., Seiter, S., Stassar, M., Claas, A., Klas, R., Rosel, M., Marhaba, R., Savelyeva, L., Schwab, M., Matzku, S. and Zoller, M.: Cloning of the human homologue of the metastasis-associated rat C4.4A. *Gene* 262 (2001) 35-41.
- Wyckoff, J.B., Jones, J.G., Condeelis, J.S. and Segall, J.E.: A critical step in metastasis: in vivo analysis of intravasation at the primary tumor. *Cancer Res* 60 (2000) 2504-11.

- Yang, Y., Pares-Matos, E.I., Tesmer, V.M., Dai, C., Ashworth, S., Huai, J. and Bina, M.: Organization of the promoter region of the human NF-IL6 gene. *Biochim Biophys Acta* 1577 (2002) 102-8.
- Young, M.R., Li, J.J., Rincon, M., Flavell, R.A., Sathyanarayana, B.K., Hunziker, R. and Colburn, N.: Transgenic mice demonstrate AP-1 (activator protein-1) transactivation is required for tumor promotion. *Proc Natl Acad Sci U S A* 96 (1999) 9827-32.
- Zagariya, A., Mungre, S., Lovis, R., Birrer, M., Ness, S., Thimmapaya, B. and Pope, R.: Tumor necrosis factor alpha gene regulation: enhancement of C/EBPbeta-induced activation by c-Jun. *Mol Cell Biol* 18 (1998) 2815-24.
- Zahnow, C.A., Cardiff, R.D., Laucirica, R., Medina, D. and Rosen, J.M.: A role for CCAAT/enhancer binding protein beta-liver-enriched inhibitory protein in mammary epithelial cell proliferation. *Cancer Res* 61 (2001) 261-9.
- Zeng, L., Si, X., Yu, W.P., Le, H.T., Ng, K.P., Teng, R.M., Ryan, K., Wang, D.Z., Ponniah, S. and Pallen, C.J.: PTP alpha regulates integrin-stimulated FAK autophosphorylation and cytoskeletal rearrangement in cell spreading and migration. *J Cell Biol* 160 (2003) 137-46.
- Zhivotovsky, B. and Kroemer, G.: Apoptosis and genomic instability. *Nat Rev Mol Cell Biol* 5 (2004) 752-62.
- Zhou, J., Gurates, B., Yang, S., Sebastian, S. and Bulun, S.E.: Malignant breast epithelial cells stimulate aromatase expression via promoter II in human adipose fibroblasts: an epithelial-stromal interaction in breast tumors mediated by CCAAT/enhancer binding protein beta. *Cancer Res* 61 (2001) 2328-34.
- Zhu, S., Oh, H.S., Shim, M., Sterneck, E., Johnson, P.F. and Smart, R.C.: C/EBPbeta modulates the early events of keratinocyte differentiation involving growth arrest and keratin 1 and keratin 10 expression. *Mol Cell Biol* 19 (1999) 7181-90.
- Zhu, S., Yoon, K., Sterneck, E., Johnson, P.F. and Smart, R.C.: CCAAT/enhancer binding protein-beta is a mediator of keratinocyte survival and skin tumorigenesis involving oncogenic Ras signaling. *Proc Natl Acad Sci U S A* 99 (2002) 207-12.

6 Veröffentlichung

Fries, F., Hess, J., Claas, A., Angel, P., and Zöller, M. (2005). Transcriptional activation of the metastasis-associated C4.4A gene (submitted).

7 Danksagung

Mein Dank gilt zunächst Fr. Prof. Dr. Margot Zöller für meine Aufnahme in ihre Arbeitsgruppe, die Überlassung des Themas und die stete Diskussionsbereitschaft,

Andreas Claas, Eberhard Amtmann, Jochen Hess und Stefan Berger für die wertvollen Anregungen und Unterstützung in meiner Arbeit,

ebenso danke ich Christoph Claas bei der Durchsicht meiner Arbeit und die vielen nützlichen Ratschläge.

Für ihre wertvollen und mitunter kritischen Anregungen sei auch Claudia Paret, Joachim Wahl, Markus Ladwein gedankt. Auch Dirk, Peter, Pamela, Mehdi und allen anderen aus der Arbeitsgruppe sei für die nette und kollegiale Atmosphäre gedankt.

8 Lebenslauf

Vorname und Name: Frank Fries
Geburtsdatum: 20. April 1968
Geburtsort: Creglingen
Staatsangehörigkeit: deutsch
Familienstand: ledig

Schulbildung:

1974 - 1978 Grundschule, Röttingen
1978 - 1983 Hauptschule, Röttingen,
9/1990 - 7/1991 Gewerblich-technische Berufsaufbauschule, Wertheim
 Abschluss: Fachschulreife
9/1992 - 8/1995 Städtische Berufsoberschule Würzburg (Hauswirtschaft,
 Sozialpflege)
 Abschluss: Fachgebundene Hochschulreife

Berufsausbildung:

1983 - 1986 Ausbildung zum Kfz-Mechaniker im Autohaus Gehringer GmbH,
 Weikersheim

Studium:

10/1995 - 6/2000 Aufnahme des Studium der Biologie an der Julius-Maximilians-
 Universität Würzburg
 Hauptfach: Biochemie
 Nebenfächer: Immunologie, Virologie, Tierphysiologie
7/2000 – 6/2001 Diplomarbeit bei Prof. Dr. F. Grummt, Institut für Biochemie,
 Universität Würzburg
 Thematik: Untersuchungen zur Initiation der DNA-Replikation,
 insbesondere der „Untersuchungen zur Interaktion von Cdc6 mit
 Chromatin“.

Berufliche Tätigkeit:

9/1986 - 8/1990 Angestellter der Fa. Aug. Laukhuff Orgelteile GmbH & Co.,
 Weikersheim
7/1987 - 9/1988 Wehrdienst in der Nachschubkompanie 360, Bad Mergentheim

Promotion:

Beginn der Dissertation im September 2001 über das Thema „Studien zur Regulation des Metastasierungs-assoziierten Oberflächenproteins C4.4A“ am DKFZ Heidelberg; Abteilung Tumorprogression und Tumorabwehr, Prof. Dr. M. Zöller.

