

Transkriptionseinfluß einer Multiconsensus- region im 5'-flankierenden Genbereich des Hepatocyte Growth Factor

Inaugural-Dissertation

zur

Erlangung des Doktorgrades

der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät

der Universität zu Köln

vorgelegt von

Mark-Peter Spindler

aus Oldenburg

Köln im Jahr 2002

Berichterstatter: Prof. Dr. H.-W. Klein

Prof. Dr. J. Howard

Tag der letzten mündlichen Prüfung: 21.05.2002

Inhaltsverzeichnis

INHALTSVERZEICHNIS	I
ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS	VI
1. EINLEITUNG	1
2. MATERIAL UND METHODEN	8
2.1. MATERIAL	8
2.1.1. Plastikwaren, Verbrauchsmaterialien und Glasgeräte	8
2.1.2. Antibiotika, Chemikalien, Enzyme	8
2.1.3. Lösungen und Puffer	8
2.1.4. Antikörper	9
2.1.5. Oligonukleotide	9
2.1.5.1. Oligonukleotiddimere	9
2.1.5.2. PCR-Primer für die Klonierung der Ratten-HGF-Promotorkonstrukte	10
2.1.5.3. PCR-Primer für die Mutagenese	12
2.1.5.4. Primer und Oligonukleotide für den in-vivo-Footprint	12
2.1.6. Vektoren und Plasmide	13
2.1.7. Bakterienstämme	13
2.1.8. Zelllinien	13
2.2. METHODEN	14
2.2.1. Biochemische Arbeiten	14
2.2.1.1. Isolierung von Plasmid-DNA im Mikromaßstab	14
2.2.1.2. Präparative Isolierung von Plasmid-DNA	15
2.2.1.3. Photometrische Analyse der DNA	16
2.2.1.4. Polymerase-Ketten-Reaktion	16
2.2.1.5. Enzymatische Hydrolyse mit Restriktionsendonukleasen	18
2.2.1.6. Horizontalgelelektroporese	18
2.2.1.7. Isolierung von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen	19
2.2.1.8. Dimerisierung von Oligonukleotiden	19
2.2.1.9. Ligation von DNA-Fragmenten	20
2.2.1.10. Klonierung der HGF-Promotorfragmente aus genomischer Rattenleber-DNA	20
2.2.1.11. In-vitro-Expression von TFE3 mittels des TNT® Coupled Reticulocyte Lysate System	21
2.2.1.12. In-vitro-Expression einer trunkierten Form von USF1 mittels des pET-Systems	21

2.2.2. Arbeiten mit E.Coli-Zellen	22
2.2.2.1. Kultivierung	22
2.2.2.2. Herstellung kompetenter Zellen	22
2.2.2.3. Transformation kompetenter Zellen	23
2.2.2.4. Einführung von Mutationen in die HGF-Promotorkonstrukte mit Hilfe des QuikChange™ Site-Directed Mutagenesis Kits	23
2.2.3. Zellkulturarbeiten	24
2.2.3.1. Bestimmung der Zellvitalität und Zellzahl	25
2.2.3.2. Passagierung der Zellen	25
2.2.3.3. Kryokonservierung und Rekultivierung	26
2.2.3.4. Transfektion	26
2.2.3.5. Chloramphenicol-Acetyl-Transferase-Assay und β -Galactosidase-Assay	27
2.2.3.6. Luciferase-Assays	27
2.2.3.7. Isolierung von Kernproteinen	28
2.2.3.8. Bestimmung der Proteinkonzentration	29
2.2.4. In-vivo-Footprint	29
2.2.4.1. Zellbehandlung mit Dimethylsulfat	30
2.2.4.2. In-vitro-DNA-Behandlung und DNA-Fragmentierung	31
2.2.4.3. Erststrangsynthese und Linker-Ligation	32
2.2.4.4. Linker vermittelte (Linker-mediated-)PCR und Labeling	33
2.2.5. Elektromobilityshiftassay	34
2.2.5.1. Markierung der Oligonukleotiddimere	34
2.2.5.2. Bindungsreaktion, Gellauf und Analyse	34
2.2.6. In-vitro-Footprint	35
2.2.6.1. Markierung und Präparation des Promotorfragments	36
2.2.6.2. Maxam-Gilbert-Reaktion	36
2.2.6.3. DNase-I-Titration	37
2.2.6.4. DNase-I-Footprint	37
3. ERGEBNISSE	38
3.1. TRANSKRIPTIONELLE EXPRESSIONSKONTROLLE DURCH DEN 5'-FLANKIERENDEN BEREICH DES HGF-GENS	38
3.2. LOKALISIERUNG UND CHARAKTERISIERUNG VON PROTEIN-DNA-BINDUNGSDOMÄNEN IM 5'-FLANKIERENDEN BEREICH DES HGF-GENS	40
3.2.1. Etablierung eines in-vivo-Footprints	41
3.2.2. Lokalisierung der Protein-DNA-Interaktion mit Hilfe des in-vitro-Footprints	44
3.3. SPEZIFITÄT UND AFFINITÄT DER PROTEIN-DNA-BINDUNG AN DIE MULTICONSENSUSREGION	46
3.3.1. Affinität der Proteinbindung an die E-Boxen	46
3.3.2. Affinität der Proteinbindung an die NF1-Bindestelle	48
3.3.3. Untersuchung der Protein-DNA-Bindung an die AP2-Bindestelle	49
3.4. UNTERSUCHUNG DER BINDUNGSPARTNER DER MCR-BINDUNGSELEMENTE	50
3.4.1. Beteiligung von NF1- und AP2-Transkriptionsfaktoren an dem MCR-Proteinbindungskomplex	50

3.4.2. Bindung von HLH/LZ-Faktoren an die E-Boxen	50
3.4.3. Bindung rekombinant exprimierter Proteine an die E-Boxen	52
3.4.4. Zelltypspezifische Proteinbindung von USF1 und TFE3 an die E-Boxen	54
3.5. EINFLUSS DER HLH-LZ-PROTEINEN USF1 UND TFE3 AUF DIE PROMOTORAKTIVITÄT	56
3.6. EINFLUSS DER EINZELNEN BINDEELEMENTE AUF DIE PROMOTORAKTIVITÄT	60
3.7. BEEINFLUSSUNG DER PROMOTORAKTIVITÄT MUTIERTER DELETIONSKONSTRUKTE DURCH USF1 ODER EINE NICHT DNA-BINDUNGSFÄHIGE USF1-VARIANTE	61
4. DISKUSSION	63
5. ZUSAMMENFASSUNG	72
6. LITERATUR	74

Abkürzungsverzeichnis

AP1	activating protein 1	IPTG	isopropyl- β -D-thiogalacto- pyranoside
AP2	activating protein 2	kDa	kiloDalton
APS	Ammoniumpersulfat	LB	Luria broth
Arg	Arginin	LIF	Lymphoma inhibitory factor
BD	DNA-Bindedomäne	LMPCR	Linker-mediated polymerase chain reaction
bFGF	basic fibroblast growth factor	MCR	Multiconsensusregion
br	basic region	mRNA	messenger ribonucleic acid
C/EBP	CAAT/Enhancer binding protein	NF1	Nuclear factor 1
CAMP	cyclic Adenosine mono- phosphate	NK	
CAT	Chloramphenicol-Acetyl- Transferase	NP40	Nonidet P40
cDNA	complementary Deoxyribo- nucleic acid	OD	optische Dichte
CMV	Cytomegalievirus	p.A.	pro analysi
COUP-TF	Chicken ovalbumin up- stream promoter - transcrip- tion factor	PA	Plasminogen activator
CRE	cAMP-response element	PBS	Phosphate buffered saline
dATP	desoxy-Adenosintri-phosphat	PCR	Polymerase chain reaction
dCTP	desoxy-Cytosintri-phosphat	PDGF	Plateled-derived growth factor
dGTP	desoxy-Guanosintri-phosphat	PEG	Polyethlenglykol
DIG	Digoxygenin	pH	pondus hydrogeni
DMEM	Dulbecco's modified Eagle's medium	PMSF	Phenyl-methyl-sulfonyl fluorid
DMS	Dimethylsulfat	proHGF	pro-Hepatocyte growth fac- tor
DMSO	Dimethylsulfoxid	RE	Response element
DNA	Deoxyribonucleic acid	RNA	ribonucleic acid
dNTP	desoxy-Nukleotidtri-phosphat	SDS	Sodium dodecyl sulfate
dTTP	desoxy- Thymosintri-phosphat	SF	Scatter factor
EDTA	Ethylendiamintetra- essigsäure	SV40	Simian virus 40
EGF	Epithelial growth factor	TAE	Tris
ELISA	Enzyme-linked immuno sorbent assay	TBE	Tris-Borat-EDTA
EMSA	Electromobility shift assay	TD	Transaktivierungsdomäne
ENU	Ethylnitrosoharnstoff	TE	Tris-EDTA
ER	Estrogen receptor	TEMED	Tetramethylethylendiamin
FCS	Fetal calf serum	TFE3	Transcription factor E3
HAI	Hepatocyte growth factor activator inhibitor	TIE	Transforming growth factor β inhibitory element
HEPES	[4-(2-Hydroxyethyl)- piperazino]- ethansulfonsäure	TK	Tyrosin Kinase
HGF	Hepatocyte growth factor	TNF- α	Tumornekrosefaktor- α
HGFA	Haepocyte growth factor activator	tPA	tissue-type plasminogen activator
HLH/LZ	Helix-loop-helix/leucine zip- per	TPA	12-O-Tetradecanoylphorbol- 13-acetat
HPLC	High pressure liquid chro- matography	TSS	Transformation and storage solution
IFN	Interferon	U	Unit
IGF	Insulin-like growth factor	uPA	urokinase-like Plasminogen activator
IL	Interleukin	USF	upstream stimulatory factor
		UV	ultraviolett
		Val	Valin
		VEGF	Vascular epithelial growth factor
		vgl.	vergleiche

1. Einleitung

Der Hepatocyte Growth Factor (HGF) ist ein multifunktionaler Wachstumsfaktor mit großer Bedeutung für die embryonale Entwicklung, für die spätere normale Organfunktion und für die Regeneration nach einer Organschädigung. 1984 wurde HGF aus dem Serum von Ratten, die einer partiellen Hepatektomie unterzogen worden waren, isoliert und partiell aufgereinigt und charakterisiert [1]. Im selben Jahr wurde unabhängig hiervon die Bedeutung zweier Serumfaktoren – Hepatopoietin A und B genannt – für die Leberregeneration entdeckt [2]. Später wurde HGF als einer dieser Faktoren identifiziert [3]. Unabhängig davon wurde im Medium einer embryonalen Fibroblastenzelllinie der Scatter Factor (SF) als ein die Motilität stimulierender Faktor entdeckt [4]. Weitere Untersuchungen zeigten, daß HGF und SF miteinander identisch sind [5, 6, 7].

HGF kann auf vielerlei Weisen auf seine Zielzellen wirken. Seine verschiedenen Effekte auf Hepatozyten sind am besten charakterisiert, da er aufgrund seiner mitogenen Wirkung auf primäre Hepatozyten erstmalig isoliert und charakterisiert wurde. Daneben wirkt er mitogen auf verschiedene andere Zelltypen vor allem epithelialen Ursprungs. Neben seinen mitogenen Eigenschaften werden etliche epitheliale und endotheliale Zelllinien durch HGF zur Wanderung (Motogenität) angeregt. Zudem werden HGF aufgrund der Induktion gefäßartiger Strukturen bei verschiedenen epithelialen Zellen morphogene Eigenschaften zugeschrieben [zur Übersicht: 8, 9, 10]. Daneben wurden sowohl *in vitro* [11] als auch *in vivo* [12] neurotrophe Effekte für HGF beschrieben. Entgegen seiner ansonsten eher die Tumorbildung fördernden Eigenschaften sind aber für HGF sowohl *in vitro* als auch *in vivo* die Tumorbildung und -promotion inhibierende Wirkungen [9].

Sämtliche biologischen Wirkungen von HGF werden über den c-Met-Rezeptor vermittelt [13]. Neben c-Met kann HGF aber auch an Heparansulfatproteoglycane binden. Diese Bindung ist allerdings bei weitem nicht so affin wie die Bindung an den c-Met-Rezeptor. Die Heparansulfatproteoglycane liegen sowohl in der extrazellulären Matrix als auch auf der Zelloberfläche vor und werden als Koregulatoren des c-Met-Signalwegs angesehen [13]. Der HGF-Rezeptor, c-Met, wird vornehmlich von epithelialen Zellen gebildet [14, 15]. Da HGF hauptsächlich in Zellen mesenchymalen Ursprungs gebildet wird, wird dem HGF-c-Met-Signalweg eine bedeutende Rolle in der mesenchymal-epithelialen Kommunikation zugeordnet [16]. Die Wechselwirkungen von HGF und seinem Rezeptor c-Met sind für verschiedene Prozesse während der Embryogenese, dem Organwachstum und der Aufrechterhaltung der Organfunktionen beim Erwachsenen von Bedeutung. Daneben ist HGF aber auch in die Neubildung von

Gewebe und damit in die Organregeneration nach einer Schädigung involviert. Die Effekte von HGF auf die Proliferation, Motilität und Morphogenese von Zellen bilden die Basis dieser physiologischen Funktionen der HGF/c-Met-Interaktion [9].

Verschiedene Studien haben die Bedeutung der einzelnen Effekte in den physiologischen Vorgängen veranschaulicht. So ist in Mäusen die essentielle Rolle der motogenen Wirkung von HGF für die Wanderung von Muskelvorläuferzellen in die Ansätze der Gliedmaße, die Zunge und das Zwerchfell beschrieben worden [17]. Die mitogene Wirkung von HGF spielt vor allem bei der embryonalen Organogenese eine Rolle. Homozygote Knock-out Mäuse sterben *in utero* mit Fehlbildungen der Plazenta und der Leber [18, 19]. Aber auch eine Überproduktion an HGF stört die normale Entwicklung. Die Überexpression von HGF in transgenen Mäuse führte zu einer Vergrößerung der Leber (Hepatomegalie) und der Ausbildung von Lebertumoren [20]. Bei der Entwicklung von Organen, die einer koordinierten Gewebsausbildung mit z.B. verzweigten Gefäßen benötigen, wie die Lunge, die Niere oder dem Drüsengewebe der Brust, kommt neben der mitogenen auch die morphogene Wirkung von HGF zum Tragen [13]. Für mesenchymale Nierenzellen ist zudem eine Beschleunigung der mesenchymal-epithelialen Transdifferenzierung, die in den Metanephros des Embryos eine Rolle spielt, durch HGF beschrieben worden [21]. Den neurotrophen Eigenschaften von HGF kommen sowohl bei der Entwicklung des Gehirns als auch des zentralen und peripheren Nervensystems Bedeutung zu. So fördert HGF nicht nur das Überleben, die Proliferation und Transformation von neuronalen Vorläuferzellen, sondern ist auch an der Ausbildung der Neuriten beteiligt [12, 13]. Des Weiteren ist für HGF eine Beteiligung an der Angiogenese, der Blutbildung, der Wundheilung und der B-Zelldifferenzierung beschrieben worden [13]. Neben den hier beispielhaft aufgeführten physiologischen Funktionen spielt HGF auch in der Ausbildung und Funktion anderer Organe und Gewebe eine Rolle [Zur Übersicht: 13].

Aufgrund seiner zentralen Rolle in den oben angeführten Prozessen ist eine straffe Regulierung der Interaktionen von HGF und c-Met notwendig. Die Überexpression von HGF und/oder c-Met ist mit vielerlei Tumorarten assoziiert [zur Übersicht: 9, 10]. HGF kann aufgrund seiner mitogenen Wirkung die Proliferation fördern. Seine Fähigkeit Zellen aus ihrem Verband zu lösen („Scattering“) erleichtert die Ablösung von Primärtumorzellen. Für die Wanderung der Tumorzellen sind zudem seine motogenen und chemotaktischen Eigenschaften wichtig. Im letzten Schritt der Metastasierung – dem Andocken an einen neuen Zellverband – kommt die antiapoptische Wirkung von HGF zum Tragen [13]. Neben diesen Funktionen kommt beim Tumorwachstum noch die angiogenetische Wirkung von HGF hinzu. Bei der Anregung der Angiogenese durch HGF ist allerdings noch ungeklärt, ob HGF die vaskulären

Endothelzellen direkt oder indirekt über eine VEGF-Aktivierung zur Gefäßbildung anregt [13]. HGF unterstützt somit die Tumorentstehung, -promotion und -metastasierung.

Die Funktionen, die HGF während der embryonalen Entwicklung innehat, kommen beim Erwachsenen bei einer Gewebsverletzung oder Organschädigung wieder zum Tragen. Nach akuter Schädigung führt die Aktivierung von HGF zur Regeneration des beteiligten Gewebes wie, z.B. in der Leber [22], der Lunge [23], sowie den Nieren [24]. Frühe Untersuchungen zeigten, daß die HGF-Aktivität im Serum nach akuter Schädigung innerhalb von 2-3 Stunden stark ansteigt [25], die erhöhte Expression der HGF-mRNA erfolgt hingegen erst nach ca. 12 Stunden [26]. Daher müssen Mechanismen existieren, die die Menge an im Serum zirkulierendem, aktivem HGF vor der Neubildung über die Transkription und Translation erhöhen. Hierbei wird die Freisetzung von HGF aus der extrazellulären Matrix als erster Schritt bei der Aktivierung von HGF angesehen.

Die ersten Hinweise auf eine Speicherfunktion der extrazellulären Matrix kamen von Matsumoto und Yamamoto [27]. Tomiya *et al.* vermuteten die Bindung von HGF an die extrazelluläre Matrix, denn nach akuter Schädigung kommt es zu einem schnellen Anstieg (2 h) des HGF-Levels im Serum, der nicht durch Neusynthese zu erklären ist [28]. Die Bindung von HGF an die Proteine der extrazellulären Matrix konnte *in vitro* von Schuppan *et al.* gezeigt werden, indem HGF in der fibrillären extrazellulären Matrix der Leber lokalisiert wurde. Nach Collagenase-Behandlung konnte hingegen kein HGF mehr in der Matrix nachgewiesen werden [29]. Dies wird als Hinweis gesehen, daß die Bindung von HGF an die Collagene auch *in vivo* besteht.

Bei der Freisetzung von HGF ist von Schuppan *et al.* Heparin und den Heparansulfatproteoglycane eine wichtige Rolle zugeordnet worden. Während einer akuten, entzündlichen Leberschädigung werden Heparin und die Heparansulfatproteoglycane aus aktivierten Entzündungszellen oder nekrotischen Hepatozyten freigesetzt [29]. Aufgrund der höheren Affinität ihrer Bindung an HGF als die der Collagene sollten sie HGF aus der Matrix zu lösen vermögen. Dies passt zu der Beobachtung, daß HGF sehr gut mit Heparin aus der Leber extrahiert werden kann [27].

HGF wird aus der Matrix in seiner inaktiven Vorläuferform (proHGF) freigesetzt. ProHGF besteht aus einer 728 Aminosäuren langen einzelnen Kette, die zwischen Arg⁴⁹⁴ und Val⁴⁹⁵ proteolytisch in eine 60 kDa große α -Kette und eine 30 kDa große β -Kette gespalten wird. Die entstandenen α - und β -Ketten werden dann über eine Disulfidbrücke verknüpft und bilden ein Heterodimer, welches die biologisch aktive Form von HGF darstellt (Abb. 1).

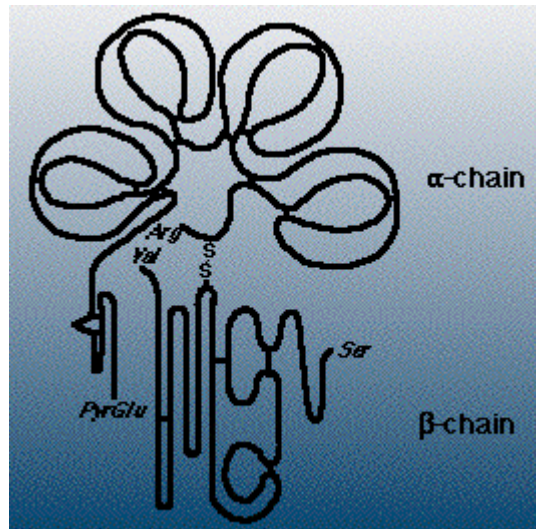


Abbildung 1: Struktur der aktiven, heterodimeren HGF-Form.

Das Vorläuferprotein ähnelt in seiner Struktur dem Plasminogen und hat damit eine für einen Wachstumsfaktor sehr untypische Struktur. Aufgrund seiner Ähnlichkeit mit Plasminogen wurde eine mögliche Aktivierung durch verschiedene Plasminogen-Aktivatoren (PA) vermutet. Die Fähigkeit der Spaltung der HGF-Vorläuferform ist von Mars *et al.* für den urokinase-like-PA (uPA) und den tissue-like-PA (tPA) gezeigt worden [30]. Aufgrund der relativ niedrigen Aktivität von uPA und tPA bei der Umsetzung von proHGF zu HGF wird diesem Mechanismus lediglich in Tumoren mit einer Überexpression der PA ein Bedeutung zugesprochen [31]. Daneben wurde eine Aktivierung durch Matriptase [32] und Faktor XIIa beschrieben [33]. Der bei weitem effizienteste Aktivator für HGF ist aber der HGF-Aktivator (HGFA), der in seiner Struktur und Funktion dem Koagulationsfaktor XII gleicht [31]. HGFA muss selbst durch Thrombin aktiviert werden. Da auch Thrombin wiederum aktiviert werden muss, ist eine ganze Kaskade an Proteasen an der Aktivierung von proHGF beteiligt.

Die Wirkungen von HGF werden auch durch verschiedene Antagonisten und Inhibitoren reguliert. So existieren zwei Splice-Varianten, NK1 und NK2, die jeweils aus der N-terminalen Domäne und einem bzw. zwei Kringeldomänen bestehen. Diese trun-kierten Formen binden genau wie HGF an c-Met. Die Vermittlung der Signale ins Innere der Zelle ist aber vermindert [10, 13]. Außerdem sind zwei Inhibitoren für HGFA, HAI-1 und HAI-2, beschrieben worden [34, 35]. HAI-1 kann HGFA reversibel ohne Schädigung der Enzymfunktion binden. Da HAI-1 auf der Zellmembran lokalisiert ist, kann HAI-1 auch als Reservoir für HGFA dienen. Bei der Wundheilung und der Gewebsregeneration ist die HAI-1-Bildung erhöht. In Verbindung mit einer – aufgrund erhöhter Thrombinbildung – erhöhten Aktivierung von HGFA kann es im Zuge der Gewebsschädigung bzw. Entzündung zur Akkumulation von HGFA/HAI-1-Komplexen

kommen [31]. Freigesetzte Entzündungsmediatoren sorgen über eine komplexe intra- und extrazelluläre Kaskade zur Abspaltung der HGFA/HAI-1-Komplexe von der Zellmembran, wobei HAI-1 hierbei derart gespalten wird, daß die Bindung an HGFA deutlich schwächer wird und daher HGFA wieder abgegeben wird. Durch die parallele Freisetzung von proHGF und HGFA kann es so im Falle einer Gewebsschädigung zu einer sehr schnellen Aktivierung von proHGF zu HGF kommen [31].

Im Falle einer akuten Gewebsschädigung kommt es neben der schnellen Freisetzung und Aktivierung von HGF auch zur Induktion der HGF-Expression im betroffenen Organ [36, 37], aber auch in anderen, nicht geschädigten Organen [38, 39]. Die genauen Mechanismen dieser Aktivierung, aber auch der Regulation der HGF-Expression im allgemeinen sind nur unvollständig aufgeklärt. Zwar ist eine Beeinflussung der HGF-Expression durch verschiedene extrazelluläre Faktoren beschrieben worden, welche regulatorischen Elemente im HGF-Promotor aber diese Einflüsse vermitteln, ist nur selten bekannt. Hier soll zunächst auf die extrazellulären Einflüsse und anschließend auf die intrinsischen Faktoren eingegangen werden.

Bei den extrazellulären Faktoren sind vor allem die Gruppe der Wachstumsfaktoren und die der Entzündungsmediatoren untersucht worden. Diese werden auch als Grund für die Induktion der HGF-Expression nach Gewebsschädigung angesehen [40]. *In vitro* Studien vornehmlich an kultivierten Fibroblasten zeigten eine Stimulierung der HGF-Produktion z.B. für EGF, bFGF, PDGF und TGF- β [41, 42]. Ebenso wurde bereits eine Aktivierung der HGF-Expression in HSC durch IGF-1 und IGF-2 gefunden [43]. Neben der Stimulierung durch diese Wachstumsfaktoren ist aber auch eine Inhibition durch LIF und vor allem TGF- β beschrieben worden [42]. Die Reprimierung durch TGF- β ist nicht nur in Fibroblasten [42, 44], sondern auch in HSC [43, 45] und in HL-60 [44], einer Leukämiezelllinie, gefunden worden. Als das vermittelnde *cis*-Element ist hierbei ein TGF- β inhibitorisches Element (TIE), welches im Rattenpromotor bei -363 bis -354 in Relation zur Transkriptionsinitiationsstelle liegt, beschrieben worden [45].

Auch die zweite große Gruppe, die Entzündungsmediatoren, haben eine stimulierende Wirkung auf die HGF-Expression. So führen neben Interleukin-1 (IL-1) [46, 47] und Interleukin-6 (IL-6) [48], der Gruppe der Interferone (IFN) [49] auch TNF- α [50] und die Prostaglandine [51] zu einer erhöhten HGF-Expression. Für die Vermittlung der Wirkung von IL-6 sind mehrere IL-6-Elemente im HGF-Promotor vorhanden [48]. Für eine Rolle der Entzündungsmediatoren gibt es auch *in vivo* Indizien. So ist in der Leber von Patienten mit Hepatitis B neben einer erhöhten HGF-Produktion eine erhöhte IFN- γ -Produktion in T-Lymphocyten gezeigt worden [52]. Ebenso ist eine Erhöhung des Levels an Prostaglandinen in der Leber nach partieller Hepatektomie be-

obachtet worden, die der gesteigerten HGF-Bildung vorangeht [53]. Für die intrazelluläre

Vermittlung dieser extrazellulären Signale ist ein cAMP-regulierter Signalweg beschrieben [53]. Für die Aktivierung über cAMP ist ein Response-Element bei -270 bis -263 im humanen HGF-Promotor vorhanden [53].

Des Weiteren ist eine Stimulierung der Transkription für verschiedene andere Moleküle beschrieben worden, so für das Antioxidans N-Acetyl-Cystein [54], die Gruppe der Phorbolster (z.B. TPA) [50] und die Östrogen-Hormone [55]. Für die Aktivierung durch diese Gruppe liegen mehrere Estrogen-Response-Elemente, an die sowohl der aktivierende Östrogenrezeptor als auch der inhibierende Chicken-Ovalbumin-Promoter-Transcription-Factor (COUP-TF) binden können [56]. Demgegenüber wird die HGF-Expression unter dem Einfluß von Glucocorticoiden, für die ein Bindeelement im Bereich -649 bis -636 beschrieben ist [48], (z.B. Cortisol) supprimiert [57].

Neben den Untersuchungen der extrazellulären Einflüsse sind auch verschiedene Studien zu den regulatorischen Elementen im HGF-Promotor durchgeführt worden. Es wurden schon früh nach der Charakterisierung von HGF per Sequenzanalyse diverse *cis*-Elemente gefunden, die nach Bindung eines *trans*-aktivierenden Transkriptionsfaktors die Expression des HGF-Gens beeinflussen könnten [40, 48, 58]. Die meisten dieser Elemente sind evolutionär konserviert. So besteht im Bereich -400 bis -25 eine Sequenzhomologie zwischen Nagern und Mensch von 90% [48]. Die Bedeutung sowohl der einzelnen *cis*-Elemente und der dazugehörigen *trans*-Faktoren wie auch deren Zusammenspiel für die zelltyp- und gewebsspezifische HGF-Expression liegt allerdings noch im Dunkeln.

Als aktivierendes Element ist eine Bindestelle für die Transkriptionsfaktoren Sp1 und Sp3 bei -318 bis -303 gefunden worden [59]. Zudem ist ein Element im Bereich -394 bis -385, das die Aktivierung der HGF-Expression durch p53 vermittelt, beschrieben worden [60]. Von der Arbeitsgruppe um R. Zarnegar wurde ein zelltypspezifisches Repressorelement in der Region -16 bis +11 im Maus-HGF-Promotor identifiziert [61].

Die Aktivierung von HGF erfolgt somit auf mehreren Ebenen:

- Freisetzung von HGF aus der Extrazellulären Matrix
- Proteolytische Spaltung der inaktiven HGF-Form
- Neusynthese von HGF

In der vorgelegten Arbeit sollte der 5'-flankierende Bereich des HGF-Gens und dessen Funktion in der HGF-Suppression untersucht werden. Nach einer näheren Charakterisierung der gefundenen regulatorischen Elemente sollten die transaktivierenden Bindungsfaktoren identifiziert und ihre Rolle in der HGF-Regulation bestimmt werden.

2. Material und Methoden

2.1. Material

2.1.1. Plastikwaren, Verbrauchsmaterialien und Glasgeräte

Pipettenspitzen, Reaktionsgefäße etc. wurden von der Firma Biozym (Hess. Oldendorf) oder der Firma Eppendorf (Hamburg) bezogen. 15 ml- bzw. 50 ml-Polypropylenröhrchen, sowie Petrischalen mit Nocken für die Bakterienkultur kamen von der Firma Greiner (Nütringen). Verwendete Plastikwaren für die Zellkultur stammten von den Firmen Falcon (Heidelberg) oder Greiner (Nütringen).

Sämtliche Reaktionsgefäße und Pipettenspitzen wurden im Dampfsterilisator bei 121°C und 1,2 bar in feuchter Hitze 20 Minuten autoklaviert. Sämtliche Abfälle wurden bei 135°C und 1,2 bar in feuchter Hitze 20 Minuten autoklaviert. Glas- und Metallgeräte wurden vor der Verwendung 6 Stunden im Trockenschrank bei 180°C gebacken.

2.1.2. Antibiotika, Chemikalien, Enzyme

Sämtliche Chemikalien wurden – soweit nicht anders angegeben – von den Firmen Fluka (Deisenhofen), Merck (Darmstadt), Roth (Karlsruhe), Serva (Deisenhofen) oder Sigma (Deisenhofen) bezogen. Lösemittel wurden von JT-Baker (Deventer, Holland) bezogen. Die eingesetzten DNA-modifizierenden Enzyme waren von den Firmen New England Biolabs (Frankfurt a.M.), Promega (Heidelberg) oder Roche (Mannheim).

Standardchemikalien und Lösungen wurden, sofern nicht anders angegeben, in pro analysi (p.A.) Qualität bezogen.

2.1.3. Lösungen und Puffer

Für alle Lösungen wurde mittels einer Millipore-Q-Plus-Anlage vollentsalztes Wasser verwendet.

Im folgenden werden allgemeine Puffer und Lösungen aufgeführt, die bei verschiedenen Arbeiten im Labor Verwendung fanden. Spezielle Puffer und Lösungen werden unter den entsprechenden Versuchbeschreibungen aufgeführt.

PBS:	8 g/l NaCl 1,44 g/l Na ₂ HPO ₄ 0,24 g/l KH ₂ PO ₄ 0,2 g/l KCl pH 7,4
TE:	10 mM Tris•HCl 1 mM EDTA pH 7,5 oder pH 8,0
Tris-Puffer:	10 mM Tris•HCl pH 8,5

2.1.4. Antikörper

Protein	Nr.	Herkunft	Firma
AP2□	H-79; <i>sc-8975</i>	Rabbit IgG; polyklonal	Santacruz Biotechnologies (SCBT), USA
c-Myc	N-262; <i>sc-764</i>	Rabbit IgG; polyklonal	SCBT, USA
E2A	Yae; <i>sc-416</i>	Mouse IgG; monoklonal	SCBT, USA
His•Tag	G-18; <i>sc-804</i>	Rabbit IgG; polyklonal	SCBT, USA
Mef2	C-21; <i>sc-313</i>	Rabbit IgG; polyklonal	SCBT, USA
NF1	N-20; <i>sc-870</i>	Rabbit IgG; polyklonal	SCBT, USA
TFE3	15451A	Mouse IgG; monoklonal	Pharmingen, Heidelberg
USF1	C-20; <i>sc-229</i>	Rabbit IgG; polyklonal	SCBT, USA

2.1.5. Oligonukleotide

Sämtliche Oligonukleotide wurden – soweit nicht anders angegeben – von MWG Biotech (Ebersberg) bezogen. Die Oligonukleotide wurden mittels HPLC gereinigt und lyophilisiert geliefert. Zum Lösen wurden sie in Millipore-Wasser aufgenommen. Die Stammlösungen hatten eine Konzentration von 100 µM.

2.1.5.1. Oligonukleotiddimere

Für die Elektromobilityshiftassays (EMSA) wurden folgende Oligonukleotiddimere eingesetzt. Rot hervorgehoben sind die bekannten Sequenzen für die E-Boxen, die AP2 und die NF1-Bindestelle. Mutationen sind blau hervorgehoben.

MCR	5´-CTAGCAAATTG CAGCT GGCCTCGGGC CAGGT GACCTTT GTTTAA CGTCGAC CGGAGCCCG TCCACT TGAAACTAG
M_{1/2}b	5´-CTAGCGCCTCGGGC CAGGT GACCTTGCT CGGAGCCCG TCCACT TGGAACGACTAG
M_{1/2}a	5´-CTAGAAATTG CAGCT GGCCTCGGGC TTTAA CGTCGAC CGGAGCCCGCTAG
MCR_{1/2}mut	5´-CTAGCAAATTG CAGCT CGCCTCGGGC CAGGT GACCTTT GTTTAA CGTCGAC CGGAGCCCG TCCACT TGAAACTAG
NF1_{mut}	5´-TGCAG CTT CCTCGGGC CAGGT GACC CGTC GAA GGAGCCGG TCCACT TGGA
AP2_{mut}	5´-TGCAGCT CGCT CGCC CAGGT GACC CGTCGAC CGAGC GG TCCACT TGGA
AP2 (SCBT, USA)	5´-GATCGACTGACC CCCCGG CCCGT CTAGCTGACTGG CGGGC CCGGGCA
NF1 (SCBT, USA)	5´-TTT TGG ATTGA AGCCA ATATGATAA AAA ACC TAACT TCGGT ATACTATT

2.1.5.2. PCR-Primer für die Klonierung der Ratten-HGF-Promotorkonstrukte

Name	Sequenz (5´ → 3´)	Lage
P24	CTG CAG GTA GCT GTA GTT ATG CTG AG	-1333 bis -1307
P18	ACA CCC TTT TCT TAC CTG CCC TCT	-616 bis -593
P19	AGG AGA TGC CGG GCT GAA AGA ATC	+7 bis +30

Abbildung 2 zeigt die Sequenz des 5´-flankierenden Bereichs des HGF-Gens der Ratte [58] und die Erkennungssequenzen der Restriktionsenzyme, über die die Promotorkonstrukte in die Vektoren kloniert wurden.


```

-1333
CTGCAGGTAG CTGTAGTTAT GCTGAGGAGG GTGGAGAGAT CTGCCTTTCG TGGTGGAGGT
Pst I Primer 24 □
GGAGACAGGC CATCCTGCTA CCGACTTTAA TTTTGCCTT GGTTACCTCT GTAGGGTTGC

AGGCTACTCC AGAGAAGGTC TCACATTCTG TTGACTTTCT CTTTCTCTAA AGAGGTATTC

GTTCTTCTGA GTATCCATCT CAGAAACACT GTECTCTGTT CTCTGACACA TCAGAGCACC

CTCCTCGTGT TGTAATAAAA GGAGAAGTCT GGGCAATGAT CTCACCAAAA CGTGATACTC

AGGGATCAGA GCCCCTCTGC CCCCTCCCTC CCCGAAGACC GTGGTGCTGT GGGTGTGTGT

AGGAGGAAAG AGGTTGAGAC CTTACTTAGG AATTAAAATA GCCAATGGGT CTCTAGTGAA

ATTCTTCATG CATACTACT GACATGTGGA CATGTGTGAT TGTGTACAAG GTTAGAAAAA

CCAGTATCTG TTTGCTTGTC AGGGATAAGA AACGGGCCAT GTCTGTCCCT TAGATGGTTT

AAGGGAAATT ATCAACAGAT ACATCAGAAA ACAGACATTT GAAAAATGTA TTTGGGATCC

TTTTGCAGTG GTTTGGGGAT AGCTCTTCTG AGGAAAGTCC ACTGGACAGG GCAATTTTCT

GGCCTGAAAC CCTGAGTGT TGTGTTCTGT TGCTATTTCT TCTCATCCCT CAAGGCCACA
blunt end
CCCTTTTCTT ACCTGCCCTC TTTACCTGG GTTCTGCCCC CTGACTCCCT TTCTCTTCTC
Primer 18 □
TTACTTTCCT TAAAATCCCG GGAAGTGGG TCAGTGTTC TCCCGAATC TCTCCAACAC

TGCAAGCTCG CAGACTAGGA GCTGGGGCTC ATTTGGCAGA AGGGCTGCTC CGCTCTCCTC

TTATGCTGCT TCCCCTTCCT CTTTTCCAG ATAGATATGT AAACACATGC ATTTTCCTGT

TCAAACGGGG CGAATTGGTG TTCAGCCTGT GCCTTGACTT AGCGATTGGG CTGAGTCTTG

CTCCTCCCTT CCCTACTCGG ATAGGAGCCA CAAGGATCTG GAGCTCAGGC TTCTAAATTG
Sac I
CAGCTGGCCT CGGCCAGGTG ACCTTTGCTT TGTAAGTTC TTTCTGGGAG GGGGAGTGAG

TGGAGTGGGG AGAGCTGGGA TCTGTTGCTT GTTGGGGGGG GGGGTAAAG AAAGGAAGGG

GCTGGAAGAG AGTAAAGGC TGTTGTTAAA CAGTTTCTTA CCGTAAGAGG GAGTTTAGTC

CTAGATCTTT CCAGTTAATC ACACAACAAA CTTAGCTCAT CGCAATAAAA GCAGCTCAGA
Bgl II
ACCGACCGGC TTGCAACAGG ATTCTTTCAG CCCGGCATCT CCTGCAGACC CATCAGCCTG
□ Primer 19 blunt end
CTCGAACTGC AAGCATG
+64

```

Abbildung 2: Sequenz des 5'-flankierenden Bereich des HGF-Gens der Ratte von -1333 bis +64. Die Lage der für die Klonierung der Promotorkonstrukte eingesetzten Primer ist unterstrichen. Die verwendeten Restriktionsschnittstellen sind in blau angegeben. Die Transkriptionsinitiationsstelle ist rot hervorgehoben.

Neben den Deletionskonstrukten aus dem HGF-Promotor wurden mit Hilfe der in 2.1.5.3. angegebenen Primern und des QuikChange™ Site-Directed Mutagenesis Kit (s. 2.2.2.4.) mutierte Promotorkonstrukte hergestellt und in den Reporterstudien verwendet.

2.1.5.3. PCR-Primer für die Mutagenese

Name	Sequenz (5' → 3')
E1mut2(quick)	TGC AGC TGG CCT CGG CCA GGA CAC C
a-E1mut2(quick)	GGT GTC CTG GCC GAG GCC AGC TGC A
E2mut(quick)	TAA ATT GGT GCT GGC CTC GGC CAG G
a-E2mut(quick)	ACC TGG CCG AGG CCA GCA CCA ATT T
AP2-mut(quick)	TGC AGC TGC GCT CGC CCA GGT GAC C
a-AP2-mut(quick)	AGG TCA CCT GGG CGA GCG CAG CTG C
NF1-mut(quick)	TGC AGC TTT CCT CGG CCA GGT GAC C
a-NF1-mut(quick)	AGG TCA CCT GGC CGA GGA AAG CTG C

2.1.5.4. Primer und Linker für den *in-vivo*-Footprint

Name	Sequenz (5' → 3')
P19	AGG AGA TGC CGG GCT GAA AGA ATC
FP4	A TGC CGG GCT GAA AGA ATC C
FP4b	A TGC CGG GCT GAA AGA
HGF-FP-Primer3	IRD800-C CGG GCT GAA AGA ATC CTG TTG CA
P65	ACG GGG CGA ATT GGT GTT CAG CCT
FP5	GGT GTT CAG CCT GTG C
FP6	IRD800-G CCT GTG CCT TGA CTT AGC GAT TG
Linker	GCG TTG GAT GCG CCG GAA TTC TGA C C CTT AAG ACT G
Linker-primer	GCG TTG GAT GCG CCG GAA TTC TGA C

In Abbildung 3 ist die Lage der Primer für die Erststrangsynthesen im *in-vivo*-Footprint im 5'-flankierenden Bereich des HGF-Gens der Ratte dargestellt.

TCAAACGGGG CGAATTGGTG TTCAGCCTGT GCCTTGACTT AGCGATTGGG CTGAGTCTTG
Primer 65 □
CTCCTCCCTT CCCTACTCGG ATAGGAGCCA CAAGGATCTG GAGCTCAGGC TTCTAAATTG
CAGCTGGCCT CGGCCAGGTG ACCTTTGCTT TGTAAGTTTC TTTCTGGGAG GGGGAGTGAG
TGGAGTGGGG AGAGCTGGGA TCTGTTGCTT GTTGGGGGGG GGGGTTAAGG AAAGGAAGGG
GCTGGAAGAG AGTAAAGGC TGTGTTAAA CAGTTTCTTA CCGTAAGAGG GAGTTTAGTC
CTAGATCTTT CCAGTTAATC ACACAACAAA CTTAGTCAT CGCAATAAAA GCAGCTCAGA
ACCGACCGGC TTGCAACAGG ATTCTTTCAG CCCGGCATCT CCTGCAGACC CATCAGCCTG
□ Primer 19
CTCGAACTGC AAGCATG

Abbildung 3: Lage der Primer für die Erststrangsynthesen im *in-vivo*-Footprint.

2.1.6. Vektoren und Plasmide

Vektor	Art	Bezug
pCAT-Basic	Reporterplasmid	Promega, Heidelberg
pSV- \square -Gal-Control	Reporterplasmid	Promega, Heidelberg
pGL3-CMV	Reporterplasmid	laborinterne Klonierung
pGL3-SV40	Reporterplasmid	Promega, Heidelberg
pGL3-TK	Reporterplasmid	laborinterne Klonierung
USF-full	Expressionsplasmid	Kiermaier A, Marburg
USF_BD	Expressionsplasmid	Kiermaier A, Marburg
USF_TD•His-Tag	<i>E. Coli</i> -Expressionsplasmid	Sieweke M, Paris
TFE3-pUT-SV1	Expressionsplasmid	laborinterne Klonierung

2.1.7. Bakterienstämme

Folgende *E. Coli*-Sämme [Genotyp] wurden eingesetzt:

- JM 109 [*F'* *traD36 proA*⁺ *proB*⁺ *lacIq lacZ_M15/recA1 endA1 gyrA96 (Nal*^r) *thi-1 hsdR17 supE44 relA1* *_(lac-proAB) mcrA*]
- DH5- \square [*F'*/*endA1 hsdR17(r_k⁻m_k⁺) supE44 thi-1 recA1 gyrA (Nal*^r) *relA1* *_(lacZYA-argF)_{U169} ([\square 80lacZ_M15]*]
- XL1-blue [*recA1 endA1 gyrA96 thi-1 hsdR17 supE44 relA1 lac* [*F'*/*proAB laq^fZ_M15 Tn10 (Tet*^r)]; Stratagene QuikChange™ Site-Directed Mutagenesis Kit]
- BL21(DE3) [*F ompT sdS_B (r_B m_B) gal dcm (DE3)*]; Novagen Expressionskit]

2.1.8. Zelllinien

Zelllinie	Typ	Spezies
Rat2	embryonale Fibroblasten, Thymidinkinase-mangel-Mutante	Ratte
NIH3T3	embryonale, Kontakt inhibierte Fibroblasten	Maus
FH109	embryonale Lungenfibroblasten	Mensch
HepG2	Hepatomazellen	Mensch
LF-CL2A	Hepatocarcinomazellen	Ratte
KG1	monozytäre Leukämiezellen	Mensch
U87MG	Glioblastomazellen	Mensch
U138MG	Glioblastomazellen	Mensch

2.2. Methoden

2.2.1. Biochemische Arbeiten

2.2.1.1. Isolierung von Plasmid-DNA im Mikromaßstab

Zur Isolation von Plasmid-DNA für analytische Versuche wurden Minipräparationen mittels alkalischer Lyse durchgeführt. Hierzu wurden die Puffer Q1, Q2 und Q3 aus dem Plasmid Midi Kit der Firma Qiagen (Hilden) verwendet:

Q1:	50 mM Tris-HCl, pH 7,4 10 mM EDTA, pH 8,0 100 µg/ml RNase A
Q2:	1% (w/v) SDS 200 mM NaOH
Q3:	2,55 M Kaliumacetat, pH 4,8

Für jedes Plasmid wurde eine Bakterienkolonie über Nacht in 5 ml Kulturmedium angeimpft und in einem Schüttler (E. Bühne; Tübingen) bei 37°C und 250 rpm angezogen. 1,5 ml der Kultur wurden dann in ein Eppendorfgefäß überführt und bei 5000 rpm (sämtliche Zentrifugationen erfolgten in einer Eppendorf 5417, Eppendorf; Hamburg) für 1 Minute pelletiert. Nach Verwerfen des Überstandes, der autoklaviert wurde, erfolgte eine Resuspension der Zellen in 150 µl Q1. Anschließend wurden 150 µl Q2 zugesetzt. Die anschließende Vermischung erfolgte, um eine Scherung der genomischen DNA zu vermeiden, durch vorsichtiges Invertieren. Die Proben wurden nun 5 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert und die Lysereaktion anschließend durch Zugabe von 150 µl Q3 gestoppt. Und die genomische DNA und die Zellproteine gefällt. Nach einer Inkubation von 5 Minuten auf Eis erfolgte eine Zentrifugation (14000 rpm, 4°C, 10 Minuten) zur Sedimentation der chromosomalen DNA und der Zelltrümmer. Der klare Überstand wurde in ein frisches Eppendorfcap überführt. Die Plasmid-DNA wurde durch Zugabe von 1 ml auf -20°C vorgekühlten Ethanol gefällt und durch Zentrifugation für 10 Minuten bei 14000 rpm pelletiert. Nach zweimaligem Waschen des Pellets mit 70%igem Ethanol und 10 Minuten Trocknen wurde das Pellet in 50 µl 10 mM Tris (pH 8,5) resuspendiert.

2.2.1.2. Präparative Isolierung von Plasmid-DNA

Das Prinzip der DNA-Plasmidaufreinigung mittels des Qiagen-Kits (Qiagen; Hil- den) beruht auf einer Anionenaustauschersäule, die aus definierten Silicatbestandteilen mit einer Partikelgröße von 100 µm großen Poren und einer hydrophilen Oberflächen- beschichtung besteht. Die so aufgereinigten Nukleinsäuren entsprechen in ihrer Rein- heit Proben, die über eine doppelte CsCl-Dichtegradientenzentrifugation isoliert wurden [gemäß Herstellerangabe].

Q1:	50 mM Tris-HCl, pH 7,4 10 mM EDTA, pH 8,0 100 µg/ml RNase A
Q2:	1% (w/v) SDS 200 mM NaOH
Q3:	2,55 M Kaliumacetat, pH 4,8
QBT	750 mM NaCl 50 mM MOPS, pH 7,4 15% (v/v) Ethanol 0,15% Triton X-100
QC	1 M NaCl 50 mM MOPS, pH 7,0 15% (v/v) Ethanol
QF	1,2 M NaCl 50 mM MOPS, pH 8,5 15% (v/v) Ethanol

Für die Anzucht eines plasmidtragenden Bakterienklons wurde eine 5 ml Vorkultur angesetzt, welche über Nacht im Schüttler (E. Bühne; Tübingen) bei 37°C und 250 rpm inkubiert wurde. Aus dieser Übernachtskultur wurden 30 ml (100 ml) LB-Medium angeimpft. Diese Kultur wurde erneut über Nacht im Schüttler bei 37°C und 250 rpm inkubiert. Am nächsten Tag erfolgte die Sedimentation der Bakterien für 10 Minuten und 4°C bei 5000 rpm in einer Beckmann-Zentrifuge (Palo Alto, USA) mit dem JA-20-Rotor (DuPont; Boston, USA). Der Überstand der Bakterien wurde zum Vernichten autoklaviert. Die präparative Isolierung erfolgte anschließend gemäß dem Herstellerprotokoll. Die Konzentration und Qualität der DNA wurde nach der Isolierung sowohl photometrisch als auch gelanalytisch bestimmt.

2.2.1.3. Photometrische Analyse der DNA

Um die Konzentration und die Reinheit von DNA-Proben zu bestimmen, wurden 1 oder 2 µl der Probe in 500 µl Aqua dest. verdünnt. Die Bestimmung der Konzentration erfolgte bei einer Wellenlänge von 260 nm in einem Zweistrahlphotometer von Hitachi (Tokyo, Japan). Für die Bestimmung der Reinheit wurde zusätzlich die Absorption bei einer Wellenlänge von 280 nm – dem Absorptionsmaximum von Proteinen und Phenol – gemessen. Vor der Messung wurde ein Nullabgleich des Meßstrahls gegen den Kontrollstrahl durchgeführt. Die in der Probe enthaltene DNA-Konzentration bestimmt sich nach folgender Formel:

$$c [\mu\text{g/ml}] = E_{260} \times F \times 50 \mu\text{g/ml}$$

wobei

c die Konzentration der DNA,

E_{260} die Extinktion bei 260 nm und

F den Verdünnungsfaktor darstellt.

Der Faktor (50 µg/ml) ist ein für DNA spezifischer Adsorptionskoeffizient.

Für die Reinheit wurde der Quotient aus den zwei erhaltenen Extinktionswerten berechnet:

$$R = E_{260}/E_{280}$$

Eine Probe wurde als sauber angesehen, wenn der Quotient E_{260}/E_{280} bei 1,8 lag.

2.2.1.4. Polymerase-Ketten-Reaktion

Die Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR) ist eine *in vitro*-Methode zur enzymatischen Synthese einer bestimmten DNA-Sequenz. Hierbei kopiert eine thermostabile DNA-Polymerase ausgehend von zwei spezifischen Oligonukleotiden (Primer), die an die komplementären Stränge binden, unter Einbau der jeweiligen Desoxyribonukleotide (dNTPs) die gewünschte DNA-Sequenz. Ein wiederholter Durchlauf von Zyklen bewirkt die exponentielle Vermehrung eines spezifischen Fragments, dessen Enden durch die 5'-Enden der Primer genau definiert sind. Jeder Zyklus besteht aus:

- einer Hitzedenaturierung zur Trennung der komplementären Stränge,
- der Anlagerung der beiden Primer an die komplementären Sequenzen (Annealing) und
- der Verlängerung der 3'-Enden beider Primer entsprechend der Matrize (Extension).

Der daraus resultierende exponentielle Anstieg der Zielsequenz bewirkt, daß nach 30 Zyklen ca. 10^6 - 10^7 Kopien vorliegen. Mit der PCR können bereits wenige DNA-Moleküle amplifiziert werden, wodurch die Gefahr von Kontaminationen sehr hoch ist. Aus diesem Grunde wurden alle Lösungen und Labormaterialien, die für die PCR verwendet wurden, autoklaviert bzw. sterilfiltriert. Die Lösungen, die für die PCR verwendet wurden, wurden mit Merck-Wasser hergestellt. Die Herstellung der Proben und die PCR-Reaktion wurden an Laborplätzen durchgeführt, die nicht zur weiteren Arbeit mit DNA-Amplifikationsprodukten verwendet wurden.

Die Annealing-Temperatur der Primer wurde nach folgender Faustregel berechnet:

$$T_A = (A+T) \times 2^\circ\text{C} + (C+G) \times 4^\circ\text{C} - 5^\circ\text{C}$$

Wobei A die Anzahl der Adeninbasen, T die der Thyminbasen, C die der Cytosinbasen und G die der Guaninbasen wiedergibt.

Die PCR-Methode wurde für die Herstellung spezifischer DNA-Fragmente zur Klonierung, für die Kontrolle der Klonierungen und – in abgewandelter Form – im *in-vivo*-Footprint (s. 2.2.4.4. u. 2.2.4.5.) eingesetzt. Die Amplifikation erfolgte mit Hilfe eines Omne-PCR-Gerätes (Hybaid; Middlesex, UK) oder eines Cetus Thermal Cycler (Perkin Elmer; Shelton, USA).

Ansatz:

10-100 ng Plasmid-DNA oder 1 µg genomische DNA
1 µl 10 µM sense-Primer
1 µl 10 µM antisense-Primer
5 µl dNTP-Lösung (1,25 mM dATP, dCTP, dGTP, dTTP)
5 µl 10xPCR-Puffer
0,2 µl Taq-DNA-Polymerase (5U/µl)
ad 50 µl H₂O

Optional: Überschichtung mit PCR-Wachs (MJ Research, Boston, USA)

Die PCR wurde eingeleitet durch einen fünfminütigen Denaturierungsschritt bei 92-96°C. Die Amplifikation erfolgte in der Regel in 30-35 Zyklen beginnend mit jeweils einer einminütigen Denaturierung der DNA bei 92-95°C. Danach wurde die Hybridisierung der Primer für ebenfalls 1 Minute bei einer Temperatur, die 2°C über der Annealing-Temperatur lag, durchgeführt. Die Synthese des neuen Strangs erfolgte bei 72°C für 1 Minute. Im Anschluß an die kompletten PCR-Zyklen wurde noch ein 10-minütiger Syntheseschritt durchgeführt, um unvollständige Fragmente zu komplettieren.

2.2.1.5. Enzymatische Hydrolyse mit Restriktionsendonukleasen

Zur Charakterisierung von Plasmiden und zur Herstellung von DNA-Fragmenten erfolgte ein enzymatischer Verdau mit Restriktionsendonukleasen. Sämtliche verwendeten Enzyme sowie die dazugehörenden Puffer wurden von den Firmen Roche (Mannheim) bzw. Promega (Heidelberg) bezogen.

Zur Hydrolyse wurden pro µg DNA 3 Units Restriktionsendonuklease eingesetzt, wobei eine Unit (U) der Enzymaktivität entspricht, die unter optimalen Bedingungen innerhalb einer Stunde 1 µg DNA des Lambda-Phagen vollständig spaltet. Das Ansatzvolumen berechnete sich aus der verwendeten Enzymmenge, die maximal $\frac{1}{10}$ des Ansatzvolumens ausmachen durfte. Die Reaktionen wurden, wenn vom Hersteller nicht anders angegeben, für 3 Stunden bei 37°C im enzyspezifischen Reaktionspuffer inkubiert. Danach erfolgte eine Hitzeinaktivierung der Enzyme entsprechend den Angaben des Herstellers. Eine Kontrolle des DNA-Verdaus erfolgte mittels Gelelektrophorese.

2.2.1.6. Horizontalgelelektrophorese

TAE-Puffer:

40 mM Tris-Base
20 mM Eisessig
1,25 mM EDTA, pH 8,0

Ladepuffer:

0,25% (w/v) Bromphenolblau
30% (v/v) Glycerin

Zur Analyse von DNA oder DNA-Fragmente erfolgte eine gelelektrophoretische Auftrennung in 0,8-1,5%igen Agarosegelen. Hierzu wurden 0,8-1,5 g Agarose in 100 ml TAE-Puffer durch mehrmaliges Aufkochen in der Mikrowelle gelöst. Nach Abkühlung auf ca. 60°C wurde die Agaroselösung mit 6 µl Ethidiumbromidlösung

(10 mg/ml) versetzt und in Flachgelkammern gegossen. Nach der Polymerisation des Gels wurde der Gelträger in eine mit TAE-Puffer gefüllte Elektrophoresekammer überführt. Die aufzutrennenden DNA-Proben wurden mit 1/6 Volumen Ladepuffer versetzt und in die Geltaschen geladen. Die Elektrophorese wurde bei 120 Volt bis zu einer deutlichen Trennung der DNA-Fragmente durchgeführt. Die DNA-Banden wurden im UV-Licht sichtbar gemacht und mit einem Digitalkamerasystem (MWG Biotech, Ebersberg) dokumentiert. Als Molekulargewichtsstandards wurden *MspI*-verdaute pUC19-DNA und *EcoRI-HindIII*-verdaute Lambda-DNA (MBI Fermentas; St.Leon-Rot) verwendet.

Für die Konzentrationsbestimmung von DNA-Proben wurden die aufgetrennten DNA-Banden mit dem Standard verglichen, dessen Konzentration bekannt war, und so die in den Proben befindliche Menge an Nukleinsäuren bestimmt.

2.2.1.7. Isolierung von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen

Die DNA-Extraktion aus Agarosegelen erfolgte mit Hilfe des EASY PURE-Kits (Biozym; Hess. Oldendorf) nach den Herstellerangaben. Die im Gel aufgetrennten DNA-Fragmente wurden im UV-Licht möglichst knapp ausgeschnitten. Anschließend erfolgte eine Volumenbestimmung, bei der davon ausgegangen wurde, daß 100 mg Gel etwa 100 µl entsprechen. Die Agarose wird bei diesem Verfahren thermisch aufgelöst und die DNA an Glasmilch gebunden. Nach einem Waschgang wurde die DNA in kleinem Volumen eluiert. Die Lagerung der Proben erfolgte bei -20°C.

2.2.1.8. Dimerisierung von Oligonukleotiden

Dimerisierungspuffer:

300 mM NaCl
10 mM Tris•HCl, pH 7,5
1 mM EDTA

Zur Dimerisierung wurden je ein Volumen sense- und antisense-Oligonukleotid (100 µM) mit zwei Volumen Dimerisierungspuffer für 10 Minuten im Wasserbad bei 90°C inkubiert. Anschließend wurden sie langsam auf Raumtemperatur abgekühlt und bei -20°C gelagert. Die Endkonzentration der verwendeten Oligodimere betrug 25 µM.

2.2.1.9. Ligation von DNA-Fragmenten

Ligationspuffer:

10 mM MgCl₂
10 mM DTT
1 mM Spermidin
1 mM ATP
100 ng/ml BSA
50 mM Tris•HCl, pH 7,4

Zur Insertion von DNA-Fragmenten mit kohäsiven Enden in die Vektoren wurden 5-30 fmol linearisiertes Plasmid mit dem 2-4 fachen Überschuß des zu inserierenden Fragmentes inkubiert. Die Ligation erfolgte im Ligationspuffer mit 1 Unit T4-DNA-Ligase über Nacht bei 15-16°C im Kühlwasserbad. Alle Ligationen wurden im kleinst möglichen Ansatzvolumen (5-10 µl) durchgeführt. Zur Überprüfung einer eventuellen Religation des Vektors dienten Ansätze ohne Insert-DNA, die mit und ohne Ligase inkubiert wurden.

2.2.1.10. Klonierung der HGF-Promotorfragmente aus genomischer Rattenleber-DNA

Um eine Analyse der HGF-Promotoraktivität zu ermöglichen, wurden verschiedene Deletionskonstrukte der 5'-flankierenden Sequenz des HGF-Gens mittels spezifischer Primer aus genomischer DNA amplifiziert, kloniert und sequenziert. Hierzu wurde zuerst die genomische, adulte Rattenleber-DNA mittels *ScaI* linearisiert, um die Amplifikation zu erleichtern. Anschließend erfolgte eine PCR-Amplifikation mit den in Abschnitt 2.1.5.2. angegebenen Primern. Die Amplifikate wurden aus dem Gel eluiert und *blunt end* über die *SmaI*-Schnittstelle in den Vektor pBluescript SK(-) ligiert. Für die Umklonierungen in den pCAT-Basic-Vektor wurde am 3'-Ende immer die *XbaI*-Schnittstelle aus dem pBlueskript SK(-)-Vektor verwendet. Im folgenden sind nur die am 5'-Ende verwendeten Schnittstellen angegeben. Das -1330er Fragment wurde über die *PstI*-Schnittstelle (-1330 bis -1325) und das -620er Fragment *blunt end* über die *SmaI*-Schnittstelle (Blueskript SK(-)) einkloniert. Das -270er Fragment und das -70er Fragment wurden mit Hilfe von *SacI* bzw. *BglII* aus dem -1330er Bluescript-Plasmid ausgeschnitten und über die entsprechenden Schnittstellen in den pCAT-Basic-Vektor kloniert. Die Konstrukte wurden mittels Sequenzierung auf ihre Richtigkeit kontrolliert (vgl. Abb.4 in Abschnitt 3.1.). Die Sequenzierung erfolgte nach Sanger [62] im Institut.

2.2.1.11. *In-vitro*-Expression von TFE3 mittels des TNT[®] Coupled Reticulocyte Lysate System

Für die rekombinante Expression des TFE3 wurde das TNT[®] Coupled Reticulocyte Lysate System von Promega (Heidelberg) verwendet. Mit Hilfe dieses Systems können Proteine *in vitro* transkribiert und translatiert werden, deren cDNA 3' zu einem SP6, T3 oder T7 RNA Polymerase Promotor inkloniert sind. Es handelt sich um eine Einschrittreaktion, bei der die Transkription durch die Phagen RNA-polymerasen und die anschließende Translation mittels Kaninchen-Reticulocytenlysats gekoppelt in einem Reaktionsgefäß ablaufen.

Es wurde 1 µg eines pUT-SV1-Vektors, welcher die für TFE3 codierende cDNA 3' zu einem T3 RNA Polymerase Promotor beinhaltet, in der Reaktion eingesetzt. Die Transkription/Translation erfolgte im kleinen Maßstab (25 µl Reaktionsvolumen) nach Herstellerangaben. Als Kontrolle für den Einsatz im EMSA wurde eine Reaktion ohne Plasmid angesetzt. Die Proben wurden à 5 µl aliquotiert und bei -70°C gelagert.

2.2.1.12. *In-vitro*-Expression einer trunkierten Form von USF1 mittels des pET-Systems

Für die rekombinante Expression einer DNA-bindungsfähigen, aber nicht transaktivierungsfähigen Variante von USF1 (USF_TD) wurde das pET-System von Novagen (Schwalbach) benutzt. Es wurde nach Herstellerangaben vorgegangen. Die Expression des Proteins erfolgte in einem speziellen *E.Coli*-Stamm (BL21(DE3)), der eine chromosomale Kopie des T7-RNA-Polymerase-Gens, das unter der Kontrolle des *lacUV5*-Promotors steht, trägt. Die trunkierte Form von USF1 war 3' von einem T7-Promotor in den pET-15b-Vektor von Novagen inkloniert. Diese doppelte Sperre sorgt dafür, daß die basale Expression sehr niedrig ist. Durch Zugabe von IPTG zur Bakterienkultur wird die Expression der T7-RNA-Polymerase induziert, welche dann das zu exprimierende Gen abliest. Die T7-RNA-Polymerase ist so spezifisch und aktiv, daß fast die gesamte Proteinproduktion der Bakterien auf das gewünschte Protein umgestellt wird. Bei der Expression des inklonierten Gens werden, da die cDNA die entsprechenden Codons trägt, am N-Terminus des Proteins sechs Histidine, ein sogenanntes His•Tag, eingebaut.

Die Aufreinigung des rekombinant exprimierten Proteins erfolgte mit Hilfe des BugBuster His•Bind Purification Kit von Novagen gemäß den Herstellerangaben. Hierbei werden die *E.Coli* schonend lysiert und das Protein mittels Metall-Chelations-

Chromatographie von den bakteriellen Proteinen abgetrennt. Das His•Tag bindet an Ni^{2+} -Ionen, die auf einer Säule immobilisiert sind. Das Protein wird nach dem Waschen mit 1 M Imidazol von der Säule eluiert. Für den weiteren Einsatz wurden Aliquots des Eluats bei -70°C gelagert.

Ein Großteil des Eluats wurde für den Einsatz im EMSA (2.2.5.) 2 h gegen Puffer D dialysiert und anschließend à 10 μl aliquotiert und bei -70°C gelagert.

2.2.2. Arbeiten mit E.Coli-Zellen

2.2.2.1. Kultivierung

LB-Medium:

1% (w/v) Bacto-Trypton
0,5% (w/v) Bacto-Hefeextrakt
1% NaCl
1mM NaOH

SOB-Medium:

2% (w/v) Bacto-Trypton
0.5% (w/v) Bacto-Hefeextrakt
10 mM NaCl
2.5 mM KCl
10 mM MgSO_4

SOC-Medium:

SOB-Medium mit 20 mM Glucose

Kulturmedium:

LB-Medium mit Antibiotikum

Agarplatten:

Kulturmedium mit 15 g/l Agar

Antibiotika:

Ampicillin	Arbeitskonzentration: 100 $\mu\text{g/ml}$
Zeocin	100 $\mu\text{g/ml}$

Sämtliche *E.Coli*-Bakterien-Flüssigkulturen wurden über Nacht im Schüttler in LB-Medium bei 37°C und 250 rpm kultiviert. Für die Anzucht transformierter Zellen wurde das entsprechende Antibiotikum zugesetzt.

2.2.2.2. Herstellung kompetenter Zellen

2xTSS:

20% (w/v) PEG 8000
10% (v/v) DMSO
70 mM MgCl_2

1xTSS:

50% 2xTSS
50% LB-Medium

Die *E. Coli*-Zellen (Stämme: JM109, DH5- α) wurden in 5ml LB-Medium bei 37°C und 250 rpm angezogen. Je 200 μ l dieser Übernachtskultur wurden in 200 ml LB-Medium überführt und erneut bei 37°C und 250 rpm inkubiert, bis die Kultur in der logarithmischen Wachstumsphase eine optische Dichte zwischen 0,3 und 0,4 bei 600 nm (OD_{600}) erreicht hatte. Nach einer 15minütigen Zentrifugation bei 5000 rpm und 4°C in einer Beckmann-Zentrifuge (Palo Alto, USA) mit dem JA-20-Rotor (DuPont; Boston, USA) wurde das Bakterienpellet vorsichtig in 10 ml ($1/20$ des Ausgangsvolumens) 1xTSS resuspendiert. Anschließend wurden 100 μ l Aliquots in vorgekühlte Reaktionsgefäße überführt, sofort in flüssigem Stickstoff eingefroren und bei -70°C gelagert.

2.2.2.3. Transformation kompetenter Zellen

Zur Transformation von *E. Coli*-Zellen wurden 5 μ l eines Ligationsansatzes (2.2.1.9.) oder 10 ng reines Plasmid zu 50 μ l kompetenten Bakterien, die auf Eis aufgetaut wurden, gegeben. Nach vorsichtigem Mischen des Transformationsansatzes erfolgte eine Inkubation für 30 Minuten auf Eis. Im Anschluß an einen Hitzeschock für 30 Sekunden bei 42°C wurde der Ansatz erneut 2 Minuten auf Eis inkubiert. Zur Regeneration bzw. zur Anzucht wurden 200 μ l SOC-Medium zugesetzt und die Proben für eine Stunde bei 37°C unter Schütteln (200 rpm) inkubiert. Schließlich wurde der Ansatz auf LB-Agarplatten (2.1.10.2.), welche mit dem selektierenden Antibiotikum versetzt waren, ausplattiert und über Nacht in einem Brutschrank bei 37°C inkubiert. Zur Identifizierung wurde die Plasmid-DNA aus den erhaltenen Klonen isoliert und mittels Restriktionsverdau oder Sequenzierung analysiert.

2.2.2.4. Einführung von Mutationen in die HGF-Promotorkonstrukte mit Hilfe des QuikChange™ Site-Directed Mutagenesis Kits

Mit Hilfe des QuikChange™ Site-Directed Mutagenesis Kits von Stratagene wurden die einzelnen Bindungselemente der Multiconsensusregion mutiert. Hierbei wurde nach dem Herstellerprotokoll vorgegangen.

Kontrollansatz:

2 µl pWhitescript-Plasmid
 1,25 µl Control primer 1
 1,25 µl Control primer 2
 5 µl 10x-Puffer
 1 µl dNTP-Mix
 39,5 µl H₂O
 1 µl *Pfu*Turbo

Probenansatz:

x µl Matrizen-Plasmid (5-50 ng)
 x µl sense-Primer (125 ng)
 x µl antisense-Primer (125 ng)
 5 µl 10x-Puffer
 1 µl dNTP-Mix
 ad 50 µl H₂O
 1 µl *Pfu*Turbo

Programm:

30"	95°C	
30"	95°C	} 12x
1'	55°C	
12'	68°C	

Als erstes wurde das zu mutierende Plasmid mittels einer PCR mit sense- und antisense-Primern, die eine Mutation gegenüber dem Elternstrang tragen, und der Polymerase *Pfu*Turbo vollständig kopiert. Das Elternplasmid ist, da es in einem *E.Coli*-Stamm vermehrt wurde, an verschiedenen Stellen methyliert. Die Tochterplasmide aus der PCR sind jedoch nicht methyliert, so daß durch einen enzymatischen Verdau mit *Dpn* I, welches nur methylierte DNA hydrolysiert, nur das nicht mutierte Elternplasmid zerstört wird. Nach einer anschließenden Transformation der Ansätze in XL1-blue-Zellen kann anhand der Kontrollen die Transformations- und Mutationseffizienz bestimmt werden. Klone mit mutierten Plasmiden wurden mittels Sequenzierung identifiziert.

2.2.3. Zellkulturarbeiten**Trypsinlösung:**

0,05% [w/v] Trypsin
 0,02% EDTA

Die meisten in den Versuchen verwendeten Zelllinien wurden in Dulbecco's Modified Eagle's Medium (D5546) von der Firma Sigma (Deisenhofen) kultiviert. Hier-von abweichend wurden die Zelllinien U87MG, U138MG und KG1 in RPMI 1640 (R8758, Sigma; Deisenhofen) gehalten.

Für die Kultur der einzelnen Zelllinien wurden den Grundmedien verschiedene Mengen an fötalem Kälberserum (FCS) zugesetzt. Je nach Zelllinie waren dies 5, 10 oder 20% [v/v] FCS. Sämtliche Medien wurden mit 1% [w/v] Penicilin/Streptomycin versetzt. Zum Einfrieren der Zellen wurden dem jeweiligen Kultur-medium 5% DMSO zugesetzt.

Die Zellkulturarbeiten wurden unter sterilen Bedingungen an einer Sicherheitswerkbank (Klasse II) der Firma BDK (Sonnenbühl-Genkingen) mit sterilen Plastik- und Glaswaren durchgeführt. Die Kultivierung der Zelllinien erfolgte in einem Begasungsbrutschrank der Firma Heraeus (Hanau) bei 37°C, 100% Luftfeuchtigkeit und einer CO₂-Atmosphäre von 5%. Nach mikroskopischer Beurteilung der Zellqualität und Zelldichte wurden die Zellen alle 2-5 Tage passagiert oder ein Mediumwechsel durchgeführt.

2.2.3.1. Bestimmung der Zellvitalität und Zellzahl

Die Bestimmung der Zellzahl erfolgte in einer Neubauer-Zählkammer. Die Vitalität der Zellen wurde mit Hilfe des Trypanblau-Exklusionsverfahrens bestimmt. Hierzu wurde die Zellsuspension in einem definierten Volumen Medium aufgenommen, 10 µl steril entnommen und nach einer 1:1-Verdünnung mit Trypanblaulösung (0,4% [w/v]), die nur tote Zellen anfärbt, in die Zählkammer pipettiert. Ausgezählt wurden alle nichtgefärbten Zellen aus 4 Großquadraten (= 16 Kleinquadrate) und die Gesamtzelldichte mit folgender Umrechnungsformel ermittelt:

$$\text{Zellen/ml} = \text{durchschnittliche Zellzahl pro Großquadrat} \times 2 \times 10^4/\text{ml}$$

2.2.3.2. Passagierung der Zellen

Um adhärente Zellen von den Kulturplatten zu lösen, wurden diese mit Trypsin behandelt. Um die Trypsinierung zu erleichtern, wurden die Zellen zunächst mit PBS gewaschen. Nach Absaugen des Überstandes wurde 1 ml der Trypsinlösung auf eine Platte (Ø 10 cm) zugesetzt. Unter mikroskopischer Kontrolle wurde bis zum Ablösen der Zellen gewartet und dann das Trypsin durch Zugabe von Kulturmedium inaktiviert. Nach Abschwemmen der Zellen wurden diese in ein 50 ml-Röhrchen überführt und abzentrifugiert (5 Minuten, 800 rpm). Nach Dekantieren des Überstandes wurde das Zellpellet in frischem Kulturmedium resuspendiert und auf neuen Kulturplatten ausgesät.

KG1-Zellen – als in Suspension wachsende Zelllinie – wurden direkt in 50 ml-Röhrchen überführt und abzentrifugiert (5 Minuten, 800 rpm). Auch hier wurde das Zellpellet in frischem Kulturmedium resuspendiert und auf neue Kulturplatten übertragen.

2.2.3.3. Kryokonservierung und Rekultivierung

Die Langzeitlagerung der Zellen wurde in flüssigem Stickstoff durchgeführt. Hierzu wurden die Zellen zunächst trypsiniert, die Zellzahl bestimmt und bei 800 rpm bei 4°C für 5 Minuten pelletiert. Nach Absaugen des Überstandes wurden etwa 1 Million Zellen pro ml in Einfriermedium resuspendiert und in Kryoröhrchen in einem Volumen von 1 bis 1.5 ml überführt. Nach Einfrieren der Zellen über eine Temperatursenkung von ~1°C/Minute im -70°C-Gefrierschrank für 24 Stunden erfolgte die Kryokonservierung in flüssigem Stickstoff.

Zur Rekultivierung der Zellen wurde das Kryoröhrchen nach Entnahme aus dem flüssigen Stickstoff möglichst schnell in einem Wasserbad bei 37°C aufgetaut. Die Zellsuspension wurde anschließend tropfenweise in 10 ml warmes Kulturmedium gegeben. Nach 24 Stunden Inkubation im Brutschrank erfolgte zum Entfernen des DMSO ein Mediumwechsel. Sehr empfindliche Zellen wurden vor der Zugabe von Kulturmedium pelletiert (5 Minuten, 800 rpm), um das DMSO sofort zu entfernen.

2.2.3.4. Transfektion

Am Vortag einer Transfektion wurden 150 000 Zellen je Well auf 6-Wellplatten ausgesät. Diese waren am Versuchstag 50-80% konfluent. Jeder Versuch wurde im Triplettsatz durchgeführt. Sämtliche Transfektionen wurden mit LipofectaminePlus (Lifetechnologies; Karlsruhe) durchgeführt. Die DNA setzte sich dabei aus 1 µg Konstruktvektor und 0,1 µg Kontrollvektor (pGL3-CMV) zusammen. Bei einer Kotransfektion wurden zusätzlich 0,5 µg eines Expressionsplasmids (USF, USF_BD oder TFE3) zugesetzt. Sämtliche eingesetzte serumfreie und 20% FCS-haltige Medien waren antibiotikafrei.

Zuerst wurde die DNA in 100 µl serumfreiem Medium je Probe vorgelegt, mit 6 µl Plus-Reagenz vermischt und 15 min bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wurden 4 µl Lipofectamine je Ansatz in 100 µl serumfreiem Medium verdünnt und zu der DNA gegeben. Die Mischung wurde weitere 15 min inkubiert. Während dieser Zeit wurden die Zellen mit serumfreiem DMEM gespült und 800 µl serumfreies DMEM je Well vorgelegt. Nun wurden die LipofectaminePlus-DNA-Komplexe unter Schwenken tröpfchenweise auf die Zellen gegeben. Es folgte eine 48stündige Inkubation im Brutschrank bei 37°C und 5% CO₂. Nach vier Stunden wurde 1 ml DMEM mit 20% FCS zugegeben. Am nächsten Tag wurde das Medium gegen 10% FCS-haltiges Medium

ausgetauscht. Wiederum einen Tag später wurden die Zellen dreimal mit PBS gespült und mit dem Reporterlysepuffer von Promega (Heidelberg) geerntet.

2.2.3.5. Chloramphenicol-Acetyl-Transferase-Assay und β -Galactosidase-Assay

Der Chloramphenicol-Acetyl-Transferase(CAT)-Assay ist ein Reportersystem, mit dessen Hilfe die Reporteraktivität verschiedener Abschnitte des 5'-flankierenden Bereichs des HGF-Gens untersucht wurden. Die nach der Transfektion erhaltenen Lysate enthielten zum einen CAT und zum anderen als interne Transfektionskontrolle die Firefly-Luciferase oder β -Galactosidase.

Die jeweilige CAT-Menge wurde mittels eines ELISA-Kits der Firma Roche (Mannheim) nach Angaben des Herstellers ermittelt. Hierbei wurden 200 μ l der Lysate in mit CAT-Antikörpern beschichtete Wells gegeben und anschließend mit einem anti-CAT-DIG-Antikörper und einem anti-DIG-Peroxidase-Antikörper inkubiert. Jeder Schritt wurde 1 Stunde bei 37°C inkubiert. Dazwischen wurde je fünfmal mit dem Waschpuffer gewaschen. Zur Messung wurde abschließend das Peroxidase-Substrat zugegeben und die Farbreaktion abgewartet (10-40 min). Die Messung wurde bei 405 nm in einem ELISA-Reader durchgeführt.

Für die Messung der β -Galactosidasemenge im Zellysat wurde ein auf dem gleichen Prinzip beruhender ELISA mit den entsprechenden Antikörpern für β -Galactosidase verwendet.

2.2.3.6. Luciferase-Assays

Beim single-Luciferaseassay der Firma Promega (Heidelberg) wurde die Firefly-Luciferase bestimmt, welche als interne Kontrolle im CAT-Assay diente. Die bei der Reaktion abgegebene Lichtenergie wurde mit Hilfe eines Lumineszenzreaders (Dynex Technologies; Chantilly, USA) gemessen.

Für die Messung wurden je 20 μ l der Zellysate in die Wells einer weißen Mikrotiterplatte pipettiert. Nach dem Füllen der Schläuche des Lumineszenzreaders wurde die Platte in das Luminometer eingesetzt und je Well 100 μ l des Substrats automatisch zugeetzt. Die Messung der jeweiligen Luciferaseaktivitäten dauerte im single-Luciferaseassay 15 s. Die Auswertung erfolgte mit Revelation 3.04 (Dynex Technologies; Chantilly, USA).

2.2.3.7. Isolierung von Kernproteinen

Puffer A:

10 mM HEPES•KOH, pH 7,9
10 mM KCl
1,5 mM MgCl₂
0,5 mM DTT
0,5 mM PMSF
10 µg/ml Pepstatin A
10 µg/ml Leupeptin

Puffer A+:

Puffer A mit 0,05% NP-40 (Nonidet P40)

Puffer B:

20 mM HEPES•KOH, pH 7,9
420 mM NaCl
1,5 mM MgCl₂
2 mM EDTA
25 % Glycerin
0,5 mM DTT
0,5 mM PMSF
10 µg/ml Pepstatin A
10 µg/ml Leupeptin

Puffer D:

20 mM HEPES•KOH, pH 7,9
20% [v/v] Glycerin
100 mM KCl
2 mM MgCl₂
0,5 mM DTT
0,5 mM PMSF

Die Kernextraktisolierung erfolgte nach einem modifizierten Protokoll von Dignam [63]. Sämtliche Zentrifugationen erfolgten in einer Eppendorf 5417R (Eppendorf; Hamburg). Pro Ansatz wurden ca. 1×10^8 Zellen eingesetzt. Nach dem Trypsinieren der Zellen wurden diese zweimal in PBS gewaschen und anschließend in ein Eppendorf-Gefäß überführt und pelletiert (2 Minuten, 3000 rpm, 4°C). Das Pellet wurde in 400 µl Puffer A aufgenommen und für 10 Minuten auf Eis inkubiert, wobei die Zellen anschwellen. Nach einer Zentrifugation (2 Minuten, 4000 rpm, 4°C) wurde der Überstand verworfen und das Pellet in 200 µl Puffer A+ aufgenommen. Zur mechanischen Lyse der Zellen wurde die Suspension mindestens zehnmals durch eine 26G-Kanüle gezogen. Nach einer erneuten Zentrifugation (2 Minuten, 5000 rpm, 4°C) und Verwerfen des Überstandes wurde das Pellet in 100 µl Puffer B aufgenommen und für 20 Minuten auf Eis geschüttelt. Nach einer 30-minütigen Zentrifugation (14000 rpm, 4°C) wurde der Überstand in Dialysierhütchen überführt und für 2 Stunden bei 4°C gegen Puffer D dialysiert. Die so erhaltene Kernproteinlösung wurde aliquotiert, in flüssigem Stickstoff eingefroren und bei -70°C gelagert.

2.2.3.8. Bestimmung der Proteinkonzentration

Für die Proteinkonzentrationsbestimmungen nach Bradford [64] wurden in Triplicatmessungen jeweils 2 µl der Kernextrakte in ein Well einer Mikrotiterplatte gegeben, 8 µl Puffer D (2.2.3.7.) zugegeben und mit 200 µl Coomassie-Plus-Protein-Assay-Reagenz (Pierce; Rockland, USA) versetzt. Nach kurzem Schütteln der Platte erfolgte eine Messung in einem ELISA-Reader (Dynex Technologies; Chantilly, USA) bei 590 nm und die Auswertung mit Revelation 3.04 (Dynex Technologies; Chantilly, USA). Die Proteinkonzentration wurde durch den Vergleich mit einer BSA-Standardreihe berechnet.

2.2.4. In-vivo-Footprint

Als Ausgangsbasis für die Etablierung des *in-vivo*-Footprints wurde das Protokoll von Mueller *et al.* [65] herangezogen. Etwaige Veränderungen sind in Tabelle 1 in Abschnitt 3.2.1. zusammengefasst. Im folgenden sind die nach den Optimierungsschritten erhaltenen Puffer und das optimierte Protokoll aufgeführt.

Lysepuffer:

100 mM NaCl
 10 mM Tris•HCl; pH 8,0
 25 mM EDTA; pH 8,0
 0,5% SDS
 100 µg/ml Proteinase K } frisch zugesetzt

DMS-Stopplösung:

1,5 M NaAc; pH 7,0
 1 M β-Mercaptoethanol
 steril filtrieren, dann
 100 µg/ml Hefe-tRNA

Erststrangpuffer (5x):

200 mM NaCl
 50 mM Tris•HCl; pH 8,9
 25 mM MgSO₄
 0,05% Gelatine
 Lagerung bei -20°C

PCR-Puffer (5x):

200 mM NaCl
 100 mM Tris•HCl
 25 mM MgSO₄
 0,5% Triton X-100
 Lagerung bei -20°C

Ladepuffer:

Sequenzierladepuffer von Amersham (Braunschweig)

Sequenziergel (41 cm):

5 ml 10XTBE
13,3 ml 30%iges Acrylamid/Bisacrylamid (29:1)
300 µl APS
15 µl TEMED
24 g Harnstoff
ad 50 ml H₂O

2.2.4.1. Zellbehandlung mit Dimethylsulfat

Dimethylsulfat (DMS) methyliert die DNA am N7-Atom der Guaninbasen, so daß die DNA an diesen Stellen durch die anschließende Piperidinbehandlung einen Einzelstrangbruch erhält. Aufgrund der zeitlich begrenzten Behandlung mit DMS wird nur etwa jedes 150ste Guanin methyliert, so daß Fragmente mit einer Länge von ca. 500-1000 Basen entstehen. Die Piperidinbehandlung ist quantitativ, um jedes methylierte Guanin in einen Strangbruch zu überführen.

Damit eine für mehrere Versuche ausreichende DNA-Menge zur Verfügung stand, wurden für die Versuche 15 cm Zellkulturplatten (□ 3x10⁷ Zellen) verwendet. Vor der Behandlung mit Dimethylsulfat (DMS) wurden die Zellen einmal mit serumfreiem Medium gewaschen. Anschließend wurde das Medium entfernt und die Platten auf eine 37°C warme Heizplatte gestellt. Nun wurden 25 ml vorgewärmtes Medium mit 50 µl DMS (Endkonzentration 0,2%) versetzt und diese Lösung nach kurzem Schütteln auf die Zellen gegeben. Nach exakt 2 min wurde das DMS-haltige Medium abgesaugt und die Zellen mit ca. 20 ml eiskalter PBS versetzt. Parallel dazu wurde eine Platte für die in-vitro-DNA auf gleiche Weise ohne DMS behandelt. Nach zwei weiteren Waschgängen mit PBS wurde die DNA nach dem Protokoll von Strauss isoliert [66]. Hierzu wurden die Zellen mit 3 ml Trypsinlösung von Platten gelöst. Zur Entfernung des Trypsins wurde die Zellsuspension mit eiskalter PBS auf 50 ml aufgefüllt, zentrifugiert, das Pellet mit PBS in ein 1,5 ml Eppendorfgefäß überführt und erneut zentrifugiert. Das Zellpellet wurde je nach Größe in 300-500 µl frisch hergestelltem Lysepuffer aufgenommen und über Nacht unter Schütteln bei 50°C inkubiert. Am nächsten Tag wurden die Proben zweimal mit je 1 Volumen Phenol/Chloroform/Isoamylalkohol (25:24:1) extrahiert und 2 min bei 1700 g (4000 rpm in einer Eppendorf 5417 R) zentrifugiert. Anschließend wurde die wässrige Phase in ein neues Eppendorfgefäß überführt und mit 1 Volumen Chloroform/Isoamylalkohol (24:1) extrahiert. Die wässrige Phase wurde in einem neuen Eppendorfcap mit _ Volumen 7,5 M NH₄Ac (pH 7,4) und 2 Volumina Ethanol vermischt. Die ausgefallene DNA wurde sofort 2 min bei 1700 g pelletiert, mit 70%igem Ethanol gewaschen und getrocknet. Die DNA wurde in 100 µl TE-Puffer re-

suspendiert und die Proben mehrere Stunden bei 65°C geschüttelt. Die isolierte DNA wurde bei -20°C gelagert.

2.2.4.2. *In-vitro*-DNA-Behandlung und DNA-Fragmentierung

Um die Kontroll-DNA mit DMS zu behandeln, wurden 150 µg DNA mit TE-Puffer auf ein Volumen von 175 µl gebracht. Nun wurde eine 1%ige DMS-Lösung in H₂O angesetzt. Nach kräftigem Vortexen wurden 25 µl der DMS-Lösung (Endkonzentration 0,125%) zu der DNA gegeben und der Ansatz 25 s gemischt. Nach 2 min bei Raumtemperatur wurden 50 µl eiskalter DMS-Stopplösung und 750 µl auf Trockeneis gekühlten Ethanol zugegeben und die Proben für 30 min auf Trockeneis gestellt. Parallel dazu wurden 200 µl der *in vivo* behandelten DNA mit 50 µl DMS-Stopplösung versetzt und ebenfalls mit 750 µl vorgekühltem Ethanol für 30 min auf Trockeneis gefällt.

Die gefällten Proben wurden für 10 min bei 14000 rpm und 4°C zentrifugiert und mit 1 ml 75%igem Ethanol gewaschen. Nach erneuter Zentrifugation wurde der Überstand verworfen und die Pellets in 200 µl frisch angesetzter 1 M Piperidin-Lösung aufgenommen. Nach ca. 15 min waren die Pellets gelöst und die Proben wurden für 30 min bei 90°C gehalten. Anschließend wurden die Proben für 10 min auf Trockeneis gestellt. Das Piperidin wurde im Vakuum evaporiert und die Pellets in 360 µl TE-Puffer aufgenommen. Nach vollständigem Lösen der fragmentierten DNA wurden 40 µl 3 M NaAc; pH 7,0 und 1 ml eiskaltes Ethanol zu den Proben gegeben. Nach einer mindestens zweistündigen Fällung bei -20°C wurden die Proben erneut zentrifugiert und in 500 µl TE-Puffer aufgenommen. Es folgte eine zweite Fällung mit 170 µl 8M NH₄Ac und 670 µl Isopropanol für mindestens 2 Stunden bei -20°C. Die mit 500 µl 75%igem Ethanol gewaschenen Pellets wurden in 50 µl H₂O aufgenommen und erneut evaporiert, um die letzten Spuren des Piperidins zu entfernen. Nun wurde die DNA nach photometrischer Bestimmung in einer Konzentration von ca. 1 µg/µl in TE-Puffer aufgenommen. Abschließend wurden die Proben abzentrifugiert und die Überstände in neue Eppendorfgefäß überführt. Die DNA-Konzentration wurde nun nach erneuter photometrischer Bestimmung auf 0,4 µg/µl eingestellt.

2.2.4.3. Erststrangsynthese und Linker-Ligation

Aufgrund der statistischen Methylierung der DNA ist nur ein Ende der Fragmente für eine PCR bekannt. Um einen Linker bekannter Sequenz an die Fragmente ligieren zu können, wird mittels Primerextension aus den einzelsträngigen Fragmenten je ein Doppelstrang mit glatten Enden („blunt end“) synthetisiert.

Ansatz:

2,5 µl DNA (0,4 µg/µl)
0,3 µl 1 µM Erststrangprimer
0,24 µl dNTP-Lösung (25 mM dATP, dCTP, dGTP, dTTP)
6 µl 5xErststrangpuffer (2.2.4.)
0,25 µl Vent-DNA-Polymerase (2U/µl, NEB; Frankfurt a.M.)
3 µl DMSO
17,71 µl H₂O

Je Ansatz wurde 1 µg fragmentierter DNA in einem vorgekühlten 0,5 ml PCR-Gefäß vorgelegt. Nach Zugabe der Reagenzien wurden die Ansätze gemischt und auf Eis gestellt, bis der Thermocycler die Denaturierungstemperatur erreicht hatte. Nun durchliefen die Proben einen Zyklus von 5 min bei 95°C, 30 min bei 60°C und 10 min bei 76°C. Anschließend wurden die Proben sofort auf Eis gestellt.

Zur Ligation des Linkers an die DNA-Fragmente wurde folgender Ansatz benutzt:

Ansatz:

30 µl Erststrangsynthese-Ansatz
15 µl 50% PEG 4000
1,25 µl 20 µM Linker
0,6 µl MgCl₂
2,2 µl 1 M Tris•HCl; pH 7,5
0,5 µl 1 M DTT
0,75 µl 100 mM ATP
0,125 µl 10 µg/µl BSA
0,5 µl T4 DNA-Ligase (6 U/µl, NEB; Frankfurt a.M.)
19,075 µl H₂O

Nach Zugabe sämtlicher Reagenzien auf Eis wurde eine mindestens einstündige Ligation bei 17°C durchgeführt. Anschließend wurde die DNA mit

1 µl Hefe tRNA (10 µg/µl),
8,4 µl 3 M NaAc (pH 7,0) und
220 µl Ethanol

über Nacht bei -20°C gefällt. Am nächsten Tag wurden die Proben 15 min bei 15000 rpm und 4°C pelletiert, die Pellets mit 500 µl 75%igem Ethanol gewaschen und in 60 µl Wasser und 10 µl DMSO aufgenommen.

2.2.4.4. Linker vermittelte (Linker-mediated-)PCR und Labeling

Vor der PCR wurden die Proben erneut auf Eis gestellt und die Reagenzien auf Eis zugegeben.

Ansatz:

70 µl Ligations-Ansatz
20 µl 5xPCR-Puffer (2.2.4.)
1 µl 10 µM sequenzspezifischer Primer
1 µl 10 µM Linker-Primer
0,8 µl 25 mM dNTP
0,5 µl Vent-DNA-Polymerase (2 U/µl, NEB; Frankfurt a.M.)
6,7 µl H₂O

Nachdem der Thermocycler die Denaturierungstemperatur erreicht hatte, wurde die PCR gemäß folgendem Programm durchgeführt:

5 min 95°C
1 min 95°C } 30x
2 min 64°C }
3 min 76°C }
10 min 76°C

Nach der PCR wurden die Proben sofort auf Eis gestellt. Als nächstes wurden die Fragmente nach folgendem Ansatz mit dem Infrarot-Farbstoff-konjugierten Primer markiert:

Ansatz:

100 µl LMPCR-Ansatz
1 µl 5xPCR-Puffer (2.2.4.)
2,3 µl 1 µM Labeling-Primer
0,4 µl 25 mM dNTP
0,5 µl Vent-DNA-Polymerase (2 U/µl, NEB; Frankfurt a.M.)
0,8 µl H₂O

Die Proben wurden im Anschluß sofort auf Eis gestellt. Je Ansatz wurden 4 µl mit 2 µl Ladepuffer versetzt. Die Proben wurden für 2 min bei 70°C denaturiert und 0,5 µl auf das Sequenziergel, welches durch einen 30 minütigen Vorlauf auf 50°C temperiert wurde, geladen. Die Auftrennung erfolgte bei 1500 V und 50 W über Nacht.

2.2.5. Elektromobilityshiftassay

2.2.5.1. Markierung der Oligonukleotiddimere

Zur radioaktiven Markierung wurde mittels T4-Polynukleotidkinase (PNK, NEB; Frankfurt a.M.) [γ - ^{32}P]-ATP (3000 Ci/mol, Amersham; Braunschweig) am 5'-Ende der Oligodimere eingebaut. Hierzu wurden jeweils 5 pmol Oligodimer in PNK-Puffer mit 10 U PNK und 30 μCi [γ - ^{32}P]-ATP versetzt und eine halbe Stunde bei 37°C inkubiert. Die Aufreinigung der markierten DNA erfolgte über eine Nick-Säule (Amersham; Braunschweig). Nachdem die Säule zweimal mit 3 ml TE-Puffer äquilibriert wurde, erfolgte das Auftragen der auf 100 μl aufgefüllten Probe auf die Säule. Weitere 300 μl TE-Puffer wurden auf die Säule aufgebracht und das so erhaltene erste Eluat verworfen. Das markierte Dimer wurde durch eine zweite Eluierung mit 400 μl TE-Puffer von der Säule gewonnen. Die Aktivität des markierten Oligodimers wurde in einem Szintillationszähler (Canberra Company; Meriden, USA) bestimmt. Hierzu wurden 4 μl zu analysierende Lösung in Szintillationsflüssigkeit gemessen. Die Lagerung der markierten Oligonukleotiddimere erfolgte bei -20°C.

2.2.5.2. Bindungsreaktion, Gellauf und Analyse

Mit Hilfe des Elektromobilityshiftassays (EMSA) können Proteinbindungen an regulatorische Elemente in der DNA nachgewiesen werden. Hierbei wird die unterschiedliche Laufgeschwindigkeit von proteingebundenen und ungebundenen DNA-Oligodimeren in Polyacrylamidgelen ausgenutzt.

Puffer D:

20 mM HEPES•KOH, pH 7,9
20% [v/v] Glycerin
100 mM KCl
2 mM MgCl_2
0,5 mM DTT
0,5 mM PMSF

10xTBE-Puffer:

890 mM Tris Base
890 mM Borsäure
20 mM EDTA

Polyacrylamidgel:

6,7 ml 30% Acrylamid:Bisacrylamid(29:1)-Lösung
1,25 ml 10 x TBE-Puffer
300 μl 10% APS
20 μl TEMED
ad 50 ml H_2O

Ansatz:

10 fmol markiertes Oligodimer
 2,5 µg Kernextrakt
 1 µg Poly-dI/dC
 ad 10 µl Puffer D

Der angegebene Ansatz wurde für 20 Minuten auf Eis inkubiert. Für den Nachweis einer spezifischen Bindung wurden einige Proben mit einem Überschuß (5-300fach) unmarkierter Dimere versetzt. Um bestimmte Proteine im Komplex nachzuweisen, wurden in den Supershiftanalysen die Kernextrakte vor der Zugabe des Oligodimers mit 2 µg eines spezifischen Antikörpers 20 Minuten vorinkubiert. Die Ansätze wurden auf ein 4%iges Polyacrylamidgel gegeben und eine zweistündige Elektrophorese bei 120 V durchgeführt. Anschließend wurde das Gel auf eine Filterpapier (Whatman; Maidstone, UK) überführt und für eine halbe Stunde im Vakuum in einem Gelrockner getrocknet. Es folgte eine Exposition eines Phosphoscreens (Amersham Bioscience; Freiburg) über Nacht und die Auswertung mit Hilfe des Phosphorimagers Storm840 (Amersham Bioscience; Freiburg) und der ImageQuant5.0-Software (Amersham Bioscience; Freiburg).

2.2.6. *In-vitro*-Footprint

Ein *in-vitro*-Footprint dient zur Lokalisation potentieller Protein-DNA-Bindestellen im homologen Promotorkontext. Hierbei wird ein zu untersuchender DNA-Abschnitt in An- oder Abwesenheit von Proteinen partiell mit DNase I verdaut. Anschließend werden die DNA-Fragmente mittels Gelelektrophorese aufgetrennt. Die Detektion erfolgt über einen Vergleich des hydrolytischen Abbaumusters der reinen DNA mit dem der proteingebundenen DNA.

Markierung:

1 µg DNA-Fragment
 1,6 µl Klenow (2 U/µl)
 1,6 µl 10x Puffer
 4 µl [α - 32 P]-dCTP (3000 µCi/mol)
 ad 16 µl H₂O

Maxam-Gilbert-Stop-Lösung:

0,3 M NaAc; pH 5,5
 100 µg/ml Hefe-tRNA

HNB:

0,5 M Sucrose
 15 mM Tris·HCl; pH 7,5
 60 mM KCl
 0,25 mM EDTA; pH 8,0
 0,125 mM EGTA; pH 8,0

TMK:	50% Glycerin 50 mM Tris·HCl; pH 8,0 50 mM KCl 10 mM MgCl ₂
DNase-I-Mix:	14 U/μl DNase I (Grad I) in TMK
DNase-I-Stop-Lösung:	50 mM EDTA; pH 8,0 0,1% SDS 150 μg/ml Hefe-tRA 200 μg/ml Proteinase K
Präparatives Gel:	6,7 ml 30% Acrylamid:Bisacrylamid(29:1)-Lösung 1,25 ml 10 x TBE-Puffer 300 μl 10% APS 20 μl TEMED ad 50 ml H ₂ O

2.2.6.1. Markierung und Präparation des Promotorfragments

Mit Hilfe der Restriktionsenzyme *Hind* III und *Bgl* II wurde ein Fragment aus dem -620er HGF-Promotor-Bluescript-Plasmid ausgeschnitten, welches den Bereich -620 bis -70 abdeckte (in Relation zur Transkriptionsinitiationsstelle). Es folgte eine Markierung mittels des Klenow-Fragments der DNA-Polymerase II und 4 μl [³²P]-dCTP. Nach 30minütiger Inkubation bei 37°C wurde das überschüssige [³²P]-dCTP mittels Nicksäulen abgetrennt (s. 2.2.5.1.). Um eine einseitige Markierung zu erhalten, wurde das Fragment einem weiteren Restriktionsverdau mit *Sac* I unterzogen, so daß das Fragment den HGF 5'-Bereich von -310 bis -70 umspannte. Nach Aufreinigung mit Hilfe eines präparativen Polyacrylamidgels wurde die markierte DNA bei -20°C gelagert.

2.2.6.2. Maxam-Gilbert-Reaktion

Um die Protein-DNA-Interaktionen genau lokalisieren zu können, wurde eine G/A-Leiter nach Maxam und Gilbert von dem einseitig markierten Promotorfragment erstellt [67]. 20 μl (10⁶ cpm) der markierten Probe wurden mit 1 μg I/C und 25 μl 88%iger Ameisensäure versetzt und bei Raumtemperatur inkubiert. Nach 7 min wurde die Reaktion durch Zugabe von 200 μl auf 4°C temperierter Stop-Lösung gestoppt, die DNA-Fragmente mit 500 μl auf -20°C vorgekühltem Ethanol gefällt und anschließend 30 min bei 15000 rpm (Eppendorf 5417 R) zentrifugiert. Das Pellet wurde in 250 μl 0,3 M NaAc aufgenommen, mit 3 Volumina Ethanol versetzt und erneut abzentrifugiert. Nach Entfernen des Überstandes wurde das Pellet vakuumgetrocknet und anschlie-

ssend in 100 µl frisch angesetztem 1M Piperidin aufgenommen. Das Gemisch wurde 30 min auf 90°C erhitzt, auf Eis gestellt und 2 h vakuumgetrocknet. Nach Resuspension in 100 µl H₂O und erneutem Vakuumtrocknen wurde die fragmentierte DNA in 20 µl Ladepuffer aufgenommen.

2.2.6.3. DNase-I-Titration

Zur Ermittlung des optimalen Verhältnisses von DNA zu DNase I ist eine Titration der DNase I in An- und Abwesenheit von nukleären Proteinen erforderlich. In einer Stammlösung wurden pro Reaktion 1 ng DNA und 2,5 µg I/C in 50 µl HNB mit 5 mM MgCl₂ und 2,5 mM CaCl₂ aufgenommen und im Wasserbad auf 20°C temperiert. Diese Stammlösung wurde mit dem DNase-I-Mix in HNB mit 5 mM MgCl₂ und 2,5 mM CaCl₂ für die Ansätze ohne Protein in den Verhältnissen 1:10, 1:100, 1:200, 1:400, 1:800 und 1:1000 in 1 µl Gesamtvolumen versetzt. In den Ansätzen mit Protein wurden die Verhältnisse 1:5, 1:10, 1:20, 1:40, 1:80 und 1:100 eingesetzt.

Der DNase-I-Verdau wurde 60 s bei 20°C durchgeführt und durch die Zugabe von 50 µl Stop-Lösung beendet. Die fragmentierte DNA wurde durch Phenol/Chloroform-Extraktion, anschließende Fällung mit 1 Volumen 4 M NH₄Ac und 2,5 Volumina Ethanol für 15 min bei -70°C und 30 min Zentrifugation bei 15000 rpm und 4°C isoliert und in 3 µl Ladepuffer aufgenommen. Nach gelelektrophoretischer Auftrennung wurde ausgehend von den entstandenen Fragmentlängen das geeignete DNA-DNase-I-Verhältnis ausgewählt.

2.2.6.4. DNase-I-Footprint

Pro Ansatz wurden 10 µg Rat2-Kernextrakt, 4 µl Spermidin (20 mM) und 2 µl Poly-dI/dC (1 µg/µl) 10 min auf Eis inkubiert. Nach Zugabe von 1 ng des markierten DNA-Fragments ($\approx 5 \cdot 10^6$ cpm) wurde zur Bildung der Protein-DNA-Komplexe weitere 10 min auf Eis inkubiert. Im Anschluß wurde mit der in Abschnitt 2.2.6.3. als optimal ermittelten Menge DNase I für 60 s bei Raumtemperatur inkubiert. Nach Aufreinigung der DNA mittels Phenol-Chloroform-Extraktion und Fällung mit NH₄Ac wurden die Proben mit Sequenziergelladepuffer versetzt und auf ein denaturierendes Polyacrylamidgel aufgetragen. Die Auftrennung erfolgte bei 1200 V. Anschließend wurde das Gel getrocknet und autoradiographisch ausgewertet.

3. Ergebnisse

In Rahmen dieser Arbeit wurde eine Multiconsensusregion (MCR) im Ratten-HGF-Promotor als Repressor der HGF-Expression identifiziert und näher untersucht.

3.1. Transkriptionelle Expressionskontrolle durch den 5'-flankierenden Bereich des HGF-Gens

HGF wird in mesenchymalen Zellen wie z.B. in den Hepatischen Sternzellen (HSC) [68], Mesangialzellen [69] und einigen Fibroblastentypen [70] exprimiert, während epitheliale Zellen den HGF-Rezeptor c-Met ausbilden [14]. Da HGF zelltypspezifisch reguliert wird, und auch in den meisten Fibroblastentypen nicht exprimiert wird, wurden zur Identifizierung von Repressorelementen nicht-HGF-exprimierende Zelltypen wie die Fibroblastenzelllinien Rat2 und NIH3T3 und die humane Hepatomazelllinie HepG2 herangezogen.

Zur Bestimmung der Promotoraktivität einzelner Abschnitte wurden mittels PCR und anschließender enzymatischer Hydrolyse unterschiedlich lange Fragmente aus dem 5'-flankierenden Bereich des Ratten-HGF-Gens gewonnen. Diese Promotorfragmente sind inklusive bekannter oder potentieller regulatorischer Elemente schematisch in Abbildung 4 dargestellt. Diese terminalen Deletionskonstrukte wurden in den promotorlosen pCAT-Basic-Vektor, der das Gen für das Reporterprotein Chloramphenicol-Acetyl-Transferase trägt, kloniert.

Diese Konstrukte wurden in NIH3T3-, HepG2- und Rat2-Zellen transfiziert und die Reporteraktivität nach zwei Tagen Inkubation mittels CAT-Assay ermittelt. Das -70er-Fragment, welches nur den Core-Promotor enthält, hatte in allen Zelltypen die höchste Reporteraktivität. Reporter unter Kontrolle von längeren Fragmenten wurden dagegen nur vermindert exprimiert. Die erreichte Reportersuppression durch Ausweitung des 5'-flankierenden HGF-Genbereichs wird besonders deutlich, wenn die Reporteraktivitäten der verschiedenen Konstrukte in den einzelnen Zelltypen jeweils in Relation zur Aktivität des -70er-Fragments berechnet wird (Abb. 5).

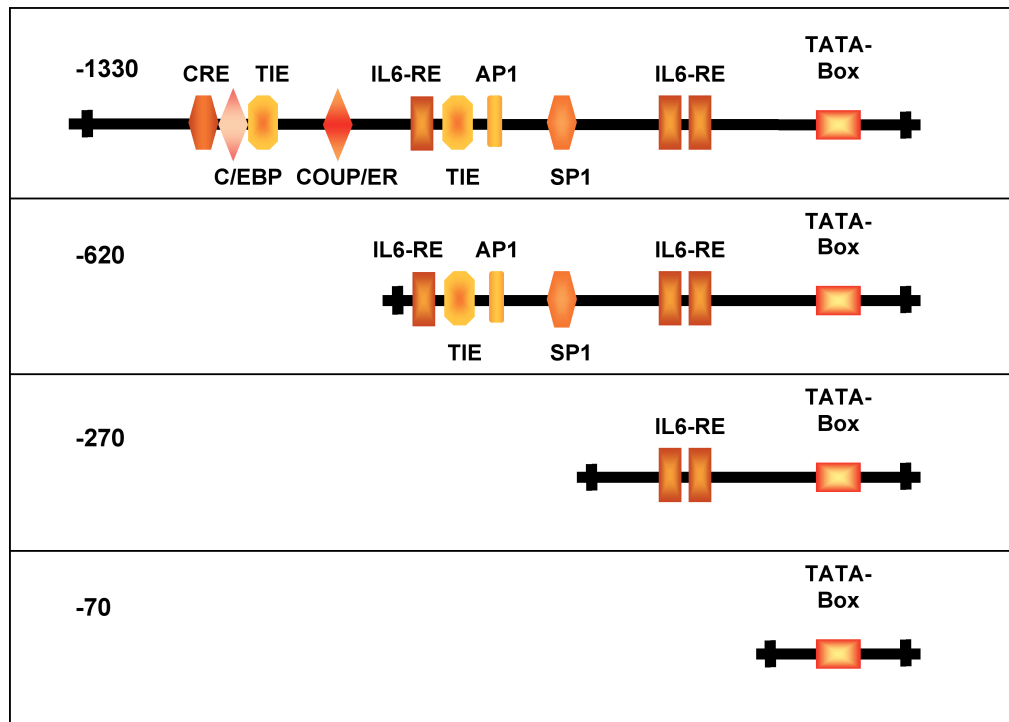


Abbildung 4: Schematische Darstellung der Deletionskonstrukte aus dem 5'-flankierenden Bereich des Ratten-HGF-Gens. Die Konstrukte wurden nach den Angaben in Abschnitt 2.1.5.2. kloniert. Die Zahl links von den Konstrukten gibt die Lage des 5'-Endes in Relation zur Transkriptionsinitiationsstelle im HGF-Gen an. Ausgewählte, nachgewiesene und potentielle regulatorische Elemente sind als farbige Boxen eingezeichnet.

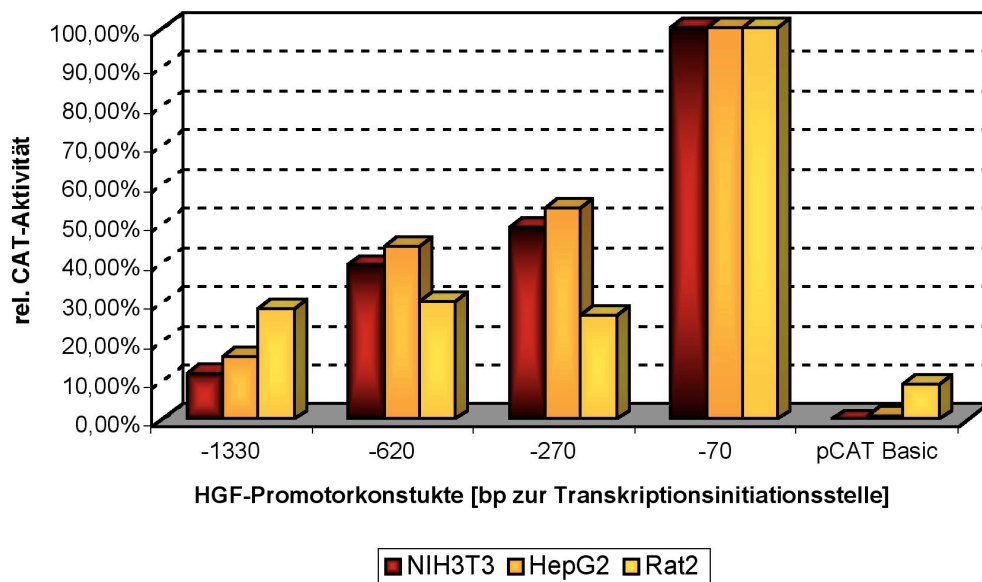


Abbildung 5: Promotoraktivität verschiedener Deletionskonstrukte aus dem 5'-flankierenden Bereich des HGF-Gens in nicht HGF-exprimierenden Zellen. Vektoren, deren CAT-Gen unter Kontrolle verschiedener Abschnitte des 5'-flankierenden Bereichs des HGF-Gens standen (Abb. 4), wurden in NIH3T3-, HepG2- und Rat2-Zellen transfiziert. Nach 2 d Inkubation wurde die CAT-Aktivität gemessen und gegen die Luciferaseaktivität - ausgehend vom kotransfizierten Kontrollvektor (pGL3-CMV) - normalisiert (2.2.3.5. und 2.2.3.6.)

In allen Zelltypen zeigte sich eine starke Reprimierung der Promotoraktivität beim -270er Fragment gegenüber dem -70er Fragment. Dies deutet auf einen negativ regulatorischen Sequenzabschnitt in der Region zwischen -270 und -70 des HGF-Gens hin. Bei den NIH3T3- und den HepG2-Zellen kommt es zusätzlich zu einer weiteren Reporterabnahme durch den Sequenzbereich von -620 bis -1330, der die Suppression verstärkt. Daher scheint ein weiteres regulatorisches Element in der Region von -620 bis -1330 zu existieren, welches vermutlich von der Spezies oder auch vom Zelltyp abhängt.

3.2. Lokalisierung und Charakterisierung von Protein-DNA-Bindungsdomänen im 5'-flankierenden Bereich des HGF-Gens

Zur Lokalisierung der reprimierenden Sequenzelemente zwischen -70 und -270 wurde ein Footprintverfahren aufgebaut. Bei diesen Methoden wird die DNA entweder mittels DNase I oder chemisch partiell fragmentiert. Sind Proteine (*in vivo* oder *in vitro*) an ihre Bindestellen in der DNA gebunden, so wird die DNA an diesen Stellen nicht gespalten. Mit einer anschliessenden Gelelektrophorese werden die Fragmente nach ihrer Grösse aufgetrennt. Durch die Anwesenheit der Proteine ändert sich das Bandenmuster, welches man nach der Gelelektrophorese erhält. Ein Vergleich der mit und ohne Proteine behandelten DNA-Proben zeigt die Proteinbindestellen im untersuchten Bereich an. Für die Analyse wurden in dieser Arbeit zwei Ansätze angegangen:

1. *In-vivo*-Footprint

2. *In-vitro*-Footprint

Der *in-vitro*-Footprint stellt ein relativ einfaches, artifizielles System dar. Mit Hilfe eines *in-vivo*-Footprints können demgegenüber Protein-DNA-Interaktionen in der lebenden Zelle nachgewiesen werden. Zur Etablierung eines Infrarot-gestützten *in-vivo*-Footprints wurden verschiedene Protokolle (Mueller et al. [65], Rodgers und Kim [71]) miteinander verglichen und einzelne Schritte optimiert.

3.2.1. Etablierung eines *in-vivo*-Footprints

Als Ausgangsprotokoll wurde die Methodik von Mueller *et al.* [65] herangezogen. Daneben wurde zum Vergleich das Protokoll von Kim und Rodgers eingesetzt [71], in dem die DNA ethyliert statt methyliert wird. In Abbildung 6 ist der schematische Ablauf eines *in-vivo*-Footprints dargestellt.

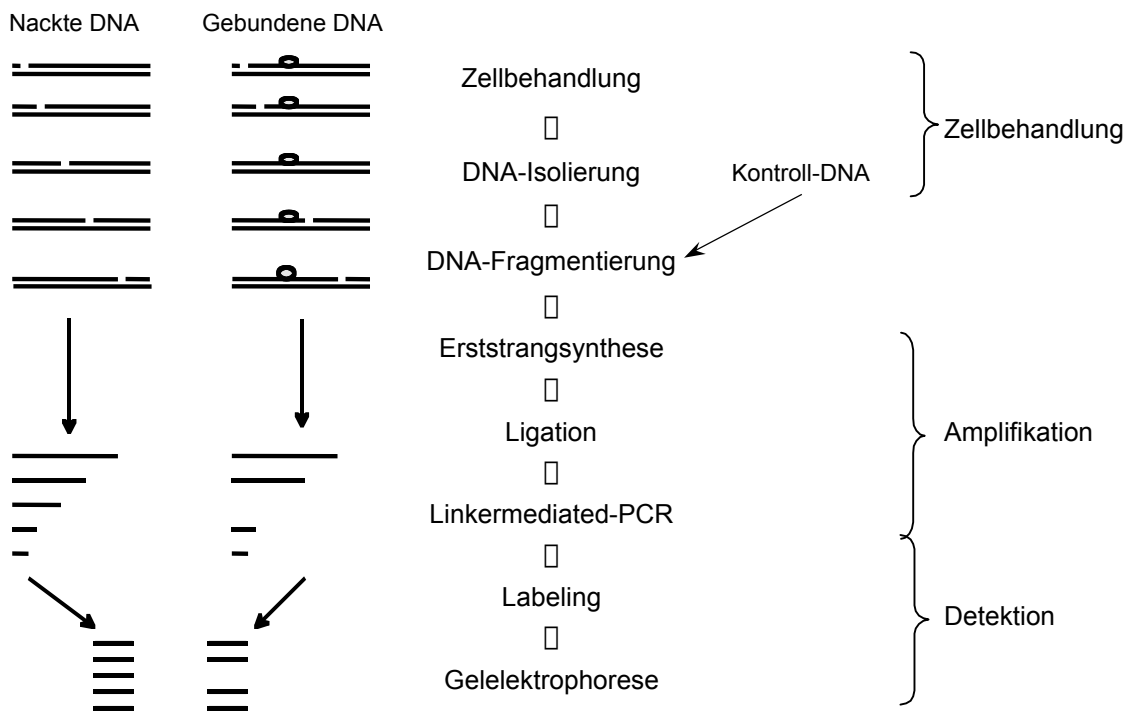


Abbildung 6: Schematischer Ablauf eines *In-vivo*-Footprints. Mit Hilfe eines *in-vivo*-Footprints können Protein-DNA-Interaktionen in der lebenden Zelle nachgewiesen werden. Hierzu werden die Zellen, aus denen die zu untersuchende DNA isoliert werden soll, mit einem chemischen Agens behandelt. Die DNA wird nach Isolierung chemisch fragmentiert. Anschließend erfolgt eine Amplifikation des Zielbereichs der Untersuchungen mittels einer adapterassoziierten PCR-Methode. Da aufgrund der statistisch verteilten Einzelstrangbrüche nur ein Ende für die PCR bekannt ist, müssen die Fragmente bis zu den Strangbrüchen aufgefüllt werden (Erststrangsynthese). Durch die anschließende Ligation eines doppelsträngigen Linkers bekannter Sequenz sind beide Enden bekannt und es kann eine Linker vermittelte PCR (Linker-mediated-PCR; LMPCR) folgen. Abschließend werden die Fragmente markiert. Die Fragmente werden mittels eines Sequenziergels aufgetrennt, so daß sich eine DNA-Leiter ergibt.

Bei dem Aufbau der Methodik wurden an den Arbeitsschritten

- Zellbehandlung
- Amplifikation
- Detektion

die in Tabelle 1 angegebenen Parameter verändert.

Ausgehend vom Protokoll von Mueller *et al.* wurden zur Anpassung an die verwendeten Zellen die Dimethylsulfat-(DMS)-Konzentrationen, die Inkubationszeiten und

die Temperatur der Zellbehandlung variiert. Neben dem bisher in den meisten Arbeiten verwendeten DMS wurden die Zellen auch – nach dem Protokoll von Kim und Rodgers – mit Ethylnitrosoharnstoff (ENU) kultiviert und die DNA nach Extraktion *in vitro* mit NaOH fragmentiert. Hierbei wurden ebenfalls verschiedene Konzentrationen und Zeiten untersucht (s. Tab. 1). Die Fragmentierung der DNA durch ENU/NaOH stellte sich allerdings als nur schwer reproduzierbar heraus.

Bei der Amplifikation wurden u.a. die Zugabe von DMSO, welches die Schmelztemperatur GC-reicher Sequenzen erniedrigt, zur Erststrangsynthese und die Zugabe von PEG 4000, welches aufgrund der erhöhten Gesamtteilchenzahl im Ansatz die Ligation begünstigt, zur Ligation getestet. Beide Veränderungen erhöhten die Effizienz der jeweiligen Arbeitsschritte.

Bei der Detektion der Amplifikate wurde zum einen die Extensionszeit verkürzt, um das Signal-Rausch-Verhältnis zu erhöhen, und zum anderen die Konzentration des Polyacrylamidgels erhöht, um die Auftrennung der Fragmente zu verbessern.

Eine Übersicht über die verschiedenen Variationen in der methodischen Ausführung des *in-vivo*-Footprints ist in Tabelle 1 gegeben.

Tabelle 1: Übersicht über die Optimierungsschritte bei der Etablierung des *in-vivo*-Footprints.

Arbeitsschritt	Optimierungsbereich	Ergebnis
Zellbehandlung	DMS-Konzentration [0,05-0,4% v/v] Zeit [1-4 min] Temperatur [RT oder 37°C]	0,2% [v/v] DMS 2 min 37°C
	ENU-Konzentrationen [100-500 µM] Inkubationszeit [1-3 h]	kein Ergebnis
Erststrangsynthese	DNA-Menge [1 oder 2 µg] Zugabe von DMSO [2-10% v/v]	1 µg 10% [v/v] DMSO
Ligation	Linkermenge [25 oder 100 pmol] Zugabe von PEG 4000 [mit/ohne] Zeit [1-17 h]	25 pmol Linker; 10% PEG; ≥ 1 h
LMPCR	Primer [10 oder 20 pmol] Zyklenzahl [18-35]	10 pmol je Primer; 30 Zyklen
Markierung	Zyklenzahl [1-10] Extensionszeit [5 oder 10 min] Labeling-Primer [1-10 pmol]	2 Zyklen 5 min 2,3 pmol Labeling-Primer
Elektrophorese	Gelkonzentration [6-10%]	8 % Polyacrylamid mit 8 M Harnstoff

Nach Optimierung des Versuchsprotokolls wurde die Protein-DNA-Interaktion im Sequenzbereich von -200 bis -405 in Relation zur Transkriptionsinitiationsstelle in Rat2-Zellen untersucht (Abb. 7).

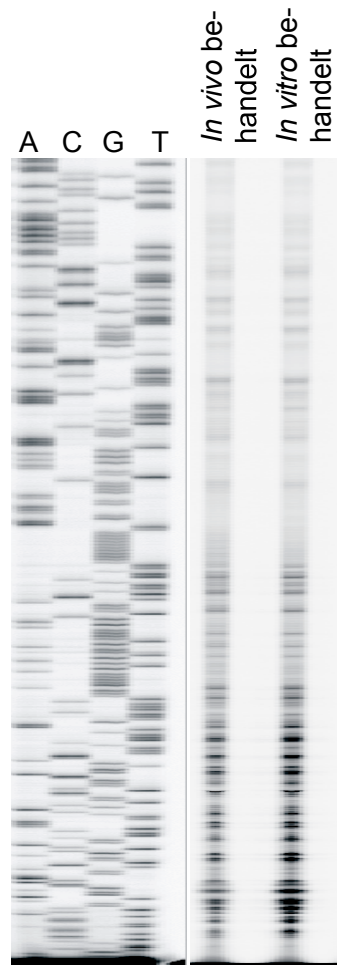


Abbildung 7: Vergleich des *in-vitro*- und *in-vivo*-methylierten 5'-flankierenden Bereich des HGF-Gens von -405 bis -200 in Relation zur Transkriptionsinitiationsstelle. Dargestellt ist ein exemplarisches Versuchsergebnis. Die mit A, C, G und T gekennzeichneten Bahnen stellen die Sequenzerspuren der jeweiligen Basen dar. Die *in vitro* behandelte DNA stellt die Kontroll-DNA dar.

Selbst nach den genannten Optimierungsschritten wurde in wiederholten Ansätzen mit verschiedenen nicht HGF-exprimierenden Zelltypen mit *in-vivo*- und *in-vitro*-behandelter DNA das gleiche Bandenmuster erhalten. Daher konnten mit Hilfe des *in-vivo*-Footprints keine Protein-DNA-Interaktionen lokalisiert werden.

3.2.2. Lokalisierung der Protein-DNA-Interaktion mit Hilfe des *in-vitro*-Footprints

In einem zweiten Ansatz zur Lokalisierung des Repressorelements zwischen -70 und -270 wurde ein *in-vitro*-Footprint verwendet. Im Gegensatz zum *in-vivo*-Footprint wurde nicht die DNA aus nicht HGF-exprimierenden Zellen bearbeitet, sondern die nukleären Proteine dieser Zellen wurden mit einem artifiziiell hergestellten DNA-Abschnitt inkubiert. Ein Restriktionsfragment, das den Bereich von -270 bis -70 abdeckte, wurde in An- und Abwesenheit nukleärer Proteinen aus Rat2-Zellen mit DNase I verdaut (Abb. 8).

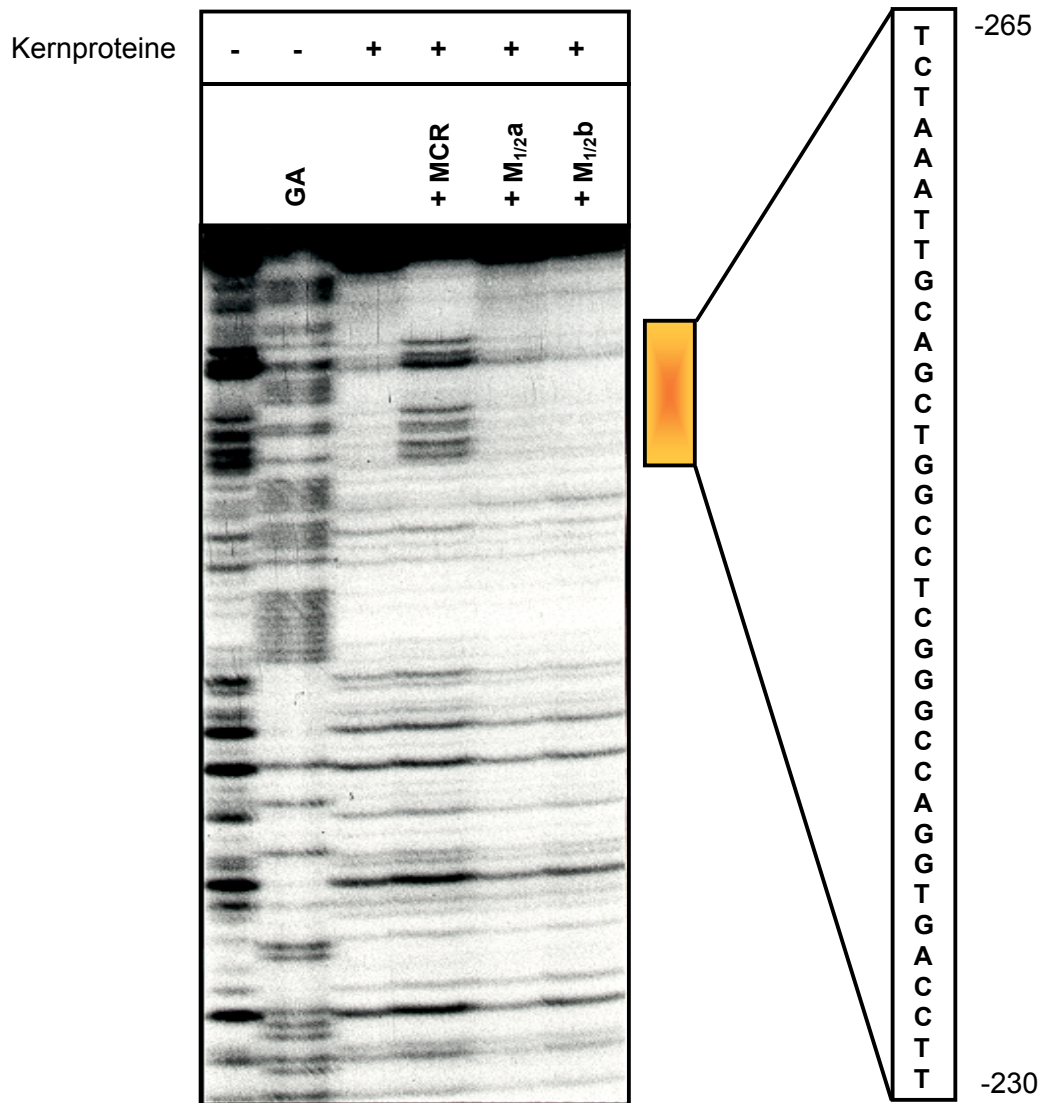


Abbildung 8: *In-vitro*-Footprint des 5'-flankierenden Bereichs des HGF-Gens von -300 bis -150. Das Autoradiogramm zeigt einen deutlichen Footprint im Bereich von -265 bis -230, der durch die Zugabe eines 300fachen Überschusses eines Dimers (MCR), welches die geschützte Region überspannt, nicht aber durch Dimere, welche nur einen Teil der MCR abdeckten (M_{1/2a} u. M_{1/2b}), aufgehoben werden konnte. Zur genauen Lokalisierung wurde eine G/A-Leiter des Bereichs nach Maxam und Gilbert [67] erstellt.

Der DNase I Footprint zeigte eine Protein-DNA-Interaktion in der Region von -265 bis -230. Diese konnte durch Zugabe eines 300fachen Überschusses eines Oligonukleotiddimers, welches die geschützte Region überspannt, aufgehoben werden. Die Zugabe von Dimeren, welche jeweils etwa die Hälfte der geschützten Region abdecken ($M_{1/2a}$ und $M_{1/2b}$), hatte hingegen keinen Effekt. Daher kann von einer spezifischen Wechselwirkung dieses Abschnitts mit Proteinen ausgegangen werden.

Eine Sequenzanalyse des lokalisierten Proteinbindungsabschnitts von -265 bis -225 zeigt, daß es sich um eine Multiconsensusregion (MCR) handelt, in der die Konsensussequenzen für eine NF1-Bindestelle, eine AP2-Bindestelle und zwei Bindestellen für HLH-LZ-Proteine (sogenannte E-Boxen) enthalten sind (Abb. 9B).

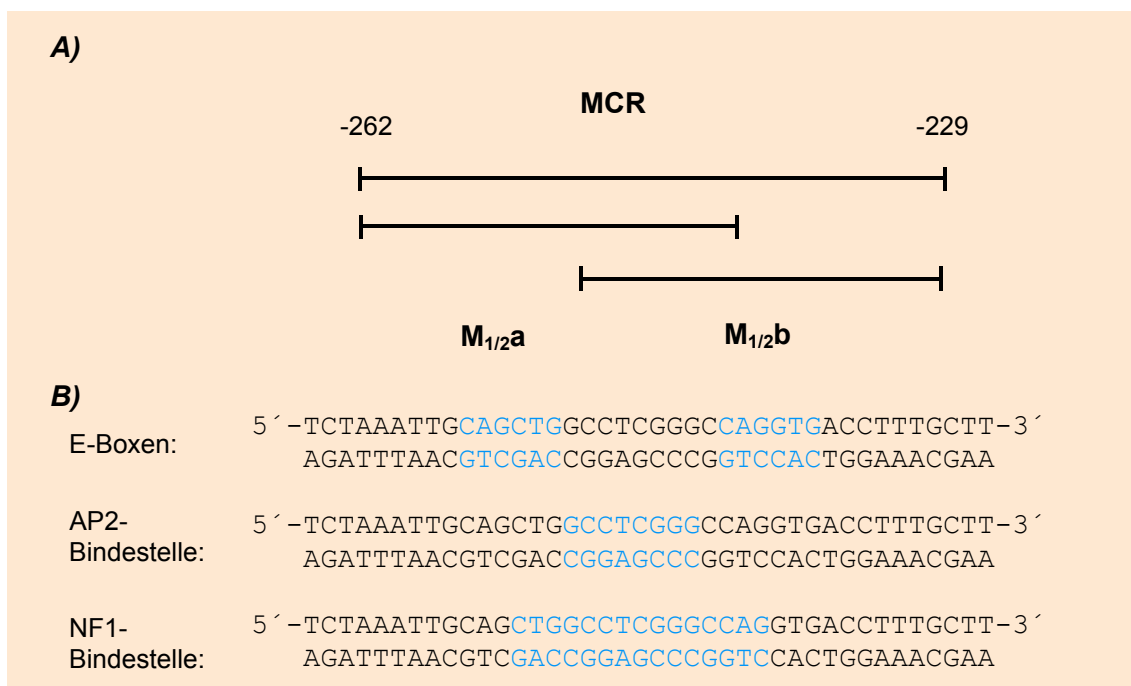


Abbildung 9: Sequenz der geschützten Region aus dem HGF-Promotor. A) Lage der zur Competition in dem in Abbildung 8 gezeigten Experiment eingesetzten Dimere. B) Sequenzanalyse des Bereichs von -265 bis -225. Blau hervorgehoben sind die Sequenzabschnitte, die den bekannten Konsensussequenzen entsprechen und die potentiell Proteine binden können.

Die geschützte Region und ihre Umgebung zeigt schon nach Augenschein eine größtenteils palindromische Sequenz. Daher ist die Ausbildung von Tertiärstrukturen in diesem Abschnitt begünstigt. Die Erstellung eines Strukturmodells des Bereichs von -316 bis -196 in Relation zur Transkriptionsinitiationsstelle mit Hilfe des Programms DNASIS (Version 2.1, Hitachi; Japan) ergab eine Schleifenstruktur über den gesamten Bereich (Abbildung 10). Die Tertiärstruktur des *sense*-Strangs wurde allerdings mit den Energiewerten für RNA berechnet und kann daher nur Tendenzen anzeigen.

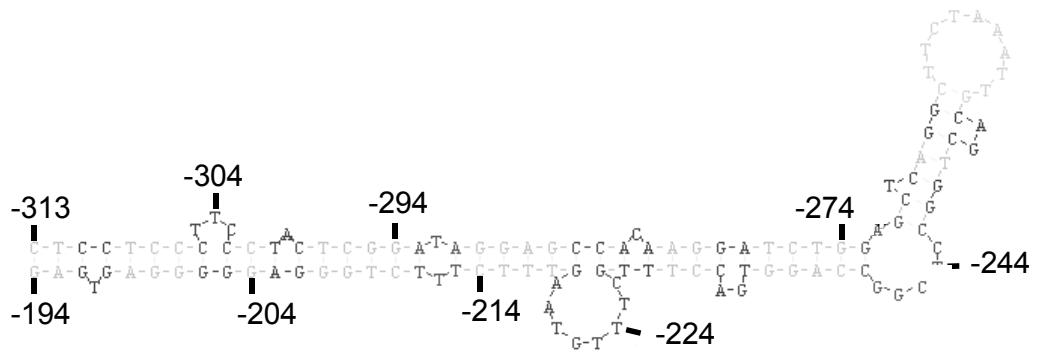


Abbildung 10: Durch das Programm DNAsis erstelltes Modell einer potentiellen Tertiärstruktur des Bereichs von -313 bis -194 des HGF-Gens. Zahlenangaben geben den Abstand zur Transkriptionsinitiationsstelle in Basenpaaren an. Das Minus zeigt an, daß dieser Bereich 5'-wärts liegt.

3.3. Spezifität und Affinität der Protein-DNA-Bindung an die Multiconsensusregion

Der im Footprint geschützte Bereich enthält mehrere mögliche Proteinbindestellen. Dies wurde auch bereits von Jiang et al. [72] und Plaschke-Schlütter et al. [73] für den Maus-HGF-Promotor beschrieben. Deshalb wurden im weiteren nukleäre Proteine auf ihr Bindungsverhalten an diese Multiconsensusregion (MCR) mittels Elektromobilityshiftassays (EMSA) untersucht.

3.3.1 Affinität der Proteinbindung an die E-Boxen

In der MCR liegen zwei sogenannte E-Boxen vor. E-Boxen sind als regulatorische Elemente in vielen Promotoren beschrieben. Sie fungieren als Bindestellen für die Transkriptionsfaktorenfamilien der HLH- und der HLH/LZ-Proteine [11]. Zur Bestimmung der Affinität der Protein-DNA-Bindung an die E-Boxen wurde das markierte MCR-Dimer mit nukleären Proteinen aus Rat2-Zellen inkubiert und versucht, mit unmarkierten Oligodimeren, welche eine der beiden oder beide E-Boxen enthalten (s. Abb. 9A), das MCR-Dimer aus den Protein-DNA-Komplexen zu verdrängen (Abb. 11).

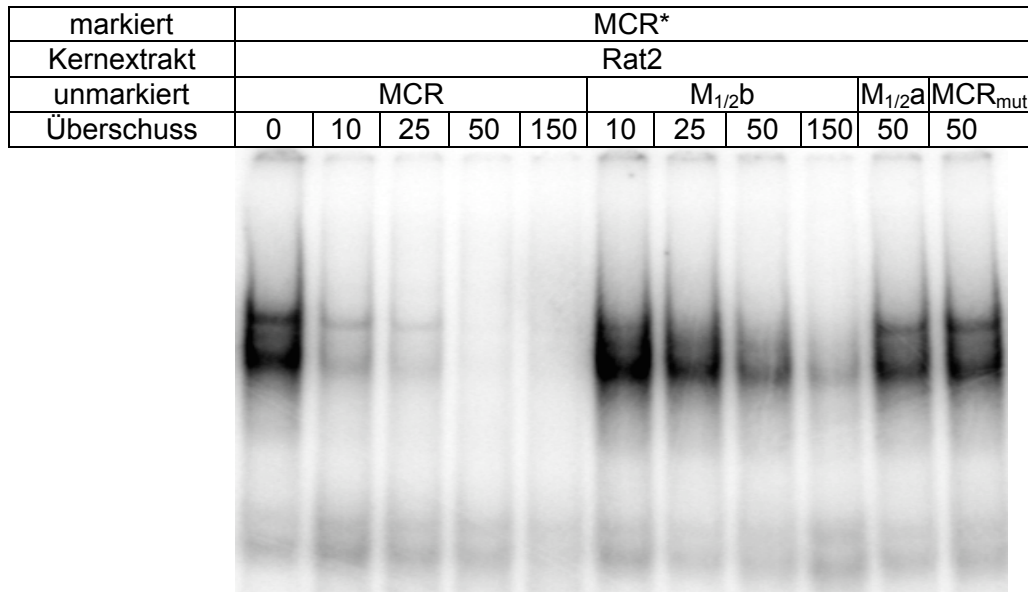


Abbildung 11: Affinität der Proteinbindung an die E-Boxen. Autoradiogramm des EMSA nach Inkubation des radioaktiv markierten MCR-Dimers (*) mit Kernextrakt aus Rat2-Zellen und einem 10-150fachen Überschuss an unmarkierten MCR- oder M_{1/2}b-Dimer bzw. einem 50fachen Überschuss an M_{1/2}a- oder MCR_{mut}-Dimer, in dem beide E-Boxen mutiert waren.

Das MCR-Dimer, das sowohl die AP2- und die NF1-Bindestelle als auch beide E-Boxen enthält, verdrängte sich selbst schon sehr stark bei der Zugabe eines 10fachen Überschusses an unmarkiertem Dimer und vollständig bei einem 50fachen Überschuss. Hingegen konnte selbst durch die Zugabe eines 150fachen Überschusses an unmarkiertem M_{1/2}b-Dimer, welches nur eine funktionelle E₁-Box enthält (s. Abb. 9), das markierte MCR-Dimer nicht vollständig aus dem Protein-DNA-Komplex verdrängt werden. Auffällig hierbei ist, daß die obere Bande bereits bei einem 10fachen Überschuss vollständig verschwunden ist, wohingegen die untere Bande nur langsam schwächer wird. Die Zugabe des 50fachen Überschusses an M_{1/2}a- bzw. MCR_{mut}-Dimer hatte nur einen sehr schwachen Effekt. Die Bindung an die E₁-Box war daher spezifisch und der höher molekulare, obere Komplex konnte der E₁-Box zugeordnet werden. Es konnte zudem in weiteren Kompetitionsversuchen gezeigt werden, daß die E₁-Box gegenüber der E₂-Box eine ca. 25fach höhere Affinität zu den Kernproteinen aufwies (Daten nicht gezeigt).

3.3.2. Affinität der Proteinbindung an die NF1-Bindestelle

Die Sequenzanalyse der MCR hatte ergeben, daß diese neben den E-Boxen auch eine Bindestelle für die NF1-Transkriptionsfaktorenfamilie enthielt. In einem weiteren Wettbewerbsversuch wurde zum einen ein Oligodimer, welches die NF1-Konsensussequenz enthält, und zum anderen ein Oligodimer, in dem die Bindestelle aus dem HGF-Promotor mutiert ist, eingesetzt. Das bereits kommerziell erhältliche und etablierte Oligodimer wurde eingesetzt, weil die NF1-Bindestelle im HGF-Promotor die AP2-Bindestelle und mit den Randsequenzen auch die E-Boxen überlappt (s. Abb. 9B). Zum Vergleich wurde mit dem 100fachen Überschuss an $M_{1/2b}$ -Dimer verdrängt (Abb. 12).

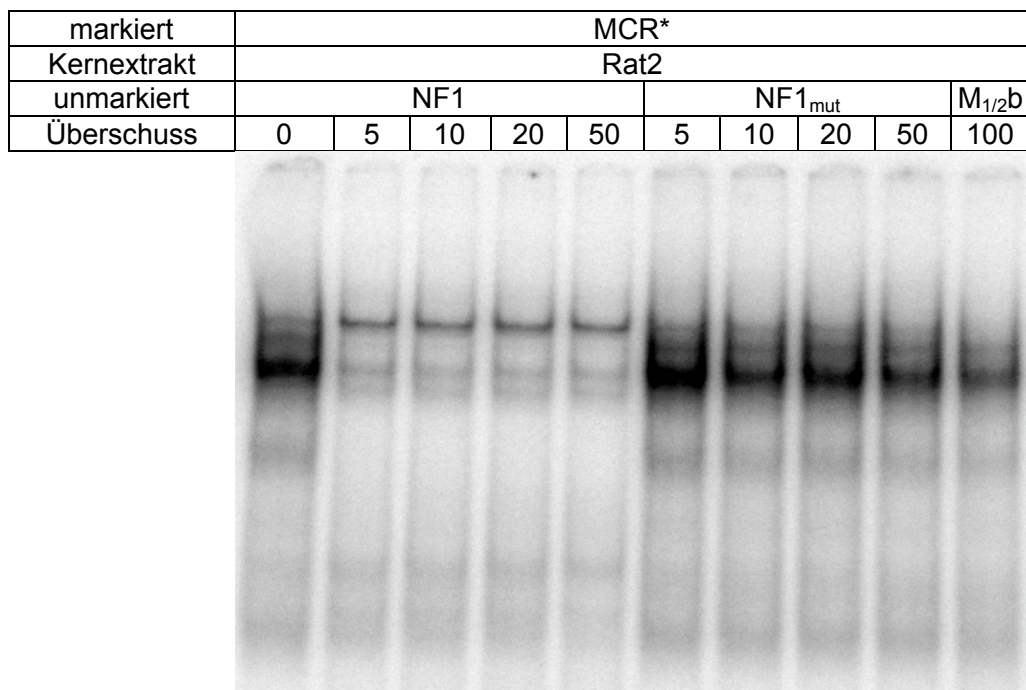


Abbildung 12: Affinität der Proteinbindung an die NF1-Bindestelle. Autoradiogramm des EMSA nach Inkubation des radioaktiv markierten MCR-Dimers (*) mit Kernextrakt aus NIH3T3-Zellen und einem 5-50fachen Überschuss an unmarkierten NF1- oder NF1_{mut}-Dimer bzw. einem 100fachen Überschuss an $M_{1/2b}$ -Dimer.

Wie in Abbildung 12 gezeigt, wird der kleinere (untere) Protein-DNA-Komplex schon bei Zugabe eines 5fachen Überschusses der NF1-Konsensussequenz verdrängt, während der größere (obere) Komplex durch die Zugabe des Dimers eher verstärkt wird. Ein grösserer Überschuss hat keine weitere Wirkung. Bei Einsatz des NF1_{mut}-Dimers kommt es hingegen zu keiner Verdrängung. Die Proteinbindung an der MCR umfasst somit auch eine mögliche, spezifische Wechselwirkung von Faktoren aus der NF1-Familie.

3.3.3. Untersuchung der Protein-DNA-Bindung an die AP2-Bindestelle

Die MCR wies neben den E-Boxen und der NF1-Bindestelle auch eine Bindestelle für die Familie der AP2-Transkriptionsfaktoren auf. Da Mutationen in der AP2-Bindestelle aufgrund der Überschneidung auch die NF1-Bindestelle betroffen hätten (s. Abb. 9B), wurde zur Untersuchung einer möglichen Bindung an die AP2-Bindestelle wiederum ein kommerziell erhältliches Oligodimer mit der AP2-Konsensussequenz eingesetzt. In einem Kompetitionsversuch wurde das markierte MCR-Dimer mit diesem Oligodimer oder einem Oligodimer, in dem die Bindestelle aus dem HGF-Promotor mutiert ist, koinkubiert (Abb. 13).

markiert	MCR*					
Kernextrakt	Rat2					
unmarkiert	AP2			MCR	NF1 _{mut}	AP2 _{mut}
Überschuss	0	20	100	100	100	100

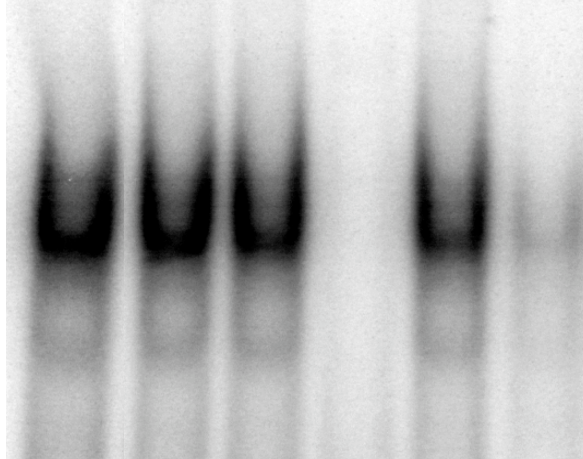


Abbildung 13: Untersuchung der Proteinbindung an die AP2-Bindestelle. Autoradiogramm des EMSA nach Inkubation des radioaktiv markierten MCR-Dimers (*) mit Kernextrakt aus Rat2-Zellen und einem 20- und 100fachen Überschuss an unmarkierten AP2- oder AP2_{mut}-Dimer bzw. einem 100fachen Überschuss an MCR- oder NF1_{mut}-Dimer.

Es konnte keine Verdrängung des markierten MCR-Dimers durch einen Überschuss des unmarkierten AP2-Dimers beobachtet werden. Dies konnte mit Kernextrakten aus anderen Zellen (u.a. LF-CL2A, NIH3T3 und U87MG) bestätigt werden. Somit scheint AP2 nicht an dem Protein-DNA-Komplex an der MCR beteiligt zu sein oder die potentielle Bindestelle entspricht nicht ausreichend der Konsensussequenz, um nachweisbar AP2 zu binden.

3.4. Untersuchung der Bindungspartner der MCR-Bindungselemente

Mit Hilfe der Kompetitionsversuche konnte der langsamere und somit grössere Protein-DNA-Komplex der E₁-Box und der schnellere (kleinere) Komplex der NF1-Bindestelle zugeordnet werden. Um nun die Bindungspartner der einzelnen Bindungselemente zu charakterisieren und identifizieren, wurden verschiedene Antikörper zu den Proben zugegeben und Supershiftanalysen durchgeführt. Zur Absicherung der in der Supershiftanalyse gefundenen Transkriptionsfaktoren wurden diese rekombinant exprimiert und im EMSA eingesetzt.

3.4.1. Beteiligung von NF1- und AP2-Transkriptionsfaktoren an dem MCR-Proteinbindungskomplex

Aufgrund der erfolgreichen Verdrängung des niedermolekularen Komplexes an der MCR durch ein Oligodimer, welches die NF1-Konsensussequenz enthält, wurde der Protein-DNA-Komplex in Supershiftanalysen untersucht. Trotz dieser Verdrängung konnte keine der bekannten NF1-Isoformen mit Hilfe eines Antikörpers im Protein-DNA-Komplex an der MCR nachgewiesen werden. Auch nach Einsatz von Kernextrakten aus verschiedenen Zelltypen konnte in keinem der Protein-DNA-Komplexe NF1 per Supershiftanalyse beobachtet werden (Daten nicht gezeigt). Möglicherweise handelt es sich bei dem verdrängten Protein um einen Transkriptionsfaktor, der zur NF1-Familie gehört, aber mit dem vorhandenen Antikörper nicht reagiert.

Ebenso wie in den Verdrängungsversuchen konnte mittels Supershiftanalyse kein Hinweis auf eine Beteiligung von AP2 oder eines verwandten Faktors in den Protein-DNA-Komplexen verschiedener Kernextrakte an der MCR gefunden werden (Daten nicht gezeigt). Daher scheint kein Mitglied der AP2-Familie beim Zustandekommen der Protein-DNA-Komplexe an der MCR eine Rolle zu spielen.

3.4.2. Bindung von HLH/LZ-Faktoren an die E-Boxen

Als Konsensus für die meisten HLH-Faktoren ist die Core-Sequenz CANNTG ermittelt worden, für die Proteinbindungsspezifität spielen aber auch die direkt benachbarten Basen eine Rolle [74]. Als häufigste Zielsequenz für HLH/LZ-Proteine wurde CACGTG beschrieben, daneben sind allerdings auch verwandte Sequenzen als Bindestellen möglich [75]. Die HLH-Proteine werden in drei Klassen (A, B, C) eingeteilt [76]. Die als reprimierend wirkenden HLH-Proteine der Klasse C wurden nicht näher

untersucht, da sie an sogenannte N-Boxen binden, die den E-Boxen ähneln (CACGCG/CACGAG) [76]. Die Transkriptionsfaktoren der Klasse A, die HLH-Proteine wie z.B. MyoD, Mash1 und E2A, gelten als aktivierende Faktoren [76]. Für die HLH/LZ-Proteine der Klasse B wie z.B. c-Myc, USF1 und TFE3 sind sowohl supprimierende als auch aktivierende Einflüsse auf die Genexpression bekannt [77].

Für die Analyse des Protein-DNA-Komplexes an der E₁-Box wurden Antikörper gegen die ubiquitären HLH/LZ-Proteine c-Myc, USF1 und TFE3, die HLH-Klasse-A-Transkriptionsfaktoren E12/E47 (E2A) und – als Kontrolle – die Antikörper gegen Myb und Mef2, welche nicht an diese Sequenz binden können, eingesetzt (Abb. 14).

Das HLH/LZ-Protein c-Myc ein Schlüssel-molekül bei der Regulierung des Zellzyklus und spielt bei der Proliferation und Transformation verschiedener Zelltypen eine Rolle [78]. C-Myc bindet die DNA als Heterodimer mit Max und hat einen überwiegend stimulierenden Effekt auf die Transkription seiner Zielgene [78]. USF liegt in den meisten Zellen als Heterodimer aus USF1 und USF2 vor [79]. USF ist als Antagonist von c-Myc/Max beschrieben, ist unter anderem aber auch in der embryonalen Entwicklung von Bedeutung [80]. TFE3 hat ebenso wie c-Myc zumeist eine stimulierende Wirkung, so z.B. beim Prothymosin- α -Promotor und beim IgH-Enhancer [81].

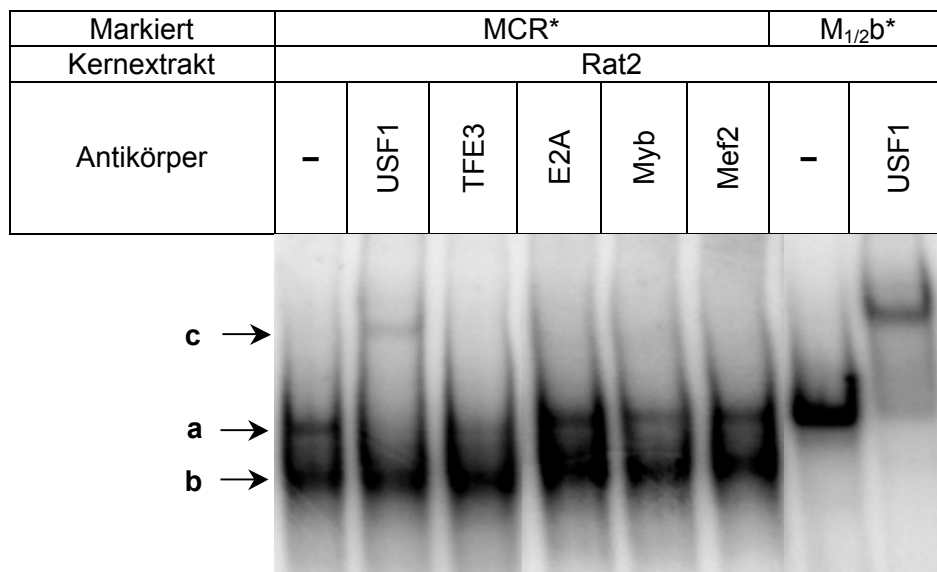


Abbildung 14: Supershiftanalyse der Protein-DNA-Komplexe am MCR-Dimer und am M_{1/2}b-Dimer. Autoradiogramm des EMSA nach Inkubation des radioaktiv markierten MCR- oder des M_{1/2}b-Dimers (*) mit Kernextrakt aus Rat2-Zellen und den angegebenen Antikörpern. a: Protein-DNA-Komplex an der E₁-Box, b: Protein-DNA-Komplex an der NF1-Box, c: USF1-Supershift des höher molekularen Protein-E₁-Box-Komplexes.

Der Vergleich des MCR-Dimers mit dem M_{1/2}b-Dimer zeigt, daß bei dem M_{1/2}b-Dimer nur die obere Bande ausgebildet wird (vgl. Abb. 14: MCR- bzw. M_{1/2}b-Dimer ohne Antikörperzugabe). Die Zugabe eines Antikörpers gegen USF1 ergab einen

Supershift des höhermolekularen Protein-DNA-Komplex, der der E₁-Box zuzuordnen ist. Bei Zugabe eines Antikörpers gegen TFE3 wurde der Protein-DNA-Komplex an der E₁-Box aufgelöst. Somit konnten mittels Antikörperzugabe USF1 und TFE3 im Protein-DNA-Komplex an der E₁-Box nachgewiesen werden. Dagegen waren sowohl die HLH-Proteine E12/E47 als auch c-Myc (Daten nicht gezeigt) nicht im Protein-DNA-Komplex an der E1-Box vorhanden.

3.4.3. Bindung rekombinant exprimierter Proteine an die E-Boxen

Die Identität der an die E-Boxen bindenden Proteine wurde weitergehend durch rekombinante Expression der im Supershift gefundenen HLH-LZ-Proteine USF1 und TFE3 untersucht.

Dazu wurde zum einen TFE3 *in vitro* mittels T3-RNA-Polymerase transkribiert und in Kaninchenreticulocytenlysate translatiert (s. 2.2.1.11.). Als Kontrolle wurde Reticulocytenlysate ohne exprimiertes TFE3 verwendet. Zum anderen wurde eine Variante von USF1, die die DNA-Bindungsdomäne, aber nicht die Transaktivierungsdomäne enthält (s. Abb.18c), in *E.Coli* exprimiert (USF1•His-Tag; s. 2.2.1.12.). Aufgrund der Kopplung an ein His-Tag konnte es über eine mit Nickelionen beladene Säule aufgereinigt werden. Die Reinheit des USF1•His-Tag wurde mittels SDS-Page mit anschließender Ponceau-Färbung und die Identität mittels immunochemischen Nachweis kontrolliert (Daten nicht gezeigt).

Die rekombinant exprimierten Proteine wurden anschliessend im EMSA mit verschiedenen, die E-Boxen beinhaltenden Dimeren eingesetzt. Die Bindung von USF1 und TFE3 an das MCR-Dimer ist in Abbildung 15 dargestellt.

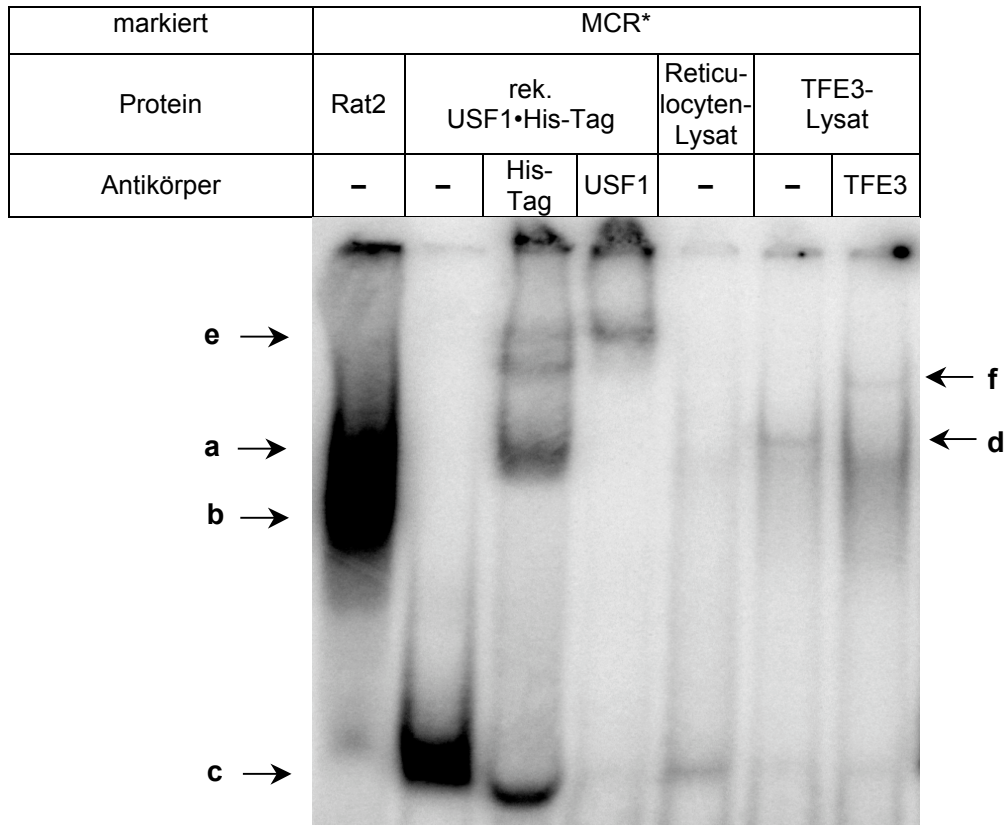


Abbildung 15: Bindung von rekombinant exprimiertem USF1•His-Tag und TFE3 an das MCR-Dimer. Autoradiogramm eines EMSA nach Inkubation des radioaktiv markierten MCR-Dimers (*) mit rekombinant exprimierten USF1•His-Tag- und TFE3-Proteinen. Nukleäre Proteine der Zelllinie Rat2 dienten als Positivkontrolle. Das für die Translation des TFE3 verwendete Reticulocytenlysate diente als Negativkontrolle. *a + b*: Protein-DNA-Komplexe von nukleären Proteinen aus Rat2 an das MCR-Dimer, *c*: USF1•His-Tag-DNA-Komplex, *d*: TFE3-DNA-Komplex, *e*: Supershift mit USF1-Antikörper, *f*: Supershift mit TFE3-Antikörper.

Die Bindung des rekombinant exprimierten USF1•His-Tag ist in Abbildung 15 deutlich zu sehen. Die höhere Laufgeschwindigkeit im Vergleich zum USF1 aus dem Rat2-Kernextrakt erklärt sich aus der geringeren Grösse des USF1•His-Tag. Denn die eingesetzte USF1-Variante war aufgrund der fehlenden Transaktivierungsdomäne kleiner als das Vollängen-USF1. Mittels spezifischer Kompetition durch unmarkiertes MCR-Dimer konnte gezeigt werden, daß diese Bindung spezifisch ist (Daten nicht gezeigt). Parallel wurde die Affinität der Bindung des USF1•His-Tag an die die E-Boxen enthaltenden Dimere bestimmt. USF1•His-Tag band ebenso an das M_{1/2}b-Dimer und – wenngleich auch deutlich schwächer – an das M_{1/2}a-Dimer.

Für das rekombinant exprimierte TFE3 konnte eine schwache, aber deutlich ausgeprägte Bindung an das MCR-Dimer gezeigt werden. Zudem konnte das rekombinant exprimierte TFE3 mittels Antikörperzugabe als Supershift identifiziert und bestätigt werden, daß in den Supershift-Ergebnissen mit nukleären Proteinen verschiedener Zelltypen TFE3 als Bindungspartner identifiziert wurde.

3.4.4. Zelltypspezifische Proteinbindung von USF1 und TFE3 an die E-Boxen

Die Ergebnisse des transkriptionellen Regulationsvermögens des 5'-flankierenden HGF-Bereichs und die Bindungslokalisation legen dar, daß die MCR-Domäne als Repressorelement in nicht HGF-exprimierenden Zellen in Frage kommt. Daher wurden zur Untersuchung, ob die Bindung zelltypspezifisch stattfindet oder die Zusammensetzung der Protein-DNA-Komplexe zelltypspezifisch divergiert, zusätzlich zu den bisher eingesetzten nicht HGF-exprimierenden verschiedene HGF-exprimierende Zelllinien herangezogen.

Aus Studien der Monozytenentwicklung war bekannt, daß die monozytäre Vorläuferzelllinie KG1 HGF exprimiert [82]. Ebenfalls hatten Vorarbeiten an der embryonalen Lungenfibroblasten-Zelllinie FH109 gezeigt, daß sie HGF exprimieren [83]. Als weitere HGF-exprimierende Zelltypen wurden die Glioblastoma-Zelllinien U87MG und U138MG eingesetzt [84, 85].

Es wurden zum einen das MCR- und zum anderen das M_{1/2}b-Dimer, welches die E₁-Box enthält, mit den Kernextrakten aus den verschiedenen Zellen und den Antikörpern gegen USF1 und TFE3 inkubiert (Abb. 16 und 17).

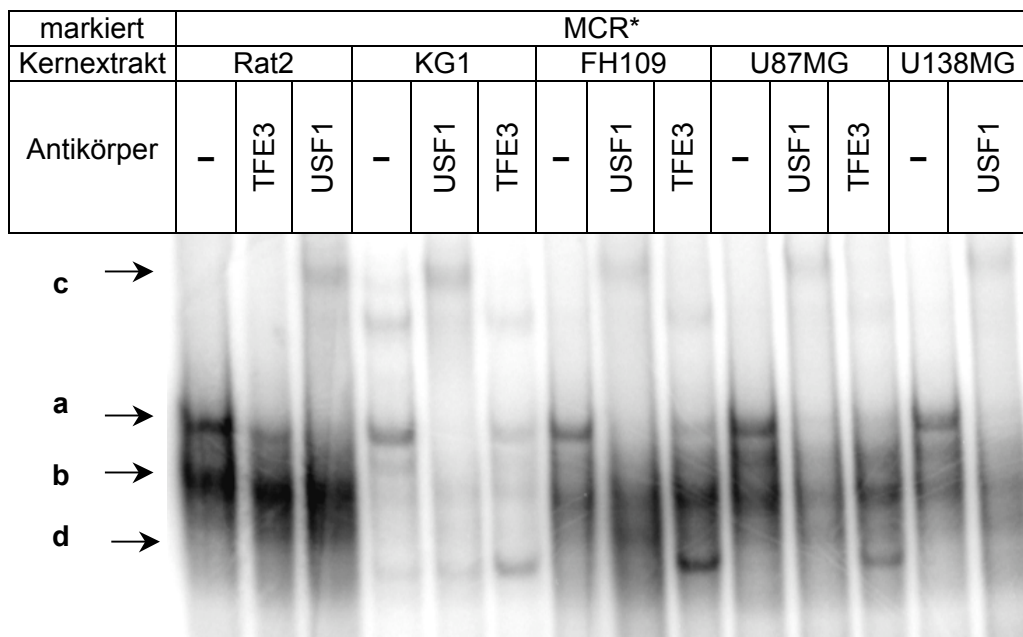


Abbildung 16: Zelltypspezifische Bindung von USF1 und TFE3 an das MCR-Dimer. Autoradiogramm eines EMSA nach Inkubation des radioaktiv markierten MCR-Dimers (*) mit Kernextrakten aus verschiedenen Zelltypen (Rat2, KG1, FH109, U87MG und U138MG) und Antikörpern gegen USF1 oder TFE3. *a*: Protein-DNA-Komplex an der E₁-Box, *b*: nicht identifizierter Protein-DNA-Komplex an der NF1-Bindestelle, *c*: Supershift mit USF1-Antikörper, *d*: Downshift mit TFE3-Antikörper.

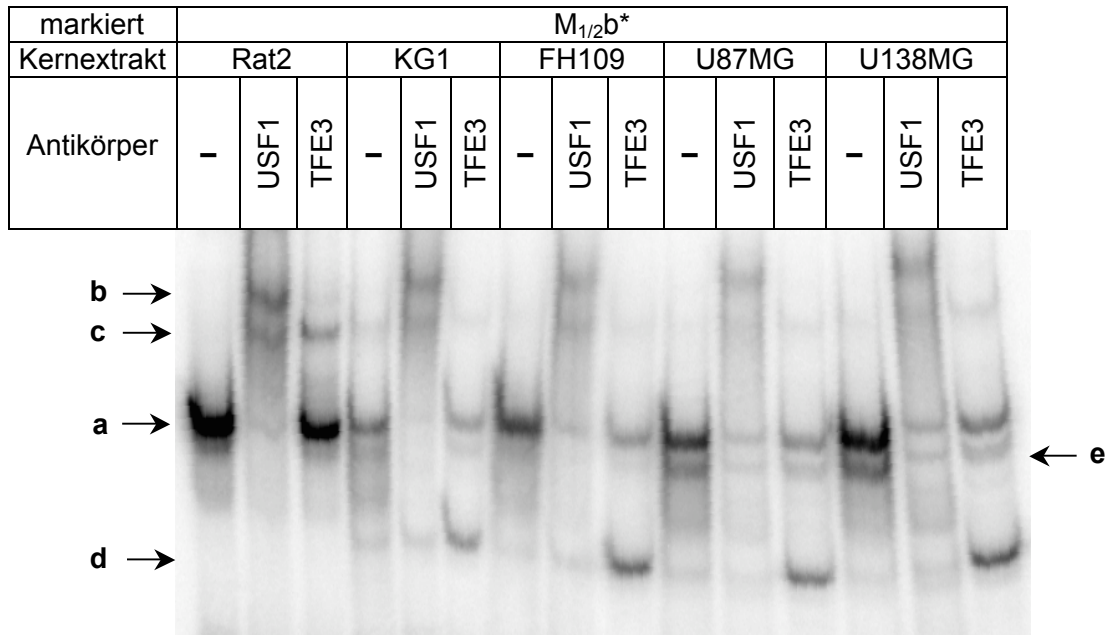


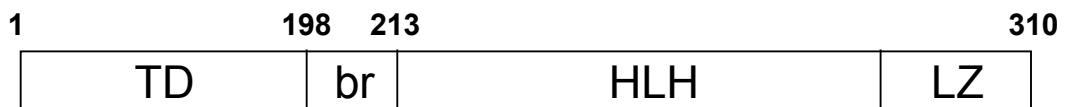
Abbildung 17: Zellspezifische Bindung von USF1 und TFE3 an das M_{1/2}b-Dimer. Autoradiogramm eines EMSA nach Inkubation des radioaktiv markierten M_{1/2}b-Dimers (*) mit Kernextrakten aus verschiedenen Zelltypen (Rat2, KG1, FH109, U87MG und U138MG) und Antikörpern gegen USF1 oder TFE3. a: Protein-DNA-Komplex an der E₁-Box, b: Supershift mit USF1-Antikörper, c: Supershift mit TFE3-Antikörper, d: Downshift mit TFE3-Antikörper, e: Glioblastom-spezifischer Protein-DNA-Komplex.

Die Ausbildung der Protein-DNA-Komplexe differiert bei beiden Dimeren zwischen HGF-exprimierenden Zellen (KG1, FH109, U87MG, U138MG) und den nicht HGF-exprimierenden Rat2-Zellen. So bildet sich bei dem MCR-Dimer bei den HGF-exprimierenden Zellen vornehmlich der höher molekulare Komplex (Bande a) aus. Daneben konnte bei den Glioblastomzelllinien am M_{1/2}b-Dimer ein zweiter Komplex beobachtet werden. Die Zugabe eines TFE3-Antikörpers zeigte bei den HGF-exprimierenden Zellen eine Verschiebung des Komplexes zu einer geringeren Größe („Downshift“). Bei den Rat2-Zellen konnte stattdessen bei dem M_{1/2}b-Dimer ein Supershift beobachtet werden, während es bei dem MCR-Dimer nur zu einer partiellen Auflösung des Komplexes, der der E₁-Box zugeordnet werden konnte, kam. USF1 hingegen konnte mittels Supershift in den Kernextrakten aus allen Zelllinien nachgewiesen werden.

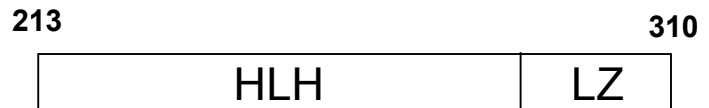
3.5. Einfluss der HLH-LZ-Proteinen USF1 und TFE3 auf die Promotoraktivität

Nachdem die HLH/LZ-Proteine USF1 und TFE3 als Bindungspartner der (vgl. 3.4.2. und 3.4.3.) E-Boxen identifiziert wurden, wurde ihre funktionelle Bedeutung für die Promotoraktivität untersucht. Die DNA-Bindung des Transkriptionsfaktors USF1 wird über die sogenannte „basic region“ vermittelt (Abb. 18) [86].

a) USF1-Volllängenkonstrukt:



b) USF BD-Deletionskonstrukt:



c) USF TD-Deletionskonstrukt:

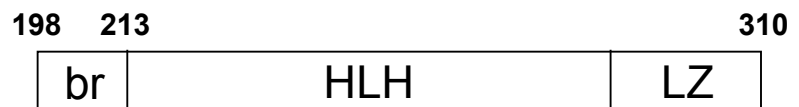


Abbildung 18: Schematische Darstellung der in den Versuchen eingesetzten USF1-Varianten. Das Diagramm zeigt die verschiedenen, in den Versuchen eingesetzten USF1-Varianten (a-c). Angegeben sind die verschiedenen Domänen mit ihren Start- und Endpunkten entsprechend der Aminosäuresequenz des Volllängenkonstrukts (a). TD: Transaktivierungsdomäne, br: „basic region“ (DNA-Bindedomäne), HLH: Helix-Loop-Helix-Domäne, LZ: Leucin-Zipper-Domäne.

Der Einfluß von USF1 wurde untersucht, indem die kodierenden Regionen von USF1 und einer nicht DNA-bindungs- aber proteininteraktionsfähigen Variante (USF \square BD) (s. Abb. 18b) in Expressionsplasmide inkloniert wurden. Diese Expressionsplasmide wurden mit den Deletionskonstrukten aus dem HGF-Promotor in NIH3T3-Zellen kotransfiziert und die CAT-Aktivitäten nach 2 Tagen Inkubation gemessen (Abb. 19).

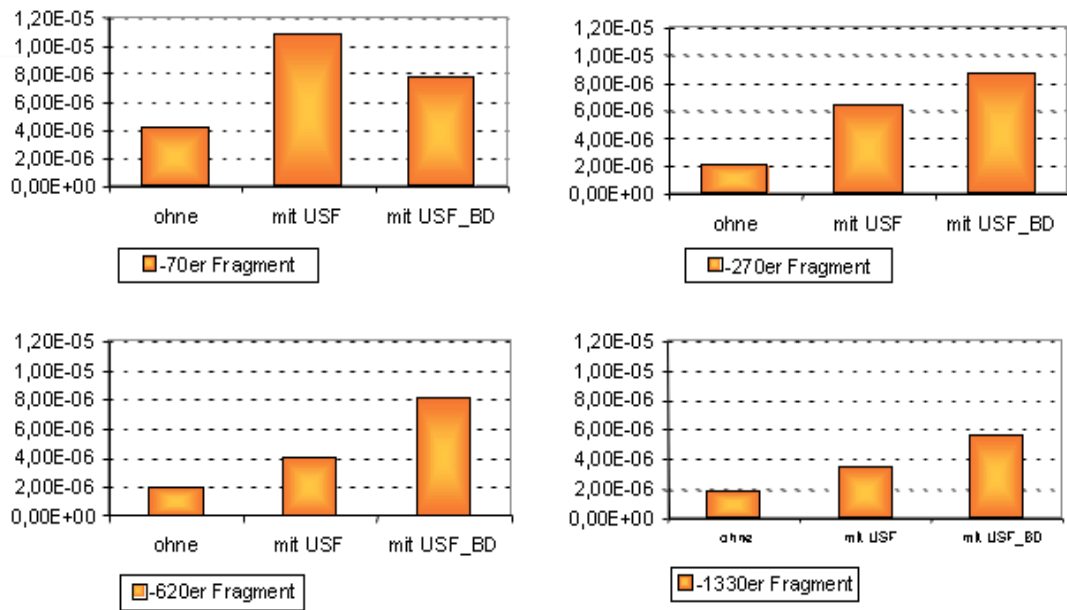


Abbildung 19: Beeinflussung der CAT-Aktivitäten der einzelnen Promotorfragmente durch USF und der nicht DNA-bindungsfähigen Variante USF□BD. Das CAT-Reportergen wurde unter Kontrolle verschiedener Abschnitte des HGF-Promotors (s. jeweilige Legende) gestellt und mit und ohne USF bzw. einer nicht DNA-bindungsfähigen Variante USF□BD in NIH3T3-Zellen transfiziert. Nach 2 d Inkubation wurde die CAT-Aktivität gemessen und gegen die Luciferasekontrollwerte - ausgehend vom kotransfizierten Kontrollvektor pGL3-CMV - normalisiert.

Die rekombinante Expression von USF1 bzw. USF□BD in NIH3T3-Zellen führte zu einer Zunahme der Reporterexpression für alle Deletionskonstrukte aus dem 5'-flankierenden HGF-Bereich. Da aber die Reporterwerte des Kontrollvektors pGL3-CMV ebenfalls von der rekombinanten Expression der USF-Varianten beeinflusst wurden, wurden weitere Kontrollvektoren mit anderen Promotoren bzw. einem anderen Reportergen in den Transfektionen eingesetzt und deren Beeinflussung durch USF bzw. USF□BD untersucht (Abb. 20).

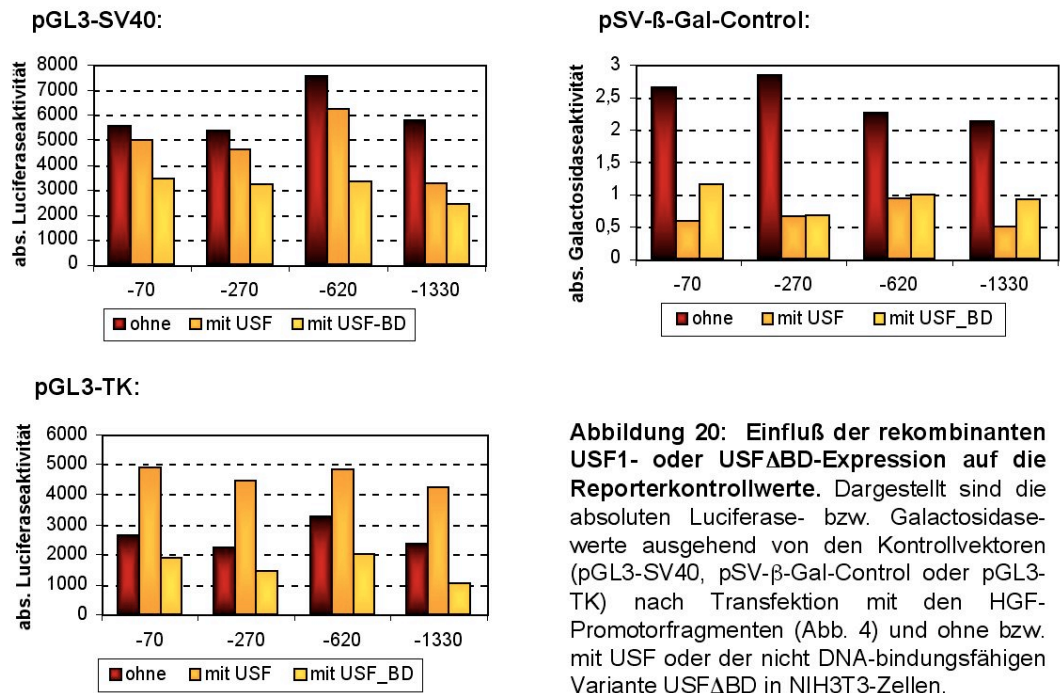


Abbildung 20: Einfluß der rekombinanten USF1- oder USF Δ BD-Expression auf die Reporterkontrollwerte. Dargestellt sind die absoluten Luciferase- bzw. Galactosidasewerte ausgehend von den Kontrollvektoren (pGL3-SV40, pSV- β -Gal-Control oder pGL3-TK) nach Transfektion mit den HGF-Promotorfragmenten (Abb. 4) und ohne bzw. mit USF oder der nicht DNA-bindungsfähigen Variante USF Δ BD in NIH3T3-Zellen.

Ebenso wie bei dem pGL3-CMV-Vektor trat bei den Vektoren pGL3-SV40, pGL3-TK und pSV- β -Gal-Control eine Beeinflussung der Reporteraktivität des Kontrollvektors durch die rekombinante USF-Expression auf. Da die Beeinflussung der Reporterwerte bei allen Kontrollvektoren auftrat, kann hier auf einen Effekt durch Interaktion mit in den Promotoren enthaltenen E-Boxen geschlossen werden konnte. Es konnte daher der mögliche Einfluß von rekombinant exprimiertem USF1 bzw. USF Δ BD nicht direkt bestimmt werden. Um die Beeinflussung des Kontrollvektors aus den Berechnungen der Promotoraktivitäten zu eliminieren, wurden die einzelnen berechneten Aktivitäten zusätzlich auf die Werte des Core-Promotors bezogen, weil dieser die MCR und mit ihr die E-Boxen nicht enthält (Abb. 21)

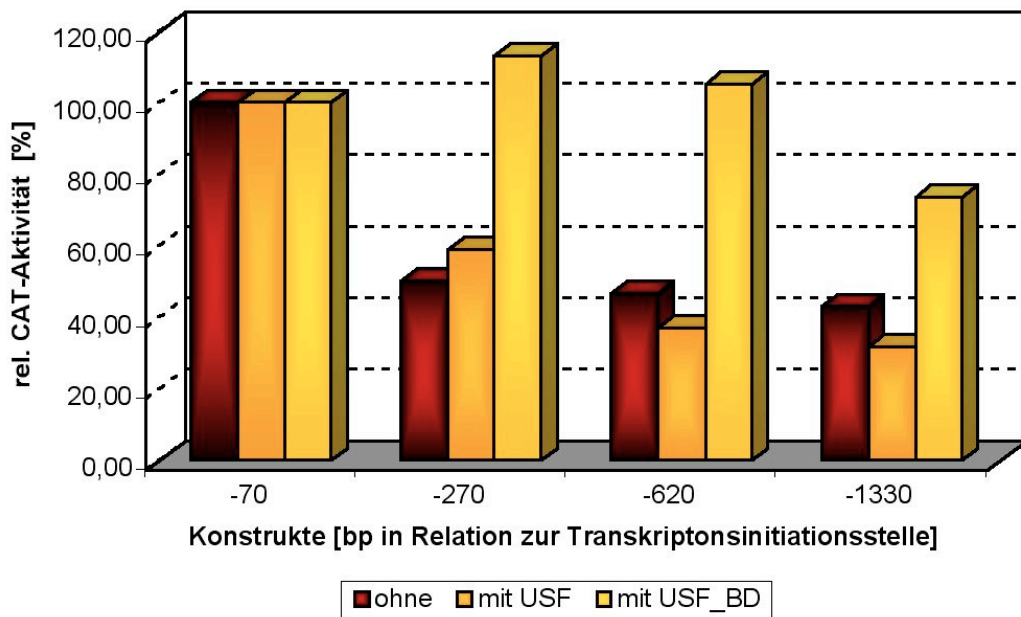


Abbildung 20: Einfluss von Vollängen-USF1 und der nicht DNA-bindungsfähigen Variante (USF \square BD) auf die Promotoraktivität der Deletionskonstrukte aus dem HGF-Promotor. Die - ausgehend von den Deletionskonstrukten (Abb. 4) - erhaltenen Reporteraktivitäten wurden jeweils auf die Aktivität des -70er-Konstrukts bezogen.

Nachdem der Einfluß von USF1 bzw. der deletierten Variante USF \square BD auf die Bezugswerte berücksichtigt wurde, belegen die Reporteraktivitäten, daß USF die Regulation der Reporterexpression durch den 5'-flankierenden HGF-Bereich nicht beeinflusst. Die rekombinante Expression von USF \square BD hob hingegen die Repression des Reporters durch das -270er Fragment und das -620er Fragment vollständig und durch das -1330er Fragment zumindest teilweise auf. Die anderen zusätzlich eingesetzten Kontrollvektoren belegten die Aufhebung der Repression durch USF \square BD (Daten nicht gezeigt).

Daher konnte gezeigt werden, daß eine erhöhte Expression von USF keinen Einfluß auf die transkriptionelle HGF-Regulation hat und auch nicht die reprimierende Aktivität der MCR beeinflusst. Dagegen führt die rekombinante Expression der USF \square BD-Variante, die die DNA und damit die MCR nicht zu binden vermag, zur Aufhebung der reprimierenden Wirkung der MCR.

Da TFE3 in den EMSA-Versuchen (s. 3.4.2. und 3.4.3.) ebenfalls als Bindungskandidat der MCR identifiziert wurde, wurde das Regulationsvermögen des 5'-flankierenden HGF-Bereichs nach rekombinanter TFE3-Expression analysiert. Nach Kotransfektion der Deletionskonstrukte mit einem TFE3-Expressionsplasmid (TFE3-pUT-SV1) bzw. dem entsprechenden Leervektor (pUT-SV1) konnte kein über die Wir-

kung des Leervektors hinausgehender Effekt des TFE3-Expressionsplasmids auf die CAT-Aktivitäten in NIH3T3 beobachtet werden. Somit hat TFE3 keinen Einfluss auf die Promotortätigkeit der Deletionskonstrukte (Daten nicht gezeigt).

3.6. Einfluss der einzelnen Bindeelemente auf die Promotoraktivität

In den dargelegten EMSA-Studien wurde eine USF-Proteinbindung an die E₁-Box der MCR gezeigt. Daneben konnte eine Bindung von rekombinant exprimiertem USF1 an die E₂-Box beobachtet werden. Die Reporterstudien mit rekombinant exprimiertem USF1 und der USF_BD-Variante sprechen für eine Beeinflussung der HGF-Regulation durch USF1, die allerdings möglicherweise durch Proteininteraktion mit Komplexpartnern der MCR verursacht wird. Als weitere Komplexpartner an der MCR kommen an die E₂-Box gebundenes USF1 (vgl. 3.4.3.) und ein Protein der NF1-Familie (vgl. 3.3.2.) in Frage. Für die AP2-Bindestelle konnte *in vitro* kein Hinweis für eine Beteiligung an den Protein-DNA-Komplexen gefunden werden (vgl. 3.3.3. u. 3.4.1.).

Zur Untersuchung welchen Einfluss die verschiedenen Bindestellen der MCR auf die Promotoraktivität besitzen, wurden daher Mutationen in die einzelnen Elemente eingebracht und die Promotoraktivitäten der mutierten -270er Fragmente mit denen der Wildtypfragmente verglichen (Abb. 22).

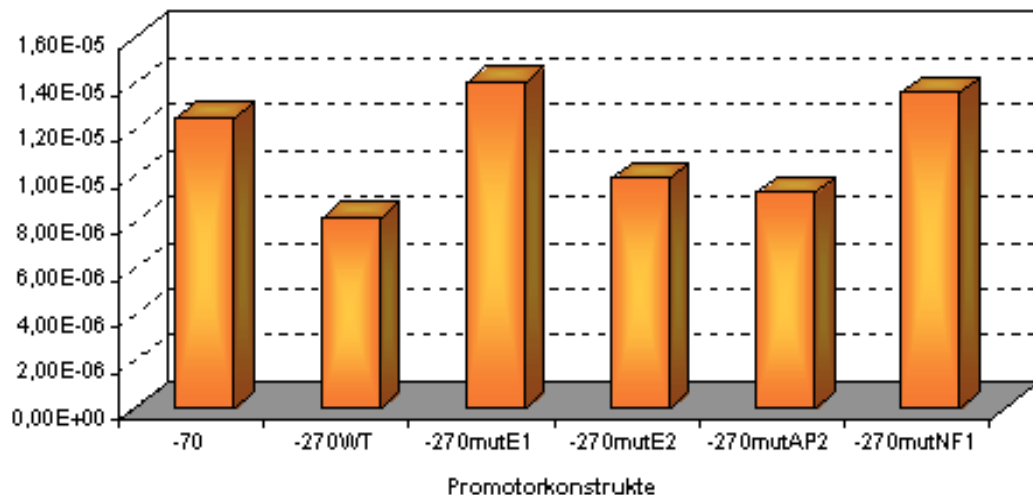


Abbildung 21: Einfluss der einzelnen Elemente der Multiconsensusregion auf die Promotoraktivität des -270er Fragments aus dem HGF-Promotor. WT: Wildtyp. Das CAT-Reportergen wurde unter Kontrolle verschiedener HGF-Promotorkonstrukte mit und ohne Mutation in den einzelnen Bindungselementen (mutE1, mutE2, AP2 bzw. NF1) gestellt und in NIH3T3-Zellen transfiziert. Nach 2 d Inkubation wurde die CAT-Aktivität gemessen und gegen die Luciferasekontrollwerte normalisiert.

Es zeigte sich, daß die Mutation der E₁-Box oder der NF1-Bindestelle zu einer erhöhten Reporteraktivität gegenüber dem Wildtypkonstrukt führte, während eine Mutation der AP2-Bindestelle oder der E₂-Box keinen Einfluß auf die Reporteraktivität hatte.

3.7. Beeinflussung der Promotoraktivität mutierter Deletionskonstrukte durch USF1 oder eine nicht DNA-bindungsfähige USF1-Variante

Da die Mutation der E₁-Box bzw. der NF1-Bindestelle die hemmende Wirkung der MCR aufzuheben vermochte, eine Mutation der E₂-Box bzw. der AP2-Bindestelle keine Veränderung der Reporteraktivität erbrachte, wurde der Einfluss der verschiedenen Mutationen auf das Zusammenspiel der MCR mit kotransfizierten USF-Konstrukten untersucht. Da bereits gezeigt werden konnte, daß USF1 und USF_{BD} die Kontrollvektoren maßgeblich beeinflussen, wurden entsprechend den Reporterstudien mit den Wildtyp-HGF-Promotorfragmenten auch bei der Analyse der Reporterexpression unter Kontrolle der mutierten 5'-flankierenden HGF-Sequenzen die Reporteraktivität auf einen Vergleichswert bezogen. Die erhaltenen CAT-Aktivitäten sind in Abbildung 23 wiedergegeben.

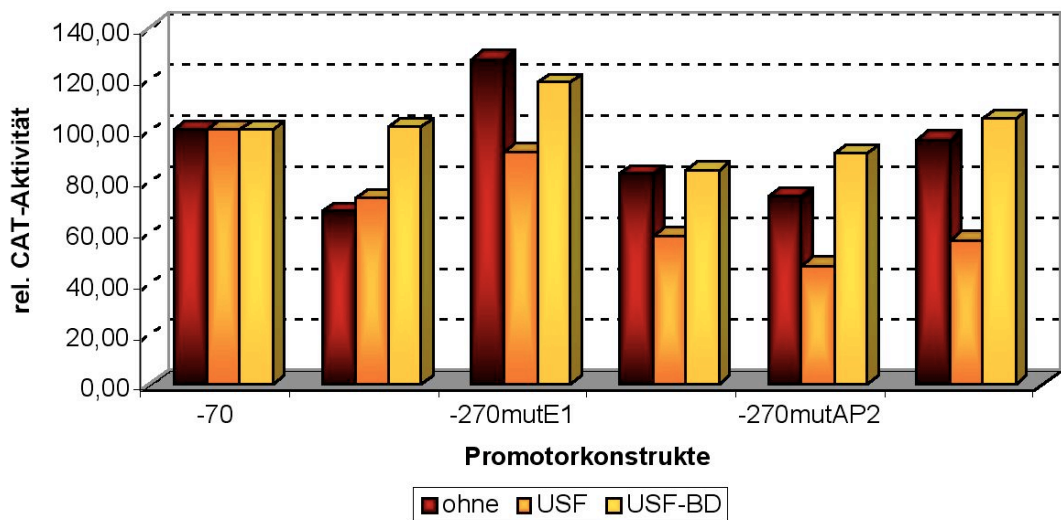


Abbildung 22: Einfluss von Mutationen in der MCR auf die Promotoraktivität der Deletionskonstrukte im Zusammenspiel mit kotransfizierten USF-Konstrukten. WT: Wildtyp; Das CAT-Reportergen wurde unter Kontrolle verschiedener HGF-Promotorkonstrukte mit und ohne Mutation in den einzelnen Bindungselementen (mutE1, mutE2, AP2 bzw. NF1) gestellt und mit und ohne USF-Varianten in NIH3T3-Zellen transfiziert. Nach 2 d Inkubation wurde die CAT-Aktivität gemessen und gegen die Luciferasekontrollwerte normalisiert.

Die Reporterwerte ergaben für die einzelnen HGF-Promotorkonstrukte ein sehr heterogenes Bild für die Auswirkungen der Mutationen auf die Reporteraktivitäten der verschiedenen Konstrukte. Während beim Wildtypkonstrukt die rekombinante Expression der nicht DNA-bindenden USF1-Variante USF_BD wiederum die Reprimierung der Promotoraktivität durch die MCR aufhob, zeigte sich bei sämtlichen Mutanten keine Beeinflussung der Reporteraktivität durch USF_BD. Hingegen kam es durch die rekombinante Expression von USF zu einer leichten Abnahme der Reporterwerte für alle Mutanten.

4. Diskussion

In dieser Arbeit wurde eine Multiconsensusregion (MCR) im Ratten-HGF-Promotor als ein Repressor der HGF-Expression identifiziert und näher untersucht. In Reporterstudien mit verschiedenen Deletionskonstrukten aus dem Ratten-HGF-Promotor konnte eine Verminderung der Reporteraktivität um ca. 50% durch den Abschnitt -270 bis -70 des 5'-flankierenden Bereichs des HGF-Gens beobachtet werden (s. Abb. 5). Die Lage des reprimierenden Elements konnte durch Lokalisation der Protein-DNA-Interaktion mittels eines *in-vitro*-Footprint auf die Region -260 bis -230 eingegrenzt werden (s. Abb. 8). Eine Sequenzanalyse erbrachte, daß es sich bei der reprimierenden Region um eine MCR mit Bindestellen für verschiedene Transkriptionsfaktorenfamilien handelte (s. Abb. 9B). Als die HGF-Expression supprimierender *trans*-Faktor konnte USF mittels EMSA- und Reporterstudien identifiziert werden.

Aufgrund der vielfältigen Wirkungen von HGF ist die auf bestimmte Zelltypen beschränkte Expression und damit auch die Unterdrückung der HGF-Expression in anderen Zelltypen für ein normales Funktionieren eines Organismus von großer Bedeutung. HGF wird im gesunden Organismus vornehmlich in mesenchymalen Zelltypen wie z.B. den Hepatischen Sternzellen (HSC) in der Leber und manchen Fibroblasten exprimiert [45, 69, 70], während sein Rezeptor, c-Met, vor allem von epithelialen Zelltypen ausgebildet wird [14, 15]. Die Wechselwirkung von HGF mit seinem Rezeptor c-Met spielt eine bedeutende Rolle in der mesenchymal-epithelialen Kommunikation sowohl während der Organogenese und Organregeneration als auch in der Homeostase von gesundem Gewebe [16, 87]. Die hier identifizierte MCR könnte in der zelltypspezifischen Expressionskontrolle eine wichtige Funktion innehaben, denn die Reporterstudien zeigten in nicht HGF exprimierenden Zellen, daß gerade der Sequenzbereich mit der MCR zur Repression führt. Durch einen *in-vitro*-Footprint konnte nur an der MCR eine Proteinbindung festgestellt werden (s. Abb. 8). Diese parakrine Wechselwirkung erfordert eine klare Regulation der HGF-Expression für eine korrekt abgestimmte mesenchymal-epitheliale Kommunikation. Die Überexpression, aber auch die *neo*-Expression von HGF ist in verschiedenen Tumorgeweben gefunden worden [88]. Werden sowohl HGF als auch c-Met von einer Zelllinie exprimiert, führt dies zur autocrinen Stimulierung und Transformation dieser Zelllinie [89]. Ist die Repression aufgehoben, kann sich zudem die Tumorigenität von kultivierten Zellen erhöhen, wenn diese sowohl HGF als auch c-Met bilden [90]. Solche eine autocrine Stimulierung durch HGF/c-Met kommt auch *in vivo* zum Tragen. So ist in vielen Tumorzellen die gleichzeitige Expression von HGF und c-Met gefunden worden [9]. Daher

spielt die Repression der HGF-Expression eine große Rolle für die Homeostase von gesundem Gewebe.

Die MCR und die Charakterisierung der Repressoren ist hierbei von großer Bedeutung. Zwar ist die Beeinflussung der HGF-Expression durch verschiedene extrazelluläre Einflüsse wie Hormone, Cytokine und Wachstumsfaktoren beschrieben worden [41, 50, 53, 91, 54] und es wurden zudem bereits neben der MCR einige regulatorische Elemente im HGF-Promotor gefunden. Diese vermittelten allerdings zumeist die Wirkung extrazellulärer Einflüsse. Ein schlüssiges Gesamtbild für die zelltyp- und gewebsspezifische Expression konnte aber noch nicht aufgestellt werden. Neben der zelltypspezifischen Reprimierung kommt es auch bei pathologischen Prozessen zur Verminderung der HGF-Expression. So wird im Laufe einer chronischen Leberschädigung die HGF-Expression in den Hepatischen Sternzellen, der Hauptquelle für HGF in der gesunden Leber, supprimiert [68]. Hierbei wird vornehmlich der Einfluß von Hormonen, Cytokinen oder Wachstumsfaktoren für die Reprimierung der HGF-Expression verantwortlich gemacht [43].

Neben der hier charakterisierten MCR wurden in früheren Arbeiten drei Elemente gefunden und ihre Bindungspartner als negativ regulatorisch auf die HGF-Expression wirkend identifiziert [56, 61, 92]. Bereits 1994 identifizierte die Arbeitsgruppe um R. Zarnegar ein zelltypspezifisches Repressorelement in der Region -16 bis +11 im Maus-HGF-Promotor, an das ein 70 kDa-Protein, welches nur in epithelialen Zellen, aber nicht in Fibroblasten vorkommt, bindet [61]. Die Identifizierung dieses Repressors ist allerdings widersprüchlich. Denn bereits die Ergebnisse aus zwei unabhängigen Arbeiten derselben Arbeitsgruppe sind unterschiedlich, da dort die Reporteraktivität eines identischen HGF-Promotorfragments in derselben epithelialen Zelllinie (RL95-2) deutlich höher lag und der Aktivität in der ebenfalls beides mal verwendeten Fibroblastenzelllinie (NIH3T3) entspricht [48].

Neben der Reprimierung durch MCR scheint in der Maus auch die Supprimierung der HGF-Transkription durch den Chicken Ovalbumin Upstream Promoter Transcription Factor (COUP-TF) über ein *cis*-Element in der Region -872 bis -860 von Bedeutung zu sein [56]. Desweiteren ist eine reprimierende Wirkung von TGF- β über ein TIE-Element in der Region -363 bis -354 des Ratten-HGF-Promotors (-382 bis -373 beim Menschen) beschrieben worden [92]. Dieser reprimierende Einfluß konnte allerdings von Plaschke-Schlütter *et al.* nicht bestätigt werden [73]. Kürzlich fanden Harrison *et al.* heraus, daß TGF- β die Degeneration der 6,0 kb und der 3,0 kb HGF-mRNA begünstigt, aber nicht die Stabilität des 1,5 kb-Transkripts, welches für NK2 – einen Antagonisten von HGF – codiert [93], beeinflusst [94]. Daher scheint es sich eher um einen posttranskriptionellen Mechanismus zu handeln.

Zur Aufklärung der Rolle verschiedener Abschnitte des HGF-Promotors in der transkriptionellen Regulation der HGF-Expression wurden Reporterstudien mit verschiedenen nicht HGF exprimierenden Zelllinien (Rat2, HepG2, NIH3T3) durchgeführt. Dabei zeigte sich eine zelltyp- und speziesunabhängige Reprimierung der Reporteraktivität durch den Abschnitt -270 bis -70 in Relation zur Transkriptionsinitiationsstelle. Mit Hilfe eines *in-vitro*-Footprints mit Kernproteinextrakt aus Rat2-Zellen gelang es über die Lokalisierung der Protein-DNA-Interaktion die Lage des reprimierenden Elements auf die Region -260 bis -230 einzugrenzen. Die Spezifität der Protein-DNA-Interaktion konnte mittels Koinkubation mit einem Oligodimer, welches diesen Abschnitt enthielt, gezeigt werden. Eine solche Interaktion wurde von Plaschke-Schlütter *et al.* für den Maus-HGF-Promotor mit Kernextrakten aus ras3T3-Fibroblastenzellen und MCF-7-Epithelzellen ebenfalls beobachtet, aber nicht näher spezifiziert [73]. Eine Sequenzanalyse des betreffenden Abschnitts zeigte eine Überlappung mehrerer, potentieller Proteinbindestellen. So enthielt diese MCR zum einen eine Bindestelle für Transkriptionsfaktoren der NF1-Familie und eine für Transkriptionsfaktoren der AP2-Familie. Zum anderen konnten zwei Bindestellen für HLH- und HLH/LZ-Proteine, sogenannte E-Boxen, identifiziert werden. Für alle diese Transkriptionsfaktorenfamilien sind sowohl positive als auch negative Einflüsse auf die transkriptionelle Regulation der Expression von Genen bekannt. So konnte z.B. für p21WAF/CIP [95], TGF- β [96] und den Östrogen-Rezeptor [97] eine Stimulierung und für MCAM/Muc18 [98], c/EBP- β [99] und c-Myc [100] eine Inhibierung durch AP2 beobachtet werden. NF1 spielt in der Regulation von mehr als 100 Genen eine Rolle [101]. Unter anderem sind Proteine der NF1-Familie für die gewebsspezifische Aktivierung der p53-Expression [102], und eine zelltypspezifische Aktivierung und Supprimierung des β_{1B} Adrenergic Receptor Promoter [103] mitverantwortlich. Desweiteren ist eine durch NF1 supprimierte Expression von $\alpha 1(I)$ -Collagen [104] und der Pyruvat-Kinase [105] beschrieben. Die Familien der HLH- oder HLH/LZ-Transkriptionsfaktoren sind bei zahlreichen Regulationsprozessen von Bedeutung, so aktiviert z.B. E2A die p21-Expression [106], sowie die der Familie der Cyclin-Proteine [107]. Für die Expression von MyoD ist eine Autostimulierung, aber auch eine Reprimierung durch USF ermittelt worden [108].

Die nähere Untersuchung der Protein-DNA-Interaktionen mittels EMSA-Studien zeigte die Ausbildung von zwei Protein-DNA-Komplexen an der MCR mit Kernextrakten aus diversen HGF exprimierenden und nicht exprimierenden Zellen. Mit Hilfe der EMSA-Studien konnte der höhermolekulare Komplex der E₁-Box und der niedermolekulare Komplex der NF1-Bindestelle zugeordnet werden (s. Abb. 11 und 12). Eine Bindung an die AP2-Bindestelle konnte dagegen weder in Kompetitionsversuchen noch in Supershiftanalysen mit Kernextrakten sowohl der nicht HGF exprimierenden Zelllinien

NIH3T3 und LF-CL2A, als auch der HGF exprimierenden Zelllinie U87MG gefunden werden. Eine Mutation der AP2-Bindestelle zeigte zudem in den Reporterstudien in NIH3T3-Zellen keinen Anstieg der Reporteraktivität. Daher kann im hier untersuchten Rattenpromotor nicht von einer Beteiligung von AP2 bei der Regulation der HGF-Expression ausgegangen werden. Dies steht partiell im Widerspruch zu den Ergebnissen von Jiang *et al.* [109]. Diese Arbeitsgruppe ordnete der AP2-Bindestelle einen supprimierenden Charakter zu. Sie fanden AP2 mittels Supershiftanalyse in den Protein-DNA-Komplexen eines Kernextrakts aus nicht HGF-exprimierenden HeLa-Zellen, jedoch nicht in denen aus einer weiteren Cervixkarzinomzelllinie, V8, die HGF-exprimiert. Da sie in Reporterstudien in NIH3T3 nach rekombinanter Expression von AP2 eine Reprimierung der Reporteraktivität eines 0,7-kb-Maus-HGF-Promotorfragments feststellten, vermuteten sie, daß die Bindung von AP2 bei der HGF-Expression in den zwei Cervixkarzinomzelllinien HeLa und V8 eine Rolle spielt [109]. Demgegenüber konnten sie in den Protein-DNA-Komplexen mit Kernextrakten aus NIH3T3-Zellen ebenfalls kein AP2 finden [72]. Eine Mutation der AP2-Bindestelle erbrachte zudem keinen Anstieg der Reporteraktivität des 0,7-kb-Fragments aus dem Maus-HGF-Promotor in NIH3T3 [109]. Die Beteiligung von AP2 in der Regulation der HGF-Expression scheint daher entweder zelltypspezifisch und/oder speziesabhängig zu sein. Möglicherweise ist die AP2-Bindung für die Suppression der HGF-Expression in speziellen Tumorarten (hier: Cervix) nach Entartung mitverantwortlich [109]. Dagegen spielt AP2 – wie die Bindungs- und Reporterstudien dieser Arbeit zeigen – in der konstitutiven, zelltypspezifischen Repression eher keine Rolle (s. 3.3.3.).

Für die konstitutive, zelltypspezifische Repression durch die MCR scheint dagegen die Komplexbildung mit den E-Boxen und der NF1-Bindestelle von Bedeutung zu sein. Die Kompetitionsversuche mit einem Oligodimer, welches die NF1-Konsensussequenz enthielt, bewirkte schon bei nur 10fachem Überschuß eine vollständige Verdrängung des markierten MCR-Oligodimers. Solch eine effiziente Verdrängung trat bei der Verdrängung mit unmarkiertem MCR-Oligodimer nicht auf. Daher hat die NF1-Bindestelle der MCR eine deutlich niedrigere Affinität zum NF1-Bindungspartner als die deduzierte Konsensussequenz für NF1. Die Supershiftanalyse der Protein-DNA-Komplexe erbrachte jedoch keinen Hinweis auf eine Beteiligung von Proteinen der NF1-Familie. Solch eine Diskrepanz zwischen Kompetitionsversuch und Supershiftanalyse ist von Lee *et al.* für ein NF1-Element im Ratten-p53-Promotor beschrieben worden [110]. Sie fanden ein 40 kDa-Protein, welches spezifisch an das NF1-Element band, aber aufgrund seiner Größe keinem bekannten Mitglied der NF1-Familie entsprach [111]. Interessanterweise zeigte sich die Proteinbindung an dieses NF1-Element als abhängig von der untersuchten Spezies. So bindet beim Menschen

gewebsspezifisch NF1 oder Ying Yang 1 (YY1) [102], während bei der Ratte das NF1-ähnliche 40-kDa-Protein unabhängig vom untersuchten Gewebe an die NF1-Bindestelle im p53-Promotor bindet [112].

Im Gegensatz hierzu wies die Arbeitsgruppe um R. Zarnegar per Supershiftanalyse NF1 in den Protein-DNA-Komplexen von Kernextrakten aus NIH3T3-Zellen an einem MCR-Dimer nach [72]. Die in der Arbeit von Jiang *et al.* präsentierten Autoradiogramme wiesen allerdings gegenüber den hier gezeigten EMSA-Studien (s. Abb. 12) eine andere Komplexbildung an dem MCR-Oligodimer mit Kernproteinen aus NIH3T3-Zellen auf. Während bei den hier durchgeführten EMSA-Studien zwei deutlich getrennte Banden beobachtet werden konnten, dominierte in den Versuchen von Jiang *et al.* der NF1-DNA-Komplex gegenüber den anderen gezeigten Komplexen so stark, daß zur näheren Untersuchung der weiteren Faktoren immer NF1 mittels Vorinkubation mit einem Oligodimer, welches die NF1-Konsensussequenz beinhaltet, aus den Kernextrakten entfernt werden musste [72]. Ein weiterer Grund für den Widerspruch könnte im Einsatz unterschiedlicher Antikörper liegen. Jiang *et al.* setzten ein nicht kommerziell erhältliches Antiserum ein [72]. Der hier benutzte, kommerzielle Antikörper sollte allerdings nach Herstellerangaben (Santa Cruz Biotechnology) alle bekannten Isoformen der NF1-Familie erkennen.

Des weiteren spielen ggf. auch die Randsequenzen der eingesetzten Oligomere eine Rolle. So deckt das hier eingesetzte Dimer den Bereich -262 bis -230 ab, während das von Jiang *et al.* benutzte Dimer den Bereich -260 bis -230 abdeckte. Dies mag für die NF1-Bindestelle direkt unerheblich sein, aber könnte das Bindungsverhalten der – von Jiang *et al.* außer Acht gelassenen – E₂-Box, die sich mit der NF1-Bindestelle überschneidet, beeinflussen. Im Rahmen der hier präsentierten Versuche konnte nicht nur die Bindung von Kernproteinen an die E₂-Box beobachtet werden, sondern auch USF1 als möglicher Bindungspartner der E₂-Box identifiziert werden.

Während der Bindungspartner des NF1-Elements nicht genauer identifiziert werden konnte, wurden für die E₁-Box die beiden HLH/LZ-Transkriptionsfaktoren TFE3 und USF1 als *in vitro* Interaktionspartner gefunden. Dies gelang zum einen mittels Supershiftanalysen in den Protein-DNA-Komplexen mit Kernextrakten aus verschiedenen Zellen. Zum anderen konnte die Bindung von TFE3 und USF1 mit Hilfe rekombinant exprimierter Proteine bestätigt werden. Der HLH/LZ-Faktor c-Myc und der HLH-Faktor E2A konnten hingegen nicht in den Protein-DNA-Komplexen gefunden werden. Bei den Supershiftanalysen mit dem MCR- und dem M_{1/2}b-Dimer (mit der E₁-Box) zeigte sich zudem eine zelltypspezifische Komplexzusammensetzung (s. Abb. 16 und 17). Zwar konnte USF1 in allen untersuchten Zelllinien, gleich ob HGF exprimierend oder nicht exprimierend, im Protein-DNA-Komplex an der E₁-Box nachgewiesen wer-

den. Die Zugabe eines Antikörpers gegen TFE3 erzeugte aber bei den HGF exprimierenden Zelllinien einen Downshift des höhermolekularen Komplexes, während es bei der nicht HGF exprimierenden Rat2-Zelllinie nur zu einer partiellen Auflösung dieses Komplexes am MCR-Dimer und bei dem $M_{1/2}b$ -Dimer zudem zu einem Supershift kam.

Daneben konnte bei den beiden eingesetzten Glioblastomazelllinien ein weiterer niedermolekularer Komplex am $M_{1/2}b$ -Dimer beobachtet werden. In einer kürzlich veröffentlichten Arbeit identifizierten Jiang *et al.* die Bindung der MCR durch den nukleären Peroxisome-Proliferator-activated-Receptor (PPAR- α) [113]. Die relative Lage des dem PPAR- α zugeordneten Komplexes zu dem Komplex an der E_1 -Box könnte ein Hinweis darauf sein, daß der glioblastomaspezifische Komplex PPAR- α enthält. Da beide Glioblastomzelllinien HGF exprimieren, würde dies zu der stimulierenden Wirkung passen, die von R. Zarnegar und seinen Mitarbeitern PPAR- α zugeschrieben wird [113]. Die verminderte Ausprägung des „PPAR- α -Komplex“ nach Zugabe des TFE3-Antikörpers erklärt sich möglicherweise aus Kooperationseffekten bei der Rekrutierung dieser Proteine an die MCR.

Neben der Identifizierung von USF1 und TFE3 als Bindungspartner der E_1 -Box wurde durch die Reporterstudien die funktionelle Bedeutung der Interaktion von USF1 mit der MCR belegt. Es zeigte sich keine Beeinflussung der Reporteraktivität verschiedener Ratten-HGF-Promotorfragmente in NIH3T3-Zellen durch die rekombinante Expression von TFE3 (Daten nicht gezeigt). Eine mangelhafte Expression als Ursache für die fehlende Beeinflussung kann ausgeschlossen werden, da in Vorversuchen die ideale Konzentration des Expressionsplasmids bestimmt wurde. Möglicherweise ist in nicht HGF exprimierenden Zellen wie den hier eingesetzten NIH3T3 die MCR mit anderen, affineren Faktoren besetzt, so daß auch eine erhöhte Expression von TFE3 in diesem System die Reporteraktivität nicht beeinflussen kann.

Demgegenüber konnten Hinweise auf eine Beteiligung von USF1 bei der transkriptionellen Regulation der Expression des HGF-Gens gefunden werden. Die rekombinante Expression von Vollängen-USF1 brachte zwar keine Veränderung der Reporteraktivität der Promotorfragmente, welche die MCR beinhalteten, aber durch die rekombinante Expression einer nicht DNA-bindungsfähigen, aber Proteininteraktionsfähigen USF1-Variante (USF_{BD}) konnte die Reprimierung der Reporteraktivität durch den Abschnitt -270 bis -70 vollständig aufgehoben werden (s. Abb. 21). Für die Aufhebung der Reprimierung durch USF_{BD} gibt es verschiedene Erklärungsmöglichkeiten. So kann USF_{BD} entweder mit endogenem USF dimerisieren und damit an der Bindung an die MCR hindern oder einen Interaktionspartner (Korepressor oder ein weiterer Transkriptionsfaktor) von USF abfangen und darüber die Reprimierung durch die MCR aufheben. Dies steht im Einklang mit den für eine

Überexpression von TFE3 erhaltenen Ergebnissen. Berücksichtigt man die deutlich höhere Affinität der USF-Bindung an die MCR bzw. die E₁-Box gegenüber der TFE3-Bindung (s. Abb. 15), so ist vorstellbar, daß in nicht HGF exprimierenden Zellen USF die E₁-Box besetzt und so die Bindung von TFE3 verhindert, welches in HGF exprimierenden an die E₁-Box bindet. Solch ein Mechanismus wurde für andere E-Box-Elemente bereits beschrieben; so für den Promyctosin- β -Promotor und den IgH-Enhancer [81]. Passend hierzu zeigte sich eine zelltypspezifische Bindung von TFE3 an die E₁-Box, während USF in allen Protein-DNA-Komplexen gefunden wurde. Folgendes Modell scheint daher für die Regulation der Transkription durch an die MCR gebundenes USF bzw. TFE3 möglich (Abb. 24).

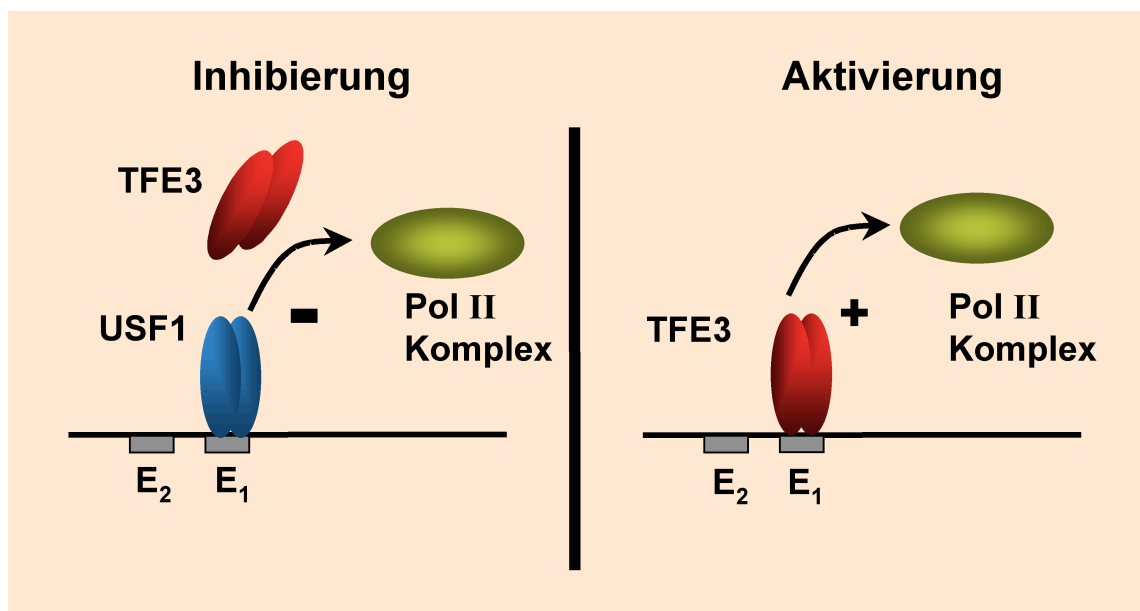


Abbildung 23: Schematische Darstellung der unterschiedlichen Bedeutungen der E₁-Box für die Regulation der HGF-Expression. Je nachdem welcher HLH/LZ-Transkriptionsfaktor an die E₁-Box gebunden ist, kommt es zur Aktivierung oder Inhibition der HGF-Expression.

Die zur Verfügung stehenden HGF exprimierenden Zelllinien (FH109, U87MG, KG-1) ließen sich nicht mit einer ausreichenden Effizienz transfizieren, um eine Überprüfung dieses Modells im Rahmen dieser Arbeit zu überprüfen.

Der hier gefundene, reprimierende Einfluß von USF steht im Widerspruch zu der aktivierenden Rolle, die Jiang *et al.* USF bei der Expression des Mäuse-HGF zugeordnet [72]. Aufgrund seines – auch in dieser Arbeit gefundenen – ubiquitären Vorkommens wird USF jedoch häufig bei zelltypspezifischen Expressionsmuster als eine Art Schwelle für andere Transkriptionsfaktoren angesehen [108, 73]. An eine E-Box gebundenes USF muss dann von anderen Transkriptionsfaktoren verdrängt werden, damit es zur Aktivierung kommt. Ob es zu dieser Verdrängung kommt, hängt von der

Affinität der Faktoren und den zur Verfügung stehenden Proteinmengen ab. Ansonsten benötigt USF zu einer Aktivierung der Expression zumeist weitere Faktoren, die mit USF interagieren [114, 115, 116, 117]. Möglicherweise spielt USF auch bei der Regulation des HGF eine duale Rolle, da es in dieser Arbeit in Kernproteinextrakten sowohl HGF-exprimierender als auch nicht-exprimierender Zelltypen gefunden wurde (s. Abb. 16 u. 17). Ein Grund für den gravierenden Unterschied zwischen den hier präsentierten Ergebnissen und denen von Jiang *et al.* mag auch darin liegen, daß die in den Arbeiten jener Arbeitsgruppe verwendeten NIH3T3-Zellen nach ihrer Angabe HGF exprimieren [118]. Die hier verwendeten NIH3T3-Zellen exprimieren HGF jedoch nur, wenn sie unter Serumentzug gehalten werden (M. Odenthal, pers. Kommunikation). Möglicherweise erklärt sich hieraus auch der differierende Befund bzgl. der NF1-Bindestelle.

Aufgrund komplexer Wechselwirkungsmöglichkeiten der MCR mit Transkriptionsfaktoren wurden zur Differenzierung der Funktionen der einzelnen Bindungselemente verschiedene Mutationen in die Elemente der MCR eingebracht. Sowohl eine Mutation der E₁-Box als auch der NF1-Bindestelle in der MCR erbrachte eine Aufhebung der Reprimierung der Reporteraktivität des -270er Promotorfragments, während die Mutation der E₂-Box bzw. der AP2-Bindestelle keine Veränderung erbrachte. Das Verhalten der Mutanten bestätigte den in den vorherigen Reporterstudien gefundenen, reprimierenden Einfluß der E₁-Box auf die Expression des HGF-Gens. Zudem scheint auch die NF1-Box - in Übereinstimmung mit den Kompetitionsversuchen in Abschnitt 3.3.2. (s. Abb. 12) - bei der Reprimierung eine Rolle zu spielen. Somit liegt eine Interaktion der an die MCR gebundenen Proteine für die Supprimierung der HGF-Transkription nahe. Eine positive Kooperation für USF mit NF1 ist für ein TGF- β Response Element im Plasminogen Activator Inhibitor Typ 1 (PAI-1) Gen beschrieben worden [119]. Jiang *et al.* vermuteten demgegenüber einen kompetitiven Mechanismus für USF und NF1 am HGF-Promotor [72].

Aus der Beeinflussung der Reporteraktivität durch USF trotz mutierter E₁-Box wird die Bindung des USF an die nicht mutierte E₂-Box (Abb. 25) oder die schon im vorigen Absatz angeführte Interaktion mit anderen, die MCR bindenden Proteine vermutet. Die Bindung von USF1 an ein nur die E₂-Box enthaltendes Oligodimer konnte *in vitro* gezeigt werden. Wenngleich sie auch recht schwach war, könnte sie aber in anderem Sequenzkontext höher sein. Daß das regulatorische Verhalten der MCR stark sequenzabhängig ist, wurde bereits von Plaschke-Schlütter *et al.* gezeigt, die nach Einklonierung der MCR in verschiedene Promotoren völlig unterschiedliche Auswirkungen feststellten [73].

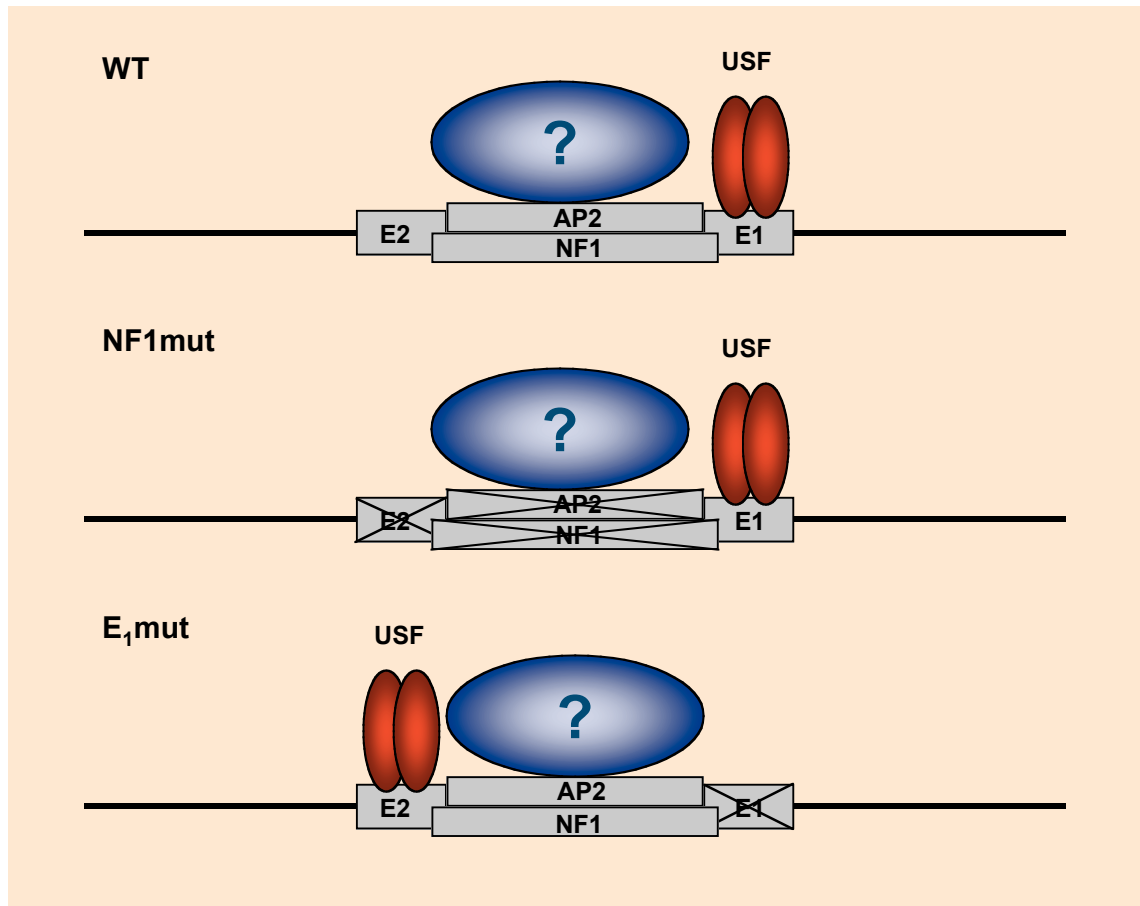


Abbildung 24: Möglicher Shift der USF-Bindung von der E₁-Box zur der E₂-Box. Ist die E₁-Box mutiert, so kann es zur USF-Bindung an die E₂- anstatt an die E₁-Box kommen. Die E₂-Box übernimmt dann die Funktion der E₁-Box für die transkriptionelle Regulation des HGF-Gens.

Eine Art Ersatzfunktion der E₂- für die E₁-Box erscheint jedenfalls möglich. Zwar sind von den Mutationen aufgrund der Überlappung teilweise zwei Bindeelemente betroffen, aber eine der E-Boxen ist immer intakt (Abb. 25).

USF bindet DNA normalerweise als Dimer, kann aber auch ein Homotetramer bilden [120]. Dieses Tetramer ist in der Lage zwei Bindestellen - z.B. beide E-Boxen in der MCR - zu binden. Möglicherweise spielt diese Isoform aber auch bei einer Wechselwirkung mit anderen, weiter 5'-liegenden Elementen eine Rolle. Eine andere Möglichkeit für ein – allerdings indirektes – Zusammenspiel mit entfernteren Elementen wäre eine Verzerrung der DNA-Struktur (DNA-bending) durch die an die MCR gebundenen Transkriptionsfaktoren, so daß *trans*-aktivierende Faktoren, die normalerweise nicht mit dem Polymerase-Komplex wechselwirken können, in räumliche Nähe gebracht werden. Solch eine DNA-Verzerrung ist für verschiedene Transkriptionsfaktoren beschrieben worden [75, 121].

5. Zusammenfassung

Der Hepatocyte Growth Factor (HGF) ist ein multifunktionseller Wachstumsfaktor, der aufgrund seiner mitogenen, motogenen und morphogenen Eigenschaften an Organumstrukturierungs- und Regenerationsprozessen beteiligt ist. HGF wird von mesenchymalen Zelltypen synthetisiert und wirkt parakrin auf epitheliale und einige endotheliale Zelltypen.

Die zelltypspezifische und differenzierungsabhängige Expressionsregulation des HGF-Gens ist nur unvollständig aufgeklärt. Es wurden aber diverse Promotorelemente identifiziert, die die Expression des HGF-Gens zu beeinflussen vermögen. Gegenstand dieser Arbeit war der 5'-flankierende Bereich des HGF-Gens und dessen Funktion in der HGF-Suppression. Für die Untersuchungen der transkriptionellen Regulation des HGF-Gens wurden verschiedene exprimierende und nicht exprimierende Zelllinien herangezogen.

Für Reporteranalysen wurde die Expression der Reportergene unter Kontrolle des HGF-Promotors mit verschiedenen trunkierten 5'-flankierenden Sequenzen gestellt. Die Reporterassays wiesen nach Transfektion von nicht HGF-exprimierenden Zellen auf einen negativ regulierenden Sequenzbereich zwischen -70 und -270 hin. Mittels eines *in-vitro*-Footprints gelang es durch Lokalisierung einer Protein-DNA-Interaktion in der Region -260 bis -230 die Lage des reprimierenden Elements einzugrenzen. Dieser Bereich erwies sich als eine Multiconsensusregion (MCR), die Consensussequenzen für die Bindung von Transkriptionsfaktoren der NF1- und der AP2-Familie sowie zwei tandemartig angeordnete, potentielle Bindestellen für Helix-Loop-Helix-Proteine, sogenannte E-Boxen (E₁ und E₂), beinhaltet.

Die nachfolgende Analyse der Protein-DNA-Komplexe mit Hilfe von Elektromobilityshiftassays (EMSA) ergab eine starke Affinität der MCR zu nukleären Proteinextrakten aus diversen Zelllinien. Verdrängungsansätze mit mutierten Sequenzen wiesen die Spezifität der Bindungen nach. Mittels der Kompetitionsversuche konnte ein Komplex der E₁-Box und ein Komplex der NF1-Bindestelle zugeordnet werden.

Die vergleichenden EMSA-Bindungsstudien der E-Boxen mit Kernextrakten aus nicht HGF-exprimierenden und HGF-exprimierenden Zellen zeigten, daß die jeweiligen DNA-Protein-Komplexe unterschiedlich zusammengesetzt sind, und sprechen daher für einen zelltypspezifischen Einfluß der MCR auf die Regulation des HGF-Gens. Da E-Boxen Bindestellen für Helix-Loop-Helix(HLH)-Transkriptionsfaktoren sind, wurden zur Identifizierung der bindenden Proteine in HGF-exprimierenden und nicht exprimierenden Zelltypen Supershiftanalysen mit spezifischen Antikörpern gegen verschiedene

HLH-Proteine und HLH-Leuzin-Zipper (LZ) Faktoren durchgeführt. Es konnte hierbei eine Interaktion mit den Faktoren USF und TFE3 aus der HLH-LZ-Familie nachgewiesen werden, während Myc oder die basalen HLH-Proteine E12, E47 keine Bindung eingingen. Ebenso konnte kein bekanntes Mitglied der NF1-Familie als Bindungspartner identifiziert werden. Bindungsstudien mit rekombinant exprimiertem USF und TFE3 bestätigten die USF- und TFE3-Interaktion mit den E-Boxen des HGF-Promotors. Hierbei zeigte sich, daß USF in sämtlichen untersuchten Zelllinien enthalten ist, während sich für TFE3 eine Zellspezifität zeigte.

In Reporterstudien wurde das Regulationsvermögen der Promotordelektionskonstrukte in Fibroblasten unter dem Einfluß einer rekombinanten USF1-Expression oder der Expression einer USF1-Variante, die zwar die Proteininteraktions- aber nicht die DNA-Bindungsdomäne (USF1_BD) beinhaltet, untersucht. Es wurde gezeigt, daß nicht durch das USF1, sondern durch USF1_BD die Repression aufgehoben wird. Die Mutation einzelner Bindungselemente der Multiconsensusregion ergab sowohl für die E₁-Box als auch für die NF1-Bindestelle eine Aufhebung der Repression der Promotoraktivität, nicht jedoch für die E₂-Box oder die AP2-Bindestelle. Dies weist auf eine interagierende Rolle von Bindungsfaktoren des reprimierenden Multiconsensusbereichs hin. Dabei scheint USF1 an der HGF-Suppression nicht nur durch direkte DNA-Bindung, sondern auch durch Vermittlung der Interaktion eines heteromeren DNA-Bindungskomplexes beteiligt zu sein.

6. Literatur

1. Nakamura T, Nawa K, Ichihara A (1984): Partial purification and characterization of hepatocyte growth factor from serum of hepatectomized rats. *Biochem Biophys Res Commun* **122**, 1450-1459.
2. Michalopoulos G, Houck KA, Dolan ML, Luetke NC (1984): Control of hepatocyte replication by two serum factors. *Cancer Res* **44**, 4414-4419.
3. Zarnegar R, Muga S, Enghild J, Michalopoulos GK (1989): NH₂-terminal amino acid sequence of rabbit hepatopoietin A, a heparin binding polypeptide growth factor for hepatocytes. *Biochem Biophys Res Commun* **163**, 1370-1376.
4. Stoker M, Perryman M (1985): Epithelial scatter factor released by embryo fibroblasts. *J Cell Sci* **77**, 209-223.
5. Weidner KM, Arakaki N, Hartmann G, Vandekerckhove J, Weingart S, Rieder H, Fonatsch C, Tsubouchi H, Hishida T, Daikuhara Y (1991): Evidence for the identity of human scatter factor and human hepatocyte growth factor. *Proc Natl Acad Sci USA* **88**, 7001-7005.
6. Furlong RA, Takehara T, Taylor WG, Nakamura T, Rubin JS (1991) Comparison of biological and immunochemical properties indicates that scatter factor and hepatocyte growth factor are indistinguishable. *J Cell Sci* **100**, 173-177.
7. Naldini L, Weidner KM, Vigna E, Gaudino G, Bardelli A, Ponzetto C, Narsimhan RP, Hartmann G, Zarnegar R, Michalopoulos GK, Birchmeier W, Comoglio PM (1991): Scatter factor and hepatocyte growth factor are indistinguishable ligands for the MET receptor. *EMBO J* **10**, 2867-2878.
8. Matsumoto K, Nakamura T (1996): Emerging multipotent aspects of hepatocyte growth factor. *J Biochem* **119**, 591-600.
9. To TC, Tsao MS (1998): The roles hepatocyte growth factor/scatter factor and Met receptor in human cancers (Review). *Oncol Rep* **5**, 1013-1024.
10. Stuart KA, Riordan SM, Lider S, Crostella L, Williams R, Skouteris GG (2000): Hepatocyte growth factor/scatter factor-induced intracellular signaling. *Int J Exp Path* **81**, 17-30.

11. Jung W, Castren E, Odenthal M, Vande Woude GF, Ishii T, Dienes HP, Lindholm D, Schirmacher P (1994): Expression and functional interaction of hepatocyte growth factor-scatter factor and its receptor *c-met* in mammalian brain. *J Cell Biol* **126**, 485-494.
12. Maina F, Hilton MC, Ponzetto C, Davies AM, Klein R (1997): Met receptor signaling is required for sensory nerve development and HGF promotes axonal growth and survival of sensory neurons. *Genes Dev* **11**, 3347-3350.
13. Van der Voort R, Taher TEI, Derksen PWB, Spaargaren M, Van der Neut, Pals ST (2000): The Hepatocyte Growth Factor/Met Pathway in Development, Tumorigenesis, and B-Cell Differentiation. *Adv Cancer Res* **79**, 39-90.
14. Di Renzo MF, Narsimhan RP, Olivero M, Bretti S, Giordano S, Medico E, Gaglia P, Zara P, Comoglio PM (1991): Expression of the Met/HGF receptor in normal and neoplastic human tissues. *Oncogene* **6**, 1997-2003.
15. Yang XM, Park M (1995): Expression of the Hepatocyte Growth Factor/Scatter Factor Receptor Tyrosine Kinase is Localized to Epithelia in the Adult Mouse. *Lab Invest* **73** (5), 483-491.
16. Rosen EM, Nigam SK, Goldberg ID (1994): Scatter Factor and the *c-met* receptor: A paradigm for mesenchymal/epithelial interaction. *J Cell Biol* **127**, 1783-1787.
17. Bladt F, Riethmacher D, Isenmann S, Aguzzi A, Birchmeier C (1995): essential role for the *c-met* receptor in the migration of myogenic precursor cells into the limb bud. *Nature* **376**, 768-771.
18. Schmidt C, Bladt F, Goedecke S, Brinkmann V, Zschiesche W, Sharpe M, Gherardi E, Birchmeier C (1995): Scatter factor/hepatocyte growth factor is essential for liver development. *Nature* **373**, 699-702.
19. Uehara Y, Minowa O, Mori C, Shiota K, Kuno J, Noda T, Kitamura N (1995): Placental defect and embryonic lethality in mice lacking hepatocyte growth factor/scatter factor. *Nature* **373**, 702-705.
20. Sakata H, Takayama H, Sharp R, Rubin JS, Merlino G, La Rochelle WJ (1996): Hepatocyte growth factor/scatter factor overexpression induces growth, abnormal development, and tumor formation in transgenic mouse livers. *Cell Growth Differ* **7**, 1513-1523.

21. Karp SL, Ortiz-Arduan A, Li S, Neilson EG (1994): Epithelial differentiation of metanephric mesenchymal cells after stimulation with hepatocyte growth factor or embryonic spinal cord. *Proc Natl Acad Sci USA* **91** (12), 5286-5290.
22. Matsumoto K and Nakamura T (1991): Hepatocyte growth factor: molecular structure and implications for a central role in liver regeneration. *J Gastroenterol Hepatol* **6**, 509-519.
23. Yanagita K, Matsumoto K, Sekiguchi K, Ishibashi H, Niho Y, Nakamura T (1993): Hepatocyte growth factor may act as a pulmotrophic factor on lung regeneration after acute liver injury. *J Biol Chem* **268**, 21212-21217.
24. Kawaida K, Matsumoto K, Shimazu H, Nakamura T (1994): Hepatocyte growth factor prevents acute renal failure and accelerates renal regeneration in mice. *Proc Natl Aca Sci USA* **91**, 4357-4361
25. Zarnegar R, DeFrances MC, Kost DP, Lindroos P, Michalopoulos GK (1991): Expression of hepatocyte growth factor mRNA in regenerating rat liver after partial hepatectomy. *Biochem Biophys Res Commun* **177** (1), 559-565.
26. Kinoshita T, Hirao S, Matsumoto K, Nakamura T (1991): Possible Endocrine Control by Hepatocyte Growth Factor of Liver Regeneration after Partial Hepatectomy. *Biochem Biophys Res Commun* **177** (1), 330-335.
27. Matsumoto A, Yamamoto N (1991): Sequestration of hepatocyte growth factor in extracellular matrix in normal adult liver. *Biochem Biophys Res Commun* **174**, 90-95.
28. Tomiya T, Nagoshi S, Fujiwara K (1992): Significance of serum human hepatocyte growth factor levels in patient with hepatic failure. *Hepatology* **15**, 1-4.
29. Schuppan D, Schmid M, Somasundaram R, Ackermann R, Ruehl M, Nakamura T, Riecken EO (1998): Collagens in the Liver Extracellular Matrix Bind Hepatocyte Growth Factor. *Gastroenterology* **114**, 139-152.
30. Mars WM, Zarnegar R, Michalopoulos GK (1993): Activation of Hepatocyte Growth Factor by the Plasminogen Activators uPA and tPA. *Am J Pathol* **143**, 949-958.
31. Kataoka H, Itoh H, Hamasuna R, Meng JY, Kono M (2001): Pericellular Activation of Hepatocyte Growth Factor/Scatter Factor (HGF/SF) in Colorectal Carcinomas: Roles of HGF Activator (HGFA) and HGFA Inhibitor Type 1 (HAI-1). *Hum Cell* **14** (1), 83-93.

32. Lee SL, Dickson RB, Lin CY (2000): Activation of hepatocyte growth factor and urokinase/plasminogen activator by matriptase and epithelial membrane serine protease. *J Biol Chem* **275**, 36720-36725.
33. Shimomura T, Miyazawa K, Komiyama Y (1992): Activation of hepatocyte growth factor by two homologous proteases, blood-coagulation factor XIIa and hepatocyte growth factor activator. *Eur J Biochem* **229**, 257-261.
34. Shimomura T, Denda K, Kitamura A, Kawaguchi T, Kito M, Kondo J, Kagaya S, Qin L, Takata H, Miyazawa K, Kitamura N (1997): Hepatocyte growth factor activator inhibitor, a novel Kunitz-type serine protease inhibitor. *J Biol Chem* **272** (10), 6370-6376.
35. Kawaguchi T, Qin L, Shimomura T, Kondo J, Matsumoto K, Denda K, Kitamura N (1997): Purification and cloning of hepatocyte growth factor activator inhibitor type 2, a Kunitz-type serine protease inhibitor. *J Biol Chem* **272** (44), 27558-27564.
36. Kinoshita T, Tashiro K, Nakamura T (1989): Marked increase of HGF mRNA in non-parenchymal liver cells of rats treated with hepatotoxins. *Biochem Biophys Res Commun* **165**, 1229-1234.
37. Joannidis M, Spokes K, Nakamura T, Faletto D, Cantley LG (1994): Regional expression of hepatocyte growth factor/c-met in experimental renal hypertrophy and hyperplasia. *Am J Physiol* **267**, F231-F236.
38. Kono S, Nagaike M, Matsumoto K, Nakamura T (1992): Marked induction of HGF mRNA in intact kidney and spleen in response to injury of distant organs. *Biochem Biophys Res Commun* **186**, 991-998.
39. Miyazawa K, Shimomura T, Naka D, Kitamura N (1994): Proteolytic Activation of Hepatocyte Growth Factor in Response to Tissue Injury. *J Biol Chem* **269** (12), 8966-8970.
40. Miyazawa K, Kitamura A, Kitamura N (1991): Structural organization and the transcription initiation site of the human hepatocyte growth factor gene. *Biochemistry* **30**, 9170-9176.
41. Gohda E, Matsunaga T, Kataoka H, Takebe T, Yamamoto I (1994): Induction of hepatocyte growth factor in human skin fibroblasts by epidermal growth factor, platelet-derived growth factor and fibroblast growth factor. *Cytokine* **6** (6), 633-640.

42. Li DQ, Tseng SCG (1997): Differential Regulation of Keratinocyte Growth Factor and Hepatocyte Growth Factor/Scatter Factor by Different Cytokines in Human Corneal and Limbal Fibroblasts. *J Cell Physiol* **172**, 361-372.
43. Skrtic S, Wallenius V, Ekberg S, Brenzel A, Gressner AM, Jansson JO (1997): Insulin-Like Growth Factors Stimulate Expression of Hepatocyte Growth Factor But Not Transforming Growth Factor β_1 in Cultured Hepatic Stellate Cells. *Endocrinology* **138** (11), 4683-4689.
44. Matsumoto K, Tajima H, Okazaki H, Nakamura T (1992): Negative Regulation of hepatocyte growth factor gene expression in human lung fibroblasts and leukemic cells by transforming growth factor- β_1 and glucocorticoids. *J Biol Chem* **267**, 24917-24920.
45. Ramadori G, Neubauer K, Odenthal M, Nakamura T, Knittel T, Schwogler S, Meyer zum Büschenfelde KH (1992): The gene of hepatocyte growth factor is expressed in fat-storing cells from rat liver and is down regulated during cell growth and by transforming growth factor beta. *Biochem Biophys Res Commun* **183**, 739-742.
46. Matsumoto K, Okazaki H, Nakamura T (1992): Up-regulation of hepatocyte growth factor gene expression by interleukin-1 in human skin fibroblasts. *Biochem Biophys Res Commun* **188**, 235-243.
47. Tamura M, Arakaki N, Tsubouchi H, Takada H, Daikuhara Y (1993): Enhancement of human hepatocyte growth factor production by interleukin-1 α and -1 β and tumor necrosis factor- α by fibroblasts in culture. *J Biol Chem* **268**, 8140-8145.
48. Liu Y, Michalopoulos GK, Zarnegar R (1994): Structural and Functional Characterization of the Mouse Hepatocyte Growth Factor Gene Promoter. *J Biol Chem* **269** (6), 4152-4160.
49. Gohda E, Takebe T, Sotani T, Nakamura S, Minowada J, Yamamoto I (1998): Induction of Hepatocyte Growth Factor/Scatter Factor by Interferon- γ in Human Leukemia Cells. *J Cell Physiol* **174**, 107-114.
50. Jiang JG, Zarnegar R (1997): A Novel Transcriptional Regulatory Region within the Core Promoter of the Hepatocyte Growth Factor Gene Is Responsible for Its Inducibility by Cytokines via the C/EBP Family of Transcription Factors. *Mol Cell Biol* **17** (10), 5758-5770.

51. Matsumoto K, Okazaki H, Nakamura T (1995): Novel function of prostaglandins as inducers of gene expression of HGF and putative mediators of tissue regeneration. *Biochem Biophys Res Commun* **188**, 235-243.
52. Kakumu S, Ishikawa T, Wakita T, Yoshioka K, Takayanagi M, Tahara H, Kusakabe A (1994): Interferon- γ production specific for hepatitis B virus antigen by intrahepatic T lymphocytes in patients with acute and chronic hepatitis B. *Am J Gastroenterol* **89**, 92-96.
53. Matsunaga T, Gohda E, Takebe T, Wu YL, Iwao M, Kataoka H, Yamamoto I (1994): Expression of Hepatocyte Growth Factor Is Up-Regulated through Activation of a cAMP-Mediated Pathway. *Exp Cell Res* **210**, 326-335.
54. Harrison PM, Farzaneh F (2000): Regulation of HGF/SF Gene Expression in MRC-5 Cells by N-Acetylcysteine. *Biochem Biophys Res Commun* **279** (1), 108-115.
55. Liu Y, Lin L, Zarnegar R (1994): Modulation of hepatocyte growth factor gene expression by estrogen in mouse ovary. *Mol Cell Biol* **104**, 173-181.
56. Jiang JG, Bell A, Liu Y, Zarnegar R (1997): Transcriptional Regulation of the Hepatocyte Growth Factor Gene by the Nuclear Receptors Chicken Ovalbumin Upstream Promoter Transcription Factor and Estrogen Receptor. *J Biol Chem* **272** (7), 3928-3934.
57. Blanquaert F, Pereira RC, Canalis E (2000): Cortisol inhibits hepatocyte growth factor/scatter factor expression and induces c-met transcripts in osteoblasts. *Am J Physiol Endocrinol Metab* **278**, E509-E515.
58. Aravamudan B, Watabe M, Watabe K (1993): Characterization of the 5'-Flanking Region of the Hepatocyte Growth Factor Gene. *Biochem Biophys Res Commun* **195** (1), 346-353.
59. Jiang JG, Chen Q, Bell A, Zarnegar R (1997): Transcriptional regulation of the hepatocyte growth factor (HGF) gene by the Sp family of transcription factors. *Oncogene* **14**, 3039-3049.
60. Metcalfe AMJ, Dixon RM, Radda GK (1997): Wild-type but not mutant p53 activates the hepatocyte growth factor/scatter factor promoter. *Nucleic Acids Res* **25** (5), 983-986.
61. Liu Y, Beedle AB, Lin L, Bell AW, Zarnegar R (1994): Identification of a Cell-Type-Specific Transcriptional Repressor in the Promotor Region of the Mouse Hepatocyte Growth Factor Gene. *Mol Cell Biol* **14** (11), 7046-7058.

62. Sanger F (1981): Determination of nucleotide sequences in DNA. *Science* **214**, 1205-1210.
63. Dignam JD (1990): Preparation of extracts from higher eukaryotes. *Methods Enzymol* **182**, 194-203.
64. Bradford MM (1976): A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* **72**, 248-254.
65. Mueller PR, Garrity PA, Wold B (1995): Ligation-Mediated PCR for Genomic Sequencing and Footprinting. In: Ausubel FM, Brent R, Kingston RE, Moore DD, Seidman JG, Smith JA, Struhl K (Hrsg.); *Current Protocols in Molecular Biology* Vol 1, Supplement 20, John Wiley & Sons, New York, 15.5.1-15.5.26.
66. Strauss, WM (1995): Preparation of Genomic DNA from Mammalian Tissue. In: Ausubel FM, Brent R, Kingston RE, Moore DD, Seidman JG, Smith JA, Struhl K (Hrsg.): *Current Protocols in Molecular Biology* Vol 1, John Wiley & Sons, New York, 2.2.1-2.2.3.
67. Maxam AM, Gilbert W (1980): Sequencing end-labeled DNA with base-specific chemical cleavages. *Methods Enzymol* **65** (1), 499-560.
68. Schirmacher P, Geerts A, Pietrangelo A, Dienes HP, Rogler CE (1992): Hepatocyte growth factor/hepatopoietin A is expressed in fat-storing cells from rat liver but not myofibroblast-like cells derived from fat-storing cells. *Hepatology* **15**, 5-11.
69. Laping NJ, Olson BA, Ho T, Ziyadeh FN, Albrightson CR (2000): Hepatocyte Growth Factor: A Regulator of Extracellular Matrix Genes in Mouse Mesangial Cells. *Biochemical Pharmacology* **59**, 847-853.
70. Stoker M, Gherardi E, Perryman M, Gray J (1987): Scatter factor is a fibroblast-derived modulator of epithelial cell mobility. *Nature* **327**, 239-242.
71. Kim IH, Rodgers GP (1997): *In vivo* Footprinting Using N-Ethyl-, N-nitrosourea: Improved Resolution of the DNA-Protein Interactions in the Human β -Globin Gene Promoter Region. *Anal Biochem* **254**, 1-8.
72. Jiang JG, Gao B, Zarnegar R (2000): The concerted regulatory functions of the transcription factors nuclear factor-1 and upstream stimulatory factor on a composite element in the promoter of the hepatocyte growth factor gene. *Oncogene* **19**, 2786-2790.

73. Plaschke-Schlütter A, Behrens J, Gherardi E, Birchmeier W (1995): Characterization of the Scatter Factor/Hepatocyte Growth Factor Gene Promoter. *J Biol Chem* **270**; 830-836.
74. Ephrussi A, Church GM, Tonegawa S, Gilbert W (1985): B lineage-specific interactions of a immunoglobulin enhancer with cellular factors *in vivo*. *Science* **227**, 134-140.
75. Fisher DE, Parent LA, Sharp PA (1992): Myc/Max and other helix-loop-helix/leucine zipper proteins bend DNA toward the minor groove. *Proc Natl Acad Sci USA* **89**, 11779-11783.
76. Fisher A, Caudy M (1998): The function of hairy-related bHLH repressor proteins in cell fate decisions. *Bioessays* **20**, 298-306.
77. Dhar M, Taneja R (2001): Cross-regulatory interaction between Stra13 and USF results in functional antagonism. *Oncogene* **20**, 4750-4756.
78. Amati B, Land H (1994): Myc-Max-Mad: A transcription factor network controlling cell cycle progression. *Curr Opin Genet Dev* **4**, 102-108.
79. Sirito M, Walker S, Lin Q, Kozlowski M, Klein WH, Sawadogo M (1992): Members of the USF family of helix-loop-helix proteins bind DNA as homo- as well as heterodimers. *Gene Expr* **2**, 231-240.
80. Sirito M, Lin Q, Deng JM, Behringer RR, Sawadogo M (1998): Overlapping roles and asymmetrical cross-regulation of the USF proteins in mice. *Proc Natl Acad Sci USA* **95**, 3758-3763.
81. Kiermaier A, Gawn JM, Desbarats L, Saffrich R, Ansorge W, Farrell PJ, Eilers M, Packham G (1999): DNA binding of USF is required for specific E-box dependent gene activation *in vivo*. *Oncogene* **18**, 7200-7211.
82. Beilmann M, Odenthal M, Jung W, Vande Woude GF, Dienes HP, Schirmacher P (1997): Neoexpression of the *c-met*/Hepatocyte Growth Factor-Scatter Factor Receptor Gene in Activated Monocytes. *Blood* **90** (11), 4450-4458.
83. Jung W (1994): Expression des , Hepatocyte-Growth-Factors' (HGF) und des c-met/HGF Rezeptors in Leber, Gehirn und weißen Blutzellen. Dissertation zur Erlangung der Doktorwürde an der Johannes-Gutenberg-Universität Mainz.
84. Price M, Fivaz J, Jotterand A, Mirkovitch J (1998): Tissue-specific chromatin structure at the hepatocyte growth factor/scatter factor gene promoter. *Gene* **211**, 141-150.

85. Shiota G, Rhoads DB, Wang TC, Nakamura T, Schmidt EV (1992): Hepatocyte growth factor inhibits growth of hepatocellular carcinoma cells. *Proc Natl Acad Sci USA* **89**, 373-377.
86. Philips SEV (1994): Built by association: structure and function of helix-loop-helix DNA-binding proteins. *Structure* **2**, 1-4.
87. Sonnenberg E, Meyer D, Weidner KM, Birchmeier C (1993): Scatter factor/hepatocyte growth factor and its receptor, the c-met tyrosine kinase, can mediate a signal exchange between mesenchyme and epithelia during mouse development. *J Cell Biol* **123**, 223-235.
88. Jiang WG, Hallett MB, Puntis MCA (1993): Hepatocyte growth factor/scatter factor, liver regeneration and cancer metastasis. *Br J Surg* **80**, 1368-1373.
89. Jyer A, Kmiecik TE, Park M, Daar I, Blair D, Dunn KJ, Suttrave P, Ihle JN, Bodescot M, Vande Woude G (1990): Structure, tissue-specific expression, and transforming activity of the mouse met protooncogene. *Cell Growth Differ* **1**, 87-95.
90. Rong S, Bodescot M, Blair D, Dunn J, Nakamura T, Mizuno K, Park M, Chan A, Aaronson S, Vande Woude G (1992): Tumorigenicity of the met protooncogen and the gene for hepatocyte growth factor. *Mol Cell Biol* **12**, 5152-5158.
91. Myazaki M, Gohda E, Kaji K, Namba M (1998): Increased Hepatocyte Growth Factor Production by Aging Human Fibroblasts Mainly due to Autocrine Stimulation by Interleukin-1. *Biochem Biophys Res Commun* **246**, 255-260.
92. Odenthal M, Gilberg B, Dienes HP, Schirmacher P (1996): A TGF- β inhibitory element in the upstream sequence of the HGF gene mediates downregulation of HGF synthesis in hepatic stellate cells after transformation into myofibroblast cells. *Hepatology* **24**, 196A.
93. Miyazawa K, Kitamura A, Naka D, Kitamura N (1991): An alternatively processed mRNA generated from human hepatocyte growth factor gene. *Eur J Biochem* **197**, 15-22.
94. Harrison P, Bradley L, Bomford A (2000): Mechanism of Regulation of HGF/SF Gene Expression in Fibroblasts by TGF- β 1. *Biochem Biophys Res Commun* **271**, 203-211.
95. Zeng YX, Somasundaram K, Eideiry WS (1997): AP2 inhibits cancer cell growth and activates p21^{WAF/CIP1} expression. *Nat Genet* **15**, 78-82.

96. Wang D, Shin TH, Kudlow JE (1997): Transcription factor AP-2 controls transcription of the human transforming growth factor- α gene. *J Biol Chem* **272** (22), 14244-14250.
97. McPherson LA, Baichwal VR, Weigel RJ (1997): Identification of ERF-1 as a member of the AP2 transcription factor family. *Proc Natl Acad Sci USA* **94** (9), 4342-4347.
98. Jean D, Gershenwald JE, Huang S, Luca M, Hudson MJ, Tainsky MA, Bar-Eli M (1998): Loss of AP-2 results in up-regulation of MCAM/MUC18 and an increase in tumor growth and metastasis of human melanoma cells. *J Biol Chem* **273** (26), 16501-16508.
99. Jiang MS, Tang QQ, McLennithan J, Geiman D, Shillinglaw W, Henzel WJ, Lane MD (1998): Depression of the C/EBP α gene during adipogenesis: Identification of AP-2 as a repressor. *Proc Natl Acad Sci USA* **95**, 3467-6471.
100. Gaubatz S, Imhof A, Dosch R, Werner O, Mitchell P, Buettner R, Eilers M (1995): Transcriptional activation by Myc is under negative control by transcription factor AP-2. *EMBO J* **14** (7), 1508-1519.
101. Gonostajski RM (2000): Roles of the NFI/CTF gene family in transcription and development. *Gene* **249**, 31-45.
102. Furlong E, Rein T, Martin F (1996): YY1 and NF1 both activate the human p53 promoter by alternatively binding to a composite element, and YY1 and E1A cooperate to amplify p53 promoter activity. *Mol Cell Biol* **16**, 5933-5945.
103. Gao B, Kunos G (1998): Cell type-specific Transcriptional Activation and Suppression of the α_{1B} Adrenergic Receptor Gene Middle Promoter by Nuclear Factor 1. *J Biol Chem* **273** (48), 31784-31787.
104. Nehls MC, Grapilon ML, Brenner DA (1992): NF-I/Sp1 switch elements regulate collagen- α 1(I) gene expression. *DNA Cell Biol* **11**, 443-452.
105. Yamada K, Tanka T, Noguchi T (1997): Members of the nuclear factor 1 family and hepatocyte nuclear factor 4 bind to overlapping sequences of the L-II element on the rat pyruvate L gene promoter and regulate its expression. *Biochem J* **324**, 917-925.
106. Prabhu S, Ignatova A, Park ST, Sun XH (1997): Regulation of the Expression of Cyclin-Dependent Kinase Inhibitor p21 by E2A and Id Proteins. *Mol Cell Biol* **17**, 5888-5896.

107. Zhao F, Vilardi A, Neely RJ, Choi JK (2001): Promotion of Cell Cycle Progression by Basic Helix-Loop-Helix E2A. *Mol Cell Biol* **21** (18), 6346-6357.
108. Lun Y, Sawadogo M, Perry M (1997): Autoactivation of *Xenopus* MyoD Transcription and Its Inhibition by USF. *Cell Growth Differ* **8**, 275-282.
109. Jiang JG, DeFrances MC, Machen J, Johnson C, Zarnegar R (2000): The Repressive Function of AP2 Transcription Factor on the Hepatocyte Growth Gene Promoter. *Biochem Biophys Res Commun* **272**, 882-886.
110. Lee M, Song H, Park S, Park JS (1998): Transcription of the rat p53 gene is mediated by factor binding to two recognition motifs of NF-1-like protein. *Biol Chem* **379**, 1333-1340.
111. Lee M, Yu S, Park JS (2000): Biochemical Characterization of a Nuclear Factor That Binds to NF1-like Elements in the Rat p53 Promoter. *J Cell Biochem* **78**, 1-7.
112. Lee M, Song H, Yu S, Lee K, Park JS (1999): A 40-kDA NF1-like protein, not YY1, binds to the rat p53 promoter for transactivation in various rat organs. *Biochem Cell Biol* **77**, 209-214.
113. Jiang JG, Johnson C, Zarnegar R (2001): Peroxisome Proliferator-activated Receptor α -mediated Transcriptional Up-regulation of the Hepatocyte Growth Factor Gene Promoter via a Novel Composite cis-Acting Element. *J Biol Chem* **276** (27), 25049-25056.
114. Sieweke MH, Tekotte H, Jarosch U, Graf T (1998): Cooperative interaction of Ets-1 with USF-1 required for HIV-1 enhancer activity in T cells. *EMBO J* **17** (6), 1728-1739.
115. Muhlethaler-Mottet A, Di Berardino W, Otten LA, Mach B (1998): Activation of the MHC Class II Transactivator CIITA by Interferon- γ Requires Cooperative Interaction between Stat1 and USF-1. *Immunity* **8**, 157-166.
116. Breen, GAM, Jordan EM (1999): Transcriptional activation of the F₁F₀ ATP synthase β -subunit initiator element by USF2 is mediated by p300. *Biochim Biophys Acta* **1428**, 169-176.
117. Qyang Y, Luo X, Lu T, Ismail PM, Krylov D, Vinson C, Sawadogo M (1999): Cell-Type-Dependent Activity of the Ubiquitous Transcription Factor USF in Cellular Proliferation and Transcriptional Activation. *Mol Cell Biol* **19** (2), 1508-1517.

118. Zarnegar R (1995): Regulation of HGF and HGFR gene expression. *EXS* **74**, 33-49.
119. Riccio A, Pedone PV, Lund LR, Olesen T, Olsen HS, Andreassen PA (1992): Transforming Growth Factor β 1-Responsive Element: Closely Associated Binding Sites for USF and CCAAT-Binding Transcription Factor-Nuclear Factor I in the Type 1 Plasminogen Activator Inhibitor Gene. *Mol Cell Biol* **12** (4), 1846-1855.
120. Ferré-D'Amaré AR, Pognonec P, Roeder RG, Burley SK (1994): Structure and function of the b/HLH/Z domain of USF. *EMBO J* **13** (1), 180-189.
121. Kim J, Shapiro D (1996): In simple synthetic promoters YY1-induced DNA binding is important in transcription activation and repression. *Nucl Acids Res* **24** (21), 4341-4348.

Kurzzusammenfassung

Der Hepatocyte Growth Factor (HGF) ist ein multifunktionaler Wachstumsfaktor, der aufgrund seiner mitogenen, motogenen und morphogenen Eigenschaften an Organumstrukturierungs- und Regenerationsprozessen beteiligt ist. HGF wird von mesenchymalen Zelltypen synthetisiert und wirkt parakrin auf epitheliale und einige endotheliale Zelltypen.

Die zelltypspezifische und differenzierungsabhängige Expressionsregulation des HGF-Gens ist nur unvollständig aufgeklärt. Es wurden aber diverse Promotorelemente identifiziert, die die Expression des HGF-Gens zu beeinflussen vermögen. Gegenstand dieser Arbeit war der 5'-flankierende Bereich des HGF-Gens und dessen Funktion in der HGF-Suppression. Für die Untersuchungen der transkriptionellen Regulation des HGF-Gens wurden verschiedene exprimierende und nicht exprimierende Zelllinien herangezogen.

Für Reporteranalysen wurde die Expression der Reportergene unter Kontrolle des HGF-Promotors mit verschiedenen trunkierten 5'-flankierenden Sequenzen gestellt. Die Reporterassays wiesen nach Transfektion von nicht HGF-exprimierenden Zellen auf einen negativ regulierenden Sequenzbereich zwischen -70 und -270 hin. Mittels eines *in-vitro*-Footprints gelang es durch Lokalisierung einer Protein-DNA-Interaktion in der Region -260 bis -230 die Lage des reprimierenden Elements einzugrenzen. Dieser Bereich erwies sich als eine Multiconsensusregion (MCR), die Consensussequenzen für die Bindung von Transkriptionsfaktoren der NF1- und der AP2-Familie sowie zwei tandemartig angeordnete, potentielle Bindestellen für Helix-Loop-Helix-Proteine, sogenannte E-Boxen (E₁ und E₂), beinhaltet.

Die nachfolgende Analyse der Protein-DNA-Komplexe mit Hilfe von Elektromobilityshiftassays (EMSA) ergab eine starke Affinität der Multiconsensusregion zu nukleären Proteinextrakten aus diversen Zelllinien. Verdrängungsansätze mit mutierten Sequenzen wiesen die Spezifität der Bindungen nach. Mittels der Kompetitionsversuche konnte ein Komplex der E₁-Box und ein Komplex der NF1-Bindestelle zugeordnet werden.

Die vergleichenden EMSA-Bindungsstudien der E-Boxen mit Kernextrakten aus nicht HGF-exprimierenden und HGF-exprimierenden Zellen zeigten, dass die jeweiligen DNA-Protein-Komplexe unterschiedlich zusammengesetzt sind, und sprechen daher für einen zelltypspezifischen Einfluß der MCR auf die Regulation des HGF-Gens. Da E-Boxen Bindestellen für Helix-Loop-Helix(HLH)-Transkriptionsfaktoren sind, wurden zur Identifizierung der bindenden Proteine in HGF-exprimierenden und nicht exprimierenden Zelltypen Supershiftanalysen mit spezifischen Antikörpern gegen verschiedene HLH-Proteine und HLH-Leuzin-Zipper (LZ) Faktoren durchgeführt. Es konnte hierbei eine Interaktion mit den Faktoren USF und TFE3 aus der HLH-LZ-Familie nachgewiesen werden, während Myc oder die basalen HLH-Proteine E12, E47 keine Bindung eingingen. Bindungsstudien mit rekombinant exprimiertem USF und TFE3 bestätigten die USF- und TFE3-Interaktion mit den E-Boxen des HGF-Promotors. Hierbei zeigte sich, dass USF in sämtlichen untersuchten Zelllinien enthalten ist, während sich für TFE3 eine Zelltypspezifität zeigte.

In Reporterstudien wurde das Regulationsvermögen der Promotordelektionskonstrukte in Fibroblasten unter dem Einfluß einer rekombinanten USF1-Expression oder einer Expression einer USF1-Variante, die zwar die Proteininteraktions- aber nicht die DNA-Bindungsdomäne (USF1_BD) beinhaltet, untersucht. Es wurde gezeigt, dass nicht durch das USF1, sondern durch USF1_BD die Repression aufgehoben wird. Durch Mutation einzelner Bindungselemente der Multiconsensusregion konnte keine Veränderung der Promotoraktivität, gleich welches Element betroffen war, herbeigeführt werden. Dies weist auf eine interagierende Rolle von Bindungsfaktoren des reprimierenden Multiconsensusbereichs hin. Dabei scheint USF1 an der HGF-Suppression nicht nur durch direkte DNA-Bindung, sondern auch durch Vermittlung der Interaktion eines heteromeren DNA-Bindungskomplexes beteiligt zu sein.

Abstract

The Hepatocyte Growth Factor (HGF) is a multifunctional growth factor involved in organogenesis and organ regeneration. The cell-type specific and differentiation dependent regulation of the expression of the HGF gene is only partly understood. The subject of this thesis was the 5'-flanking region of the HGF gene and its function in the suppression of HGF. Reporter studies revealed a negative regulatory region between -70 and -270 after transfection of deletion constructs of the HGF 5'-flanking region in non-HGF expressing cells. With an *in-vitro* footprint this negative element could be localized in the sequence from -230 to -260. This identified region showed different putative regulatory elements (NF1, AP2, and HLH/LZ binding sites) and was therefore called a multi-consensus region (MCR). The following analyses of the protein DNA complexes with gel shift assays showed a strong affinity to nuclear proteins from different non-HGF and HGF expressing cell lines. In competition assays the complexes could be addressed to one HLH/LZ and the NF1 binding site. Supershift analysis with specific antibodies showed the involvement of the HLH/LZ transcription factors USF and TFE3. Other HLH proteins like c-Myc and E12/E47, however, did not participate in the protein DNA complexes. The interaction of USF and TFE3 with their binding sites could further confirmed through binding of recombinant expressed USF and TFE3 to an oligodimer containing the MCR. The role of USF for the transcription of the HGF gene were investigated by further reporter studies. These showed that USF plays not only a role through direct DNA binding, but also mediates the protein complex formation at the MCR.

Ehrenwörtliche Erklärung:

"Ich versichere, daß ich die von mir vorgelegte Dissertation selbständig angefertigt, die benutzten Quellen und Hilfsmittel vollständig angegeben und die Stellen der Arbeit - einschließlich Tabellen, Karten und Abbildungen -, die anderen Werken im Wortlaut oder dem Sinn nach entnommen sind, in jedem Einzelfall als Entlehnung kenntlich gemacht habe; daß diese Dissertation noch keiner anderen Fakultät oder Universität zur Prüfung vorgelegen hat; daß sie - abgesehen von unten angegebenen Teilpublikationen - noch nicht veröffentlicht worden ist sowie, daß ich eine solche Veröffentlichung vor Abschluß des Promotionsverfahrens nicht vornehmen werde. Die Bestimmungen dieser Promotionsordnung sind mir bekannt. Die von mir vorgelegte Dissertation ist von Prof. Dr. H.W. Klein betreut worden."

Teilpublikationen:

Spindler MP, Kerres K, Dienes HP, Schirmacher P, Odenthal M (2001): The Influence of Helix-Loop-Helix Proteins on the Expression of the Hepatocyte Growth Factor. In: Wisse E, Knook DL, de Zanger R, Arthur MJP (Eds.): Cells of the Hepatic Sinusoid, Vol 8, Leiden.

Persönliche Daten:

Name	Mark-Peter Spindler
Geburtsdatum	28.01.1973
Geburtsort	Oldenburg
Familienstand	ledig
Nationalität	deutsch

Schullaufbahn:

8/1979 - 7/1983	GS Ofen
8/1983 – 7/1985	OS Bad Zwischenahn
8/1985 – 1/1990	Gymnasium Bad Zwischenahn
1/1990 – 7/1992	Herbartgymnasium Oldenburg
7/1992	Abitur

Ersatzdienst:

1/1993 – 12/1998	Sanitätshelfer beim Katastrophenschutz der Stadt Oldenburg
1/1999 – 12/1999	Sanitätshelfer beim Deutschen Roten Kreuz, Köln

Studium:

10/1992 – 5/1998	Diplom-Studium der Chemie an der Carl-von-Ossietzky-Universität zu Oldenburg
5/1998	Studienabschluß mit Diplom
4/1999 – 3/2002	Promotionsstudium der Chemie an der Universität zu Köln

Promotion:

11/1998 – 2/2002	Praktische Arbeiten zur Erlangung der Promotionswürde der Math.-Nat. Fakultät am Inst. f. Pathologie der Uniklinik zu Köln
21.5.2002	Disputation

Lebenslauf
