

# **Untersuchungen zur Regulation von Neuregulin-1**

**Dissertation**

**zur Erlangung des akademischen Grades**

**Doktor der Naturwissenschaften**

**(Dr. rer. nat.)**

**Fakultät für Biologie**

**Universität Bielefeld**

**vorgelegt von**

**Timo Frensing**

**Dezember 2006**

---

<b>1</b>	<b>Zusammenfassung .....</b>	<b>1</b>
<b>2</b>	<b>Einleitung .....</b>	<b>2</b>
<b>2.1</b>	<b>Regulation der Genexpression in Eukaryonten.....</b>	<b>2</b>
2.1.1	Transkriptionelle Genregulation.....	3
2.1.2	Struktur des Kernpromotors .....	4
2.1.3	Transkriptionsfaktoren .....	6
<b>2.2</b>	<b>Die Neuregulin-Wachstumsfaktoren.....</b>	<b>8</b>
2.2.1	Die Neuregulin-1-Isoformen .....	9
2.2.2	Die Neuregulin-Rezeptoren .....	12
2.2.3	Funktionen des Neuregulin-1-Signalwegs .....	13
2.2.4	Neuregulin-1 in der Entwicklung des Nervensystems.....	14
2.2.5	Medizinische Relevanz des Neuregulin-1-Signalwegs .....	16
2.2.6	Proteolytische Prozessierung von Neuregulin-1-Isoformen.....	18
<b>2.3</b>	<b>Ziel der Arbeit .....</b>	<b>21</b>
<b>3</b>	<b>Ergebnisse .....</b>	<b>22</b>
<b>3.1</b>	<b>Neuregulin-Prozessierung durch ADAM10 .....</b>	<b>22</b>
3.1.1	Cotransfektion von Neuregulin-1 Typ I mit ADAM10 .....	22
3.1.2	Neuregulin-Prozessierung unter PMA-Stimulation .....	23
3.1.3	Lokalisation der cotransfizierten Proteine in COS-7 Zellen .....	25
<b>3.2</b>	<b>Charakterisierung des Neuregulin-1 Typ I-Promotors .....</b>	<b>27</b>
3.2.1	Bestimmung des Transkriptionsstartpunkts.....	27
3.2.2	Eingrenzung der Promotorregion durch Deletionskonstrukte .....	28
3.2.3	Mutagenese potentieller Transkriptionsfaktor-Bindestellen .....	32
3.2.4	Nachweis spezifischer Protein-DNA-Bindungen.....	35
3.2.5	Suche nach Transkriptionsfaktoren für die ZBP-Bindestelle.....	40
3.2.5.1	DNA-Affinitätsaufreinigung .....	40
3.2.5.2	Überexpression von Transkriptionsfaktoren im Reporter-gen-Versuch.....	42
3.2.5.3	Suche nach weiteren Transkriptionsfaktoren für die ZBP-Bindestelle.....	43
3.2.5.4	DNA-Affinitätsaufreinigung mit anschließender LC-ESI-Analyse .....	45
3.2.6	Aktivierung des Neuregulin-1 Typ I-Promotors durch NF $\kappa$ B .....	47
3.2.7	<i>In silico</i> Analyse der Neuregulin-1 Typ I-Promotorregion .....	49
<b>4</b>	<b>Diskussion .....</b>	<b>54</b>
<b>4.1</b>	<b>Beteiligung von ADAM10 am Neuregulin-Shedding .....</b>	<b>54</b>
<b>4.2</b>	<b>Analyse der transkriptionellen Nrg-1-Genregulation .....</b>	<b>56</b>
4.2.1	Bestimmung der Neuregulin-1 Typ I-Promotorregion .....	56
4.2.1.1	Die Cytidin-reiche Bindestelle.....	58
4.2.2	Der konservierte Kernpromotor von Nrg-1 Typ I-Isoformen.....	61
4.2.3	Aktivierung des Neuregulin-1 Typ I-Promotors durch NF $\kappa$ B .....	63
4.2.3.1	Überschneidungen der Signalwege von NF $\kappa$ B und Neuregulin-1 .....	65
4.2.4	Autokrine Nrg-1-Signalwirkung bei Krebserkrankungen .....	66
<b>4.3</b>	<b>Ausblick .....</b>	<b>68</b>
<b>5</b>	<b>Material und Methoden .....</b>	<b>70</b>

<b>5.1</b>	<b>Material</b> .....	<b>70</b>
5.1.1	Bakterienstämme.....	70
5.1.2	Zelllinien .....	70
5.1.3	Mausstämme .....	70
5.1.4	Vektoren .....	71
5.1.5	Oligonukleotide.....	71
5.1.6	Enzyme .....	73
5.1.7	DNA-Fragmentlängenstandards .....	74
5.1.8	Protein-Molekulargewichtsstandard.....	75
5.1.9	Antibiotika .....	75
5.1.10	Kits .....	75
5.1.11	Antikörper .....	76
5.1.12	<i>In silico</i> -Ressourcen .....	77
<b>5.2</b>	<b>Methoden</b> .....	<b>78</b>
5.2.1	Handhabung rekombinanter Bakterien .....	78
5.2.1.1	Anzucht.....	78
5.2.1.2	Glycerinkulturen.....	78
5.2.2	Arbeiten mit RNA.....	79
5.2.2.1	RNA-Isolierung (total-RNA Präparation).....	79
5.2.2.2	mRNA Präparation .....	80
5.2.2.3	RNA-Konzentrationsbestimmung .....	80
5.2.2.4	RNA-Minigele .....	80
5.2.2.5	RACE ( <i>Rapid Amplification of cDNA Ends</i> ).....	81
5.2.2.6	Reverse Transkription .....	82
5.2.3	Arbeiten mit DNA.....	82
5.2.3.1	Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR).....	82
5.2.3.2	Agarosegelelektrophorese.....	85
5.2.3.3	DNA-Extraktion aus Agarosegelen.....	86
5.2.3.4	Klonierung von PCR-Produkten .....	86
5.2.3.5	DNA-Transformation.....	86
5.2.3.6	Plasmid-DNA-Isolierung aus Bakterien .....	87
5.2.3.7	Konzentrationsbestimmung von DNA.....	89
5.2.3.8	Restriktionsspaltung von DNA.....	90
5.2.3.9	DNA-Ligation .....	90
5.2.3.10	Fällung der DNA .....	91
5.2.3.11	Zielgerichtete <i>in vitro</i> Mutagenese.....	91
5.2.4	Zellkultur-Methoden.....	92
5.2.4.1	Kultivierung von Zellen .....	92
5.2.4.2	Langzeit-Lagerung von Zellen .....	93
5.2.4.3	Transiente Transfektion.....	94
5.2.4.4	Immuncytochemie .....	95
5.2.5	Proteinpräparation und Analyse .....	95
5.2.5.1	Proteinpräparation von Zellkulturzellen und Zellkulturüberständen.....	95
5.2.5.2	Extraktion von nukleären Proteinen.....	96
5.2.5.3	Protein-Konzentrationsbestimmung .....	97
5.2.5.4	<i>Electrophoretic Mobility Shift Assay</i> (EMSA).....	98
5.2.5.5	DNA-Affinitäts-Aufreinigung.....	98
5.2.5.6	SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE).....	100
5.2.5.7	Coomassie-Färbung.....	101
5.2.5.8	Massenspektroskopie von Proteinen (Maldi-TOF und LC-ESI).....	102
5.2.5.9	Western-Blot.....	103
5.2.5.10	South-Western Blot .....	104
5.2.6	Promotor-Reportergergen Untersuchungen .....	105

---

<b>6</b>	<b>Literatur.....</b>	<b>107</b>
<b>7</b>	<b>Anhang.....</b>	<b>121</b>
7.1	Sequenz der Neuregulin-1 Typ I-Promotorregion.....	121
7.2	Abkürzungsverzeichnis .....	122

# 1 Zusammenfassung

Die Aktivität von Polypeptid-Wachstumsfaktoren, die die Proliferation und Differenzierung von Zellen beeinflussen, muss während der Entwicklung vielzelliger Organismen strikt reguliert werden, um ein unkontrolliertes Zellwachstum wie bei Krebserkrankungen zu vermeiden. Neuregulin-1 (Nrg-1) Typ I-Isoformen sind Wachstumsfaktoren, die in Säugetieren eine essentielle Rolle bei der Herzentwicklung spielen, an der Entwicklung und Erhaltung des Nervensystems beteiligt sind und wichtige Funktionen bei der epithelialen Morphogenese wie der Brustdrüsenentwicklung ausüben. Eine Fehlregulation des Nrg-1-Signalwegs kann schwerwiegende pathologische Folgen haben. So findet man eine Überexpression von Nrg-1 in verschiedenartigen Krebserkrankungen und eine konstitutive autokrine Signalübertragung von Nrg-1 fördert das Tumorwachstum und begünstigt die Bildung von Metastasen.

Unterschiedliche Regulationsmechanismen des Nrg-1-Signalwegs sind bekannt. Nrg-1 Typ I-Isoformen werden überwiegend als membranständige Pro-Formen gebildet und eine parakrine Signalübertragung erfordert die proteolytische Freisetzung des extrazellulären Bereichs. In dieser Arbeit wurde eine Beteiligung der Protease ADAM10 an der Prozessierung untersucht. Bei der Coexpression von ADAM10 mit Nrg-1 konnte jedoch weder eine Spaltung noch eine Kolo-kalisation der beiden Proteine festgestellt werden.

Zudem wurde in der vorliegenden Arbeit die transkriptionelle Regulation von Nrg-1 analysiert. In der Maus konnte eine Cytidin-reiche Bindestelle identifiziert werden, deren Mutation in Promotor-Reporter-Gen-Versuchen eine verminderte Aktivität zur Folge hatte. An dieser Bindestelle wurden sequenzspezifische Protein-DNA-Bindungen gezeigt und über DNA-Affinitätsaufreinigungen wurden die Transkriptionsfaktoren hnRNP-K und PSF isoliert, die demzufolge an der Expression von Nrg-1 Typ I-Isoformen beteiligt sein könnten.

Des Weiteren konnte die Position des Kernpromotors von Nrg-1 Typ I-Isoformen durch die Bestimmung der Transkriptionsstartpunkte ermittelt werden. Dieser in Vertebraten hochkonservierte Kernpromotor enthält GC- und GT-Box-Elemente, für die Sp1 und ZBP-89 als potentielle Transkriptionsfaktoren gelten. Die Überexpression von ZBP-89 hat eine verringerte Nrg-1 Typ I-Promotoraktivität hervorgerufen, während die Expression von Sp1 eine Verstärkung der Aktivität verursachte. Außerdem konnte in dieser konservierten Promotorregion eine funktionale NF $\kappa$ B-Bindestelle identifiziert werden und die Überexpression des NF $\kappa$ B-Proteins p65 führte zu einem starken Anstieg der Nrg-1 Typ I-Promotoraktivität.

Von Sp1 und NF $\kappa$ B ist bekannt, dass ihre transkriptionellen Aktivitäten durch den Nrg-1-Signalweg stimuliert werden können. Aufgrund der hier vorgestellten Ergebnisse könnten Sp1 und NF $\kappa$ B an einer Autoaktivierung von Nrg-1 beteiligt sein, die möglicherweise bei Krebserkrankungen die autokrine Nrg-1-Signalübertragung verstärkt.

## 2 Einleitung

### 2.1 Regulation der Genexpression in Eukaryonten

Ein vielzelliger Organismus wie der Mensch besteht aus hunderten verschiedener Zelltypen, wobei jede dieser Zellen die komplette Erbinformation in sich trägt. Die Entwicklung dieser verschiedenen Zelltypen beruht auf differentieller Genexpression. So gibt es neben den so genannten *House Keeping*-Genen, deren Genprodukte von jeder Zelle benötigt werden und daher auch in jeder Zelle exprimiert werden, viele Gene, deren Expression einer strikten Regulation unterliegen. Die Zelle aktiviert und exprimiert nur die Gene, die sie für ihre physiologische Aufgabe benötigt, nicht benötigte Gene werden nicht aktiviert oder sogar aktiv abgeschaltet. Auf diese Weise wird in einer bestimmten Zelle zu einem bestimmten Zeitpunkt in ihrer Entwicklung nur eine bestimmte Anzahl an Genen exprimiert.

Eine fehlerhafte Expression bestimmter Gene kann für den Organismus schwerwiegende pathologische Folgen haben. So kann die Fehlregulation von Onkogenen, zu denen verschiedene Transkriptionsfaktoren, Wachstumsfaktoren, Rezeptoren und auch Kinasen gehören, zu der Bildung von Tumoren führen. Im späteren Verlauf der Arbeit wird als Beispiel hierfür die Bedeutung des Wachstumsfaktors Neuregulin-1 und seiner Rezeptoren ErbB1 bis ErbB4 bei Krebserkrankungen dargestellt.

Die Regulation der Expression kann an verschiedenen Schritten auf dem Weg vom Gen zum Protein erfolgen. Man unterscheidet generell die transkriptionelle und die posttranskriptionelle Genregulation. Zu der transkriptionellen Genregulation zählen die Mechanismen, die die Bildung des Primärtranskripts steuern. Hierbei spielt vor allem die Initiation der Transkription eine entscheidende Rolle, aber auch die sogenannte *Promoter Clearance*, die Elongation der Transkription und ihre Termination bieten Möglichkeiten zur Regulation. Die posttranskriptionelle Genregulation umfasst die Schritte der Prozessierung des Primärtranskripts, also das *Capping*, das Spleißen sowie die Polyadenylierung. Des Weiteren zählen der mRNA-Transport aus dem Nukleus in das Cytoplasma, die mRNA-Stabilität, die mRNA-Lokalisierung und die Translationseffizienz zu den Prozessen, bei denen posttranskriptionelle Genregulation stattfinden kann.

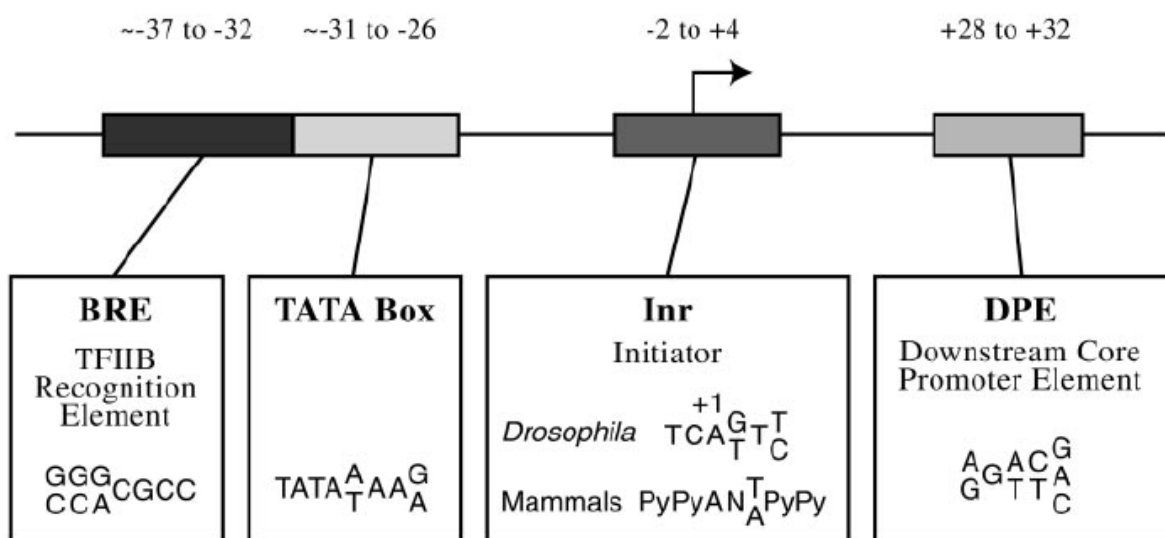
## 2.1.1 Transkriptionelle Regulation

Wie bereits zuvor erwähnt, spielt die Initiation der Transkription eine entscheidende Rolle bei der Genregulation (Wray et al., 2003). Bei diesem Prozess assembliert sich die Transkriptions-Maschinerie an dem Kernpromotor, der den Transkriptionsstartpunkt umgibt. Der sich dabei bildende Präinitiationskomplex (PIC) besteht aus den basalen oder generellen Transkriptionsfaktoren (GTFs) TFIIA, TFIIB, TFIID, TFII E, TFII F und TFIIF und der RNA-Polymerase II. Die RNA-Polymerase II ist ein etwa 500 kDa großer Proteinkomplex, der in eukaryontischen Zellen die Transkription proteinkodierender Gene durch RNA-Synthese an der DNA-Matrize katalysiert (Ogbourne und Antalis, 1998). Die sequenzspezifische Erkennung des Kernpromotors wird häufig durch die GTFs TFIIB oder TFIID vermittelt (Butler und Kadonaga, 2002). *In vitro* ist die Bildung des Präinitiationskomplexes aus GTFs und RNA-Polymerase II notwendig und auch ausreichend, um die korrekte Initiation der Transkription zu bewirken. *In vivo* wird die Initiation der Transkription jedoch durch eine Vielzahl weiterer Faktoren beeinflusst. So liegt die DNA in eukaryontischen Zellen in dicht gepackten und hoch organisierten Nukleoprotein-Strukturen vor, dem so genannten Chromatin. Die DNA ist dabei um Nukleosomen gewunden, die wiederum aus Histonen bestehen. DNA-Regionen, die nicht transkribiert werden, befinden sich in besonders hoch kondensiertem Heterochromatin und Regionen, die exprimiert werden, sind in besser zugänglichen Euchromatin organisiert. Somit haben Proteine, die die Organisation des Chromatins steuern, einen regulatorischen Einfluss auf die Genexpression (Orphanides und Reinberg, 2002). Zudem regulieren *Enhancer* und *Silencer* die Rate der Transkription, indem sie die Assemblierung der Transkriptions-Maschinerie und deren Stabilität beeinflussen. *Enhancer* und *Silencer* sind DNA-Abschnitte, die häufig unmittelbar *upstream* vom Kernpromotor liegen und an die Transkriptionsfaktoren (TFs) sequenzspezifisch binden. Die Transkriptionsfaktoren können teilweise selber mit der Transkriptions-Maschinerie interagieren oder sie rekrutieren Coregulatoren, die eine Interaktion vermitteln (Ogbourne und Antalis, 1998). Aufgrund der dreidimensionalen Strukturen, in denen die DNA vorliegt, können sich die *Enhancer* und *Silencer* auch in großer Entfernung von teilweise über 100kb *upstream* oder *downstream* vom Kernpromotor befinden und dennoch mit der Transkriptions-Maschinerie an dem Kernpromotor interagieren (Wray et al., 2003).

Die Genexpression wird *in vivo* also durch das komplexe Zusammenspiel von aktivierenden *Enhancern* und hemmenden *Silencern* reguliert, die wiederum von extrazellulären physiologischen Signalen beeinflusst werden können. So wirken extrazelluläre Signalmoleküle über Rezeptoraktivierungen und intrazelluläre Signalkaskaden auf die Aktivität von Transkriptionsfaktoren und somit auf die Genexpression (Novina und Roy, 1996).

### 2.1.2 Struktur des Kernpromotors

Als erstes Kernpromotor-Element wurde 1979 die TATA-Box von Goldberg und Hogness beschrieben. Dabei handelt es sich um das Sequenzmotiv TATAAA, das in vielen Promotoren bei Metazoen 25 bis 30bp *upstream* vom Transkriptionsstartpunkt liegt. Die TATA-Box dient als Erkennungssequenz für das TATA-Box Binde-Protein (TBP), welches eine Untereinheit vom GTF TFIID ist und somit die Assemblierung der GTFs und der RNA-Polymerase II an der TATA-Box ermöglicht. Viele Studien haben gezeigt, dass auch andere AT-reiche Sequenzen als TATA-Box dienen können, was zu der Entwicklung der Konsensus-Sequenz geführt hat, die in der folgenden Abbildung dargestellt wird:



**Abbildung 2.1: Kernpromotor-Elemente.** Schematische Darstellung einiger Sequenzmotive, die in Kernpromotoren vorkommen können. Ein bestimmter Promotor kann alle, einige oder auch keines dieser dargestellten Elemente enthalten. Die Positionsangaben sind in Basenpaaren relativ zum Transkriptionsstartpunkt +1, der durch einen Pfeil gekennzeichnet ist, gezeigt. (Abbildung aus Smale und Kadonaga, 2003)



Ein weiteres Sequenzmotiv, das man in mehreren Kernpromotoren findet, ist das Initiator-Element (Inr), welches zuerst von Grosschedl und Birnstiel (1980) untersucht wurde. In einem Promotor mit TATA-Box wird durch das Inr der Transkriptionsstartpunkt festgelegt und die Transkriptionsrate erhöht. Das Inr kann aber auch unabhängig in Promotoren ohne TATA-Box den Transkriptionsstartpunkt festlegen. In diesem Fall kann die Transkriptionsmaschinerie je nach untersuchtem Promotor durch verschiedene Faktoren an das Inr-Element gebunden werden. Zu den Inr-Binde-Proteinen zählt, wie bei der TATA-Box, der GTF TFIID, sowie die sequenzspezifischen DNA-Binde-Proteine TFII-I und YY1. Auch die RNA-Polymerase II selbst zeigt eine geringe Affinität zu dem Inr-Element (Butler und Kadonaga, 2002). Aus der Studie von Javahery et al. (1994) hat sich das von Pyrimidinen umgebene Sequenzmotiv Py-Py-A<sub>+1</sub>-N-T/A-Py-Py als Konsensus-Sequenz für das Inr-Element in Säugetieren entwickelt.

Das *Downstream Promoter Element* (DPE) kommt überwiegend in Promotoren vor, die keine TATA-Box jedoch ein Inr-Element aufweisen. Es stellt in Verbindung mit dem Inr-Element eine Erkennungssequenz für den GTF TFIID dar (Smale, 1997). Obwohl DPE und TATA-Box beides Erkennungssequenzen für TFIID sind, konnten Willy et al. (2000) zeigen, dass der Faktor NC2 (auch Dr1-Drp1 genannt) die TATA-abhängige Transkription hemmt und die DPE-abhängige Transkription aktiviert. Somit bietet NC2/Dr1-Drp1 die Möglichkeit, TATA- und DPE-abhängige Transkription unterschiedlich zu regulieren.

Das *TFIIB Recognition Element* (BRE) liegt in einigen TATA-Box-Promotoren unmittelbar vor der TATA-Box und ist eine sequenzspezifische Bindestelle für den GTF TFIIB. Durch BRE kann die TATA-abhängige Transkription abgeschwächt werden (Smale und Kadonaga, 2003).

Nach Suzuki et al. (2001) liegen von den untersuchten 1031 humanen Kernpromotoren etwa die Hälfte in CpG-Inseln. Diese 0,5 bis 2kb großen Bereiche weisen eine erhöhte Häufigkeit von CG-Dinukleotiden (CpG) auf, die im restlichen Genom von Vertebraten eher unterrepräsentiert sind. In einer methylierten CG-Abfolge kommt es häufig zu einer Deaminierung des Cytosin, wodurch ein Thymin entsteht. Daher sind CpG-Inseln nur in Bereichen zu finden, die einem Selektionsdruck für diese CpG-Dinukleotide unterliegen (Gardiner-Garden und Frommer, 1987). Promotoren in CpG-Inseln enthalten häufig keine TATA-Box, Inr-Elemente oder DPE und zeigen entgegen der bisher beschriebenen Kernpromotoren

multiple Transkriptionsstartpunkte, die in einer etwa 100bp-Region liegen können (Smale und Kadonaga, 2003). Zudem findet man vielfach in diesen Promotoren Bindestellen für den Transkriptionsfaktor Sp1.

Weiterhin sind Promotoren bekannt, die keine der bisher beschriebenen Sequenzmotive aufweisen. Die Vermutung liegt daher nahe, dass viele Kernpromotor-Elemente bislang noch nicht identifiziert worden sind.

Die Heterogenität der Kernpromotoren in Eukaryonten bietet bereits eine molekulare Grundlage, um die differentielle Genexpression zu steuern (Novina und Roy, 1996).

### **2.1.3 Transkriptionsfaktoren**

Die Bedeutung von spezifischen Transkriptionsfaktor-Bindestellen für die Regulation der Genexpression wurde schon Anfang der 80er Jahre erkannt. So konnten Pelham et al. 1982 zeigen, dass durch das Sequenzmotiv CTnGAAnnTTCnAG die hitze-induzierbare Expression der Hitzeschockproteine in der Fruchtfliege reguliert wird.

Weitere Studien haben ergeben, dass über 5% der menschlichen Gene Transkriptionsfaktoren kodieren und somit einen wesentlichen Teil des Genoms ausmachen (Tupler et al., 2001). Zudem hat die Analyse von experimentell untersuchten Promotoren zu der Einschätzung geführt, dass ein eukaryontischer Promotor durchschnittlich 10-50 TF-Bindestellen für etwa 5-15 verschiedene TFs enthält (Wray et al., 2003).

Die computergestützte Vorhersage von TF-Bindestellen in einer regulatorischen Region hat sich aufgrund der kurzen und teilweise variablen Erkennungssequenzen als schwierig erwiesen. Für die spezifische Erkennung einer Bindestelle sind in der Regel nicht mehr als 5 Nukleotide (*core sequence*) notwendig, die von weniger spezifischen Nukleotiden umgeben werden, so dass die Bindung sich über einen Bereich von 10-20 Nukleotiden erstreckt (Pennacchio und Rubin 2001, Wray et al, 2003).

Charakteristisch für Transkriptionsfaktoren ist ein modularer Aufbau der Proteine, bei dem einzelne Domänen der Proteine bestimmte Aufgaben erfüllen. Zunächst besitzen TFs eine DNA-Binde-Domäne, mit der sie an spezifische Sequenzmotive in der Promotorregion oder in entfernten *Enhancern* binden können. Es sind verschiedene DNA-Binde-Domänen bekannt, nach denen man die TFs in Gruppen

einteilt. So gibt es beispielsweise Helix-turn-helix-, Zink-Finger-, Leucin-Zipper- oder Helix-loop-helix-Binde-Domänen (Yang, 1998). Des Weiteren findet man Domänen, die durch Protein-Protein-Interaktion auf die Assemblierung oder die Stabilität der Transkriptionsmaschinerie wirken. Andere Domänen für Protein-Protein-Interaktionen vermitteln die Rekrutierung von Coregulatoren oder die Ausbildung von Homo- oder Heterodimeren (Remenyi et al., 2004). Die so genannten nukleären Rezeptoren besitzen Domänen für die Bindung von Liganden, wie Steroidhormone, die ihre Aktivität beeinflussen (Latchman, 1997).

Die Mechanismen, mit denen die TFs die Transkriptionsrate des Zielgens beeinflussen, sind sehr vielfältig. TFs wirken direkt oder indirekt (über Coregulatoren) auf die Assemblierung und Stabilität der Transkriptionsmaschinerie. Zudem beeinflussen TFs die Bindemöglichkeiten und Aktivitäten von anderen TFs. Sie können durch ihre Bindung die Konformation der DNA verändern und damit die Zugänglichkeit für weitere Faktoren verändern. Manche TFs dienen als Bindeglied zwischen entfernt liegenden *Enhancern* und dem Kernpromotor, in dem sie DNA-Loops stabilisieren. Wieder andere TFs rekrutieren Enzymkomplexe, die Einfluss auf die Chromatin- oder Nukleosomen-Struktur nehmen. Ebenso vielfältig sind die Mechanismen, die die Aktivitäten der einzelnen TFs kontrollieren. So spielt die Regulation ihrer Expression eine Rolle, posttranslationale Prozesse wie Phosphorylierungen oder die Bindung von Liganden regulieren ihre Aktivität und Wechselwirkungen mit anderen Proteinen bestimmen ihre intrazelluläre Lokalisierung oder ihre DNA-Bindeeigenschaften (Latchman, 1990; Lemon und Tjian, 2000; Levine und Tjian, 2003; Kadonaga, 2004; Villard 2004).

So wird durch das komplexe Zusammenspiel von TFs, Coregulatoren, Chromatin-modifizierenden Proteinkomplexen und der Transkriptionsmaschinerie die Transkriptionsrate eines Gens reguliert, die letztendlich auf der DNA-Sequenz des Promotors und der zugehörigen *Enhancer* und *Silencer* beruht (Orphanides und Reinberg, 2002).

## 2.2 Die Neuregulin-Wachstumsfaktoren

Die unterschiedlichen Zelltypen eines vielzelligen Organismus entstehen durch die differenzielle Genexpression. Die räumliche und funktionale Organisation der Zelltypen wird durch Zell-Zell-Interaktionen ermöglicht, bei denen Polypeptid-Wachstumsfaktoren eine wichtige Rolle spielen. Diese Wachstumsfaktoren dienen als Signalmoleküle, die Vorgänge wie Zellwachstum, Differenzierung und Proliferation beeinflussen. Dabei erfolgt die Signalübertragung über die Bindung der Signalmoleküle an spezifische Rezeptoren der Zielzelle, die dadurch aktiviert werden und intrazelluläre Signalkaskaden auslösen, die wiederum die Genexpression beeinflussen.

Die Neureguline bilden eine Familie strukturell verwandter Polypeptid-Wachstumsfaktoren, die an vielen Aspekten der Säugetier-Entwicklung beteiligt sind. Alle vier Mitglieder dieser Protein-Familie, Neuregulin-1 bis Neuregulin-4, verfügen über eine *epidermal growth factor-like* (EGF-ähnliche) Domäne, welche die Bindung und Aktivierung der so genannten ErbB-Rezeptoren ermöglicht. Die ErbB-Rezeptoren besitzen eine Rezeptor-Tyrosin-Kinase-Aktivität, die nach erfolgter Ligandenbindung intrazelluläre Signalkaskaden auslöst (Buonanno und Fischbach, 2001).

In den frühen 90er Jahren wurde Neuregulin-1 (Nrg-1) von vier unabhängigen Forschergruppen als Wachstumsfaktor identifiziert. Die klonierten Isoformen wurden jedoch zunächst nach ihren biologischen Aktivitäten benannt und es entstanden die Bezeichnungen: *neu differentiation factor* (NDF; Wen et al., 1992), *heregulin* (HRG; Holmes et al., 1992), *acetyl-choline inducing activity* (ARIA; Falls et al., 1993) und *glial growth factor* (GGF; Marchionni et al., 1993). Später stellte sich heraus, dass diese Isoformen Produkte eines Gens sind und es wurde der Name Neuregulin eingeführt (Marchionni et al., 1993; Lemke, 1993; Meyer und Birchmeier 1994).

Nrg-1 wird während der Embryonalentwicklung sowie im Erwachsenenalter im Nervensystem von Neuronen und Gliazellen exprimiert. Man findet Nrg-1-Isoformen aber auch in anderen Organen wie Herz, Lunge, Leber, Magen, Niere, Milz und in der Haut (Buonanno und Fischbach, 2001). Die umfangreichen Funktionen von Nrg-1 wurden intensiv untersucht und werden in den späteren Kapiteln dargestellt.

Die weiteren Mitglieder der Neuregulin-Protein-Familie wurden aufgrund der Homologien ihrer EGF-ähnlichen Domänen identifiziert. Neuregulin-2 wurde auch im Nervensystem nachgewiesen, sowie in den Organen Herz, Lunge und Harnblase (Carraway III et al., 1997; Chang et al., 1997; Higashiyama et al., 1997). Von Nrg-2 sind ebenfalls verschiedene Isoformen beschrieben worden, die teils als Don-1 (*divergent of neuregulin-1*; Busfield et al., 1997) oder NTAK (*neural- and thymus-derived activator for the ErbB kinase*; Yamada et al., 2000) bezeichnet wurden. Die Expressionsmuster von Nrg-1 und Nrg-2 im Zentralen Nervensystem (ZNS) weisen bei genauer Betrachtung kaum Überlappungen auf, was auf unterschiedliche Funktionen hindeutet (Longart et al., 2004). Nrg-2-Knockouts zeigen keinen so drastischen Phänotyp wie Nrg-1-Knockouts (embryonal letal), haben aber Wachstumsstörungen und eine geringere Reproduktionsrate (Britto et al., 2004).

Die Expression von Neuregulin-3 beschränkt sich im embryonalen wie im adulten Zustand hauptsächlich auf neuronale Gewebe (Zhang et al., 1997). Erst kürzlich wurde auch eine alternative Isoform von Nrg-3 beschrieben, die das Überleben von Oligodendrozyten fördert (Carteron et al., 2006). Weiterhin konnte eine Beteiligung von Nrg-3 an der Brustdrüsenentwicklung und der Entstehung von Brustkrebs gezeigt werden (Dunn et al., 2004; Howard et al., 2005).

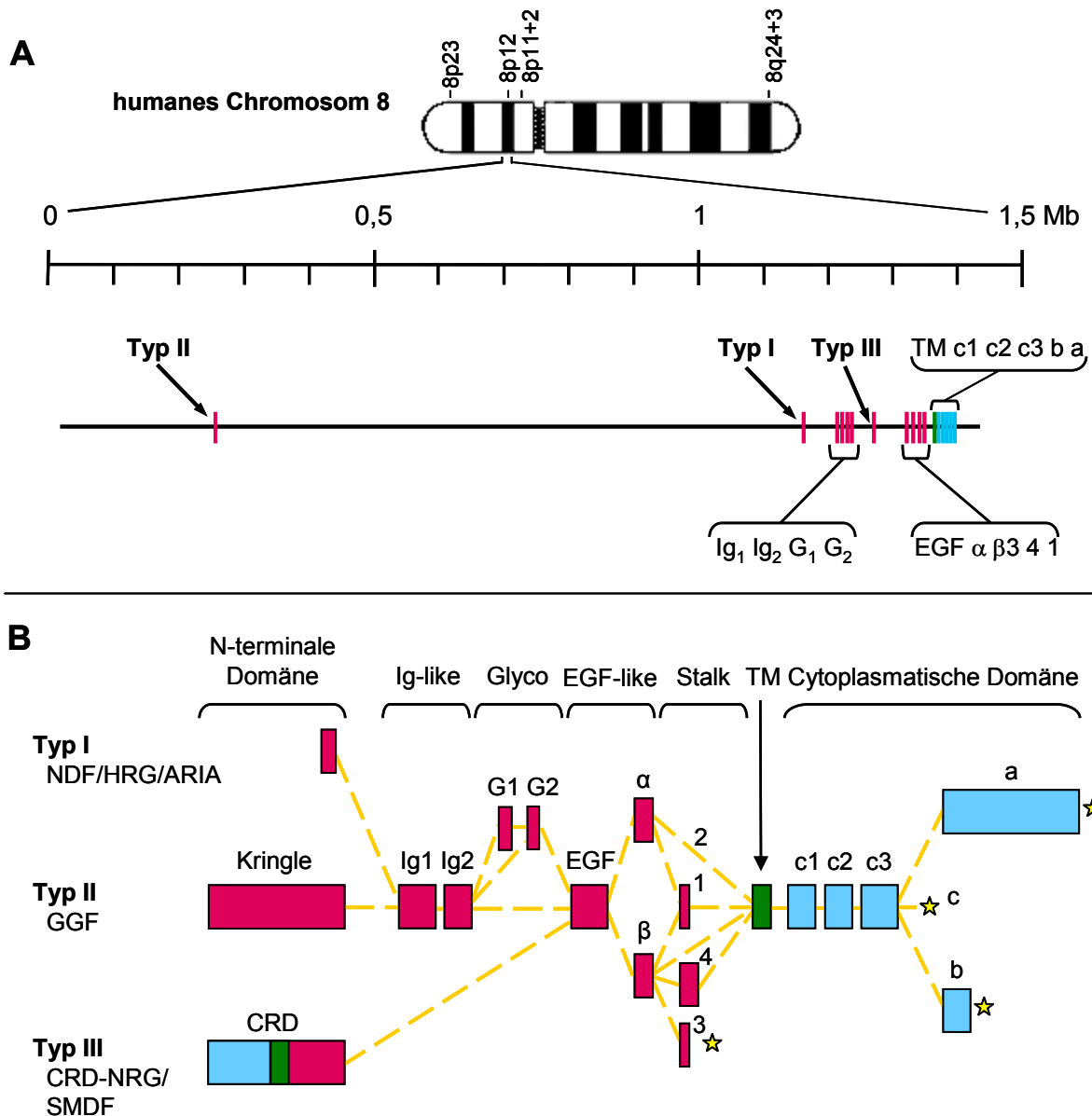
Neuregulin-4 hingegen konnte nicht in neuronalem Geweben nachgewiesen werden, sondern wurde in der Bauchspeicheldrüse und in geringem Umfang in Skelettmuskeln gefunden (Harari et al., 1999). Außerdem konnte die Nrg-4-Expression bei einigen Brustkrebsarten gezeigt werden (Dunn et al., 2004). Über die Funktionen von Nrg-4 ist bislang noch nichts bekannt.

### **2.2.1 Die Neuregulin-1-Isoformen**

Das Neuregulin-1 Gen kartiert bei Mensch und Maus auf dem Chromosom 8 (Orr-Urtreger et al., 1993). Es besteht aus mindestens 18 Exons, die im Menschen in einer etwa 1,4Mb großen Region liegen, von der aber nur ca. 0,3% proteinkodierend sind (Falls, 2003a). Von Nrg-1 sind 16 verschiedene Isoformen beschrieben worden, die durch alternatives Spleißen und die Nutzung von mindestens drei Promotoren gebildet werden (Esper et al., 2006).

Für die Bezeichnungen der vielen Isoformen wurde eine systematische Nomenklatur eingeführt (Burden und Yarden, 1997; Meyer et al., 1997). Dabei werden die

Isoformen entsprechend ihrer N-terminalen Domänen in die drei Gruppen Typ I-III eingeteilt (siehe Abbildung 2.2).



**Abbildung 2.2: Das humane Neuregulin-1 Gen und die Struktur der Isoformen** (verändert nach Falls, 2003a). **A** Das humane Nrg-1 Gen (Genbank BK000383) liegt auf dem kurzen Arm von Chromosom 8. Die Exons der bekannten Nrg-1-Isoformen sind durch vertikale Linien dargestellt. Ihre Bezeichnung erfolgte bezugnehmend auf die von ihnen kodierten Proteindomänen. **B** Schematische Darstellung der Nrg-1 Isoformen-Struktur. Die gelben Linien deuten die möglichen Zusammensetzungen der Isoformen an. Übereinanderstehende Domänen werden alternativ verwendet. Die Isoformen werden nach ihren N-terminalen Domänen in die drei Gruppen Typ I-III unterteilt. Rot dargestellt ist der extrazelluläre und blau der intrazelluläre Bereich des Proteins. Die Transmembrandomäne (TM) ist grün. Eine Sonderstellung nimmt die CRD (*cysteine-rich domain*) von Typ III-Isoformen ein, die eine zweite Transmembrandomäne enthält und deren N-terminaler Bereich ebenfalls cytoplasmatisch vorliegt. Ig-like = Immunglobulin-ähnliche Domäne; Glyco = glykosilierte Spacer-Domäne; EGF-like = *epidermal growth factor*-ähnliche Domäne mit  $\alpha$ - und  $\beta$ -Variante; Stalk- oder Juxta-Membran-Domäne mit den Varianten 1, 2 (ohne zusätzliches Exon) und 4 in membranständigen Isoformen und 3 in löslichen Proteinen; cytoplasmatische Domäne, die als a-, b- oder c-Schwanz vorliegen kann; durch Sterne sind die möglichen Stoppcodons dargestellt.

Typ I Neureguline, zu denen die zuvor beschriebenen Isoformen NDF, ARIA und Heregulin gehören, besitzen eine Immunglobulin-ähnliche (Ig)-Domäne gefolgt von einer glykosilierten Spacer-Domäne. Die Typ II-Isoformen haben ebenfalls die Ig-Domäne, der allerdings die so genannte Kringle-Domäne vorausgeht und der in diesen Isoformen keine glykosilierte Spacer-Domäne folgt. GGF zählt zu den Typ II-Isoformen. Der erste Vertreter der Typ III-Isoformen wurde von Ho et al. (1995) beschrieben und als *sensory and motor neuron-derived factor* (SMDF) bezeichnet. In den Typ III-Isoformen findet man N-terminal eine Cystein-reiche Domäne (CRD), die einen hydrophoben Bereich enthält, der als Transmembrandomäne fungiert (Schroering und Carey, 1998).

Alle Isoformen enthalten die signalübertragende EGF-ähnliche Domäne, die aus etwa 50 Aminosäuren besteht und immer mindestens sechs Cysteine enthält, die zur Bildung der drei charakteristischen Cysteinbrücken beitragen. Durch alternatives Spleißen entstehen  $\alpha$ - und  $\beta$ -Varianten der EGF-Domäne. Diese unterscheiden sich in der Aminosäuresequenz vor und hinter dem sechsten Cystein, wodurch unterschiedliche Rezeptor-Bindungsaffinitäten entstehen (Holmes et al., 1992; Wen et al., 1994).

Von der sich anschließenden Juxta-Membran-Domäne, auch Stalk-Region genannt, gibt es insgesamt vier Varianten, die sich in ihrer Länge unterscheiden. Dabei folgt den Varianten 1, 2 und 4 die Transmembrandomäne. Isoformen mit diesen Domänen bilden membranständige Proteine. Transkripte der Form 3 tragen ein Stopp-Codon in der Stalk-Region, so dass im Falle von Typ I- und II-Isoformen lösliche Proteine gebildet werden. Bei Typ III-Isoformen sind diese Varianten über die CRD-Domäne in der Membran verankert.

Bei den membranständigen Isoformen findet man drei verschiedene cytoplasmatische Domänen, die als a-, b- und c-Schwanz bezeichnet werden und sich in ihrer Länge unterscheiden.

Nach dieser systematischen Nomenklatur wird beispielsweise die als ARIA identifizierte Isoform als Nrg-1 Typ I $\beta$ 1a bezeichnet. ARIA hat eine Ig-Domäne gefolgt von der glykosylierten Spacer-Domäne, des weiteren eine EGF- $\beta$ -Domäne, die Variante 1 der Juxta-Membran-Domäne, also auch die Transmembrandomäne und einen a-Schwanz.

Steinthorsdottir et al. (2004) haben zudem beim Menschen neun weitere Exons beschrieben, mit denen drei weitere Nrg-1 Typen IV-VI gebildet werden können. Die

Funktionen dieser neuen Isoformen konnte noch nicht bestimmt werden und nur drei der neuen Exons liegen auch konserviert in der Maus und in der Ratte vor.

## **2.2.2 Die Neuregulin-Rezeptoren**

Die Neuregulin-Signale werden von den Zielzellen über Mitglieder der ErbB-Rezeptor-Familie aufgenommen, die eine Untergruppe der Rezeptor-Tyrosin-Kinasen darstellen. Bisher sind vier Mitglieder dieser Familie identifiziert worden, die mit ErbB1 bis ErbB4 bezeichnet werden. Ihre charakteristische Struktur besteht aus einem extrazellulären Bereich, der zwei Cystein-reiche Boxen enthält und die Liganden-Bindung vermittelt, einer Transmembrandomäne und einem cytoplasmatischen Bereich, der die Tyrosin-Kinase-Aktivität trägt (Lemke 1996; Citri et al., 2003).

Neuregulin-Isoformen können mittels ihrer EGF-ähnlichen Domäne, die hinreichend und notwendig für die Bindung an die Rezeptoren ist (Fischbach und Rosen, 1997), an die beiden Rezeptoren ErbB3 und ErbB4 binden. Die Bindung der Neuregulin-Isoformen führt zu einer Konformationsänderung der Rezeptoren, wodurch eine Rezeptor-Dimerisierung und Aktivierung der Tyrosin-Kinase-Aktivität erfolgt. Durch die Tyrosin-Kinase-Aktivität werden intrazelluläre Signalkaskaden ausgelöst (Yarden und Sliwkowski, 2001).

Die beiden Rezeptoren ErbB1 und ErbB2 können Neuregulin nicht direkt binden, aber mit aktivierten ErbB3- oder ErbB4-Rezeptoren Heterodimere bilden und so zur Signalweiterleitung beitragen. Der Rezeptor ErbB3 ist auf die Ausbildung solcher Heterodimere angewiesen, da er eine katalytisch inaktive cytoplasmatische Domäne aufweist. Somit ist nur ErbB4 in der Lage, die Signalweiterleitung neben der Ausbildung von Heterodimeren mit den anderen Rezeptoren auch über die Ausbildung von Homodimeren zu gewährleisten (Crone und Lee, 2002).

Auch wenn die bei allen Isoformen vorhandene EGF-ähnliche Domäne ausreicht, um die Rezeptoren zu aktivieren, so haben die unterschiedlichen Neuregulin-Isoformen jedoch eine unterschiedliche Affinität zu den Rezeptoren und favorisieren unterschiedliche Dimer-Kombinationen. Des Weiteren können die vier Rezeptoren verschiedene intrazelluläre Signalwege aktivieren. Aber auch dieselbe Rezeptor-Kombination kann durch die Bindung verschiedener Neuregulin-Isoformen vermutlich verschiedene spezifische Signalwege aktivieren. Durch diese Eigenschaften werden



die Vielfalt und die Spezifität der durch Neuregulin vermittelten Signale weiter erhöht (Buonanno und Fischbach, 2001).

### **2.2.3 Funktionen des Neuregulin-1-Signalwegs**

Die Neuregulin-1-Isoformen erfüllen eine Vielzahl von Funktionen in der Entwicklung und Erhaltung des Nervensystems von Vertebraten. Sie beeinflussen die Migration von Neuronen, sind an der Ausbildung von neuromuskulären Synapsen beteiligt und wirken auf die Differenzierung, Proliferation und das Überleben von Glia-Zellen. Sie haben weiterhin entscheidende Bedeutung in der Herzentwicklung und der epithelialen Morphogenese wie der Brustdrüsenentwicklung.

Um die Funktionen des Neuregulin-Signalsystems untersuchen zu können, wurden gezielte Mutationen in das Neuregulin-1-Gen und in die rezeptorkodierenden Gene eingebracht. So wurden Knockout-Mäuse der Rezeptoren ErbB2, ErbB3 und ErbB4 generiert und alle Neuregulin-1-Isoformen wurden durch Deletion der EGF-ähnlichen Domäne ausgeschaltet. Daneben existieren Knockout-Mäuse, bei denen spezifische Domänen ausgeschaltet wurden, so dass nur bestimmte Neuregulin-1-Isoformen nicht mehr gebildet werden können. Hierzu zählen die Deletionen der Ig-Domäne, der cytoplasmatischen Domäne, der CRD, der EGF $\alpha$ -Varianten und der Transmembrandomäne, die im Folgenden dargestellt werden.

Die 1995 von verschiedenen Gruppen unabhängig voneinander vorgestellten Knockouts von Neuregulin-1 (Meyer et al., 1995), des ErbB2-Rezeptors (Lee et al., 1995) und des ErbB4-Rezeptors (Gassman et al., 1995) zeigten alle bei homozygoten Deletionsmäusen einen Defekt in der Herzentwicklung, der zum Tod am Tag 10,5 der Embryonalentwicklung führte. Zu diesem Zeitpunkt der Herzentwicklung wird Neuregulin von Endothelzellen des Endocards exprimiert. Es wirkt parakrin auf die benachbarte Muskelschicht der Ventrikelwand, dem Myocard, in dem die beiden Rezeptoren ErbB2 und ErbB4 exprimiert werden, und induziert dort die Ausbildung von Trabeculae. Dies sind fingerähnliche Ausstülpungen, die den gleichmäßigen Blutfluss während der frühen Herzentwicklung gewährleisten. In den drei Knockout-Mäusen werden diese Trabeculae nicht ausgebildet, was zum Tod der Embryonen führt (Carraway III, 1996; Lemke, 1996). Der gleiche Phänotyp tritt ebenfalls bei Deletion der Ig-Domäne (Kramer et al., 1996) auf, aufgrund derer keine Typ I und Typ II Neuregulin-Isoformen mehr gebildet werden können. Auch die von

Liu et al. (1998) generierte Deletion der cytoplasmatischen Domäne, wodurch eine Prozessierung membranständiger Isoformen verhindert wird, als auch die Deletion der Transmembrandomäne (Steffanson et al., 2002), bei der keine membranständigen Isoformen auftreten können, zeigen diesen Herzdefekt. Da Expressionsstudien gezeigt haben, dass nur Typ I-Isoformen zu diesem Zeitpunkt im Endocard exprimiert werden, muss eine membranständige Typ I-Isoform für die Ausbildung der Trabeculae verantwortlich sein (Meyer et al., 1997).

Die Deletion des ErbB3-Rezeptors (Erickson et al., 1997) führt in homozygoten Deletionsmäusen zu einem anderen Herzdefekt. So findet die Trabeculation noch statt, die Herzklappen, die aus dem endothelialen Kissen entstehen, sind jedoch nur rudimentär vorhanden, so dass die Tiere am Tag 13,5 der Embryonalentwicklung sterben (Burden und Yarden, 1997). Somit sind Neuregulin-Isoformen und bestimmte Rezeptor-Kombinationen an mindestens zwei Aspekten der Herzentwicklung beteiligt.

Ein völlig anderes Bild ergibt sich bei der Deletion der CRD, wodurch keine Typ III-Isoformen gebildet werden können (Wolpowitz et al., 2000). Die betroffenen Mäuse sterben direkt nach der Geburt, da bei ihnen keine Atmung einsetzt. Dieser Phänotyp beruht auf einer schlechten Innervation der Atemmuskulatur. Verursacht wird dies durch eine gestörte Neuronen-Schwann-Zellen-Interaktion verursacht wird, die zum Neuronentod von sensorischen und motorischen Neuronen führt (Falls, 2003a).

Mäuse mit einer Mutation, die nur die  $\alpha$ -Variante der EGF-ähnlichen Domäne betrifft, sind lebensfähig und zeigen keine Verhaltensauffälligkeiten oder Veränderungen im Nervensystem (Li et al., 2002). Bei Schwangerschaften dieser Mäuse kommt es jedoch zu einer fehlerhaften Brustdrüsenentwicklung.

#### **2.2.4 Neuregulin-1 in der Entwicklung des Nervensystems**

Das Neuregulin-Signalsystem ist für die Ausbildung bestimmter von der Neuralleiste abgeleiteter Gewebe von entscheidender Bedeutung. Neuralleistenzellen wandern während der Entwicklung vom sich bildenden Hinterhirn zu bestimmten Orten im Körper und tragen dort zur Ausbildung von sensorischen Ganglien und Spinalganglien des peripheren Nervensystems (PNS) bei. Knockouts von Neuregulin-1 (Deletion der EGF-Domäne), der Ig-Domäne oder des ErbB2-Rezeptors führen in homozygoten Knockout-Mäusen zum Verlust von

Neuraleistenzellen in den cranialen sensorischen Ganglien. Zudem sind diese Ganglien nur ansatzweise oder gar nicht mit dem Hinterhirn verbunden (Carraway III, 1996; Burden und Yarden, 1997). Bei Ausschaltung des ErbB3-Rezeptors wird derselbe Phänotyp beobachtet, die Ausprägung ist jedoch weniger stark (Erickson et al., 1997). Dagegen führt der Knockout des ErbB4-Rezeptors weder zum Verlust von Zellen der cranial sensorischen Ganglien noch zum Verlust der Verbindungen zum Hinterhirn. Stattdessen findet man, dass die Ganglien V, VII und VIII an falscher Stelle lokalisiert und beinahe fusioniert vorliegen und zudem ein abweichendes Verbindungsmuster zum Hinterhirn zeigen. (Lemke, 1996). Somit beeinflusst der Neuregulin-Signalweg die Proliferation, Migration und das Überleben von Neuraleistenzellen, wobei Typ I-Isoformen (mit Ig-Domäne) eine wichtige Rolle spielen.

Neuregulin spielt ebenfalls eine Rolle bei der Interaktion von Neuronen mit Gliazellen, die eine gerichtete Migration der Neuronen im cerebralen Cortex und im Cerebellum ermöglicht (Crone und Lee, 2002).

Sowohl im peripheren als auch im zentralen Nervensystem wirken Neuregulin-Isoformen auf die Differenzierung, Proliferation und das Überleben von Glia-Zellen. So zeigen Knockouts der Cystein-reichen Domäne (Typ III), des ErbB3- und des ErbB2-Rezeptors, wenn der letale Herzphänotyp durch ErbB2-Expression im Myocard umgangen wird (*heart rescue*), einen Mangel an Schwann'schen Zellen (Wolpowitz et al., 2000; Woldeyesus et al., 1999; Morris et al., 1999). Man findet in diesen Mutanten noch geringe Mengen von Schwann'schen Vorläuferzellen, die aber nicht mehr zu Schwann-Zellen reifen. Oligodendrozyten, die myelin-bildenden Glia-Zellen des ZNS, benötigen für ihre Reifung ebenfalls Neuregulin (Vartanian et al., 1999). Auch bei dieser Entwicklung sind Typ III Isoformen mit CRD von Bedeutung (Calaora et al., 2001).

Neuregulin-1 Typ I-Isoformen beeinflussen die Expression von Untereinheiten des NMDA- (N-Methyl-D-Aspartat-) Rezeptors und des GABA- ( $\gamma$ -Aminobuttersäure-) Rezeptors. Beide sind Transmitter-kontrollierte Ionenkanäle (Ozaki et al., 1997; Ozaki et al., 2000). Die ErbB2- und ErbB4-Rezeptoren findet man in hoher Konzentration in postsynaptischen Bereichen, wo sie mit Proteinen in Wechselwirkung treten, die wichtige Signalkaskaden in den Neuronen auslösen (Buonanno und Fischbach, 2001). Somit können durch Neuregulin die Aktivitäten von Ionenkanälen und anderer Rezeptoren der Neuronen, sowie intrazelluläre Prozesse

beeinflusst werden. Durch dieses Potential wird dem Neuregulin-Signalweg eine wichtige Rolle in der Regulation der synaptischen Plastizität eingeräumt, die für die Entwicklung und Funktion des Nervensystems entscheidend ist (Ozaki, 2002).

## 2.2.5 Medizinische Relevanz des Neuregulin-1-Signalwegs

Durch die zahlreichen Funktionen, die der Neuregulin-1-Signalweg während der Entwicklung und Erhaltung des Nervensystems, im Herzen und bei der epithelialen Morphogenese erfüllt, sind viele Krankheitsbilder bekannt, bei denen die Fehlregulation des Nrg-1-Signalwegs als ursächlich bzw. beitragend angesehen wird. Hierzu werden einige Krebserkrankungen gezählt. Bei anderen Krankheiten, wie Kardiomyopathien oder Multiple Sklerose, wird die therapeutische Wirkung von rekombinant-hergestellten Nrg-Isoformen untersucht. Einige Krankheiten, die durch den Nrg-1-Signalweg beeinflusst werden, sind in der Tabelle 2.1 dargestellt:

Gewebe/ Organ	Nrg-1 Funktionen	Krankheiten	Referenzen
Zentrales Nervensystem	Regulation von Ionenkanälen, Oligodendrozyten-Entwicklung und Myelinisierung, Neuronen-Migration	Schizophrenie, Schlaganfall, Multiple Sklerose Glioblastom	Stefansson et al., 2002 Xu et al., 2004 Viehover et al., 2001 Westphal et al., 1997
Peripheres Nervensystem	Schwann-Zell-Entwicklung und periphere Myelinisierung	Neuropathien, Schwannoma	ter Laak et al., 2000 Hansen et al., 2006
Herz	Entwicklung der Trabeculae, Herzklappe und des Reizleitungssystems, Kardiomyozyten-Entwicklung	Kardiotoxizität von Trastuzumab (Herceptin), Kardiomyopathien	Pugatsch et al., 2006  Liu et al., 2006
Brustdrüse	Brustdrüsen-Entwicklung und Laktation	Mammakarzinom	Stove und Bracke, 2004
Lunge	Entwicklung des Lugenepithels	Lungenkrebs	Dammann et al., 2003

**Tabelle 2.1: Auswahl von Neuregulin-1-Wirkungsorten den bekannten Funktionen und Krankheiten, die in diesen Bereichen durch den Neuregulin-1-Signalweg beeinflusst werden.**

Besonders intensiv wurde in den vergangenen Jahren die Beteiligung des Nrg-Signalwegs bei der Entstehung von Brustkrebs und im Zusammenhang mit Schizophrenie untersucht.

Schizophrenie ist eine schwerwiegende psychiatrische Erkrankung, von der etwa 0,5 bis 1% der Erdbevölkerung betroffen sind (Ross et al., 2006). Das Krankheitsbild weist eine große Heterogenität in Symptomatik, Neuropathie und Verlauf auf,

aufgrund dessen eine multifaktorielle Entstehung der Krankheit angenommen wird (Stefansson et al., 2004). Schizophrenie wird unter anderem von genetischen Faktoren hervorgerufen, so liegt die Konkordanzrate bei monozygoten Zwillingen zwischen 41 und 65% (Corfas et al., 2004). Die molekular-genetischen Mechanismen sind jedoch weitestgehend unbekannt. Durch Kopplungs- und Assoziationsstudien konnten mehrere chromosomale Loci ermittelt werden, die Kandidaten- bzw. Risikogene für die Schizophrenie enthalten. So wurde durch die Feinkartierung eines Bereichs auf dem humanen Chromosom 8 Neuregulin-1 als Kandidatengen identifiziert (Stefansson et al., 2002). Die Funktionen des Nrg-1-Signalwegs passen gut zu den bislang aufgestellten Hypothesen zur Entstehung der Schizophrenie. So wird vermutet, dass Schizophrenie durch eine fehlerhafte Hirnentwicklung verursacht wird, was durch den Einfluss von Nrg-1 auf die Neuronenmigration hervorgerufen werden könnte. Als weitere mögliche Ursache wurde eine fehlerhafte Myelinisierung angenommen, die sowohl bei Schwann'schen Zellen als auch bei Oligodendrozyten von Neuregulin-1 Typ III-Isoformen reguliert wird (Corfas et al., 2004). Die Hinweise mehren sich, dass Schizophrenie durch eine Veränderung in der glutamergen Signalweiterleitung im Gehirn verursacht wird (Coyle et al., 2003; Moghaddam, 2003). Passend hierzu haben Hahn et al. (2006) zeigen können, dass in Schizophrenie-Patienten eine NMDA-Rezeptor-Hypofunktion durch veränderte Nrg-1-ErbB4-Signalwirkung vorliegt.

Brustkrebs gehört zu den am häufigsten auftretenden Krebsarten und ist die zweithäufigste Todesursache durch Krebserkrankung bei Frauen (Navolanic et al., 2003). Eine erhebliche Anzahl der Brustkrebsfälle zeigt eine Störung des Neuregulin-ErbB-Signalwegs auf. So liegt in 20-30% der Fälle eine Amplifikation des ErbB2-Gens (bis zu 200 Kopien) vor, die zu einer fehlerhaften Signalübertragung führt und mit einer schlechten Prognose für die Betroffenen einhergeht (Citri et al., 2003).

Der monoklonale ErbB2-Antikörper Trastuzumab (Herceptin<sup>TM</sup>) wird in klinischen Tests eingesetzt, um die Proliferation von Brustkrebszellen, die ErbB2 überexprimieren, herabzusetzen. In diesen klinischen Studien zeigten sich jedoch Nebenwirkungen. So haben Patienten, die mit Trastuzumab behandelt wurden, ein erhöhtes Risiko für Herzversagen (Schneider et al., 2002). Es stellte sich heraus, dass Trastuzumab in humanen Kardiomyozyten-Kulturen strukturelle und funktionelle Veränderungen hervorruft (Schneider et al., 2001) und somit kardiotoxisch wirkt (Pugatsch et al., 2006).

Weitere 30% der Brustkrebsfälle zeigen keine ErbB-2-Überexpression, aber eine Neuregulin-Überexpression, die ebenfalls zu einer Störung im Nrg-ErbB-Signalweg führt und durch eine autokrine Signalwirkung das Tumorwachstum sowie die Bildung von Metastasen fördert (Tsai et al., 2003). Bislang ist nur relativ wenig über die Regulation der Neuregulin-1-Expression bekannt (Stove und Bracke, 2004). Dabei könnte die Manipulation der Neuregulin-Signalwirkung einen therapeutischen Nutzen für Patienten haben, die nicht ErbB2, sondern Nrg überexprimieren (Li et al., 2004). Eine autokrine Nrg-1-Signalübertragung und veränderte Nrg-Expression wurde auch in anderen Krebsarten festgestellt und führt ebenso bei Darmkrebs (Venkateswarlu et al., 2002), bei Lungenkrebs (Gollamudi et al., 2004), beim ovarialen Karzinom (Gilmour et al., 2002), bei Schwannomen (Hansen und Linthicum, 2004) und bei Glioblastomen (Westphal et al., 1997) zu verstärktem Tumorwachstum und teilweise zur Entstehung von metastasierenden malignen Tumoren. Daher ist das Verständnis der Regulation der Neuregulin-Expression von entscheidender Bedeutung.

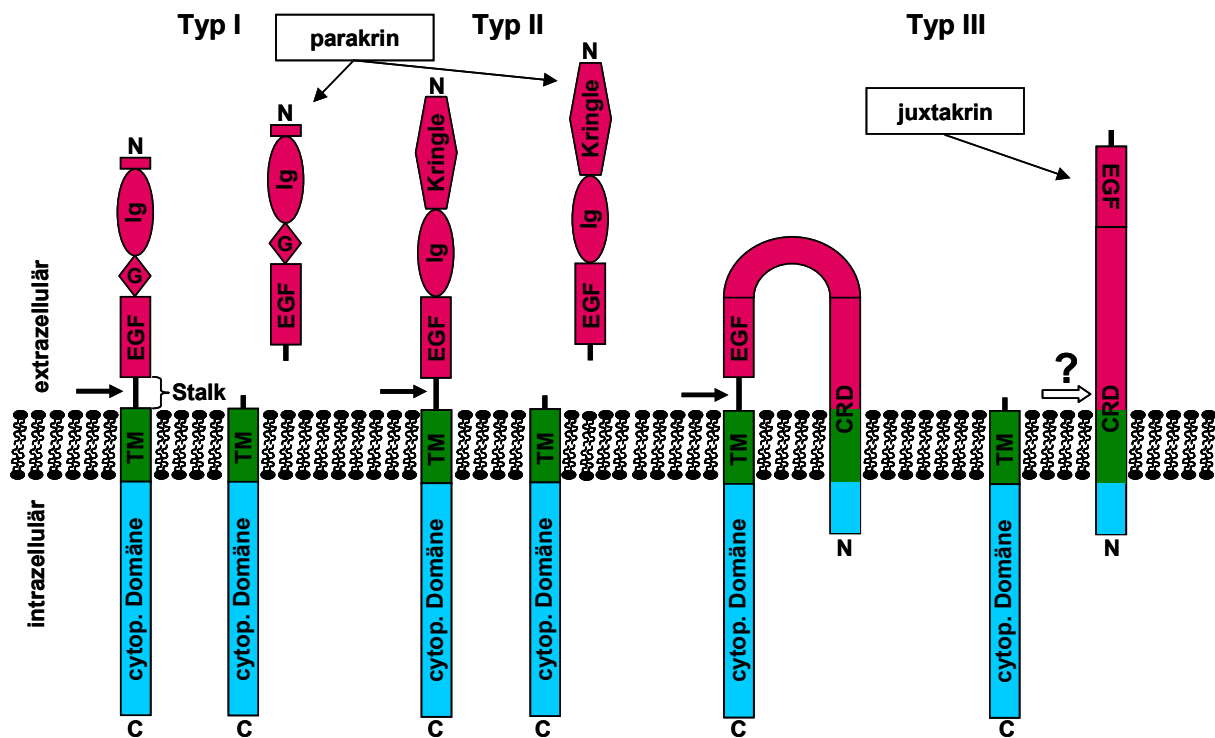
### 2.2.6 Proteolytische Prozessierung von Neuregulin-1-Isoformen

Die membranständigen Neuregulin-1-Isoformen können eine parakrine Signalübertragung nur nach proteolytischer Prozessierung, auch *Shedding* genannt, ausüben. Dabei wird der extrazelluläre signalübertragende Bereich der membranständigen Pro-Form freigesetzt (siehe Abbildung 2.3). Liu et al. (1998) konnten zeigen, dass das *Shedding* während der Herzentwicklung ein notwendiger Schritt ist. So führte die Deletion der cytoplasmatischen Domäne, die für das *Shedding* benötigt wird, in homozygoten Deletionsmäusen zum selben letalen Herzdefekt am Tag 10,5 der Embryonalentwicklung wie in Neuregulin-1-Knockout-Mäusen.

Die proteolytische Prozessierung von Neuregulin kann durch Stimulation des Protein Kinase C (PKC)-Signalwegs mit dem Phorbolster PMA verstärkt werden (Loeb et al., 1998). Hohe Zinkkonzentration über 1mM  $Zn^{2+}$  hemmt hingegen das *Shedding*, was für die Beteiligung von zinkabhängigen Metalloproteasen spricht, da diese durch hohe Zinkkonzentrationen inhibiert werden (Han und Fischbach, 1999).

Zu Beginn der vorliegenden Arbeit war für zwei zinkabhängige Metalloproteasen der ADAM (*a disintegrin and metalloprotease*)-Proteinfamilie nachgewiesen worden, dass sie an der Prozessierung von Neuregulin-1 Typ I-Isoformen beteiligt sind. So

findet in Zellen, die eine inaktive Form der Protease TACE (*tumor necrosis factor- $\alpha$  converting enzyme*, auch ADAM17 genannt) bilden, kein Shedding statt (Montero et al., 2000). Die Expression der katalytisch aktiven Form von TACE in diesen Zellen führt hingegen zu verstärktem *Shedding* (Montero et al., 2002). Eine Überexpression der Protease Meltrin  $\beta$  (ADAM19) führte in Neuregulin-exprimierenden Zellen zu einer verstärkten Prozessierung (Shirakabe et al., 2001).



**Abbildung 2.3: Proteolytische Prozessierung membranständiger Neuregulin-1-Isoformen.** Schematische Darstellung membranständiger Isoformen. Die durch schwarze Pfeile symbolisierte proteolytische Spaltung in der Stalk-Region führt bei Typ I- und Typ II-Isoformen zur Freisetzung des extrazellulären signalübertragenden Teils und ermöglicht so eine parakrine Signalübertragung. Bei den Typ III-Isoformen führt die proteolytische Spaltung in der Stalk-Region von der zweifach- zu einer einfach-membranständigen Form, die auf der Zelloberfläche eine juxtakrine Signalübertragung an benachbarte Zellen ermöglicht. Eine Freisetzung dieser Form, die durch eine Spaltung in der CRD-Domäne (weißer Pfeil) erreicht wird, wurde in Zellkulturzellen nur in sehr geringem Maße beobachtet und es ist unklar, ob eine solche Prozessierung eine physiologische Bedeutung *in vivo* hat (Wang et al., 2001). Der extrazelluläre Bereich ist in rot dargestellt, Transmembrandomänen sind grün und der intrazelluläre Bereich ist blau. Die Domänenstruktur der Isoformen wird gezeigt (siehe auch Abbildung 2.2), wobei G für die glykosilierte Spacer-Domäne steht.

Die Prozessierung membranständiger Neuregulin-1 Typ III-Isoformen unterscheidet sich von denen der Typ I-Isoformen. Die Isoform Typ III $\beta$ 1a wird in Zellkultur zwar deutlich stärker auf der Zelloberfläche exponiert als Typ I $\beta$ 1a, aber man findet bei Typ III $\beta$ 1a wesentlich weniger prozessierte lösliche Fragmente im Medium (Wang et al., 2001). Die Freisetzung des signalübertragenden Bereichs mit EGF-ähnlicher Domäne würde aufgrund der zweiten Transmembrandomäne eine weitere

proteolytische Spaltung innerhalb der CRD-Domäne voraussetzen. Ob eine zweite Prozessierung *in vivo* stattfindet bzw. eine physiologische Bedeutung hat ist noch unklar. Mehrere Studien zur Funktion von Typ III-Isoformen bei der Interaktion von Neuronen mit Schwann'schen Zellen oder mit Oligodendrozyten deuten darauf hin, dass die Typ III-Isoformen ihre Funktion durch juxtakrine Signalwirkung bei Zell-Zell-Kontakt ausüben (Falls, 2003a).

Für die Neuregulin-Rezeptoren ErbB2 und ErbB4 wurden ebenfalls eine proteolytische Prozessierung und Freisetzung des extrazellulären Bereichs beschrieben (Rio et al., 2000; Molina et al., 2001). Durch das *Shedding* der Rezeptoren könnte die Signalwirkung von freigesetztem Neuregulin abgeschwächt und somit reguliert werden (Sanderson et al., 2006). Eine umgekehrte Signalwirkung, bei der lösliche ErbB-Rezeptor-Dimere an membranständige Neuregulin-Isoformen binden, wird ebenfalls diskutiert. So konnten Bao et al. (2003) zeigen, dass durch Rezeptor-Dimer-Bindung an die Isoform Typ III $\beta$ 1a eine  $\gamma$ -Sekretase abhängige proteolytische Freisetzung und Translokation der cytoplasmatischen Domäne in den Nukleus stattfindet. Dies hatte einen Einfluss auf die Expression bestimmter Gene.

Die proteolytische Prozessierung der membranständigen Pro-Formen bietet somit eine Möglichkeit der Regulation des Neuregulin-1-Signalwegs (Blobel, 2005). Hierdurch wird vor allem die parakrine Signalwirkung gesteuert, bei der die proteolytische Freisetzung des signalübertragenden Teils notwendig ist. Die therapeutische Manipulation des *Sheddings* bietet daher eine Möglichkeit für die Behandlung von Krankheiten, bei denen eine Störung im Neuregulin-ErbB-Signalweg vorliegt (Sanderson et al., 2006).

Bislang wurden jedoch noch nicht alle Proteasen identifiziert, die an der Neuregulin-Prozessierung beteiligt sind. Dies wird deutlich, wenn man die Phänotypen der Neuregulin-1-Knockouts mit den Knockouts der bislang identifizierten Proteasen ADAM17 und 19 vergleicht (Blobel, 2005). Wie oben beschrieben führt das Fehlen der proteolytischen Neuregulin-1-Prozessierung zu dem embryonal letalen Herzdefekt am Tag 10,5 (Liu et al., 1998). Der Knockout von ADAM19 weist ebenfalls einen Herzdefekt auf (Kurohara et al., 2004). Dieser Defekt unterscheidet sich aber von dem Herzdefekt in Neuregulin-Knockouts und führt bei etwa 80% der homozygoten Deletionsmäuse zum Tod in den ersten postnatalen Tagen (Zhou et



al., 2004). Die Inaktivierung von ADAM17 ist auch postnatal letal und wird ebenfalls durch einen Herzdefekt hervorgerufen (Jackson et al., 2003). Daher kommen diese beiden Proteasen nicht für das Neuregulin-1-*Shedding* bei der Herzentwicklung in Frage.

Für die katalytisch aktive Metalloprotease ADAM10, die ein weites Expressionsmuster aufweist und von den Funktionen im Nervensystem und bei der Herzentwicklung beschrieben wurden (Novak, 2004), war zu Beginn dieser Arbeit noch nicht bekannt, ob ADAM10 an dem Neuregulin-1-*Shedding* beteiligt ist. ADAM10-Knockouts sterben während der Embryonalentwicklung am Tag 9,5 und zeigen Fehlentwicklungen des Nervensystems und des Herzens (Hartmann et al., 2002). Somit lassen diese Knockout-Mäuse nicht direkt erkennen, ob ADAM10 an der Neuregulin-Prozessierung beteiligt ist, schließen es aber auf Grund der früheren Letalität auch nicht aus.

## **2.3 Ziel der Arbeit**

Ziel der vorliegenden Arbeit war es, einen Beitrag zum Verständnis der Regulation des Neuregulin-1-Signalwegs zu leisten. Durch die Identifizierung der zugrunde liegenden regulatorischen Mechanismen könnten wichtige Erkenntnisse über Erkrankungen gewonnen werden, bei denen eine Fehlregulation dieses Signalwegs vorliegt. Daraus würde sich der Nutzen von gezielten therapeutischen Manipulationen des Signalwegs besser einschätzen lassen.

Zum einen sollte gezeigt werden, ob die Metalloprotease ADAM10 an der proteolytischen Prozessierung von membranständigen Neuregulin-1 Typ I-Isoformen beteiligt ist.

Zum anderen sollte die transkriptionelle Regulation dieser Neuregulin-1 Typ I-Isoformen untersucht werden. Hierzu sollte der Promotorbereich dieser Isoformen charakterisiert werden und Transkriptionsfaktoren sollten identifiziert werden, die in dem Promotorbereich spezifisch binden und die Neuregulin-Expression beeinflussen.

## 3 Ergebnisse

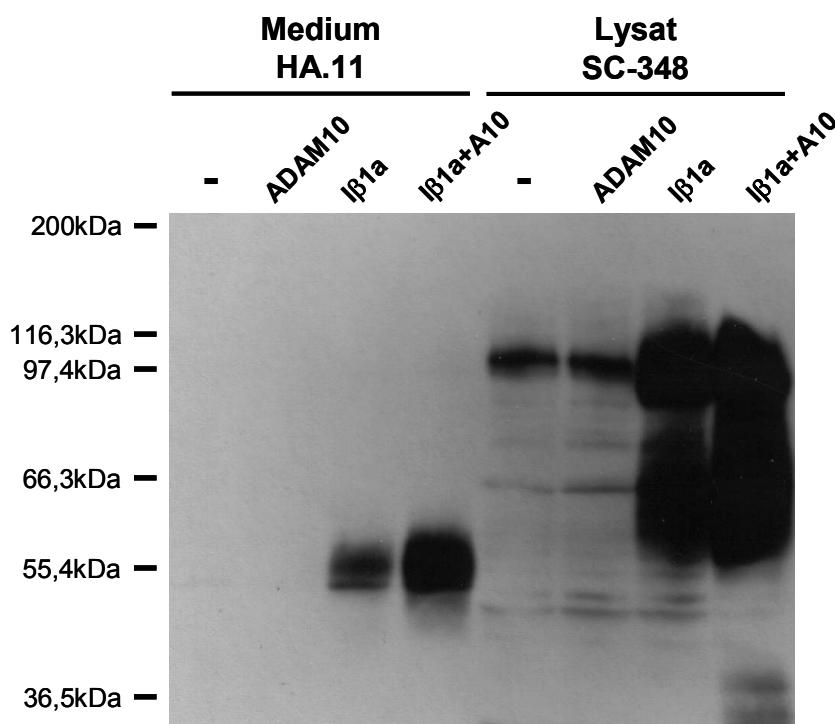
### 3.1 Neuregulin-Prozessierung durch ADAM10

#### 3.1.1 Cotransfektion von Neuregulin-1 Typ I mit ADAM10

Für die parakrine Signalübertragung durch membranständige Neuregulin-Isoformen ist eine proteolytische Prozessierung nötig, bei der der signalübertragende N-terminale Bereich des Proteins freigesetzt wird (siehe Kapitel 2.2.6). Eine mögliche Beteiligung der Metalloprotease ADAM10 an der Prozessierung membranständiger Neuregulin-1 Typ I-Isoformen sollte durch eine Cotransfektion von ADAM10 mit der Nrg-Isoform Typ I  $\beta$ 1a untersucht werden. Dabei sollte gezeigt werden, ob die Überexpression von ADAM10 zusammen mit Typ I  $\beta$ 1a zu einer verstärkten Freisetzung des signalübertragenden N-terminalen Bereichs führt.

COS-7 Zellen wurden mit Expressionsvektoren für Typ I  $\beta$ 1a und ADAM10 transfiziert, wobei das Neuregulin-konstrukt pcDNA3-I $\beta$ 1aHA verwendet wurde, in dem ein HA-Epitop im N-terminalen Bereich für die spätere Immundetektion im Western-Blot vorliegt. 24 Stunden nach der Transfektion wurde das Wachstumsmedium durch serumfreies Medium ersetzt und nach weiteren 24 Stunden Inkubationszeit erfolgte die Proteinpräparation dieser Zellen und ihrer Zellkultur-Überständen. Die Überstände und Zelllysate wurden in SDS-Polyacrylamidgelen aufgetrennt und in einem Western-Blot untersucht.

Mit dem Antikörper HA.11 (Covance) konnte das N-terminale Spaltprodukt im Medium bei etwa 55kDa nachgewiesen werden. Durch den Antikörper SC-348 (Santa Cruz) konnten das C-terminale Spaltprodukt bei etwa 60kDa, sowie die ungespaltene Isoform Typ I  $\beta$ 1a bei etwa 105kDa in den Zelllysaten gezeigt werden (siehe Abb. 3.14). In dem Medium der Zellen, in die Neuregulin und ADAM10 cotransfiziert wurden, konnte hierbei eine größere Menge des N-terminalen Spaltprodukts nachgewiesen werden als im Medium der Proben, in denen Neuregulin alleine transfiziert wurde. Somit wurde durch die Überexpression von ADAM10 eine verstärkte proteolytische Spaltung von Nrg-1 Typ I  $\beta$ 1a in den COS-7 Zellen hervorgerufen. Dieses Ergebnis sollte durch weitere Experimente bestätigt werden.

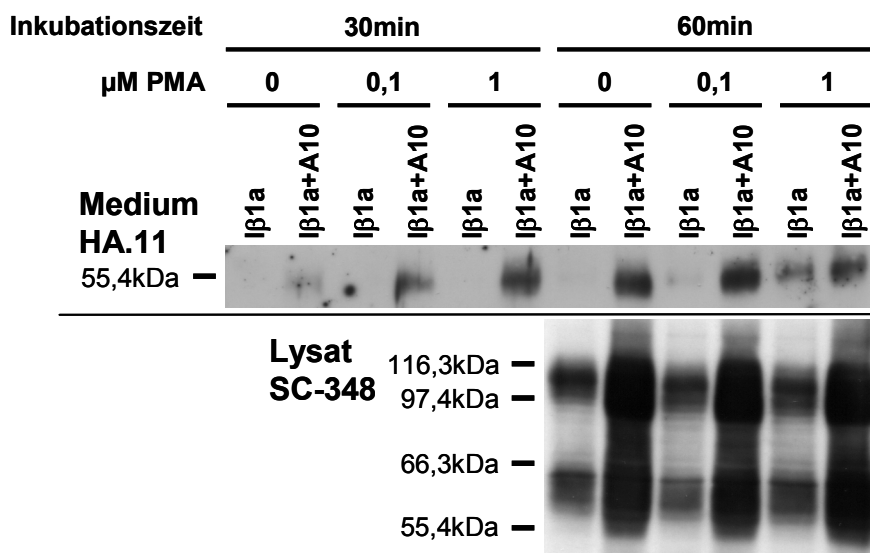


**Abbildung 3.1: Cotransfektion von Neuregulin und ADAM10 in COS-7 Zellen.** Die Überexpression von ADAM10 führte zu einer verstärkten Freisetzung des signalübertragenden N-terminalen Bereichs der Nrg-1 Isoform Typ I $\beta$ 1a in das Medium. COS-7 Zellen wurden mit ADAM10 und/oder mit Nrg-1 Typ I $\beta$ 1a (mit HA-Epitop) transfiziert. 24h nach der Transfektion erfolgte ein Mediumswechsel auf serumfreies Medium, mit dem die Zellen für weitere 24h inkubiert wurden. Anschließend wurde das Medium abgenommen und mit Hilfe von Centricon YM-10 Säulen (Millipore) von 2ml auf ca. 200 $\mu$ l ankonzentriert. Die Zellen wurden lysiert und die Lysate und Zellkultur-Überstände wurden in einem Western-Blot analysiert.

### 3.1.2 Neuregulin-Prozessierung unter PMA-Stimulation

Da die Neuregulin-Prozessierung durch den Protein Kinase C (PKC)-Signalweg induziert werden kann, sollte gezeigt werden, ob die PKC-Stimulation einen Einfluss auf die Spaltung durch ADAM10 aufweist. Die COS-7 Zellen sollten hierfür mit dem Phorbolster PMA stimuliert werden.

Die Zellen wurden wie auch unter Kapitel 3.1.1 beschrieben zunächst transfiziert, nach 24 Stunden erfolgte ein Mediumwechsel mit serumfreiem Medium und 48 Stunden nach der Transfektion wurde die PMA-Stimulation durchgeführt. Dabei wurden die Zellen zunächst mit serumfreiem Medium gewaschen und anschließend für 30 oder 60 Minuten in serumfreiem Medium mit 0,1 $\mu$ M oder 1 $\mu$ M PMA inkubiert. Das Medium wurde danach ankonzentriert, die Zellen wurden lysiert und beides wurde für die Western-Blot-Analyse verwendet (siehe Abb. 3.2).



**Abbildung 3.2: Neuregulin-Prozessierung unter Stimulation des Protein Kinase C-Signalwegs.** Die proteolytische Freisetzung des signalübertragenden N-terminalen Bereichs konnte durch PMA-Stimulation verstärkt werden. COS-7 Zellen wurden 48h nach der Transfektion mit ADAM10 und/oder mit Nrg-1 Typ  $\beta 1a$  mit serumfreiem Medium gewaschen und anschließend mit serumfreiem Medium mit 0,1-1 $\mu\text{M}$  PMA für 30-60min inkubiert. Die Zellüberstände wurden ankonzentriert und im Western-Blot mit dem Antikörper HA.11 auf N-terminale Spaltprodukte untersucht. Die Zelllysate wurden mit dem Antikörper SC-348 auf C-terminale Spaltprodukte und auf die ungespaltene Form analysiert.

Wie man in der Abbildung 3.2 erkennen kann, wurde durch die PMA-Stimulation die Freisetzung des signalübertragenden N-terminalen Spaltprodukts in das Medium erhöht. Zudem konnte in dem Medium der Zellen, die mit Typ  $\beta 1a$  und ADAM10 cotransfiziert wurden, jeweils eine größere Menge des proteolytisch freigesetzten N-terminalen Spaltprodukts nachgewiesen werden. Betrachtet man jedoch die entsprechenden Lysate der Zellen, so fällt auf, dass die cotransfizierten Zellen auch eine größere Menge der ungespaltenen Isoform  $\beta 1a$  bei etwa 105kDa aufwiesen. Diese erhöhte Neuregulin-Menge trat in mehreren Experimenten auf, obwohl die Menge des transfizierten Neuregulin-Expressionsvektors in allen Proben konstant gehalten wurde und die Gesamtmenge transfizierter DNA durch die Zugabe von Leervektor in den Proben ohne ADAM10 ebenfalls für alle Proben gleich war. Färbungen der für die Western-Blots verwendeten Nitrocellulose-Membranen mit Ponceau-Rot zeigten zudem, dass auch die aufgetragene Gesamtproteinmenge für alle Proben in etwa konstant war. Somit widersprach diese erhöhte Neuregulin-Menge in ADAM10- $\beta 1a$ -cotransfizierten Zellen der Schlussfolgerung, dass die verstärkte Freisetzung des N-terminalen Bereichs durch die direkte Interaktion mit ADAM10 und einer proteolytischen Prozessierung durch ADAM10 hervorgerufen wurde.

### 3.1.3 Lokalisation der cotransfizierten Proteine in COS-7 Zellen

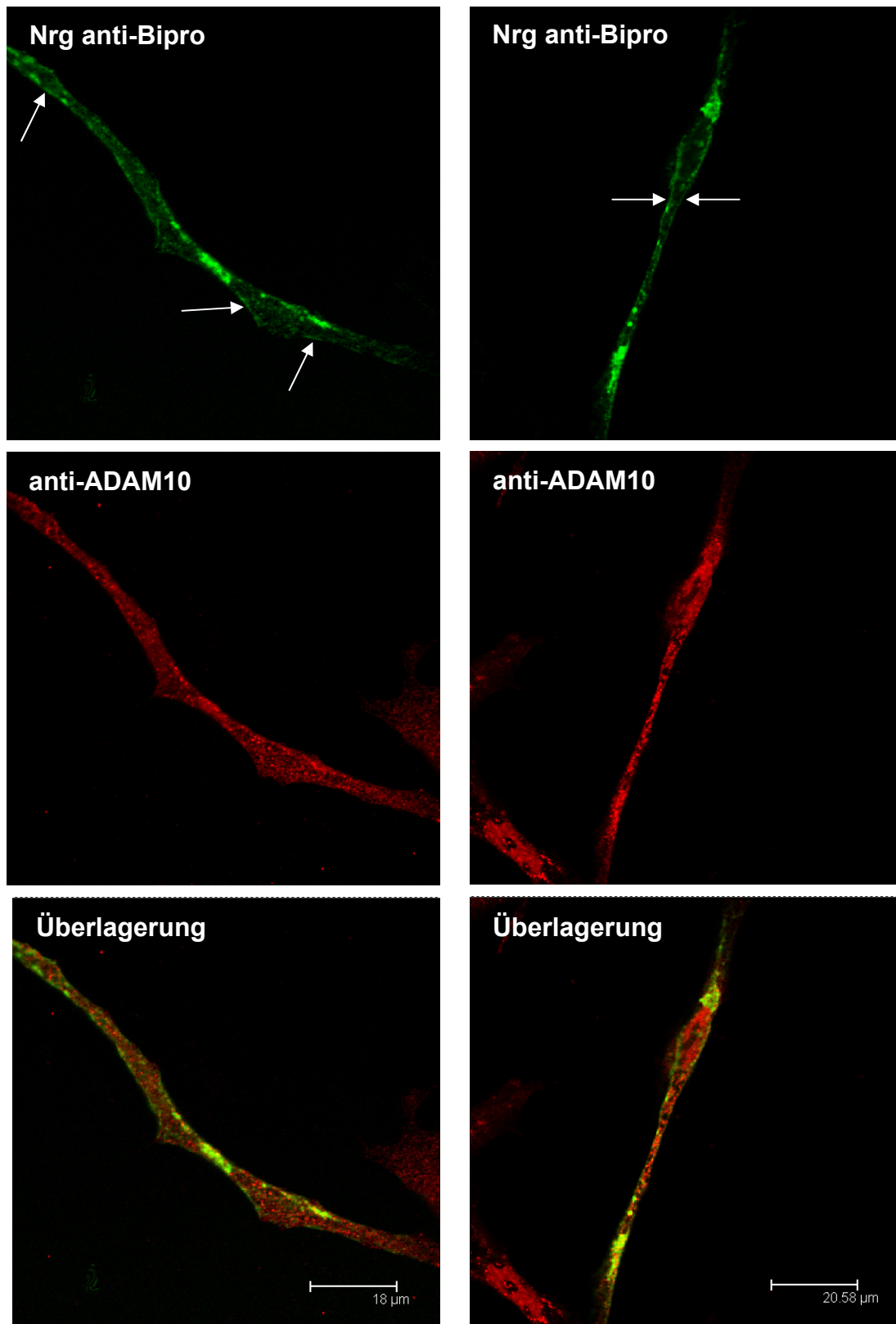
Durch Immunfluoreszenzaufnahmen sollte gezeigt werden, ob die Proteine ADAM10 und Nrg-1 Typ I $\beta$ 1a innerhalb der COS-7 Zellen colokalisieren, wodurch eine direkte Interaktion ermöglicht wäre. COS-7 Zellen wurden dazu mit dem ADAM10-Expressionsvektor und einem Typ I $\beta$ 1a-Konstrukt cotransfiziert, bei dem ein Antikörperepitop aus Birkenprofilin C-terminal vorliegt. Mit Hilfe dieses Epitops konnte die Isoform durch den monoklonalen Maus-Antikörper anti-Bipro nachgewiesen werden.

Die Immundetektion mit den beiden spezifischen Erstantikörpern anti-Bipro (Maus) und anti-ADAM10 (Kaninchen) wurde 48 Stunden nach der Transfektion durchgeführt, wobei die fluoreszenzmarkierten Sekundärantikörper anti-MausCy2 und anti-KaninchenCy3 verwendet wurden. Die Lokalisierung der beiden Proteine innerhalb der Zellen konnte anschließend unter Verwendung des konfokalen Laser-Scanning-Mikroskops Leica TCS SP2 (Leica Mikrosysteme) analysiert werden.

Betrachtet man die Überlagerungen der beiden Farbkanäle mit den unterschiedlichen Fluorophoren, so erkennt man, dass ADAM10 und Nrg-1 Typ I $\beta$ 1a nicht colokalisieren (siehe Abb. 3.3). Man findet grüne und rote Signale getrennt von einander. Eine Kolokalisation wäre durch gelbe Signale gekennzeichnet.

In der Nrg-Immundetektion mit anti-Bipro kann man an einigen Stellen der beiden abgebildeten Zellen erkennen, dass die Nrg-1 Isoform Typ I $\beta$ 1a in der Plasmamembran lokalisiert ist. Die Färbung von ADAM10 findet man hingegen vorwiegend in Vesikeln, die über die ganze Zelle gleichmäßig verteilt sind.

Da keine Colokalisation von Nrg-1 Typ I $\beta$ 1a und ADAM10 in den COS-7 Zellen nachgewiesen werden konnte, ist es auch unwahrscheinlich, dass ADAM10 durch eine direkte Interaktion und proteolytische Spaltung an der Freisetzung des signalübertragenden N-terminalen Bereichs von Neuregulin beteiligt ist.



**Abbildung 3.3: Immunfluoreszenzaufnahmen cotransfizierter COS-7 Zellen.** ADAM10 und die Neuregulin-1 Isoform Typ I $\beta$ 1a zeigen keine Colokalisation in den COS-7 Zellen. Die Zellen wurden mit ADAM10 und Nrg-1 Typ I $\beta$ 1a cotransfiziert, wobei das verwendete Neuregulin-Konstrukt C-terminal ein Antikörperepitop aus Birkenprofilin enthielt. Die Neuregulin-Isoform wurde mit dem Antikörper anti-Bipro und ADAM10 durch anti-ADAM10 nachgewiesen. Durch weiße Pfeile sind Stellen markiert, an denen man die Lokalisation der Neuregulin-Isoform in der Plasmamembran gut erkennen kann. Aufnahmen von Dr. Ralf Palmisano, Universität Bielefeld

## 3.2 Charakterisierung des Neuregulin-1 Typ I-Promotors

Die transkriptionelle Genregulation spielt bei der Steuerung des Neuregulin-1-Signalwegs eine entscheidende Rolle. Eine Fehlregulation kann schwerwiegende pathologische Folgen haben wie im Falle einiger Brustkrebsarten deutlich wird (siehe Kapitel 2.2.5). Aus diesem Grund sollte im Rahmen dieser Arbeit der Promotor für Neuregulin-1 Typ I-Isoformen charakterisiert werden.

### 3.2.1 Bestimmung des Transkriptionsstartpunkts

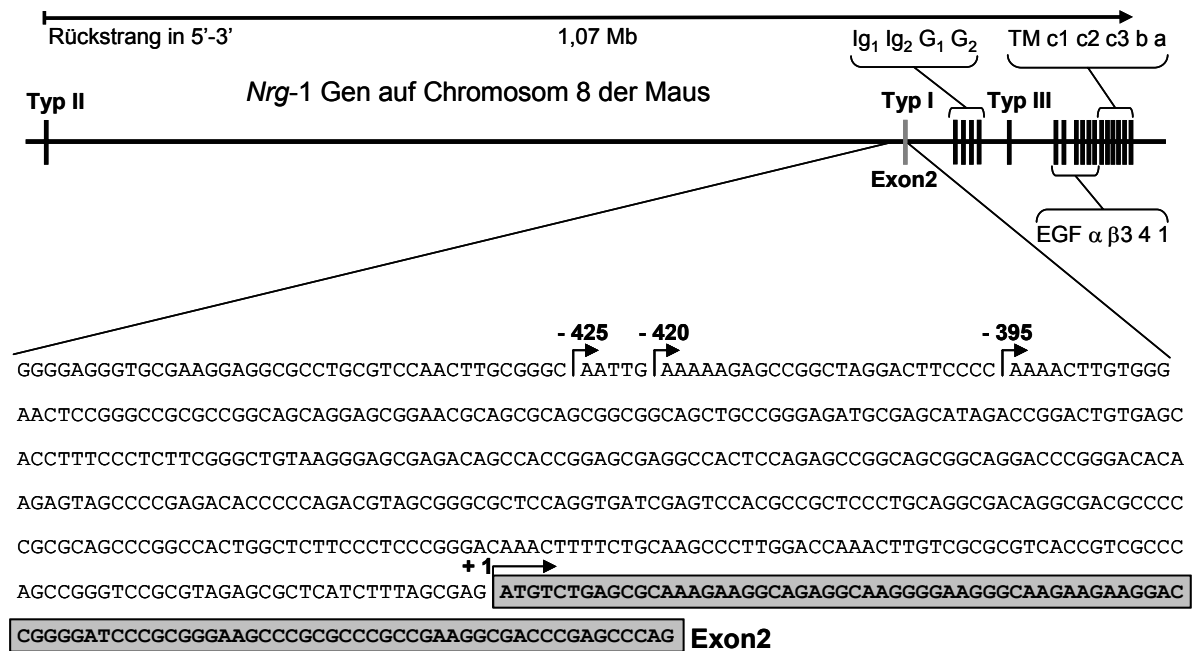
Für die Charakterisierung des Neuregulin-1 Typ I-Promotors war es zunächst wichtig, dessen Lage zu bestimmen. Dazu sollte zunächst der Transkriptionsstartpunkt (TSP) für Nrg-1 Typ I-Isoformen durch eine 5'-RACE (*Rapid Amplification of cDNA Ends*) ermittelt werden, da sich der Kernpromotor in der Regel unmittelbar *upstream* vom TSP befindet.

Die 5'-RACE Reaktion wurde mit dem GeneRacer™ Kit (Invitrogen) unter Verwendung von mRNA aus dem Großhirn oder dem Rückenmark von CD1-Mäusen durchgeführt. Die 5'-Enden der cDNA wurden durch zwei aufeinander folgende PCRs amplifiziert. In der ersten PCR wurde der mitgelieferte GeneRacer 5'-Primer mit dem genspezifischen Primer NrgP-rev verwendet und in der folgenden Nested-PCR wurden 0,4µl der ersten PCR als Template mit dem GeneRacer 5'-Nested Primer und dem NrgRACERev-Primer eingesetzt. Die PCR-Produkte dieser Reaktion wurden aufgereinigt und in den pCR4-TOPO-Vektor kloniert. Von den erhaltenen Klonen wurden 10 Klone aus der RACE mit mRNA aus Rückenmark und 10 Klone aus der RACE mit mRNA aus dem Großhirn eingesetzt, um den TSP durch eine Sequenzierung zu ermitteln.

Es zeigte sich, dass die Neuregulin-1 Typ I-Isoformen, die mit dem zweiten Exon aus dem Nrg-1-Gen beginnen, mehr als einen Transkriptionsstartpunkt besitzen. Sowohl im Rückenmark als auch im Großhirn konnten dieselben drei Transkriptionsstartpunkte ermittelt werden. Diese befinden sich in einer 30bp großen Region und haben die Positionen -425, -420 und -395 relativ zum Translationsstartpunkt + 1 (siehe Abb. 3.4).

Die ermittelten 5'-Enden wurden mit Maus-ESTs aus den öffentlichen Datenbanken durch das Programm Blast (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/>) verglichen. Es

zeigte sich, dass keine Neuregulin-1 Typ I-EST-Sequenzen *upstream* der ermittelten Transkriptionsstartpunkte vorhanden sind. Somit sind keine Nrg-1 Typ I-Transkripte in der Maus bekannt, für die die ermittelten Transkriptionsstartpunkte nicht in Frage kommen würden. Daher konnte die Lage des Nrg-1 Typ I-Promotors unmittelbar *upstream* der in dieser Arbeit ermittelten Transkriptionsstartpunkte angenommen werden.



**Abbildung 3.4: Darstellung der Transkriptionsstartpunkte von Neuregulin-1 Typ I-Isoformen.** Schematische Darstellung des Neuregulin-1-Gens auf dem Chromosom 8 der Maus. Die Exonstruktur in dem 1,07Mb umfassenden Gen ist durch vertikale Linien wiedergegeben und die Bezeichnung der Exons erfolgte wie bei dem in der Einleitung (Abbildung 2.1) dargestellten humanen *NRG-1*-Gen (nach Falls, 2003a modifiziert). Typ I-Isoformen beginnen mit dem Exon 2. Die Transkriptionsstartpunkte von Nrg-1 Typ I-Isoformen wurden mittels 5'RACE (Invitrogen) in mRNA-Proben aus dem Rückenmark und dem Großhirn von Mäusen bestimmt und liegen an den durch Pfeile gekennzeichneten Positionen relativ zum Translationsstartpunkt +1.

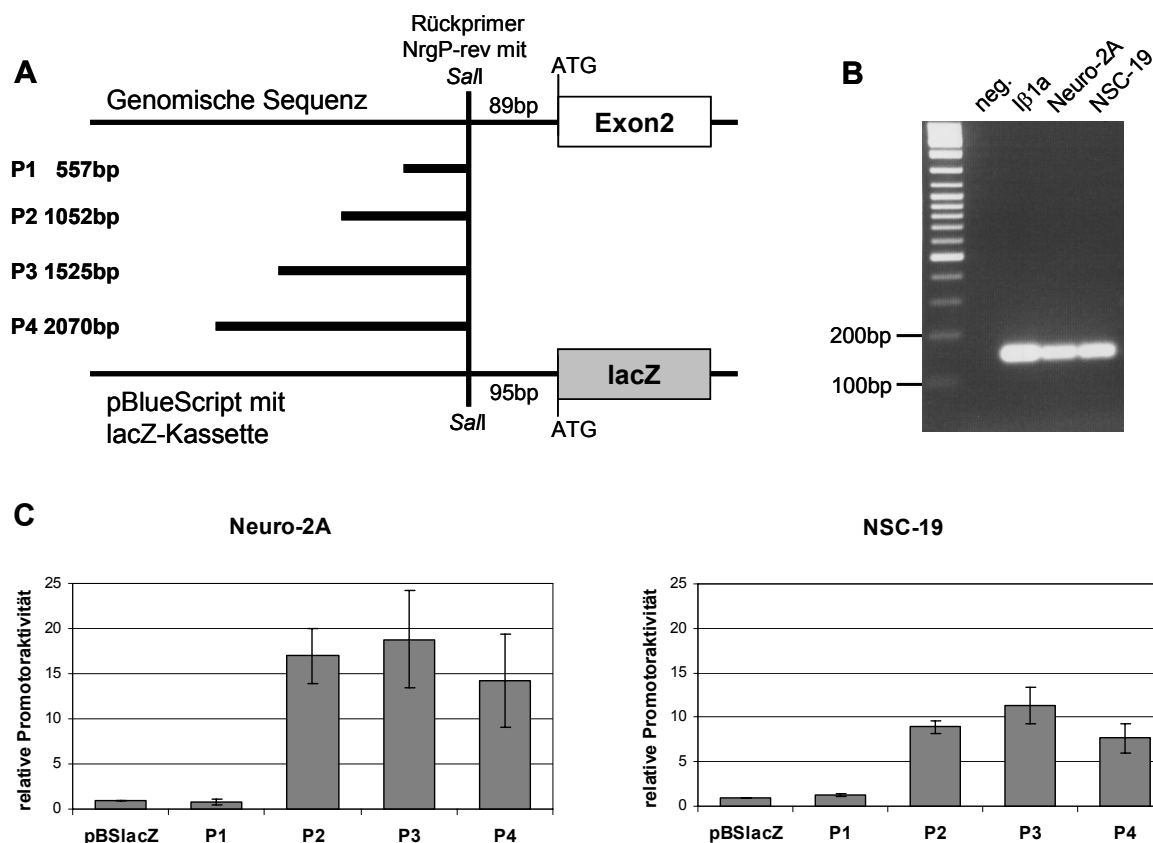
### 3.2.2 Eingrenzung der Promotorregion durch Deletionskonstrukte

Um zu bestimmen welche Bereiche *upstream* der Transkriptionsstartpunkte für die Expression der Nrg-1 Typ I-Isoformen notwendig sind, wurden vier verschiedene Deletionskonstrukte mit Längen zwischen etwa 0,5kb und 2kb für einen Promotor-Reporter-Gen-Versuch erstellt (siehe Abb. 3.5).

Als Reporter-Vektor wurde der in der Arbeitsgruppe von C. Drepper klonierte pBSlacZ verwendet. Dabei handelt es sich um den Vektor pBluskript SK (+/-), in den die lacZ-Kassette aus dem Vektor pSV-beta-Galaktosidase (Promega) über die



Schnittstellen *HindIII* und *BamHI* als Reporter gen kloniert wurde. In diesem Reporter-Vektor pBSlacZ befindet sich kein eukaryontischer Promotor vor dem Reporter gen. Die vier unterschiedlich großen Deletionsfragmente P1 bis P4 wurden mit dem Polymerasen-Mix Expand Long Template (Roche) mit *Proofreading*-Aktivität amplifiziert und die Fragmente wurden in den pCR4-TOPO-Vektor (Invitrogen) kloniert. Hierbei war der bei allen Konstrukten verwendete Rückprimer NrgP-rev mit einer *SaII*-Schnittstelle versehen und die vier Hinprimer NrgP-1for bis NrgP-4for enthielten eine *ApaI*-Schnittstelle. Über diese Schnittstellen wurden die vier Fragmente in den pBSlacZ kloniert. Der Abstand im pBSlacZ-Vektor zwischen der *SaII*-Schnittstelle und dem Translationsstartpunkt der lacZ-Kassette betrug 95bp. Damit die Lage des Promotors relativ zum Translationsstartpunkt auch in den erstellten Deletionskonstrukten in etwa gleich zu seiner genomischen Position blieb, wurde der Rückprimer NrgP-rev in den 5'-untranslatierten Bereich gelegt. Nun wurden Zelllinien ausgewählt, die sich für einen Promotor-Reporter gen-Versuch eignen. Diese sollten Neuregulin-1 Typ I-Isoformen endogen exprimieren, damit die für die Neuregulin-Expression benötigten Transkriptionsfaktoren vorhanden sind. Die beiden neuronalen Maus-Zelllinien Neuro-2A und NSC-19 wurden durch eine PCR positiv auf die Expression von Nrg-1 Typ I getestet (siehe Abb. 3.5). Die beiden Zelllinien wurden mit den Promotor-Reporterkonstrukten transient transfiziert. Dabei wurde jeweils der Luziferase-Expressionsvektor pPALU, den Dr. J. Bartsch (King's College London, Großbritannien) zur Verfügung stellte, cotransfiziert. Mit dessen Hilfe wurde die Transfektionseffizienz der einzelnen Ansätze normalisiert. 48 Stunden nach der Transfektion erfolgte die Messung der  $\beta$ -Galaktosidase- und Luziferase-Aktivitäten durch eine Chemilumineszenz-Nachweisreaktion mit dem Dual-Light System (Applied Biosystems) unter Verwendung eines Luminometers. Es zeigte sich, dass das Konstrukt P2 mit einem 1052bp umfassenden genomischen Bereich eine deutliche Promotoraktivität in beiden Zelllinien aufwies (siehe Abb. 3.5). Das mit 1525bp längere Deletionskonstrukt P3 zeigte einen weiteren Anstieg der Promotoraktivität und das 2070bp Fragment P4 zeigte einen Aktivitätsverlust im Vergleich zu P2 oder P3, was auf das Vorhandensein von negativ regulatorischen Elementen hindeutet. In den 557bp von P1, in denen die ermittelten Transkriptionsstartpunkte (siehe Kapitel 3.2.1) enthalten sind, scheinen noch nicht alle Promotor-Elemente für eine Nrg-1 Typ I-Expression in Neuro-2A und NSC-19-Zellen vorhanden zu sein.



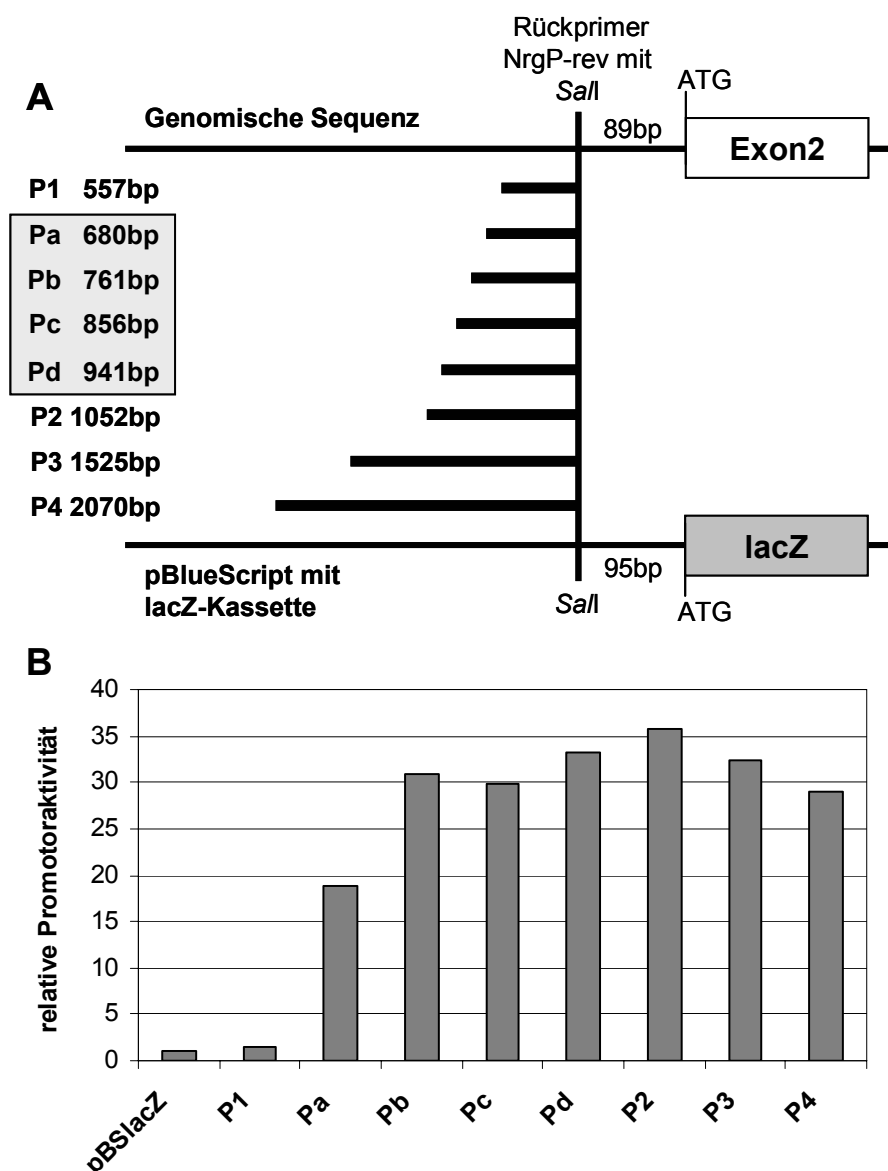
**Abbildung 3.5: Einengung der Neuregulin-1 Typ I-Promotorregion.** Das 1052bp Deletionsfragment P2 enthält notwendige Promotorbereiche und Transkriptionsfaktor-Bindestellen für die Nrg-1 Typ I-Expression in den getesteten Zelllinien. **A** Schematische Darstellung der Promotor-Reporterkonstrukte. Die vier Deletionsfragmente P1-P4 wurden in den Reporter-Gen-Vektor pBSlacZ kloniert. **B** Nachweis der Neuregulin-Expression in Neuro-2A und NSC-19. cDNA von Neuro-2A und NSC-19 wurde mittels PCR mit den Primern NrgTypIfor und NrgTypIrev positiv auf Nrg-1 Typ I getestet. neg. = negativ Kontrolle mit H<sub>2</sub>O,  $\beta$ 1a = positiv Kontrolle mit 2,5ng pTarget-  $\beta$ 1a-Expressionsvektor. **C** Promotoraktivitäten in Neuro-2A und NSC-19. Die Zellen wurden mit jeweils 0,5 $\mu$ g Promotor-Reportervektor und 0,5 $\mu$ g pPALU Luziferase-Expressionsvektor cotransfiziert. Die Luziferase- und  $\beta$ -Galaktosidase-Aktivitäten wurden 48h nach der Transfektion durch das Dual-Light System (Applied Biosystems) bestimmt. Durch die Luziferase-Aktivitäten wurden die Transfektionseffizienzen normalisiert und die Promotoraktivitäten der Konstrukte sind als Vielfaches der Aktivität des Leervektors (wurde gleich 1 gesetzt) dargestellt. Die Mittelwerte aus mind. 3 Experimenten sind mit Standardabweichung dargestellt.

Da die Promotoraktivitäten in Neuro-2A Zellen größer waren als in den NSC-19 Zellen (für P2 z.B. 17x in Neuro-2A zu 9x in NSC-19) und sich somit die unterschiedlichen Promotoraktivitäten deutlicher erkennen ließen, wurden für die folgenden Experimente nur noch die Neuro-2A Zellen verwendet.

Die Sequenz der 1052bp P2-Region wurde mit dem Programm MatInspector ([www.genomatix.de](http://www.genomatix.de)) auf Transkriptionsfaktor-Bindestellen überprüft. Dabei wurden besonders die 495bp im 5'-Bereich betrachtet, die in der P1-Region nicht vorhanden sind und zu der verstärkten Promotoraktivität geführt haben. Aufgrund der kurzen Erkennungssequenzen von etwa 4-6 Nukleotiden findet man mit MatInspector in dieser Region etwa 65 potentielle TF-Bindestellen. Daher war es notwendig, den

Bereich, der die verstärkte Promotoraktivität in den Zellen auslöst, durch weitere Deletionskonstrukte einzugrenzen.

Mit Hilfe von weiteren vier Hinprimern NrgP-afor bis NrgP-dfor wurden die vier Deletionskonstrukte Pa bis Pd wie oben beschrieben kloniert, die die 495bp Region am 5'-Ende von P2 in etwa 100bp Bereiche unterteilen (siehe Abb. 3.6).



**Abbildung 3.6: Detaillierte Bestimmung der Neuregulin-1 Typ I-Promotorregion.** Die Deletionsfragmente Pa und Pb enthalten notwendige Transkriptionsfaktor-Bindestellen für die Nrg-1 Typ I-Expression in Neuro-2A Zellen. **A** Schematische Darstellung der Promotor-Reporterkonstrukte. Die vier zusätzlichen Deletionsfragmente Pa-Pd wurden in den Reporter-gen-Vektor pBSlacZ eingebracht. **B** Promotoraktivitäten in Neuro-2A. Die Zellen wurden mit 0,5µg Promotor-Reportervektor und 0,5µg pPALU Luziferase-Expressionsvektor cotransfiziert. Die Luziferase- und β-Galaktosidase-Aktivitäten wurden 48h nach der Transfektion durch das Dual-Light System (Applied Biosystems) bestimmt. Durch die Luziferase-Aktivitäten wurden die Transfektionseffizienzen normalisiert und die Promotoraktivitäten sind als Vielfaches der Aktivität der Promotor-Reporterkonstrukte gegenüber der Aktivität des Leervektors (wurde als 1 gesetzt) dargestellt. Die Säulen repräsentieren die Mittelwerte aus drei Experimenten.

Eine deutliche Promotoraktivität war ab einer Länge von 680bp genomischer Sequenz bei dem Deletionskonstrukt Pa zu beobachten. Die Promotoraktivität stieg bei dem mit 761bp längeren Deletionsfragment Pb noch einmal deutlich an und bei der Verwendung der längeren Deletionskonstrukte Pc bis P4 waren nur noch geringere Unterschiede zu erkennen. Daher wurden im weiteren Verlauf der Arbeit die 5'-Enden der Deletionsfragmente Pa und Pb genauer analysiert, um die Transkriptionsfaktor-Bindestellen zu identifizieren, die für den Anstieg der Promotoraktivität verantwortlich sind.

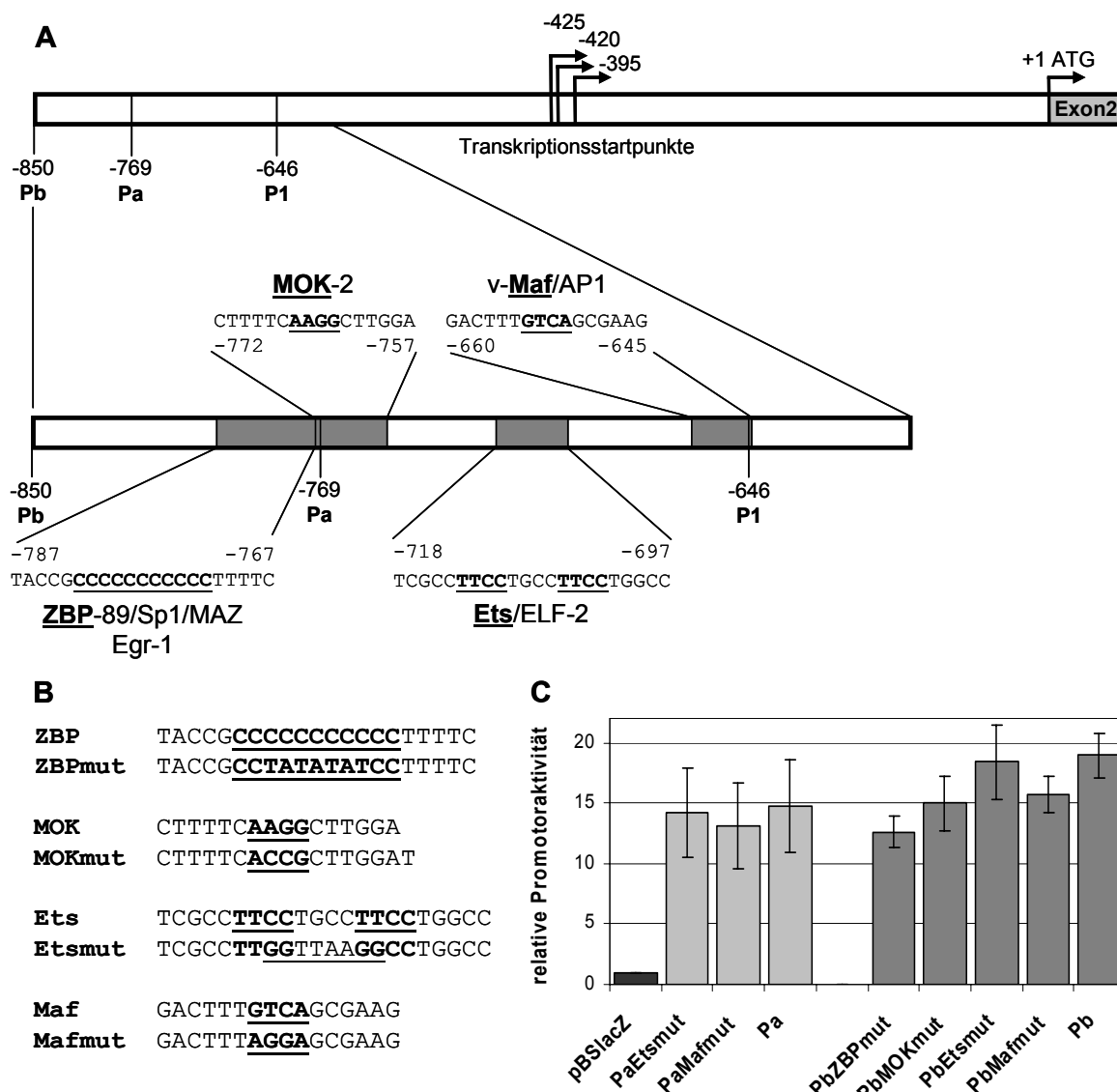
### 3.2.3 Mutagenese potentieller Transkriptionsfaktor-Bindestellen

Die 5'-Enden der Deletionsfragmente Pa und Pb, die einen Anstieg der Promotoraktivität im vorangegangenen Reporter-gen-Versuch gezeigt haben, wurden mit dem Programm MatInspector auf potentielle Transkriptionsfaktor-Bindestellen durchsucht. Um TF-Bindestellen zu identifizieren, die an der Nrg-1 Typ I-Expression beteiligt sind, sollten die vorhergesagten Bindestellen in den Promotor-Reporterkonstrukten gezielt mutiert werden. Anschließend sollte untersucht werden, ob die Mutation bestimmter Bindestellen zu einer veränderten Promotoraktivität in Neuro-2A Zellen führt. Hierbei wurden von den 23 durch MatInspector vorhergesagten TF-Bindestellen in dieser Region nur die berücksichtigt, die auch in der Nrg-1 Typ I-Promotorregion beim Menschen und bei der Ratte zu finden sind. Durch die Fokussierung auf konservierte TF-Bindestellen in diesen drei Organismen, konnte die Zahl potentieller TF-Bindestellen auf 8 reduziert werden (siehe Abb. 3.7). Im 5'-Bereich des Deletionsfragments Pb befindet sich eine Region mit 11 aufeinander folgenden Cytosin-Basen, in der Bindestellen für die vier Transkriptionsfaktoren ZBP-89, Sp1, MAZ und Egr-1 vorhergesagt werden. Diese Region wird im Folgenden als Cytidin-reiche Bindestelle oder ZBP-Bindestelle bezeichnet. *Downstream* davon befindet sich eine Bindestelle für den Transkriptionsfaktor MOK-2. Diese Bindestelle liegt im vollen Umfang erst im Deletionsfragment Pb vor, da das 5'-Ende der MOK-Bindestelle im Deletionsfragment Pa fehlt. Somit könnten diese beiden Bindestellen für den Anstieg der Promotoraktivität des Deletionskonstrukts Pb verantwortlich sein. Weiter *downstream* findet man in der Vorhersage einen Bereich mit zwei sich überlappenden Bindestellen für Ets-Transkriptionsfaktoren und eine Region mit potentiellen

Bindestellen für die Transkriptionsfaktoren v-Maf und AP1. Diese beiden Regionen könnten die Promotoraktivität von Pa bewirken.

Alle vier Bereiche wurden einzeln mit Hilfe des *QuikChange II Site-directed Mutagenesis Kit* (Stratagene) mutiert. Dabei wurden die für die Erkennung und Bindung wichtigen Kernsequenzen der TF-Bindestellen durch Nukleotidsubstitutionen verändert (siehe Abb. 3.7). Die Mutationen wurden an den Deletionsfragmenten Pa und Pb im pCR4-TOPO-Vektor vorgenommen, da dieser um 3kb kleiner ist als die fertigen Promotor-Reporterkonstrukte im pBSlacZ, was die PCR-basierte Mutagenese erleichtert. Die Mutationen wurden durch Sequenzierungen überprüft. Die vier Mutanten des Deletionsfragments Pb PbZBPmut, PbMOKmut, PbEtsmut und PbMafmut und die zwei Mutanten PaEtsmut und PaMafmut des Deletionsfragments Pa wurden in den pBSlacZ-Reportervektor umkloniert und für weitere Reporteragen-Versuche in Neuro-2A Zellen eingesetzt (siehe Abb. 3.7). Hierbei wurden die Promotoraktivitäten der mutierten Konstrukte mit denen der nicht-mutierten Vektoren verglichen.

Bei den Reporteragen-Versuchen kam es häufig zwischen zwei unabhängigen Wiederholungen eines Experiments zu großen Schwankungen in der Promotoraktivität, wodurch Aussagen über eine veränderte Aktivität mutierter Promotor-Reporterkonstrukte erschwert wurden. Um diese Schwankungen zu minimieren, wurden Anstrengungen unternommen, die Versuchsbedingungen zu optimieren. Dabei wurde zunächst die DNA-Konzentration der verwendeten Plasmidpräparationen durch Verwendung eines Spektralphotometers NanoDrop ND-1000 (Peglab) exakter gemessen, um stets vergleichbare Mengen einsetzen zu können. Anschließend wurden unterschiedliche DNA-Mengenverhältnisse zwischen den Promotor-Reporterkonstrukten und dem Luziferase-Kontrollvektor im Reporteragen-Versuch getestet. Des Weiteren wurden verschiedene Plasmidpräparationen der Promotor-Reporterkonstrukte verwendet. Es stellte sich heraus, dass vor allem die Qualität der im Reporteragen-Versuch verwendeten Plasmidpräparation eine wichtige Rolle spielt, so dass nur Präparationen mit ähnlicher Konzentration und ähnlicher Reinheit (Quotient  $A_{260}/A_{280}$ ) verglichen werden sollten. Die Schwankungen zwischen zwei Wiederholungen waren aber stets vorhanden, da man bei zwei Transfektionen von Zellen nie exakt reproduzierbare Bedingungen bezüglich Zelldichte, Zustand der Zellen und Transfektionseffizienz erzielen kann.



**Abbildung 3.7: Zielgerichtete Mutagenese potentieller Transkriptionsfaktor-Bindestellen.** Die Mutation der Cytidin-reichen ZBP-Bindestelle führt zu einer signifikant verminderten Promotoraktivität. **A** Schematische Darstellung der Nrg-1 Typ I-Promotorregion der Maus. In der 5'-Region der Deletionsfragmente Pa und Pb wurden durch das Programm MatInspector (Genomatix) nach potentiellen TF-Bindestellen gesucht, die auch in der Promotorregion beim Menschen und in der Ratte zu finden sind. **B** Zielgerichtete Mutagenese der vier potentiellen TF-Bindestellen. Die fettgedruckten und unterstrichenen Kernsequenzen der vier Bindestellen wurden durch die angegebenen Nukleotidsubstitutionen verändert. **C** Promotoraktivitäten in Neuro-2A Zellen. Jeweils 0,5µg Promotor-Reportervektor und 0,5µg Luziferase-Kontrollvektor pPALU wurden in die Zellen cotransfiziert. 48h nach der Transfektion erfolgte der Reporter-Gen-Versuch mit dem Dual-Light System (Applied Biosystems). Die Transfektionseffizienz wurde durch die Luziferase-Aktivitäten normalisiert und die Promotoraktivitäten sind als Vielfaches der Leervektor-Aktivität dargestellt. Gezeigt sind die Mittelwerte aus zwei Messungen mit einer Plasmidpräparation. Die Experimente wurden mit mind. 2 verschiedenen Plasmidpräparationen wiederholt und die Vektormengen wurden in weiteren Experimenten bei der Transfektion variiert.

Um eine Aussage über die Veränderung der Promotoraktivität durch die Mutation der potentiellen TF-Bindestellen treffen zu können, wurden die Ergebnisse aller 10 bis dahin unabhängig durchgeführten Experimente mit den mutierten Konstrukten

zusammengenommen betrachtet und die Aktivitäten der mutierten Konstrukte wurden mit denen der nicht-mutierten durch den Student's t-Test unter hochsignifikanten Bedingungen ( $p \leq 0,01$ ) verglichen. Dabei zeigte nur die Mutation der Cytidin-reichen ZBP-Bindestelle PbZBPmut eine signifikante Verminderung ( $p = 0,004$ ) der Promotoraktivität gegenüber dem Deletionsfragment Pb. Somit lässt sich anhand der Daten der Mutagenese der potentiellen TF-Bindestellen die Cytidin-reiche Bindestelle als positiv wirkendes regulatorisches Element für die Neuregulin-1 Typ I-Expression in Neuro-2A Zellen identifizieren.

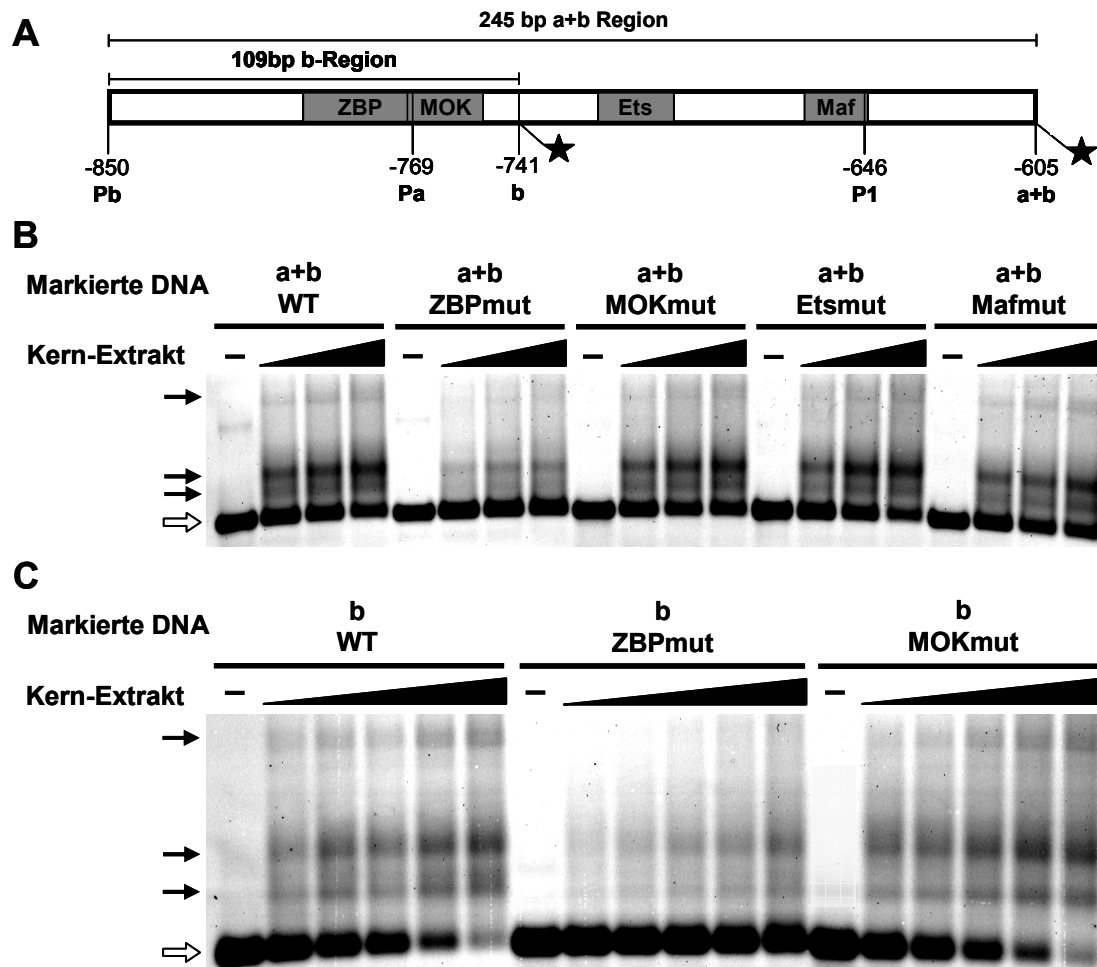
### 3.2.4 Nachweis spezifischer Protein-DNA-Bindungen

Um den Nachweis zu erbringen, dass es an den potentiellen Transkriptionsfaktor-Bindestellen zu spezifischen Protein-DNA-Bindungen kommt, wurden EMSAs (*Electrophoretic Mobility Shift Assay*) durchgeführt. EMSAs beruhen auf der Beobachtung, dass Protein-DNA-Komplexe sich langsamer bei einer Gel-Elektrophorese bewegen als freie DNA, wodurch man einen so genannten „Shift“ erkennen kann. Es wurde eine nicht-radioaktive Methode gewählt, bei der die DNA durch den Cy3-Fluorophor markiert war. Nach einer Agarosegel-Elektrophorese wurden die Ergebnisse durch den Typhoon 8600 Variable Mode Imager (Amersham Biosciences) dokumentiert.

Es wurden zwei PCR-Produkte generiert, die die 5'-Enden der Deletionsfragmente Pb und Pa enthielten. Das 245bp PCR-Fragment a+b wurde mit den Primern NrgP-bfor und dem Fluorophor-markierten Primer Pa+brevCy3 erstellt. In diesem Fragment waren alle vier potentiellen TF-Bindestellen (siehe Kapitel 3.2.3) vorhanden. Das mit den Primern NrgP-bfor und PbrevCy3 erstellte 109bp PCR-Fragment b umfasste das 5'-Ende von Pb mit den darin enthaltenen ZBP- und MOK-Bindestellen (siehe Abb. 3.8). Durch die Verwendung der mutierten Deletionsfragmente als Template in der PCR wurden auch Cy3-markierte Fragmente erstellt, die eine der vier Mutationen in den potentiellen TF-Bindestellen trugen. Somit sollte durch den Vergleich zwischen nicht-mutierten und mutierten Fragmenten geprüft werden, ob die Mutationen zu veränderten Protein-DNA-Bindungen führen.

Die PCR-Fragmente wurden mit den Proteinen aus nukleären Extrakten von Neuro-2A Zellen inkubiert. Dabei wurden die nukleären Extrakte vor der Zugabe der Cy3-markierten DNA mit Poly[d(I-C)] gemischt, um unspezifische DNA-Bindeproteine zu

blocken. Die Proben wurden auf 2%igen TAE-Agarosegelen aufgetrennt, die anschließend mit dem Typhoon Imager eingescannt wurden.



**Abbildung 3.8: EMSAs bei steigender Kern-Extrakt Menge.** Durch die Mutation der Cytidin-reichen ZBP-Bindestelle kommt es zu einer schlechteren Bindung der Kern-Proteine. **A** Schematische Darstellung der Cy3-markierten PCR-Fragmente b und a+b, die durch die Verwendung der 5'-Fluorophor-gekoppelten Primer PbrevCy3 oder Pa+brevCy3 mit NrgP-bfor mittels PCR amplifiziert wurden. Sterne symbolisieren die Cy3-Fluorophore. **B** EMSA mit dem 245bp PCR-Fragment a+b. Die Cy3-markierten Fragmente wurden mit den angegebenen Mutationen durch den Einsatz der mutierten Deletionsfragmente (Kapitel 3.1.4) als Template in einer PCR amplifiziert. Diese Fragmente wurden bei einem EMSA mit steigender Kern-Extraktmenge zwischen 2,5 und 10µg eingesetzt. **C** EMSA mit dem 109bp PCR-Fragment b mit den angegebenen Mutationen. Schwarze Pfeile kennzeichnen die langsamer migrierenden Protein-DNA-Komplexe und weiße Pfeile kennzeichnen die freie DNA.

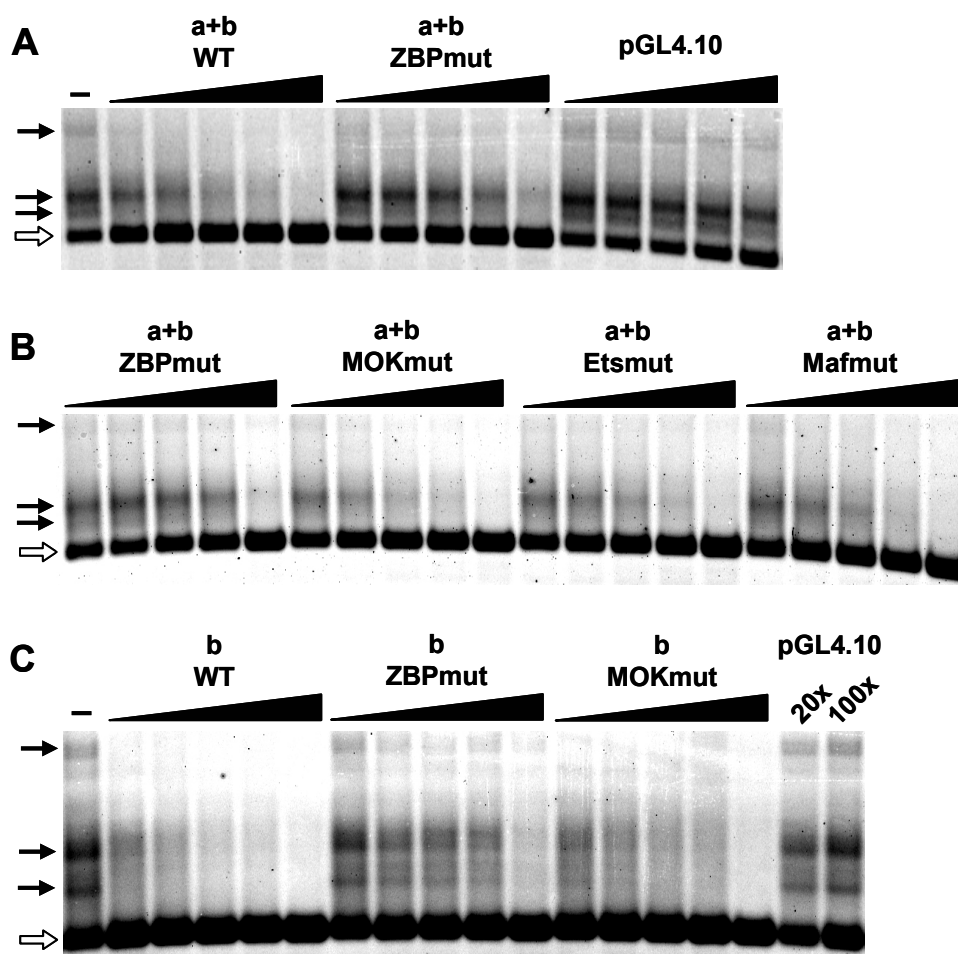
In den Proben mit nukleärem Extrakt waren drei Protein-DNA-Komplexe durch das Auftreten von langsamer migrierenden Banden im Vergleich zu der freien DNA in den Ansätzen ohne Kern-Extrakt zu erkennen (siehe Abb. 3.8). Die beiden PCR-Fragmente a+b und b wurden dabei aufgrund ihrer Größenunterschiede unterschiedlich aufgetrennt. Da alle drei Protein-DNA-Komplexe jedoch auch mit dem 109bp PCR-Fragment b entstanden sind, liegen die Bindestellen in dieser Region.



Vergleicht man die Bindung der Kernproteine an die mutierten PCR-Fragmente bei steigender Proteinmenge, so sieht man, dass die Ausbildung aller drei Protein-DNA-Komplexe bei vorliegender Mutation der Cytidin-reichen ZBP-Bindestelle bei beiden PCR-Fragmenten schwächer ausfällt. Die Mutationen der drei anderen vorhergesagten Bindestellen führten im Vergleich mit den nicht-mutierten Wildtyp-Fragmenten zu keiner Veränderung der Protein-DNA-Bindung.

Um zu zeigen, dass es sich bei den ausgebildeten Protein-DNA-Komplexen um spezifische Protein-DNA-Bindungen handelt, wurden nicht-markierte PCR-Fragmente als Kompetitor eingesetzt. Gibt man einen sequenzidentischen, also spezifischen Kompetitor, in einem molaren Überschuss gegenüber dem markierten DNA-Fragment in den Ansatz, so wird der „Shift“ abgeschwächt. Die spezifischen DNA-Bindeproteine binden vermehrt an die unmarkierte DNA, wodurch mehr von der markierten DNA ungebunden als freie DNA vorliegt. Als Negativkontrolle wurde ein 246bp PCR-Fragment des Vektors pGL4.10 (Promega) amplifiziert. Dieses sollte den „Shift“ nicht beeinflussen, wenn dieser durch sequenz-spezifische Protein-DNA-Bindung entstanden ist. Die Kompetitoren wurden den Ansätzen mit steigendem molaren Überschuss von 2,5fach bis 100fach gegenüber der Cy3-markierten DNA zugesetzt und vor der Zugabe der markierten DNA-Fragmente für 10 Minuten mit dem nukleären Extrakt inkubiert.

Es zeigte sich, dass die ausgebildeten Protein-DNA-Komplexe sequenzspezifisch sind, da die Zugabe der sequenzidentischen unmarkierten Kompetitoren a+b und b bei steigender Konzentration den Shift der markierten DNA abschwächen, wohingegen die Zugabe des unspezifischen Kompetitors pGL4.10 selbst bei 100fachem molaren Überschuss den Shift nicht beeinflusst (siehe Abb. 3.9). Durch die Verwendung der Kompetitoren, bei denen eine der potentiellen TF-Bindestellen mutiert vorlag, konnte erneut wie schon in Abbildung 3.8 gezeigt werden, dass es durch die Mutation der Cytidin-reichen ZBP-Bindestelle zu einer schwächeren Protein-DNA-Bindung kommt. Dies wird deutlich, da in beiden PCR-Fragmenten a+b und b die ZBP-Mutation dazu führt, dass dieser Kompetitor die Protein-DNA-Komplexe erst bei höheren Konzentrationen verdrängen kann. Die Kompetitoren mit einer der anderen drei Mutationen verhalten sich hingegen wie die nicht-mutierten Wildtyp-Kompetitoren.

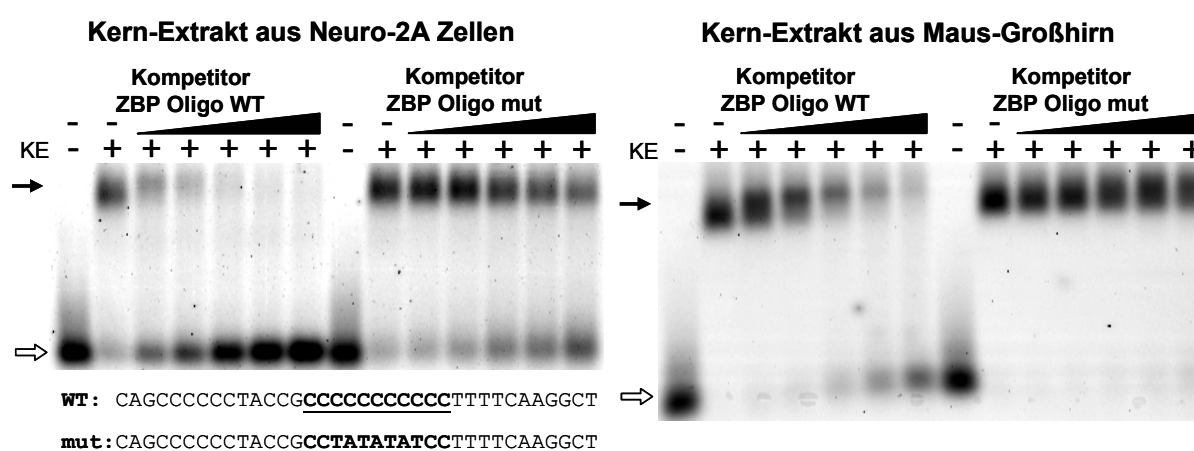


**Abbildung 3.9: EMSAs mit spezifischen und unspezifischen Kompetitoren.** Bei den drei auftretenden Protein-DNA-Komplexen handelt es sich um sequenzspezifische Protein-DNA-Bindungen, die durch die Mutation der Cytidin-reichen ZBP-Bindestelle abgeschwächt werden. **A** EMSA mit dem 245bp Cy3-markierten PCR-Fragment a+b. Die angegebenen nicht-markierten Kompetitoren wurden gegenüber der markierten DNA in einem molaren Überschuss von 2,5fach bis 100fach zugesetzt. Das 246bp PCR-Fragment von dem Vektor pGL4.10 diente als unspezifischer Kompetitor. **B** Vergleich der vier Kompetitoren, bei denen je eine der potentiellen TF-Bindestellen mutiert vorlag. **C** EMSA mit dem 109bp Cy3-markierten PCR-Fragment b unter Verwendung der angegebenen mutiert und nicht-mutierten spezifischen Kompetitoren und des unspezifischen Kontroll-Kompetitors. Schwarze Pfeile kennzeichnen die langsamer migrierenden Protein-DNA-Komplexe und weiße Pfeile kennzeichnen die freie DNA.

Die unterschiedliche Protein-DNA-Bindung an der Cytidin-reichen Bindestelle und der mutierten Variante wurde noch deutlicher, wenn man statt PCR-Fragmenten hybridisierte Oligonukleotide mit dieser Bindestelle in einem EMSA verwendete. Hierzu wurden 36bp komplementäre Oligonukleotide hybridisiert, von denen einer durch ein Cy3-Fluorophor markiert war. Diese wurden in einem EMSA unter Verwendung unmarkierter Oligonukleotid-Kompetitoren mit und ohne Mutation der Cytidin-reichen ZBP-Bindestelle eingesetzt. Bei diesen Versuchen wurden die Kompetitoren in einem molaren Überschuss zwischen 50fach und 1000fach zugegeben.

In diesen Versuchen war nur ein Protein-DNA-Komplex durch eine langsamer migrierende Bande zu erkennen. Es zeigte sich, dass der Kompetitor mit mutierter ZBP-Bindestelle diesen Protein-DNA-Komplex erst bei höheren Konzentrationen verdrängen konnte als der nicht-mutierte Kompetitor (siehe Abb. 3.10).

Unter diesen Bedingungen wurden auch nukleäre Extrakte aus Mäuse-Großhirn eingesetzt. Diese wiesen aufgrund der unterschiedlichen Reinheit und Protein-Konzentration der Proteinpräparation eine leicht veränderte Protein-DNA-Bindungs-Aktivität auf, wobei aber ebenfalls die spezifische Bindung an die Cytidin-reiche Bindestelle gezeigt werden konnte.



**Abbildung 3.10: EMSAs mit Oligonukleotiden.** Oligonukleotide mit der Cytidin-reichen ZBP-Bindestelle zeigen eine spezifische Protein-DNA-Bindung mit Kern-Proteinen aus Neuro-2A Zellen und dem Großhirn von adulten Mäusen. Die angegebenen 36bp Cy3-markierten Oligonukleotide wurden mit komplementären Oligonukleotiden hybridisiert und für EMSAs mit den beiden Kern-Extrakten unter Verwendung von unmarkierten mutierten und nicht-mutierten Kompetitor-Oligonukleotiden eingesetzt. KE kennzeichnet die Zugabe von nukleären Extrakt, schwarze Pfeile deuten auf die langsamer migrierenden Protein-DNA-Komplexe und weiße Pfeile kennzeichnen die freie DNA.

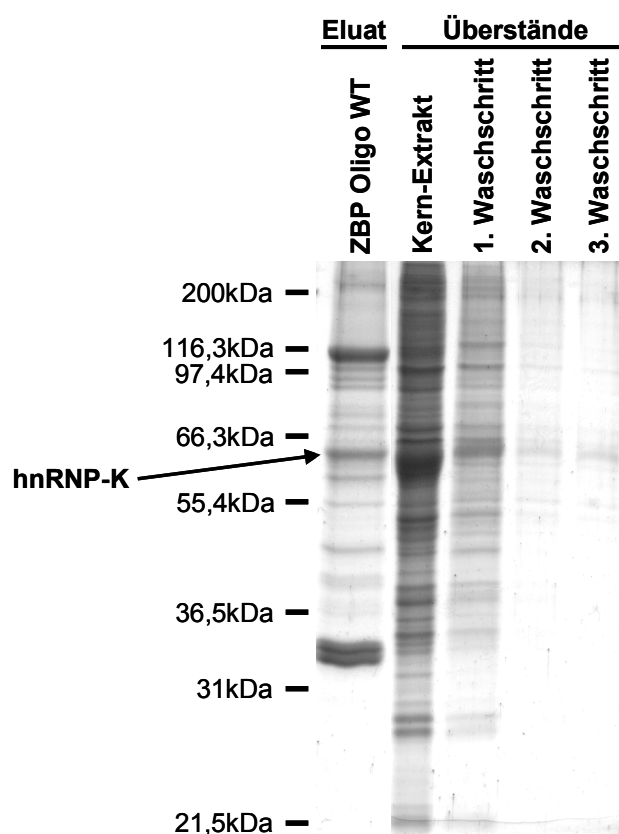
Durch die EMSAs konnten folglich nur für eine der potentiellen TF-Bindestellen spezifische Protein-DNA-Bindungen nachgewiesen werden, nämlich für die Cytidin-reichen Bindestelle. Sowohl in Neuro-2A Zellen als auch im Großhirn von adulten Mäusen waren die spezifischen DNA-Bindeproteine hierfür vorhanden.

### 3.2.5 Suche nach Transkriptionsfaktoren für die ZBP-Bindestelle

Für die Cytidin-reiche ZBP-Bindestelle, deren Mutation einen signifikanten Rückgang der Promotoraktivität im Reporter-gen-Versuch gezeigt hatte (siehe Kapitel 3.2.3) und für die durch EMSAs eine spezifische Protein-DNA-Bindung gezeigt werden konnte (siehe Kapitel 3.2.4), sollten die Transkriptionsfaktoren identifiziert werden, die an dieser DNA-Sequenz binden. Da durch das Programm MatInspector für die Cytidin-reiche Bindestelle gleich vier verschiedene Transkriptionsfaktoren ZBP-89, Sp1, MAZ und Egr-1 vorhergesagt wurden (siehe Kapitel 3.2.3), sollten der Transkriptionsfaktor bzw. die Transkriptionsfaktoren, die in Neuro-2A Zellen an dieser Cytidin-reichen Bindestelle binden, durch eine DNA-Affinitäts-Aufreinigung isoliert und anschließend identifiziert werden. Außerdem sollte durch eine Überexpression der vorhergesagten Kandidaten im Reporter-gen-Versuch geprüft werden, ob dies zu einer Veränderung der Promotoraktivität führt.

#### 3.2.5.1 DNA-Affinitätsaufreinigung

Wie auch im EMSA wurden bei der DNA-Affinitätsaufreinigung wurden das 36bp doppelsträngige Oligonukleotid ZBP Oligo und das 245bp PCR-Fragment a+b eingesetzt. Statt einem Cy3-Fluorophor enthielten diese DNA-Fragmente eine Modifikation mit Biotin, über das die DNA-Fragmente an magnetische Partikel mit Streptavidin gekoppelt wurden. Nach der Inkubation mit nukleärem Extrakt konnten gebundene Proteine mit Hilfe eines Magneten isoliert werden. Anschließend erfolgten drei Waschschrte und dann die Elution der gebundenen nukleären Proteine von den DNA-Fragmenten unter hoher Salzkonzentration (2M MgCl<sub>2</sub>). Nach einer Dialyse des Eluats konnten die gewonnenen Proteinproben auf einem SDS-Polyacrylamidgel aufgetrennt werden. Die Proteine wurden mit Coomassie gefärbt und die Proteinbanden wurden für eine massenspektroskopische Analyse (Maldi-TOF) aus dem Gel ausgeschnitten und einem tryptischen Verdau unterzogen. Die Maldi-TOF-Analyse erfolgte am CeBiTec (Bielefeld).



**Abbildung 3.11: DNA-Affinitätsaufreinigung mit dem 36bp ZBP-Oligonukleotid.** Der Transkriptionsfaktor hnRNP-K (*heterogenous nuclear Ribonucleoprotein K*) bindet an die Cytidinreiche Bindestelle. Eine DNA-Affinitäts-Aufreinigung wurde mit einem doppelsträngigen Biotinmarkierten 36bp Oligonukleotid, das die Cytidin-reiche ZBP-Bindestelle enthält, durchgeführt. Die dabei erhaltenen Protein-Proben wurden auf einem 7% SDS-Polyacrylamidgel aufgetrennt und anschließend mit Coomassie gefärbt. Dabei wurde das gesamte Eluat mit etwa 35 $\mu$ l, 10 $\mu$ l der Bindungsreaktion/Kern-Extrakt und je 30 $\mu$ l der Waschschriffe aufgetragen. Die Größenbestimmung erfolgte über den Proteinmarker Mark12 (Invitrogen). Mit den Proteinbanden des Eluats erfolgte eine Maldi-TOF-Analyse.

In Abbildung 3.11 ist das Ergebnis einer DNA-Affinitätsaufreinigung exemplarisch dargestellt. Das Eluat zeigt, dass bei der Aufreinigung mehrere Proteine isoliert wurden. Die Identifikation der Proteinbanden durch die Maldi-TOF-Analyse erwies sich als schwierig, da es bei dem Abgleich der erzielten Massenspektren mit Protein-Datenbanken für die Maus nur für wenige Banden ein signifikantes Ergebnis gab. Dies ist auf die geringe Ausbeute bei der durchgeführten DNA-Affinitätsaufreinigung zurückzuführen. Bei einigen der isolierten Proteine handelt es sich um unspezifische DNA-Bindeproteine wie z.B. Histone. In mehreren Durchgängen der DNA-Affinitätsaufreinigung unter leicht variierenden Versuchsbedingungen konnte keiner der für die Cytidin-reiche Bindestelle vorhergesagten Transkriptionsfaktoren isoliert werden. Es wurde jedoch ein Protein mit bekannter transkriptioneller Aktivität mehrmalig isoliert, dabei handelte es sich um das multifunktionelle Protein hnRNP-K

(*heterogenous nuclear ribonucleoprotein K*). Für hnRNP-K konnte neben der Aktivität als Transkriptionsfaktor auch Funktionen beim Spleißen und Transport der mRNA gezeigt werden (Bomsztyk et al., 2004). Um zu prüfen, ob hnRNP-K einen Einfluss auf die Expression von Nrg-1 Typ I-Isoformen hat, sollte auch dieser Transkriptionsfaktor bei einem Promotor-Reporter-Versuch überexprimiert werden.

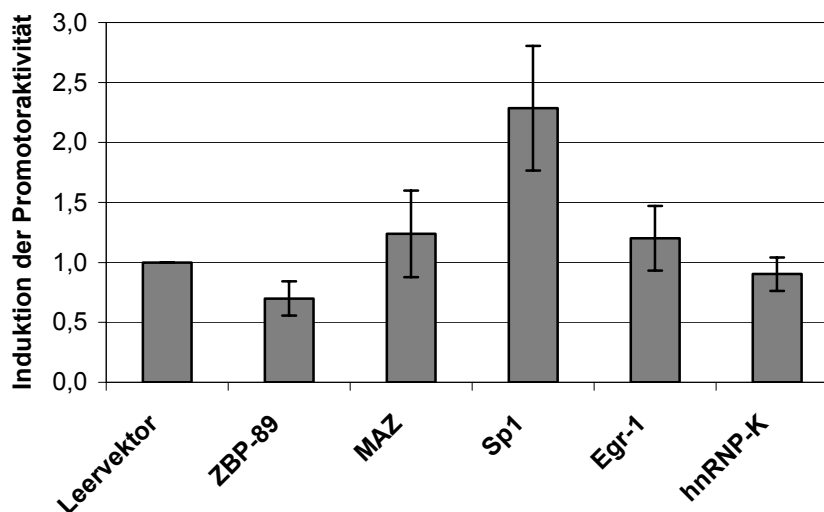
### 3.2.5.2 Überexpression von Transkriptionsfaktoren im Reporteragen-Versuch

Die vier von dem Programm MatInspector vorhergesagten Transkriptionsfaktoren ZBP-89, Sp1, MAZ und Egr-1, sowie der durch die DNA-Affinitätsaufreinigung gefundene TF hnRNP-K wurden bei Promotor-Reporter-Versuchen in Neuro-2A Zellen überexprimiert. Dabei wurde das Reporter-Konstrukt mit dem Deletionsfragment Pb eingesetzt, in dem die Cytidin-reiche ZBP-Bindestelle enthalten ist. In einer Cotransfektion des Deletionskonstrukts Pb mit dem Luziferase-Kontrollvektor und einem TF-Expressionsvektor sollte im Vergleich mit der entsprechenden Cotransfektion mit dem Leervektor dieses TFs geprüft werden, ob die Überexpression zu einer veränderten Promotoraktivität führt.

Nach einigen Reporteragen-Versuchen zeigte sich, dass durch die Überexpression der verschiedenen Transkriptionsfaktoren die Luziferase-Aktivitäten des pPALU Kontrollvektors unterschiedlich beeinflusst wurden, so dass die Werte für eine Normalisierung der Transfektionseffizienz nicht genutzt werden konnten. Daher wurden andere *Firefly* Luziferase-Expressionsvektoren getestet. Doch auch die Verwendung der Vektoren pGL3 und pGL4 (Promega) zeigte eine Beeinflussung der Luziferase-Aktivität durch die Überexpression der Transkriptionsfaktoren. Deshalb war die Normalisierung der Transfektionseffizienz nicht möglich. Stattdessen wurde die Anzahl der unabhängigen Experimente auf 6 bis 8 erhöht, so dass die zufällig auftretenden Schwankungen der Transfektionseffizienz nicht so stark ins Gewicht fallen.

Es zeigte sich, dass die Überexpression der Transkriptionsfaktoren MAZ, Egr-1 und hnRNP-K kaum eine Veränderung der Promotoraktivität zur Folge hatte. Durch die Expression des TF ZBP-89 kam es zu einer um etwa 30% reduzierten Promotoraktivität des Reporterkonstrukts Pb. Die Überexpression von Sp1 bewirkte eine um das 2,3fache gesteigerte Promotoraktivität (siehe Abb. 3.12). Diese Ergebnisse wurden jedoch auch unter der Verwendung des Reporterkonstrukts Pb

mit mutierter ZBP-Bindestelle erzielt (Daten nicht gezeigt), so dass der Einfluss der getesteten Transkriptionsfaktoren nicht im Zusammenhang mit der Bindung an die Cytidin-reiche ZBP-Bindestelle zu stehen scheint.



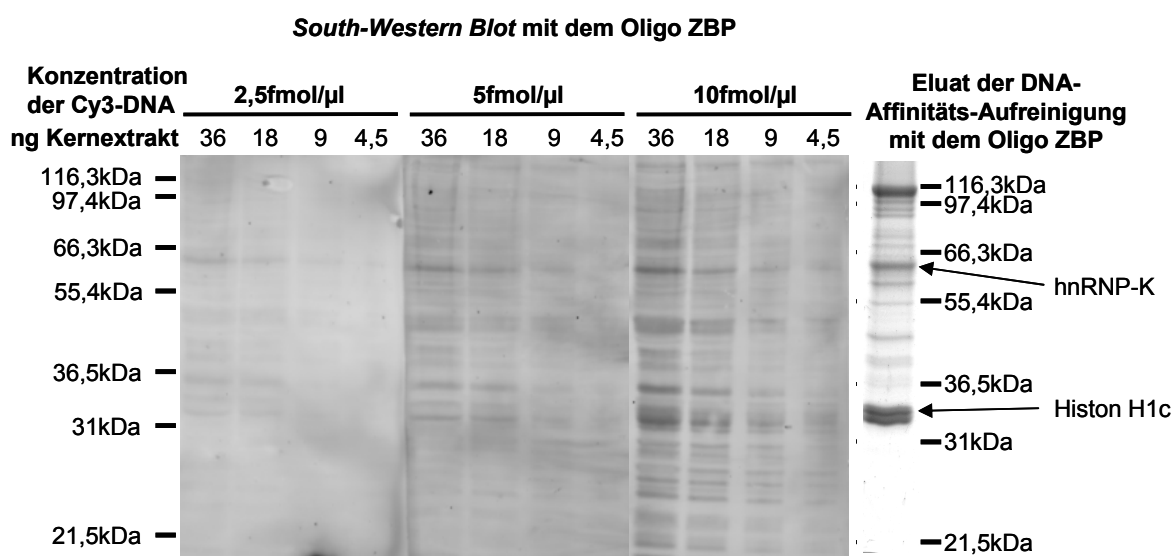
**Abbildung 3.12: Überexpression der potentiellen Transkriptionsfaktoren der ZBP-Bindestelle.** Der TF ZBP-89 zeigt einen inhibitorischen Effekt und der TF Sp1 zeigt einen verstärkenden Effekt auf die Promotoraktivität des Reporterkonstrukts Pb. Neuro-2A Zellen wurden mit 250ng Reporterkonstrukt Pb, 250ng Luziferase-Kontrollvektor und 500ng Expressionsvektor für die angegebenen Transkriptionsfaktoren oder dessen Leervektoren cotransfiziert. 48h nach der Transfektion erfolgten die Messungen der  $\beta$ -Galaktosidase- und Luziferase-Aktivitäten mit dem Dual-Light System (Applied Biosystems). Da die Luziferase-Aktivitäten durch die verwendeten TFs unterschiedlich beeinflusst wurden, konnte keine Normalisierung der Transfektionseffizienzen durchgeführt werden. Die  $\beta$ -Galaktosidase-Aktivitäten bei Überexpression sind als Vielfaches der Aktivität der entsprechenden Leervektoren, die als 1 gesetzt wurde, dargestellt. Die Daten repräsentieren dabei die Mittelwerte aus 6 bis 8 Experimenten mit angegebener Standardabweichung.

### 3.2.5.3 Suche nach weiteren Transkriptionsfaktoren für die ZBP-Bindestelle

Da der Transkriptionsfaktor hnRNP-K zwar bei der DNA-Affinitätsaufreinigung an die Cytidin-reiche ZBP-Bindestelle bindet, die Überexpression dieses TFs aber keinen Einfluss auf die Promotor-Reporterkonstrukte in Neuro-2A Zellen gezeigt hat, sollte durch einen *South-Western Blot* geprüft werden, ob sich weitere spezifische Interaktionspartner der Cytidin-reichen Bindestelle nachweisen lassen, die bei der DNA-Affinitätsaufreinigung noch nicht identifiziert worden waren.

Hierzu wurden nukleäre Extrakte der Neuro-2A Zellen in SDS-Polyacrylamidgelen aufgetrennt und durch einen *Semidry*-Elektroblot auf eine Nitrocellulose-Membran (Schleicher und Schuell) übertragen. Durch die Inkubation dieser Membran in einem physiologischen Puffer, sollten die aufgebrauchten Kernproteine renaturiert werden,

um ihre nativen Bindungseigenschaften zurück zu gewinnen. Anschließend wurden die Proteine mit dem doppelsträngigen 36bp Cy3-markierten Oligonukleotid mit ZBP-Bindestelle inkubiert, welches auch bei den EMSAs verwendet wurde (siehe Kapitel 3.2.4). Nichtgebundene Cy3-markierte DNA wurde danach durch drei Waschschriffe entfernt. Der Nachweis von gebundener Cy3-markierter DNA wurde mit dem Typhoon 8600 Variable Mode Imager (Amersham Biosciences) dokumentiert, wobei sich die Molekularmasse der Interaktionspartner durch Vergleich mit einem mitgeführten Proteinmarker bestimmen ließ.



**Abbildung 3.13: South-Western Blot unter Verwendung des ZBP-Oligonukleotids.** Die stärksten Bindungen des Oligonukleotids mit der Cytidin-reichen ZBP-Bindestelle findet man bei einem Protein mit etwa 64kDa und einem Protein mit ca. 33kDa. Nukleäre Extrakte wurden in den angegebenen Mengen in einem SDS-Polyacrylamidgel aufgetrennt und durch einen *Semidry*-Elektroblot auf eine Nitrocellulose-Membran übertragen. Nach der Renaturierung der Kernproteine erfolgte die Inkubation mit dem Cy3-markierten ZBP-Oligonukleotid. Gebundene Cy3-markierte DNA wurde mit dem Typhoon 8600 Variable Mode Imager (Amersham Biosciences) nachgewiesen. Zum Vergleich mit den Ergebnissen der DNA-Affinitätsaufreinigung ist das Eluat aus Abbildung 3.8 erneut dargestellt.

Das Cy3-markierte Oligonukleotid mit der Cytidin-reichen ZBP-Bindestelle wurde in dem *South-Western Blot* von mehreren Proteinen gebunden (siehe Abb. 3.13). Dabei zeigen sich die stärksten Bindungen, die schon bei geringer DNA-Konzentration entstehen und die die größte Intensität bei steigender DNA-Menge erreichen, bei einem Protein mit etwa 64kDa und einem zweiten Protein mit etwa 33kDa. Diese Proteinbanden tauchten auch nach der DNA-Affinitätsaufreinigung (siehe Kapitel 3.2.5.1) auf und konnten als hnRNP-K und Histon H1c identifiziert werden. Somit zeigen diese Ergebnisse, dass der Transkriptionsfaktor hnRNP-K an dem ZBP-Oligonukleotid mit hoher Affinität binden kann. Andere Bindungen des ZBP-



Oligonukleotids durch Proteine bei etwa 35kDa und bei etwa 50kDa sind im *South-Western Blot* ebenfalls schon bei geringen DNA-Konzentrationen zu erkennen, lassen sich in dem Eluat der DNA-Affinitätsaufreinigung aber nicht wieder finden. Da es sich bei diesen Proteinen ebenfalls um Transkriptionsfaktoren handeln könnte, die an der Cytidin-reichen Bindestelle mit hoher Affinität binden, aber in dem Eluat der Aufreinigung aufgrund ihrer geringen Konzentration nicht sichtbar sind, sollten die Eluate der DNA-Affinitäts-Aufreinigung einer genaueren Analyse durch eine LC-ESI unterzogen werden.

#### **3.2.5.4 DNA-Affinitätsaufreinigung mit anschließender LC-ESI-Analyse**

Die im Kapitel 3.2.5.1 dargestellte Vorgehensweise zur Identifizierung der bei der DNA-Affinitätsaufreinigung isolierten Proteine mit eindimensionaler SDS-Gelelektrophorese, Coomassie-Färbung und Maldi-TOF-Analyse der Proteinbanden hat sich als unzureichend erwiesen. Daher sollte eine LC-ESI-Analyse der Eluate durchgeführt werden, um möglichst alle bei der DNA-Affinitäts-Aufreinigung isolierten Proteine identifizieren zu können. Bei der LC-ESI-Analyse wird ein Proteingemisch einem tryptischen Verdau unterzogen und die resultierenden Peptid-Fragmente werden durch eine HPLC-Aufreinigung fraktioniert. Anschließend werden MS/MS-Spektren der Peptid-Fragmente erstellt, so dass durch den Abgleich mit Datenbanken die Peptide und damit auch die Proteine in der Probe identifiziert werden können.

Für die LC-ESI-Analyse wurden DNA-Affinitätsaufreinigungen mit dem PCR-Fragment a+b durchgeführt, welches auch bei den EMSAs unter Kapitel 3.2.4 eingesetzt wurde und dort die Ausbildung von drei spezifischen DNA-Protein-Komplexen gezeigt hatte. Um die Transkriptionsfaktoren identifizieren zu können, die an der Cytidin-reichen ZBP-Bindestelle binden, wurden zwei DNA-Proben eingesetzt. Eine dieser Proben enthielt die Wildtyp-Sequenz, die andere enthielt die Mutation der Cytidin-reichen Bindestelle. Die mit diesen Proben erzielten Ergebnisse sollten miteinander verglichen werden. Die dialysierten Eluate der DNA-Affinitätsaufreinigung wurden tryptisch verdaut und die LC-ESI-Analyse der Proben wurde durch Dr. Sven Brand (Bruker Daltonik, Bremen) unter Verwendung eines HCT ultra Ion Trap LC/MS<sup>(n)</sup>-Systems erstellt. Die Ergebnisse sind in der Tabelle 3.1 dargestellt.

<p><b>im Eluat beider DNA-Proben:</b></p> <p><b>a+b WT</b></p> <p><b>und</b></p> <p><b>a+b ZBPmut</b></p>	<p>Elongation factor 1-alpha 1 (EF-1-alpha-1)  Elongation factor 1-beta (EF-1-beta)  Elongation factor 1-gamma (EF-1-gamma)  <b>Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein K (hnRNP-K)</b>  Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein A3 (hnRNP A3)  Histone H1.2 (H1c)  Histone H1.5 (H1b)  Lamin A  Peptidyl-prolyl cis-trans isomerase B precursor (PPIase)  <b>Polypyrimidine tract-binding protein-associated splicing factor (PSF)</b>  Proliferation-associated protein 2G4  PRP19/PSO4 homolog (Nuclear matrix protein 200)  RNA-binding protein FUS (Pigpen protein)  Septin-2  Septin-7  Septin-11  Staphylococcal nuclease domain containing protein 1 (p100 co-activator)  TATA box-binding protein-associated factor 2S</p>
<p><b>nur im Eluat der DNA-Probe:</b></p> <p><b>a+b WT</b></p>	<p>DNA-(apurinic or apyrimidinic site) lyase (AP endonuclease 1)  EH-domain containing protein 4 (mPAST2)  Eukaryotic translation initiation factor 2 subunit 3  Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein A1 (hnRNP core protein A1)  Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein L (hnRNP L)  Histone H1.1 (H1a)  Lamina-associated polypeptide 2 isoforms alpha/zeta  Peptidyl-prolyl cis-trans isomerase NIMA-interacting 4  Peroxisomal multifunctional enzyme type 2 (MFE-2)  Poly(rC)-binding protein 2 (Alpha-CP2)</p>
<p><b>nur im Eluat der DNA-Probe:</b></p> <p><b>a+b ZBPmut</b></p>	<p>Glandular kallikrein K24 precursor  Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein A/B (hnRNP A/B)  Heterogeneous nuclear ribonucleoproteins A2/B1 (hnRNP A2/hnRNP B1)  Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein D0 (hnRNP D0)  Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein G (hnRNP G)  Nucleophosmin (NPM)</p>

**Tabelle 3.1: Liste der mittels DNA-Affinitätsaufreinigung isolierten Kern-Proteine.** Die beiden Transkriptionsfaktoren hnRNP-K und PSF binden an dem PCR-Fragment a+b. Die Aufreinigung erfolgte mit dem 245bp PCR-Fragment a+b mit und ohne Mutation der Cytidin-reichen Bindestelle. Die isolierten Kern-Proteine wurden durch eine LC-ESI-Analyse (Dr. Sven Brand, Bruker Daltonik) identifiziert. Bekannte Transkriptionsfaktoren sind fettgedruckt.

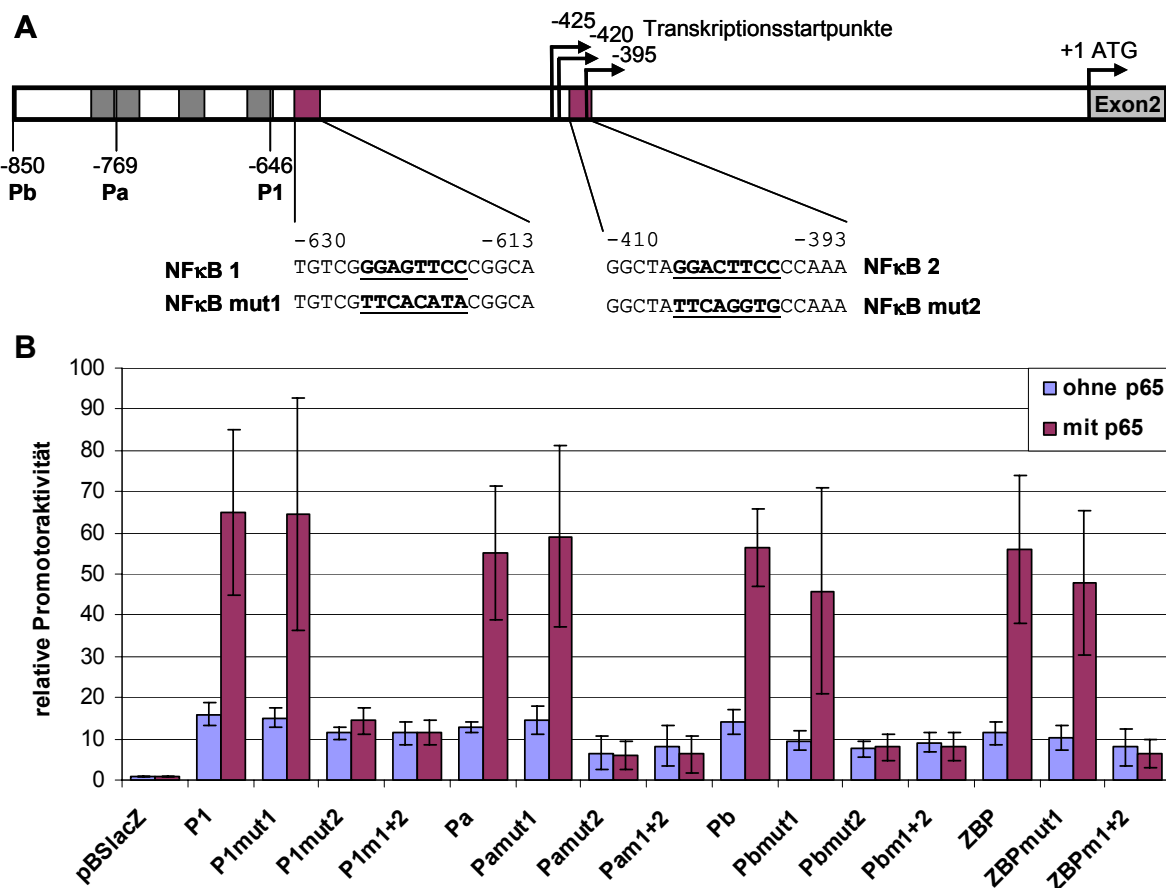
Es zeigte sich, dass unter den isolierten Kern-Proteinen nur zwei Proteine waren, die in der Literatur als Transkriptionsfaktoren beschrieben wurden. Neben dem bereits zuvor isolierten hnRNP-K wurde das ebenfalls multifunktionelle Protein PSF (*polypyrimidine tract-binding protein-associated splicing factor*) identifiziert, von dem auch transkriptionelle Aktivität beschrieben wurde. Es finden sich keine weiteren Transkriptionsfaktoren unter den Proteinen, die nur mit der Wildtyp-Sequenz isoliert werden konnten, was auf eine Bindung an der Cytidin-reichen ZBP-Bindestelle hingedeutet hätte.

### 3.2.6 Aktivierung des Neuregulin-1 Typ I-Promotors durch NF $\kappa$ B

Auf der Suche nach weiteren potentiellen Transkriptionsfaktoren für die Cytidinreiche ZBP-Bindestelle wurden neben dem Programm MatInspector weitere Vorhersageprogramme für Transkriptionsfaktor-Bindestellen eingesetzt. In der Vorhersage des Programms Match<sup>TM</sup> ([www.gene-regulation.com](http://www.gene-regulation.com)) fielen zwei potentielle Bindestellen für den Transkriptionsfaktor NF $\kappa$ B auf, die unmittelbar *upstream* und *downstream* von der Cytidin-reichen Bindestelle liegen. In der Literatur über die potentiellen Transkriptionsfaktoren der Cytidin-reichen Bindestelle wurde wiederholt eine gemeinsame Regulation in verschiedenen Promotoren mit z.B. Sp1 und NF $\kappa$ B oder Egr-1 und NF $\kappa$ B beschrieben. Zudem berichtete PD Dr. Skerka (persönliche Mitteilung, Leibniz Institut für Naturstoff Forschung und Infektionsbiologie, Jena), die mit dem TF Egr-1 arbeitet und dessen Expressionsvektor zur Verfügung gestellt hatte, dass Erg-1 teilweise erst durch die gemeinsame Regulation mit NF $\kappa$ B eine Promotor-Aktivierung auslösen kann. Daher wurde der Einfluss von NF $\kappa$ B auf den Nrg-1 Typ I-Promotor durch Überexpression der NF $\kappa$ B-Untereinheit p65 in Neuro-2A Zellen untersucht. Bei dieser Überexpression von p65 im Reporter-gen-Versuch zeigte sich, dass p65 die Promotoraktivität stark steigert (siehe Abb. 3.14). Die Überexpression von p65 in Kombination mit jeweils einem der potentiellen Transkriptionsfaktoren der Cytidin-reichen Bindestelle ZBP-89, MAZ, Sp1, Egr-1 und hnRNP-K führte zu keiner weiteren Aktivierung, sondern ließ die Promotoraktivität schwächer ansteigen als durch die Überexpression von p65 alleine (Daten nicht gezeigt). Wie man in Abbildung 3.14 erkennen kann, führte die p65-Überexpression bei den getesteten Reporter-gen-Konstrukten P1, Pa und Pb zu einer Steigerung der Promotoraktivität, was auch auf das Deletionskonstrukt Pb mit mutierter ZBP-Bindestelle zutraf, das in Abbildung 3.14 als ZBP bezeichnet wurde. Somit steht die Aktivierung des Nrg-1 Typ I-Promotors durch die Überexpression von p65 nicht im Zusammenhang mit der Cytidin-reichen ZBP-Bindestelle.

Um zu zeigen welche TF-Bindestelle die Promotor-Aktivierung durch p65 vermittelt, wurde der Promotorbereich mit dem Vorhersageprogramm MatInspector auf weitere potentielle NF $\kappa$ B-Bindestellen durchsucht. In dem Promotorbereich des mit 557bp kürzesten Deletionsfragments P1, welches eine NF $\kappa$ B-Aktivierung offenbarte, konnten zwei potentielle NF $\kappa$ B-Bindestellen gezeigt werden (siehe Abb. 3.14). Diese beiden Bindestellen wurden durch zielgerichtete Mutagenese durch die in Abbildung

3.14 angegebenen Nukleotidsubstitutionen verändert. Dabei wurden zunächst jeweils eine der beiden Bindestellen in den Deletionsfragmenten P1, Pa, Pb und ZBP (Pb mit mutierter ZBP-Bindestelle) mutiert. Die eingebrachten Mutationen wurden durch Sequenzierungen bestätigt und mit Hilfe dieser einfach mutierten Konstrukte wurden Reporter-Gen-Konstrukte generiert, in denen beide NF $\kappa$ B-Bindestellen mutiert vorliegen. Der Einfluss dieser Mutationen wurde in Reporter-Gen-Versuchen mit und ohne Überexpression der NF $\kappa$ B-Untereinheit p65 untersucht.



**Abbildung 3.14: Aktivierung des Nrg-1 Typ I-Promotors durch die NF $\kappa$ B-Untereinheit p65.** Die Überexpression von p65 führt zu einer erhöhten Promotoraktivität durch die NF $\kappa$ B-Bindestelle zwischen -410 und -393. **A** Schematische Darstellung der Nrg-1 Typ I-Promotorregion der Maus. In dem Promotorbereich wurden mit dem Programm MatInspector zwei potentielle NF $\kappa$ B-Bindestellen vorhergesagt. Diese Bindestellen wurden durch zielgerichtete Mutagenese mit den gezeigten Nukleotidsubstitutionen verändert. Die Nummern kennzeichnen dabei die Positionen relativ zum Translationsstartpunkt +1. **B** Neuro-2A Zellen wurden cotransfiziert mit den mutierten oder nicht-mutierten Reporterkonstrukten, dem Luziferase-Kontrollvektor pGL4.10+TK (Promega, modifiziert durch eingebrachten Thymidin Kinase Promotor des Herpes Simplex Virus aus dem Vektor pGL4.74) und einem p65-Expressionsvektor oder dessen Leervektor. 48h nach der Transfektion wurden die Promotoraktivitäten mit dem Dual-Light System (Applied Biosystems) bestimmt. Dabei dienten die Luziferase-Aktivitäten der Normalisierung der Transfektionseffizienzen. Die  $\beta$ -Galaktosidase-Aktivitäten sind als Vielfaches der Aktivität des Leervektors pBSlacZ mit und ohne p65, die jeweils als 1 gesetzt wurden, dargestellt. Die Daten repräsentieren die Mittelwerte aus drei unabhängigen Experimenten mit dargestellter Standardabweichung.

Es zeigte sich, dass die Mutation der NF $\kappa$ B-Bindestelle zwischen -630 und -613 (mut1) keinen Einfluss auf die Promotoraktivierung durch p65-Überexpression hatte. Die Mutation der Bindestelle zwischen -410 und -393 (mut2) zeigte hingegen einen Verlust der Promotoraktivierung durch p65-Überexpression. Auch die Reporterkonstrukte mit beiden Mutationen (m1+2) zeigten diese ausbleibende Promotoraktivierung bei p65-Überexpression. Die Promotoraktivität bei p65-Überexpression fällt bei den Konstrukten mit der Mutation 2 auf das Niveau ihrer Promotoraktivität ohne p65-Überexpression herab. Somit wird die Aktivierung des Nrg-1 Typ I-Promotors durch die NF $\kappa$ B-Untereinheit p65 durch die Bindestelle 2 in der Position zwischen -410 und -393 (relativ zum Translationsstartpunkt +1) vermittelt.

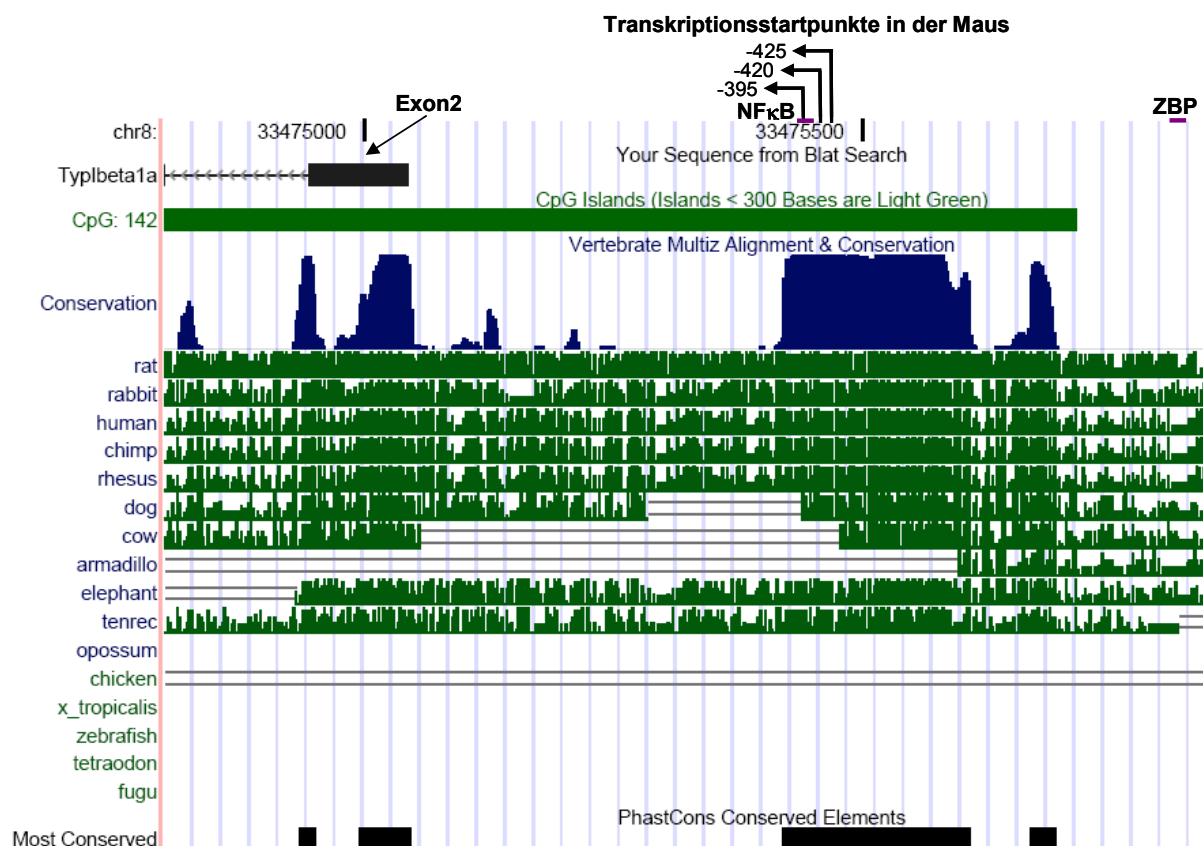
Betrachtet man die Promotoraktivitäten ohne p65-Expression, so fällt auf, dass die Konstrukte mit der Mutation 2 tendenziell eine leicht reduzierte Aktivität aufweisen. Bei der Anzahl der bisher durchgeführten Experimente kann man jedoch noch nicht von einem signifikanten Effekt sprechen. Da dieser Trend aber bei allen getesteten Reporterkonstrukten auftrat, ergibt sich der Hinweis, dass NF $\kappa$ B auch ohne Überexpression an der Nrg-1 Typ I- Expression in Neuro-2A Zellen beteiligt sein könnte.

### **3.2.7 *In silico* Analyse der Neuregulin-1 Typ I-Promotorregion**

Die experimentelle Charakterisierung des Neuregulin-1 Typ I-Promotors hatte gezeigt, welcher Promotorbereich für die Neuregulin-Expression in der Maus-Zelllinie Neuro-2A notwendig war. Um zu überprüfen, ob dieser experimentell gefundene Promotorbereich auch in anderen Organismen konserviert vorliegt, wurden die homologen Bereiche mit Hilfe des *UCSC Genome Browser* (Stand: September 2006; <http://genome.ucsc.edu/>) analysiert (siehe Abb. 3.15).

Für die untersuchte Promotorregion von Neuregulin-1 Typ I-Isoformen der Maus findet man in den bislang sequenzierten Genomen nur in anderen Säugetierarten Bereiche mit hoher Homologie. In anderen Vertebraten wie dem Krallenfrosch, dem Huhn oder dem Zebrafisch findet man ebenfalls ein Neuregulin-1-Gen, die größte Homologie findet sich jedoch in der EGF-Domäne und nicht am 5'-Ende. Zudem sind für diese Arten bislang auch nur wenige Transkripte beschrieben worden, bei denen

es sich zumeist um Typ III-Isoformen handelt. Daher konnten für diese Arten keine konservierten Bereiche zu der Typ I-Promotorregion identifiziert werden.



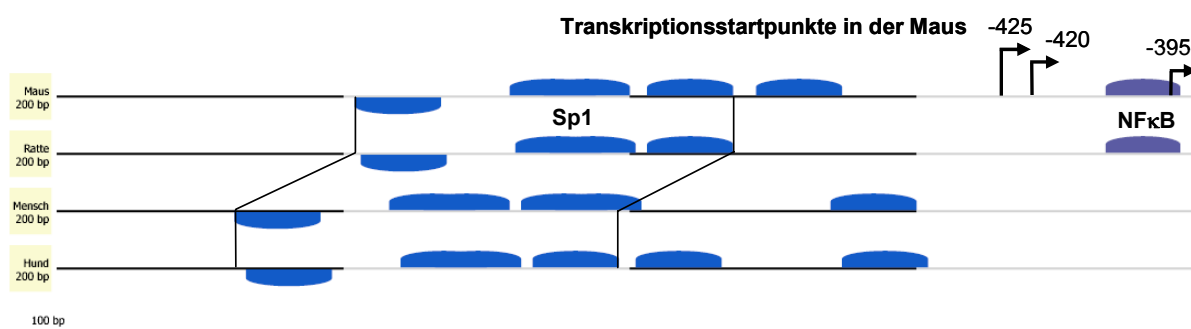
**Abbildung 3.15: Analyse homologer Promotorbereiche mit dem UCSC Genome Browser.** Der Kernpromotor der Maus ist in nahe verwandten Säugetierarten konserviert. Dargestellt ist die Region um das erste Exon der Typ I- $\beta$ 1a Isoform (Exon2 von *Nrg-1*) auf dem Maus-Chromosom 8, dessen Lage oben links durch den schwarzen Balken markiert wird. Aufgrund der Orientierung des Neuregulin-Gens auf dem Chromosom 8 befindet sich die Region upstream vom ersten Exon auf der rechten Seite. Neben der Analyse von CpG-Inseln in diesem Bereich wird der Sequenzvergleich mit homologen Bereichen der angegebenen Organismen gezeigt. In blau wird das Multiple Alignment und in grün sind die einzelnen Alignments dargestellt, wobei die Höhe der Kurve den Grad der Konservierung widerspiegelt. Die Lage der in dieser Arbeit ermittelten Transkriptionsstartpunkte ist durch Pfeile dargestellt. Die Positionen der untersuchten NF $\kappa$ B- und Cytidin-reiche ZBP-Bindestellen sind durch lila Balken gezeigt.

Bei den verschiedenen Säugetierarten zeigen sich Bereiche mit hoher Homologie zum einen in dem ersten Exon der Typ I-Isoformen und zum anderen in der Promotorregion. Mit dem *UCSC Genome Browser* wird in der Promotorregion durch das implementierte Programm PhastCons ein 189bp *Conserved Noncoding Sequence* (CNS)-Element beschrieben. Dieses CNS-Element befindet sich zwischen den Positionen -378 und -566 relativ zum Translationsstartpunkt und enthält demnach die bei der Maus identifizierten Transkriptionsstartpunkte bei -395, -405 und -425 (siehe Kapitel 3.2.1), sowie die untersuchte NF $\kappa$ B-Bindestelle zwischen

-410 und -393 (siehe Kapitel 3.2.6). Somit liegt der Kernpromotor der Nrg-1 Typ I-Isoformen bei Säugetieren konserviert vor.

Des Weiteren zeigte die Betrachtung der Typ I-Promotorregion mit dem *UCSC Genome Browser*, dass sich diese in einer CpG-Insel befindet. Diese CpG-Insel erstreckt sich bei der Maus über 1348bp, weist einen GC-Gehalt von 66,2% auf und hat einen CpG-Gehalt von 21,1%. Homologe CpG-Inseln waren auch in anderen Säugetierarten wie Mensch, Ratte, Hund und Rind zu finden.

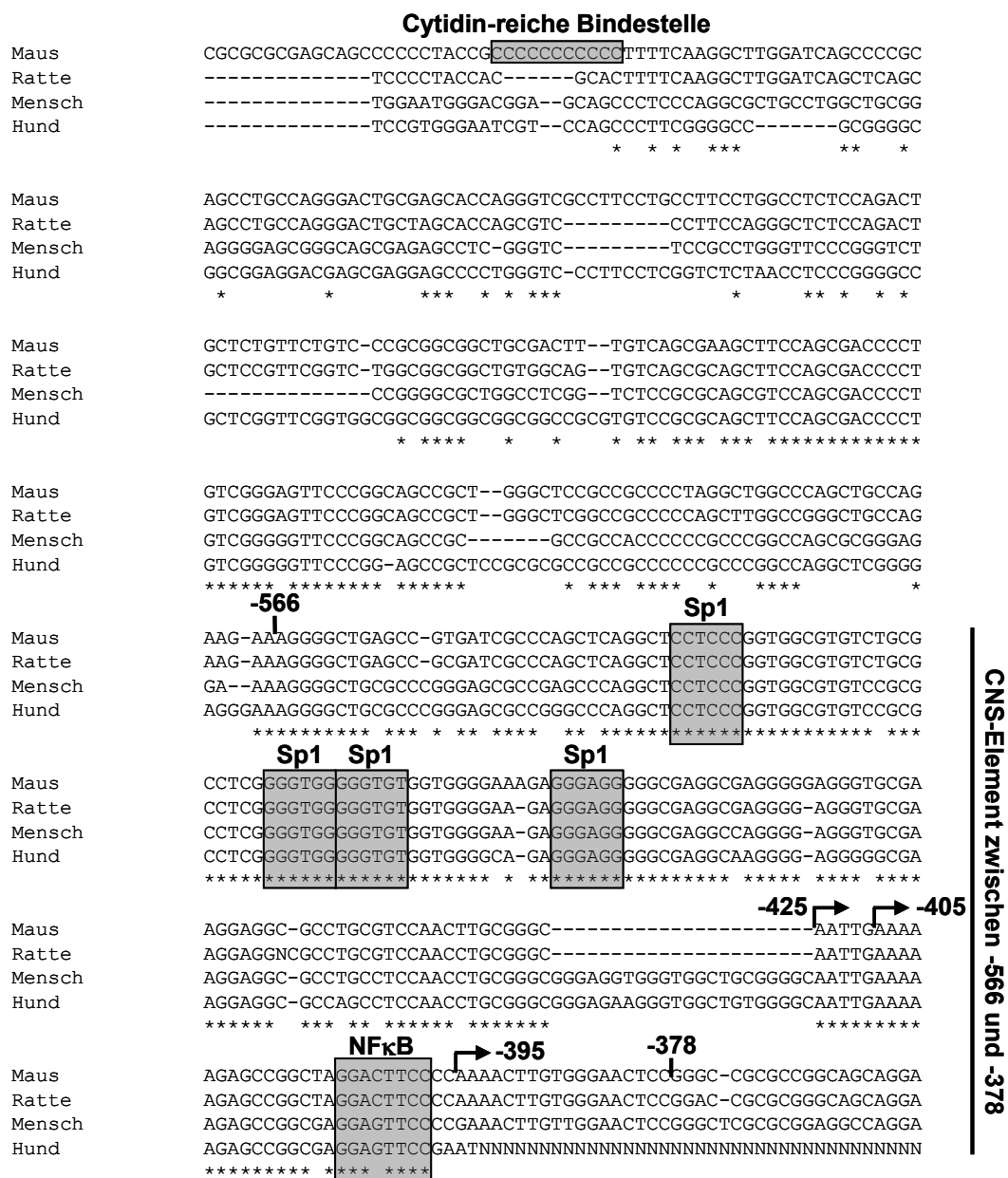
Promotoren, die in CpG-Inseln liegen und multiple Transkriptionsstartpunkte aufweisen, haben häufig mehrere Sp1-Bindestellen in der Promotorregion. Da die Überexpression von Sp1 eine etwa 2,3 fache Steigerung der Aktivität des Nrg-1 Typ I-Promotors gezeigt hatte, diese aber nicht durch die Cytidin-reiche Bindestelle vermittelt wurde (siehe Kapitel 3.2.5.2), wurde der etwa 200bp große Promotorbereich mit hoher Homologie mit dem Programm MatInspector auf Sp1-Bindestellen durchsucht. Wie man in der Abbildung 3.16 erkennen kann, befinden sich mindestens vier Sp1-Bindestellen bei den getesteten Organismen Maus, Ratte, Mensch und Hund in diesem Bereich. Diese vier Sp1-Bindestellen zeigen bei allen Organismen die gleichen Abstände und Orientierungen untereinander. Ihre Positionen liegen bei den Nagern Maus und Ratte etwa 20bp näher an den Transkriptionsstartpunkten.



**Abbildung 3.16: Sp1-Bindestellen in der konservierten Neuregulin-1 Typ I-Promotorregion.** Schematische Darstellung der MatInspector-Vorhersage von Sp1-Bindestellen in der etwa 200bp großen konservierten Promotorregion bei Maus, Ratte, Mensch und Hund. Die in dieser Arbeit ermittelten Transkriptionsstartpunkte der Maus sind zur Orientierung durch Pfeile eingezeichnet. Schwarze Linien grenzen die vier in blau dargestellten Sp1-Bindestellen ein, die bei den vier Organismen konserviert vorliegen. Die in lila gezeigte NFκB-Bindestelle wird von dem Programm MatInspector nur bei der Maus und bei der Ratte vorhergesagt.

Betrachtet man ein multiples Alignment von Maus, Ratte, Mensch und Hund in der Nrg-1 Typ I-Promotorregion zwischen der bei der Maus untersuchten Cytidin-reichen ZBP-Bindestelle und der NFκB-Bindestelle, so zeigt sich, dass die Cytidin-reiche

Bindestelle in den anderen Säugetierarten nicht konserviert vorliegt (siehe Abb. 3.17).



**Abbildung 3.17: Multiples Alignment von Maus, Ratte, Mensch und Hund.** Die NFκB-Bindestelle liegt in den dargestellten Säugetierarten konserviert vor. Von der Promotorregion zwischen der Cytidin-reichen Bindestelle und der NFκB-Bindestelle in der Maus wurden mit den homologen Sequenzen aus Ratte, Mensch und Hund ein multiples Alignment mit dem Programm ClustalW ([www.ebi.ac.uk/clustalw](http://www.ebi.ac.uk/clustalw)) erzeugt. Graue Kästchen markieren die TF-Bindestellen. Die Positionen der Transkriptionsstartpunkte in der Maus sind durch Pfeile wiedergegeben und die Position des durch das Programm PhastCons beschriebenen CNS-Elements zwischen -566 und -378 wird gezeigt.

Die vier Sp1-Bindestellen liegen hingegen in dem zuvor beschriebenen CNS-Element und zeigen eine extrem hohe Konservierung zwischen den getesteten Organismen. Durch die 22bp große Lücke vor dem Transkriptionsstartpunkt bei -425, die in den



Nagern möglicherweise durch eine Deletion entstanden ist, erklärt sich auch die abweichenden Positionen der vier Sp1-Bindestellen in der Abbildung 3.16.

Die NF $\kappa$ B-Bindestelle liegt ebenfalls in dem CNS-Element und weist nur einen Basenaustausch zwischen den untersuchten Spezies auf. Die in den Nagern Maus und Ratte zu findende Variante GGACTTTCC wird durch die Vorhersageprogramme MatInspector, rVista (<http://genome.lbl.gov/vista/index.shtml>) und Match<sup>TM</sup> als potentielle NF $\kappa$ B-Bindestelle ausgewiesen. Die Variante GGAGTTTCC, die man in den anderen Säugetierarten findet, wird durch das Programm MatInspector nicht als NF $\kappa$ B-Bindestelle erkannt (siehe Abb. 3.16). rVista und Match<sup>TM</sup> weisen dagegen auch diese Variante als NF $\kappa$ B-Bindestelle aus.

Somit konnte durch die *in silico*-Analyse gezeigt werden, dass die bei der Maus bestimmten Transkriptionsstartpunkte sowie die untersuchte NF $\kappa$ B-Bindestelle in einem Bereich liegen, der auch in anderen Säugetierarten konserviert vorliegt. Diese konservierte Promotorregion liegt in einer CpG-Insel und es befinden sich in diesem homologen Bereich bei Maus, Ratte, Mensch und Hund mehrere Sp1-Bindestellen. Die untersuchte Cytidin-reiche Bindestelle liegt hingegen bei anderen Säugetierarten nicht konserviert vor.

## 4 Diskussion

Im Rahmen dieser Arbeit wurden zwei unterschiedliche Regulationsmechanismen des Neuregulin-1-Signalwegs untersucht. Eine Beteiligung der Protease ADAM10 an der proteolytischen Prozessierung von membranständigen Neuregulin-1 Typ I-Isoformen konnte unter den verwendeten Testbedingungen nicht gezeigt werden.

Die Charakterisierung des Promotors von Neuregulin-1 Typ I-Isoformen hat ergeben, dass dieser Promotor in einer CpG-Insel liegt, multiple Transkriptionsstartpunkte aufweist und in Vertebraten konserviert ist. In der Maus konnte eine Cytidin-reiche Bindestelle identifiziert werden, deren Mutation zu einer verminderten Promotoraktivität führte und für die zwei potentielle Transkriptionsfaktoren hnRNP-K und PSF durch eine DNA-Affinitätsaufreinigung isoliert wurden. Des Weiteren wurden für die beiden Transkriptionsfaktoren Sp1 und NF $\kappa$ B gezeigt, dass sie die Expression von Typ I-Isoformen steigern können.

Im Folgenden wird die Bedeutung dieser Ergebnisse unter anderem für die bei Krankheiten auftretende Fehlregulation des Neuregulin-1-Signalwegs diskutiert. Im Ausblick werden einige weiterführende Experimente dargestellt, mit deren Hilfe die transkriptionelle Regulation von Neuregulin und ihre Beteiligung an Krankheiten genauer untersucht werden können.

### 4.1 Beteiligung von ADAM10 am Neuregulin-Shedding

Die parakrine Signalübertragung durch membranständige Neuregulin-1-Isoformen wird durch proteolytische Freisetzung des signalübertragenden extrazellulären Bereichs des Proteins ermöglicht und bietet eine Möglichkeit der posttranslationalen Regulation der Neuregulin-1-Signalwegs. Für zwei Proteasen der ADAM-Familie, ADAM17 und ADAM19, war zu Beginn der vorliegenden Arbeit eine Beteiligung an dem Neuregulin-Shedding nachgewiesen worden (Montero et al., 2000; Shirakabe et al., 2001), die Mitwirkung von weiteren Proteasen wurde vermutet (siehe Kapitel 2.2.6).

Eine Beteiligung der Protease ADAM10 an der Neuregulin-Prozessierung sollte durch Überexpression von ADAM10 und der Neuregulin-1-Isoform I $\beta$ 1a

nachgewiesen werden. Zellen, die mit ADAM10 und Nrg-1 Typ I $\beta$ 1a cotransfiziert wurden, zeigten eine verstärkte Freisetzung des signalübertragenden extrazellulären Nrg-Proteinfragments (siehe Kapitel 3.1.1). Diese verstärkte Freisetzung beruhte jedoch nicht auf einer direkten Interaktion zwischen ADAM10 und der Nrg-1-Isoform, da diese beiden Proteine in den verwendeten COS-7 Zellen nicht colokalisiert zu finden waren (siehe Kapitel 3.1.3). Es war jedoch eine Akkumulation der überexprimierten Nrg-Isoform festzustellen. Diese Veränderung der Neuregulin-Menge kann nicht auf eine Aktivierung der endogenen Neuregulin-Expression beruhen, da im Überstand der Zellen nur die transient transfizierte Neuregulin-Isoform über das eingebrachte HA-Epitop nachgewiesen wurde (siehe Kapitel 3.1.2). Da die Menge der transfizierten DNA und die im Western-Blot aufgetragene Proteinmenge kontrolliert wurden, sind keine Fehler in der experimentellen Durchführung als Ursache für die veränderte Neuregulin-Menge zu erkennen. Somit scheint die Überexpression von ADAM10 in den COS-7 Zellen zu einer Störung im Protein-Umsatz (*turnover*) zu führen, so dass es indirekt zu einer Akkumulation der eingebrachten Nrg-Isoform kommt. Durch diese Experimente ergeben sich daher keine Hinweise auf eine direkte proteolytische Neuregulin-Prozessierung durch ADAM10. Zu diesem Befund kommen auch die umfangreichen Studien von Horiuchi et al. (2005) zur Neuregulin-Prozessierung. In diesen Studien wurden embryonale Fibroblasten aus ADAM17-Knockout-Mäusen eingesetzt, die eine sehr geringe Shedding-Aktivität für die getesteten Neuregulin-1-Isoformen I $\beta$ 1 und I $\beta$ 2 aufweisen. In diesem Zellsystem wurden die Proteasen ADAM8, 9, 10, 12, 15, 17 und 19 mit den Nrg-Isoformen cotransfiziert. Es zeigte sich, dass nur durch die Überexpression von ADAM17 eine verstärkte Prozessierung beider Isoformen zu erzielen war (Horiuchi et al., 2005). Dieses Ergebnis widerspricht der von Shirakabe et al. (2001) beschriebenen Beteiligung von ADAM19 an der Neuregulin-Prozessierung.

Vor kurzem konnte eine weitere Protease BACE1 (*beta-site amyloid precursor protein-cleaving enzyme 1*), die an der Prozessierung bestimmter Nrg-Isoformen beteiligt ist, identifiziert werden (Willem et al., 2006).

Da die Phänotypen der Knockouts von ADAM17 und BACE1 nicht den gleichen Herzdefekt zeigen wie Neuregulin-1-Knockouts, sind somit immer noch nicht alle Proteasen identifiziert, die Nrg-1-Isoformen spalten und den Nrg-Signalweg regulieren (Horiuchi et al., 2005; Willem et al., 2006).

## 4.2 Analyse der transkriptionellen Nrg-1-Genregulation

Zu Beginn dieser Arbeit wurden in unserer Arbeitsgruppe im Rahmen der Diplomarbeit von Torben Söker bereits Anstrengungen unternommen, die transkriptionelle Regulation von Nrg-1 Typ III-Isoformen zu untersuchen. Dies sollte durch die in der vorliegenden Arbeit durchgeführten Analysen der Nrg-1 Typ I-Promotorregion erweitert werden.

Von der Promotorregion der Typ III-Isoformen wurden vier unterschiedlich lange Deletionskonstrukte erstellt. Die Promotoraktivität dieser Promotor-Reporter-Konstrukte wurde in den beiden Zelllinien Neuro-2A und NSC-19 mit dem Dual-Light System (Applied Biosystems) ermittelt. Es zeigte sich, dass die Promotoraktivitäten dieser Konstrukte in Neuro-2A-Zellen nur etwa 1,8fach und in NSC-19-Zellen nur etwa 2,7fach über der Aktivität des Leervektors lagen, wobei die Aktivitäten der verschiedenen Promotorlängen sich kaum unterschieden (Torben Söker, Diplomarbeit, Universität Bielefeld, 2004).

Eine detailliertere Charakterisierung der Nrg-1 Typ III-Promotorregion war aufgrund der geringen Aktivitätsunterschiede der Promotor-Reporter-Konstrukte untereinander bzw. gegenüber des Leervektors nicht zu erzielen. Zielgerichtete Mutationen von potentiellen Transkriptionsfaktor-Bindestellen, wie sie in der vorliegenden Arbeit in der Typ I-Promotorregion durchgeführt wurden, hätten daher keine detektierbaren Aktivitätsunterschiede verursachen können. Infolgedessen wurden keine weiteren Anstrengungen unternommen, die Promotorregion von Typ III-Isoformen zu untersuchen.

### 4.2.1 Bestimmung der Neuregulin-1 Typ I-Promotorregion

Um die Promotorregion von Nrg-1 Typ I-Isoformen zu bestimmen, wurden Promotor-Reporter-Konstrukte erstellt. Diese enthielten die Region *upstream* des ersten Exons von Typ I-Isoformen (Exon2) mit steigenden Längen zwischen etwa 0,5kb und 2kb, deren Promotoraktivität sich durch das Reporter-gen lacZ bestimmen ließ. Für die Bestimmung der Promotoraktivitäten wurden die zwei neuronalen Zelllinien Neuro-2A (Olmsted et al., 1970) und NSC-19 (Cashman et al., 1992) gewählt, die in dieser Arbeit positiv auf die Expression von Nrg-1 Typ I-Isoformen getestet wurden (siehe Kapitel 3.2.1). Durch die Wahl von Zelllinien, die Typ I-Isoformen endogen

exprimieren, sollte sichergestellt werden, dass die für die Neuregulin-Expression benötigten Transkriptionsfaktoren vorhanden waren.

Ab einer Länge von 680bp genomischer Sequenz in dem Promotor-Reporter-Konstrukt Pa konnte eine deutliche Promotoraktivität festgestellt werden, die etwa 19fach über der Aktivität des Leervektors lag. Bei dem mit 761bp längeren Promotorbereich im Deletionsfragment Pb stieg die Promotoraktivität noch einmal deutlich auf etwa das 31fache an. Die längeren Deletionskonstrukte Pc bis P4 zeigten nur noch geringe Aktivitätsunterschiede zu Pb. Das Fragment P1 mit 557bp genomischer Sequenz, in dem die in dieser Arbeit ermittelten Transkriptionsstartpunkte (siehe Kapitel 3.2.1) enthalten sind und daher auch der Kernpromotor liegt, zeigte keine Promotoraktivität, so dass angenommen werden kann, dass in diesem Fragment nicht alle Transkriptionsfaktor-Bindestellen für eine Nrg-1 Typ I-Expression in Neuro-2A und NSC-19-Zellen vorhanden sind (siehe Kapitel 3.2.2).

Die Suche nach TF-Bindestellen beschränkte sich folglich auf die 5'-Bereiche der Fragmente Pa und Pb, die für den Anstieg der Promotoraktivität verantwortlich waren. Die durch das Programm MatInspector (Genomatix) vorhergesagten potentiellen TF-Bindestellen wurden durch zielgerichtete Mutagenese verändert (siehe Kapitel 3.2.3). Dabei wurden die TF-Bindestellen durch Nukleotidsubstitutionen mutiert, da Deletionen von TF-Bindestellen dazu führen, dass sich die Lage aller *upstream* gelegenen Bindestellen relativ zum Transkriptionsstartpunkt und dem Kernpromotor verändert. Mit dem Programm MatInspector wurde kontrolliert, ob die potentiellen Bindestellen durch die eingebrachten Mutationen ausgeschaltet wurden. Es kann bei solchen Nukleotidsubstitutionen jedoch nicht ausgeschlossen werden, dass dadurch neue TF-Bindestellen entstehen.

Die Mutagenese der potentiellen TF-Bindestellen hat nur für die Cytidin-reiche Bindestelle eine signifikante Veränderung der Promotoraktivität im Promotor-Reportergergen-Versuch bewirkt (siehe Kapitel 3.2.3). Durch EMSAs konnte gezeigt werden, dass es an der Cytidin-reichen Bindestelle zu einer sequenzspezifischen Protein-DNA-Bindung kam. Durch die Mutation dieser Bindestelle wurde die Ausbildung des Protein-DNA-Komplexes abgeschwächt (siehe Kapitel 3.2.4). Somit handelt es sich bei der Cytidin-reichen Bindestelle um ein positiv wirkendes

regulatorisches Element, dessen Mutation zu einer schwächeren Protein-DNA-Bindung führt, aus der eine geringere Promotoraktivität resultiert.

Die Ergebnisse der EMSAs zeigen außerdem, dass unter Verwendung eines 36bp DNA-Fragments mit der Cytidin-reichen Bindestelle nur ein Protein-DNA-Komplex ausgebildet wurde. Bei Verwendung der mit 109bp und mit 245bp längeren PCR-Fragmente entstanden jedoch jeweils drei Protein-DNA-Komplexe, die alle von der Cytidin-reichen Bindestelle abhingen, wie durch die eingebrachten Mutationen und spezifischen Kompetitoren gezeigt wurde. Die Ausbildung des spezifischen Protein-DNA-Komplexes an der Cytidin-reichen Bindestelle könnte notwendig sein, um weitere Protein-DNA-Komplexe an benachbarten TF-Bindestellen zu stabilisieren. Solch kombinatorische Regulationsmechanismen wurden mehrfach beschrieben (Sogaard-Andersen et al., 1993; zusammengefasst von Remenyi et al., 2004).

Die Mutationen der anderen TF-Bindestellen haben weder in den Promotor-Reporter-Gen-Versuchen veränderte Aktivitäten noch bei den EMSAs veränderte Protein-DNA-Bindungen hervorgerufen. Es kann daher davon ausgegangen werden, dass diese Bindestellen zumindest in der neuronalen Zelllinie Neuro-2A keine Rolle bei der Expression von Nrg-1 Typ I-Isoformen spielen.

#### **4.2.1.1 Die Cytidin-reiche Bindestelle**

Es sind viele Transkriptionsfaktoren bekannt, die an GC-reiche Sequenzen oder auch an Sequenzen binden, die nur Cytidin oder Guanosin enthalten (Hapgood et al., 2001). Die TFs ZBP-89, Sp1, Egr-1 und MAZ, die von dem Programm MatInspector für die Cytidin-reiche Bindestelle vorhergesagt wurden, gehören zu dieser TF-Gruppe. Die Überexpression dieser TFs bei den Promotor-Reporter-Versuchen (siehe Kapitel 3.2.5.2) hat jedoch gezeigt, dass nur die Überexpressionen von ZBP-89 und Sp1 Veränderungen der Promotoraktivität zur Folge hatte. Dieser Einfluss auf die Aktivität war jedoch auch dann zu erkennen, wenn die Cytidin-reiche Bindestelle mutiert vorlag. Ein Zusammenhang mit dieser Bindestelle kann daher ausgeschlossen werden. Die Bedeutung von Sp1 und ZBP-89 für die Neuregulin-Expression wird im Kapitel 4.2.2 erörtert.

Da durch EMSAs gezeigt werden konnte, dass es an der Cytidin-reichen Bindestelle zu einer sequenzspezifischen Protein-DNA-Bindung kam, wobei ein stabiler Protein-DNA-Komplex entstand, wurden DNA-Affinitätsaufreinigungen durchgeführt, um das

Protein oder auch die Proteine, die an dieser Bindestelle binden, zu isolieren und anschließend zu identifizieren.

In mehreren Ansätzen der DNA-Affinitätsaufreinigung unter leicht variierenden Versuchsbedingungen wurde das Protein hnRNP-K (*heterogenous nuclear ribonucleoprotein K*) isoliert (siehe Kapitel 3.2.5.1). Dieses Protein wurde als Untereinheit K des *heterogenous nuclear ribonucleoprotein complex* von Matunis et al. (1992) erstmals beschrieben. Dieser Proteinkomplex ist an der Reifung des Primärtranskripts zur mRNA beteiligt. Weiterhin werden hnRNP-K Funktionen beim Spleißen, beim mRNA-Transport und der Regulation der Translation zugeordnet (Bomsztyk et al., 2004). hnRNP-K bindet mit hoher Affinität an poly(C)-Sequenzen (Matunis et al., 1992). Es tut dies sowohl in RNA-Molekülen als auch in einzel- oder doppelsträngiger DNA (Bomsztyk et al., 1997). Aktivitäten als Transkriptionsfaktor wurden für hnRNP-K ebenfalls beschrieben, wobei sowohl aktivierende Einflüsse (Michelotti et al., 1996; Ritchie et al., 2003) als auch hemmende Einflüsse (Du et al., 1998; Hsieh et al., 1998) berichtet worden sind.

Die Überexpression von hnRNP-K in Promotor-Reporter-Versuchen hatte jedoch keinen Einfluss auf die Promotoraktivität (siehe Kapitel 3.2.5.2). Dieses Ergebnis widerspricht einer Beteiligung von hnRNP-K an der Regulation der Nrg-1 Typ I-Expression. Es wäre jedoch denkbar, dass hnRNP-K in einem kombinatorischen Mechanismus mit einem weiteren TF oder mehreren weiteren TFs die Expression beeinflusst und die Überexpression von hnRNP-K alleine noch keinen Effekt zeigt. So konnte beispielsweise gezeigt werden, dass durch die Bindung von hnRNP-K die Konformation der DNA verändert wird und so die Bindung weiterer Faktoren ermöglicht wird (Michelotti et al., 1996; Garcia-Bassets et al., 1999).

Durch die DNA-Affinitätsaufreinigung mit anschließender LC-ESI-Analyse der isolierten Proteine konnte PSF (*polypyrimidine tract-binding protein-associated splicing factor*) als potentieller TF für die Cytidin-reiche Bindestelle identifiziert werden. PSF wird wie auch hnRNP-K als multifunktionelles Protein beschrieben, das Funktionen beim RNA-Spleißen und als Transkriptionsfaktor ausüben kann (Shav-Tal und Zipori, 2002). Bislang wurden nur negativ-regulatorische Aktivitäten für PSF beschrieben (Urban et al., 2000). Eine Überexpression dieses kürzlich identifizierten Kandidaten war aus zeitlichen Gründen nicht mehr möglich.

Die beiden vorgestellten Kandidaten hnRNP-K und PSF für die Cytidin-reiche Bindestelle wurden sowohl mit der Wildtyp-Sequenz als auch mit dem mutierten

DNA-Fragment isoliert (siehe Kapitel 3.2.5.4). Wie man aber durch EMSAs erkennen konnte, führt die Mutation der Cytidin-reichen Bindestelle nur zu einer Abschwächung der Bindung, jedoch nicht zum vollständigen Ausbleiben des Protein-DNA-Komplexes (siehe Kapitel 3.2.4). Die DNA-Fragmente wurden bei der DNA-Affinitätsaufreinigung im Überschuss von bis zu 300pmol bei doppelsträngigen Oligonukleotiden und etwa 100pmol bei PCR-Fragmenten zugegeben, um eine ausreichende Ausbeute isolierter Proteine zu erzielen. Bei EMSAs wurden hingegen nur 50fmol der markierten DNA eingesetzt. Durch den Überschuss bei der DNA-Affinitätsaufreinigung wurden daher wahrscheinlich auch schwächere Bindungspartner isoliert, so dass kein deutlicher Unterschied zwischen den Proben der mutierten und der nicht-mutierten Bindestelle zu erkennen war. Aus diesem Grund wurden auch viele unspezifische DNA-Bindeproteine wie Histone isoliert (siehe Kapitel 3.2.5.4). hnRNP-K und PSF könnten daher auch falsch positive Interaktionspartner der Cytidin-reichen Bindestelle sein, die aufgrund einer größeren Abundanz gegenüber anderen TFs isoliert worden sind.

Die Betrachtung von homologen Promotorbereichen in anderen Vertebraten hat ergeben, dass sich die Cytidin-reiche Bindestelle nicht wie der Kernpromotor, die untersuchte NF $\kappa$ B-Bindestelle und die ermittelten Transkriptionsstartpunkte in einer konservierten Region befindet (siehe Kapitel 3.2.7). Hinzu kommt, dass man in der Promotorregion von Mensch, Ratte und Hund keinen Bereich mit 11 aufeinander folgenden Cytidinen findet. Die Promotorregion dieser Organismen ist aber ebenfalls GC-reich, so dass Bindestellen für die von MatInspector vorhergesagten TFs der Cytidin-reichen Bindestelle mit leicht veränderten Sequenzmotiven auch in den anderen Organismen vorhergesagt wurden.

Die Promotorregionen von homologen Genen, die ein vergleichbares räumliches und zeitliches Expressionsmuster aufweisen, können dennoch spezies-spezifische Strukturen und Bindestellen zeigen (Cuadrado et al., 2001). Demnach könnte es sich bei der Cytidin-reichen Bindestelle auch um eine spezies-spezifische Bindestelle in der Maus handeln. Die Mutation dieser Bindestelle hatte eine signifikante Verminderung der Promotoraktivität zur Folge. Außerdem konnten sequenzspezifische Protein-DNA-Bindungen gezeigt werden. Die TFs, die diese spezifischen Protein-DNA-Komplexe an der Cytidin-reichen Bindestelle ausbilden, konnten jedoch nicht eindeutig identifiziert werden. Für die ermittelten Kandidaten hnRNP-K und PSF sind weitere Analysen notwendig, um eine Beteiligung an der



Neuregulin-Expression nachzuweisen. Durch Chromatin-Immunopräzipitationen (ChIP) könnte beispielsweise überprüft werden, ob diese Proteine *in vivo* in der Promotorregion im natürlichen Chromatiumfeld binden.

#### 4.2.2 Der konservierte Kernpromotor von Nrg-1 Typ I-Isoformen

Die *in silico* Analyse der Nrg-1 Typ I-Promotorregion hat gezeigt, dass der Kernpromotor konserviert in verschiedenen Säugetierarten vorliegt. Der Bereich, der die höchste Homologie aufweist, umfasst 189bp und befindet sich zwischen den Positionen -378 und -566 relativ zum Translationsstartpunkt. Somit enthält er die bei der Maus ermittelten Transkriptionsstartpunkte bei -395, -405 und -425 (siehe Kapitel 3.2.1) und die untersuchte NF $\kappa$ B-Bindestelle zwischen -410 und -393 (siehe Kapitel 3.2.6). In diesem konservierten Kernpromotor findet man weder eine TATA-Box, noch ein Initiator-Element (Inr) oder ein *Downstream Promoter Element* (DPE).

Der Typ I-Promotor befindet sich bei der Maus in einer CpG-Insel, die auch in anderen Säugetierarten wie Mensch, Ratte, Hund und Rind zu finden war (siehe Kapitel 3.2.7). Durch das Fehlen der oben genannten Kernpromotor-Elemente und das Auftreten von multiplen Transkriptionsstartpunkten zeigt dieser Promotor typische Eigenschaften eines CpG-Insel-assoziierten Promotors (Butler und Kadonaga, 2002). Darüber hinaus wurden in der konservierten Promotorregion mindestens vier potentielle Sp1-Bindestellen bei Maus, Ratte, Mensch und Hund durch das Programm MatInspector vorhergesagt (siehe Kapitel 3.2.7). Das Vorhandensein von mehreren Sp1-Bindestellen wird als weiteres Merkmal von CpG-Insel-assoziierten Promotoren angesehen (Smale und Kadonaga, 2003).

Der Transkriptionsfaktor Sp1 wurde als einer der ersten eukaryontischen TFs untersucht (Dyran und Tjian 1983; Kadonaga et al., 1987). Sp1 wird ubiquitär exprimiert, wobei die Stärke der Expression während der Entwicklung und in verschiedenen Zelltypen variiert (Saffer et al., 1991). Sp1 bindet an die so genannte GC-Box (GGGGCGGGG) und GT-Box (GGTGTGGGG) und verstärkt so die Expression von vielen ubiquitär aber auch gewebespezifisch exprimierten Genen (Philipsen und Suske, 1999). Durch posttranslationale Modifikationen wie Phosphorylierungen oder Glykosylierungen wird die Sp1-Aktivität reguliert und somit die Regulation von gewebespezifischen Genen ermöglicht (Bouwman und Philipsen, 2002). Die Lage von Sp1-Bindestellen in CpG-Insel-assoziierten Promotoren scheint

die Positionen der Transkriptionsstartpunkte zu bestimmen (Blake et al., 1990; Butler und Kadonaga, 2002).

Die Überexpression von Sp1 bei den Promotor-Reporter-Versuchen hatte eine etwa 2,3fach verstärkte Promotoraktivität ergeben, die nicht durch eine Bindung an der Cytidin-reichen Bindestelle vermittelt wurde (siehe Kapitel 3.2.5.2). Die relativ schwache Aktivierung der Promotoraktivität in den Neuro-2A-Zellen liegt vermutlich an der Tatsache, dass Sp1 ubiquitär exprimiert wird und zu den abundant vorkommenden Kernproteinen zählt (Marin et al., 1997), so dass eine Überexpression in Säugetierzellen nur geringe Aktivierungen verursacht. Um das Aktivierungspotential von Sp1 untersuchen zu können, wird daher häufig die *Drosophila*-Zelllinie SL2 verwendet, die keine Sp1-Aktivität zeigt (Bouwman und Philipsen, 2002).

Da die Überexpression von Sp1 eine verstärkte Promotoraktivität in der Maus-Zelllinie Neuro-2A gezeigt hat und in der Promotorregion von Nrg-1 Typ I-Isoformen in den Säugern Maus, Ratte, Mensch und Hund vier Sp1-Bindestellen eine extrem hohe Konservierung zeigen und die gleichen Abstände und Orientierungen untereinander aufweisen, ergeben sich gute Hinweise, dass Sp1 an der Regulation der Expression von Nrg-1 Typ I-Isoformen beteiligt ist.

In diesem Zusammenhang könnte auch die um etwa 30% verminderte Promotoraktivität durch Überexpression von ZBP-89 stehen (siehe Kapitel 3.2.5.2). ZBP-89 bindet ebenfalls an GC/GT-Box-Elemente und wird auch ubiquitär exprimiert (Merchant et al., 1996). Für ZBP-89 sind sowohl aktivierende Einflüsse beschrieben worden (Reizis und Leder, 1999; Ye et al., 1999; Bai und Merchant, 2003), als auch hemmende Aktivitäten (Merchant et al., 1996; Law et al., 1998; Keates et al., 2001; Zhang et al., 2003). In den genannten Studien, in denen ZBP-89 als Repressor fungiert, wirkt ZBP-89 jeweils einer aktivierenden Sp1-Funktion entgegen, wobei entweder die gleiche Bindestelle genutzt wird oder überlappende bzw. angrenzende Bindestellen vorliegen.

Solche entgegengesetzten Aktivitäten von Sp1 und ZBP-89 könnten also auch für den Promotor von Nrg-1 Typ I-Isoformen eine Rolle spielen, wobei vermutlich die GT-Box-Elemente in der konservierten Kernpromotorregion von Bedeutung sind.

### 4.2.3 Aktivierung des Neuregulin-1 Typ I-Promotors durch NF $\kappa$ B

Eine Beteiligung des Transkriptionsfaktors NF $\kappa$ B an der Expression von Nrg-1 Typ I-Isoformen wurde im Rahmen dieser Arbeit untersucht, da sich potentielle NF $\kappa$ B-Bindestellen unmittelbar *upstream* und *downstream* von der Cytidin-reichen Bindestelle befinden. Diese Bindestellen wurden durch die Vorhersage des Programms Match<sup>TM</sup> ([www.gene-regulation.com](http://www.gene-regulation.com)) identifiziert. Die Nutzung von alternativen Vorhersageprogrammen zu dem bereits verwendeten MatInspector ([www.genomatix.de](http://www.genomatix.de)) schien sinnvoll, da die bis dahin untersuchten TFs weder in der Überexpression noch durch die DNA-Affinitätsaufreinigung eine Interaktion mit der Cytidin-reichen Bindestelle gezeigt hatten. Zudem hatten die Ergebnisse der EMSAs unter Verwendung von 109bp oder 245bp großen PCR-Fragmenten gezeigt, dass drei Protein-DNA-Komplexe auftraten, die möglicherweise durch benachbarte Bindestellen entstehen können (siehe Diskussion Kapitel 4.2.1). Des Weiteren wurde in der Literatur über die bis dahin untersuchten TFs wiederholt eine synergetische Promotoraktivierung durch NF $\kappa$ B mit Egr-1 (Cogswell et al., 1997; Decker et al., 2003) oder durch NF $\kappa$ B mit Sp1 (Wang et al., 2001; Sakai et al., 2005) beschrieben. Daher wurde der Einfluss von NF $\kappa$ B auf den Nrg-1 Typ I-Promotor durch Überexpression der NF $\kappa$ B-Untereinheit p65 in Neuro-2A Zellen untersucht.

NF $\kappa$ B wurde 1986 entdeckt (Sen und Baltimore, 1986a+b). Heutzutage beschreibt der Ausdruck NF $\kappa$ B eine Familie von Transkriptionsfaktoren, die in Säugetieren die fünf Mitglieder c-Rel, NF $\kappa$ B1 (p50 aus p105), NF $\kappa$ B2 (p52 aus p100), RelA (p65) und RelB umfasst (Baldwin, 1996). Diese Mitglieder bilden Hetero- oder Homodimere aus, wobei NF $\kappa$ B ursprünglich das am häufigsten auftretende Heterodimer aus p50 und p65 beschrieb (Li und Stark, 2002). Die NF $\kappa$ B/Rel-Proteine haben alle eine etwa 300 Aminosäuren umfassende *Rel homology domain* (RHD), die die DNA-Bindung, die Dimerisierung und die Interaktion mit I $\kappa$ B vermittelt. Durch die Bindung des intrazellulären Inhibitors I $\kappa$ B wird eine Kernlokalisationssequenz in der RHD maskiert und dadurch werden die Dimere inaktiviert und im Cytoplasma lokalisiert (Ghosh et al., 1998). Über 150 verschiedene extrazelluläre Signale können über intrazelluläre Signalkaskaden eine Aktivierung von NF $\kappa$ B bewirken (Li und Stark, 2002). Dabei kommt es zu einer Phosphorylierung von I $\kappa$ B durch den I $\kappa$ B Kinase (IKK)-Komplex, wodurch NF $\kappa$ B freigesetzt wird, in den Zellkern importiert wird und eine Aktivierung

von Zielgenen innerhalb von Minuten ermöglicht (O'Neill und Kaltschmidt, 1997). NF $\kappa$ B wird ubiquitär exprimiert und der NF $\kappa$ B-Signalweg spielt eine wichtige Rolle bei der Regulation der Immunabwehr, bei Entzündungsprozessen, bei der Kontrolle des Zellzyklus, bei apoptotischen Prozessen, sowie bei der Entwicklung von Neuronen und Gliazellen (Chen et al., 2001, Kaltschmidt et al., 2005).

Homodimere von p65 zeigen ein starkes Aktivierungspotential (persönliche Mitteilung Dr. Siebenlist, NIH, Bethesda, MD, USA) und wurden daher für die Promotor-Reporterversuche eingesetzt. Die Überexpression von p65 führte zu einem starken Anstieg der Promotoraktivität. Dabei war jedoch keine synergetische Aktivierung durch die Cotransfektion von NF $\kappa$ B mit je einem der bis dahin untersuchten TFs ZBP-89, MAZ, Sp1, Egr-1 oder hnRNP-K festzustellen. Es zeigte sich außerdem, dass die Aktivierung des Typ I-Promotors nicht im Zusammenhang mit der Cytidinreichen Bindestelle stand, da eine Aktivierung auch bei dem mit 557bp kürzesten Deletionsfragments P1 auftrat, in dem die Cytidin-reiche Bindestelle nicht vorhanden ist (siehe Kapitel 3.2.6).

In der Promotorregion des 557bp großen Deletionsfragments P1 konnte von den zwei potentiellen NF $\kappa$ B-Bindestellen durch zielgerichtete Mutationen die Bindestelle 2 zwischen den Positionen -410 und -393 relativ zum Translationsstartpunkt eindeutig als funktionale NF $\kappa$ B-Bindestelle bestimmt werden. Die Mutation dieser Bindestelle führte zu einer ausbleibenden Promotoraktivierung bei p65-Überexpression.

Da diese NF $\kappa$ B-Bindestelle zwischen den ermittelten Transkriptionsstartpunkten liegt, hätte man erwarten können, dass die Mutation Probleme bei der Assemblierung der Transkriptionsmaschinerie am Kernpromotor verursacht und damit zu einem generellen Verlust der Promotoraktivität führt. Dies ist jedoch nicht eingetreten. Durch die Mutation wurde nur die NF $\kappa$ B-Bindestelle zerstört und damit die Wirkung von NF $\kappa$ B bei p65-Überexpression ausgeschaltet.

Die Promotoraktivitäten der vier unterschiedlich langen Konstrukte mit der NF $\kappa$ B-Mutation 2 zeigten alle auch ohne p65 Überexpression eine leicht reduzierte Aktivität gegenüber den nicht-mutierten Varianten (siehe Kapitel 3.2.6). Um zu überprüfen ob es sich hierbei um einen signifikanten Effekt handelt, wäre eine größere Anzahl von unabhängigen Wiederholungen notwendig. Da dieser Trend aber bei allen vier Konstrukten auftrat, ergibt sich der Hinweis, dass NF $\kappa$ B auch ohne Überexpression einen Beitrag an der Nrg-1 Typ I- Expression in Neuro-2A Zellen leistet. In neuronalem Gewebe sowie in einigen Krebszellarten findet man NF $\kappa$ B konstitutiv

aktiviert (O'Neill und Kaltschmidt, 1997; Sovak et al., 1997). Eine solche konstitutive Aktivierung von NF $\kappa$ B findet man auch in Neuro-2A Zellen (persönliche Mitteilung Prof. Kaltschmidt, Universität Witten-Herdecke). Diese trägt anscheinend zu der Nrg-1 Typ I- Promotoraktivität in den Zellen bei.

Die im Nrg-1 Typ I-Promotor gefundene Bindestelle 2 zwischen den Positionen -410 und -393 entspricht mit der 5'-3'-Sequenz AGGACTTCCC nicht exakt der klassischen NF $\kappa$ B-Konsensus-Sequenz GGGRNNYYCC (R = Purin, Y = Pyrimidin, N = unbestimmt; Baldwin, 1996). Leicht abweichende Sequenzmotive können aber ebenfalls als NF $\kappa$ B-Bindestellen fungieren, wobei bestimmte Hetero- oder Homodimere unterschiedliche Präferenzen aufweisen (Kunsch et al., 1992; Parry und Mackman, 1994).

Die in dieser Arbeit identifizierte funktionale NF $\kappa$ B-Bindestelle in der Nrg-1 Typ I-Promotorregion stellt den ersten Hinweis dar, dass Neuregulin-1 zu den Zielgenen des NF $\kappa$ B-Signalwegs gehört.

#### **4.2.3.1 Überschneidungen der Signalwege von NF $\kappa$ B und Neuregulin-1**

Im Hinblick auf die mögliche physiologische Bedeutung von Nrg-1 Typ I-Isoformen als NF $\kappa$ B-induzierbare Wachstumsfaktoren lassen sich mehrere Überschneidungen der Funktionen des Nrg-1- und des NF $\kappa$ B-Signalwegs feststellen.

Der Neuregulin-1-Signalweg spielt eine wichtige Rolle bei der Entwicklung des Herzens. So führen homozygote Deletionen von Nrg-1 (Meyer et al., 1995), von ErbB2 (Lee et al., 1995), von ErbB3 (Erickson et al., 1997) und von ErbB4 (Gassman et al., 1995) zu embryonal letalen Herzdefekten. Darüber hinaus hat die Kardiotoxizität des monoklonalen ErbB2-Antikörpers Trastuzumab (Herceptin), der in klinischen Tests bei der Behandlung von Brustkrebspatienten eingesetzt wurde, gezeigt, dass der Nrg-1-Signalweg auch eine Funktion im adulten Herzen ausübt (Schneider et al., 2002). Nrg-1 reguliert *in vitro* die Proliferation, das Größenwachstum und das Überleben von Kardiomyozyten (Garratt, 2006). Die Funktionen von NF $\kappa$ B im Herzen werden kontrovers diskutiert, da sowohl schädliche als auch positive Einflüsse einer NF $\kappa$ B-Aktivierung beschrieben wurden (Valen et al., 2001). So kann eine NF $\kappa$ B-Aktivierung ebenfalls das Überleben von Kardiomyozyten fördern (Valen, 2004; Petersen et al., 2006). Bei dieser Funktion könnte es zu einer Aktivierung der Nrg-1-Expression kommen.

Nrg-1 Typ I-Isoformen mit der  $\alpha$ -Variante der EGF-ähnlichen Domäne stimulieren die Proliferation und Differenzierung des Brustdrüsengewebes während der Schwangerschaft (Li et al., 2002). In schwangeren Mäusen wird die Typ I $\alpha$ -Isoform verstärkt in der Brustdrüse exprimiert und erreicht eine maximale Expression etwa am Tag 15 (Yang et al., 1995). In diesem Zeitraum der Schwangerschaft ist auch die Expression und DNA-Bindeaktivität von NF $\kappa$ B im Brustdrüsengewebe am stärksten (Brantley et al., 2000). Transgene Mäuse, die eine dominant negative Mutante des I $\kappa$ B in der Brustdrüse exprimieren und dadurch keine NF $\kappa$ B-Aktivierung zeigen, weisen eine fehlerhafte Brustdrüsenentwicklung mit reduzierter Proliferation des epithelialen Gewebes auf (Cao et al., 2001). Auch in diesem Zusammenhang könnte Nrg-1 als Zielgen von NF $\kappa$ B auftreten. Zudem liegt bei vielen Brustkrebsarten eine Fehlregulation sowohl des Nrg-1-Signalwegs (Stove und Bracke, 2004) als auch des NF $\kappa$ B-Signalwegs (Cao und Karin, 2003) vor.

Bei der Entwicklung des Zentralen Nervensystems sowie im adulten Gehirn findet man ebenfalls Überschneidungen von NF $\kappa$ B-Aktivität und Nrg-1-Expression. So findet man NF $\kappa$ B-Aktivität im cerebralen Cortex und im Hippocampus (O'Neill und Kaltschmidt, 1997), wo auch Nrg-1 zu finden ist (Law et al., 2004). Für beide Signalwege wurden unabhängig neuroprotektive Einflüsse *in vitro* beschrieben (zusammengefasst für Nrg-1: Esper et al., 2006 und für NF $\kappa$ B: Mattson et al., 2000). Auch Einflüsse auf die Regulation der synaptischen Plastizität werden für den NF $\kappa$ B-Signalweg (Kaltschmidt et al., 2005) und für den Nrg-1-Signalweg (Ozaki, 2002) diskutiert.

Im Zusammenhang mit den zahlreichen Überschneidungen in den Funktionen der beiden Signalwege sollte man zukünftig die mögliche Aktivierung der Nrg-1 Typ I-Expression durch NF $\kappa$ B genauer untersuchen.

#### **4.2.4 Autokrine Nrg-1-Signalwirkung bei Krebserkrankungen**

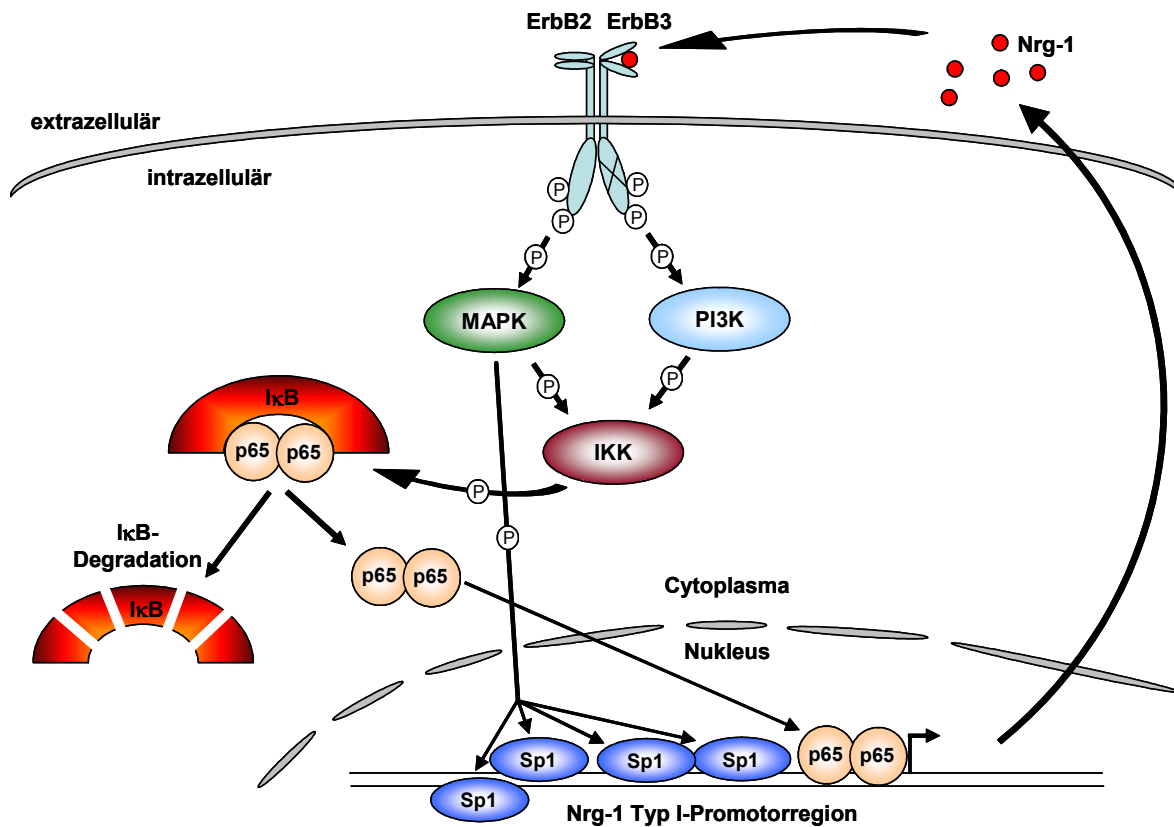
Bei vielen verschiedenen Krebserkrankungen wurde eine erhöhte Nrg-1-Expression festgestellt. Eine autokrine Nrg-1-Signalübertragung führt zu verstärktem Tumorwachstum und teilweise zur Entstehung von malignen Tumoren bei Brustkrebs (Tsai et al., 2003), bei Darmkrebs (Venkateswarlu et al., 2002), bei Lungenkrebs (Gollamudi et al., 2004), beim ovarialen Karzinom (Gilmour et al., 2002), bei

Schwannoma (Hansen und Linthicum, 2004) und bei Glioblastoma (Westphal et al., 1997). Diese autokrine Nrg-1-Signalübertragung wird über die ErbB-Rezeptoren und intrazelluläre Signalkaskaden vermittelt und beeinflusst die Aktivitäten von verschiedenen Transkriptionsfaktoren, wodurch die Expression von vielen Genen reguliert wird (Stove und Bracke, 2004).

Alroy et al. (1999) konnten zeigen, dass Nrg-1 die Phosphorylierung und Aktivierung von Sp1 in verschiedenen Zelllinien stimuliert und dass diese Aktivierung über *mitogen-activated protein kinases* (MAPK) erfolgt. Eine über den MAPK-Signalweg vermittelte Aktivierung von Sp1 durch Nrg-1 konnte auch in verschiedenen Brustkrebszelllinien gezeigt werden (Talukder et al., 2001).

Auch NF $\kappa$ B kann durch die Stimulation mit Nrg-1 aktiviert werden (Bhat-Nakshatri et al., 2002). Je nachdem welche ErbB-Rezeptoren exprimiert werden, kann die NF $\kappa$ B-Aktivierung bei ErbB2-Aktivität über den MAPK-Signalweg erfolgen (Pei-Wen Tsai et al., 2003) oder beim Zusammenspiel von ErbB1 und ErbB3 über den Phosphatidylinositol-3 (PI3) Kinase-Signalweg ausgelöst werden (Bhat-Nakshatri et al., 2002). Die genannten NF $\kappa$ B-Aktivierungen durch Nrg-1-Stimulation wurden ebenfalls in Brustkrebszelllinien untersucht. Zudem konnten Biswas et al. (2004) zeigen, dass die Nrg-1-induzierte NF $\kappa$ B-Aktivierung zur verstärkten Proliferation der Brustkrebszellen führt.

Die in der vorliegenden Arbeit vorgestellten Ergebnisse, dass Sp1 und das NF $\kappa$ B-Protein p65 die Expression von Nrg-1 Typ I-Isoformen aktivieren können, deuten darauf hin, dass dies in Krebszellen zu einer Autoregulation von Nrg-1 führen kann. Eine Nrg-1-Autoregulation wurde von Li et al. (2004) in humanen Brustepithelzellen beschrieben und sie haben gezeigt, dass eine konstitutive autokrine Nrg-1-Signalübertragung zum Tumorwachstum führt und auch die Metastasen-Bildung begünstigt. Eine Blockade der Nrg-1 Expression durch die Expression von reverskomplementärer cDNA kann bei aggressiven Brustkrebszellen das Tumorwachstum und die Metastasen-Bildung abschwächen (Tsai et al., 2003). Da NF $\kappa$ B und Sp1 vermutlich an der Autoregulation von Nrg-1 beteiligt sind und somit eine konstitutive autokrine Nrg-1-Signalübertragung ermöglichen (siehe Abbildung 4.1), könnte die Manipulation der NF $\kappa$ B- und/oder der Sp1-Aktivität ebenfalls einen therapeutischen Nutzen bei Krebserkrankungen haben, in denen eine Fehlregulation des Nrg-1-Signalwegs vorliegt.



**Abbildung 4.1: Schematisches Modell für die Autoregulation von Neuregulin.** Heterodimere der Zelloberflächen-Rezeptoren ErbB2 und 3 können durch Neuregulin-Bindung stimuliert werden und durch ihre Tyrosin-Kinase-Aktivität werden intrazelluläre Signalkaskaden ausgelöst. Durch ErbB2 wird der MAP-Kinase- und durch ErbB3 der PI3 Kinase-Signalweg aktiviert. Durch den MAPK-Signalweg kann Sp1 phosphoryliert werden und so die transkriptionelle Aktivität von Sp1 verstärkt werden. Darüber hinaus können der MAPK- und der PI3K-Signalweg den IKK-Komplex aktivieren, der IκB phosphoryliert. Durch diese Phosphorylierung kommt es zur Degradation von IκB und gebundene NFκB-Dimere werden freigesetzt, die dann in den Zellkern importiert werden und ihre transkriptionelle Aktivität ausüben können. Sp1 und NFκB können die Expression von Nrg-1 Typ I-Isoformen verstärken, was zu einer Autoregulation von Nrg-1 führen könnte.

### 4.3 Ausblick

Das Verständnis der Regulation des Neuregulin-1-Signalwegs ist von großer Bedeutung, da eine Fehlregulation schwerwiegende pathologische Folgen haben kann, wie man bei verschiedenartigen Krebserkrankungen erkennen kann. Der Befund, dass Sp1 und NFκB an der Regulation der Neuregulin-1 Typ I-Expression beteiligt sein können, ist daher von Interesse und bedarf einer weiterführenden Analyse.

Für den Transkriptionsfaktor Sp1 wurden in dieser Arbeit potentielle Bindestellen vorgestellt, die in einer bei Säugetieren hochkonservierten Promotorregion liegen. Um den Einfluss von Sp1 auf die Nrg-1 Typ I-Expression genauer untersuchen zu



können und um die funktionalen Sp1-Bindestellen in dem Promotor zu identifizieren, ist zunächst die Etablierung eines geeigneten Zellsystems erforderlich. Hierbei würde sich die *Drosophila*-Zelllinie SL2 anbieten, die keine endogene Sp1-Aktivität aufweist. Zudem könnten Chromatin-Immunopräzipitationen mit einem Sp1-spezifischen Antikörper bei Nrg-1-exprimierenden Zellen, wie Neuro-2A oder auch Brustkrebszelllinien, zeigen, ob Sp1 in der endogenen Typ I-Promotorregion im nativen Chromatiumfeld bindet.

Solche ChIP-Experimente könnten auch für NF $\kappa$ B durchgeführt werden. Da die funktionale Bindestelle bereits in dieser Arbeit bestimmt wurde, könnte durch EMSAs untersucht werden welche Hetero- oder Homodimere von NF $\kappa$ B an dieser Bindestelle binden können. Die Frage, ob NF $\kappa$ B auch an der Autoregulation von Nrg-1 und der resultierenden konstitutiven autokrinen Nrg-1-Signalwirkung bei Krebserkrankungen beteiligt ist, könnte man untersuchen, indem man humane Brustkrebszelllinien wie MCF-7 oder T47D mit rekombinant hergestelltem Nrg-1 Typ I stimuliert. Wenn sich in diesen Zellen hierdurch eine verstärkt endogene Nrg-1 Typ I-Expression feststellen lässt, könnte man durch die Überexpression einer dominant-negativen Variante von I $\kappa$ B (Superrepressor) zeigen, ob der NF $\kappa$ B-Signalweg diesen Effekt auslöst.

## 5 Material und Methoden

### 5.1 Material

#### 5.1.1 Bakterienstämme

- *Escherichia coli* **JM109** (chemisch kompetent, Promega): *endA1 recA1 gyrA96 thi-1 hsdR17*( $r_k^-$ ,  $m_k^+$ ) *relA1 supE44*  $\Delta$ (*lac-proAB*) [F' *traD36 proAB lacI<sup>q</sup>Z* $\Delta$ M15]
- *Escherichia coli* **DH5 $\alpha$**  (chemisch kompetent): F' *endA1 hsdR17*( $r_k^-$ ,  $m_k^-$ ) *supE44 thi-1*  $\lambda^-$  *recA1 gyrA96 relA1*  $\Delta$ (*argF-lacZYA*)U169  $\phi$ 80*lacZ* $\Delta$ M15
- *Escherichia coli* **XL1-Blue** (chemisch kompetent): *recA1 endA1 gyrA96 thi-1 hsdR17 supE44 relA1 lac* (F' *proAB lacZ* $\Delta$ M15 Tn10(Tet<sup>R</sup>))
- *Escherichia coli* **TOP10** (chemisch kompetent, Invitrogen): F' *mcrA*  $\Delta$ (*mrr-hsdRMS-mcrBC*)  $\phi$ 80*lacZ* $\Delta$ M15  $\Delta$ *lacX74 recA1 araD139*  $\Delta$ (*ara-leu*)7697 *galU galK rpsL* (Str<sup>R</sup>) *endA1 nupG*

#### 5.1.2 Zelllinien

- **CHO/dhFr<sup>-</sup>** (*chinese hamster ovary*; Puck et al., 1958)
- **COS-7** (*african green monkey kidney*, Gluzman et al., 1981)
- **Neuro-2A** (*mouse neuroblastoma*, Olmsted et al., 1970)
- **NSC-19** (*mouse neuroblastoma – spinal cord hybrids*, Cashman et al., 1992)

#### 5.1.3 Mausstämme

- *Mus musculus* **CD1**: Labor-Auszuchtstamm, Harlan/Winkelmann
- *Mus musculus* **C57BL/6J (B16)**: Labor-Inzuchtstamm, Jackson Laboratory, Bar Harbor, USA

## 5.1.4 Vektoren

Bezeichnung	Verwendung	Bezugsquelle
pCR4-TOPO	Klonierungen	Invitrogen, Karlsruhe
pBSlacZ	Promotor-Reporter-Konstrukte	C. Drepper, Bielefeld
pTarget	Expressionsvektor	Promega, Mannheim
pTarget-I $\beta$ 1a	Neuregulin-Expressionsvektor	Diplomarbeit (2003)
pcDNA3-I $\beta$ 1aHA	Neuregulin-Expressionsvektor	D. Falls, Atlanta, Ga (USA)
pSG5*-A10	ADAM10-Expressionsvektor	J. Bartsch, Bielefeld
pTarget-A17	ADAM17- Expressionsvektor	J. Bartsch, Bielefeld
pCR3.1-A19	ADAM19-Expressionsvektor	J. Bartsch, Bielefeld
pSG5-Egr1	Egr1- Expressionsvektor	C. Skerka, Jena
pcDNA3-ZBP-89	ZBP-89- Expressionsvektor	J.L. Merchant, Ann Arbor, Mi (USA)
pcDNA1-hnRNP-K	hnRNP-K- Expressionsvektor	D.L. Levens, Bethesda, Md (USA)
pCMV-MAZ	MAZ- Expressionsvektor (pcDNA3.1)	RIKEN BioResource Center (Japan)
pCMV-Sp1	Sp1-Expressionsvektor (pcDNA3.1)	RIKEN BioResource Center (Japan)
pMT2T-p65	NF $\kappa$ B-p65-Expressionsvektor	U. Siebenlist, Bethesda, Md (USA)
pMT2T-p50	NF $\kappa$ B-p50-Expressionsvektor	U. Siebenlist, Bethesda, Md (USA)
pPALU	Firefly-Luciferase-Expressionsvektor	J. Bartsch, Bielefeld
pGL4.10	Firefly-Luciferase-Reportervektor	Promega, Mannheim
pGL4.74	Renilla-Luciferase-Reportervektor	Promega, Mannheim
pGFP-N3	GFP-Expressionsvektor	Clontech, Saint-Germain-en-Laye (Frankreich)

## 5.1.5 Oligonukleotide

Name	Sequenz (5'-3')	Verwendung	5'- Modifikation
NrgP-rev	GTCGACCCGGGAGGGAAGAGCCAGT	Promotor-Klonierung	
NrgP-1for	GGGCCAGCTTCCAGCGACCCCTGTC	Promotor-Klonierung	
NrgP-2for	GGGCCAGCACGGGAAGGCAGACACA	Promotor-Klonierung	
NrgP-3for	GGGCCCTGATCGTTGGTGCGAGCTGT	Promotor-Klonierung	
NrgP-4for	GGGCCCGGCTTGCTGCCGCTCACT	Promotor-Klonierung	
NrgP-afor	GGGCCCTTCAAGGCTTGATCAGC	Promotor-Klonierung	
NrgP-bfor	GGGCCCCAACACACACACACACA	Promotor-Klonierung, EMSA	
NrgP-cfor	GGGCCCTGTTCCCTCCCCCTCACC	Promotor-Klonierung	

Name	Sequenz (5'-3')	Verwendung	5'- Modifikation
NrgP-dfor	GGGCCCCTGCACCTTCGCTCTTAGT	Promotor-Klonierung	
ZBPmutfor	CGAGCAGCCCCCTACCGCCTATATATCCTTTTC AAGGCTTGGATCAGCCC	Mutagenese, EMSA	
ZBPmutrev	GGGCTGATCCAAGCCTTGAAAAGGATATATAGGC GGTAGGGGGGCTGCTCG	Mutagenese, EMSA	
MOKmutfor	CCCCCTTTTCACCGCTTGGATCAGCCCCG	Mutagenese, EMSA	
MOKmutrev	CGGGGCTGATCCAAGCGGTGAAAAGGGGGG	Mutagenese, EMSA	
Etsmutfor	GCGAGCACCAGGGTCGCTTGGTTAAGCCTGGC CTCTCCAGACTGC	Mutagenese, EMSA	
Etsmutrev	GCAGTCTGGAGAGGCCAGGCCTTAACCAAGGCGA CCCTGGTGCTCGC	Mutagenese, EMSA	
Mafmutfor	GGCGGCTGCGACTTTAGGAGCGAAGCTTCCAGCG	Mutagenese, EMSA	
Mafmutrev	CGCTGGAAGCTTCGCTCCTAAAGTCGCAGCCGCC	Mutagenese, EMSA	
ZBPforCy3	CAGCCCCCTACCGCCCCCCCCCTTTCAAGG CT	EMSA	Cy3-Fluorophor
ZBPfor	CAGCCCCCTACCGCCCCCCCCCTTTCAAGG CT	EMSA	
ZBPrev	AGCCTTGAAAAGGGGGGGGGCGGTAGGGGGG TG	EMSA	
MOKforCy3	CCCCCTTTTCAAGGCTTGGATCAGCCCCG	EMSA	Cy3-Fluorophor
MOKfor	CCCCCTTTTCAAGGCTTGGATCAGCCCCG	EMSA	
MOKrev	CGGGGCTGATCCAAGCCTTGAAAAGGGGGG	EMSA	
EtsforCy3	CCAGGGTCGCTTCTCGCTTCTGGCTCTCC	EMSA	Cy3-Fluorophor
Etsfor	CCAGGGTCGCTTCTCGCTTCTGGCTCTCC	EMSA	
Etsrev	GGAGAGGCCAGGAAGGCAGGAAGGCGACCCTGG	EMSA	
MafforCy3	GGCGGCTGCGACTTTGTCAGCGAAGCTTCCAGCG	EMSA	Cy3-Fluorophor
Maffor	GGCGGCTGCGACTTTGTCAGCGAAGCTTCCAGCG	EMSA	
Mafrev	CGCTGGAAGCTTCGCTGACAAAGTCGCAGCCGCC	EMSA	
PbrevCy3	AGGCTGCGGGGCTGATCCAAG	PCR/EMSA	Cy3-Fluorophor
Pa+brevCy3	CAGCGGCTGCCGGGAACTC	PCR/EMSA	Cy3-Fluorophor
Pbrev	AGGCTGCGGGGCTGATCCAAG	PCR/EMSA	
Pa+brev	CAGCGGCTGCCGGGAACTC	PCR/EMSA	
pGL4lucfor	AGCGCCATTCTACCCACTC	PCR/EMSA	
pGL4lucrev	AACACGGGCATGAAGAACTG	PCR/EMSA	
pGL4Ampfor	TCGTCCATAGTGGCCTGACT	PCR/EMSA	
pGL4Amprev	GGAACTACTCACTGGCGAAC	PCR/EMSA	
Pa+brev- Biotin	CAGCGGCTGCCGGGAACTC	DNA-Affinitäts- Aufreinigung	Biotin
ZBPfor- Biotin	CGCGCAGCAGCCCCCTACCGCCCCCCCCCT TTTCAAGGCT	DNA-Affinitäts- Aufreinigung	Biotin

Name	Sequenz (5'-3')	Verwendung	5'-Modifikation
ZBPrevBio	AGCCTTGAAAAGGGGGGGGGGGCGGTAGGGGGGC TGCTCGCGCG	DNA-Affinitäts- Aufreinigung	
ZBPmutfor- Biotin	CGCGGAGCAGCCCCCTACCGCCTATATATCCT TTTCAAGGCT	DNA-Affinitäts- Aufreinigung	Biotin
ZBPmutrev Bio	AGCCTTGAAAAGGATATATAGGCGGTAGGGGGGC TGCTCGCGCG	DNA-Affinitäts- Aufreinigung	
p65mut_1for	GCTTCCAGCGACCCCTGTCGTTACATACGGCAG CCGCTGGGCTCCG	Mutagenese, EMSA	
p65mut_1rev	CGGAGCCCAGCGGCTGCCGTATGTGAACGACAGG GGTCGCTGGAAGC	Mutagenese, EMSA	
p65_1for	GCTTCCAGCGACCCCTGTCGGGAGTCCCGGCAG CCGCTGGGCTCCG	EMSA	
p65_1forCy3	GCTTCCAGCGACCCCTGTCGGGAGTCCCGGCAG CCGCTGGGCTCCG	EMSA	Cy3-Fluorophor
p65_1rev	CGGAGCCCAGCGGCTGCCGGAACTCCCGACAGG GGTCGCTGGAAGC	EMSA	
p65mut_2for	GGCAATTGAAAAGAGCCGGCTATTCAGGTGCCA AACTTGTGGGAAC TCCGGG	Mutagenese, EMSA	
p65mut_2rev	CCCGGAGTCCCACAAGTTTTGGCACCTGAATAG CCGCTCTTTTTCAATTGCC	Mutagenese, EMSA	
p65_2for	GGCAATTGAAAAGAGCCGGCTAGGACTTCCCCA AACTTGTGGGAAC TCCGGG	EMSA	
p65_2forCy3	GGCAATTGAAAAGAGCCGGCTAGGACTTCCCCA AACTTGTGGGAAC TCCGGG	EMSA	Cy3-Fluorophor
p65_2rev	CCCGGAGTCCCACAAGTTTTGGGGAAGTCTAG CCGCTCTTTTTCAATTGCC	EMSA	
lacZSeqrev	GCGAGATTATAGAGATCCCAAGC	Sequenzierung	
NrgTypelfor	GGAAGGGCAAGAAGAAGGAC	PCR	
NrgTypelrev	GAGCTGGTTTCACACCGAAG	PCR	
NrgRACErev	TGTCTCGGGGCTACTCTTGT	RACE	

### 5.1.6 Enzyme

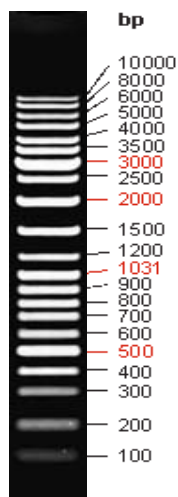
Enzym	Bezugsquelle
<i>Taq</i> DNA-Polymerase	QIAGEN, Hilden
Omniscript Reverse Transkriptase	QIAGEN, Hilden
Expand Long Template PCR System	Roche, Mannheim
Expand Reverse Transcriptase	Roche, Mannheim
<i>Pfu</i> Ultra High-Fidelity DNA-Polymerase	Stratagene, Amsterdam, Niederlande
Restriktionsendonukleasen	Fermentas, St. Leon-Rot New England Biolabs, Frankfurt a.M.

Enzym	Bezugsquelle
T4 DNA Ligase	Fermentas, St. Leon-Rot
Shrimp Alkaline Phosphatase	Fermentas, St. Leon-Rot
RNase A	Roth, Karlsruhe
Lysozym	Roth, Karlsruhe
Protector RNase Inhibitor	Roche, Mannheim
Trypsin Seq. Grade Modified	Promega, Mannheim
Trypsin-EDTA	PAA, Cölbe

### 5.1.7 DNA-Fragmentlängenstandards

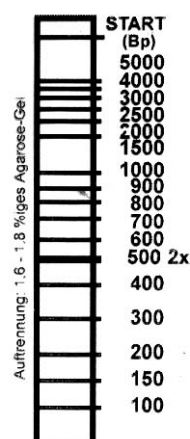
Die verwendeten Längenstandards unterscheiden sich in der Zusammensetzung ihrer einzelnen Fragmentgrößen. In Abhängigkeit von der zu erwartenden Größe der DNA-Probe wurde der geeignete Marker für die Agarosegelelektrophorese ausgewählt. Die Längenstandards wurden von den Firmen Fermentas (St. Leon-Rot) oder MBL (Bielefeld) bezogen.

GeneRuler DNA Ladder Mix



1.0% Agarose

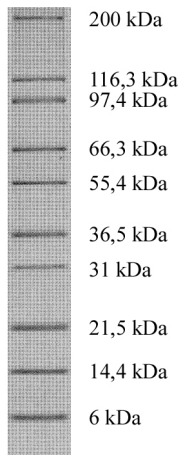
DNA-Marker 100bp-Leiter<sup>+</sup>



1,6-1,8% Agarose

### 5.1.8 Protein-Molekulargewichtsstandard

Bei SDS-Polyacrylamidgelelektrophoresen wurde in mindestens einer Spur der Größenmarker Mark12 (Invitrogen, Karlsruhe) aufgetragen.



### 5.1.9 Antibiotika

Das Antibiotikum Ampicillin wurde zur Selektion plasmidtragender Bakterien dem Kulturmedium zugegeben. Dabei lag die Arbeitskonzentration zwischen 50 und 150 µg/ml.

Das Konzentrat der Antibiotika Penicillin (10000Units/ml) und Streptomycin (10mg/ml) der Firma PAA (Cölbe) wurde dem jeweiligen Zellkulturmedium 1:100 verdünnt zugesetzt, um Kontaminationen mit Bakterien zu verhindern.

### 5.1.10 Kits

Name des Kits	Verwendung	Bezugsquelle
QIAprep Spin Miniprep Kit	Plasmid-DNA Aufreinigung aus Bakterien	QIAGEN, Hilden
QIAGEN Plasmid Midi Kit	Plasmid-DNA Aufreinigung aus Bakterien	QIAGEN, Hilden
Nucleospin-ExtractII	DNA-Aufreinigung aus Agarosegelen, PCR-Produkt-Aufreinigung	Macherey-Nagel, Düren

Name des Kits	Verwendung	Bezugsquelle
Dynabeads mRNA Purification Kit	mRNA-Präparation	Invitrogen, Karlsruhe
TOPO-TA Cloning Kit	Klonierung in den Vektor pCR4	Invitrogen, Karlsruhe
GeneRacer Kit	5'-RACE	Invitrogen, Karlsruhe
QuikChange II Site-directed Mutagenesis Kit	zielgerichtete Mutation von DNA-Plasmiden	Stratagene, Amsterdam, Niederlande
Dual-Light System	Untersuchung der Reporterogenaktivität	Applied Biosystems, Darmstadt
BCA Protein Assay Kit	Protein-Konzentrationsbestimmung	Pierce, Rockford, IL, USA
DNA-binding Protein Purification Kit	DNA-Affinitäts-Aufreinigung	Roche, Mannheim
Taq-PCR Mastermix	PCR	QIAGEN, Hilden

### 5.1.11 Antikörper

#### Primäre Antikörper

Antikörper	Charakterisierung	Hersteller	Verdünnung (Western Blot/ Immunfluoreszenz)
HA.11	monoklonaler Maus-Antikörper gegen HA-Epitop	Covance, Berkley, Ca, USA	1:2000 / 1:100
anti-ADAM10	polyklonaler Kaninchen-Antikörper gegen ADAM10	CellSciences Canton, Ma, USA	1:1000 / 1:50
HRG (C-20): SC-348	polyklonaler Kaninchen-Antikörper gegen Nrg-Cytoplasmatische-Domänen	Santa Cruz, Santa Cruz, Ca, USA	1:2000 / 1:200
anti-Bipro	monoklonaler Maus-Antikörper gegen Birkenprofilin (bzw. eingebrachter Bipro-Tag)	Wiedemann et al. 1996	1:25 / unverdünnt
anti-Actin 2G2	monoklonaler Maus-Antikörper gegen ubiquitär-exprimiertes Actin	Gonsior et al. 1999	1:2000 / -



Sekundäre Antikörper

Antikörper	Charakterisierung	Hersteller	Verdünnung (Western Blot/ Immunfluoreszenz)
anti-Kaninchen HRP	HRP-gekoppelter polyklonaler Ziegen-Antikörper	Sigma, Taufkirchen	1:4000 / -
anti-Maus HRP	HRP-gekoppelter polyklonaler Ziegen-Antikörper	Dianova, Hamburg	1:4000 / -
anti-Ziege Cy3	Cy3-gekoppelter polyklonaler Maus-Antikörper	Dianova, Hamburg	- / 1:300
anti-Kaninchen Cy3	Cy3-gekoppelter polyklonaler Ziegen-Antikörper	Dianova, Hamburg	- / 1:500
anti-Maus Cy2	Cy2-gekoppelter polyklonaler Ziegen-Antikörper	Dianova, Hamburg	- / 1:200

**5.1.12 *In silico*-Ressourcen**

Name	Internetadresse
BLAST	<a href="http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/">http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/</a>
PubMed	<a href="http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?db=PubMed">http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?db=PubMed</a>
Ensembl Genom Browser	<a href="http://www.ensembl.org/index.html">http://www.ensembl.org/index.html</a>
UCSC Genom Browser	<a href="http://genome.ucsc.edu/">http://genome.ucsc.edu/</a>
BCM Search Launcher	<a href="http://searchlauncher.bcm.tmc.edu/">http://searchlauncher.bcm.tmc.edu/</a>
CAP3	<a href="http://pbil.univ-lyon1.fr/cap3.php">http://pbil.univ-lyon1.fr/cap3.php</a>
Webcutter	<a href="http://rna.lundberg.gu.se/cutter2/">http://rna.lundberg.gu.se/cutter2/</a>
Primer3	<a href="http://frodo.wi.mit.edu/cgi-bin/primer3/primer3_www.cgi">http://frodo.wi.mit.edu/cgi-bin/primer3/primer3_www.cgi</a>
ClustalW	<a href="http://www.ebi.ac.uk/clustalw/">http://www.ebi.ac.uk/clustalw/</a>
MatInspector	<a href="http://www.genomatix.de/">http://www.genomatix.de/</a>
VISTA	<a href="http://genome.lbl.gov/vista/index.shtml">http://genome.lbl.gov/vista/index.shtml</a>
Gene Regulation	<a href="http://www.gene-regulation.com/">http://www.gene-regulation.com/</a>

## 5.2 Methoden

### 5.2.1 Handhabung rekombinanter Bakterien

#### 5.2.1.1 Anzucht

Für Flüssigkulturen von Bakterien wurde Luria-Bertani-Medium (LB-Medium) verwendet. Dieses Medium wurde nach der Herstellung autoklaviert, um eine Infektion mit anderen Mikroorganismen zu vermeiden. Nach dem Abkühlen auf ca. 60°C konnte der Flüssigkeit ein Antibiotikum zugesetzt werden.

Sollten LB-Platten hergestellt werden, wurde wie oben verfahren, jedoch dem Medium vor dem Autoklavieren 15g/l Agar-Agar zugegeben, das nach dem Abkühlen die Verfestigung des Mediums sicherstellt.

Für eine Blau-Weiß-Selektion konnte eine halbe Stunde vor dem Ausplattieren der Bakterien 40µl einer 40mg/ml X-Gal Lösung und 100µl einer 100mM IPTG-Lösung pro Platte ausgestrichen werden.

Für die Anzucht der Bakterien ist generell darauf zu achten, dass eine Reinkultur angelegt wird. Dies bedeutet, dass beim Animpfen des Mediums nur ein Klon verwendet wird.

LB-Medium (für einen Liter):

10g Trypton

5g Hefeextrakt

10g NaCl

auf pH7.0 einstellen (300µl 5N NaOH)

und auf 1l auffüllen Aqua dest.

#### 5.2.1.2 Glycerinkulturen

Um rekombinante Bakterien für längere Zeit zu lagern, ist eine Aufbewahrung in 20% Glycerin bei -70°C erforderlich. Dafür wurden 800µl einer frischen Bakterienkultur mit 200µl 100% Glycerin versetzt. Diese Suspension wurde mit Hilfe eines Vortex-Schüttlers durchmischt und in flüssigem Stickstoff schockgefroren. Anschließend konnte diese Glycerinkultur bei -70°C für längere Zeit aufbewahrt werden.

## 5.2.2 Arbeiten mit RNA

### 5.2.2.1 RNA-Isolierung (total-RNA Präparation)

Für die RNA-Isolierung wurden Großhirn und Rückenmark aus CD1-Mäusen präpariert.

Alle in diesem Protokoll genannten Mengenangaben beziehen sich auf eine Gewebemenge von 100mg, und somit müssen alle Volumenangaben an die vorhandenen Gewebemengen angepasst werden.

Das Gewebe wurde in einem 12ml Greinerröhrchen auf Eis gelagert. Pro 100mg Gewebe wurde 1ml Denaturierungslösung zugegeben und anschließend wurde das Gewebe mit einem Ultra-Turrax homogenisiert. Danach wurden 1ml Phenol, 0,2ml  $\text{CHCl}_3$ /Isoamylalkohol (49:1) und 0,1ml 2M Na-Acetat pH4.0 zugegeben und kurz geschüttelt. Bei 10000g wurde 20min in der Sorvall RC5b Kühlzentrifuge (4°C) zentrifugiert und die obere, wässrige Phase in ein neues Greinerröhrchen gegeben. Um die RNA zu fällen, wurde ein Volumen Isopropanol hinzugegeben und für 20min (bei -80°C) inkubiert. Die RNA wurde 15min bei 10000g abzentrifugiert und der Überstand verworfen. Das Pellet wurde in 0,3ml Denaturierungslösung aufgenommen, in ein Eppendorfgefäße überführt und durch Zugabe von einem Volumen Isopropanol gefällt. Bei 4°C wurde die RNA für 15min in der Eppendorffzentrifuge (13000rpm) pelletiert, der Überstand verworfen und das Pellet mit 0,5ml 70% Ethanol (-20°C) gewaschen, um  $\beta$ -Mercaptoethanol-Rückstände zu beseitigen. Nun wurde zum Auswaschen von Salzen noch einmal 0,5ml 70 % Ethanol zugegeben, 15min bei Raumtemperatur inkubiert und anschließend erneut abzentrifugiert. Nachdem der Überstand vollständig abgesaugt worden war, wurde das Sediment luftgetrocknet. Anschließend wurde die RNA in 100 $\mu$ l DEPC-H<sub>2</sub>O (0,1% DEPC in H<sub>2</sub>O, über Nacht (ü/N) inkubieren und zweimal autoklavieren) aufgenommen und für 10min bei 65°C im Thermoschüttler resuspendiert.

Denaturierungslösung:

4M Guanidinium-Thiocyanat

25mM Na-Citrat pH7.0

0,5% Na-Sarcosyl (v/v)

0,1M  $\beta$ -Mercaptoethanol

### 5.2.2.2 mRNA Präparation

Um die mRNA aus der total-RNA (5.2.2.1) aufzureinigen, wurde das Dynabeads mRNA Purification Kit (Invitrogen, Karlsruhe) verwendet. Dabei werden superparamagnetische Polystyrol-Kügelchen mit kovalent gebundenen 25-meren Poly-T-Ketten genutzt, um die Poly-A-Enden der mRNA zu binden und mit Hilfe eines Magneten die mRNA zu isolieren.

Es wurden 75µg total-RNA als Ausgangsmaterial verwendet und die Isolierung der mRNA erfolgte nach dem Kit-Protokoll. Die mRNA wurde im letzten Protokollschritt mit 20µl Elutionspuffer eluiert und anschließend erfolgte eine photometrische Konzentrationsbestimmung.

### 5.2.2.3 RNA-Konzentrationsbestimmung

Die photometrische Konzentrationsbestimmung beruht auf dem Absorptionsmaximum von Nukleinsäuren im UV-Bereich bei 260nm, wofür die aromatischen Ringe der Basen verantwortlich sind. Bei einer Schichtdicke von 1cm hat eine RNA-Lösung mit 40µg/ml einen Absorptionswert von 1. Die Messung der Absorption bei 280nm und das Errechnen des Quotienten  $A_{260}/A_{280}$  gibt Auskunft über die Reinheit der RNA. Reine RNA hat einen Quotienten von 2,0, der durch Proteinverunreinigungen kleiner wird.

Für die Konzentrationsbestimmung wurden 2µl RNA mit 98µl 10mmol Tris pH8.0 verdünnt und die Absorption im BioPhotometer (Eppendorf) bei 260nm gemessen. Unter Angabe der Verdünnung wurde von dem Gerät die Konzentration der RNA-Probe ausgegeben.

### 5.2.2.4 RNA-Minigele

Um die Gelkammern RNase frei zu bekommen, wurden diese für mindestens eine halbe Stunde mit 3% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> behandelt und mit DEPC-H<sub>2</sub>O gespült. Man kochte für ein 1%-Gel 0,3g Agarose in 3ml 10x MOPS Puffer und 27ml DEPC-H<sub>2</sub>O kurz auf und goss die Agarose in die behandelte Gelkammer. Nach ca. 30min überschichtete man das erstarrte Gel mit 1x MOPS Buffer. 1µg RNA wurde in 9µl RNA-Probenpuffer und 1µl Ethidiumbromid (1mg/ml) gegeben und für mindestens 15min bei 65°C inkubiert,

um Sekundärstrukturen aufzulösen. Nach 5min auf Eis wurde die Probe direkt aufgetragen. Nach dem Lauf (bei 10V/cm) konnte das Gel direkt analysiert werden.

10x MOPS Puffer:

- 0,2M 3-N-Morpholino-Propansulfonsäure pH7.0
- 50mM Natriumacetat
- 10mM EDTA pH7.0

Probenpuffer:

- 50% Formamid
- 10% 10x MOPS
- 0,45% Formaldehyd
- 7% Glycerin
- 0,5% (w/v) Bromphenolblau

### **5.2.2.5 RACE (*Rapid Amplification of cDNA Ends*)**

Wenn man an dem genauen Transkriptionsstart eines Gens interessiert ist, bietet sich die Methode der 5'-RACE an, wobei spezifisch das 5'-Ende einer bestimmten mRNA amplifiziert wird. Verwendet wurde das GeneRacer™ Kit (Invitrogen, Karlsruhe) nach den Angaben des Herstellers.

Dabei wurden 250ng aufgereinigter mRNA als Ausgangsmaterial verwendet. In einem ersten Schritt wurden die 5'-Enden unvollständiger mRNA dephosphoryliert, was diese von den weiteren Reaktionen ausschloss. Diese Reaktion hatte keinen Effekt auf vollständige mRNA, da diese durch die 5'-Cap Struktur geschützt waren. Der zweite Reaktionsschritt entfernte die 5'-Cap Struktur der intakten mRNA. Anschließend wurde der mitgelieferte RNA-Oligo an das verbleibende 5'-Phosphat der vollständigen mRNAs ligiert. Für die Reverse Transkription der mRNA wurden nun die Superscript III RT (Invitrogen) zusammen mit den mitgelieferten Random-Primern verwendet. Es folgte die Amplifizierung der 5'-Enden durch eine PCR unter der Verwendung des Taq-PCR Mastermix (Qiagen, Hilden), des GeneRacer™ 5'-Primers und einem genspezifischen *reverse*-Primers nach dem PCR-Programm aus dem RACE-Protokoll. Dabei wurden 0,4µl der RT-Reaktion als Template für die PCR eingesetzt. Wiederum 0,4µl der ersten PCR-Reaktion wurden als Template für eine

zweite sogenannte Nested-PCR verwendet. Das PCR-Produkt wurde über ein Agarosegel aufgetrennt und über die S.N.A.P.<sup>™</sup> Säulen aus dem Gel aufgereinigt. Das Eluat wurde in den pCR4-TOPO Vektor (Invitrogen) kloniert. Nach Identifizierung von *insert*-tragenden Klonen wurden diese angezogen und die DNA zur Sequenzierung vorbereitet.

#### **5.2.2.6 Reverse Transkription**

Die Reverse Transkriptase ist eine RNA-abhängige DNA-Polymerase, die die Synthese von komplementären DNA-Strängen an einzelsträngige RNA katalysiert. Die reverse Transkriptase stammt ursprünglich aus onkogenen Viren und wird *in vitro* für die Synthese von cDNA aus RNA verwendet. Die verwendete Expand Reverse Transkriptase (Roche, Mannheim) ist optimiert worden, um lange cDNAs erstellen zu können.

1µg RNA wurde für die Reverse Transkription mit 100pmol Oligo(dT)<sub>15</sub>-Primer (Roche) versetzt und mit DEPC-H<sub>2</sub>O auf 10,5µl aufgefüllt. Diese Lösung wurde im Mastercycler Gradient (Eppendorf, Wesseling-Berzdorf) für 10min auf 65°C erwärmt und anschließend auf 4°C abgekühlt. Dem Ansatz wurden die Komponenten 4µl 5x RT-Puffer, 2µl dNTP-Mix (10mM jedes dNTP), 2µl 100mM DTT, 1µl Expand Reverse Transkriptase (50U) und 0,5µl Protector RNase-Inhibitor 40U/µl (Roche) zugegeben und dann wurde dieser Ansatz eine Stunde bei 43°C inkubiert. Die cDNA wurde bei -20°C gelagert.

### **5.2.3 Arbeiten mit DNA**

#### **5.2.3.1 Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR)**

Die Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR) ist eine einfach zu handhabende Methode, um DNA selektiv zu amplifizieren. Hierbei muss man allerdings über Sequenzinformationen der flankierenden Bereiche des zu vervielfältigten Stückes verfügen. Für diese Bereiche werden Oligonukleotidprimer synthetisiert, so dass sie in gegenläufiger Richtung an den komplementären DNA-Strang binden können und so die Ziel-DNA einrahmen. Nach einer Hitze-Denaturierung werden die angelagerten Primer (Annealing) von einer hitzestabilen DNA-Polymerase verlängert (Elongation). Dieser Vorgang (Denaturierung, Annealing, Elongation) wird bis zu

35mal wiederholt. Das bei jedem Zyklus entstehende Fragment dient im nächsten als Matrize, so dass eine exponentielle Amplifikation stattfindet.

Essentiell für diese Reaktion ist eine hitzestabile Polymerase, da die Denaturierung der Template-DNA bei 92-94°C stattfindet. Verwendung findet in der Regel die *Taq*-Polymerase aus dem Organismus *Thermus aquaticus*, die ein Temperaturoptimum von 72°C besitzt.

### Standard-PCR

Bei der Auswahl eines Primers sind folgende Regeln einzuhalten (QIAGEN, *Critical Factors for Successful PCR*): Folgen von 3 oder mehr G oder C am 3' Ende sollten genau wie ein T am 3' Ende vermieden werden. Außerdem sollten komplementäre Sequenzen innerhalb des Primers oder zwischen den eingesetzten Primern nicht auftauchen. Die Länge des Primers sollte zwischen 18-30 Nukleotiden liegen, da kleinere Primer zu unspezifischen Nebenreaktionen führen könnten. Der GC-Gehalt sollte zwischen 40-60% liegen. Die Annealing-Temperatur  $T_m$  kann nach der 2 + 4-Regel abgeschätzt werden. Hierbei rechnet man für jede A+T Paarung 2°C und für G+C 4°C. Als Ausgangspunkt sollte man die Annealing-Temperatur 5°C unter dem abgeschätzten  $T_m$  Wert wählen. Die Primer-Konzentration sollte im Bereich von 0,1 bis 0,5µM liegen. Bei hoher Primer-Konzentration ist die Gefahr einer unspezifischen Reaktion größer. Die Anzahl der PCR-Zyklen sollte 35 nicht übersteigen, da sonst eventuell zunehmende unspezifische Reaktionen überbewertet würden. Die Aktivität der DNA-Polymerase nimmt mit jedem weiteren Zyklus ab. In der folgenden Tabelle ist ein PCR-Standardprogramm aufgeführt:

Reaktion		Temperatur °C	Zeitdauer min
initiale Denaturierung		94	4
35 Zyklen	Denaturierung	94	1
	Annealing	primerspezifisch	1
	Elongation	72	1
finale Elongation		72	5

Die Zeiten für die Denaturierung sind generell so gering wie möglich zu halten, um die Polymerase nicht unnötig zu beanspruchen. Die Elongationszeit richtet sich nach der Länge des Amplifikates. Die finale Elongation dient der eventuell notwendigen

Vervollständigung der Replikation. Die Zusammensetzung eines PCR-Ansatzes variiert mit der Verwendung von Taq-Polymerasen unterschiedlicher Anbieter. Im Folgenden wird ein Beispiel für einen 20µl Ansatz unter der Verwendung von *Taq*-Polymerase (Master Mix Kit) der Firma QIAGEN, Hilden dargestellt:

Komponenten	Ausgangskonzentration	Einsatz µl
Mastermix	2x	10
upstream-Primer	50pmol/µl	0,4
downstream-Primer	50pmol/µl	0,4
Wasser		8,2
DNA-Template	10-100ng/µl	1

#### PCR unter Verwendung einer Proofreading-Polymerase

Um ein Produkt zu erhalten, das keine oder nur wenige Punktmutationen enthält, kann man eine Polymerase mit einer Proofreading-Aktivität, also einer 3'-5'-Exonuclease-Aktivität, verwenden. Die bei einer Standard-PCR verwendete *Taq*-Polymerase besitzt keine Korrekturaktivität und ist daher für bestimmte Anwendungen bei denen es auf eine korrekte Sequenz ankommt (z.B. Klonierungen von Genen oder Mutagenese von Vektoren) ungeeignet.

Verwendet wurden Expand Long Template (Roche, Mannheim) und *PfuUltra* High Fidelity (Stratagene, Amsterdam, Niederlande). Die Polymerasen wurden nach den Anleitungen der Hersteller verwendet.

#### Gradienten-PCR

Um unterschiedliche Annealing-Temperaturen für ein Primerpaar zu testen, besitzt der Mastercycler Gradient der Firma Eppendorf eine Zusatzfunktion, mit der es möglich ist, in einer PCR 12 verschiedene Temperaturen mit einer Spanne von bis zu 20°C parallel zu fahren. Auf diese Weise lässt sich leicht die optimale Temperatur für eine möglichst hohe Spezifität eines Primerpaars feststellen. Hierzu wurden identische Ansätze nach der Gradienten-PCR in einem Agarosegel untersucht und die beste Annealing-Temperatur abgeschätzt.



### 5.2.3.2 Agarosegelelektrophorese

Die Agarosegelelektrophorese ist eine Methode, die DNA-Fragmente ihrer Größe nach auftrennt und durch die Einlagerung eines Farbstoffs, wie z.B. Ethidiumbromid, sichtbar macht. Aufgrund der Phosphodiester-Brücken in der DNA trägt diese eine stark negative Ladung. In einem Gleichspannungsfeld wandert die DNA in Richtung der Anode. Erfolgt die Wanderung in einer Gelmatrix, so trennen sich die verschiedenen Fragmentgrößen wegen der unterschiedlichen Laufgeschwindigkeiten in der Matrix auf.

Zur Herstellung der Gele wurde eine entsprechende Menge Agarose (1-2%) in 1x TAE-Puffer eingewogen und in der Mikrowelle kurz aufgeköcht und auf einen Rührer gestellt, um Luftbläschen aus der Lösung zu bekommen. Daraufhin goss man das Gel in der gewünschten Größe (Minigel 7 x 10cm; Großes Gel 13 x 15cm) und steckte einen Gelkamm ein. Nach dem Aushärten des Gels wurde es mit 1x TAE überschichtet und der Kamm gezogen. In die Geltaschen wurde die zu analysierenden Nukleinsäuren pipettiert, nachdem diese mit 6x Probenpuffer gemischt worden waren. Als Vergleich wurde ein Fragmentlängenstandard aufgetragen. Mit einer Spannung von 5V/cm bis 10V/cm wurden die Fragmente aufgetrennt. Anschließend wurde das Gel aus der Kammer genommen und in einem Ethidiumbromidbad (1µg/ml Ethidiumbromid in 1x TAE) für 15-20min geschüttelt. Der Farbstoff interkaliert in die Nukleinsäure. Durch UV-Bestrahlung auf einem Transilluminator (302nm) fluoresziert der Farbstoff orange und gibt somit die Lage der einzelnen DNA- bzw. RNA-Banden wieder. Mit Hilfe einer fotografischen Dokumentationsanlage (Digitalkamera und Thermoprinter) wurde das Ergebnis festgehalten.

#### TAE-Puffer

0,04M TrisAcetat

1mM EDTA

pH8.0

#### 6x Probenpuffer

0,25% Bromphenolblau

0,25% Xylenyanol

30% Glycerin

### 5.2.3.3 DNA-Extraktion aus Agarosegelen

Will man nach einer Restriktionsspaltung ein spezifisches DNA-Fragment bekannter Größe von unerwünschten Nebenprodukten reinigen, so kann man die DNA über ein Agarosegel auftrennen, und das gewünschte Fragment isolieren. Nach dem Färben mit Ethidiumbromid können auf einem Transilluminator die Größen der Banden bestimmt werden und das gewünschte Fragment kann mit einem Skalpell ausgeschnitten und in ein Eppendorfgefäß überführt werden. Für die Extraktion der DNA aus dem Gel bietet die Firma Macherey&Nagel ein Kit an (NucleoSpin ExtractII).

Die DNA-Extraktion wurde nach den Angaben des Herstellers durchgeführt und im letzten Protokollschritt mit 25µl Elutionspuffer eluiert. Die gewonnene DNA Menge konnte im Agarosegel geprüft werden, wobei die Konzentration durch den Vergleich mit Längenstandards bekannter Konzentration abgeschätzt werden konnte.

### 5.2.3.4 Klonierung von PCR-Produkten

Für die Klonierung von PCR-Produkten wurde das TOPO TA Cloning Kit (Invitrogen, Karlsruhe) verwendet. Der Vektor liegt in einer linearisierten Form vor und besitzt 3'-Thymidin Überhänge mit kovalent gebundener Topoisomerasel, was eine effiziente Klonierung von PCR-Produkten mit 3'-Adenosin Überhängen erlaubt.

Bis zu 4µl PCR-Ansatz wurden mit 1µl Salt-Solution und 1µl pCR4-TOPO-Vektor gemischt, 15min bei Raumtemperatur inkubiert und anschließend in die mitgelieferten chemisch-kompetenten *E. coli* TOP10-Zellen transformiert.

### 5.2.3.5 DNA-Transformation

Für Transformationen wurden stets chemisch kompetente *E.coli*-Zellen verwendet. Die Zellen wurden auf Eis aufgetaut und je 50µl Bakteriensuspension wurde mit 2-4µl Ligationsansatz bzw. 2-10ng Vektor-DNA versetzt. Der Ansatz wurde vorsichtig gemischt und 15min auf Eis inkubiert. Anschließend erfolgte ein Hitzeschock im 42°C Wasserbad für 45-50 Sekunden. Danach wurden die Zellen noch einmal für 2min auf Eis gelagert. Nun wurden 800µl SOC-Medium (Raumtemperatur) zu den Zellen pipettiert und diese für 1 Stunden in einem 37°C Schüttler inkubiert.

Nach der Erholung der Zellen konnten 50 bis 200µl auf LB-Platten, die mit Ampicillin, X-Gal und IPTG versetzt waren, ausplattiert werden und über Nacht bei 37°C inkubiert werden.

SOC-Medium (für einen Liter):

20g Trypton

5g Hefeextrakt

0,5g NaCl

- in 950ml H<sub>2</sub>O lösen

10ml 250mM KCl

- mit NaOH auf pH7 einstellen, auf 1l auffüllen und autoklavieren

5ml sterile 2M MgCl<sub>2</sub>-Lösung

20ml sterile 1M Glucose-Lösung

#### **5.2.3.6 Plasmid-DNA-Isolierung aus Bakterien**

Für die Plasmid-Isolierung aus Bakterien stehen verschiedene Präparationsmethoden zur Verfügung, die sich hinsichtlich der Reinheit der DNA und des Arbeitsaufwandes unterscheiden.

##### **Easy Prep**

Eine sehr einfache und schnelle Methode, um Plasmid-DNA zu gewinnen, ist die von Berghammer und Auer (1993) beschriebene Methode "Easy-Prep". Diese Methode eignet sich gut, um eine größere Anzahl von Bakterienklonen auf eine erfolgreiche Transformation zu testen. Ein Nachteil ist die geringe Reinheit, da hier auf Reinigungsschritte unter Verwendung von Phenol verzichtet wird. Die Reinheit ist aber für Restriktionsspaltungen durchaus ausreichend. Durchführbar ist die Easy-Prep allerdings nur für *endA*<sup>-</sup>-Stämme, da die Endonuklease A nicht durch Hitze inaktivierbar ist und die DNA abbauen würde.

Für eine Easy-Prep wurde 1ml LB-Medium in einem Eppendorfgefäß, bei dem mehrere Löcher in den Deckel gestochen wurden, mit dem zu untersuchenden Bakterien-Klon mit einer 10µl-Pipettenspitze angeimpft und über Nacht bei 37°C im Schüttler inkubiert.

Für die Plasmid-Isolierung wurde die üN-Kultur 30-60 Sekunden in der Eppifuge (13000rpm, RT) zentrifugiert und der Überstand wurde abgesaugt. Das Pellet wurde in 50µl Lysispuffer vollständig resuspendiert. Nach 5 Minuten im Schüttler bei Raumtemperatur wurde das Eppendorfgefäß in ein 100°C Wasserbad für 30 Sekunden gegeben, was zur Lyse der Bakterien führte. Anschließend wurde für 60 Sekunden auf Eis inkubiert. Nach 20 Minuten Zentrifugation bei Raumtemperatur in der Eppifuge, wurden bis zu 5µl des Überstandes für eine Restriktionsspaltung und anschließender Agarosegel-Elektrophorese eingesetzt.

#### Lysispuffer

10mM Tris pH8.0

1mM EDTA

15% Sucrose

2mg/ml Lysozym

0,1mg/ml BSA)

#### **Präparation mittels Ionenaustauschersäulen**

Diese Methode wurde angewandt, um hochreine Plasmid-DNA zu erhalten. Die so isolierte Plasmid-DNA konnte für Sequenzierungen und Transfektionen von eukaryontischen Zellen eingesetzt werden.

Bei dieser Methode wird die Plasmid-DNA während der Isolierung aus den Bakterien in Puffern aufgenommen, die optimale Salzkonzentrationen und passenden pH-Wert herstellen. Dadurch kann die Plasmid-DNA in zuvor equilibrierten Ionenaustauschsäulen gebunden, gereinigt und anschließend eluiert werden. Auf diese Weise können degradierte RNA, zelluläre und nukleinsäureassoziierte Proteine von der Plasmid-DNA entfernt werden. Die Fällung erfolgt mit Alkohol (2-Propanol).

Es gibt verschiedene Anbieter von Kits mit Ionenaustauschersäulen, die nach diesem Prinzip arbeiten. Im Weiteren beziehen sich die Angaben auf das am häufigsten verwendete QIAGEN Plasmid Midi Kit.

Für eine Plasmidisolierung wurde eine Einzelkolonie in 40ml LB-Medium mit 50-150µg/ml Ampicillin über Nacht bis zum Erreichen der Stationärphase bei 37°C geschüttelt. Die Bakterien wurden bei 6000g in einer Kühlzentrifuge (Sorvall RC5b, Rotor SS34 oder SA600) für 15 Minuten abzentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das Pellet wurde in 4ml Resuspendierungspuffer wieder

aufgenommen. Die Lyse wurde durch Zugabe von 4ml des Lysepuffers gestartet. Nach fünf Minuten Inkubation bei Raumtemperatur wurden 4ml Neutralisierungspuffer zugefügt. Bei der folgenden Inkubation für 15 Minuten auf Eis fallen genomische DNA, Proteine, Zelltrümmer sowie Komplexe mit SDS als Präzipitat aus, während die Plasmid-DNA gelöst bleibt. Nach 30 Minuten Zentrifugation bei 4°C und 20000g wurde der Überstand durch einen Faltenfilter filtriert und anschließend auf eine mit Äquilibriumspuffer equilibrierte Säule (QIAGEN-Säule 100) gegeben. Beim Durchfluß der Säule bindet die DNA an der Säule. Verunreinigungen wurden durch zweimaliges Waschen mit jeweils 10ml Waschpuffer entfernt. Mit 5ml Elutionspuffer (QF) wurde die DNA von der Säule eluiert. Anschließend wurde mit 3,5ml Isopropanol bei Raumtemperatur gefällt. Nach 30 Minuten Zentrifugation bei 15000g und 4°C wurde das resultierende Pellet mit 2ml 70% Ethanol gewaschen. Der Überstand wurde abgesaugt, das Pellet 5 – 10min luftgetrocknet und in 50-100µl Aqua bidest. (nach Pelletgröße) resuspendiert.

### 5.2.3.7 Konzentrationsbestimmung von DNA

Die Konzentration von DNA kann ebenfalls über photometrische Messung bei 260nm bestimmt werden. Eine reine Lösung doppelsträngiger DNA mit 50µg/ml erreicht einen Wert vom 1. Der Quotient  $A_{260}/A_{280}$  liegt bei reiner DNA bei 1,8.

Da die DNA meist nur in sehr kleinen Mengen und Volumina zur Verfügung steht, wird die Konzentration in einer Verdünnungen festgestellt. 2µl DNA wurden mit 98µl 10mmol Tris pH8.0 versetzt und die Absorption im BioPhotometer (Eppendorf) bei 260nm gemessen.

Eine genauere photometrische Konzentrationsbestimmung ist durch die Messung mit dem Spektralphotometer NanoDrop ND-1000 (Peqlab, Erlangen) möglich, da an diesem Gerät eine Messung in kleinen Volumina (1,5µl) durchgeführt werden kann, wobei eine Verdünnung der DNA-Lösung nicht notwendig ist und keine Küvette verwendet wird.

Eine weitere Methode der Konzentrationsbestimmung ist das Abschätzen der Fluoreszenz von gebundenem Ethidiumbromid. Dazu wird die DNA-Probe gegen einen Fragmentlängenstandard bekannter Konzentration auf ein Agarosegel aufgetragen, im elektrischen Feld aufgetrennt und anschließend im Ethidiumbromidbad gefärbt. Dabei interkaliert der Farbstoff in die DNA. Beim

Bestrahlen mit UV-Licht fluoresziert Ethidiumbromid orange. Hierbei kann ein Mengenverhältnis zwischen eingesetztem Marker (bekannter Konzentration) und Probe abgeschätzt werden.

### 5.2.3.8 Restriktionsspaltung von DNA

Je nach Menge der zu spaltenden DNA wurde das Gesamtvolumen des Restriktionsansatzes gewählt. Generell ist darauf zu achten, dass das Volumen der Restriktionsenzyme nicht höher als 10% des Gesamtvolumens liegt, da diese in einem glycerinhaltigen Puffer vorgelegt werden und viele Enzyme bei zu hohen Glycerinkonzentrationen Staraktivität zeigen. Für Testspaltungen wurde das Gesamtvolumen des Ansatzes mit 20 $\mu$ l angesetzt. Hierbei wurden etwa 0,5 $\mu$ g DNA, ca. 5U Restriktionsenzyme (Menge ist Abhängig von der Konzentration, bzw. der spezifischen Aktivität der Enzyme) und 2 $\mu$ l 10-fach Puffer in ein Reaktionsgefäß gegeben und mit Wasser auf 20 $\mu$ l aufgefüllt. Bei Restriktionsspaltungen größerer DNA Mengen, z.B. für nachfolgende Ligationen, wurde ein Volumen von 30-100 $\mu$ l eingesetzt. 5-10 $\mu$ g DNA, 2 $\mu$ l Restriktionsenzym und 10 $\mu$ l 10-fach Puffer wurden mit Wasser auf 100 $\mu$ l aufgefüllt. Die Ansätze wurden bei 37°C oder einer anderen für das jeweilige Enzym spezifischen Temperatur 3 Stunden bis über Nacht je nach Verwendung inkubiert.

### 5.2.3.9 DNA-Ligation

Führt man Ligationen mit einem Vektor durch, der nur mit einem Restriktionsenzym geschnitten ist, kann man die Rate der Religierungen des linearen Vektors ohne Insert durch den Einsatz von *Shrimp Alkaline Phosphatase* verringern. Dazu wurden in den Restriktionsansatz des Vektors zusätzlich 1 $\mu$ l *Shrimp Phosphatase* gegeben und diese nach Inkubation bei 37°C durch kurzes Erhitzen (15 Minuten bei 65°C) inaktiviert. Die Wirkung ist eine Dephosphorylierung der 5'-DNA-Enden. Beim Einsatz mit zwei Restriktionsenzymen kann auf den Dephosphorylierungsschritt verzichtet werden.

Bei den Ligationen wurde das Mengenverhältnis zwischen Vektor und Insert 1:5 gesetzt. Verwendet man standardmäßig 25ng Vektor, so kann man mit folgender Formel die Fragmentmenge für die Ligation berechnen:

$$\text{Masse}_{\text{Fragment}} [\text{ng}] = 125 [\text{ng}] \times \text{Länge}_{\text{Fragment}} [\text{bp}] / \text{Länge}_{\text{Vektor}} [\text{bp}]$$

Für eine Ligation mit kohäsiven Enden wurde 1 Weiss-Unit T4 Ligase (Fermentas, St. Leon-Rot) eingesetzt. Dem Ansatz wurden 2µl 10x-Ligationspuffer zugegeben und er wurde mit Wasser auf 20µl Gesamtvolumen gebracht. Der Ligationsansatz wurde über Nacht bei 16°C inkubiert.

### 5.2.3.10 Fällung der DNA

Um bei einer DNA-Probe den eingesetzten Puffer aus dem Ansatz zu entfernen oder DNA anzukonzentrieren, bietet sich eine Fällung an. Zu mindestens 100µl DNA-Probe (bei Bedarf mit Wasser auffüllen) wurde 1/10 Volumen (10µl) 3M Natriumacetat pH5.2, und 2,5 Volumen (250µl) 100% Ethanol -20°C gegeben. Die Lösung wurde mehrmals invertiert und bei -80°C für 10-20 Minuten inkubiert. Nach 30 Minuten zentrifugieren bei 13000rpm und Raumtemperatur wurde der Überstand verworfen. Das Pellet wurde mit 0,5ml eiskaltem 70% Ethanol gewaschen und für 10-15 Minuten zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das Pellet wurde getrocknet und anschließend in der gewünschten Menge Aqua<sub>bidest</sub> (autoklaviert) resuspendiert. Falls die Menge der DNA gering ist (< 250ng/µl), so kann noch ein *carrier* (wie etwa t-RNA oder Glykogen) zugegeben werden, um die Fällung zu unterstützen und eine bessere Ausbeute zu erhalten.

### 5.2.3.11 Zielgerichtete *in vitro* Mutagenese

Um zielgerichtete Mutationen in Plasmide einzubringen, wurde das QuikChange II Site-directed Mutagenesis Kit (Stratagene, Amsterdam, Niederlande) nach den Angaben des Herstellers verwendet. Man benötigt hierzu zwei komplementäre Oligonukleotide, die die gewünschte Mutation (Substitution, Deletion oder Insertion) in ihrer Mitte tragen mit beiderseits je 10-15 Basen, die komplementär zu der Plasmid-Sequenz sind. Mit Hilfe dieser Primer werden in einer PCR-Reaktion beide Stränge des Plasmids komplett amplifiziert. Nach der PCR wird der Ansatz mit dem Restriktionsenzym *DpnI* verdaut, wobei nur die Ausgangs-DNA abgebaut wird, da die Ausgangs-DNA aufgrund ihrer Isolierung aus *E. coli* methyliert vorliegt und *DpnI* nur methylierte DNA spaltet. Anschließend erfolgt eine Transformation in kompetente *E. coli* Zellen, in denen die mutierten Plasmide vervielfältigt werden.

20ng Vektor-DNA wurden bei der PCR-Reaktion mit 5µl 10x Puffer, je 125ng der Primer, 0,5µl dNTP-Mix (je 25mM) eingesetzt und auf 50µl mit H<sub>2</sub>O<sub>bidest</sub> aufgefüllt. Dem Ansatz wurde 1µl der Proofreading-Polymerase *PfuUltra* High Fidelity zugegeben und die PCR lief über 18 Zyklen, um die Substitutionen von bis zu 7 Basen durchzuführen. Je nach Länge des verwendeten Vektorrückgrats wurde die Elongationszeit bei 68°C auf 1 Minute pro Kilobase festgelegt (bis zu 8 Minuten bei 7,5kb pBSlacZ-Konstrukten). 10µl des Ansatzes wurden nach der PCR für ein Agarosegel aufgehoben und die restlichen 40µl wurden mit 1µl *DpnI* für eine Stunde bei 37°C inkubiert. 20µl dieser Spaltung wurden mit den zuvor abgenommenen 10µl in einem Agarosegel auf erfolgreiche PCR und Spaltung überprüft. War dies erfolgreich, so wurde 1µl der Reaktion für eine Transformation in ultrakompetente DH5α oder XL1-Blue Zellen eingesetzt. Bei den erhaltenen Klonen wurden die Mutationen durch Sequenzierungen bestätigt und die zu untersuchenden DNA-Abschnitte wurden in den Reporter-Vektor pBSlacZ umklontiert.

## **5.2.4 Zellkultur-Methoden**

Glasflaschen und Puffer wurden vor Gebrauch autoklaviert. Gestopfte Glas-Pipetten wurden im Sterilisator für 4 Stunden bei 160°C hitzsterilisiert. Zellkulturschalen, Kryoröhrchen und andere Plastikware, sowie Pipettenspitzen wurden als sterile Einmalplastikware verwendet. Alle Medienzusätze (FCS, nichtessentielle Aminosäuren, Glutamin, Trypsin/EDTA) wurden als sterile Flüssigprodukte vom Hersteller PAA (Cölbe) bezogen. Alle Zellkulturarbeiten wurden in einer Reinraumwerkbank „SterilGARD“ (The Baker Company, Sanford, Me, USA) durchgeführt.

### **5.2.4.1 Kultivierung von Zellen**

Alle verwendeten Zellen wurden im jeweiligen Wachstumsmedium bei 37°C und 7,5% CO<sub>2</sub>-Atmosphäre im Inkubator kultiviert. Zellen dicht bewachsener Zellkulturschalen wurden durch Trypsinbehandlung vom Untergrund gelöst und in angemessener Zelldichte in neue Kulturgefäße überführt.

Nach Abwaschen von trypsinhemmenden Serumrückständen mit CMF-PBS wurden die Zellen mit Trypsin-EDTA (PAA) 2 Minuten bei 37°C inkubiert. Beim Ablösen vom



Untergrund runden sich die Zellen ab. Diese Reaktion wurde durch Zugabe des 10fachen Volumens vorgewärmten Wachstumsmediums gestoppt. Je nach gewünschter Zelldichte wurde ein Teil der Zellen in ein neues Kulturgefäß überführt und mit Wachstumsmedium versorgt. Das Auszählen der Zellzahl in einer Neubauer-Zählkammer ermöglicht das Aussähen einer definierten Zellzahl.

Wachstumsmedium für COS-7, Neuro-2A und NSC19

- DMEM mit 4,5g/l Glucose und L-Glutamin (PAA) mit
- 1% Nichtessentielle Aminosäuren (PAA)
- 10% FCS Gold (fötale Kälberserum) (PAA)
- 1% 100x Penicillin/Streptomycin (PAA)

Wachstumsmedium für CHO, wie oben mit Zusatz von:

- 1x HT-Supplement (0,1mM Hypoxanthin, 0,01mM Thymidin)
- 1x Prolin (0,3mM)

CMF-PBS (kurz PBS)

- 136mM NaCl
- 3mM KCl
- 8mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>·2H<sub>2</sub>O
- 1,5mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>

#### 5.2.4.2 Langzeit-Lagerung von Zellen

Zum Schutz vor Kontamination und genetischen Veränderungen werden Zellen in flüssigem Stickstoff tiefgefroren gelagert. Um osmotische Schäden und Eiskristallbildung gering zu halten, werden die Zellen in einem Einfriermedium mit DMSO langsam heruntergekühlt. Da DMSO zytotoxisch wirkt, muss zügig gearbeitet werden.

Trypsinierte Zellen wurden in Greiner-Röhrchen durch 5 Minuten Zentrifugation in der Hettich-Zentrifuge bei etwa 500g sedimentiert. Das Sediment wurde in 1ml Einfriermedium aus 40% DMEM, 50% FCS und 10% DMSO resuspendiert und in Kryoröhrchen gefüllt. Dabei sollte die Zellzahl bei etwa 10<sup>6</sup> Zellen pro Milliliter Einfriermedium liegen.

In einer mit Isopropanol umspülten Einfrierbox (Nalgene) wurden die Zellen gleichmäßig und langsam über Nacht auf  $-80^{\circ}\text{C}$  heruntergekühlt. Die Langzeitlagerung erfolgte in der Dampf- oder Flüssigphase eines Stickstofftanks.

Das Auftauen der Zellen wurde zügig im  $37^{\circ}\text{C}$  Wasserbad vorgenommen. Die Zellen wurden schnell in ein Kulturgefäß überführt und mit einer entsprechenden Menge Wachstumsmedium versorgt, wobei sich das DMSO ausverdünnt.

#### **5.2.4.3 Transiente Transfektion**

Für die Transfektion von COS-7, Neuro-2A, NSC-19 und CHO-Zellen wurde das Transfektionsreagenz Lipofectamine mit Plus-Reagenz (Invitrogen, Karlsruhe) verwendet.

2 bis  $3 \times 10^5$  Zellen wurden in 35mm-Kulturschalen bis zum Erreichen einer realen Konfluenz von 70-90% inkubiert. Pro Schale wurde  $1\mu\text{g}$  Plasmid-DNA in  $100\mu\text{l}$  DMEM (PAA, Cölbe) verdünnt und mit  $6\mu\text{l}$  PlusReagenz versetzt. Diese Lösung wurde für 15 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. In einem zweiten Eppendorfgefäß wurden  $4\mu\text{l}$  Lipofectamine mit  $100\mu\text{l}$  DMEM versetzt. Die beiden Lösungen wurden vereinigt und zur Bildung des DNA/Lipid-Komplexes 15 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Derweilen wurde das Medium der Zellen durch  $0,8\text{ml}$  frisches DMEM ersetzt. Nun wurde der DNA/Lipid-Komplex zu den Zellen gegeben, das Ganze wurde vorsichtig gemischt und für 3 Stunden bei  $37^{\circ}\text{C}$  im Inkubator inkubiert. Anschließend wurde  $1\text{ml}$  DMEM mit 20% FCS und 2x Penicillin/Streptomycin zugegeben, um die Bedingungen des Wachstumsmediums herzustellen.

Um Zellüberstände untersuchen zu können oder Stimulationen der Zellen durchführen zu können, wurde nach 24 Stunden das serumhaltige Wachstumsmedium durch serumfreies Wachstumsmedium (ohne 10% FCS) ersetzt und weitere 24 Stunden kultiviert.

Bei Zellen, die einem Promotor-Reporter-Versuch dienen sollten, wurde das Wachstumsmedium durch serumreduziertes Wachstumsmedium (1% FCS) ersetzt, um das Wachstum zu verlangsamen ohne einen Serummangel zu erzeugen.

#### 5.2.4.4 Immuncytochemie

Zum Zweck der Immunfluoreszenz wurden die Zellen auf kollagenisierten Deckgläsern kultiviert. Drei Deckgläser konnten in eine 35mm-Kulturschale gelegt werden, darauf wurden  $1 \times 10^5$  Zellen ausgesät. Nach 24h im Inkubator erfolgte die Transfektion (siehe 5.2.4.3) mit den Expressionsvektoren der zu untersuchenden Proteine. 48 Stunden nach der Transfektion wurden die Zellen fixiert. Das Medium wurde abgesaugt, die Zellen dreimal mit PBS (siehe 5.2.4.1) gewaschen und  $-20^\circ\text{C}$  kaltes Methanol wurde für 4-5min auf die Zellen gegeben. Das Methanol wurde abgesaugt und die Zellen wurden 20min in PBS inkubiert, anschließend noch zweimal mit PBS gewaschen. Nun wurden die Deckgläser einzeln in Feuchtkammern gelegt und mit einer Verdünnung des Primärantikörpers in 0,5% BSA oder 0,5% Ovalbumin in PBS für 3h bei Raumtemperatur inkubiert. Nach dreimaligen waschen mit PBS konnte eine Verdünnung des fluoreszenzmarkierten Sekundärantikörpers für 1 Stunde zugegeben werden. Danach wurde erneut dreimal mit PBS gewaschen. Die Deckgläser wurden kurz in Wasser (bidest.) getaucht, um Salze zu entfernen, und anschließend mit der bewachsenen Seite nach unten in einen Tropfen Elvanol auf einem Objektträger eingedeckelt.

Die Fluoreszenz der Zellen wurde unter Verwendung eines Fluoreszenzmikroskops (Axiophot, Zeiss, Jena) beobachtet. Die Lokalisierung der Konstrukte innerhalb der Zellen konnte unter Verwendung des konfokalen Laser-Scanning-Mikroskops Leica TCS SP2 (Leica Mikrosysteme, Bensheim) analysiert werden.

#### 5.2.5 Proteinpräparation und Analyse

##### 5.2.5.1 Proteinpräparation von Zellkulturzellen und Zellkulturüberständen

Die Zellen und der Zellkulturüberstand wurden 48 Stunden nach der Transfektion geerntet. Dabei wurden die Zellen lysiert, das Medium wurde etwa 10fach ankonzentriert und die Proben dann mit SDS-Probenpuffer für spätere SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese versetzt.

Der Zellkulturüberstand wurde abgenommen und in ein Eppendorfgefäß überführt. Dies wurde in einer Tischzentrifuge bei 13000rpm 2min zentrifugiert, um vereinzelte Zellen, die sich noch im Medium befanden, zu sedimentieren. Der Überstand wurde auf Centricon YM-10 Säulen (Millipore Corporation, Eschborn) geladen und von 2ml

auf ca. 200µl eingeengt. Dies geschah durch Zentrifugation bei 5000g für 60-90min in einer Kühlzentrifuge (Sorvall RC5b, Rotor SS34).

Für die Lyse der Zellen wurden 200µl RIPA-Lysispuffer zu den Zellen gegeben. Diese wurden mit einem Zellschaber von der Zellkulturschale gelöst, durch Auf- und Abpipettieren homogenisiert und in ein Eppendorfgesäß überführt. Die Suspension wurde 1h auf Eis inkubiert und anschließend mit einem Ultraschallgerät für 10 Sekunden bei maximaler Amplitude beschallt.

Lysat und konzentrierter Überstand wurden mit 50µl 5x SDS-Probenpuffer versetzt und 5min bei 95°C inkubiert. Die Proben wurden bei -20°C gelagert.

#### RIPA-Lysispuffer

5mM EDTA

5mM 1,10-Phenanthrolin

1× Proteinaseinhibitor (Complete™ EDTA-free, Roche)

in RIPA-Puffer (1% NP-40, 0,5% Natriumdeoxycholat, 0,1% SDS, in PBS)

#### 5x SDS-Probenpuffer

250mM Tris, pH6,8

10% (w/v) SDS

50% Glycerol

0,05% Bromphenolblau

100mM β-Mercaptoethanol

#### 5.2.5.2 Extraktion von nukleären Proteinen

Für EMSAs und DNA-Affinitäts-Aufreinigungen wurden Kernproteine nach der Methode von Dignam et al. (1983) aus Neuro-2A-Zellen aufgereinigt. Es wurden etwa  $1 \times 10^9$  Neuro-2A-Zellen verwendet. Trypsinierte Zellen wurden in Greiner-Röhrchen durch 10 Minuten Zentrifugation in der Hettich-Zentrifuge bei etwa 500g sedimentiert. Die Zellen wurden zweimal mit PBS gewaschen und erneut sedimentiert. Die Pellets wurden gesammelt und bei -80°C gelagert, bis eine ausreichende Zellzahl zur Verfügung stand. Die gefrorenen Zell-Pellets wurden aufgetaut und im 5fachen Volumen Puffer A (ca. 10ml) resuspendiert und 10 Minuten auf Eis inkubiert. Nach anschließender Zentrifugation bei 300-500g in einer Kühlzentrifuge (Sorvall RC5b,

Rotor SS34) bei 4°C wurde das Zell-Pellet in 2ml Puffer A resuspendiert und in einem Dounce Homogenisator (mit B-Pistill) durch 20-30 Stöße lysiert. Das Lysat wurde zunächst 10 Minuten bei 1500rpm zentrifugiert, der Überstand abgenommen und das Pellet wurde bei 25000g für 20 Minuten erneut zentrifugiert. Die so sedimentierten Zellkerne wurden in 3ml Puffer C aufgenommen und im Dounce Homogenisator resuspendiert. Die Suspension wurde bei 4°C für 30 Minuten in einem 12ml-Greiner-Röhrchen auf einem Magnetrührer gerührt, wobei die Kerne lysiert wurden. Die nukleäre Proteinfraction wurde durch 30 Minuten Zentrifugation bei 25000g von unlöslichen Kernbestandteilen gereinigt und anschließend gegen das 50fache Volumen Puffer D für 5 Stunden dialysiert. Die Suspension wurde abschließend für 20 Minuten bei 25000g zentrifugiert und der Überstand wurde als nukleärer Extakt aliquotiert, in flüssigem Stickstoff eingefroren und bei -80°C gelagert.

Puffer A	Puffer C	Puffer D
10mM HEPES pH 7.9	20mM HEPES pH 7.9	20mM HEPES pH 7.9
1.5mM MgCl <sub>2</sub>	25% (v/v) Glycerol	20% (v/v) Glycerol
10mM KCl	0.42M NaCl	0.1M KCl
0.5mM DTT	1.5mM MgCl <sub>2</sub>	0.2mM EDTA
	0.2mM EDTA	0.5mM PMSF
	0.5mM PMSF	0.5mM DTT
	0.5mM DTT	

### 5.2.5.3 Protein-Konzentrationsbestimmung

Die Konzentrationsbestimmung von Proteinlösungen wurde mit dem BCA Protein Assay Kit (Pierce, Rockford, IL, USA) durchgeführt. Hierbei bilden die Proteine mit Cu<sup>2+</sup>-Ionen in alkalischer Lösung einen Komplex, so dass man eine photometrische Messung gegen Eichlösungen durchführen kann.

Hierzu wurden 25µl der zu messenden Proteinlösung mit 500µl Testlösung (BCA Reagenz A zu BCA Reagenz B wie 50:1) gemischt und 30 Minuten bei 37°C inkubiert. Anschließend ließ man die Lösungen auf Raumtemperatur abkühlen und es folgte die photometrische Messung im BioPhotometer (Eppendorf).

#### **5.2.5.4 Electrophoretic Mobility Shift Assay (EMSA)**

Im EMSA kann die spezifische Bindung von Proteinen an DNA gezeigt werden, da sich Protein-DNA-Komplexe langsamer bei einer Agarosegel-Elektrophorese bewegen als frei DNA, wodurch man einen „Shift“ oder eine Retardierung erkennen kann. Die Detektion der DNA im Agarosegel erfolgte über die Cy3-Fluorophor-Markierung der DNA mittels des Typhoon 8600 Variable Mode Imagers (Amersham Biosciences, München).

Die Cy3-markierte DNA wurde entweder durch Hybridisierung eines Cy3-markierten Oligonukleotids mit dem entsprechenden komplementären Oligo oder durch eine PCR unter der Verwendung eines Cy3-markierten Oligonukleotids hergestellt.

Die komplementären Oligonukleotide wurden für die Hybridisierung auf eine Konzentration von 1pmol/μl in 50mM NaCl verdünnt, 5min in einem 100°C Wasserbad (≥ 400ml) erhitzt und anschließend wurden die Proben langsam in dem Wasserbad auf unter 37°C abgekühlt (etwa 2 Stunden). Die Cy3-markierten PCR-Produkte wurden nach der PCR mit dem Nucleospin-ExtractII Kit (Macherey&Nagel, Düren) nach den Angaben des Herstellers aufgereinigt und in 30μl Elutionspuffer eluiert. Die DNA-Konzentration wurde photometrisch mit dem NanoDrop (Peqlab, Erlangen) bestimmt und in einem Agarosegel überprüft.

Für einen EMSA wurden zunächst 5-10μg nukleärer Extrakt (siehe 5.2.5.2) in 10μl Puffer D (siehe 5.2.5.2) vorgelegt. Dazu wurden 1μl BSA 5mg/ml (Sigma, Taufkirchen) und 1μl Poly[d(I-C)] 4μg/μl (Roche, Mannheim) gegeben und mit H<sub>2</sub>O<sub>bidest</sub> auf 19μl aufgefüllt. Der Ansatz wurde 10 Minuten bei 20°C inkubiert, damit unspezifische DNA-Bindeproteine durch das Poly[d(I-C)] geblockt werden können. Dann wurde 1μl Cy3-markierter DNA 50fmol/μl zugegeben und der Ansatz wurde für 15 Minuten bei 20°C inkubiert. Die Reaktionsansätze wurden in 2% (w/v) TAE-Agarosegelen (großes Gel 13 x 15cm) bei 4,5 V/cm für 2h bei 4°C im Dunkeln (Kühlraum) aufgetrennt. Die Gele wurden mit H<sub>2</sub>O<sub>bidest</sub> gewaschen und das Ergebnis wurde mit Hilfe des Typhoon 8600 dokumentiert.

#### **5.2.5.5 DNA-Affinitäts-Aufreinigung**

Um Proteine aufzureinigen, die an einer bestimmten DNA-Sequenzen binden, kann die Ziel-DNA an magnetische Partikel gekoppelt werden und nach Inkubation der DNA mit nukleären Proteinen, können spezifisch gebundene Proteine mit Hilfe eines

Magneten isoliert werden. Die verwendeten Dynabeads M-280 Streptavidin (Invitrogen, Karlsruhe) liegen in einer gleichmäßige Suspension vor, wenn die Lösung auf einem Roller in ständiger Bewegung gehalten wird. Durch einen Magnetständer können die Dynabeads sehr schnell sedimentiert werden, so dass man den Überstand der Lösung abnehmen kann, wodurch einfache Pufferwechsel für die Kopplungs- und Waschschrte ermöglicht werden.

Als Ziel-DNA wurden wie im EMSA (siehe 5.2.5.4) Oligonukleotide oder PCR-Fragmente verwendet, die anstelle der Cy3-Fluorophor-Markierung eine Biotin-Markierung aufwiesen.

Für eine Aufreinigung wurde 1mg Dynabeads M-280 Streptavidin verwendet. Diese wurden zunächst zweimal mit 100µl DNA-Bindepuffer gewaschen. Die Ziel-DNA (300pmol doppelsträngige Oligonukleotide oder etwa 100pmol 245bp PCR-Fragment) wurde mit H<sub>2</sub>O<sub>bidest</sub> auf 250µl aufgefüllt und mit 250µl 2x DNA-Bindepuffer gemischt. Dieser Ansatz wurde für 2 Stunden bei Raumtemperatur mit den Dynabeads auf einem Roller inkubiert, um die DNA über die Streptavidin-Biotin-Bindung an die Dynabeads zu koppeln. Die Dynabeads wurden dreimal mit 100µl DNA-Bindepuffer gewaschen und danach für 10 Minuten in 100µl Protein-Bindepuffer (entspricht 1/2x Puffer D, siehe 5.2.5.2) mit 25µg BSA inkubiert, um freie unspezifische Bindestellen der Dynabeads mit BSA zu blocken. 250-500µg nukläerer Extrakt (siehe 5.2.5.2) wurden in 500µl Puffer D vorgelegt, hierzu wurden 250µg BSA und 200µg Poly[d(I-C)] (Roche, Mannheim) oder 400µg Herings-Sperma-DNA (Sigma, Taufkirchen) gegeben und die Lösung wurde mit H<sub>2</sub>O<sub>bidest</sub> auf 1ml aufgefüllt. Der Ansatz wurde ebenfalls 10 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert, damit unspezifische DNA-Bindeproteine durch das Poly[d(I-C)] bzw. durch die Herings-Sperma-DNA geblockt werden können. Diese Lösung wurde nun für 30 Minuten mit den vorbehandelten Dynabeads inkubiert und anschließend wurden die Dynabeads sedimentiert und der Überstand für spätere Analysen abgenommen und bei -20°C gelagert. Die Dynabeads wurden dreimal mit 200µl Protein-Bindepuffer gewaschen. Die an der Ziel-DNA gebundenen Proteine wurden durch zwei aufeinander folgende 10minutige Elutionsschrte mit je 15µl Protein-Bindepuffer mit 2M MgCl<sub>2</sub> von der DNA gelöst. Die Eluate wurden vereinigt und 2 Stunden gegen 1,5ml Dialysepuffer dialysiert. Die dialysierten Proben wurden ebenfalls für weitere Analysen bei -20°C eingefroren.

2x DNA-Bindepuffer	Protein-Bindepuffer (1/2x Puffer D)	Dialysepuffer
10mM Tris-Cl pH 7,5	10mM HEPES pH 7.9	30mM Tris-Cl pH 7,9
1mM EDTA	10% (v/v) Glycerol	0,2mM EDTA
2M NaCl	50mM KCl	200mM NaCl
	0.1mM EDTA	
	0.25mM PMSF	
	0.25mM DTT	

### 5.2.5.6 SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE)

Zur Auftrennung von Proteinen nach ihrer relativen Molekülmasse wird die SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese mit einem von U.K. Laemmli (1970) entwickelten, SDS-haltigen, diskontinuierlichen Tris-HCl/Tris-Glycin-Puffersystem eingesetzt. Die Proben werden mit dem anionischen Detergenz SDS (Natriumdodecylsulfat) behandelt, wodurch ein Protein-SDS-Komplex mit konstanter negativer Nettoladung pro Masseneinheit entsteht. Somit ist eine Auftrennung der Proteine im porösen Polyacrylamidgel bei angelegtem elektrischem Feld möglich. Für eine gute Auflösung wird das Trenngel mit einem weitporigen Sammelgel überschichtet, an deren Grenzschicht die Proteine aufgestaut werden und somit eine Zonenschärfung erfahren.

Das Trenngel wurde unmittelbar nach Mischen der Komponenten zwischen zwei durch 0,8mm dicke Abstandhalter getrennte Glasplatten eines Gelsystems der Firma Peqlab (Erlangen) gegossen und mit Isopropanol überschichtet. Nach minimal einstündiger Auspolymerisation bei Raumtemperatur (besser: über Nacht bei 4°C) wurde die Geloberfläche mit SDS-Laufpuffer gewaschen und anschließend das Sammelgel darüber gegossen. In das Sammelgel wurde ein Kamm zur Ausbildung von Geldaschen für die Probenauftragung gesteckt. Nach der Polymerisationszeit von etwa 45min wurde die Gelkammer mit SDS-Laufpuffer gefüllt, der Kamm vorsichtig herausgezogen und die Taschen mit Puffer ausgewaschen. Nun konnten die Proben, die mit 5x SDS-Probenpuffer versetzt wurden, mit einer Hamilton-Pipette in die Taschen geladen werden. Zusätzlich wurde der Proteingrößenmarker Mark12 (Invitrogen, Karlsruhe) aufgetragen.



Komponenten für 1Minigel	Trenngel 7,5%	Sammelgel 3,75%
Acrylamidmix: 30% Acrylamid, 0,8% Bisacrylamid	1,75ml	0,5ml
3M Tris-Cl pH 8,8	875µl	-
1M Tris-Cl pH 6,8	-	0,5ml
10% SDS	70µl	40µl
60% Saccharose	-	1ml
H <sub>2</sub> O <sub>bidest</sub>	4,25ml	1,95ml
TEMED	5µl	3µl
10 % APS	50µl	30µl

#### Zusammensetzung der verwendeten SDS-Polyacrylamidgele

Die Proteinproben liefen nach der Beladung der Gele bei einer konstanten Stromstärke von 12,5-15mA pro Gel für ca. 2 Stunden.

#### 10x SDS-Laufpuffer

2,5M Glycin

250mM Tris-Base

1% (w/v) SDS

#### 5.2.5.7 Coomassie-Färbung

Nach der Auftrennung im SDS-PAGE können die Proteine im Gel durch eine Coomassie-Färbung sichtbar gemacht werden. Um eine hoch-sensitive Färbung zu erzielen, wurde die Coomassie-Färbelösung PageBlue (Fermentas, St. Leon-Rot) verwendet. Vor der Färbung wurden die Proteine zunächst durch eine Fixierlösung (25% 2-Propanol, 10% Essigsäure in H<sub>2</sub>O) im Gel fixiert. Danach wurde das Gel dreimal für 10 Minuten in H<sub>2</sub>O<sub>bidest</sub> gewaschen. Die Färbung mit 20ml PageBlue erfolgte für 1 Stunde bei Raumtemperatur bei leichtem Schütteln. Abschließend wurde das Gel noch einmal mit H<sub>2</sub>O<sub>bidest</sub> gewaschen.

### 5.2.5.8 Massenspektroskopie von Proteinen (Maldi-TOF und LC-ESI)

Proteine, die bei der DNA-Affinitäts-Aufreinigung (siehe 5.2.5.5) isoliert wurden, sollten durch Maldi-TOF-Analysen (CeBiTec, Bielefeld) oder durch LC-ESI-Analysen (Bruker Daltonik, Bremen) ihrer tryptischen Spaltprodukte identifiziert werden.

Für die Maldi-TOF-Analysen am CeBiTec (Bielefeld) wurden die Proteinproben aus der DNA-Affinitäts-Aufreinigung zunächst durch SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese aufgetrennt und anschließend wurde das Gel mit Coomassie gefärbt. Interessante Proteinbanden wurden mit einem Skalpell aus dem Gel ausgeschnitten und einem tryptischen Verdau unterzogen. Hierzu wurden die ausgeschnittenen Gelbanden in Eppis gegeben, die zuvor zweimal für mindestens eine Stunde mit 500µl in 0,1% TFA, 60% Acetonitril gewaschen wurden. Die Gelbanden wurden mit einem Skalpell in kleinere Stücke zerteilt und mit 250µl 50% Acetonitril für 5 Minuten gewaschen. Der Überstand wurde abgenommen und durch 250µl 50% Acetonitril, 50mM Ammoniumhydrogencarbonat ersetzt. Nach 30 Minuten Inkubation wurde diese Lösung durch 250µl 50% Acetonitril, 10mM Ammoniumhydrogencarbonat ersetzt und es wurde erneut für 30 Minuten inkubiert. Danach wurde der Überstand abgenommen und die Gelstücke in der Speedvac vollständig getrocknet. Auf die Gelstücke wurden 15µl Trypsinlösung (6,6µg/ml modifiziertes Trypsin von Promega in 10mM Ammoniumhydrogencarbonat) gegeben und dieser Ansatz wurde 2 Stunden bei 4°C inkubiert, damit das Trypsin in die getrockneten Gelstücken eindringen konnte. Anschließend wurden 15µl 10mM Ammoniumhydrogencarbonat zugesetzt und der Ansatz wurde über Nacht bei 37°C inkubiert. Die tryptisch verdauten Proben wurden dem CeBiTec Maldi-TOF-Service (Bielefeld) übergeben und dort wurden die MS-Spektren am Biflex III Maldi-TOF-MS (Bruker Daltonik, Bremen) erzeugt und mittels Flexanalysis, Biotools (Bruker) und MASCOT analysiert.

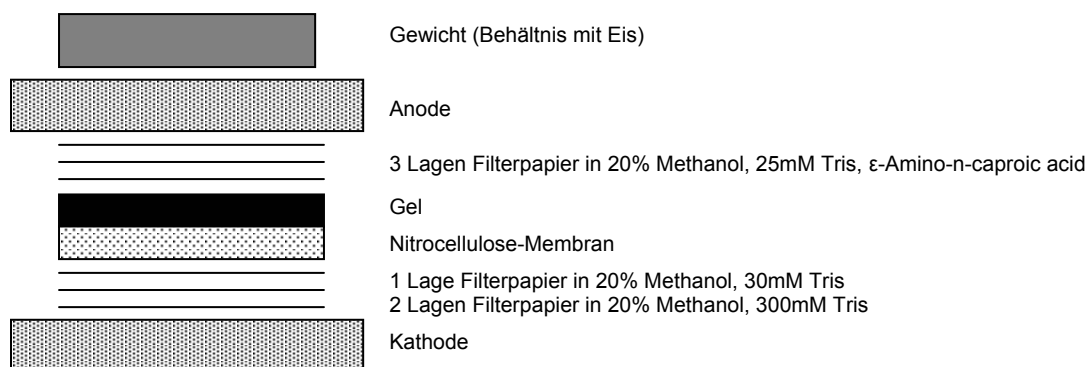
Für die LC-ESI-Analysen wurden die Eluate der DNA-Affinitäts-Aufreinigung direkt einem tryptischen Verdau unterzogen. Dabei wurden 35µl Eluat mit 8µl 50mM Ammoniumhydrogencarbonat und 0,6µl 10mM DTT versetzt. Dieser Ansatz wurde 15 Minuten bei 50°C inkubiert und nach Zugabe von 0,6µl 25mM Jodacetamid für weitere 15 Minuten bei Raumtemperatur im Dunkeln inkubiert. Dem Ansatz wurden 6µl modifiziertes Trypsin 100ng/µl (Promega, Mannheim) zugegeben und dann über Nacht bei 37°C inkubiert. Die Reaktion wurde durch Zugabe von 5µl Ameisensäure gestoppt und danach wurden die Proben lyophilisiert. Die Proben wurden durch

Bruker Daltonik (Bremen) einer HPLC-Aufreinigung unterzogen und anschließend wurden MS/MS-Spektren der Peptidfraktionen an einem HCT ultra Ion Trap LC/MS<sup>(n)</sup>-System erstellt.

### 5.2.5.9 Western-Blot

#### Proteintransfer

Die durch SDS-PAGE aufgetrennten Proteine wurden elektrisch durch einen Semidry-Elektroblot bei einer Stromstärke von 135mA pro Gel für 1 Stunde auf eine Nitrocellulose-Membran (Protran BA85, Porengröße 0,45µm; Schleicher und Schuell, Dassel) transferiert. Zur Kontrolle des Elektroblots und zur Markierung der Markerbanden wurden die Membranen reversibel mit Ponceau-Rot (SIGMA, Hamburg) gefärbt, anschließend mit 1x TBS entfärbt.



#### **Aufbau eines Semidry-Elektroblots**

10x TBS-Puffer

1,37 M NaCl

100 mM Tris, pH7,3

#### Immundetektion

Zunächst wurden freie Proteinbindungsstellen der Nitrocellulose-Membran abgesättigt. Dieses Blocken erfolgte mit 5% Magermilchpulver oder 3% BSA in TTBS-Waschpuffer (TBS, 0,1% Tween20) bei 4°C über Nacht (alternativ: 1h bei RT). Anschließend wurde die Membran mit einer Verdünnung des Primärantikörpers in 5% Magermilchpulver oder 0,5% BSA in TTBS bei Raumtemperatur für 3 Stunden inkubiert. Danach wurde die Membran dreimal 10min mit TTBS gewaschen, um

nicht-gebundene Antikörper zu entfernen. Nun wurde eine Stunde mit einer Verdünnung des HRP-gekoppelten Sekundärantikörpers inkubiert. Nach erneutem dreimaligem Waschen erfolgte die Entwicklung des Immunblots mit dem ECL-System Lumi-Glo (Roche, Mannheim). Die an den Sekundärantikörper gekoppelte Meerrettichperoxidase oxidiert in Gegenwart von Wasserstoffperoxid das Substrat Luminol, dabei wird Licht emittiert. Dabei konnten ECL-Filme (HyperfilmECL, Amersham Pharmacia Biotech, Buckinghamshire, England) je nach Intensität der Reaktion 30 Sekunden bis 24 Stunden belichtet werden. Die Entwicklung und Fixierung der Filme erfolgte mit Kodak x-ray Developer LX 24 und Kodak x-ray Fixer AL4 (Eastman Kodak, Rochester, NY, USA).

#### Immunblot-Stripping

Um eine Membran mit einem weiteren Primärantikörper inkubieren zu können, müssen zuvor gebundene Antikörper abgewaschen werden. Dazu wurde die Membran eine Stunde bei 37°C in Stripping-Lösung (2% SDS in PBS) inkubiert. Anschließend musste sie erneut abgesättigt werden und konnte dann mit einem anderen Primärantikörper untersucht werden.

#### **5.2.5.10 South-Western Blot**

Bei einem South-Western Blot können DNA-Protein-Bindungen an einem zu untersuchenden markiertem DNA-Fragment gezeigt werden. Dazu werden die zu testenden Proteinproben zunächst in einem SDS-PAGE aufgetrennt und anschließend auf eine Nitrocellulose-Membran transferiert. Die Proteine müssen auf der Membran renaturiert werden, um ihre Bindungseigenschaften untersuchen zu können. Nach Inkubation mit markierter DNA und anschließenden Waschschritten, kann die gebundene DNA detektiert werden.

Es wurde Cy3-markierte DNA verwendet, die durch Hybridisierung eines Cy3-markierten Oligonukletids mit dem entsprechenden komplementären Oligo hergestellt wurde (siehe EMSA; 5.2.5.4). Die Detektion der gebundenen DNA erfolgte mit dem Typhoon 8600 Variable Mode Imager (Amersham Biosciences, München).

Nukleäre Extrakte (siehe 5.2.5.2) aus Neuro-2A Zellen wurden in einem SDS-Polyacrylamidgel (siehe 5.2.5.6) aufgetrennt und anschließend auf eine Nitrocellulose-Membran (Protran BA85, Porengröße 0,45µm; Schleicher und Schuell,

Dassel) durch einen Semidry-Elektroblot (siehe Proteintransfer 5.2.5.9) transferiert. Anschließend wurde die Membran für 5 Minuten in Bindepuffer gewaschen. Die Renaturierung der Proteine auf der Membran wurde für 2 Stunden in Bindepuffer bei Raumtemperatur durchgeführt. Danach erfolgt die Inkubation mit der Cy3-markierten DNA für 1 Stunde, dabei lagen die DNA-Fragmente in Konzentrationen zwischen 2,5-20fmol/ $\mu$ l vor. Die ungebundene DNA wurde durch drei Waschschriffe für jeweils 10 Minuten mit Bindepuffer entfernt. Abschließend wurden die gebundenen markierten DNA-Fragmente mit dem Typhoon 8600 Variable Mode Imager nachgewiesen.

#### Bindepuffer

- 50mM Tris-Cl pH8
- 100mM NaCl
- 1mM DTT
- 1mM EDTA
- 0,1% (v/v) Tween20
- 1% (w/v) BSA
- 50 $\mu$ g/ml Herrings-Sperma-DNA

### 5.2.6 Promotor-Reportergen Untersuchungen

Für Messungen der Promotor-Aktivität wurden die zu untersuchenden DNA-Abschnitte in einen pBluescript Vektor mit lacZ-Kassette (pBSlacZ) gesetzt und diese Vektoren wurden durch transiente Transfektion in Zellkultur-Zellen eingebracht. 48 Stunden nach der Transfektion wurde die Promotoraktivität durch Messung der  $\beta$ -Galaktosidase-Aktivität bestimmt. Um verschiedene Promotor-Konstrukte miteinander vergleichen zu können, wurde die Transfektions-Effizienz der einzelnen Ansätze bestimmt, indem gemeinsam mit dem Promotor-Konstrukt ein Luziferase-Expressionsvektor (pPALU oder pGL4.10TK) in die Zellen cotransfiziert wurde. Mit Hilfe des Dual-Light System (Applied Biosystems, Darmstadt) konnten die  $\beta$ -Galaktosidase-Aktivitäten und Luziferase-Aktivitäten der Zellextrakte gemeinsam in einer Probe durch eine Chemilumineszenz-Nachweisreaktion bestimmt werden. Hierzu wurden die Zellen 48 Stunden nach der Transfektion in den verwendeten 35mm-Schalen zunächst zweimal mit PBS gewaschen und durch die Zugabe von 100 $\mu$ l Lysis-Solution lysiert. Die Zellen wurden mit einem Zellschaber von dem

Untergrund gelöst und das Lysat wurde in ein Eppendorfgefäß überführt. Nach 2 Minuten Zentrifugation bei 13.000rpm konnte der Überstand für die Messung verwendet werden. Die Lysate mussten entsprechend der Reporter-Aktivitäten bis zu 1:200 mit Lysis-Solution verdünnt werden, um die Messung im linearen Bereich der beiden Nachweisreaktionen durchführen zu können. 10µl verdünntes Lysat wurden mit 25µl Puffer A gemischt und nach der Zugabe von 100µl Puffer B mit 1µl Galacton-Plus erfolgte unmittelbar die Messung der Luziferase-Aktivität im Luminometer MiniLumat LB 9506 (Berthold, Bad Wildbad). Dabei wurden die entstehenden Lichteinheiten RLU in einer Sekunde gemessen. Da diese Luziferase-Nachweisreaktion mit einer Halbwertszeit von 1 Minute schnell abklingt, wurden die Proben 30 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert bevor die  $\beta$ -Galaktosidase-Nachweisreaktion durch Zugabe von 100µl Accelerator II gestartet wurde. Die Messung der Chemilumineszenz erfolgte wieder unmittelbar über 1 Sekunde. Mittels der Luziferase-Aktivitäten erfolgte eine Normalisierung der Transfektions-Effizienz. Die Promotoraktivitäten der Konstrukte wurden als Vielfaches der Aktivität des Leervektors ausgedrückt.

## 6 Literatur

- Alroy, I., Soussan, L., Seger, R., and Yarden, Y. (1999). Neu differentiation factor stimulates phosphorylation and activation of the Sp1 transcription factor. *Mol Cell Biol* 19, 1961-72.
- Bai, L., and Merchant, J. L. (2003). Transcription factor ZBP-89 is required for STAT1 constitutive expression. *Nucleic Acids Res* 31, 7264-70.
- Baldwin, A. S., Jr. (1996). The NF-kappa B and I kappa B proteins: new discoveries and insights. *Annu Rev Immunol* 14, 649-83.
- Bao, J., Wolpowitz, D., Role, L. W., and Talmage, D. A. (2003). Back signaling by the Nrg-1 intracellular domain. *J Cell Biol* 161, 1133-41.
- Bhat-Nakshatri, P., Sweeney, C. J., and Nakshatri, H. (2002). Identification of signal transduction pathways involved in constitutive NF-kappaB activation in breast cancer cells. *Oncogene* 21, 2066-78.
- Biswas, D. K., Shi, Q., Baily, S., Strickland, I., Ghosh, S., Pardee, A. B., and Iglehart, J. D. (2004). NF-kappa B activation in human breast cancer specimens and its role in cell proliferation and apoptosis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 101, 10137-42.
- Blake, M. C., Jambou, R. C., Swick, A. G., Kahn, J. W., and Azizkhan, J. C. (1990). Transcriptional initiation is controlled by upstream GC-box interactions in a TATAA-less promoter. *Mol Cell Biol* 10, 6632-41.
- Blobel, C. P. (2005). ADAMs: key components in EGFR signalling and development. *Nat Rev Mol Cell Biol* 6, 32-43.
- Bomsztyk, K., Van Seuning, I., Suzuki, H., Denisenko, O., and Ostrowski, J. (1997). Diverse molecular interactions of the hnRNP K protein. *FEBS Lett* 403, 113-5.
- Bomsztyk, K., Denisenko, O., and Ostrowski, J. (2004). hnRNP K: one protein multiple processes. *Bioessays* 26, 629-38.
- Bouwman, P., and Philipsen, S. (2002). Regulation of the activity of Sp1-related transcription factors. *Mol Cell Endocrinol* 195, 27-38.
- Brantley, D. M., Yull, F. E., Muraoka, R. S., Hicks, D. J., Cook, C. M., and Kerr, L. D. (2000). Dynamic expression and activity of NF-kappaB during post-natal mammary gland morphogenesis. *Mech Dev* 97, 149-55.
- Britto, J. M., Lukehurst, S., Weller, R., Fraser, C., Qiu, Y., Hertzog, P., and Busfield, S. J. (2004). Generation and characterization of neuregulin-2-deficient mice. *Mol Cell Biol* 24, 8221-6.
- Buonanno, A., and Fischbach, G. D. (2001). Neuregulin and ErbB receptor signaling pathways in the nervous system. *Curr Opin Neurobiol* 11, 287-96.
- Burden, S., and Yarden, Y. (1997). Neuregulins and their receptors: a versatile signaling module in organogenesis and oncogenesis. *Neuron* 18, 847-55.

- Busfield, S. J., Michnick, D. A., Chickering, T. W., Revett, T. L., Ma, J., Woolf, E. A., Comrack, C. A., Dussault, B. J., Woolf, J., Goodearl, A. D., and Gearing, D. P. (1997). Characterization of a neuregulin-related gene, Don-1, that is highly expressed in restricted regions of the cerebellum and hippocampus. *Mol Cell Biol* 17, 4007-14.
- Butler, J. E., and Kadonaga, J. T. (2002). The RNA polymerase II core promoter: a key component in the regulation of gene expression. *Genes Dev* 16, 2583-92.
- Calaora, V., Rogister, B., Bismuth, K., Murray, K., Brandt, H., Leprince, P., Marchionni, M., and Dubois-Dalcq, M. (2001). Neuregulin signaling regulates neural precursor growth and the generation of oligodendrocytes in vitro. *J Neurosci* 21, 4740-51.
- Cannella, B., Hoban, C. J., Gao, Y. L., Garcia-Arenas, R., Lawson, D., Marchionni, M., Gwynne, D., and Raine, C. S. (1998). The neuregulin, glial growth factor 2, diminishes autoimmune demyelination and enhances remyelination in a chronic relapsing model for multiple sclerosis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95, 10100-5.
- Cao, Y., and Karin, M. (2003). NF-kappaB in mammary gland development and breast cancer. *J Mammary Gland Biol Neoplasia* 8, 215-23.
- Carraway, K. L., 3rd. (1996). Involvement of the neuregulins and their receptors in cardiac and neural development. *Bioessays* 18, 263-6.
- Carraway, K. L., 3rd, Weber, J. L., Unger, M. J., Ledesma, J., Yu, N., Gassmann, M., and Lai, C. (1997). Neuregulin-2, a new ligand of ErbB3/ErbB4-receptor tyrosine kinases. *Nature* 387, 512-6.
- Carteron, C., Ferrer-Montiel, A., and Cabedo, H. (2006). Characterization of a neural-specific splicing form of the human neuregulin 3 gene involved in oligodendrocyte survival. *J Cell Sci* 119, 898-909.
- Cashman, N. R., Durham, H. D., Blusztajn, J. K., Oda, K., Tabira, T., Shaw, I. T., Dahrouge, S., and Antel, J. P. (1992). Neuroblastoma x spinal cord (NSC) hybrid cell lines resemble developing motor neurons. *Dev Dyn* 194, 209-21.
- Chang, H., Riese, D. J., 2nd, Gilbert, W., Stern, D. F., and McMahan, U. J. (1997). Ligands for ErbB-family receptors encoded by a neuregulin-like gene. *Nature* 387, 509-12.
- Chen, F., Castranova, V., and Shi, X. (2001). New insights into the role of nuclear factor-kappaB in cell growth regulation. *Am J Pathol* 159, 387-97.
- Citri, A., Skaria, K. B., and Yarden, Y. (2003). The deaf and the dumb: the biology of ErbB-2 and ErbB-3. *Exp Cell Res* 284, 54-65.
- Cogswell, P. C., Mayo, M. W., and Baldwin, A. S., Jr. (1997). Involvement of Egr-1/RelA synergy in distinguishing T cell activation from tumor necrosis factor-alpha-induced NF-kappa B1 transcription. *J Exp Med* 185, 491-7.
- Corfas, G., Roy, K., and Buxbaum, J. D. (2004). Neuregulin 1-erbB signaling and the molecular/cellular basis of schizophrenia. *Nat Neurosci* 7, 575-80.
- Corfas, G., Velardez, M. O., Ko, C. P., Ratner, N., and Peles, E. (2004). Mechanisms and roles of axon-Schwann cell interactions. *J Neurosci* 24, 9250-60.



- Coyle, J. T., Tsai, G., and Goff, D. (2003). Converging evidence of NMDA receptor hypofunction in the pathophysiology of schizophrenia. *Ann N Y Acad Sci* 1003, 318-27.
- Crone, S. A., and Lee, K. F. (2002). Gene targeting reveals multiple essential functions of the neuregulin signaling system during development of the neuroendocrine and nervous systems. *Ann N Y Acad Sci* 971, 547-53.
- Cuadrado, M., Sacristan, M., and Antequera, F. (2001). Species-specific organization of CpG island promoters at mammalian homologous genes. *EMBO Rep* 2, 586-92.
- Dammann, C. E., Nielsen, H. C., and Carraway, K. L., 3rd. (2003). Role of neuregulin-1 beta in the developing lung. *Am J Respir Crit Care Med* 167, 1711-6.
- Decker, E. L., Nehmann, N., Kampen, E., Eibel, H., Zipfel, P. F., and Skerka, C. (2003). Early growth response proteins (EGR) and nuclear factors of activated T cells (NFAT) form heterodimers and regulate proinflammatory cytokine gene expression. *Nucleic Acids Res* 31, 911-21.
- Dignam, J. D., Lebovitz, R. M., and Roeder, R. G. (1983). Accurate transcription initiation by RNA polymerase II in a soluble extract from isolated mammalian nuclei. *Nucleic Acids Res* 11, 1475-89.
- Du, Q., Melnikova, I. N., and Gardner, P. D. (1998). Differential effects of heterogeneous nuclear ribonucleoprotein K on Sp1- and Sp3-mediated transcriptional activation of a neuronal nicotinic acetylcholine receptor promoter. *J Biol Chem* 273, 19877-83.
- Dunn, M., Sinha, P., Campbell, R., Blackburn, E., Levinson, N., Rampaul, R., Bates, T., Humphreys, S., and Gullick, W. J. (2004). Co-expression of neuregulins 1, 2, 3 and 4 in human breast cancer. *J Pathol* 203, 672-80.
- Dynan, W. S., and Tjian, R. (1983). The promoter-specific transcription factor Sp1 binds to upstream sequences in the SV40 early promoter. *Cell* 35, 79-87.
- Erickson, S. L., O'Shea, K. S., Ghaboosi, N., Loverro, L., Frantz, G., Bauer, M., Lu, L. H., and Moore, M. W. (1997). ErbB3 is required for normal cerebellar and cardiac development: a comparison with ErbB2- and heregulin-deficient mice. *Development* 124, 4999-5011.
- Esper, R. M., Pankonin, M. S., and Loeb, J. A. (2006). Neuregulins: versatile growth and differentiation factors in nervous system development and human disease. *Brain Res Brain Res Rev* 51, 161-75.
- Falls, D. L., Rosen, K. M., Corfas, G., Lane, W. S., and Fischbach, G. D. (1993). ARIA, a protein that stimulates acetylcholine receptor synthesis, is a member of the neu ligand family. *Cell* 72, 801-15.
- Falls, D. L. (2003). Neuregulins and the neuromuscular system: 10 years of answers and questions. *J Neurocytol* 32, 619-47.
- Falls, D. L. (2003). Neuregulins: functions, forms, and signaling strategies. *Exp Cell Res* 284, 14-30.
- Fischbach, G. D., and Rosen, K. M. (1997). ARIA: a neuromuscular junction neuregulin. *Annu Rev Neurosci* 20, 429-58.

- Garcia-Bassets, I., Ortiz-Lombardia, M., Pagans, S., Romero, A., Canals, F., Avil s, F. X., and Azorin, F. (1999). The identification of nuclear proteins that bind the homopyrimidine strand of d(GA.TC)<sub>n</sub> DNA sequences, but not the homopurine strand. *Nucleic Acids Res* 27, 3267-75.
- Gardiner-Garden, M., and Frommer, M. (1987). CpG islands in vertebrate genomes. *J Mol Biol* 196, 261-82.
- Garratt, A. N. (2006). "To erb-B or not to erb-B..." Neuregulin-1/ErbB signaling in heart development and function. *J Mol Cell Cardiol* 41, 215-8.
- Gassmann, M., Casagrande, F., Orioli, D., Simon, H., Lai, C., Klein, R., and Lemke, G. (1995). Aberrant neural and cardiac development in mice lacking the ErbB4 neuregulin receptor. *Nature* 378, 390-4.
- Ghosh, S., May, M. J., and Kopp, E. B. (1998). NF-kappa B and Rel proteins: evolutionarily conserved mediators of immune responses. *Annu Rev Immunol* 16, 225-60.
- Gilmour, L. M., Macleod, K. G., McCaig, A., Sewell, J. M., Gullick, W. J., Smyth, J. F., and Langdon, S. P. (2002). Neuregulin expression, function, and signaling in human ovarian cancer cells. *Clin Cancer Res* 8, 3933-42.
- Gluzman, Y. (1981). SV40-transformed simian cells support the replication of early SV40 mutants. *Cell* 23, 175-82.
- Goldberg. (1979). Sequence analysis of Drosophila histone genes. Stanford University.
- Gollamudi, M., Nethery, D., Liu, J., and Kern, J. A. (2004). Autocrine activation of ErbB2/ErbB3 receptor complex by NRG-1 in non-small cell lung cancer cell lines. *Lung Cancer* 43, 135-43.
- Gonsior, S. M., Platz, S., Buchmeier, S., Scheer, U., Jockusch, B. M., and Hinssen, H. (1999). Conformational difference between nuclear and cytoplasmic actin as detected by a monoclonal antibody. *J Cell Sci* 112 ( Pt 6), 797-809.
- Grosschedl, R., and Birnstiel, M. L. (1980). Identification of regulatory sequences in the prelude sequences of an H2A histone gene by the study of specific deletion mutants in vivo. *Proc Natl Acad Sci U S A* 77, 1432-6.
- Hahn, C. G., Wang, H. Y., Cho, D. S., Talbot, K., Gur, R. E., Berrettini, W. H., Bakshi, K., Kamins, J., Borgmann-Winter, K. E., Siegel, S. J., Gallop, R. J., and Arnold, S. E. (2006). Altered neuregulin 1-erbB4 signaling contributes to NMDA receptor hypofunction in schizophrenia. *Nat Med* 12, 824-8.
- Han, B., and Fischbach, G. D. (1999). Processing of ARIA and release from isolated nerve terminals. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* 354, 411-6.
- Han, B., and Fischbach, G. D. (1999). The release of acetylcholine receptor inducing activity (ARIA) from its transmembrane precursor in transfected fibroblasts. *J Biol Chem* 274, 26407-15.
- Hansen, M. R., and Linthicum, F. H., Jr. (2004). Expression of neuregulin and activation of erbB receptors in vestibular schwannomas: possible autocrine loop stimulation. *Otol Neurotol* 25, 155-9.

- Hansen, M. R., Roehm, P. C., Chatterjee, P., and Green, S. H. (2006). Constitutive neuregulin-1/ErbB signaling contributes to human vestibular schwannoma proliferation. *Glia* 53, 593-600.
- Hapgood, J. P., Riedemann, J., and Scherer, S. D. (2001). Regulation of gene expression by GC-rich DNA cis-elements. *Cell Biol Int* 25, 17-31.
- Harari, D., Tzahar, E., Romano, J., Shelly, M., Pierce, J. H., Andrews, G. C., and Yarden, Y. (1999). Neuregulin-4: a novel growth factor that acts through the ErbB-4 receptor tyrosine kinase. *Oncogene* 18, 2681-9.
- Hartmann, D., de Strooper, B., Serneels, L., Craessaerts, K., Herreman, A., Annaert, W., Umans, L., Lubke, T., Lena Illert, A., von Figura, K., and Saftig, P. (2002). The disintegrin/metalloprotease ADAM 10 is essential for Notch signalling but not for alpha-secretase activity in fibroblasts. *Hum Mol Genet* 11, 2615-24.
- Higashiyama, S., Horikawa, M., Yamada, K., Ichino, N., Nakano, N., Nakagawa, T., Miyagawa, J., Matsushita, N., Nagatsu, T., Taniguchi, N., and Ishiguro, H. (1997). A novel brain-derived member of the epidermal growth factor family that interacts with ErbB3 and ErbB4. *J Biochem (Tokyo)* 122, 675-80.
- Ho, W. H., Armanini, M. P., Nuijens, A., Phillips, H. S., and Osheroff, P. L. (1995). Sensory and motor neuron-derived factor. A novel heregulin variant highly expressed in sensory and motor neurons. *J Biol Chem* 270, 26722.
- Holmes, W. E., Sliwkowski, M. X., Akita, R. W., Henzel, W. J., Lee, J., Park, J. W., Yansura, D., Abadi, N., Raab, H., Lewis, G. D., and et al. (1992). Identification of heregulin, a specific activator of p185erbB2. *Science* 256, 1205-10.
- Horiuchi, K., Zhou, H. M., Kelly, K., Manova, K., and Blobel, C. P. (2005). Evaluation of the contributions of ADAMs 9, 12, 15, 17, and 19 to heart development and ectodomain shedding of neuregulins beta1 and beta2. *Dev Biol* 283, 459-71.
- Howard, B., Panchal, H., McCarthy, A., and Ashworth, A. (2005). Identification of the scaramanga gene implicates Neuregulin3 in mammary gland specification. *Genes Dev* 19, 2078-90.
- Hsieh, T. Y., Matsumoto, M., Chou, H. C., Schneider, R., Hwang, S. B., Lee, A. S., and Lai, M. M. (1998). Hepatitis C virus core protein interacts with heterogeneous nuclear ribonucleoprotein K. *J Biol Chem* 273, 17651-9.
- Jackson, L. F., Qiu, T. H., Sunnarborg, S. W., Chang, A., Zhang, C., Patterson, C., and Lee, D. C. (2003). Defective valvulogenesis in HB-EGF and TACE-null mice is associated with aberrant BMP signaling. *Embo J* 22, 2704-16.
- Javahery, R., Khachi, A., Lo, K., Zenzie-Gregory, B., and Smale, S. T. (1994). DNA sequence requirements for transcriptional initiator activity in mammalian cells. *Mol Cell Biol* 14, 116-27.
- Junier, M. P., Legendre, P., Esguerra, C. V., Tinel, M., Couplier, M., Dreyfus, P. A., and Bahr, M. (1998). Regulation of growth factor gene expression in degenerating motoneurons of the murine mutant wobbler: a cellular patch-sampling/RT-PCR study. *Mol Cell Neurosci* 12, 168-77.

- Kadonaga, J. T., Carner, K. R., Masiarz, F. R., and Tjian, R. (1987). Isolation of cDNA encoding transcription factor Sp1 and functional analysis of the DNA binding domain. *Cell* 51, 1079-90.
- Kadonaga, J. T. (2004). Regulation of RNA polymerase II transcription by sequence-specific DNA binding factors. *Cell* 116, 247-57.
- Kaltschmidt, B., Widera, D., and Kaltschmidt, C. (2005). Signaling via NF-kappaB in the nervous system. *Biochim Biophys Acta* 1745, 287-99.
- Kastning, K. (2000). Expression des Neuregulin-1-Gens und der ErbB-Rezeptoren in etablierten Zelllinien und im Mausmodell für neurodegenerative Erkrankungen. Bielefeld.
- Keates, A. C., Keates, S., Kwon, J. H., Arseneau, K. O., Law, D. J., Bai, L., Merchant, J. L., Wang, T. C., and Kelly, C. P. (2001). ZBP-89, Sp1, and nuclear factor-kappa B regulate epithelial neutrophil-activating peptide-78 gene expression in Caco-2 human colonic epithelial cells. *J Biol Chem* 276, 43713-22.
- Kramer, R., Bucay, N., Kane, D. J., Martin, L. E., Tarpley, J. E., and Theill, L. E. (1996). Neuregulins with an Ig-like domain are essential for mouse myocardial and neuronal development. *Proc Natl Acad Sci U S A* 93, 4833-8.
- Kunsch, C., Ruben, S. M., and Rosen, C. A. (1992). Selection of optimal kappa B/Rel DNA-binding motifs: interaction of both subunits of NF-kappa B with DNA is required for transcriptional activation. *Mol Cell Biol* 12, 4412-21.
- Kurohara, K., Komatsu, K., Kurisaki, T., Masuda, A., Irie, N., Asano, M., Sudo, K., Nabeshima, Y., Iwakura, Y., and Sehara-Fujisawa, A. (2004). Essential roles of Meltrin beta (ADAM19) in heart development. *Dev Biol* 267, 14-28.
- Laemmli, U. K. (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227, 680-5.
- Latchman, D. S. (1990). Eukaryotic transcription factors. *Biochem J* 270, 281-9.
- Latchman, D. S. (1997). Transcription factors: an overview. *Int J Biochem Cell Biol* 29, 1305-12.
- Law, G. L., Itoh, H., Law, D. J., Mize, G. J., Merchant, J. L., and Morris, D. R. (1998). Transcription factor ZBP-89 regulates the activity of the ornithine decarboxylase promoter. *J Biol Chem* 273, 19955-64.
- Law, A. J., Shannon Weickert, C., Hyde, T. M., Kleinman, J. E., and Harrison, P. J. (2004). Neuregulin-1 (NRG-1) mRNA and protein in the adult human brain. *Neuroscience* 127, 125-36.
- Lee, K. F., Simon, H., Chen, H., Bates, B., Hung, M. C., and Hauser, C. (1995). Requirement for neuregulin receptor erbB2 in neural and cardiac development. *Nature* 378, 394-8.
- Lemke, G. (1993). Developmental neurobiology. Recitative and aria. *Nature* 362, 291-2.
- Lemke, G. (1996). Neuregulins in development. *Mol Cell Neurosci* 7, 247-62.
- Lemon, B., and Tjian, R. (2000). Orchestrated response: a symphony of transcription factors for gene control. *Genes Dev* 14, 2551-69.

- Levine, M., and Tjian, R. (2003). Transcription regulation and animal diversity. *Nature* 424, 147-51.
- Li, L., Cleary, S., Mandarano, M. A., Long, W., Birchmeier, C., and Jones, F. E. (2002). The breast proto-oncogene, HRGalpha regulates epithelial proliferation and lobuloalveolar development in the mouse mammary gland. *Oncogene* 21, 4900-7.
- Li, X., and Stark, G. R. (2002). NFkappaB-dependent signaling pathways. *Exp Hematol* 30, 285-96.
- Li, Q., Ahmed, S., and Loeb, J. A. (2004). Development of an autocrine neuregulin signaling loop with malignant transformation of human breast epithelial cells. *Cancer Res* 64, 7078-85.
- Liu, X., Hwang, H., Cao, L., Buckland, M., Cunningham, A., Chen, J., Chien, K. R., Graham, R. M., and Zhou, M. (1998). Domain-specific gene disruption reveals critical regulation of neuregulin signaling by its cytoplasmic tail. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95, 13024-9.
- Liu, X., Hwang, H., Cao, L., Wen, D., Liu, N., Graham, R. M., and Zhou, M. (1998). Release of the neuregulin functional polypeptide requires its cytoplasmic tail. *J Biol Chem* 273, 34335-40.
- Liu, X., Gu, X., Li, Z., Li, X., Li, H., Chang, J., Chen, P., Jin, J., Xi, B., Chen, D., Lai, D., Graham, R. M., and Zhou, M. (2006). Neuregulin-1/erbB-activation improves cardiac function and survival in models of ischemic, dilated, and viral cardiomyopathy. *J Am Coll Cardiol* 48, 1438-47.
- Loeb, J. A., Susanto, E. T., and Fischbach, G. D. (1998). The neuregulin precursor proARIA is processed to ARIA after expression on the cell surface by a protein kinase C-enhanced mechanism. *Mol Cell Neurosci* 11, 77-91.
- Longart, M., Liu, Y., Karavanova, I., and Buonanno, A. (2004). Neuregulin-2 is developmentally regulated and targeted to dendrites of central neurons. *J Comp Neurol* 472, 156-72.
- Marchionni, M. A., Goodearl, A. D., Chen, M. S., Bermingham-McDonogh, O., Kirk, C., Hendricks, M., Danehy, F., Misumi, D., Sudhalter, J., Kobayashi, K., and et al. (1993). Glial growth factors are alternatively spliced erbB2 ligands expressed in the nervous system. *Nature* 362, 312-8.
- Marin, M., Karis, A., Visser, P., Grosveld, F., and Philipsen, S. (1997). Transcription factor Sp1 is essential for early embryonic development but dispensable for cell growth and differentiation. *Cell* 89, 619-28.
- Mattson, M. P., Culmsee, C., Yu, Z., and Camandola, S. (2000). Roles of nuclear factor kappaB in neuronal survival and plasticity. *J Neurochem* 74, 443-56.
- Matunis, M. J., Michael, W. M., and Dreyfuss, G. (1992). Characterization and primary structure of the poly(C)-binding heterogeneous nuclear ribonucleoprotein complex K protein. *Mol Cell Biol* 12, 164-71.
- Merchant, J. L., Iyer, G. R., Taylor, B. R., Kitchen, J. R., Mortensen, E. R., Wang, Z., Flintoft, R. J., Michel, J. B., and Bassel-Duby, R. (1996). ZBP-89, a Kruppel-like zinc finger protein, inhibits epidermal growth factor induction of the gastrin promoter. *Mol Cell Biol* 16, 6644-53.

- Meyer, D., and Birchmeier, C. (1994). Distinct isoforms of neuregulin are expressed in mesenchymal and neuronal cells during mouse development. *Proc Natl Acad Sci U S A* 91, 1064-8.
- Meyer, D., and Birchmeier, C. (1995). Multiple essential functions of neuregulin in development. *Nature* 378, 386-90.
- Meyer, D., Yamaai, T., Garratt, A., Riethmacher-Sonnenberg, E., Kane, D., Theill, L. E., and Birchmeier, C. (1997). Isoform-specific expression and function of neuregulin. *Development* 124, 3575-86.
- Michelotti, E. F., Michelotti, G. A., Aronsohn, A. I., and Levens, D. (1996). Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein K is a transcription factor. *Mol Cell Biol* 16, 2350-60.
- Moghaddam, B. (2003). Bringing order to the glutamate chaos in schizophrenia. *Neuron* 40, 881-4.
- Molina, M. A., Codony-Servat, J., Albanell, J., Rojo, F., Arribas, J., and Baselga, J. (2001). Trastuzumab (herceptin), a humanized anti-Her2 receptor monoclonal antibody, inhibits basal and activated Her2 ectodomain cleavage in breast cancer cells. *Cancer Res* 61, 4744-9.
- Montero, J. C., Yuste, L., Diaz-Rodriguez, E., Esparis-Ogando, A., and Pandiella, A. (2000). Differential shedding of transmembrane neuregulin isoforms by the tumor necrosis factor-alpha-converting enzyme. *Mol Cell Neurosci* 16, 631-48.
- Montero, J. C., Yuste, L., Diaz-Rodriguez, E., Esparis-Ogando, A., and Pandiella, A. (2002). Mitogen-activated protein kinase-dependent and -independent routes control shedding of transmembrane growth factors through multiple secretases. *Biochem J* 363, 211-21.
- Morris, J. K., Lin, W., Hauser, C., Marchuk, Y., Getman, D., and Lee, K. F. (1999). Rescue of the cardiac defect in ErbB2 mutant mice reveals essential roles of ErbB2 in peripheral nervous system development. *Neuron* 23, 273-83.
- Navolanic, P. M., Steelman, L. S., and McCubrey, J. A. (2003). EGFR family signaling and its association with breast cancer development and resistance to chemotherapy (Review). *Int J Oncol* 22, 237-52.
- Novak, U. (2004). ADAM proteins in the brain. *J Clin Neurosci* 11, 227-35.
- Novina, C. D., and Roy, A. L. (1996). Core promoters and transcriptional control. *Trends Genet* 12, 351-5.
- O'Neill, L. A., and Kaltschmidt, C. (1997). NF-kappa B: a crucial transcription factor for glial and neuronal cell function. *Trends Neurosci* 20, 252-8.
- Ogbourne, S., and Antalis, T. M. (1998). Transcriptional control and the role of silencers in transcriptional regulation in eukaryotes. *Biochem J* 331 ( Pt 1), 1-14.
- Olmsted, J. B., Carlson, K., Klebe, R., Ruddle, F., and Rosenbaum, J. (1970). Isolation of microtubule protein from cultured mouse neuroblastoma cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 65, 129-36.

- Orphanides, G., and Reinberg, D. (2002). A unified theory of gene expression. *Cell* 108, 439-51.
- Orr-Urtreger, A., Trakhtenbrot, L., Ben-Levy, R., Wen, D., Rechavi, G., Lonai, P., and Yarden, Y. (1993). Neural expression and chromosomal mapping of Neu differentiation factor to 8p12-p21. *Proc Natl Acad Sci U S A* 90, 1867-71.
- Ozaki, M., Sasner, M., Yano, R., Lu, H. S., and Buonanno, A. (1997). Neuregulin-beta induces expression of an NMDA-receptor subunit. *Nature* 390, 691-4.
- Ozaki, M., Tohyama, K., Kishida, H., Buonanno, A., Yano, R., and Hashikawa, T. (2000). Roles of neuregulin in synaptogenesis between mossy fibers and cerebellar granule cells. *J Neurosci Res* 59, 612-23.
- Ozaki, M. (2002). Analysis of patterned neuronal impulses and function of neuregulin. *Neurosignals* 11, 191-6.
- Parry, G. C., and Mackman, N. (1994). A set of inducible genes expressed by activated human monocytic and endothelial cells contain kappa B-like sites that specifically bind c-Rel-p65 heterodimers. *J Biol Chem* 269, 20823-5.
- Pelham, H. R., and Bienz, M. (1982). A synthetic heat-shock promoter element confers heat-inducibility on the herpes simplex virus thymidine kinase gene. *Embo J* 1, 1473-7.
- Pennacchio, L. A., and Rubin, E. M. (2001). Genomic strategies to identify mammalian regulatory sequences. *Nat Rev Genet* 2, 100-9.
- Petersen, C. A., Krumholz, K. A., Carmen, J., Sinai, A. P., and Burleigh, B. A. (2006). Trypanosoma cruzi infection and nuclear factor kappa B activation prevent apoptosis in cardiac cells. *Infect Immun* 74, 1580-7.
- Philipsen, S., and Suske, G. (1999). A tale of three fingers: the family of mammalian Sp/XKLF transcription factors. *Nucleic Acids Res* 27, 2991-3000.
- Puck, T. T. (1958). Growth and genetics in somatic mammalian cells in vitro. *J Cell Physiol Suppl* 52, 287-302; discussion 302-11.
- Pugatsch, T., Abedat, S., Lotan, C., and Beerli, R. (2006). Anti-erbB2 treatment induces cardiotoxicity by interfering with cell survival pathways. *Breast Cancer Res* 8, R35.
- Reizis, B., and Leder, P. (1999). Expression of the mouse pre-T cell receptor alpha gene is controlled by an upstream region containing a transcriptional enhancer. *J Exp Med* 189, 1669-78.
- Remenyi, A., Scholer, H. R., and Wilmanns, M. (2004). Combinatorial control of gene expression. *Nat Struct Mol Biol* 11, 812-5.
- Rio, C., Buxbaum, J. D., Peschon, J. J., and Corfas, G. (2000). Tumor necrosis factor-alpha-converting enzyme is required for cleavage of erbB4/HER4. *J Biol Chem* 275, 10379-87.
- Ritchie, S. A., Pasha, M. K., Batten, D. J., Sharma, R. K., Olson, D. J., Ross, A. R., and Bonham, K. (2003). Identification of the SRC pyrimidine-binding protein (SPy) as hnRNP K: implications in the regulation of SRC1A transcription. *Nucleic Acids Res* 31, 1502-13.

- Ross, C. A., Margolis, R. L., Reading, S. A., Pletnikov, M., and Coyle, J. T. (2006). Neurobiology of schizophrenia. *Neuron* 52, 139-53.
- Saffer, J. D., Jackson, S. P., and Annarella, M. B. (1991). Developmental expression of Sp1 in the mouse. *Mol Cell Biol* 11, 2189-99.
- Sakai, H., Jinawath, A., Yamaoka, S., and Yuasa, Y. (2005). Upregulation of MUC6 mucin gene expression by NFkappaB and Sp factors. *Biochem Biophys Res Commun* 333, 1254-60.
- Sanderson, M. P., Dempsey, P. J., and Dunbar, A. J. (2006). Control of ErbB signaling through metalloprotease mediated ectodomain shedding of EGF-like factors. *Growth Factors* 24, 121-36.
- Schaeffer, L., de Kerchove d'Exaerde, A., and Changeux, J. P. (2001). Targeting transcription to the neuromuscular synapse. *Neuron* 31, 15-22.
- Schneider, J. W., Chang, A. Y., and Rocco, T. P. (2001). Cardiotoxicity in signal transduction therapeutics: erbB2 antibodies and the heart. *Semin Oncol* 28, 18-26.
- Schneider, J. W., Chang, A. Y., and Garratt, A. (2002). Trastuzumab cardiotoxicity: Speculations regarding pathophysiology and targets for further study. *Semin Oncol* 29, 22-8.
- Schroering, A., and Carey, D. J. (1998). Sensory and motor neuron-derived factor is a transmembrane heregulin that is expressed on the plasma membrane with the active domain exposed to the extracellular environment. *J Biol Chem* 273, 30643-50.
- Sen, R., and Baltimore, D. (1986). Multiple nuclear factors interact with the immunoglobulin enhancer sequences. *Cell* 46, 705-16.
- Sen, R., and Baltimore, D. (1986). Inducibility of kappa immunoglobulin enhancer-binding protein Nf-kappa B by a posttranslational mechanism. *Cell* 47, 921-8.
- Shav-Tal, Y., and Zipori, D. (2002). PSF and p54(nrb)/NonO--multi-functional nuclear proteins. *FEBS Lett* 531, 109-14.
- Shirakabe, K., Wakatsuki, S., Kurisaki, T., and Fujisawa-Sehara, A. (2001). Roles of Meltrin beta /ADAM19 in the processing of neuregulin. *J Biol Chem* 276, 9352-8.
- Smale, S. T. (1997). Transcription initiation from TATA-less promoters within eukaryotic protein-coding genes. *Biochim Biophys Acta* 1351, 73-88.
- Smale, S. T., and Kadonaga, J. T. (2003). The RNA polymerase II core promoter. *Annu Rev Biochem* 72, 449-79.
- Sogaard-Andersen, L., and Valentin-Hansen, P. (1993). Protein-protein interactions in gene regulation: the cAMP-CRP complex sets the specificity of a second DNA-binding protein, the CytR repressor. *Cell* 75, 557-66.
- Sovak, M. A., Bellas, R. E., Kim, D. W., Zanieski, G. J., Rogers, A. E., Traish, A. M., and Sonenshein, G. E. (1997). Aberrant nuclear factor-kappaB/Rel expression and the pathogenesis of breast cancer. *J Clin Invest* 100, 2952-60.



- Söker, T. (2004). Untersuchung der Transkriptions-Regulation von Neuregulin1 Typ III-Isoformen. In "Entwicklungsbiologie". Bielefeld.
- Stefansson, H., Sigurdsson, E., Steinthorsdottir, V., Bjornsdottir, S., Sigmundsson, T., Ghosh, S., Brynjolfsson, J., Gunnarsdottir, S., Ivarsson, O., Chou, T. T., Hjaltason, O., Birgisdottir, B., Jonsson, H., Gudnadottir, V. G., Gudmundsdottir, E., Bjornsson, A., Ingvarsson, B., Ingason, A., Sigfusson, S., Hardardottir, H., Harvey, R. P., Lai, D., Zhou, M., Brunner, D., Mutel, V., Gonzalo, A., Lemke, G., Sainz, J., Johannesson, G., Andresson, T., Gudbjartsson, D., Manolescu, A., Frigge, M. L., Gurney, M. E., Kong, A., Gulcher, J. R., Petursson, H., and Stefansson, K. (2002). Neuregulin 1 and susceptibility to schizophrenia. *Am J Hum Genet* 71, 877-92.
- Stefansson, H., Steinthorsdottir, V., Thorgeirsson, T. E., Gulcher, J. R., and Stefansson, K. (2004). Neuregulin 1 and schizophrenia. *Ann Med* 36, 62-71.
- Steinthorsdottir, V., Stefansson, H., Ghosh, S., Birgisdottir, B., Bjornsdottir, S., Fasquel, A. C., Olafsson, O., Stefansson, K., and Gulcher, J. R. (2004). Multiple novel transcription initiation sites for NRG1. *Gene* 342, 97-105.
- Stove, C., and Bracke, M. (2004). Roles for neuregulins in human cancer. *Clin Exp Metastasis* 21, 665-84.
- Suzuki, Y., Tsunoda, T., Sese, J., Taira, H., Mizushima-Sugano, J., Hata, H., Ota, T., Isogai, T., Tanaka, T., Nakamura, Y., Suyama, A., Sakaki, Y., Morishita, S., Okubo, K., and Sugano, S. (2001). Identification and characterization of the potential promoter regions of 1031 kinds of human genes. *Genome Res* 11, 677-84.
- Talukder, A. H., Jorgensen, H. F., Mandal, M., Mishra, S. K., Vadlamudi, R. K., Clark, B. F., Mendelsohn, J., and Kumar, R. (2001). Regulation of elongation factor-1alpha expression by growth factors and anti-receptor blocking antibodies. *J Biol Chem* 276, 5636-42.
- ter Laak, M. P., Hamers, F. P., Kirk, C. J., and Gispen, W. H. (2000). rhGGF2 protects against cisplatin-induced neuropathy in the rat. *J Neurosci Res* 60, 237-44.
- Troyer, K. L., and Lee, D. C. (2001). Regulation of mouse mammary gland development and tumorigenesis by the ERBB signaling network. *J Mammary Gland Biol Neoplasia* 6, 7-21.
- Tsai, M. S., Shamon-Taylor, L. A., Mehmi, I., Tang, C. K., and Lupu, R. (2003). Blockage of heregulin expression inhibits tumorigenicity and metastasis of breast cancer. *Oncogene* 22, 761-8.
- Tsai, P. W., Shiah, S. G., Lin, M. T., Wu, C. W., and Kuo, M. L. (2003). Up-regulation of vascular endothelial growth factor C in breast cancer cells by heregulin-beta 1. A critical role of p38/nuclear factor-kappa B signaling pathway. *J Biol Chem* 278, 5750-9.
- Tupler, R., Perini, G., and Green, M. R. (2001). Expressing the human genome. *Nature* 409, 832-3.
- Urban, R. J., Bodenbun, Y., Kurosky, A., Wood, T. G., and Gasic, S. (2000). Polypyrimidine tract-binding protein-associated splicing factor is a negative regulator of transcriptional activity of the porcine p450scc insulin-like growth factor response element. *Mol Endocrinol* 14, 774-82.

- Valen, G., Yan, Z. Q., and Hansson, G. K. (2001). Nuclear factor kappa-B and the heart. *J Am Coll Cardiol* 38, 307-14.
- Valen, G. (2004). Signal transduction through nuclear factor kappa B in ischemia-reperfusion and heart failure. *Basic Res Cardiol* 99, 1-7.
- Vartanian, T., Fischbach, G., and Miller, R. (1999). Failure of spinal cord oligodendrocyte development in mice lacking neuregulin. *Proc Natl Acad Sci U S A* 96, 731-5.
- Venkateswarlu, S., Dawson, D. M., St Clair, P., Gupta, A., Willson, J. K., and Brattain, M. G. (2002). Autocrine heregulin generates growth factor independence and blocks apoptosis in colon cancer cells. *Oncogene* 21, 78-86.
- Viehover, A., Miller, R. H., Park, S. K., Fischbach, G., and Vartanian, T. (2001). Neuregulin: an oligodendrocyte growth factor absent in active multiple sclerosis lesions. *Dev Neurosci* 23, 377-86.
- Villard, J. (2004). Transcription regulation and human diseases. *Swiss Med Wkly* 134, 571-9.
- Wang, J. Y., Frenzel, K. E., Wen, D., and Falls, D. L. (1998). Transmembrane neuregulins interact with LIM kinase 1, a cytoplasmic protein kinase implicated in development of visuospatial cognition. *J Biol Chem* 273, 20525-34.
- Wang, J. Y., Miller, S. J., and Falls, D. L. (2001). The N-terminal region of neuregulin isoforms determines the accumulation of cell surface and released neuregulin ectodomain. *J Biol Chem* 276, 2841-51.
- Wang, T., Lafuse, W. P., and Zwilling, B. S. (2001). NFkappaB and Sp1 elements are necessary for maximal transcription of toll-like receptor 2 induced by Mycobacterium avium. *J Immunol* 167, 6924-32.
- Wen, D., Peles, E., Cupples, R., Suggs, S. V., Bacus, S. S., Luo, Y., Trail, G., Hu, S., Silbiger, S. M., Levy, R. B., and et al. (1992). Neu differentiation factor: a transmembrane glycoprotein containing an EGF domain and an immunoglobulin homology unit. *Cell* 69, 559-72.
- Wen, D., Suggs, S. V., Karunakaran, D., Liu, N., Cupples, R. L., Luo, Y., Janssen, A. M., Ben-Baruch, N., Trollinger, D. B., Jacobsen, V. L., and et al. (1994). Structural and functional aspects of the multiplicity of Neu differentiation factors. *Mol Cell Biol* 14, 1909-19.
- Westphal, M., Meima, L., Szonyi, E., Lofgren, J., Meissner, H., Hamel, W., Nikolics, K., and Sliwkowski, M. X. (1997). Heregulins and the ErbB-2/3/4 receptors in gliomas. *J Neurooncol* 35, 335-46.
- Wiedemann, P., Giehl, K., Almo, S. C., Fedorov, A. A., Girvin, M., Steinberger, P., Rudiger, M., Ortner, M., Sippl, M., Dolecek, C., Kraft, D., Jockusch, B., and Valenta, R. (1996). Molecular and structural analysis of a continuous birch profilin epitope defined by a monoclonal antibody. *J Biol Chem* 271, 29915-21.
- Willem, M., Garratt, A. N., Novak, B., Citron, M., Kaufmann, S., Rittger, A., DeStrooper, B., Saftig, P., Birchmeier, C., and Haass, C. (2006). Control of peripheral nerve myelination by the beta-secretase BACE1. *Science* 314, 664-6.

- Willy, P. J., Kobayashi, R., and Kadonaga, J. T. (2000). A basal transcription factor that activates or represses transcription. *Science* 290, 982-5.
- Woldeyesus, M. T., Britsch, S., Riethmacher, D., Xu, L., Sonnenberg-Riethmacher, E., Abou-Rebyeh, F., Harvey, R., Caroni, P., and Birchmeier, C. (1999). Peripheral nervous system defects in erbB2 mutants following genetic rescue of heart development. *Genes Dev* 13, 2538-48.
- Wolpowitz, D., Mason, T. B., Dietrich, P., Mendelsohn, M., Talmage, D. A., and Role, L. W. (2000). Cysteine-rich domain isoforms of the neuregulin-1 gene are required for maintenance of peripheral synapses. *Neuron* 25, 79-91.
- Wray, G. A., Hahn, M. W., Abouheif, E., Balhoff, J. P., Pizer, M., Rockman, M. V., and Romano, L. A. (2003). The evolution of transcriptional regulation in eukaryotes. *Mol Biol Evol* 20, 1377-419.
- Xu, Z., Ford, G. D., Crosland, D. R., Jiang, J., Gates, A., Allen, R., and Ford, B. D. (2005). Neuroprotection by neuregulin-1 following focal stroke is associated with the attenuation of ischemia-induced pro-inflammatory and stress gene expression. *Neurobiol Dis* 19, 461-70.
- Yamada, K., Ichino, N., Nishii, K., Sawada, H., Higashiyama, S., Ishiguro, H., and Nagatsu, T. (2000). Characterization of the human NTAK gene structure and distribution of the isoforms for rat NTAK mRNA. *Gene* 255, 15-24.
- Yang, Y., Spitzer, E., Meyer, D., Sachs, M., Niemann, C., Hartmann, G., Weidner, K. M., Birchmeier, C., and Birchmeier, W. (1995). Sequential requirement of hepatocyte growth factor and neuregulin in the morphogenesis and differentiation of the mammary gland. *J Cell Biol* 131, 215-26.
- Yang, X., Kuo, Y., Devay, P., Yu, C., and Role, L. (1998). A cysteine-rich isoform of neuregulin controls the level of expression of neuronal nicotinic receptor channels during synaptogenesis. *Neuron* 20, 255-70.
- Yang, V. W. (1998). Eukaryotic transcription factors: identification, characterization and functions. *J Nutr* 128, 2045-51.
- Yang, J. F., Zhou, H., Choi, R. C., Ip, N. Y., Peng, H. B., and Tsim, K. W. (1999). A cysteine-rich form of *Xenopus* neuregulin induces the expression of acetylcholine receptors in cultured myotubes. *Mol Cell Neurosci* 13, 415-29.
- Yarden, Y., and Sliwkowski, M. X. (2001). Untangling the ErbB signalling network. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2, 127-37.
- Ye, S., Whatling, C., Watkins, H., and Henney, A. (1999). Human stromelysin gene promoter activity is modulated by transcription factor ZBP-89. *FEBS Lett* 450, 268-72.
- Zhang, D., Sliwkowski, M. X., Mark, M., Frantz, G., Akita, R., Sun, Y., Hillan, K., Crowley, C., Brush, J., and Godowski, P. J. (1997). Neuregulin-3 (NRG3): a novel neural tissue-enriched protein that binds and activates ErbB4. *Proc Natl Acad Sci U S A* 94, 9562-7.
- Zhang, X., Diab, I. H., and Zehner, Z. E. (2003). ZBP-89 represses vimentin gene transcription by interacting with the transcriptional activator, Sp1. *Nucleic Acids Res* 31, 2900-14.

Zhou, H. M., Weskamp, G., Chesneau, V., Sahin, U., Vortkamp, A., Horiuchi, K., Chiusaroli, R., Hahn, R., Wilkes, D., Fisher, P., Baron, R., Manova, K., Basson, C. T., Hempstead, B., and Blobel, C. P. (2004). Essential role for ADAM19 in cardiovascular morphogenesis. *Mol Cell Biol* 24, 96-104.

## 7 Anhang

### 7.1 Sequenz der Neuregulin-1 Typ I-Promotorregion

Dargestellt ist die genomische Sequenz der Maus upstream vom Nrg-1-Exon2, dem ersten Exon von Typ I-Isoformen. Die Primer für die Klonierung der Promotor-Reporterkonstrukte, die Transkriptionsstartpunkte und das Exon2 sind angegeben:

TTTCAGC**GGCTTGCTGCCGCTCACT**CCTAGCTGGCTGAGCAGTGGCCCT  
 CCTGGGAAAGTGGAGTTATTCCAGCCGGCTCTGGGGCCACTTTCCCTTCA  
 CTCTGAATGGCCAGGCCGGCTGCAGTGCCTTTTACAGAGTCATAATCTT  
 TCCTGGGGTTCTGCTGTTTGGCACAAATACCACACTATGTGGTATTTGCT  
 GGAAAGCTATCAAAGGTGTCTGGACACTAAAGGTTTAAAGATAAAGAATG  
 ATGCTAGTACTGTTGAGCTATCTTAACAATTGCACCTATCTTACAGAGTT  
 TGATTCTTAATCCAACGAAAATTAAGTAGGATGGAAGCGATTCTTAAGA  
 CGATTTAAATGAACATCTTTGCCCGTTTTCCCTTCCCACCCATGTGTG  
 ACAGGTGACTCTGGATTTACCTTTGTTTAAATCGTGGCAGCCAGAGAA  
 CACAGGGAAAGCTGTGGACAGCCACGGGTCTGTTAGTATTAACTCCAGGA  
 AGCGAAAAGGAAGGAGCCAAATCACTCTGAAAGTGGGATAGCTGTAGAAT  
 AT**TGATCGTTGGTGCAGCTGT**TTCTCGACCACAACCTCTATACCATCAGT  
 AAAAGAGCAGGCTAAGTTGGCCACAACCTGTGTGTGTGTTGATGACAGCAT  
 CTGTCTCTATGTGGAGACCATTGTGAATCACTCCTTGGTGCAGATCACTC  
 TGGTCTCTGACTATTCCCTTAGAGTTCTCCACCTGGATCCAGGAACGCTAG  
 GATTCAGTCAATTTCTCAGAAAGTCTAATGGGTGTGGGAGGGGGCTGGT  
 ATTACTGAACTAAGGGTCTGCACTACAGTTCTACGGCCCCAACCCCCCCC  
 CCCCCCGCGCATCTGACTTGTACCCATCCACACCCGTAGACATGTTACTC  
 TCTATGGTGAAGTGTGGCTCCTCAGTTCTTTTAAACTTAAGCTGTAGTA  
 AGAGATACGTGTGCTTGGGAAGAAGCTAGAGTATTTTTTTTAAATGGAGAT  
 GGGAAATCCAACAGTCACTGCTATTT**AGCACGGGAAGGCAGACACA**TGCTC  
 AAGTGGCAGATGTACGAAGTGAAGTGTCCATGCTTGAAGTTCACAGAA  
 CCCTTCCCTGGGTACCTCAAATTCCTTCCACTCCAG**GCTGCACCTTCGCT**  
**CTTAGT**GCCAGAGGGAAACTTCCCTAAAGCAAGAGAGAAATGAACTCTGA  
 ACCCTTCTGGGAAATAGCAACT**TGTTCCCTTCCCCCTCACC**GGGGCTCCAGG  
 TCTCCAGAGCTTTCATTATGGGGCAGGTGCTACGGTTGCAAAGTTTTCTC  
 CATCCCTCCCCCGCC**CCAACACACACACACACA**CACACACACACACG  
 CGCGCGCGCGCGCGCGAGCAGCCCCCTACCGCCCCCCCCCTTT**TTC**  
**AAGGCTTGGATCAGC**CCCCGAGCCTGCCAGGGACTGCGAGCACCAGGGTC  
 GCCTTCCCTGCCTTCCCTGGCCTCTCCAGACTGCTCTGTTCTGTCCCGCGC  
 GGCTGCGACTTTGTGAGCGA**AGCTTCCAGCGACCCCTGTC**GGGAGTTCCC  
 GGCAGCCGCTGGGCTCCGCCGCCCTAGGCTGGCCCAGCTGCCAGAAGAA  
 AGGGGCTGAGCCGTGATCGCCAGCTCAGGCTCCTCCCGGTGGCGTGTCT  
 GCGCCTCGGGGTGGGGGTGTGGTGGGGAAAGAGGGAGGGGGCGAGGCGAG  
 GGGGAGGGTGCAGAGGAGGCGCCTGCGTCCAACCTGCGGGC**AATTGA**AAAA  
 AGAGCCGGCTAGGACTTCCCC**AAA**ACTTGTGGAACTCCGGGCGCGCCG  
 GCAGCAGGAGCGGAACGCAGCGCAGCGGGCGGCAGCTGCCGGGAGATGCCA  
 GCATAGACCGGACTGTGAGCACCTTTCCCTCTTCGGGCTGTAAGGGAGCG  
 AGACAGCCACCGGAGCGAGGCCACTCCAGAGCCGGCAGCGGCAGGACCCG  
 GGACACAAGAGTAGCCCCGAGACACCCCCAGACGTAGCGGGCGCTCCAGG  
 TGATCGAGTCCACGCCGCTCCCTGCAGGCGACAGGCGACGCCCCCGCGCA  
 GCCCGGCC**ACTGGCTCTTCCCTCCCGG**GACAAACTTTTCTGCAAGCCCTT  
 GGACAAACTTGTGCGCGCTCACCGTCGCCAGCCGCGGGTCCGCGTAGAGC  
 GCTCATCTTTAGCGAG**ATGTCTGAGCGCAAAGAGGCAGAGGCAAGGGGA**  
**AGGGCAAGAAGAAGGACCGGGGATCCCGCGGGAAGCCCGCGCCCGCGAA**  
**GGCGACCCGAGCCAG**GTGAGTGCCAGCCGCTCCGCTGCTCCCAGGCGGG

NrgP-4for

NrgP-3for

NrgP-2for

NrgP-dfor

NrgP-cfor

NrgP-bfor

NrgP-afor

NrgP-1for

Transkriptionsstartpunkte

NrgP-rev

Exon2

## 7.2 Abkürzungsverzeichnis

°C	Grad Celsius
µg	Mikrogramm
µl	Mikroliter
µm	Mikrometer
A	Adenin
Abb.	Abbildung
ADAM	engl. <i>a disintegrin and metalloprotease</i>
ARIA	engl. <i>acetylcholin receptor inducing activity</i>
ATP	Adenosintriphosphat
bp	Basenpaar
BRE	engl. <i>TFIIB recognition element</i>
BSA	engl. <i>bovin serum albumin</i>
C	Cytosin
ca.	zirka
cDNA	engl. <i>copy desoxyribonucleic acid</i>
cm	Zentimeter
CNS	engl. <i>conserved noncoding sequence</i>
CpG	CG-Dinukleotid
CRD	engl. <i>cysteine-rich domain</i>
DEPC	Diethylpyrocarbonat
DMEM	engl. <i>Dulbecco's Modified Eagle Medium</i>
DNA	engl. <i>desoxyribonucleic acid</i>
DPE	engl. <i>downstream promoter element</i>
Don-1	engl. <i>divergent of neuregulin-1</i>
E.coli	Escherichia coli
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
EGF	engl. <i>epidermal growth factor</i>
Egr-1	engl. <i>early growth response-1</i>
Ets	engl. <i>E twenty-six</i>
FCS	engl. <i>fetal calf serum</i>
g	Erdbeschleunigung
g	Gramm
G	Guanin
GABA	engl. <i>GA binding protein</i>
GFP	engl. <i>green fluorescent protein</i>
GGF	engl. <i>glial growth factor</i>
GH	Großhirn
GTFs	generelle Transkriptionsfaktoren
hnRNP-k	engl. <i>heterogenous nuclear ribonucleoprotein K</i>
HRP	engl. <i>horse radish peroxidase</i>
Ig	Immunglobulin

---

Inr	Initiator-Element
IPTG	Isopropylthiogalactosid
kb	Kilobase
kDa	Kilodalton
l	Liter
LB	Luria Bertani
M	molar
MAPK	engl. <i>mitogen-activated protein kinase</i>
MCS	engl. <i>multiple cloning site</i>
MAZ	engl. <i>Myc-associated zinc-finger</i>
min	Minute
ml	Milliliter
MOPS	3-N-morpholino-propansulfonsäure
mRNA	engl. <i>messenger ribonucleic acid</i>
NF $\kappa$ B	engl. <i>nuclear factor kappa B</i>
NDF	engl. <i>neu differentiation factor</i>
ng	Nanogramm
nM	nanomolar
Nrg	Neuregulin
NTAK	engl. <i>neural and thymus derived factor</i>
OD	Optische Dichte
PBS	engl. <i>phosphate buffered saline</i>
PCR	engl. <i>polymerase chain reaction</i>
pH	negativ dekadischer Logarithmus der Wasserstoffionenkonzentration
PIC	Präinitiationskomplex
PKC	Protein Kinase C
PMA	engl. <i>phorbol 12-myristate 13-acetate</i>
pmol	picomolar
PNS	Peripheres Nervensystem
PSF	engl. <i>polypyrimidine tract-binding protein-associated splicing factor</i>
RACE	engl. <i>rapid amplification of cDNA ends</i>
RM	Rückenmark
RNA	engl. <i>ribonucleic acid</i>
RNase	Ribonuklease
rpm	engl. <i>rounds per minute</i>
RT	engl. <i>reverse transcriptase</i>
RT	Raumtemperatur
s (sec)	Sekunde
SDS	Sodiumdodecylsulfat
SMDF	engl. <i>sensory and motor neuron-derived factor</i>
Sp1	engl. <i>specificity protein 1</i>
T	Thymin
Tab.	Tabelle

---

TACE	engl. <i>TNF<math>\alpha</math>-converting enzyme</i>
TBP	TATA-Box Binde-Protein
TF (TFs)	Transkriptionsfaktor (Transkriptionsfaktoren)
TBE	Tris-Borat-EDTA Puffer
TE	Tris-EDTA Puffer
Tris	Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan
UV	ultraviolett
V	Volt
v-Maf	engl. <i>v-musculoaponeurotic fibrosarcoma</i>
W	Watt
WT	Wildtyp
X-Gal	5-Brom-4-chloro-3-indoyl- $\beta$ -D-galactosid
z.B.	zum Beispiel
ZBP-89	engl. <i>zinc-finger binding protein-89</i>
ZNS	Zentrales Nervensystem



## Danksagung

Diese Arbeit wurde am Lehrstuhl für Entwicklungsbiologie und Molekulare Pathologie der Universität Bielefeld angefertigt (Prof. Dr. Harald Jockusch).

Für die Bereitstellung des interessanten Themas und für seine freundliche Unterstützung möchte ich mich bei meinem Betreuer Herrn Prof. Dr. Thomas Schmidt-John bedanken. Der Studienstiftung des deutschen Volkes danke ich für die finanzielle Unterstützung meines Studiums und meiner Promotion. Frau Prof. Dr. Eichenlaub-Ritter möchte ich für die Bereitschaft zur Übernahme der Betreuung in der Endphase der Arbeit danken.

Ich danke den letzten Mitgliedern des aussterbenden Lehrstuhls Robert, Elke und Peter für ihre Unterstützung. Meinen ehemaligen Laborkollegen Björn und Doro danke ich für eine stets angenehme Arbeitsatmosphäre und gute Zeit. Von den ehemaligen Mitgliedern des Lehrstuhls möchte ich besonders Carsten und Jörg für ihre Diskussionsbereitschaft und Ideen danken. Allen anderen ehemaligen Mitgliedern danke ich für die gute Zusammenarbeit und Hilfsbereitschaft, insbesondere Silvia, Dirk, Ralf, Angela, Christiane, Daniel, Anke, Melli, Minne, Jana und Cora.

Meinem Studienkollegen und Freund Till danke ich für die hilfreichen Korrekturvorschläge zu dieser Arbeit. Ein Dankeschön möchte ich auch an meinen guten Freund Lars richten, der mich stets mit Literatur versorgte, auf die ich in Bielefeld nicht zugreifen konnte.

Besonders bedanken möchte ich bei meinen Eltern für die beständige Unterstützung während des Studiums und der Promotion. Der herzlichste Dank gilt meiner Freundin Nora für ihr Verständnis und ihre Unterstützung.

## **Erklärung**

Hiermit erkläre ich, dass ich die vorliegende Arbeit selbstständig und nur unter Verwendung der angeführten Materialien und Quellen angefertigt habe.

Bielefeld, den 11.12.2004

---

Timo Frensing