
**Identifizierung und
funktionelle Analyse der humanen
Xylosyltransferase I- und II-Promotoren**

Dissertation zur Erlangung des
Doktorgrades der Naturwissenschaften
(Dr. rer. nat.)

**Fakultät für Chemie
Universität Bielefeld**

vorgelegt von
Benjamin Müller
aus Kalletal-Erder

Bielefeld/Bad Oeynhausen

Dezember 2009

Diese Arbeit entstand unter der Leitung von **Herrn Prof. Dr. med. Knut Kleesiek**,
am Institut für Laboratoriums- und Transfusionsmedizin,
Herz- und Diabeteszentrum Nordrhein-Westfalen,
Universitätsklinik der Ruhr-Universität Bochum,
Bad Oeynhausen,
in der Zeit von Dezember 2006 bis Dezember 2009.

DANKSAGUNG

Herrn Prof. Dr. med. Knut Kleesiek danke ich für die interessante Themenstellung, die Bereitstellung des Arbeitsplatzes sowie für sein Interesse am Fortgang dieser Arbeit.

Herrn Prof. Dr. rer. nat. Jürgen Frey möchte ich für die Bereitschaft danken, diese Dissertation als Gutachter zu betreuen und zu beurteilen.

Mein besonderer Dank gilt Herrn PD Dr. rer. nat. Christian Götting für viele hilfreiche Diskussionen und Anregungen sowie für die Unterstützung meiner Arbeit.

Herrn Dr. rer. nat. Christian Prante und besonders Frau Dr. rer. nat. Doris Hendig möchte ich für ihr Engagement und die vielen anregenden und aufmunternden Diskussionen sowie für ihr Interesse am Gelingen dieser Arbeit danken.

Überdies möchte ich mich ebenfalls bei Herrn PD Dr. rer. nat. Jens Dreier, Dr. rer. nat. Joachim Kuhn, Dennis Hinse, Claudia Pönighaus, Christina Roch, Ralf Zarbock, Marlen Ewald, Christoph Lichtenberg und Anne Vollmer für ihre vielen Ideen und ihre Unterstützung jeglicher Art bedanken.

Ich möchte außerdem all meinen gegenwärtigen und ehemaligen Kolleginnen und Kollegen aus Labor 11 und 13 für die gute Zusammenarbeit, die vielfältige Unterstützung und die angenehme Arbeitsatmosphäre danken.

Ebenso möchte ich mich auch bei Bärbel Vollmer für ihre moralische Unterstützung bedanken.

Mein größter Dank gilt meinen Eltern, die immer an mich geglaubt und mich in jeglicher Hinsicht gefördert und unterstützt haben. Ein ganz besonderer und lieber Dank gilt Tanja Vollmer für ihre großartige Unterstützung, ihr Verständnis und ihre Geduld. Ohne euch wäre diese Arbeit nicht möglich gewesen.

INHALTSVERZEICHNIS

1	ZUSAMMENFASSUNG	1
	SUMMARY	2
2	EINLEITUNG	3
2.1	Extrazelluläre Matrix	3
2.2	Aufbau und Funktion der Proteoglykane	3
2.3	Glykosaminoglykane	5
2.4	Glykosyltransferasen	8
2.5	Xylosyltransferasen	9
2.6	Transkriptionelle Regulation bei eukaryotischen Promotoren	11
2.7	Transkriptionsfaktoren der Sp1- und AP-1-Familie	14
2.8	Gegenstand der Arbeit	16
3	ERGEBNISSE	17
3.1	Identifizierung der <i>XYLT1</i>-Promotorregion	17
3.1.1	Eingrenzung der <i>XYLT1</i> -Promotorregion durch 5'- und 3'-Deletionskonstrukte	19
3.1.2	Identifizierung von <i>cis</i> -regulatorischen Bindestellen für die transkriptionelle Regulation des <i>XYLT1</i> -Promotors	23
3.1.3	Nachweis spezifischer DNA-Protein-Bindungen im <i>XYLT1</i> -Promotor	24
3.1.4	Wirkung von AP-1-Inhibitoren auf die native <i>XYLT1</i> -Expression	29
3.1.5	Untersuchung der Beteiligung von Mitgliedern der Sp1-Familie an der Transkription des <i>XYLT1</i> -Gens	30
3.1.6	Analyse der Beteiligung der Transkriptionsfaktoren Sp1 und Sp3 an der transkriptionellen Regulation des <i>XYLT1</i> -Gens durch RNA-Interferenz	31
3.1.7	Untersuchung der Aktivität des <i>XYLT1</i> -Promotors in HepG2-Zellen	34
3.2	Identifizierung der <i>XYLT2</i>-Promotorregion	35
3.2.1	Eingrenzung der <i>XYLT2</i> -Promotorregion durch 5'-Deletionskonstrukte	37
3.2.2	Eingrenzung der <i>XYLT2</i> -Promotorregion durch 3'-Deletionskonstrukte	39
3.2.3	Identifizierung potentiell aktiver Transkriptionsfaktor-Bindestellen im <i>XYLT2</i> -Promotor	41
3.2.4	Nachweis spezifischer Protein-DNA-Interaktionen im <i>XYLT2</i> -Promotor	43
3.2.5	Untersuchung von Affinitätsunterschieden zwischen den Bindestellen SpA und SpB	47
3.2.6	Analyse der <i>XYLT2</i> -Promotoraktivität in SW1353-Chondrosarkomzellen	48
3.2.7	Auswirkung einer Inhibierung der Bindung von Sp-Proteinen im nativen <i>XYLT2</i> -Promotor	50
3.3	Induktion der <i>XYLT</i>-Gene durch Cytokine der TGFβ-Familie	51

4	DISKUSSION	53
4.1	Identifizierung und Charakterisierung des humanen <i>XYLT1</i>-Promotors	53
4.1.1	Identifizierung der minimal funktionalen Promotorregion und aktiver Transkriptionsfaktor-Bindestellen	54
4.1.2	Auswirkungen einer Inhibition der AP-1-Bindung auf die XT-I mRNA-Expression	57
4.1.3	Beteiligung von Transkriptionsfaktoren der Sp1-Familie an der Regulation des <i>XYLT1</i> -Gens	57
4.1.4	Induktion der <i>XYLT1</i> -Genexpression über Wachstumsfaktoren der TGF β -Familie.....	59
4.2	Identifizierung und Charakterisierung des humanen <i>XYLT2</i>-Promotors	60
4.2.1	Identifizierung der minimal aktiven <i>XYLT2</i> -Promotorregion und essentieller Transkriptionsfaktor-Bindestellen	61
4.3	Vergleich der Regulation und Expression des <i>XYLT1</i>- und <i>XYLT2</i>-Gens in SW1353- und HepG2-Zellen	64
4.4	Ausblick	65
5	METHODEN	66
5.1	Molekularbiologische Methoden	66
5.1.1	Isolierung von Gesamt-RNA.....	66
5.1.2	Isolierung von Plasmid-DNA aus <i>Escherichia coli</i>	66
5.1.3	Photometrische Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren	67
5.1.4	cDNA-Synthese aus isolierter Gesamt-RNA	68
5.1.5	Polymerase-Kettenreaktion (PCR) zur Generierung von <i>XYLT1</i> - und <i>XYLT2</i> -Promotor-Fragmenten	69
5.1.6	Klonanalyse mittels PCR (<i>Colony-PCR</i>).....	70
5.1.7	<i>Real-Time quantitative PCR</i>	71
5.1.8	Klonierungsstrategie zur Generierung von Promotor-Reportergen-Konstrukten	73
5.1.9	Bestimmung des <i>XYLT2</i> -Transkriptionsstartpunktes mittels 5'-RACE	75
5.1.10	Sequenzierung von DNA-Fragmenten	77
5.1.11	Auftrennung von DNA-Fragmenten mittels Agarosegel-Elektrophorese	79
5.1.12	Aufreinigung von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen	79
5.1.13	Hydrolytische Spaltung von DNA durch Restriktionsendonukleasen	80
5.1.14	Dephosphorylierung von DNA-Fragmenten	80
5.1.15	Generierung von glatten DNA-Enden (<i>blunt ends</i>).....	81
5.1.16	Ligation mit der T4-Ligase	81
5.1.17	Zielgerichtete Mutagenese (<i>site-directed mutagenesis</i>).....	81
5.1.18	<i>Annealing</i> komplementärer Oligonukleotide.....	83

5.2	Zellbiologische Methoden	84
5.2.1	Anzucht und Kryokonservierung von <i>Escherichia coli</i>	84
5.2.2	Transformation von <i>E. coli</i> TOP10- und XL10-Gold-Zellen	84
5.2.3	Kultivierung von humanen Zellen	85
5.2.3.1	Kulturmedien und Zusätze	85
5.2.3.2	Kultivierung humaner Zelllinien	85
5.2.3.3	Passagieren von adhärennten Zellen	85
5.2.3.4	Kryokonservierung humaner Zellen	86
5.2.3.5	Revitalisierung humaner Zellen	86
5.2.3.6	Bestimmung der Zellzahl und Vitalität	86
5.2.3.7	Inkubation von SW1353- und HepG2-Zellen mit verschiedenen TGF β -Isoformen und Transkriptionsfaktor-Inhibitoren	86
5.2.4	Liposomen-vermittelte Plasmid-Transfektion	87
5.2.5	Liposomen-vermittelte <i>short interference</i> RNA (siRNA)-Transfektion	87
5.3	Proteinchemische Methoden	88
5.3.1	Isolierung von nukleären Proteinen	88
5.3.2	<i>Electrophoretic Mobility Shift Assay</i> (EMSA)	89
5.3.3	Bestimmung der Proteinkonzentration in nukleären Zellextrakten	91
5.3.4	Reportergendetektion in Zelllysaten	91
5.3.5	Bestimmung der enzymatischen Xylosyltransferase-Aktivität im Zellkulturüberstand	92
6	MATERIAL UND GERÄTE	94
6.1	Zelllinien	94
6.2	Zellkulturmedien und Zusätze	94
6.3	Bakterienstämme	94
6.4	Nährmedien für <i>Escherichia coli</i>	95
6.5	Vektoren	95
6.6	Oligonukleotide	95
6.7	Reagenzien	99
6.8	Enzyme, Antikörper und rekombinante Proteine	100
6.9	Reagenziensätze	101
6.10	Software	102
6.11	Puffer und Lösungen	102
6.12	Sonstige Materialien	103
6.13	Geräte	104

7	ABKÜRZUNGEN	105
8	LITERATUR	109
9	PUBLIKATIONEN UND PRÄSENTATIONEN	124
9.1	Publikationen	124
9.2	Kongressvorträge	125
9.3	Kongressbeiträge und Posterpräsentationen	125
10	LEBENS LAUF	128
11	ERKLÄRUNG	129

1 ZUSAMMENFASSUNG

Die Xylosyltransferasen I und II (XT-I und XT-II) katalysieren den initialen Schritt in der posttranslationalen Biosynthese von Glykosaminoglykanketten durch den Transfer von UDP-aktivierter Xylose auf spezifische Serin-Reste von Proteoglykan-Core-Proteinen. Sie sind somit entscheidend an der *de novo*-Synthese und Umstrukturierung der extrazellulären Matrix sowie an zahlreichen pathophysiologischen Prozessen beteiligt. Beide XTs sind funktionell und strukturell sehr homolog, zeigen jedoch zell- und gewebespezifisch sowie während der mesenchymalen Stammzelldifferenzierung ein divergentes Expressionsmuster. Ferner konnte eine differente Induktion durch Wachstumsfaktoren der TGF β -Familie beobachtet werden. Die zugrundeliegenden transkriptionellen Regulationsmechanismen sind bislang unbekannt.

Im Rahmen dieser Arbeit erfolgte erstmals die Identifizierung der XT-I- und XT-II-Promotoren sowie eine detaillierte Charakterisierung der beteiligten *cis*- und *trans*-regulatorischen Faktoren. Hierbei konnte das Fehlen typischer Promotorelemente, wie einer TATA- oder CAAT-Box, sowie eine überdurchschnittlich hohe Akkumulation von GC-Nukleotiden in Form von CpG-Inseln unmittelbar stromaufwärts des Translationsstarts beider *XYLT*-Gene festgestellt werden. Mittels Gensynthese und PCR wurden verschiedene 5'- und 3'-trunkierte Fragmente der potentiellen Promotorbereiche generiert und in ein Reporter-gen-Vektorsystem inseriert. Durch eine Analyse der Aktivitäten dieser Promotorkonstrukte in der Chondrosarkomzelllinie SW1353 und der Hepatomazelllinie HepG2 konnte der für eine konstitutive Expression erforderliche Promotorbereich des *XYLT1*-Gens auf 797 bp und der des *XYLT2*-Gens auf 177 bp unmittelbar stromaufwärts des Translationsstarts eingegrenzt werden. *In silico*-Analysen lieferten Hinweise auf Transkriptionsfaktor (TF)-Bindestellen der AP-1- und Sp-Proteinfamilie in diesen Promotorbereichen. Die Identifizierung funktioneller TF-Bindestellen erfolgte über zielgerichtete Mutationen dieser Erkennungssequenzen. Daraus resultierende signifikante Veränderungen der Promotoraktivitäten wurden durch den direkten Nachweis von TF-DNA-Interaktionen mittels *electrophoretic mobility shift assays* bestätigt. Die eindeutige Identifizierung der TF erfolgte schließlich durch spezifische Antikörper gegen AP-1- und Sp-Proteine unter Einsatz von *Supershift-Assays*. Die Ergebnisse dieser Arbeit zeigten, dass die basale Aktivierung von *XYLT1* durch den TF cJun/AP-1- und Sp-Proteine erfolgt. Die essentielle Beteiligung dieser TF an der Expression des *XYLT1*-Promotors konnte durch Verwendung spezifischer Antikörper und durch den Einsatz sequenzspezifischer siRNA gegen Sp1 und Sp3 bestätigt werden. Zudem konnte erstmalig eruiert werden, dass TF der Sp1-Proteinfamilie entscheidend an der Regulation der *XYLT2*-Expression beteiligt sind. Hierbei zeigte sich, dass für die konstitutive *XYLT2*-Expression sowie für die Feinjustierung der Transkriptionsstärke ein Zusammenwirken mehrerer Sp-Erkennungssequenzen erforderlich ist. Die Beteiligung der identifizierten TF an der transkriptionellen Regulation der nativen *XYLT*-Promotoren konnte zudem durch AP-1- bzw. Sp1-Inhibitoren verifiziert werden. Ein Sequenzvergleich der humanen und murinen *XYLT*-Promotorbereiche zeigte überdies die phylogenetische Konservierung der spezifischen AP-1- und Sp1-Transkriptionsfaktorbindestellen.

Zusammenfassend konnten im Rahmen dieser Arbeit erstmals signifikante Unterschiede in der transkriptionellen Regulation der beiden XT-Isoformen aufgezeigt werden. Diese Untersuchungen können als Grundlage für die weitere Charakterisierung des divergenten Expressionsmusters dienen sowie zur Aufklärung der unterschiedlichen physiologischen Funktionen beider Xylosyltransferasen beitragen.

SUMMARY

The xylosyltransferases I and II (XT-I and XT-II) catalyze the transfer of xylose from UDP-xylose to selected serine residues in the proteoglycan core protein, which is the initial and rate-limiting step in glycosaminoglycan biosynthesis. Both XT-isoforms represent key enzymes in extracellular matrix assembly and remodeling and do also play a major role in various pathological processes. The xylosyltransferases show a high degree of homology in structure and function. Nevertheless, they have divergent expression levels in different cell types and tissues as well as during the osteogenic and chondrogenic mesenchymal stem cell differentiation. Furthermore, a different response to growth factors of the TGF β family has been observed. The mechanisms underlying the transcriptional regulation of both *XYLT*-genes have not been characterized yet.

In my thesis, I identified for the first time the promoter regions of XT-I and XT-II as well as important transcription factors involved in their regulation. Both putative regulatory regions lack typical promoter elements like a TATA or CAAT box. In contrast, several GC boxes within a CpG island immediately upstream of the translation initiation sites were observed in both genes. To determine the minimal active promoter regions, different 5'- and 3'-truncated promoter fragments were generated by gene synthesis and PCR and subsequently inserted into a reporter gene vector system. A detailed activity analysis of each promoter reporter gene construct in the chondrosarcoma cell line SW1353 and in the hepatoma cell line HepG2 revealed that a 797 bp fragment is essential for full *XYLT1* promoter activity. In contrast, a region encompassing 177 nucleotides immediately upstream of the translation start site was sufficient to drive the constitutive transcription of the *XYLT2* gene in full strength. Using an *in silico* approach numerous putative transcription factor binding sites for transcription factors of the AP-1 and Sp1 protein family were identified. Several site-directed mutagenesis experiments as well as electrophoretic mobility shift and supershift assays using specific antibodies were used to clearly identify the transcription factors involved. The findings of my thesis were that cJun/AP-1 and Sp1 proteins essentially participate in the regulation of the *XYLT1* gene. This was confirmed by using specific antibodies and sequence specific siRNA targeting Sp1 and Sp3. Additionally, a crucial role of Sp1 transcription factors in regulating the *XYLT2* gene could be ascertained. A cooperative interaction of multiple Sp1 recognition sequences was determined as being necessary for the constitutive expression as well as for the vernier adjustment of the transcriptional regulation. The participation of the transcription factors identified for the activation of the *XYLT* genes was further verified using inhibitors against AP-1 and Sp1. Moreover, an alignment of the human and murine *XYLT* promoter regions revealed phylogenetically conserved AP-1 and Sp1 transcription factor binding sites.

In conclusion, I demonstrated significant differences in the transcriptional regulation of both XT-isoforms. These results can be used as a starting point for further investigation regarding the divergent cell type and tissue specific expression patterns of both xylosyltransferases. Furthermore, the findings of my thesis may contribute to elucidate the different physiological functions of both enzymes.

2 EINLEITUNG

2.1 Extrazelluläre Matrix

Die extrazelluläre Matrix (ECM) stellt ein komplexes Netzwerk von präzise organisierten Makromolekülen dar, die den Interzellularraum ausfüllen. Diese bestehen vorwiegend aus Faserproteinen wie Kollagen, Elastin, Fibronectin und Laminin sowie aus Glykoproteinen, Proteoglykanen (PGs) und Glykosaminoglykanen (GAGs) [1]. Aufgrund der negativen Ladung der Glykosaminoglykanketten kommt es innerhalb der ECM zu einer Einlagerung von interstitiellem Wasser. Die ECM bietet den Zellen überdies ein mechanisches Gerüst für Zelladhäsion und Zellmigration, kann aber keinesfalls als eine rein passive Struktur angesehen werden. Proteine der ECM interagieren direkt mit Zelloberflächenrezeptoren, wodurch es zur Initiation spezifischer Signaltransduktionswege kommt, in deren Folge die zellulären Funktionen und der Phänotyp moduliert werden [2]. Hieraus kann eine Umstrukturierung sowie der Auf- oder Abbau von Geweben resultieren [3].

2.2 Aufbau und Funktion der Proteoglykane

Proteoglykane stellen eine heterogene Gruppe von glykosylierten Makromolekülen dar, die von nahezu allen tierischen Zellen exprimiert werden. Neben Kollagenfasern sind sie ein wesentlicher Bestandteil der ECM und kommen auf annähernd jeder Zelloberfläche vor [4, 5]. PGs bestehen aus einem *Core*-Protein, an das kovalent eine variable Anzahl von repetitiven Disaccharideinheiten in Form von unverzweigten GAG-Ketten gebunden sind. Diese können bis zu 95% der Gesamtmasse eines PGs ausmachen [6]. Aufgrund von Carboxylat- und Sulfatgruppen besitzen PGs eine hohe negative Ladungsdichte, aus der ihr stark hydrophiler Charakter resultiert [7].

Die Größe der *Core*-Proteine, von denen bisher mehr als 30 identifiziert wurden, kann von 10 kDa bis über 500 kDa variieren [4, 8]. Dabei ist die Anzahl der an das *Core*-Protein gebundenen GAG-Ketten ebenfalls hochvariabel und reicht von einer bis zu mehr als 100 Ketten [7]. Die *Core*-Proteine besitzen nicht nur die Eigenschaft, GAGs zu binden. Sie verfügen zudem über weitere funktionelle Domänen, die ihnen eine Interaktion mit anderen Proteinen sowie eine Fixierung auf der Zelloberfläche ermöglichen [4]. Basierend auf der Struktur und den biologischen Eigenschaften, wurde für perizelluläre PGs eine Einteilung in zwei Gruppen vorgeschlagen: kleine leucinreiche PGs (SLRPs, *small leucine rich proteoglycans*), wie z.B. Decorin und modulare PGs, die in zwei weitere Subgruppen unterteilt wurden [9]. Diese

differenzieren zwischen Hyalektanen, die hyaluron- und lektinbindende Domänen aufweisen (z.B. Aggrecan und Versican) und den nicht hyaluronsäurebindenden PGs (z.B. Perlecan).

Die biologische Funktion der PGs reicht von einer stabilisierenden Stützfunktion, die essentiell für die Aufrechterhaltung der Bindegewebsstruktur ist, über dynamische Vorgänge wie die Zelladhäsion und Zellmotilität bis hin zu komplexen Prozessen wie der Zelldifferenzierung und Morphogenese, dem Tumorzellwachstum und der viralen Infektion von Zellen [7, 10-12]. Dieses breite Funktionsspektrum basiert auf der strukturellen Heterogenität, ausgehend von verschiedenen *Core*-Proteinen, der variablen Art und Anzahl der GAG-Ketten und dem Grad der Sulfatierung und Epimerisierung der einzelnen Zuckerreste. Durch ihre hydrophilen Eigenschaften sind PGs in der Lage, große Mengen Wasser in der ECM zu binden und auf diese Weise hydratisierte GAG-Gele zu bilden. Diese ermöglichen es Gelenken und Geweben große Druckunterschiede zu absorbieren [8, 13]. So bildet beispielsweise das strukturgebende PG Aggrecan (Abb. 2.2.1), das über kleine glykosylierte Verbindungsproteine nicht-kovalent an das GAG Hyaluronat gebunden ist, im Knorpel komplexe multimolekulare Aggregate aus und verleiht so Gelenken und Geweben durch die starke Hydratisierung der polyanionischen GAGs mechanische Belastbarkeit und Elastizität. Nahezu 90% der Gesamtmasse des Aggrecans entfällt auf den Kohlenhydratanteil, der weitestgehend aus Chondroitinsulfat und Keratansulfat besteht [13, 14]. Im Gegensatz dazu spielt das 40 kDa umfassende, zur Gruppe der SLRPs gehörende Decorin, das mit nur einer Chondroitin bzw. Dermatansulfatkette assoziiert ist, eine wichtige Rolle in der Organisation der ECM [13]. Es interagiert mit den Kollagentypen I und II und beeinflusst dabei entscheidend sowohl die Kinetik der Kollagenfibrillogenese als auch den Durchmesser und die Distanz der Fibrillen [15]. Durch die Bindung von Decorin an die Oberfläche der Kollagenfibrillen kommt es zu einer Verzögerung der lateralen Assemblierung der einzelnen tripelhelikalen Kollagenmoleküle und in deren Folge zu einer Verminderung des Fibrillendurchmessers [16]. Decorin ist ebenfalls über das *Core*-Protein in der Lage, Wachstumsfaktoren wie den *Transforming growth factor* $\beta 1$ (TGF β_1) mit hoher Affinität zu binden und somit dessen Aktivität zu beeinflussen [17-19].

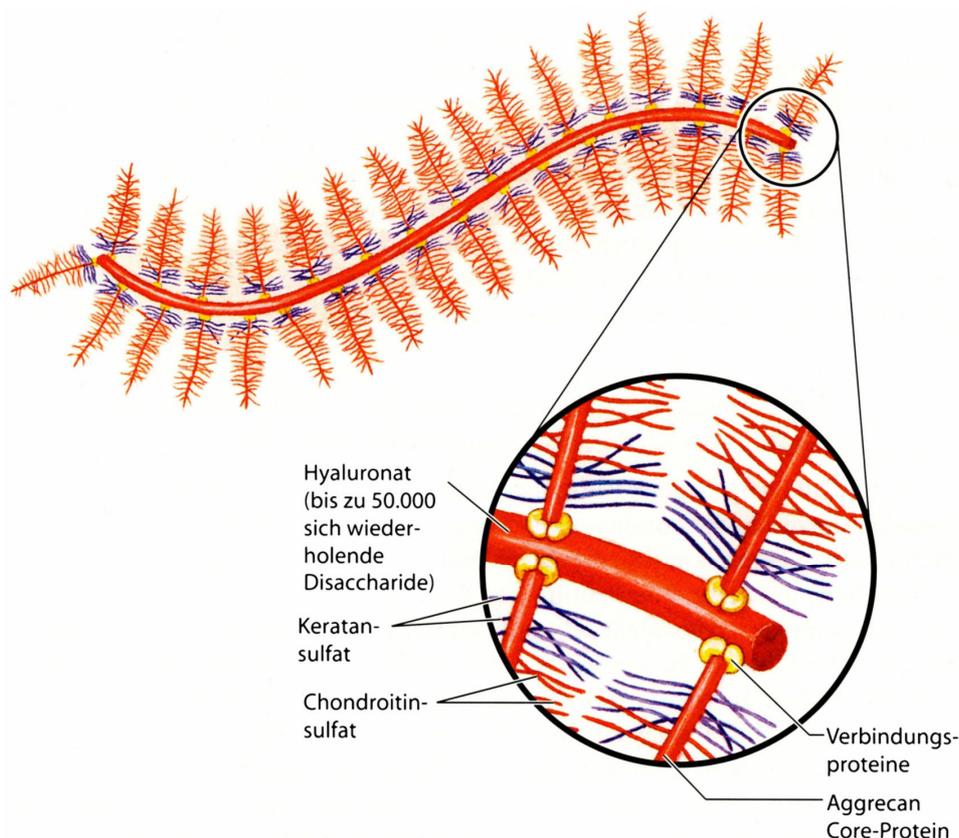


Abb. 2.2.1: Schematische Darstellung eines Proteoglykanaggregates der extrazellulären Matrix [20]. Ein einzelnes Hyaluronatmolekül ist nicht-kovalent über Verbindungsproteine mit etwa 100 Molekülen des Core-Proteins Aggrecan verbunden, wobei jedes Aggrecan-Molekül kovalent mit zahlreichen Chondroitinsulfat- und Keratansulfatketten verknüpft ist.

2.3 Glykosaminoglykane

Glykosaminoglykane sind unverzweigte, aus repetitiven Disaccharid-Einheiten aufgebaute Polysaccharide, die in tierischen Geweben in Form von PGs über den terminalen reduzierenden Zuckerrest der GAG-Kette an ein Core-Protein gebunden sind [21]. Eine Ausnahme hiervon bildet das Hyaluronat, das sowohl frei als auch mit PGs assoziiert in der ECM vorliegen kann (Abb. 2.2.1). Bis auf die Keratansulfate, die sowohl N-glykosidisch an Asparagin (Asn) als auch O-glykosidisch an Serin (Ser) oder Threonin (Thr) gebunden vorkommen, sind alle sulfatierten GAGs über die Sequenz $(1\rightarrow4)\text{-}\beta\text{-D-GlcA-(1}\rightarrow3)\text{-}\beta\text{-D-Gal-(1}\rightarrow3)\text{-}\beta\text{-D-Gal-(1}\rightarrow4)\text{-}\beta\text{-D-Xyl-O-Serin}$ an das Core-Protein gebunden (Abb. 2.3.1) [8, 22]. Der initiale Schritt der Synthese dieses Tetrasaccharid-Linkers wird *in vivo* durch die Xylosyltransferasen I und II (XT-I/XT-II) katalysiert. Nach der Xylosylierung des Core-Proteins erfolgt die durch weitere Glykosyltransferasen vermittelte Übertragung von zwei Galaktosemolekülen und einer Glukuronsäure [22]. Obwohl diverse Modifikationen wie Sulfatierungen und Phosphorylierungen innerhalb dieser Linker-Region beschrieben wurden, ist über deren Funktion bisher wenig bekannt [8]. Kürzlich konnte

für das Protein FAM20B eine Kinaseaktivität für die Phosphorylierung der Xylose innerhalb der *Linker*-Struktur gezeigt werden. Außerdem gibt es Belege dafür, dass eine Phosphorylierung der Xylose an Position C2 eine weitere Synthese des Tetrasaccharid-*Linkers* verhindert [23, 24]. Neben der Phosphorylierung der Xylose gibt es Hinweise, dass auch das Sulfatierungsmuster der beiden Galaktose-Einheiten im Tetrasaccharid-*Linker* an der Regulation der weiteren GAG-Biosynthese beteiligt ist [23, 25].

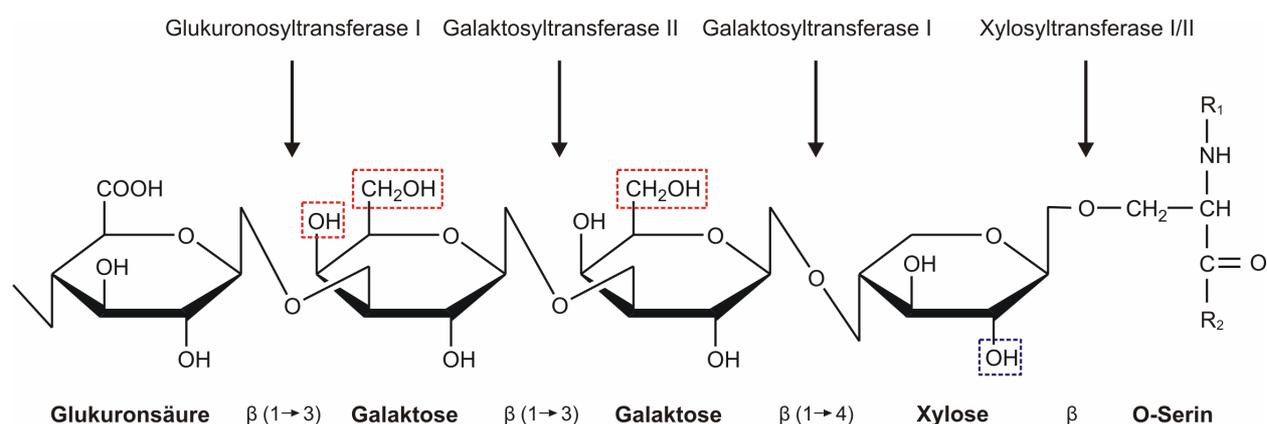


Abb. 2.3.1: Struktur des an einen Serin-Rest des PG-Core-Proteins gebundenen Tetrasaccharid-*Linkers*. Der initiale Schritt der *Linker*-Synthese erfolgt durch die Xylosyltransferasen I und II. Die rot umrandeten Positionen können sulfatiert, die blau umrandete Position an C2 der Xylose kann hingegen phosphoryliert vorliegen.

Die weitere Elongation der GAG-Kette erfolgt nach Fertigstellung des Tetrasaccharid-*Linkers* durch die alternierende Addition eines Aminozuckers und einer Uronsäure. In Heparin und Heparansulfat (HS) ist dieser Aminozucker N-Acetylglucosamin (GlcNAc), hingegen in Chondroitin- bzw. Dermatan-sulfat (CS bzw. DS) N-Acetylgalaktosamin (GalNAc) [8, 22]. Das Ausmaß der Epimerisierung der Glukuronsäure (GlcA) zu Iduronsäure (IdoA), katalysiert durch die Glukuronyl-C5-Epimerase (GlcAC5E), und das Sulfatierungsmuster der Disaccharid-Einheiten unterscheidet Heparin von HS und CS von DS [8, 22]. Das Sulfatierungsmuster ist ebenfalls für spezifische Interaktionen mit Wachstumsfaktoren, Cytokinen und Matrixkomponenten sowie Enzymen und anderen Proteinen erforderlich [26].

Mit wenigen Ausnahmen werden die Monosaccharide und Sulfate in aktivierter Form in Verbindung mit einem Nukleotid auf den jeweiligen Akzeptor übertragen. Die Aktivierung der Zucker erfolgt im Allgemeinen durch Uridindiphosphat (UDP), wohingegen das Sulfat als 3'-Phosphoadenosin-5'-Phosphosulfat (PAPS) vorliegt. Über spezifische Transporter erfolgt die Translokation dieser aktivierten Vorstufen in das Lumen des endoplasmatischen Retikulums bzw. in den Golgi-Apparat [27-30]. Dort findet die weitere Polymerisierung und Modifizierung der GAG-Ketten statt, wobei das fünfte Monosaccharid darüber entscheidet, ob eine CS/DS oder Heparin/HS-GAG-Kette gebildet wird.

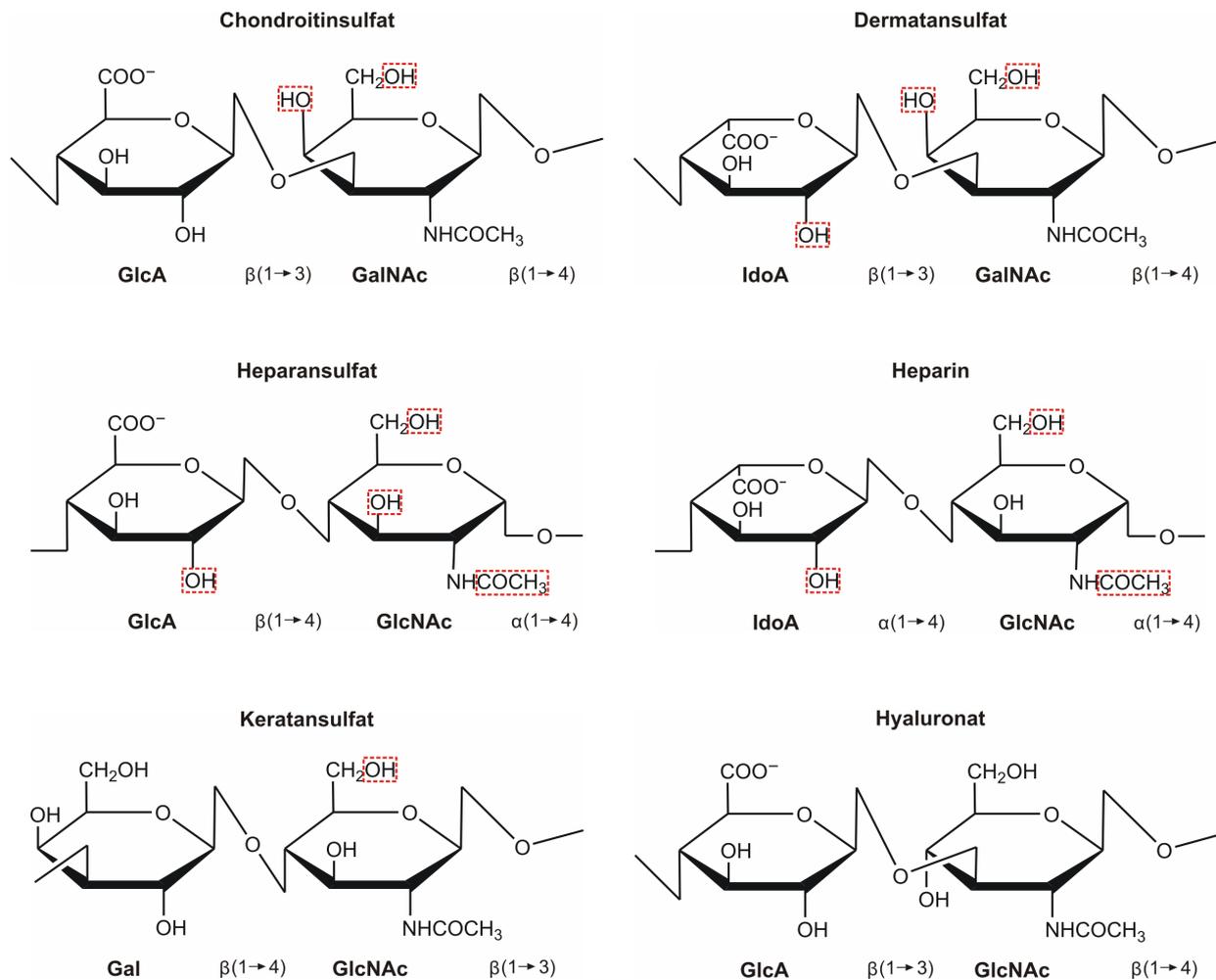


Abb. 2.3.2: Struktur diverser Glykosaminoglykan-Disaccharideinheiten. Bis auf Hyaluronat weisen alle dargestellten GAG-Ketten einen hohen Grad an Sulfatierung auf. Die verschiedenen Positionen für diese Modifikation sind jeweils durch einen roten Rahmen gekennzeichnet.

2.4 Glykosyltransferasen

Glykosyltransferasen gehören zu einer Gruppe von ubiquitär vorkommenden Enzymen, die den Transfer von aktivierten Zuckern auf eine Vielzahl von Akzeptoren vermitteln. Obwohl viele Glykosyltransferasen chemisch sehr ähnliche Reaktionen katalysieren, zeigen sie jedoch eine enorme Diversität in Bezug auf Donor-, Akzeptor- und Produktspezifität, wodurch eine kaum überschaubare Anzahl an Glykokonjugaten, Oligo- und Polysacchariden gebildet wird [31]. Die Glykosyltransferasen zeigen untereinander nur eine sehr geringe Sequenzhomologie. Dennoch ist ihre Unterteilung, basierend auf der Art des Donor-Zuckers, der relativen Donor-Produkt-Stereochemie und aufgrund von Sequenzhomologien in 26 verschiedene Familien möglich [32]. Die überwiegende Mehrheit der Glykosyltransferasen nutzt UDP-aktivierte Zuckerreste für die Übertragung auf ihr jeweiliges Substrat. Diese Glykosyltransferasen können in nur zwei verschiedene strukturelle Superfamilien gegliedert werden, die sich hinsichtlich ihrer Domänenstruktur, ihres aktiven Zentrums und demzufolge in ihrem Mechanismus bei der Übertragung der Zuckerreste unterscheiden [33]. Allen Glykosyltransferasen gemeinsam ist ein kurzer N-terminaler cytoplasmatischer Abschnitt, eine 16–20 Aminosäuren lange Anker-Sequenz und eine umfangreiche Stamm-Region, gefolgt von einer großen C-terminalen katalytischen Domäne. Die Signal-Anker-Domäne fungiert als Signalpeptid und als membrandurchspannende Region. Die meisten eukaryotischen Glykosyltransferasen sind integrale Typ II Membranproteine des endoplasmatischen Retikulums bzw. des Golgi-Apparates [34].

Beim Aufbau der GAG-Ketten ist, nach der Synthese des *Linker*-Tetrasaccharids durch die entsprechenden Enzyme, die Addition des fünften Zuckers von entscheidender Bedeutung, da dieser über die Art der synthetisierten GAG-Kette entscheidet. So ist die N-Acetylglucosaminyl-Transferase I (EXTL2) ausschlaggebend für die Bildung von Heparin respektive HS durch die Übertragung von GlcNAc auf den Tetrasaccharid-*Linker* [35]. Für die Elongation von CS-Ketten ist die enzymatische Aktivität der Glukuronosyltransferase II [36], die die Übertragung von Glukuronsäure katalysiert und die N-Acetylgalaktosaminyltransferase I (GalNAcT), die die Addition von GalNAc vermittelt, erforderlich [37]. Die GalNAcT ist ebenfalls für die Addition von GalNAc in DS verantwortlich. Die GlcAC5E, die die Epimerisierung von Glukuronsäure zu Iduronsäure katalysiert, ist ebenfalls von entscheidender Bedeutung für die Bildung von Heparin, HS und DS. Durch die katalytische Aktivität des Enzyms erhält die GAG-Kette eine flexiblere Konformation, was neben dem Sulfatierungsmuster als ausschlaggebend für die weitere Elongation der GAG-Kette diskutiert wird [8, 38, 39].

2.5 Xylosyltransferasen

Die Xylosyltransferasen I und II (XT-I, XT-II, EC 2.4.2.26), die einer Subgruppe der Glykosyltransferase-Familie 14 zugeordnet werden, katalysieren den Transfer von Xylose, ausgehend von UDP-Xylose auf die Hydroxylgruppe spezifischer Serin-Reste in PG-*Core*-Proteinen [31, 32, 40]. Dieser Prozess stellt den initialen und limitierenden Schritt im Aufbau des gemeinsamen Tetrasaccharid-*Linkers* sowohl von CS und DS als auch von HS und Heparin dar [41-45]. Die Xylosylierungsreaktion und weitere Modifikationen sowohl des *Core*-Proteins als auch der GAGs erfolgen posttranslational im Lumen des endoplasmatischen Retikulums und im Golgi-Apparat [8]. Wie in unserer Arbeitsgruppe gezeigt werden konnte, sind beide Xylosyltransferasen im Golgi-Apparat lokalisiert [46]. Eine Xylosylierung von Serin-Resten im *Core*-Protein von PGs erfolgt nur innerhalb einer definierten Aminosäuresequenz. Als entsprechende Konsensus-Sequenz konnte die Aminosäurenabfolge a-a-a-a-G-S-G-a-G/a-a (mit a = saure Aminosäure) sowohl für XT-I als auch für XT-II identifiziert werden [47, 48]. Beide Enzyme werden proteolytisch von der Golgi-Membran abgespalten und zusammen mit großen CS-PGs in aktiver Form in den extrazellulären Raum sekretiert [49, 50]. Aufgrund dieser Tatsache kann die enzymatische Aktivität beider Enzyme als Serum-Biomarker für diverse Erkrankungen, wie die systemische Sklerose und Pseudoxanthoma elasticum sowie für weitere Krankheiten, die mit einem veränderten PG-Metabolismus einhergehen, genutzt werden [44, 49, 51-55]. Sowohl die biologische Funktion der sekretierten Xylosyltransferasen als auch der Ablauf des Sekretionsprozesses selbst sind bislang nur unzureichend geklärt [43]. Neueste Ergebnisse weisen allerdings auf die Beteiligung einer Cystein-Protease für die Sekretion der XT-I [56] bzw. der γ -Sekretase als verantwortliche Protease für die Sekretion der XT-II hin [57].

Das *XYLT1*-Gen, welches für die XT-I codiert, ist auf Chromosom 16p13.1 lokalisiert und setzt sich aus 12 Exons zusammen. Die prozessierte mRNA weist eine Größe von 2877 bp auf und codiert für ein Protein mit einer Masse von etwa 108 kDa [40]. Das Gen für die Isoform XT-II wurde auf Chromosom 17 in der Region 17q21.3-22 lokalisiert. Im Gegensatz zum *XYLT1*-Gen umfasst das *XYLT2*-Gen nur 11 Exons, die für ein aus 865 Aminosäuren bestehendes Protein mit einer Masse von etwa 97 kDa codieren. Die Xylosyltransferasen zeigen auf Aminosäureebene eine hohe Homologie von über 80% in Teilen der C-terminalen katalytischen Domäne und von 52% bezogen auf das Gesamtprotein [43, 44].

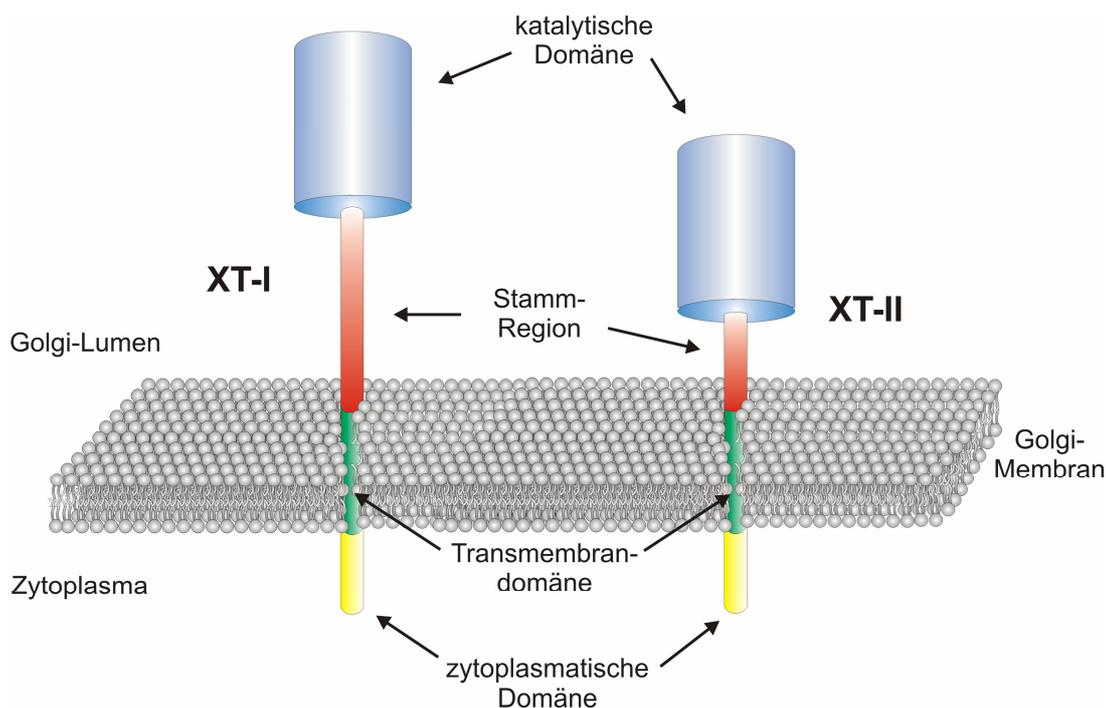


Abb. 2.5.1: Schematische Darstellung der postulierten Typ-II Transmembran-Topologie der XT-I und XT-II. Beide Xylosyltransferasen besitzen eine sehr ähnliche Struktur mit einer cytoplasmatischen Domäne, einer variablen Stammregion, einer hauptsächlich aus hydrophoben Aminosäuren bestehenden Transmembran-Domäne, die das Enzym in der Golgi-Membran verankert sowie einer kurzen N-terminalen zyttoplasmatischen Domäne.

Die Ähnlichkeit beider Enzyme zeigt sich auch in der von ihnen katalysierten Reaktion. So konnte in unserer Arbeitsgruppe kürzlich gezeigt werden, dass die K_M -Werte und die Akzeptorspezifitäten bei beiden Xylosyltransferasen nur marginale Unterschiede aufweisen, wobei XT-I eine geringere Stringenz gegenüber der Akzeptorsequenz zu besitzen scheint [47]. Aus diesem Grund ist die biologische Relevanz für die Expression von zwei Isoformen der Xylosyltransferase in allen bisher untersuchten Wirbeltieren, auch im Hinblick auf die Tatsache, dass alle anderen an der Biosynthese des Tetrasaccharid-*Linkers* beteiligten Glykosyltransferasen nur in einer Isoform vorliegen, unklar. Die bisher bekannten Unterschiede zwischen beiden Xylosyltransferasen sind zum einen eine unterschiedlich stark ausgeprägte Expression in verschiedenen Geweben und zum anderen divergente Expressionsstärken innerhalb eines Gewebetyps. Obwohl in den meisten Geweben beide Xylosyltransferase-Gene exprimiert werden, konnte sowohl in der murinen als auch der humanen Lunge, Niere und besonders der Leber ein vergleichsweise hoher Gehalt an XT-II mRNA nachgewiesen werden. Im Gegensatz dazu war eine Expression der XT-I mit Ausnahme der Niere kaum oder gar nicht zu detektieren [43, 45]. Eine ebenfalls kürzlich durchgeführte Analyse der *XYLT1*- und *XYLT2*-Expression in 33 verschiedenen humanen Zelllinien ergab, dass das *XYLT1*-Gen nur in etwa der Hälfte aller untersuchten Zelllinien exprimiert wird, wohingegen *XYLT2*-Transkripte in allen untersuchten Zelllinien nachweisbar waren [47]. In Untersuchungen zur myokardialen Fibrose

konnte in humanen kardialen Fibroblasten eine Induktion der *XYLT1*-Transkription durch das Cytokin $TGF\beta_1$ beobachtet werden, wohingegen die Transkription des *XYLT2*-Gens nicht beeinflusst wurde [58]. Ein ähnlich divergentes Bild zeigte sich auch während der osteogenen und der durch $TGF\beta_3$ -vermittelten chondrogenen Differenzierung von mesenchymalen Stammzellen. Hier wurde ebenfalls eine differente Expression von XT-I und XT-II während des Differenzierungsprozesses beobachtet [59, 60].

Da bislang die regulatorischen Bereiche beider Xylosyltransferase-Gene nicht identifiziert wurden, ist sowohl über den genauen Ablauf als auch über die Unterschiede in der transkriptionellen Regulation beider Xylosyltransferasen sowie über die daraus resultierende biologische Relevanz nahezu nichts bekannt.

2.6 Transkriptionelle Regulation bei eukaryotischen Promotoren

Als Promotoren werden Strukturelemente der DNA bezeichnet, die die Bindung des basalen Transkriptionsapparats ermöglichen [61]. Der Ablauf der Transkription bei Eukaryoten ist dabei weitaus komplexer als bei Prokaryoten oder Archaea. Dies zeigt sich schon aufgrund des Vorhandenseins von drei RNA-Polymerasen, die für die Biosynthese verschiedenartiger RNA-Transkripte verantwortlich sind. Die Transkription protein-codierender Gene erfolgt durch die Aktivität der RNA-Polymerase II [62]. Zur Regulation der Genexpression in Eukaryoten ist ferner eine präzise räumliche und zeitliche Koordination einer Vielzahl von allgemeinen und spezifischen Transkriptionsfaktoren (TF), die an definierte *cis*-regulatorische Elemente auf der DNA-Matrize binden, erforderlich [63].

In der aktuellen Literatur wird mit dem Begriff Promotor im Allgemeinen der Kernpromotor bezeichnet [64-66]. Dieser, etwa 70–100 Basenpaare (bp) umfassende, den Transkriptionsstart (TSS) flankierende Bereich, beinhaltet DNA-Bindungsmotive, die ausreichend für die Erkennung durch die generellen Transkriptionsfaktoren (GTF) und die Initiation der Transkription unter Ausbildung des so genannten Präinitiationskomplexes (PIC) sind [63, 64, 67, 68]. Der PIC besteht neben den GTF TFIIA, TFIIB, TFIID, TFIIE, TFIIIF und TFIIF auch aus der RNA-Polymerase II selbst [68]. Typische Sequenzmotive des Kernpromotors sind die TATA- und CAAT-Box sowie Initiator- (Inr) und *downstream*-Promotorelemente (DPE). Wie sich in neueren Untersuchungen herausgestellt hat, weist nur eine vergleichsweise geringe Anzahl der Promotoren alle oder einen Teil dieser Motive auf [63-65, 69]. Ein weiteres Merkmal vieler eukaryotischer Promotoren ist das Vorhandensein von CG-Dinukleotiden in Form von CpG-Inseln. Das Vorkommen dieser Dinukleotidkombination im humanen Genom ist, im Vergleich zur statistischen Erwartung für die Verteilung der einzelnen Nukleotide, unterrepräsentiert [63, 66]. Eine Erklärung hierfür ist, dass Cytosin-Nukleotide in der DNA sehr oft methyliert in

Form von 5-Methylcytosin vorliegen. Bei diesem modifizierten Nukleotid kommt es häufig zu spontanen Desaminierungen, was in einer Umwandlung von 5-Methylcytosin in Thymin resultiert. CpG-Dinukleotide bzw. CpG-Inseln sind daher nur in Bereichen zu finden, die einem Selektionsdruck durch funktionelle Mechanismen der transkriptionellen Regulation für den Erhalt dieser CpG-Dinukleotide unterliegen [63, 70]. Nach aktuellen Schätzungen besitzen etwa 79–88% der humanen Promotoren CpG-Inseln [71]. Diesen Promotoren fehlen häufig typische Sequenzmotive wie eine TATA-Box oder Inr- und DPE-Elemente [65, 69]. Überdies sind Promotoren mit CpG-Inseln häufig mit ubiquitär exprimierten Haushaltsgenen, die für die Aufrechterhaltung der grundlegenden zellulären Funktionen verantwortlich sind, assoziiert. Promotoren mit einer TATA-Box scheinen hingegen strikter und spezifischer reguliert zu werden [72]. Dies zeigt sich auch in der Tatsache, dass TATA-Box-Promotoren häufig einen deutlich definierteren TSS besitzen als CpG-Promotoren, die mehrere TSS über einen Bereich von 100 bp aufweisen können [73]. Ein weiteres Merkmal von CpG-Inseln ist das Vorhandensein multipler Bindestellen für TF der Sp1 (*Specificity protein 1*)-Proteinfamilie [69, 74, 75]. Interessanterweise ist der TSS häufig 40–80 bp stromabwärts von diesen Sp-Bindestellen lokalisiert. Es wird daher diskutiert, dass Sp1 in der Lage ist, die PIC-Bildung innerhalb eines bestimmten nicht stringent definierten Promotorbereiches zu ermöglichen [66, 69, 76].

Neben dem Kernpromotor spielen weitere *cis*-regulatorische Elemente, wie der proximale Promotor, der eine Region bis etwa -250 bp stromaufwärts des TSS umfasst sowie *Enhancer*-, *Silencer*- und *Insulator*-Elemente eine bedeutende Rolle in der RNA-Polymerase II vermittelten Transkription [64]. Die außerhalb des eigentlichen Promotorbereiches gelegenen *Enhancer*- und *Silencer*-Elemente können 10 bis 50 kb stromauf- oder stromabwärts des TSS lokalisiert sein und die Transkription, durch die Interaktion mit dem Promotor, sowohl positiv als Aktivatoren als auch negativ als Repressoren, beeinflussen [64, 77]. Für die Initiation der Transkription sind neben den sequenzspezifischen TF auch Co-Aktivatoren wie Chromatin- und Histon-modifizierende Enzyme erforderlich, die eine Remodellierung der Nukleosomenstruktur bewirken. Erst diese Umstrukturierung ermöglicht die Bindung und die Stabilisierung der basalen Transkriptionsmaschinerie [63, 78, 79].

Über die Regulation sowie über die Promotoren von Glykosyltransferasen, die an der Biosynthese von PGs beteiligt sind, ist bislang wenig bekannt. Im Jahr 2006 wurde durch Barré *et al.* erstmals der Promotor des *B3GAT3*-Gens, das für die Glukuronosyltransferase I (GlcAT-I) codiert, charakterisiert [80]. Dieses Enzym katalysiert den finalen Schritt in der Assemblierung des Tetrasaccharid-*Linkers*. Hierbei konnten funktionell bedeutende Bindestellen für TF der Sp1-Familie in Form von GC-Boxen innerhalb des proximalen Promotorbereiches identifiziert werden. Die Promotoren von Genen, die für PG-*Core*-Proteine oder andere ECM-Proteine codieren, wurden im Vergleich zu denen der Glykosyltransferasen umfangreicher untersucht. Die Regulation dieser Gene erfolgt ebenfalls häufig durch die Beteiligung von TF der

Sp1-Familie. Beispiele hierfür sind die *Core*-Proteine der HS-PGs Syndecan-1 und im Besonderen Perlecan, dessen sehr GC-reicher proximaler Promotorbereich zahlreiche Bindestellen für Sp1-TF besitzt, aber weder über eine TATA-Box noch über eine CAAT-Box verfügt [81, 82]. Sowohl an der Regulation des *VCAN*- als auch der des *BGN*-Gens, die für das CS-PG-*Core*-Protein Versican respektive das SLRP Biglycan codieren, sind ebenfalls TF der Sp1-Familie beteiligt. Überdies konnte eine bedeutende Funktion der *Activator protein 1* (AP-1)-Transkriptionsfaktorfamilie für die transkriptionelle Kontrolle beider Gene nachgewiesen werden [83-85].

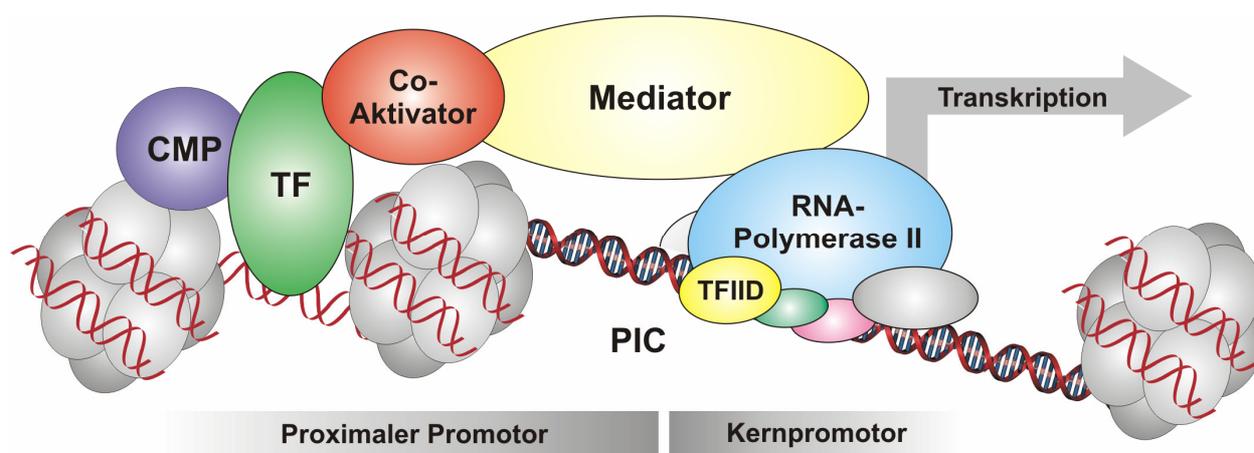


Abb. 2.6.1: Schematische Darstellung einer typischen aktiven eukaryotischen Promotorstruktur. Der Promotor kann in eine Kernpromotor-Region in der unmittelbaren Umgebung des Transkriptionsstarts (TSS) und einen benachbarten proximalen Promotorbereich mit weiteren Bindungsmotiven für Transkriptionsfaktoren gegliedert werden. Die RNA-Polymerase II und verschiedene basale Transkriptionsfaktoren (wie z.B. TFIID) assemblieren zum Präinitiationskomplex (PIC) im Bereich des Kernpromotors um den TSS. Weitere regulatorische Proteine, wie Co-Aktivatoren, sequenzspezifische Transkriptionsfaktoren (TF) und Chromatin-modifizierende Proteinkomplexe (CMP) sind an der Regulation der Transkription im Bereich des Promotors beteiligt [modifiziert nach [63]].

2.7 Transkriptionsfaktoren der Sp1- und AP-1-Familie

Die transkriptionelle Regulation erfolgt durch die Bindung und die Interaktion verschiedener Proteine an spezifische Promotor- und *Enhancer*-Elemente innerhalb der DNA-Matrize. Hierbei wird eine limitierte Anzahl *cis*-regulatorischer DNA-Elemente häufig durch mehrere strukturell verwandte Proteine erkannt [86]. Ein Beispiel hierfür sind die Zink-Finger-Proteine der Sp1-Familie (Abb. 2.2.1). Bisher sind neben Sp1 noch insgesamt sieben weitere Mitglieder dieser Familie bekannt, wobei die TF Sp1, Sp2, Sp3 und Sp4 aufgrund ihrer analogen modularen Struktur eine Subgruppe bilden [87]. Diese vier Proteine besitzen sehr ähnliche strukturelle Merkmale, wie eine hochkonservierte DNA-Bindungsdomäne, die aus drei Zink-Fingern aufgebaut ist und sich in der Nähe des C-Terminus befindet sowie serin/threonin- und glutaminreiche Domänen im Bereich der N-terminalen Region. Diese Domänen können als starke Aktivatoren fungieren [88]. Überdies konnten Murata *et al.* zeigen, dass der N-terminale Bereich auch eine inhibitorische Domäne beinhaltet [89]. Sp1 ist in der Lage, sowohl mit weiteren Sp1-Proteinen als auch mit anderen Klassen von nukleären Proteinen, wie dem TATA-Box-Bindeprotein (TBP), TBP-assoziierten Faktoren und Zellzyklusregulatoren wie p107 sowie mit einer Vielzahl anderer TF wie cJun/AP-1 und E2F, zu interagieren [90, 91].

Sp2 besitzt im Vergleich zu den anderen drei Sp-Proteinen eine geringfügig modifizierte DNA-Bindungsdomäne, wodurch es zu einer abweichenden Affinität gegenüber der Erkennungssequenz kommt. Im Gegensatz zu den anderen Mitgliedern der Sp-Familie, die primär an als GC-Boxen bezeichnete GC-reiche DNA-Elemente binden, bindet Sp2 an GT-reiche Elemente [92-94]. Eine Besonderheit innerhalb der Sp-Familie stellt der TF Sp3 dar. Bisher sind drei Isoformen bekannt, von denen die größte 110–115 kDa umfasst; die beiden kleineren besitzen hingegen eine Größe von je etwa 70–80 kDa. Wie in mehreren Studien gezeigt werden konnte, kann Sp3 die Genexpression sowohl aktivieren als auch inhibieren [95-98]. Die Gründe, wann Sp3 als Aktivator und wann als Inhibitor wirkt, sind bislang nicht vollständig aufgeklärt [91]. Es gibt Hinweise darauf, dass sowohl die Struktur und die Anordnung als auch die Anzahl der vorhandenen Bindungsmotive darüber entscheiden, ob Sp3 als starker Aktivator oder Repressor agiert [99, 100]. Auch das Verhältnis zwischen Sp1 und Sp3 scheint hierbei von entscheidendem Einfluss zu sein [91].

Im Gegensatz zu den ubiquitär vorkommenden TF Sp1 und Sp3, ist die Expression von Sp4 auf wenige Gewebetypen, wie z.B. das Gehirn, beschränkt [93, 101]. Sp4 ist überdies nicht in der Lage, eine synergetische Aktivierung durch benachbarte Bindungsstellen zu realisieren.

Im Gegensatz zu den Zink-Finger-Proteinen der Sp-Familie, besteht der Transkriptionsfaktor AP-1 aus Mitgliedern der Jun-, Fos- und *Activating transcription factor* (ATF)-Proteinfamilien [102, 103]. Die Bindung an das palindromische Sequenzmotiv 5'-TGAGTCA-3' erfolgt in Form

von Dimeren, die über basische *leucine zipper* (bZIP) Domänen gebildet werden [104] (Abb. 2.7.1). Im Gegensatz zu den Fos-Proteinen (Fos, FosB, Fra-1 und Fra-2), die nur Heterodimere mit Mitgliedern der Jun-Protein-Familien bilden können, sind Mitglieder der Jun-Familie (Jun, JunB, JunD) in der Lage sowohl Homodimere als auch Heterodimere mit Fos-Proteinen bilden [105].

Obwohl die Jun- und Fos-Proteine strukturell sehr homolog sind, weisen die einzelnen AP-1-Dimere signifikante Unterschiede sowohl in der DNA-Bindungsaffinität als auch in der Fähigkeit, die Genexpression zu aktivieren oder zu inhibieren, auf [106]. So wird z.B. von Jun-ATF-2-Dimeren das leicht, aber doch signifikant abweichende DNA-Sequenzmotif 5'-TGAGCTCA-3' erkannt, an das auch andere bZIP-TF wie z.B. der CREB (*cAMP-responsive element binding protein*)-Proteinfamilie binden [104]. Eine Beeinflussung der von AP-1 vermittelten Genexpression kann unter anderem über den Mitogen-aktivierten Proteinkinase (MAP-Kinase)-Signalweg und den TGF β -Signalweg erfolgen [107].

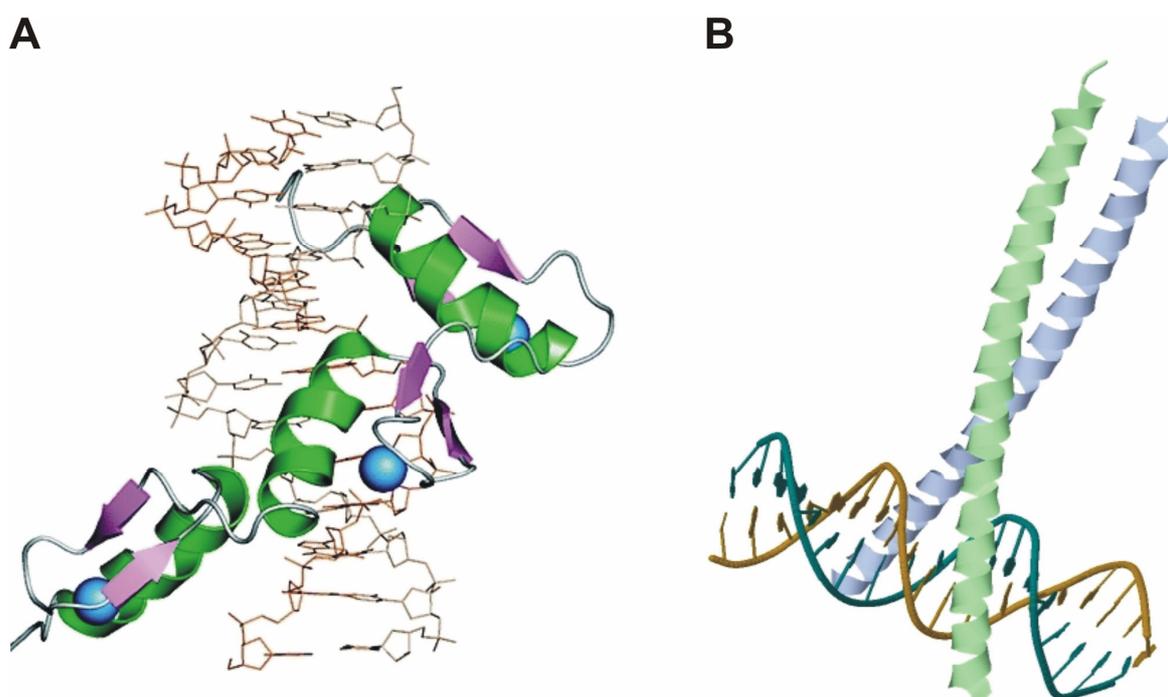


Abb. 2.7.1: (A) Auf NMR-Daten basierende Modellierung der Struktur des zu den Zink-Finger-Proteinen gehörenden Transkriptionsfaktors Sp1. Blau dargestellt ist das koordinativ gebundene Zink in den drei DNA-bindenden Domänen, die charakteristischerweise aus jeweils einer β -Faltblatt-Struktur (violett) und einer α -Helix-Anordnung (grün) aufgebaut sind (Abb. aus [108]). (B) Kristallstruktur des cJun-Homodimers. Der zu der Familie der basischen *Leucine Zipper* gehörende Transkriptionsfaktor ist im Komplex mit der AP-1-Erkennungssequenz auf der DNA-Matrize dargestellt (www.pdb.org, ID0818).

2.8 Gegenstand der Arbeit

Die Xylosyltransferasen I und II katalysieren den initialen Schritt in der Biosynthese von Glykosaminoglykanen in Proteoglykanen. Sie sind somit zentral am Aufbau der extrazellulären Matrix beteiligt. Beide Enzyme sind funktionell und strukturell sehr homolog. Bisher sind die divergenten Expressionsstärken sowohl innerhalb eines Gewebetyps als auch zwischen verschiedenen Geweben sowie eine voneinander abweichende Induzierbarkeit durch Cytokine der TGF β -Familie die einzigen bekannten Unterschiede zwischen XT-I und XT-II. Überdies gibt es bislang keine Untersuchungen über die Mechanismen oder die Unterschiede in der transkriptionellen Regulation beider Xylosyltransferasen.

Im Rahmen dieser Dissertation sollten daher erstmals die Promotoren der Xylosyltransferasen I und II identifiziert und funktionell charakterisiert werden. Hierzu wurden nach einer *in silico*-Analyse die vermutlichen regulatorischen Bereiche beider Gene mittels Gensynthese generiert bzw. über Polymeraseketten-Reaktion (PCR) amplifiziert und anschließend in ein Reporter-gen-Vektorsystem inseriert. Die Expression des Reportergens wurde in der Leberzelllinie HepG2, die ausschließlich das *XYLT2*-Gen exprimiert und in SW1353-Chondrosarkomzellen, die sowohl *XYLT1*- als auch *XYLT2*-Transkripte aufweisen, untersucht. Durch sukzessive Verkürzungen des jeweiligen Promotorbereiches erfolgte eine Identifizierung des minimalen aktiven Promotors.

In einem zweiten Schritt sollten spezifische Erkennungssequenzen für Transkriptionsfaktoren mithilfe der zielgerichteten Mutagenese modifiziert und die Auswirkungen auf Aktivitätsebene analysiert werden. Im Fall signifikanter Veränderungen der Promotoraktivität wurde die Identität der hierfür verantwortlichen Transkriptionsfaktoren durch Etablierung eines Gel-Retentions- und *Supershift*-Assays für die entsprechenden Transkriptionsfaktoren unter Verwendung spezifischer Antikörper bestimmt und verifiziert. Um die Bedeutung der *in vitro* identifizierten Transkriptionsfaktoren für die Expression der *XYLT*-Gene *in vivo* zu bestätigen, wurden verschiedene spezifische Transkriptionsfaktor-Inhibitoren und transient transfizierte siRNA gegen die entsprechenden Transkriptionsfaktor-mRNAs eingesetzt. Im Anschluss erfolgte eine Analyse der Auswirkungen auf die Expression der beiden *XYLT*-Transkripte.

Zur Aufklärung der divergenten Xylosyltransferase-Expression in verschiedenen Geweben erfolgte überdies eine Analyse der Aktivität des *XYLT1*-Promotors in der Leberzelllinie HepG2, die ausschließlich *XYLT2*-Transkripte aufweist. Unter Verwendung von Wachstumsfaktoren der TGF β -Familie wurde eine Induktion des *XYLT1*-Gens in den verwendeten SW1353-Zellen untersucht. Im Anschluss erfolgte eine Analyse der Induzierbarkeit ausgewählter *XYLT1*-Promotorfragmente durch TGF β_1 in dieser Zelllinie.

3 ERGEBNISSE

Das Verständnis der transkriptionellen Regulation der Xylosyltransferasen I und II (XT-I und XT-II) ist von großer Bedeutung, da diese Enzyme den initialen und geschwindigkeitsbestimmenden Schritt in der GAG-Biosynthese als Bestandteil von PGs katalysieren. Sie sind somit essentiell am Auf- und Umbau der ECM beteiligt. Um einen detaillierten Überblick über die Mechanismen der *XYLT1*- und *XYLT2*-Genregulation zu erhalten, ist die Kenntnis der Promotorregion und der verantwortlichen transkriptionellen Prozesse, die zu einer gesteigerten oder verminderten Expression des jeweiligen Gens führen, erforderlich.

3.1 Identifizierung der *XYLT1*-Promotorregion

Für die Charakterisierung der regulatorischen Bereiche des *XYLT1*-Gens musste zunächst die Position des proximalen *XYLT1*-Promotors ermittelt werden. Hierzu wurde eine *in silico*-Analyse der Sequenz unmittelbar 5' des *XYLT1*-Translationsstarts unter Verwendung der Software *Gene2Promotor* (<http://www.genomatix.de>) durchgeführt. Eine detaillierte Betrachtung des potentiellen Promotorbereiches von Position -1638 bis zum Translationsstart (ATG) ergab, dass typische Sequenzmotive wie eine TATA- oder CAAT-Box fehlen. Im Gegensatz dazu weisen insbesondere die ersten 300 bp stromaufwärts des ATG einen Anteil von über 78% an GC-Nukleotiden auf. Im Bereich zwischen -1638 bp und -300 bp ist dieser Anteil hingegen erheblich geringer und liegt im Durchschnitt nur bei 54% (vgl. Abb. 3.1.1 und Abb. 3.1.2).

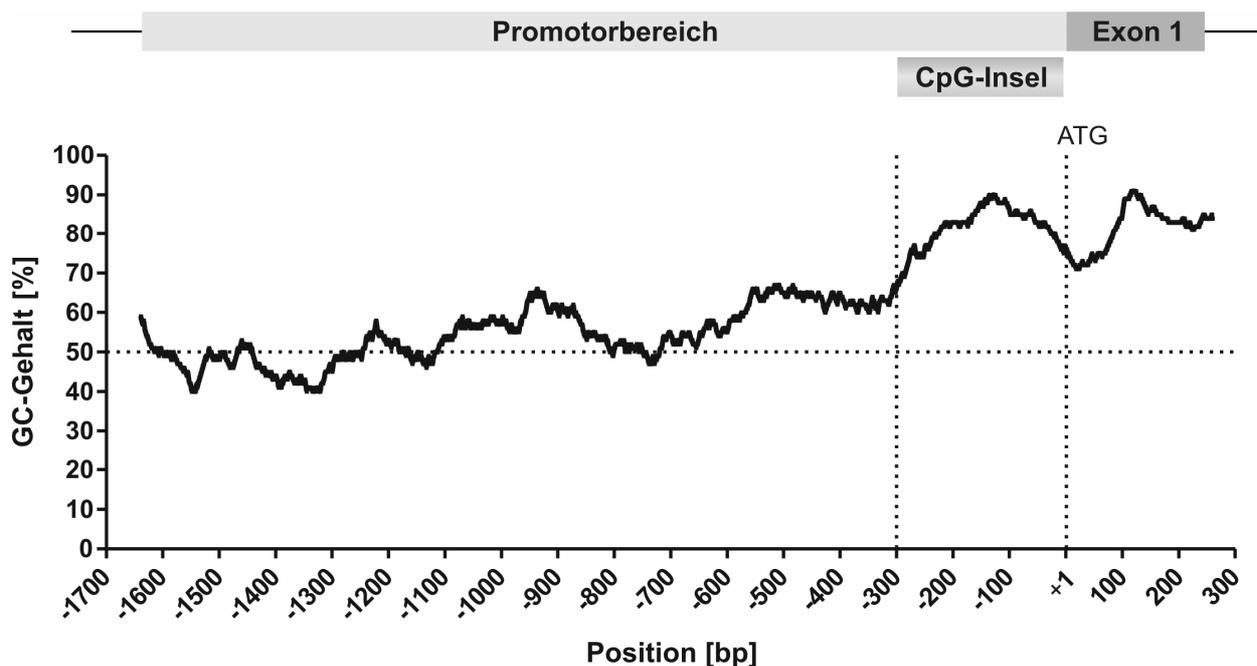


Abb. 3.1.2: Prozentualer Gehalt an GC-Nukleotiden im *XYLT1*-Promotorbereich. Dargestellt ist der Bereich von 1638 bp stromaufwärts des Translationsstartpunktes (ATG) bis 260 bp stromabwärts, die sich innerhalb des ersten Exons des *XYLT1*-Gens befinden. Die Berechnung des GC-Gehaltes erfolgte jeweils in einem Bereich von 100 bp und einer Schrittweite von 1 bp. Die horizontale Linie repräsentiert den statistisch zu erwartenden GC-Gehalt von 50%. Die beiden vertikalen Linien begrenzen den 300 bp umfassenden 5'-flankierenden Bereich des Translationsstartpunktes, der einen GC-Gehalt von über 78% aufweist und als CpG-Insel gekennzeichnet ist.

3.1.1 Eingrenzung der *XYLT1*-Promotorregion durch 5'- und 3'-Deletionskonstrukte

Für eine detaillierte Analyse und eine experimentelle Verifizierung, welche Bereiche des *XYLT1*-Promotors für die Expression des Xylosyltransferase I-Gens verantwortlich sind, wurde zunächst die Region von -1638 bp bis +1 bp stromaufwärts des *XYLT1*-Translationsstartes sowie weitere 5'-trunkierte Varianten dieser potentiellen Promotorregion mittels Gensynthese und Polymerase-Kettenreaktion (PCR) generiert (Abb. 3.1.1). Anschließend wurden sämtliche dieser Promotorvarianten *upstream* eines *Firefly*-Luziferase-Reportergens in den Vektor pGI4.10 inseriert (vgl. Abschnitt 5.1.8). Dieser Vektor besitzt ein speziell für die Expression in Säugerzellen Codon-optimiertes *Firefly*-Luziferase-Gen (*luc2*) als Reporter für die Analyse der Promotorstärke. Überdies befindet sich kein eigener Promotor stromaufwärts dieses Luziferase-Gens, so dass die transkriptionelle Regulation ausschließlich durch den inserierten Promotor erfolgt (vgl. Abschnitt 5.1.8, Abb. 5.1.1).

Zur Analyse der Promotorfunktion ist die Auswahl einer geeigneten Zelllinie, die sämtliche für die Expression des *XYLT1*-Gens erforderlichen Transkriptionsfaktoren (TF) besitzt, obligat. Aus Vorarbeiten war bekannt, dass die Chondrosarkomzelllinie SW1353 eine im Vergleich zu

anderen Zelllinien starke Expression des *XYLT1*-Gens aufweist [109]. Aus diesem Grund wurden alle Untersuchungen zur Aktivität des *XYLT1*-Promotors zunächst in dieser Zelllinie durchgeführt.

Zur Bestimmung der Aktivität der jeweiligen *XYLT1*-Promotorfragmente wurde jeweils 1 µg des pGI4.10-Vektors, der die verschiedenen Promotorkonstrukte *upstream* des *Firefly*-Luziferase-Gens beinhaltet, zusammen mit 10 ng des pGI4.74-Vektors in SW1353-Zellen transfiziert. Der pGI4.74-Vektor beinhaltet einen konstitutiv aktiven *HSV-Tk*-Promotor, dem ein *Renilla*-Luziferase-Gen nachgeschaltet ist. Durch die Co-Transfektion dieser beiden Plasmide ist eine Normalisierung der gemessenen Aktivitäten für die *Firefly*-Luziferase möglich. Hierbei wird die Aktivität der verschiedenen Promotorkonstrukte auf die konstante Expression der *Renilla*-Luziferase innerhalb eines Ansatzes bezogen und durch die Bildung eines Quotienten der beiden gemessenen relativen Lichteinheiten (RLU) die jeweilige Promotoraktivität berechnet. Durch diese Vorgehensweise lassen sich intra- und interexperimentelle Schwankungen, die z.B. durch eine unterschiedliche Transfektionseffizienz hervorgerufen werden können, auf ein Mindestmaß reduzieren. Jeweils 48 h nach der Transfektion wurden die Zellen lysiert und die jeweilige Luziferase-Aktivität mittels des *Dual-Luciferase-Assays* mit einem Luminometer detektiert.

Für die Untersuchung des *XYLT1*-Promotors wurden insgesamt neun verschiedene Konstrukte analysiert, wobei das längste Fragment die Region von -1638 bis +1 und das kürzeste die Region von -218 bis +1 stromaufwärts des *XYLT1*-Translationsstartes umfasste. Die Aktivität des promotorlosen pGI4.10-Vektors wurde als Referenzwert gleich eins gesetzt (Abb. 3.1.3). Alle weiteren relativen Promotoraktivitäten repräsentieren ein Vielfaches dieses Referenzwertes. Alle Promotoranalysen erfolgten jeweils in Dreifachstimmung und wurden mindestens in drei voneinander unabhängigen Experimenten wiederholt.

Für das größte untersuchte Fragment konnte eine 24,4 ($\pm 0,7$)-fache Induktion gemessen werden. Weitere 5'-Trunkierungen bis zu einer Fragmentgröße von 1280 bp zeigten nur marginale Aktivitätsunterschiede, wohingegen beim 1031+1-Fragment ein Aktivitätsanstieg um mehr als das Doppelte auf das 50,7 ($\pm 4,1$)-fache im Vergleich zum 1638 bp Konstrukt zu beobachten war. Eine ähnlich hohe Aktivität mit einer 44,6 ($\pm 2,7$)-fachen Induktion konnte für das Promotorfragment 797+1 ermittelt werden. Eine weitere Verkürzung um 88 bp auf eine Fragmentgröße von 709 bp bewirkte hingegen eine drastische Verminderung der gemessenen Promotoraktivität. Hier konnte nur noch eine 3,1 ($\pm 0,2$)-fache Induktion gegenüber dem promotorlosen pGI4.10-Vektor detektiert werden. Für zwei weitere verkürzte Promotorkonstrukte mit einer Länge von 601 bp bzw. 531 bp wurde eine ähnliche Luziferase-Aktivität gemessen. Für das kleinste 218 bp umfassende Konstrukt konnte hingegen keine Promotoraktivität mehr detektiert werden.

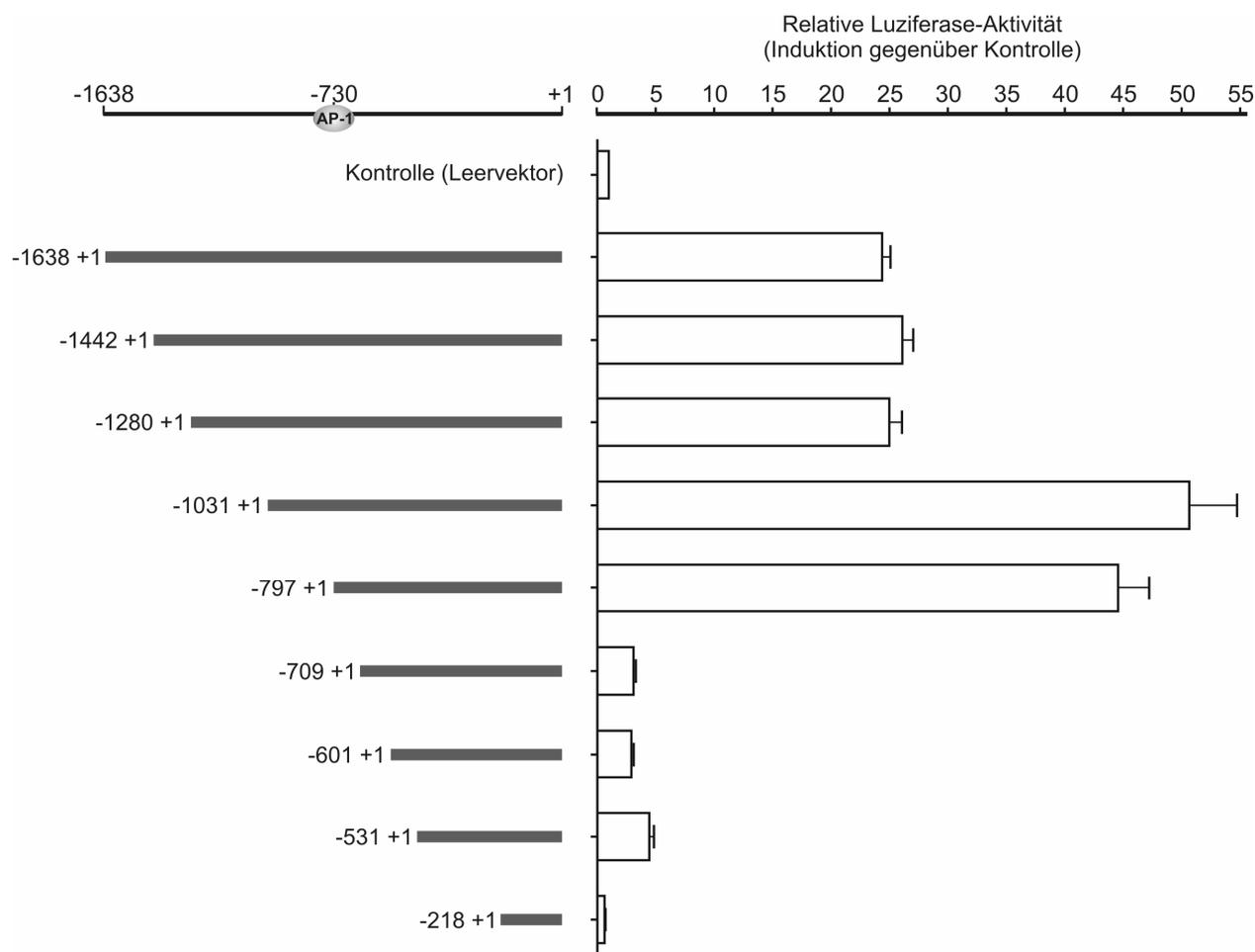


Abb. 3.1.3: Darstellung der relativen Luciferase-Aktivität in Abhängigkeit von verschiedenen 5'-Deletionskonstrukten des *XYLT1*-Promotors. Die dargestellten Aktivitäten repräsentieren die Induktion der Expression, hervorgerufen durch die neun verschiedenen Promotorfragmente im Vergleich zu dem promotorlosen pGI4.10 Vektor, dessen Aktivität gleich eins gesetzt wurde. Die ermittelten Aktivitäten ergeben sich aus dem Quotienten der relativen Lichteinheiten (RLU), die für die *Firefly*-Luciferase gemessen wurden und den RLUs der *Renilla*-Luciferase. Die angegebene Nummerierung der schematisch dargestellten Promotorbereiche entspricht dem 5'-Ende des jeweiligen *XYLT1*-Promotor-Konstrukts in Relation zum Translationsstartpunkt. Das 3'-Ende aller untersuchten Fragmente erstreckte sich jeweils bis zum Translationsstart (+1). Die Position der potentiell aktiven AP-1-Erkennungssequenz an Position -730 ist ebenfalls angegeben. Die dargestellten Werte entsprechen den gemessenen Aktivitäten aus drei voneinander unabhängigen Experimenten, die jeweils in Dreifachbestimmung durchgeführt wurden.

Aufgrund der erzielten Ergebnisse wurde untersucht, ob die den Translationsstart direkt 5'-flankierenden 218 bp einen Einfluss auf die transkriptionelle Regulation des *XYLT1*-Gens haben. Hierzu erfolgte eine 3'-Trunkierung von vier ausgewählten Promotorfragmenten um 218 Nukleotide und eine Analyse der Auswirkungen auf die Promotoraktivität (Abb. 3.1.4). Wie sich in der Analyse zeigte, führte die Deletion dieses Sequenzabschnitts sowohl für das -797+1 als auch für das -531+1 Promotorfragment zu einem erheblichen Anstieg der Luziferase-Aktivität um etwa 180% im Vergleich zur jeweils nicht-trunkierten Promotorvariante. Im Gegensatz dazu konnten für die Fragmente -709+1 bzw. -601+1 sowohl untereinander als auch im Vergleich zu den jeweils 3'-trunkierten Konstrukten nur marginale Unterschiede beobachtet werden.

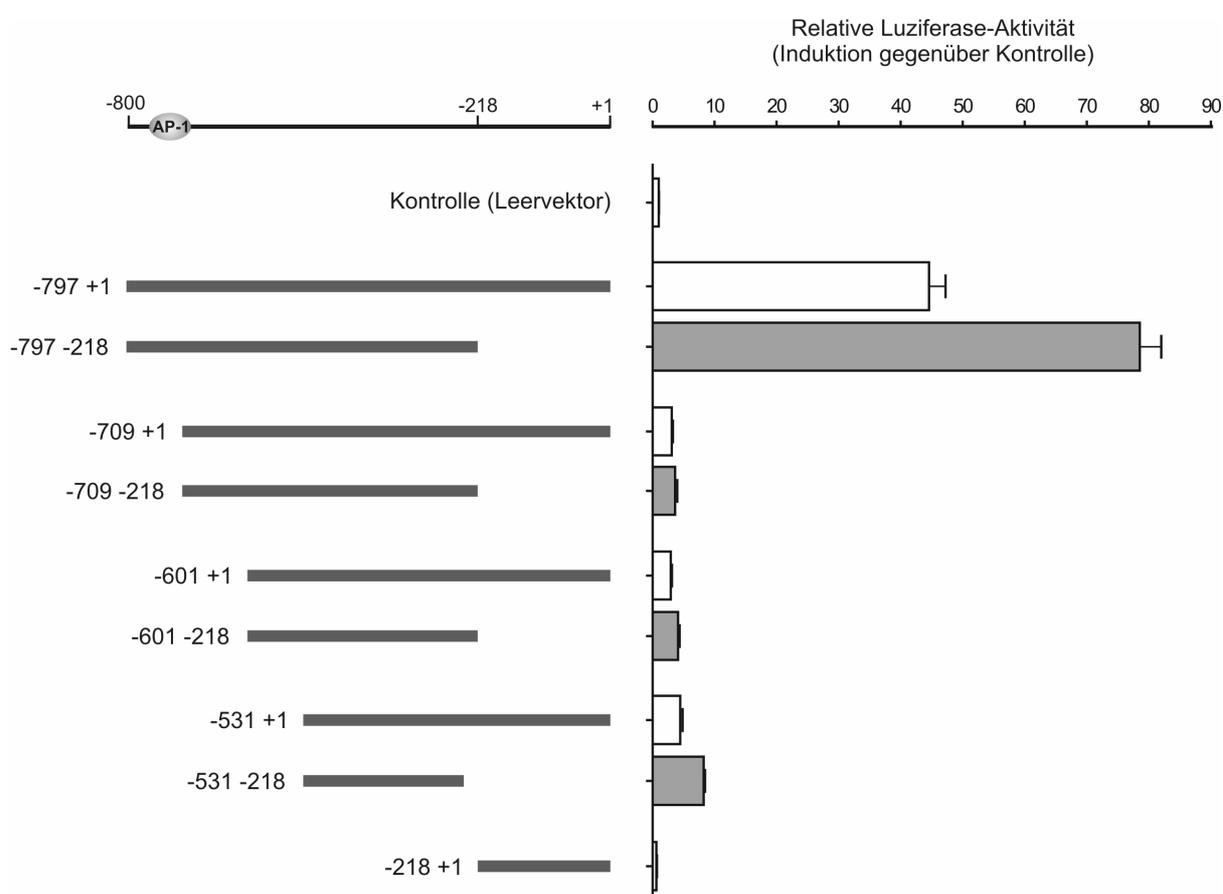


Abb. 3.1.4: Darstellung der Auswirkungen einer Deletion von 218 bp, die direkt den Translationsstart stromaufwärts flankieren, auf die transkriptionelle Regulation von vier ausgewählten Promotorkonstrukten. Die relative Luziferase-Aktivität der um 218 bp 3'-trunkierten *XYLT1*-Promotorfragmente (graue Balken) ist jeweils im Vergleich zu den nicht-trunkierten Varianten dargestellt (weiße Balken).

3.1.2 Identifizierung von *cis*-regulatorischen Bindestellen für die transkriptionelle Regulation des *XYLT1*-Promotors

Aufgrund der unter Abschnitt 3.1. und 3.1.1. erhaltenen Ergebnisse konnte der Bereich des *XYLT1*-Promotors, der essentielle Bindestellen für die transkriptionelle Regulation beinhaltet, auf 800 bp eingegrenzt werden. Da nach einer Trunkierung der *XYLT1*-Promotorregion auf 709 bp ein massiver Aktivitätsverlust beobachtet werden konnte, wurde der Bereich zwischen -797 und -709 stromaufwärts des *XYLT1*-Translationsstarts detaillierter untersucht. Durch eine Analyse dieser 88 bp langen Sequenz mittels des Programms *MatInspector* (<http://www.genomatix.com>) konnte eine Bindungsstelle für den TF AP-1 an Position -730 des *XYLT1*-Promotors mit sehr hoher Wahrscheinlichkeit identifiziert werden. Zur experimentellen Verifizierung, ob diese AP-1-Bindestelle maßgeblich an der transkriptionellen Regulation des *XYLT1*-Gens beteiligt ist, wurde diese Erkennungssequenz sowohl in dem vollständigen 797+1 als auch in dem um 218 Nukleotide 3'-trunkierten -797-218-*XYLT1*-Promotorfragment mittels zielgerichteter Mutagenese von 5'-TGACT-3' zu 5'-TGGTT-3' mutiert bzw. vollständig deletiert (vgl. Abb. 3.1.1).

In den anschließend durchgeführten Analysen konnte eine drastische Reduktion der Luziferase-Aktivität sowohl bei den mutierten Konstrukten als auch bei den Promotorfragmenten, in denen die Bindestelle für AP-1 vollständig deletiert wurde, beobachtet werden (Abb. 3.1.5). Bei der -797+1-Wildtyp-Sequenz (wt) wurde eine 44,6 ($\pm 2,7$)-fache Induktion gegenüber dem promotorlosen Vektor beobachtet, wohingegen bei dem mutierten Promotorkonstrukt nur noch eine 4,9 ($\pm 0,5$)-fache Induktion detektiert werden konnte. Dies entspricht einer um 89% reduzierten Promotoraktivität gegenüber der Wildtyp-Sequenz. Ein ähnlich starker Verlust an Promotoraktivität wurde ebenfalls bei den um 218 Nukleotide 3'-trunkierten Promotorvarianten mit einer Mutation bzw. Deletion der AP-1-Bindestelle verzeichnet. Die verbleibende basale Restaktivität der untersuchten Fragmente mit einer Mutation oder vollständigen Deletion der Bindestelle für den TF AP-1 entspricht nahezu der Aktivität, die für die 5'-trunkierten Fragmente -709+1, -601+1 und -531+1 beobachtet wurde (Abb. 3.1.4 und Abb. 3.1.5).

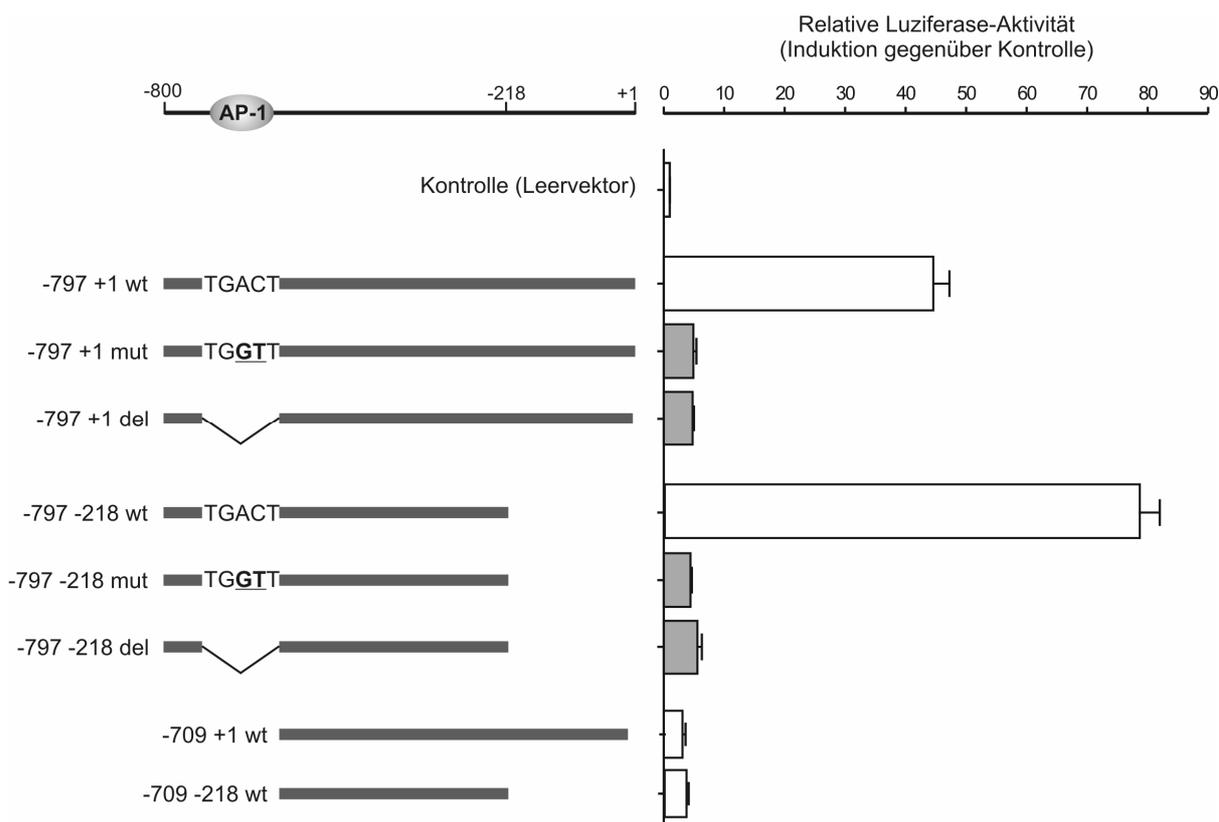


Abb. 3.1.5: Vergleich der Promotoraktivitäten der Wildtyp-Promotorsequenz (wt) des -797+1 und der um 218 Nucleotide 3'-trunkierten Form (-797 -218 wt, weiße Balken) mit den entsprechenden Konstrukten, deren AP-1-Bindestelle im *XYLT1*-Promotor an Position -730 stromaufwärts des Translationsstartes von TGACT zu TGGTT mutiert (mut) bzw. vollständig deletiert (del) wurde (graue Balken). Die Promotoraktivität der Mutations- und Deletionsvarianten entspricht nahezu der Aktivität der 5'-trunkierten Promotorfragmente -709+1 wt bzw. -709 -218 wt, die die AP-1-Bindestelle ebenfalls nicht mehr enthalten.

3.1.3 Nachweis spezifischer DNA-Protein-Bindungen im *XYLT1*-Promotor

Für den eindeutigen Nachweis, dass es an der AP-1-Bindungsstelle zu einer spezifischen Protein-DNA-Interaktion kommt, wurden *Electrophoretic mobility shift assays* (EMSA) durchgeführt. Das Prinzip dieser Methode beruht darauf, dass Protein-DNA-Komplexe in einer elektrophoretischen Auftrennung unter nativen Bedingungen langsamer laufen als die entsprechende freie DNA. Hierzu wurden zwei 32 bp lange, am 5'-Ende biotinylierte komplementäre Oligonukleotidsequenzen, die die zu untersuchende AP-1-Bindungsstelle enthielten, hybridisiert und anschließend als *Probe* in den EMSA-Experimenten eingesetzt (Abb. 3.1.6 A). Die DNA-*Probe* wurde zunächst mit nukleären Proteinisolaten (4 µg) aus SW1353-Zellen inkubiert. Nach Auftrennung der Protein-DNA-Komplexe in einem nativen 6%igen Polyacrylamidgel erfolgte eine Übertragung auf eine positiv geladene Nylonmembran und deren Detektion über ein Streptavidin-HRP (*horseradish peroxidase*)-Konjugat.

Die Ergebnisse des EMSA sind Abb. 3.1.6 B zu entnehmen. In dem Ansatz mit nukleärem Proteinextrakt war eine im Vergleich zur freien DNA (Spur 1) langsamer migrierende Bande erkennbar (Spur 2). Zur Verifizierung, dass es sich bei dem detektierten Signal um eine spezifische DNA-Protein-Interaktion handelt, wurden in verschiedenen Ansätzen nicht-biotinylierte DNA-Oligonukleotide als Kompetitoren verwendet. Durch die Zugabe eines sequenzidentischen und demzufolge spezifischen Kompetitors in einem molaren Überschuss gegenüber der Biotin-markierten DNA kommt es bei spezifischen DNA-Protein-Interaktionen zu einer Abschwächung oder völligem Ausbleiben der Banden. Dies ist darauf zurückzuführen, dass spezifische DNA-Bindeproteine vermehrt an die zugesetzte, im großen Überschuss vorliegende unmarkierte DNA binden, in deren Folge der Großteil des markierten Oligonukleotids als freie DNA vorliegt und somit kein detektierbares Signal mehr erzeugt wird.

Die Kompetitoren wurden den Ansätzen in steigendem molaren Überschuss von 50–200fach gegenüber der Biotin-markierten DNA zugesetzt und vor deren Zugabe für mindestens 20 min mit dem nukleären Extrakt inkubiert. Innerhalb dieses Zeitraumes können spezifische Bindungen an die nicht-markierten DNA-Oligonukleotide erfolgen. Wie in Abb. 3.1.6 B deutlich zu erkennen ist, war bereits die geringste Konzentration an Kompetitor-DNA ausreichend, um die Ausbildung eines Komplexes zwischen Protein und markierter DNA in detektierbaren Mengen zu verhindern (Spuren 3–6).

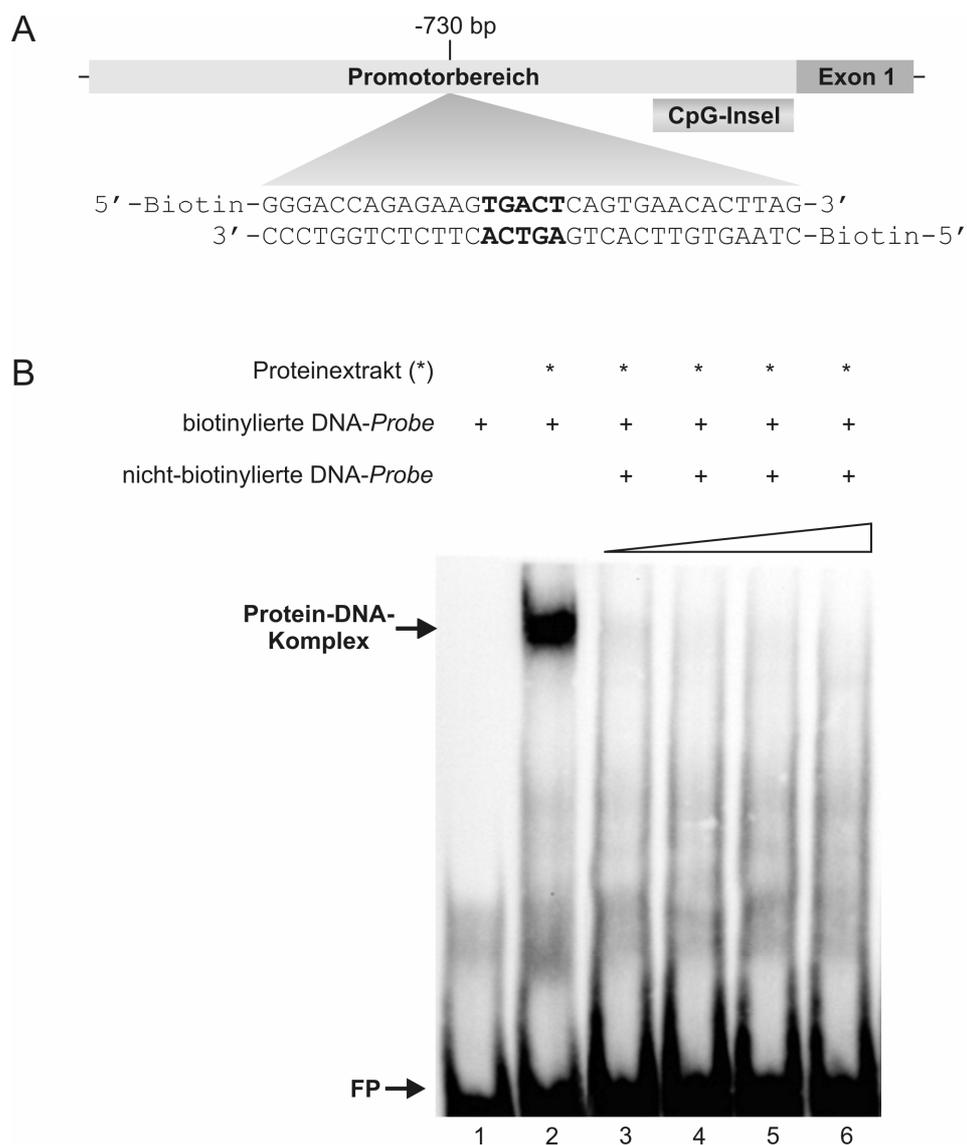


Abb. 3.1.6: Nachweis der Bindung von nukleären Proteinen an die AP-1-Erkennungssequenz. (A) Schematische Darstellung der Position der AP-1-Bindestelle im *XYLT1*-Promotor sowie des als DNA-Probe verwendeten doppelsträngigen und am 5'-Ende biotinylierten Oligonukleotids. Die Erkennungssequenz für den AP-1-Proteinkomplex ist fettgedruckt. (B) Nukleäre Proteine (4 µg) aus SW1353-Zellen wurden mit dem unter (A) angegebenen 32 bp umfassenden Biotin-markierten Oligonukleotid inkubiert und die resultierenden Protein-DNA-Komplexe mithilfe eines *Electrophoretic mobility shift assays* (EMSA) analysiert. Die freie DNA-Probe (FP, Spur 1) ist deutlich schneller migriert als das mit nukleären Proteinen inkubierte DNA-Oligonukleotid (Spur 2). Des Weiteren kommt es zu einer Abschwächung bzw. dem vollständigen Ausbleiben des Signals für den DNA-Protein-Komplex in den Ansätzen, denen nicht-markierte sequenzidentische DNA als Kompetitor zugesetzt wurde (Spuren 3–6).

Zur eindeutigen Bestimmung der Identität der an die Sequenz des *XYLT1*-Promotors bindenden Proteinspezies wurden, zusätzlich zum EMSA, *Supershift*-Experimente durchgeführt. Hierbei wird dem Inkubationsansatz aus markiertem Oligonukleotid und nukleärem Protein zusätzlich noch ein spezifischer Antikörper gegen das potentielle DNA-bindende Protein zugegeben. Da der tertiäre Komplex aus markiertem DNA-Oligonukleotid, DNA-bindendem Protein und spezifischem Antikörper noch langsamer in die Matrix des Polyacryamidgels migriert als der DNA-Protein-Komplex alleine, kommt es zu einem so genannten *Supershift*. Wie aus Abb. 3.1.7 ersichtlich, konnte neben einem deutlichen Signal für den DNA-Protein-Komplex (Spur 2) im Vergleich zum freien DNA-Oligonukleotid (Spur 1) auch ein weiteres, wesentlich langsamer migrierendes Signal detektiert werden (Spur 3). Zusätzlich zu der Inkubation mit nukleären Zellextrakten wurde das Biotin-markierte Oligonukleotid mit der Sequenz des *XYLT1*-Promotors auch mit humanem rekombinanten cJun-Protein, das ein Bestandteil des AP-1-Komplexes ist, sowie zusätzlich mit dem spezifischen Antikörper gegen cJun inkubiert. Auch in diesem Fall konnte ein Signal für den langsamer migrierenden DNA-Protein-Komplex (Spur 4) als auch ein *Supershift*-Signal für den Komplex aus Antikörper, Protein und DNA (Spur 5) erhalten werden.

Proteinextrakt (*) bzw. rekombinantes cJun(§)		*	*	§	§
biotinylierte DNA- <i>Probe</i>	+	+	+	+	+
Anti-cJun-Antikörper			+		+

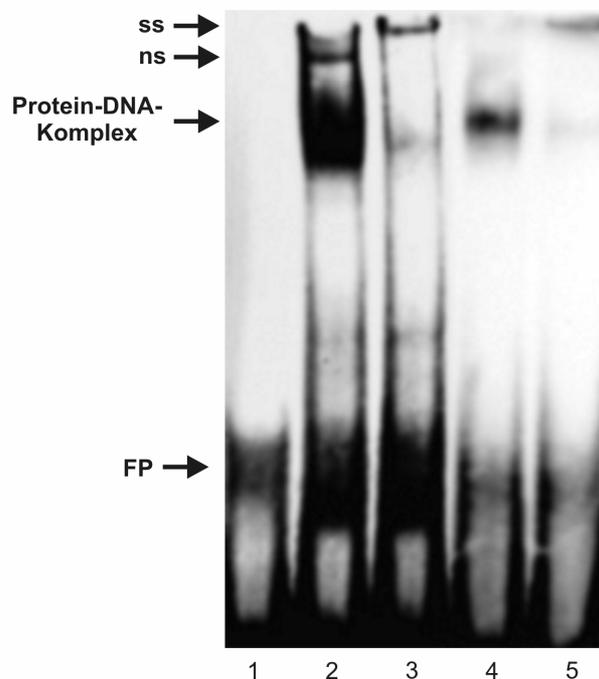


Abb. 3.1.7: Identifizierung des mit der AP-1-Sequenz des *XYLT1*-Promotors interagierenden Proteins mittels EMSA. Die 32 bp umfassende DNA-*Probe* wurde mit (a) 4 µg nukleärem Proteinextrakt aus SW1353-Zellen (Spur 2), (b) 4 µg nukleärem Proteinextrakt und 2 µg Anti-cJun-Antikörper (Spur 3), (c) 1 µg rekombinanten humanem cJun (Spur 4) und (d) 1 µg rekombinanten cJun und 2 µg Anti-cJun-Antikörper inkubiert (Spur 5). Die freie DNA-*Probe* (FP, Spur 1) ist deutlich schneller migriert als die DNA-Oligonukleotide, die entweder mit nukleärem Proteinextrakt oder mit rekombinantem cJun-Protein inkubiert wurden. In den Ansätzen, die zusätzlich einen Antikörper gegen cJun enthielten, kann in beiden Fällen ein *Supershift*-Signal (ss) sowie eine deutliche Abnahme der Bandenintensität für den Protein-DNA-Komplex beobachtet werden. ns = nicht-spezifisches Signal.

3.1.4 Wirkung von AP-1-Inhibitoren auf die native *XYLT1*-Expression

Um den Einfluss des TFs AP-1 auf die Expression des nativen *XYLT1*-Promotors zu untersuchen, wurden SW1353-Zellen für 6 h mit den AP-1-Inhibitoren Curcumin und Tanshinon IIA behandelt. Beide Substanzen wirken inhibierend auf die von AP-1 vermittelte Transkription, indem sie die Bindung des dimeren TF-Komplexes an die DNA verhindern [110, 111]. Die Quantifizierung der jeweils vorhandenen *XYLT1*-Transkripte erfolgte nach RNA-Isolierung und cDNA-Synthese mithilfe der *Real-Time quantitative* PCR. Hierbei konnte für die mit Curcumin (20 μ M) behandelten Zellen eine signifikante Reduktion der *XYLT1*-Transkripte auf 41,8% (\pm 8,5%) und für die mit Tanshinon IIA (100 μ M) behandelten Zellen auf 13,8% (\pm 1,0%) im Vergleich zu unbehandelten Zellen (Kontrolle) detektiert werden (Abb. 3.1.8).

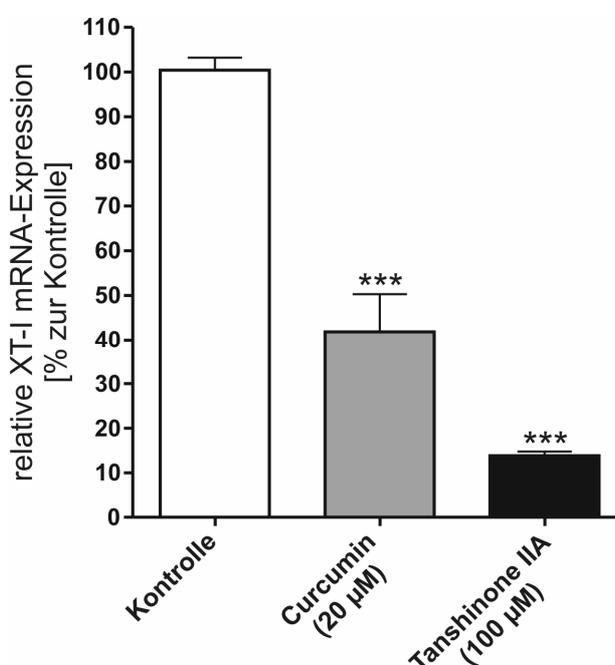


Abb. 3.1.8: Ergebnisse der *Real-Time quantitative* PCR Analyse des XT-I mRNA-Gehalts von SW1353-Zellen nach AP-1-Inhibitor-Behandlung. Die Zellen wurden für 6 h mit Curcumin (20 μ M) und Tanshinon IIA (100 μ M) behandelt. Die dargestellten Werte entsprechen dem Mittelwert mit dem zugehörigen Standardfehler aus einer Dreifachbestimmung von mindestens zwei unabhängigen Experimenten. *** $p < 0,0001$.

3.1.5 Untersuchung der Beteiligung von Mitgliedern der Sp1-Familie an der Transkription des *XYLT1*-Gens

Aufgrund des überdurchschnittlich hohen Gehalts an GC-Nukleotiden in der Region direkt stromaufwärts des *XYLT1*-Translationsstarts, wurde dieser Bereich mithilfe des Programms *MatInspector* detaillierter auf das Vorhandensein *cis*-regulatorischer Bereiche untersucht (vgl. Abb. 3.1.1 und Abb. 3.1.2). Hierbei konnten zahlreiche potentielle Bindungsstellen für TF der Sp1-Familie detektiert werden (vgl. Abb. 3.1.1). Zur Überprüfung, ob an der Regulation des *XYLT1*-Gens TF beteiligt sind, die an GC-reiche Regionen binden, wurden SW1353-Zellen mit dem aus *Streptomyces tanashiensis* stammenden Antibiotikum Mithramycin A behandelt. Mithramycin A bindet spezifisch an GC-reiche Sequenzen der DNA und inhibiert auf diese Weise selektiv die DNA-abhängige RNA-Synthese. Wie aus Abb. 3.1.9 ersichtlich, bewirkten alle eingesetzten Konzentrationen (10 nM–1 μ M) von Mithramycin A eine signifikante Reduktion des XT-I mRNA-Gehalts innerhalb der Inkubationszeit von 24 h. Die geringste Mithramycin A-Konzentration im Zellkulturüberstand (ZKÜ) von 10 nM war ausreichend, um die XT-I mRNA-Expression auf 14,0% (\pm 0,5%) im Vergleich zu einer unbehandelten Kontrolle zu reduzieren.

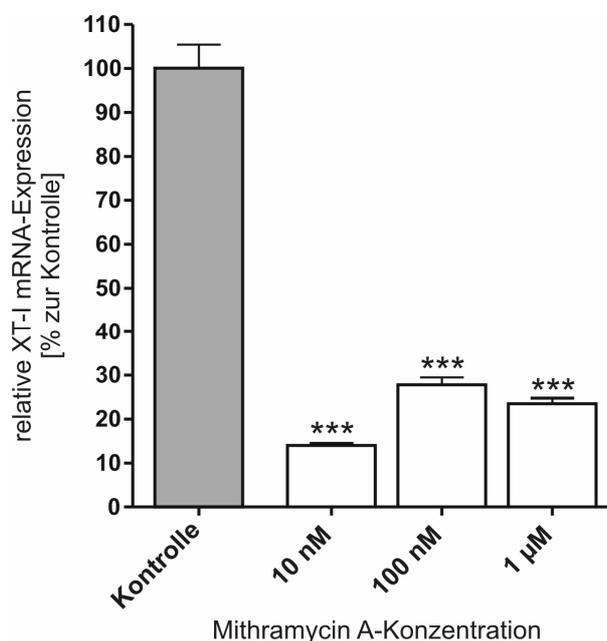


Abb. 3.1.9: Darstellung der Ergebnisse der *Real-Time quantitative* PCR-Analyse des XT-I mRNA-Gehalts von SW1353-Zellen nach Mithramycin A-Behandlung. Die Zellen wurden für 24 h mit den angegebenen Konzentrationen an Mithramycin A im Zellkulturüberstand kultiviert. Die dargestellten Werte repräsentieren den Mittelwert einer Dreifachbestimmung aus mindestens zwei unabhängigen Experimenten mit dem zugehörigen Standardfehler. *** $p < 0,0001$.

3.1.6 Analyse der Beteiligung der Transkriptionsfaktoren Sp1 und Sp3 an der transkriptionellen Regulation des *XYLT1*-Gens durch RNA-Interferenz

Aufgrund der unter Abschnitt 3.1.5 erhaltenen Ergebnisse nach Behandlung von SW1353-Zellen mit Mithramycin A wurde eine detaillierte Analyse der potentiell an der Regulation des *XYLT1*-Gens beteiligten TF mittels RNA-Interferenz durchgeführt.

Da der TF Sp2 eine von den anderen Mitgliedern der Sp-Familie divergierende Konsensussequenz für die DNA-Bindung aufweist und Sp4 primär nur in ausgewählten Gewebetypen exprimiert wird, wurde die Analyse auf die ubiquitär exprimierten Sp-Familienmitglieder Sp1 und Sp3 fokussiert. Hierzu wurde die Translation der Sp1 und Sp3 mRNA gezielt durch den Einsatz spezifischer siRNA-Oligonukleotide gegen diese TF herabreguliert und die Auswirkungen auf die Transkription des *XYLT1*-Gens untersucht. SW1353-Zellen wurden zu diesem Zweck mit kommerziellen siRNA-Oligonukleotiden transfiziert, wobei die Konzentration der jeweiligen siRNA im ZKÜ 15 nM betrug. Als Kontrolle wurde eine FAM-markierte siRNA ohne bekannte komplementäre Sequenz im humanen Genom verwendet. Mithilfe dieser Markierung konnte fluoreszenzmikroskopisch eine Transfektionseffizienz von mehr als 90% beobachtet werden. 48 h nach der Transfektion erfolgte die Analyse der Genexpression mittels *Real-Time quantitative* PCR. Hierbei konnte eine deutliche Reduktion der mRNA-Expression auf 27,4% ($\pm 1,8\%$) für Sp1 bzw. auf 29,0% ($\pm 1,0\%$) für Sp3 innerhalb der ersten 48 h nach Transfektion detektiert werden. Vergleichbar hohe Reduktionen der jeweiligen mRNAs wurden für einen Zeitraum von insgesamt 96 h beobachtet (Abb. 3.1.10). Die Analyse der Auswirkungen dieses siRNA-vermittelten *Knockdowns* auf die transkriptionelle Regulation des *XYLT1*-Gens ergab, dass die Herabregulierung des TFs Sp3 eine signifikante Reduktion der XT-I mRNA über den gesamten Analysezeitraum von 96 h zur Folge hatte. Innerhalb der ersten 48 h konnte eine Reduktion der XT-I mRNA auf 35,8% ($\pm 1,2\%$) detektiert werden; 96 h nach Transfektion wurde sogar eine Reduktion auf 29,8% ($\pm 2,4\%$) festgestellt. Im Gegensatz dazu wurde bei einer siRNA-vermittelten Herabregulierung der Sp1 mRNA zu keinem Zeitpunkt ein Einfluss auf die Transkription des *XYLT1*-Gens detektiert.

Zusätzlich zur Analyse der XT-I mRNA-Expression erfolgte die Bestimmung der XT-Aktivität im ZKÜ (Abb. 3.1.11). Hierbei konnte zu allen untersuchten Zeitpunkten ebenfalls eine deutliche Reduktion der XT-Aktivität in den mit Sp3 siRNA transfizierten Zellen beobachtet werden. Bereits 48 h nach der Transfektion wurde eine Verminderung der enzymatischen Aktivität auf 65,0% ($\pm 6,1\%$), nach 72 h auf 57,7% ($\pm 11,02\%$) und nach 96 h auf 49,7% ($\pm 4,7\%$) im Vergleich zur jeweiligen Kontrolle detektiert.

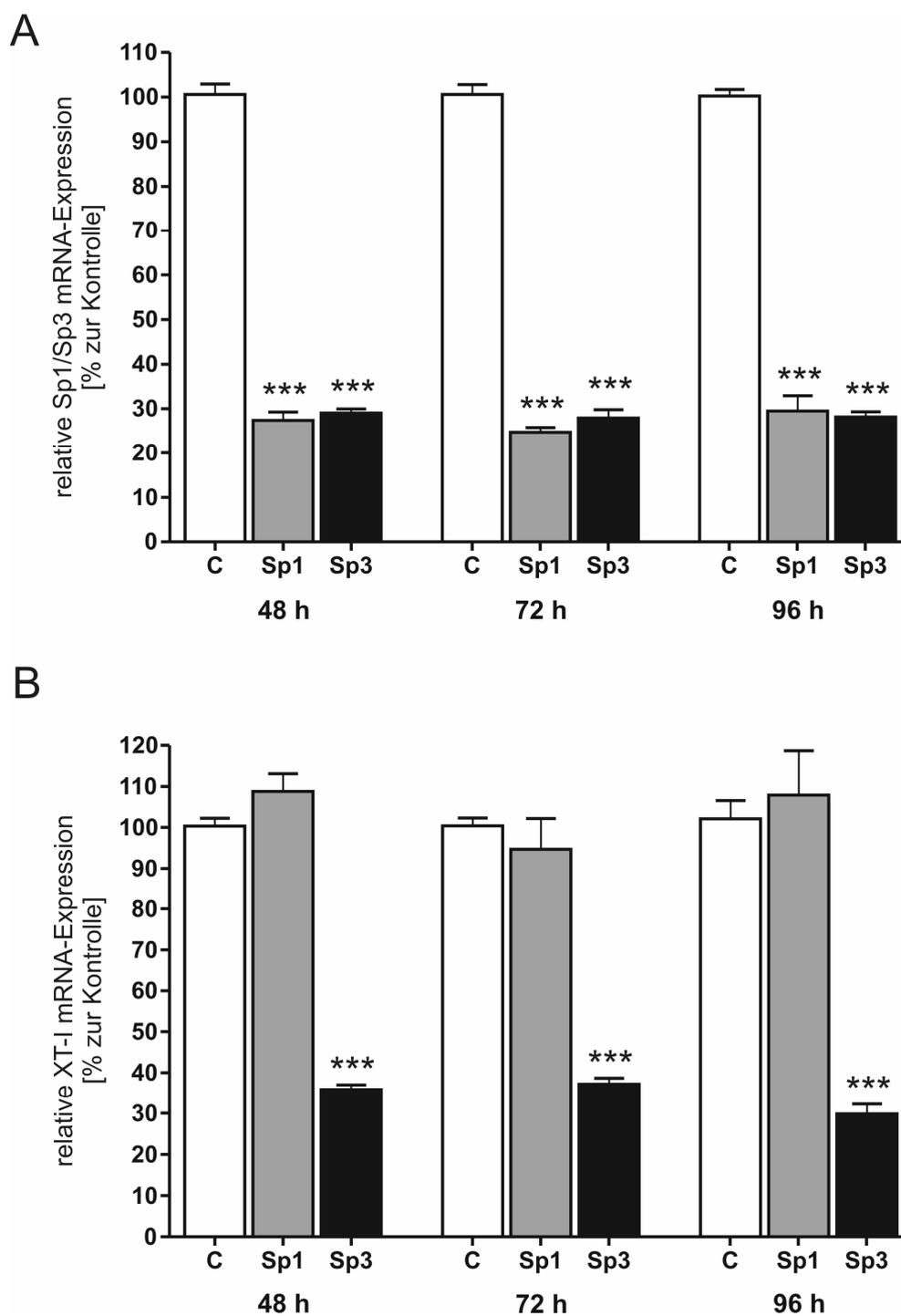


Abb. 3.1.10: Auswirkungen der durch siRNA-vermittelten Herabregulierung der Transkriptionsfaktoren Sp1 und Sp3 auf die *XYLT1*-Genexpression. (A) Ergebnisse der relativen Quantifizierung des Sp1 und Sp3 mRNA-Gehaltes von SW1353-Zellen nach Transfektion mit dem jeweiligen siRNA-Oligonukleotid im Vergleich zu einem mit Kontroll-siRNA transfizierten Ansatz. (B) Darstellung der Ergebnisse der relativen Quantifizierung der XT-I mRNA-Expression nach siRNA-vermitteltem *Knockdown* von Sp1 und Sp3. Die dargestellten Resultate sind die Mittelwerte von Triplikaten mit dem korrespondierenden Standardfehler von mindestens drei unabhängigen Experimenten zu den Zeitpunkten 48 h, 72 h und 96 h. *** $p < 0,0001$.

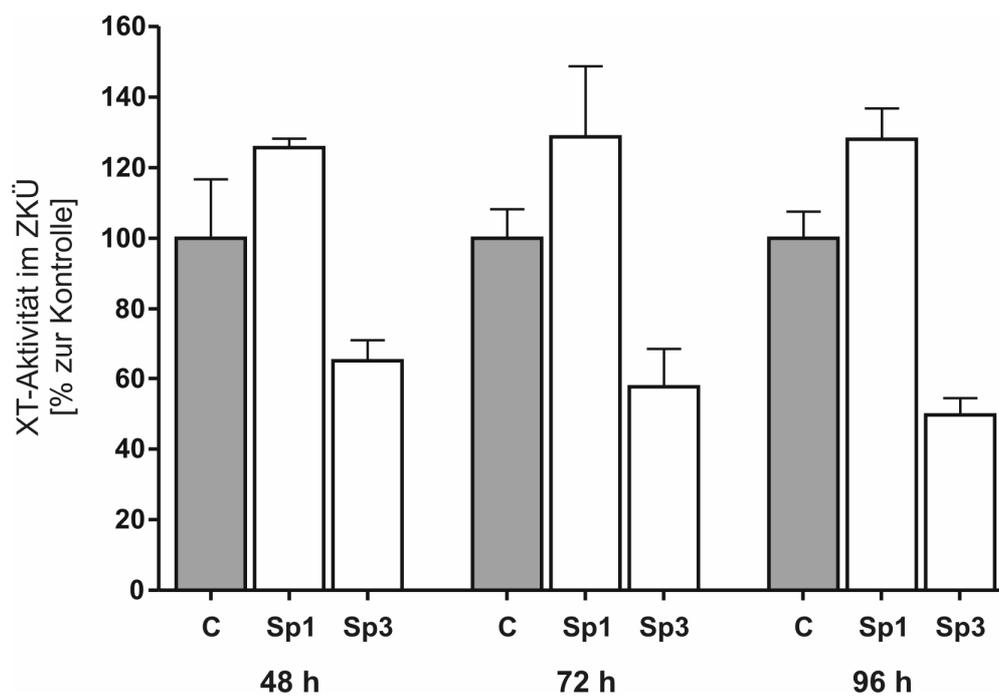


Abb. 3.1.11: XT-Aktivität im Zellkulturüberstand (ZKÜ) von SW1353-Zellen nach siRNA-vermittelter Herabregulierung der Transkriptionsfaktoren Sp1 und Sp3 im Vergleich zur Kontrolle (C, graue Balken). Die dargestellten Werte entsprechen dem Mittelwert von Triplikaten mit der korrespondierenden Standardabweichung zu den Zeitpunkten 48 h, 72 h und 96 h.

3.1.7 Untersuchung der Aktivität des *XYLT1*-Promotors in HepG2-Zellen

Wie bereits in den Abschnitten 2.5 und 1.1 erwähnt, konnten weder im murinen bzw. humanem Lebergewebe noch in der humanen Hepatoma-Zelllinie HepG2 nennenswerte Mengen an *XYLT1*-Transkripten detektiert werden. Zur Untersuchung, inwieweit hierfür der regulatorische Bereich des Xylosyltransferase I-Gens verantwortlich ist, wurde sowohl das längste 1638 bp umfassende *XYLT1*-Promotorfragment als auch das -797+1-Promotorfragment, welches annähernd die höchste gemessene Promotoraktivität in SW1353-Zellen aufwies, in HepG2-Zellen transfiziert und die korrespondierenden relativen Luziferase-Aktivitäten bestimmt.

Beide Konstrukte wiesen eine relativ starke Induktion der Luziferase-Expression in der Chondrosarkoma-Zelllinie SW1353 auf, die eine vergleichsweise hohe XT-I mRNA-Expression besitzt. Für das -1638+1-Promotorkonstrukt wurde eine 24,4 ($\pm 0,7$)-fache Induktion und für das -797+1-Fragment eine 44,6 ($\pm 2,7$)-fache Induktion gegenüber dem promotorlosen und als Kontrolle mitgeführten pGI4.10-Vektor nachgewiesen. Im Gegensatz dazu konnte für keines dieser Fragmente in HepG2-Zellen eine über dem Niveau der Kontrolle liegende relative Luziferase-Aktivität detektiert werden (Abb. 3.1.12).

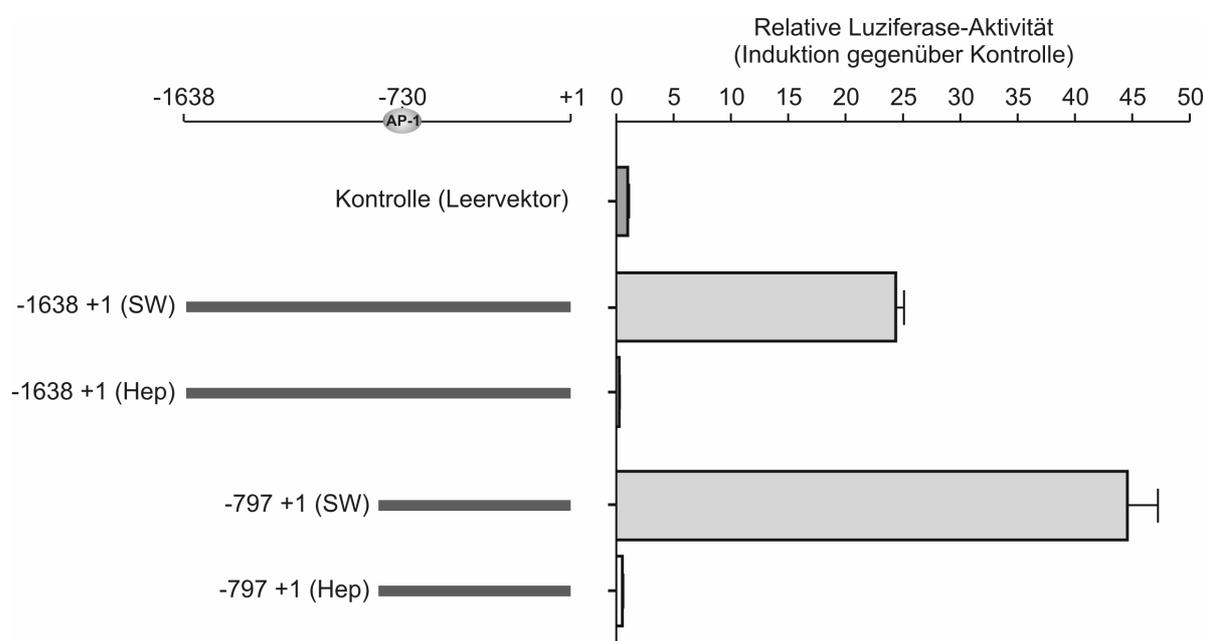


Abb. 3.1.12: Vergleichende Darstellung der relativen Luziferase-Aktivitäten in SW1353-Chondrosarkomazellen (SW) und HepG2-Hepatomaazellen (Hep), hervorgerufen durch die *XYLT1*-Promotorfragmente -1638+1 und -797+1 im Vergleich zum promotorlosen, als Kontrolle fungierenden Reporter-gen-Vektor pGI4.10.

3.2 Identifizierung der *XYLT2*-Promotorregion

Die Lokalisation des proximalen *XYLT2*-Promotorbereiches erfolgte analog zu der für das *XYLT1*-Gen durchgeführten *in silico*-Analyse mittels der Software *Gene2Promotor*. Auch hier zeigte eine detaillierte Betrachtung der potentiellen Promotorregion von Position -2568 bis +2, dass keine typischen Promotorelemente wie eine TATA- oder CAAT-Box vorhanden sind. Eine Analyse der Basenzusammensetzung offenbarte hingegen, dass der Gehalt an G- und C-Nukleotiden innerhalb der ersten 550 bp unmittelbar stromaufwärts des ATG 74% und innerhalb der ersten 250 bp sogar 81% beträgt. Das Vorkommen von GC-Nukleotiden stromaufwärts dieses Bereichs, von Position -550 bis -2568, zeigte hingegen einen deutlich niedrigeren prozentualen GC-Gehalt von 47% (vgl. Abb. 3.2.1 und Abb. 3.2.2).

Neben der Charakterisierung des potentiellen Promotorbereiches erfolgte überdies auch eine Identifizierung des Transkriptionsstartpunktes (TSS) mittels 5'-RACE (*rapid amplification of cDNA ends*) (vgl. Abb. 5.1.2). Hierzu wurde mRNA verwendet, die zuvor aus humanen Zellen isoliert wurde. Nach erfolgter cDNA-Synthese mittels spezifischer Oligonukleotide wurden die entsprechend amplifizierten Fragmente in pCR2.1TOPO-Vektoren inseriert und anschließend sequenziert. Hierdurch konnte die Position des potentiellen TSS unmittelbar 13 bp stromaufwärts des *XYLT2*-Translationsstartes lokalisiert werden (vgl. Abb. 3.2.1).

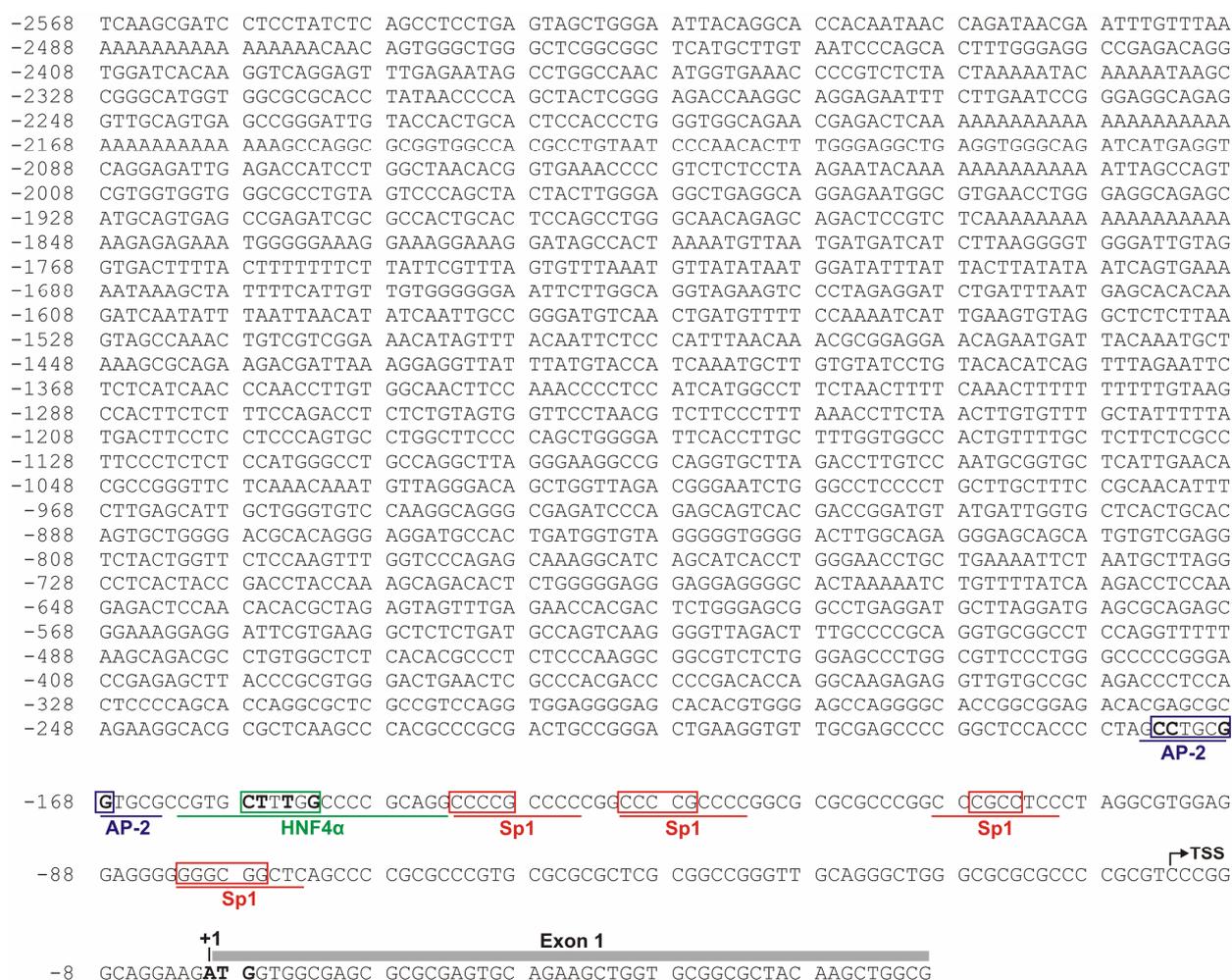


Abb. 3.2.1: Nukleotidsequenz der 5'-flankierenden Region des humanen *XYL2*-Gens. Dargestellt ist der Sequenzbereich von -2568 bp stromaufwärts bis +51 bp stromabwärts des *XYL2*-Translationsstarts (ATG). Dieser Bereich ist zwischen den Nukleotiden 48.420.934 und 48.423.552 auf Chromosom 17 lokalisiert (*GenBank accession no.* NC_000017.10). Die Sequenzen einiger potentieller Transkriptionsfaktorbindestellen sind unterstrichen. Die mit einem roten Rechteck gekennzeichneten Nukleotide innerhalb der Erkennungssequenz für Transkriptionsfaktoren der Sp1-Familie wurden in weiteren Experimenten zu einer *EcoRI*-Restriktionsschnittstelle (GAATTC) mutiert. Für die potentielle AP-2 und HNF4α-Erkennungssequenz erfolgte eine Mutation der fettgedruckten Nukleotide zu AGTGCTC bzw. TCTAGA (vgl. Abschnitt 3.2.3). Der potentielle Transkriptionsstartpunkt (TSS) ist durch einen Pfeil gekennzeichnet.

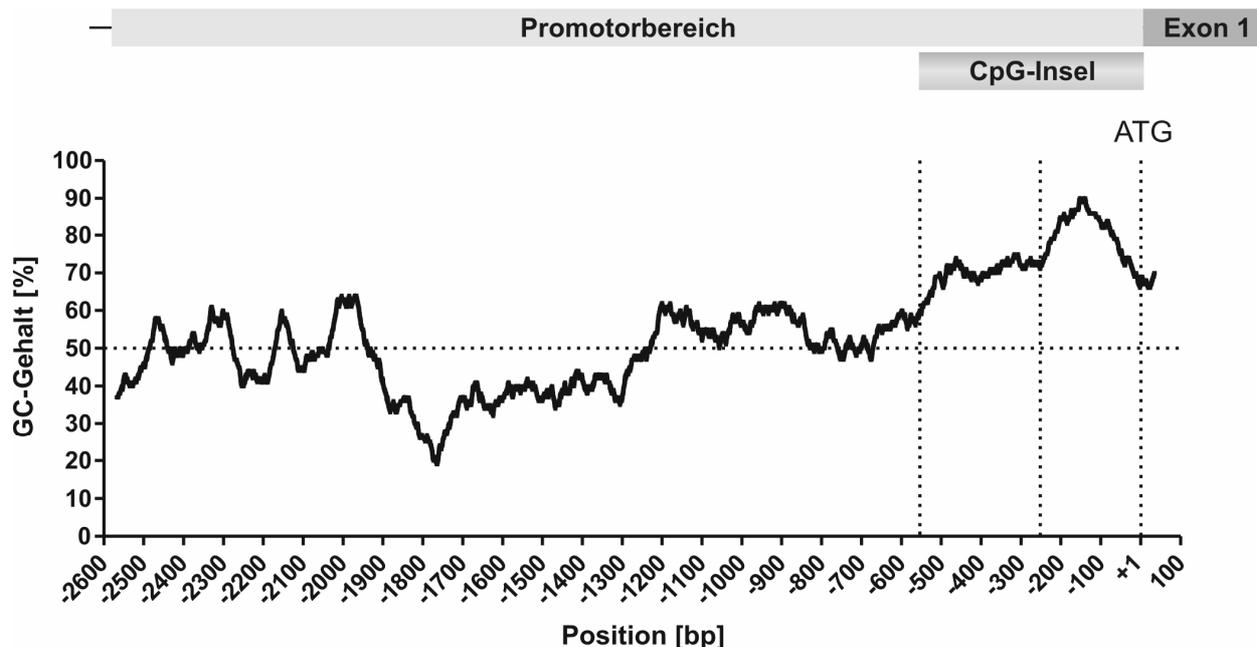


Abb. 3.2.2: Darstellung der prozentualen Verteilung an GC-Nukleotiden im *XYLT2*-Promotorbereich. Die Lokalisation der gezeigten Region entspricht dem Bereich von -2568 bp stromaufwärts bis +35 bp stromabwärts des *XYLT2*-Translationsstartpunktes (ATG). Der jeweilige prozentuale Gehalt von G- und C-Nukleotiden wurde jeweils für einen Bereich von 100 bp und einer Schrittweite von 1 bp berechnet. Der statistisch zu erwartende durchschnittliche GC-Gehalt von 50% wird durch eine horizontale Linie dargestellt. Die beiden äußeren vertikalen Linien begrenzen den als CpG-Insel bezeichneten Bereich mit einem Anteil von 74% an GC-Nukleotiden. Die mittlere vertikale Linie verdeutlicht einen nochmaligen Anstieg des GC-Gehaltes innerhalb der ersten 250 bp umfassenden Region stromaufwärts des *XYLT2*-Translationsstarts auf 81%.

3.2.1 Eingrenzung der *XYLT2*-Promotorregion durch 5'-Deletionskonstrukte

Zur Durchführung einer umfassenden funktionellen Analyse der potentiellen *XYLT2*-Promotorregion wurde zunächst der Bereich von Position -2568 bis +2 stromaufwärts des *XYLT2*-Translationsstartes mittels PCR amplifiziert (Abb. 3.2.1). Analog zur Charakterisierung des *XYLT1*-Promotors wurde dieses Konstrukt sowie neun weitere 5'-trunkierte Promotorfragmente *upstream* des *Firefly*-Luziferase-Gens in den Vektor pGI4.10 inseriert. Für die Analyse der Promotorfunktion wurde zunächst die humane Hepatomazelllinie HepG2 verwendet. Vergleichbar zum murinen und humanen Lebergewebe, weist diese Zelllinie eine relativ hohe XT-II mRNA-Expression auf, wohingegen nahezu keine *XYLT1*-Transkripte nachweisbar sind [47, 112]. Aus diesem Grund kann davon ausgegangen werden, dass alle zur Expression des *XYLT2*-Gens nötigen TF in ausreichendem Umfang vorliegen. Die Untersuchung der Aktivität der *XYLT2*-Promotorfragmente erfolgte mittels des bereits unter Abschnitt 3.1.1 beschriebenen Verfahrens unter Verwendung des *Dual-Luciferase-Assays*.

Das Promotorfragment -177+2 wies hierbei die höchste Aktivität auf und wurde als 100% definiert (Abb. 3.2.3, grauer Balken). Für das längste generierte Fragment -2568+2 konnte nur eine deutlich geringere Aktivität, die 18,2% ($\pm 0,8\%$) des -177+2-Konstrukts entsprach, detektiert werden. Eine sukzessive Verkürzung des -2568+2-Promotorfragmentes führte zu einer kontinuierlichen Steigerung der gemessenen relativen Luziferase-Aktivität bis zu einem Maximum beim -177+2-Konstrukt. Eine weitere Trunkierung um 37 bp (-140+2-Fragment) hatte hingegen einen erheblichen Aktivitätsverlust um mehr als die Hälfte auf 46,5% ($\pm 4,2\%$) zur Folge. Diese Entwicklung konnte ebenfalls für die weiteren 5'-trunkierten Promotorvarianten -140+2, -127+2 und -104+2 beobachtet werden. Für das -75+2-Promotorfragment wurde noch eine basale Aktivität von 15,6% ($\pm 0,6\%$) im Vergleich zum -177+2-Konstrukt detektiert, wohingegen eine weitere 5'-Trunkierung um 32 bp (-43+2-Fragment) zu einem vollständigen Verlust der Promotor-Aktivität führte.

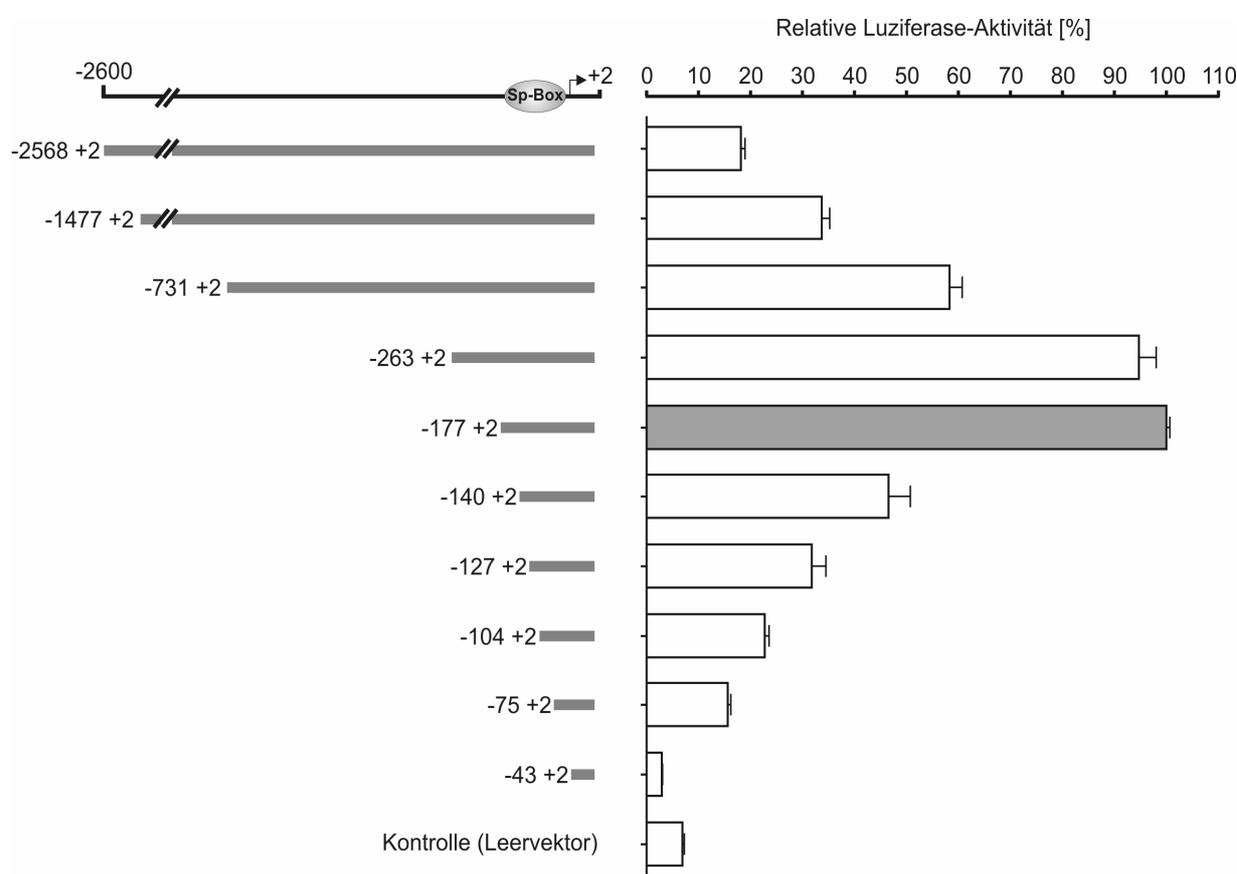


Abb. 3.2.3: Darstellung der relativen Luziferase-Aktivität verschiedener 5'-trunkierter Konstrukte des *XYL T2*-Promotors in HepG2-Zellen. Die dargestellten Werte repräsentieren den prozentualen Anteil an der Aktivität des Fragmentes -177+2 (grauer Balken), das die höchste gemessene Aktivität aufwies und als 100% definiert wurde. Die angegebene Nummerierung der schematisch dargestellten Promotorfragmente entspricht der jeweiligen Position im *XYL T2*-Promotor, ausgehend vom Translationsstartpunkt. Als Kontrolle ist zusätzlich die Aktivität des promotorlosen Vektors pGI4.10 dargestellt. Die Bestimmung der relativen Luziferase-Aktivität erfolgte jeweils in einer Dreifachbestimmung in mindestens drei voneinander unabhängigen Experimenten. Der Bereich mit den potentiellen Erkennungssequenzen für Transkriptionsfaktoren der Sp1-Familie ist als Sp-Box gekennzeichnet.

3.2.2 Eingrenzung der *XYLT2*-Promotorregion durch 3'-Deletionskonstrukte

Basierend auf den Ergebnissen, die unter Abschnitt 3.2.1 beschrieben wurden, konnte für das Promotorfragment -177+2 die höchste Luziferase-Aktivität detektiert werden. Zur Untersuchung, ob dieser Bereich des *XYLT2*-Promotors eine essentielle Bedeutung für die Regulation des *XYLT2*-Gens besitzt, erfolgte eine Deletion dieses Bereiches durch 3'-Trunkierung der beiden Fragmente -1477+2 und -731+2 um 192 bp.

In den durchgeführten Aktivitätsanalysen der jeweils 3'-trunkierten Konstrukte -1477 -191 und -731 -191 konnte lediglich eine relative Luziferase-Aktivität von 2,0% ($\pm 0,1\%$) bzw. 6,8% ($\pm 0,2\%$) detektiert werden (Abb. 3.2.4). Dies entspricht, speziell im Vergleich zur Aktivität des als zusätzliche Kontrolle verwendeten promotorlosen pGI4.10-Vektors, nahezu einem vollständigen Verlust der Promotor-Aktivität. Im Gegensatz dazu wiesen die nicht-verkürzten Promotorfragmente -1477+2 und -731+2 eine relative Luziferase-Aktivität von 33,7% ($\pm 1,5\%$) bzw. 58,3% ($\pm 2,4\%$) im Vergleich zum -177+2-Konstrukt auf.

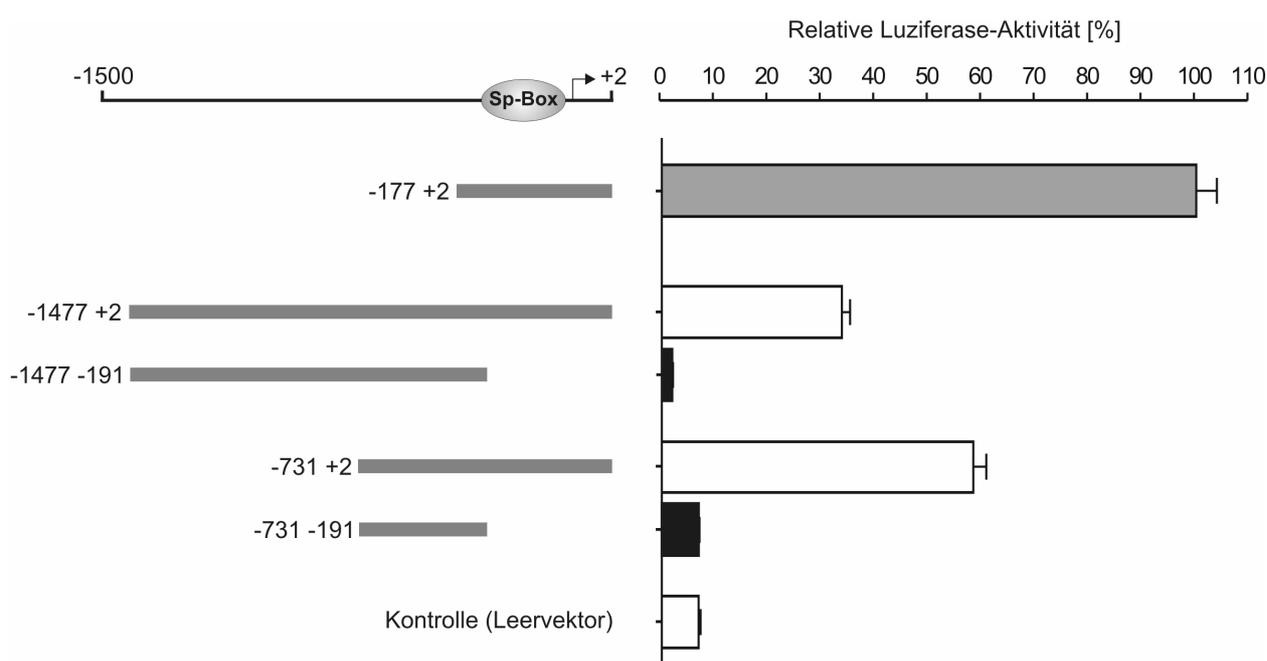


Abb. 3.2.4: Auswirkungen einer 3'-Trunkierung von 192 bp auf die relative Luziferase-Aktivität verschiedener Promotorfragmente (schwarze Balken) im Vergleich zu den unverkürzten Fragmenten (weiße Balken). Zusätzlich sind die Aktivitäten des promotorlosen pGI4.10-Vektors (Kontrolle) und die des -177+2-Fragments (grauer Balken), das zahlreiche Erkennungssequenzen für Transkriptionsfaktoren der Sp-Familie enthält (Sp-Box), mit dargestellt.

Für eine weitere Eingrenzung der Position potentiell aktiver TF-Bindestellen wurden weitere 3'-trunkierte Konstrukte, ausgehend vom -177+2-Promotorfragment, generiert und mittels des *Dual-Luciferase-Assays* analysiert. Für Konstrukte, die einen Bereich von -177 bis -58 bzw. -177 bis -108 bp umfassten, wurden noch Luziferase-Aktivitäten von 83,3% ($\pm 2,0\%$) bzw. 79,9% ($\pm 3,9\%$) im Vergleich zum -177+2-Fragment nachgewiesen. Im Gegensatz dazu konnte für die Fragmente -177-127 und -177-140 nur noch eine relative Luziferase-Aktivität von 18,3% ($\pm 1,0\%$) bzw. 6,1% ($\pm 0,7\%$) gemessen werden. Im Vergleich zur Aktivität des als Kontrolle mitgeführten promotorlosen pGI4.10-Vektors, der eine vektorbedingte Luziferase-Aktivität von 6,9% ($\pm 0,4\%$) aufwies, entspricht dies einem totalen Verlust der transkriptionellen Aktivität für das Fragment -177-140.

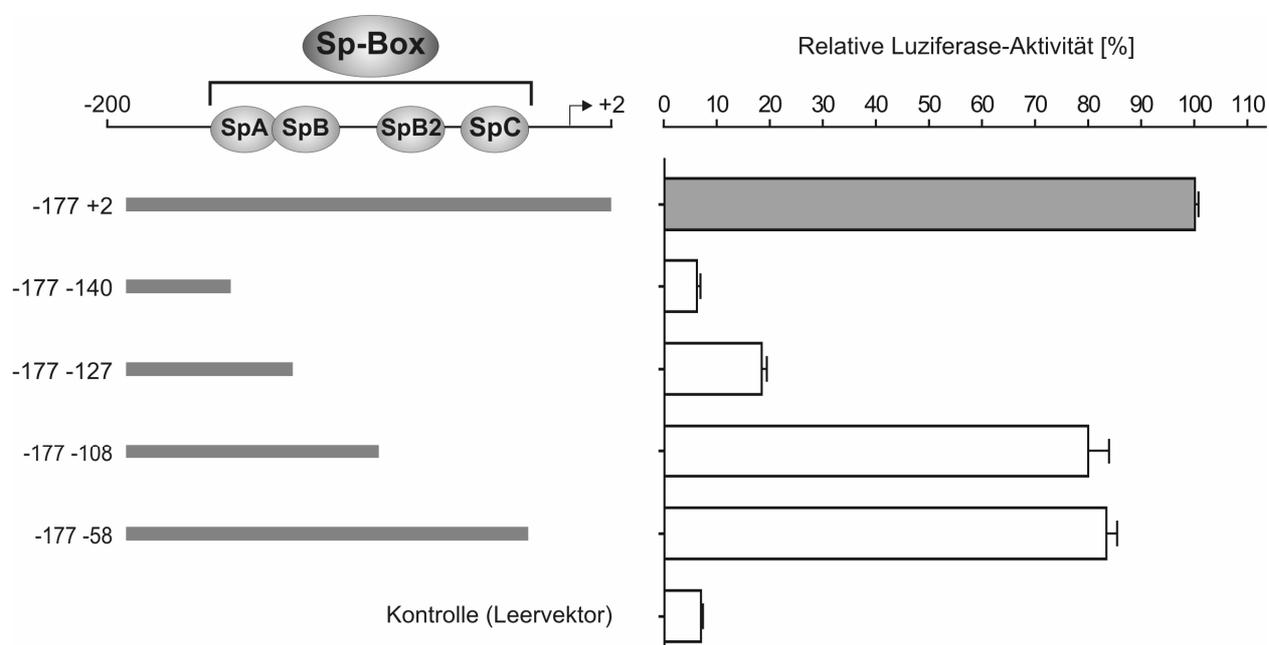


Abb. 3.2.5: Darstellung der relativen Luziferase-Aktivitäten von vier verschiedenen 3'-trunkierten *XYLT2*-Promotorvarianten im Vergleich zum vollständigen -177+2-Konstrukt (grauer Balken). Ferner sind vier potentiell aktive Erkennungssequenzen für Transkriptionsfaktoren der Sp1-Familie im Bereich der als Sp-Box bezeichneten Region dargestellt.

3.2.3 Identifizierung potentiell aktiver Transkriptionsfaktor-Bindestellen im *XYLT2*-Promotor

Unter Einbeziehung der in den Abschnitten 3.2.1 und 3.2.2 beschriebenen Resultate für die Eingrenzung des *XYLT2*-Promotorbereiches erfolgte eine genaue Analyse der Region zwischen den Nukleotiden -177 und -58 stromaufwärts des Translationsstartes mittels der Software *MatInspector*. Hierdurch war die Identifizierung von vier potentiell aktiven Bindestellen für TF der Sp1-Familie sowie jeweils einer Bindestelle für TF der AP-2-Familie und den TF HNF4 α möglich. Zur Verifizierung, welche dieser Bindestellen in HepG2-Zellen aktiv und in welchem Ausmaß sie an der transkriptionellen Aktivierung des *XYLT2*-Gens beteiligt sind, wurden zunächst sukzessive sämtliche Bindestellen für TF der Sp-Familie (bezeichnet als SpA, SpB, SpB2 und SpC) in dem Promotorfragment -177+2 mutiert. Die im Anschluss durchgeführten Analysen der relativen Luziferase-Aktivität zeigten, dass die Mutation der SpA-Bindestelle eine Reduktion der Promotoraktivität auf 33,0% ($\pm 0,8\%$) gegenüber der Wildtyp-Sequenz zur Folge hatte (Abb. 3.2.6). Ein Basenaustausch in der SpB- und SpB2-Erkennungssequenz resultierte hingegen in einer geringen Abschwächung der transkriptionellen Aktivierung. Hier konnte eine verbleibende Aktivität von 72,2% ($\pm 2,6\%$) bzw. 84,6% ($\pm 3,1\%$) detektiert werden. Im Gegensatz dazu wurde für das Fragment mit einer Mutation in der als SpC bezeichneten Bindestelle sogar eine Steigerung der relativen Luziferase-Aktivität um fast 20% auf 119,3% ($\pm 5,7\%$) festgestellt.

Um die Auswirkungen einer möglichen Interaktion zwischen den TF zu untersuchen, die an die unterschiedlichen Sp-Erkennungssequenzen binden, wurden verschiedene Kombinationen der Sp-Bindungsmotive mutiert. Die durchgeführten Promotoranalysen zeigten, dass ein gleichzeitiger Basenaustausch in den Bindestellen SpA und SpB eine Verminderung der Luziferase-Aktivität auf 47,8% ($\pm 1,5\%$) zur Folge hatte. Dies entspricht einem um etwa 15% geringeren Verlust an transkriptioneller Aktivität als für die alleinige Mutation der SpA-Bindestelle beobachtet wurde. Ein ähnliches Ergebnis wurde auch für das Konstrukt, in dem die drei Erkennungsmotive SpA, B und B2 mutiert wurden, erhalten. Hier konnte eine vergleichbare Verminderung der Reporteragen-Aktivität auf 44,6% ($\pm 2,3\%$) detektiert werden. Im Gegensatz dazu wurde für das Promotorfragment, das jeweils eine Mutation in SpA und SpB2 enthielt, eine vergleichbare Reduktion der relativen Luziferase-Aktivität auf 37,2% ($\pm 2,4\%$) verzeichnet, wie für die alleinige Mutation der SpA-Erkennungssequenz. Ein gleichzeitiger Basenaustausch in den potentiellen TF-Bindestellen SpB und SpB2 scheint hingegen einen additiven Effekt zu besitzen. Hier konnte eine Verminderung der Reporteragenaktivität auf 52,2% ($\pm 1,9\%$) detektiert werden. Dies entspricht in etwa dem kumulativen Verlust an relativer Luziferase-Aktivität, hervorgerufen durch die jeweils singuläre Mutation von SpB und SpB2, die zusammengenommen einer Reduktion der Promotoraktivität auf 56,8% entspräche.

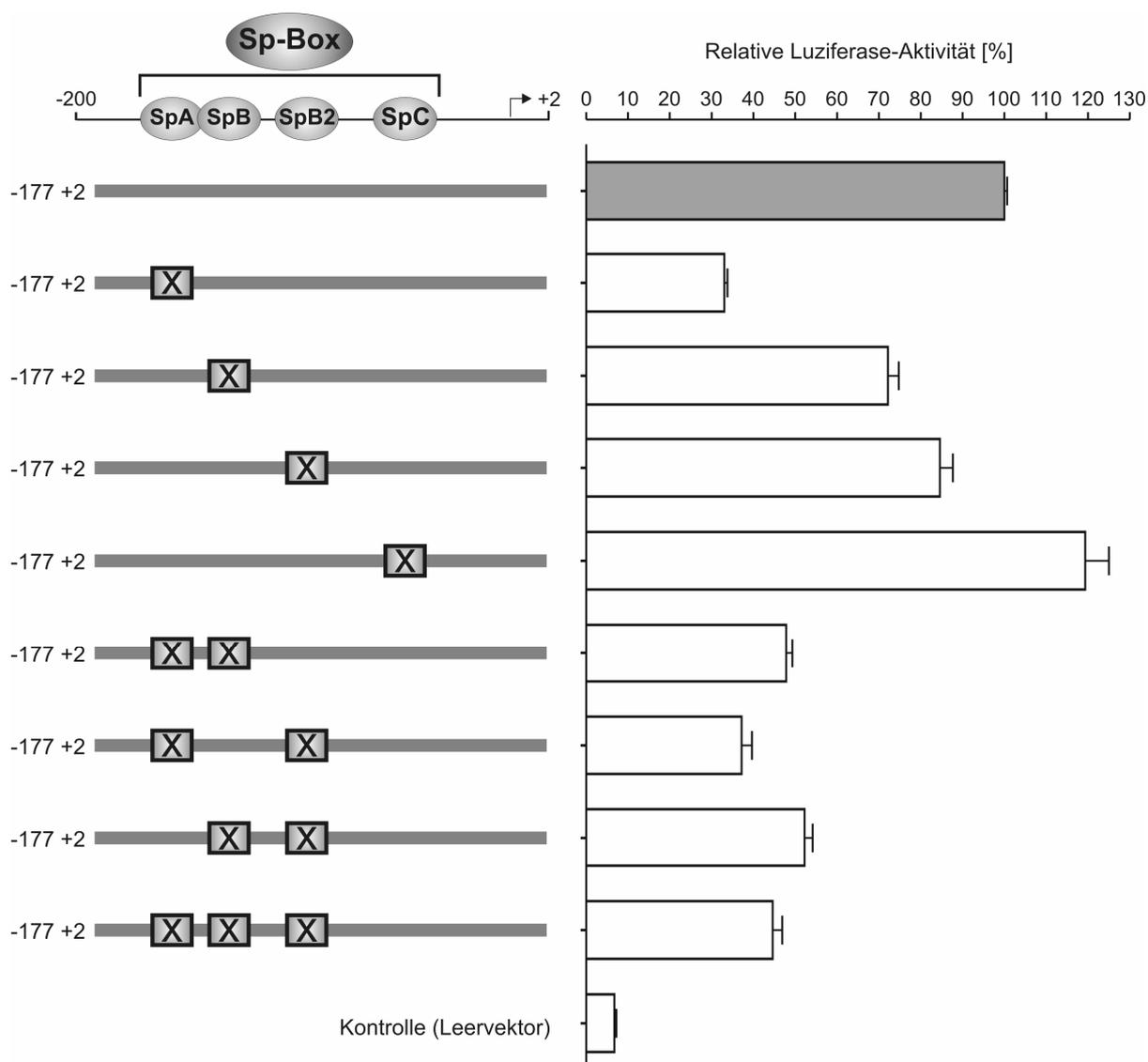


Abb. 3.2.6: Analyse der Auswirkungen von insgesamt vier mutierten Sp-Transkriptionsfaktor-Bindestellen innerhalb des proximalen Promotorbereiches zwischen der Position -177 und +2 stromaufwärts des *XYLT2*-Translationsstarts. Die potentiellen Bindestellen für Transkriptionsfaktoren der Sp1-Familie SpA, SpB, SpB2 und SpC wurden separat zu einer *EcoRI*-Restriktionsschnittstelle mutiert (gekennzeichnet durch ein X). Zur Analyse eventueller kooperativer Interaktionen zwischen den bindenden Transkriptionsfaktoren wurden ebenfalls Promotorfragmente mit mehrfachen Mutationen untersucht. Alle relativen Luziferase-Aktivitäten sind in Relation zu der Aktivität des -177+2-Fragmentes dargestellt und repräsentieren den Mittelwert mit dem korrespondierenden Standardfehler von mindestens drei unabhängigen, in Dreifachbestimmung durchgeführten, Experimenten.

Neben den Mutationen in den potentiellen Erkennungssequenzen für die TF der Sp-Familie wurde auch die potentielle Bindestelle für den TF HNF4α bzw. den der AP-2-Familie mutiert und die Auswirkung auf die transkriptionelle Regulation analysiert. Hierbei konnten jedoch keine signifikanten Alterationen in der Reporter-gen-Aktivität detektiert werden.

3.2.4 Nachweis spezifischer Protein-DNA-Interaktionen im *XYLT2*-Promotor

Zur eindeutigen Identifizierung der TF, die mit der SpA- und SpB-Bindestelle interagieren, wurden EMSA-Analysen der betreffenden Regionen im *XYLT2*-Promotor durchgeführt. Zur Untersuchung der SpA-Bindestelle wurde eine 28 bp und für die SpB-Bindestelle eine 20 bp umfassende doppelsträngige jeweils am 5'-Ende biotinylierte DNA-*Probe* verwendet. Diese entsprachen der jeweiligen Sequenz des entsprechenden *XYLT2*-Promotorbereichs (vgl. Abb. 3.2.7 A bzw. Abb. 3.2.8 A). Beide DNA-*Probes* wurden zunächst mit äquivalenten Mengen nukleärer HepG2-Proteinextrakte inkubiert und die gebildeten Protein-DNA-Komplexe in einem nativen 6%igen Polyacrylamidgel aufgetrennt. Diese Komplexe wurden nach Übertragung auf eine positiv geladene Nylonmembran mit einem Streptavidin-HRP-Konjugat inkubiert und das resultierende Lumineszenzsignal detektiert (vgl. Abschnitt 3.1.3).

Nach Inkubation der DNA-*Probe* mit den nukleären HepG2-Proteinen konnten zwei spezifische Protein-DNA-Komplexe durch das Auftreten von langsamer migrierenden Banden (Spur 2) im Vergleich zur freien DNA (Spur 1) detektiert werden (Abb. 3.2.7 B). Aufgrund der durch die Software *MatInspector* prognostizierten hohen Wahrscheinlichkeit für die Bindung von TF der Sp-Familie, wurde einigen Ansätzen ein spezifisch gegen Sp1 und Sp3 gerichteter Antikörper zugesetzt. Hierbei konnte in dem Ansatz, der einen spezifischen Antikörper gegen Sp1 beinhaltete, eine weitere vergleichsweise schwache, noch langsamer migrierende Bande in Form eines *Supershifts* (ss in Abb. 3.2.7 B) detektiert werden (Spur 3). Zur Verifizierung einer Interaktion zwischen dem biotinylierten DNA-Oligonukleotid und dem etwa 80 kDa großen TF Sp1, wurde die DNA-*Probe* in einem separaten Ansatz mit rekombinatem humanen Sp1-Protein sowie zusätzlich mit dem spezifischen Sp1-Antikörper inkubiert. Hierbei konnte ebenfalls ein sehr deutliches Signal für den Komplex aus Sp1-Protein und der biotinylierten DNA-*Probe* (Spur 6) bzw. für den weitaus langsamer migrierenden Komplex aus Antikörper, Sp1-Protein und DNA-*Probe* detektiert werden (Spur 7). Da der TF Sp3 eine identische Erkennungssequenz auf der DNA-Matrize besitzt wie Sp1, wurde auch die Bindung dieses TFs, durch Zusatz eines entsprechenden spezifischen Antikörpers, untersucht. Da bisher drei verschiedene Transkriptvarianten des Sp3-Proteins mit Größen von 110–115 kDa (lange Transkriptvariante) bzw. 60–70 kDa (kurze Transkriptvariante) bekannt sind, kann hiermit das Auftreten zweier Banden verschiedenen Laufverhaltens erklärt werden, die teilweise durch das Signal für den Komplex aus Sp1-Protein und DNA-*Probe* überlagert werden. Obwohl hierbei nur ein extrem schwaches *Supershift*-Signal detektiert wurde, konnte jedoch eine deutliche Reduktion des Signals für den Komplex aus DNA-*Probe* und der kurzen Transkriptvariante des Sp3-Proteins beobachtet werden (Spur 4). Die Verwendung beider Antikörper führte dazu, dass weder ein Signal für den Komplex aus DNA-*Probe* und Sp1-Protein noch ein Signal für eine der Transkriptvarianten des Sp3-Proteins detektiert werden konnte. Dies ist sehr wahrscheinlich

darauf zurückzuführen, dass beide Komplexe aufgrund ihrer Größe und ihres Laufverhaltens nicht in die Geltaschen migriert sind und daher kein *Supershift*-Signal zu detektieren war.

Zur Sicherstellung einer spezifischen Protein-DNA-Interaktion wurde zwei Ansätzen ein 40 bzw. 200facher molarer Überschuss sequenzidentischer nicht-biotinmarkierter DNA als Kompetitor zugesetzt (Spuren 8 und 9). Da die Ausbildung spezifischer Protein-DNA-Interaktionen in diesem Fall bevorzugt mit denen im Überschuss vorliegenden nicht-markierten DNA-Oligonukleotiden stattfindet, konnte in diesen Ansätzen kein Signal für einen Komplex aus biotinmarkierter DNA-*Probe* und spezifisch bindendem Protein nachgewiesen werden.

Analog zu der beschriebenen Analyse für die SpA-Erkennungssequenz im *XYLT2*-Promotorbereich, erfolgte eine EMSA-basierte Untersuchung der SpB-Erkennungssequenz (Abb. 3.2.8). Auch hierbei konnte ein zu der SpA-*Probe* vergleichbares Bandenmuster nach Inkubation des 5'-biotinylierten DNA-Oligonukleotids mit nukleären Proteinextrakten aus HepG2-Zellen beobachtet werden (Spur 2). Im Gegensatz zur SpA-*Probe* waren die Signale für die Protein-DNA-Komplexe, die in den Ansätzen mit nukleären HepG2-Proteinextrakten und dem humanen rekombinanten Sp1-Protein erhalten wurden (Spur 6), deutlich schwächer. Durch Einsatz der spezifischen Sp1- und Sp3-Antikörper konnte allerdings auch in diesem Fall eine weitere Abschwächung der Signale für den jeweiligen Protein-DNA-Komplex und ein deutlicher *Supershift* nach Einsatz von rekombinantem Sp1 in Verbindung mit dem spezifischen Sp1-Antikörper beobachtet werden. Neben den Banden, die Komplexen aus DNA-*Probe* und Sp1- bzw. Sp3-Protein zugeordnet werden konnten, waren weitere langsamer migrierende Banden zu detektieren. Da diese Signale auch in den Ansätzen, die mit einem 40 bzw. 200fachen molaren Überschuss an nicht markiertem Oligonukleotid zu detektieren waren, kann hierbei von unspezifischen Protein-DNA-Interaktionen ausgegangen werden. Im Gegensatz dazu wurde in diesen Ansätzen kein Signal für die spezifischen Wechselwirkungen zwischen Sp1- und Sp3-Protein mit der DNA-*Probe* beobachtet.

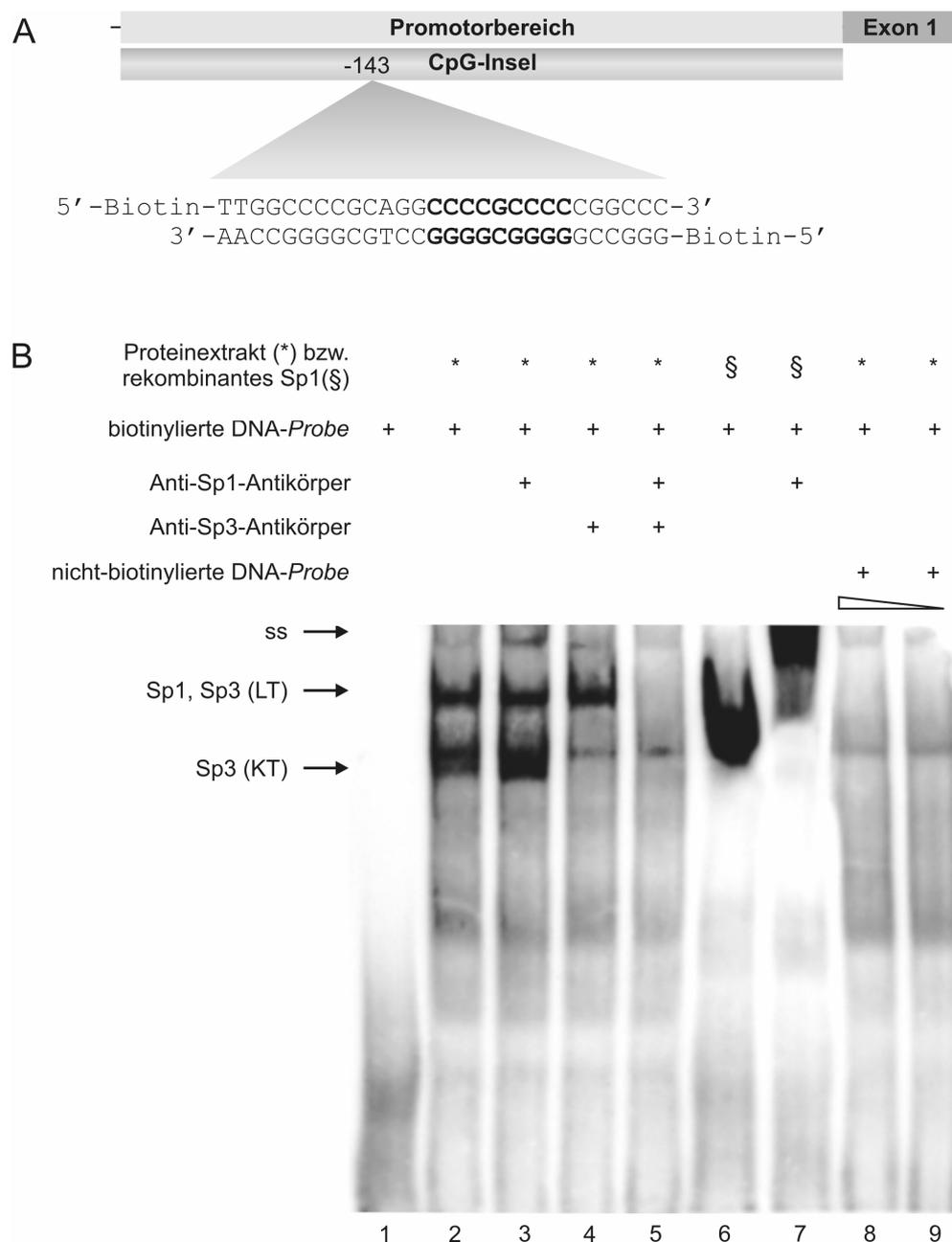


Abb. 3.2.7: (A) Schematische Darstellung der Position der SpA-Bindungsstelle im proximalen *XYLT2*-Promotor sowie der im EMSA eingesetzten am 5'-Ende Biotin-markierten doppelsträngigen DNA-Probe. Die Erkennungssequenz für Proteine der Sp1-Familie ist fettgedruckt. (B) Identifizierung der mit der SpA-Sequenz interagierenden Proteine. Die 28 bp umfassende SpA-DNA-Probe wurde mit (a) 6 µg nukleärem Proteinextrakt aus HepG2-Zellen (Spur 2), (b) 6 µg nukleärem Proteinextrakt und 2 µg Anti-Sp1-Antikörper (Spur 3), (c) 6 µg nukleärem Proteinextrakt und 2 µg Anti-Sp3-Antikörper (Spur 4), (d) 6 µg nukleärem Proteinextrakt und jeweils 2 µg Anti-Sp1- und Anti-Sp3-Antikörper (Spur 5), (e) 1 µg rekombinantem Sp1-Protein (Spur 6), (f) 1 µg rekombinantem Sp1-Protein und 2 µg Anti-Sp1-Antikörper (Spur 7) inkubiert. Die in den Spuren 8 und 9 aufgetragenen Ansätze enthielten zusätzlich zu den nukleären Proteinextrakten einen 40 bzw. 200fachen molaren Überschuss an nicht-biotinylierter sequenzidentischer DNA-Probe als Kompetitor. LT = langes Transkript; KT = kurzes Transkript; ss = *Supershift*.

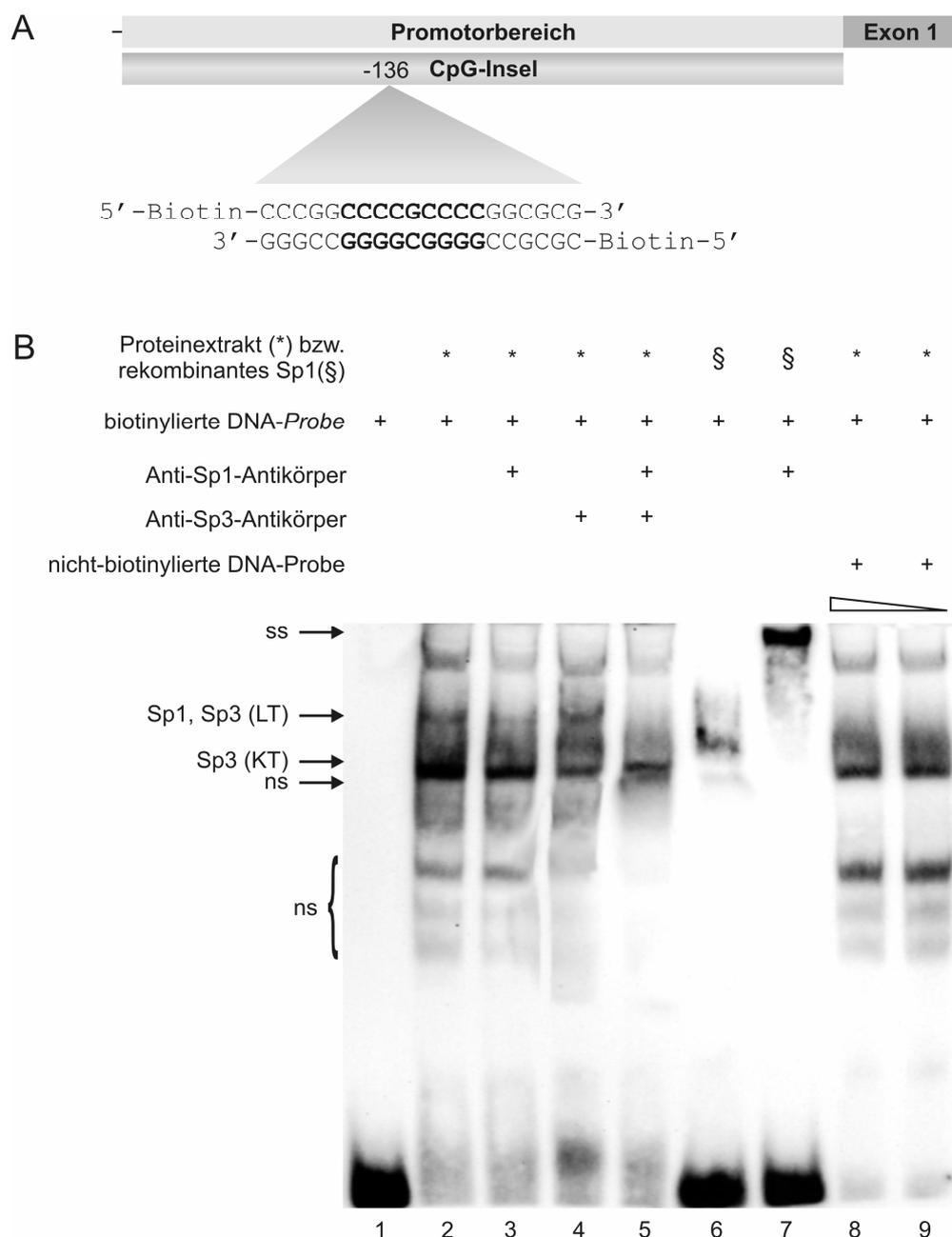


Abb. 3.2.8: (A) Schematische Darstellung der Position der SpB-Bindungsstelle im proximalen *XYLT2*-Promotor sowie der im EMSA eingesetzten am 5'-Ende Biotin-markierten doppelsträngigen DNA-Probe. Die Erkennungssequenz für Proteine der Sp1-Familie ist fettgedruckt. (B) Identifizierung der mit der SpB-Sequenz interagierenden Proteine. Die 20 bp umfassende SpB-DNA-Probe wurde mit (a) 6 µg nukleärem Proteinextrakt aus HepG2-Zellen (Spur 2), (b) 6 µg nukleärem Proteinextrakt und 2 µg Anti-Sp1-Antikörper (Spur 3), (c) 6 µg nukleärem Proteinextrakt und 2 µg Anti-Sp3-Antikörper (Spur 4), (d) 6 µg nukleärem Proteinextrakt und jeweils 2 µg Anti-Sp1- und Anti-Sp3-Antikörper (Spur 5), (e) 1 µg rekombinantem Sp1-Protein (Spur 6), (f) 1 µg rekombinantem Sp1-Protein und 2 µg Anti-Sp1-Antikörper (Spur 7) inkubiert. Die in den Spuren 8 und 9 aufgetragenen Ansätze enthielten zusätzlich zu den nukleären Proteinextrakten einen 40 bzw. 200fachen molaren Überschuss an nicht-biotinylierter sequenzidentischer DNA-Probe als Kompetitor. LT = langes Transkript; KT = kurzes Transkript; ss = *Supershift*; ns = nicht-spezifische Signale.

3.2.5 Untersuchung von Affinitätsunterschieden zwischen den Bindestellen SpA und SpB

Aufgrund der Ergebnisse der in Abschnitt 3.2.4 beschriebenen EMSA-Analysen für die Bindung von Sp-Proteinen an die Erkennungssequenzen von SpA und SpB erfolgte eine semiquantitative Bestimmung der Bindungsaffinitäten des TF Sp1 an diese Bindestellen. Hierzu wurde die jeweilige DNA-*Probe* in Dreifachbestimmung unter identischen Bedingungen mit 1 µg des rekombinanten humanen Sp1-Proteins inkubiert. Im Anschluss wurden die so generierten Protein-DNA-Komplexe auf demselben Polyacrylamidgel elektrophoretisch aufgetrennt und auf eine positiv geladene Nylonmembran, zur späteren Detektion der Komplexe mittels des Streptavidin-HRP-Konjugats, übertragen. Hierbei konnte durch eine densitometrische Auswertung der Bandenintensitäten gezeigt werden, dass das Sp1-Protein eine etwa 5fach stärkere Affinität zur Sequenz der SpA-*Probe* des *XYLT2*-Promotors aufweist als zur Sequenz der SpB-*Probe* (Abb. 3.2.9).

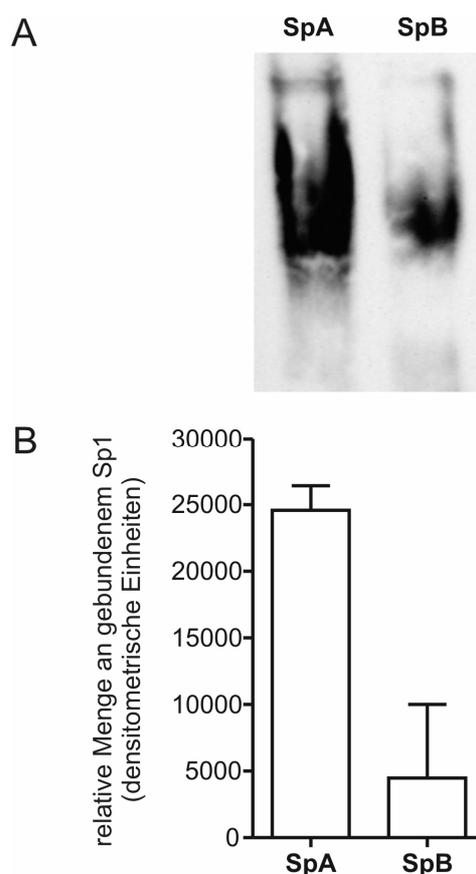


Abb. 3.2.9: (A) Exemplarische Darstellung der EMSA-Resultate der unterschiedlichen Bindungsaffinitäten des rekombinanten humanen Sp1-Proteins zur jeweiligen Erkennungssequenz SpA bzw. SpB im proximalen *XYLT2*-Promotor. (B) Semiquantitative densitometrische Auswertung der Bandenintensitäten mittels der Software *ImageJ*. Dargestellt ist der Mittelwert einer Dreifachbestimmung mit der korrespondierenden Standardabweichung.

3.2.6 Analyse der *XYLT2*-Promotoraktivität in SW1353-Chondrosarkomzellen

Wie bereits in den Abschnitten über die Charakterisierung des *XYLT1*-Promotors beschrieben, findet in SW1353-Zellen sowohl eine Expression des *XYLT1*- als auch des *XYLT2*-Gens statt. Um potentielle Unterschiede in der transkriptionellen Regulation des *XYLT2*-Gens in HepG2- und SW1353-Zellen zu untersuchen, erfolgte ebenfalls eine Aktivitätsanalyse der einzelnen *XYLT2*-Promotorfragmente in SW1353-Chondrosarkomzellen. Hierbei wies das -177+2-Konstrukt ebenfalls die höchste Aktivität auf und wurde, analog zu der Analyse der HepG2-Zellen, als 100% definiert (Abb. 3.2.10). Die weitere sukzessive Verkürzung dieses Fragmentes führte ebenfalls zu einer deutlichen Reduktion der relativen Luziferase-Aktivität.

Bei der Analyse der längeren *XYLT2*-Promotorfragmente konnten hingegen einige Unterschiede festgestellt werden. So wurden in SW1353-Zellen für die Konstrukte -263+2 und -731+2 relative Luziferase-Aktivitäten von 56,6% ($\pm 4,4\%$) bzw. 45,4% ($\pm 2,8\%$) detektiert. Im Gegensatz dazu konnte in HepG2-Zellen für das -263+2-Fragment eine nahezu 1,7fach höhere Aktivität von 94,7% ($\pm 3,3\%$) beobachtet werden. Auch für das -731+2-Fragment war eine um etwa 15% gesteigerte Aktivität von 58,3% ($\pm 2,4\%$) gegenüber den SW1353-Zellen zu verzeichnen. Während die relative Luziferase-Aktivität des -2568+2-Promotorfragmentes in beiden Zelllinien nahezu identisch war, wurde für das -1477+2-Konstrukt in SW1353-Zellen eine fast doppelt so hohe Aktivität von 66,1% ($\pm 5,9\%$) im Vergleich zu HepG2-Zellen, in denen dieses Fragment eine Aktivität von 33,7% ($\pm 1,5\%$) aufwies, detektiert.

Für die 3'-trunkierten Promotorkonstrukte -1477-191 und -731-191 konnte, vergleichbar zu den Resultaten, die in HepG2-Zellen erhalten wurden, keine über dem Niveau des promotorlosen pGI4.10-Vektors liegende relative Luziferase-Aktivität mehr detektiert werden.

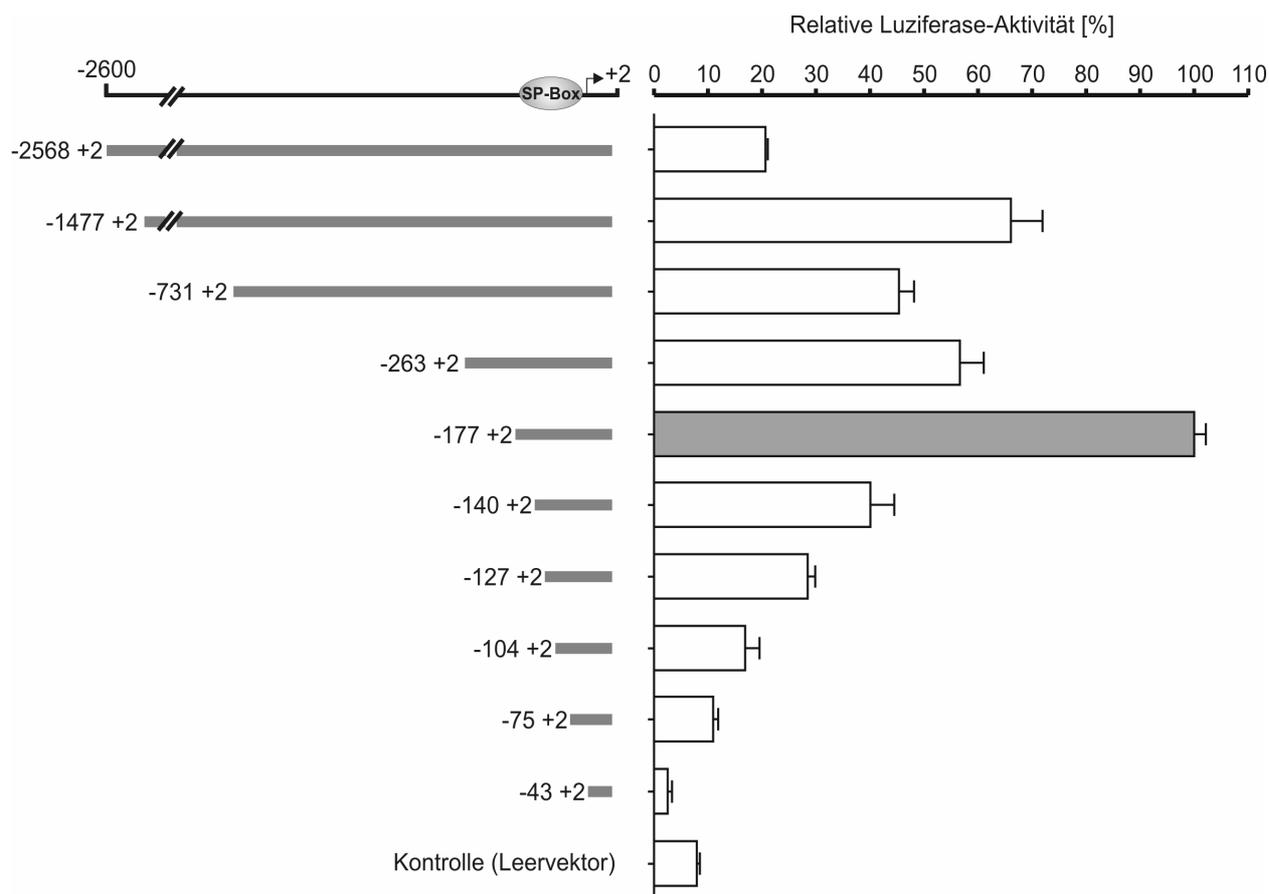


Abb. 3.2.10: Darstellung der relativen Luziferase-Aktivität verschiedener 5'-trunkierter Konstrukte des *XYLT2*-Promotors in SW1353-Zellen. Die dargestellten Werte repräsentieren den prozentualen Anteil an der Aktivität des Fragmentes -177+2 (grauer Balken), das die höchste gemessene Aktivität aufwies und gleich 100% gesetzt wurde. Die angegebene Nummerierung der schematisch dargestellten Promotorfragmente entspricht der jeweiligen Position im *XYLT2*-Promotor, ausgehend vom Translationsstartpunkt. Als Kontrolle ist zusätzlich die Aktivität des promotorlosen Vektors pGI4.10 dargestellt. Die dargestellten relativen Luziferase-Aktivitäten repräsentieren den Mittelwert mit dem korrespondierenden Standardfehler von mindestens drei unabhängigen in Dreifachbestimmung durchgeführten Experimenten. Der Bereich mit den potentiellen Erkennungssequenzen für Transkriptionsfaktoren der Sp1-Familie ist als Sp-Box bezeichnet.

3.2.7 Auswirkung einer Inhibierung der Bindung von Sp-Proteinen im nativen *XYLT2*-Promotor

Um den Einfluss der Sp-TF auf die Transkription des nativen *XYLT2*-Gens zu untersuchen, wurden HepG2- und SW1353-Zellen für 24 h mit dem Antibiotikum Mithramycin A inkubiert, welches spezifisch an sehr GC-haltige Sequenzen innerhalb der DNA bindet und auf diese Weise selektiv die DNA-abhängige RNA-Synthese inhibiert. In Abb. 3.2.11 sind die Ergebnisse der relativen Quantifizierung des XT-II mRNA-Gehaltes nach Behandlung mit verschiedenen Konzentrationen (10 nM–1 µM) von Mithramycin A im ZKÜ dargestellt. Bereits bei einer Konzentration von 100 nM konnte eine signifikante Verringerung der *XYLT2*-Transkripte auf 27,2% ($\pm 1,7\%$) in HepG2- und auf 24,5% ($\pm 2,7\%$) in SW1353-Zellen im Vergleich zu einer unbehandelten Kontrolle beobachtet werden. Eine Erhöhung der Mithramycin A-Konzentration auf 1 µM resultierte sogar in einer Reduktion auf 9,4% ($\pm 0,3\%$) bzw. 13,6% ($\pm 2,4\%$).

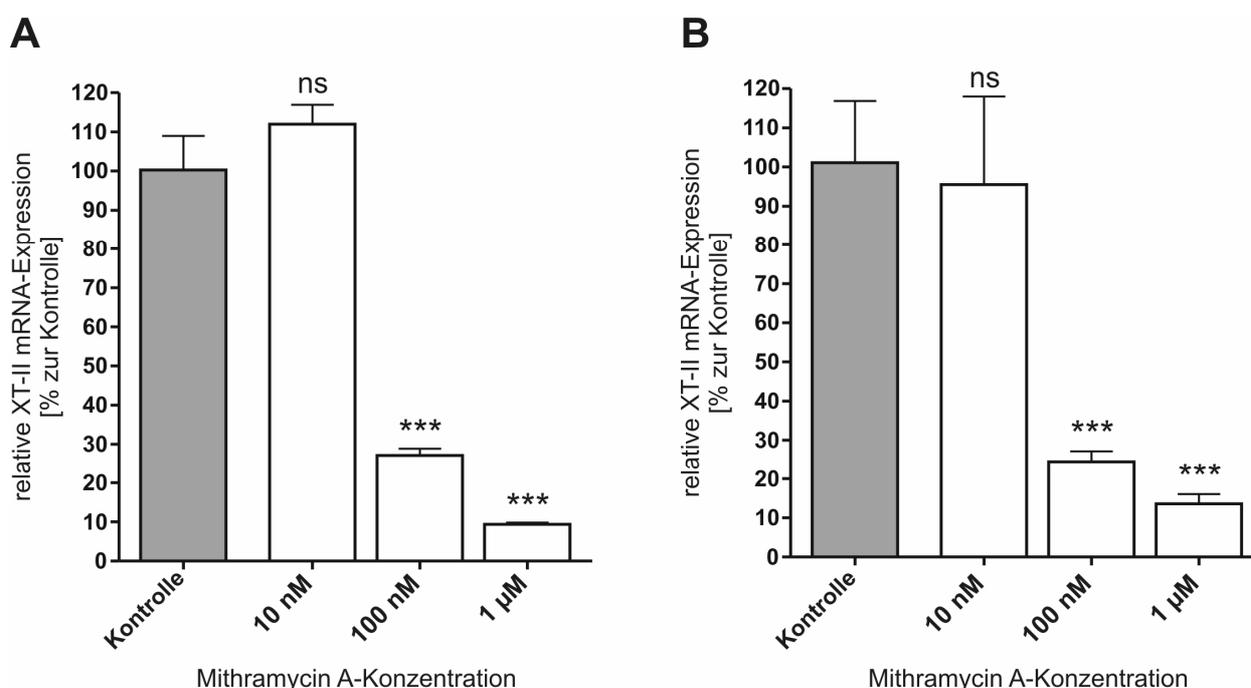


Abb. 3.2.11: Ergebnisse der quantitativen *Real-Time* PCR-Analyse des XT-II mRNA-Gehaltes von (A) HepG2-Zellen und (B) SW1353-Zellen nach Mithramycin A-Behandlung. Die Zellen wurden für 24 h mit den angegebenen Konzentrationen an Mithramycin A im ZKÜ behandelt. Die angegebenen Werte entsprechen dem Mittelwert einer Dreifachbestimmung aus mindestens zwei voneinander unabhängigen Experimenten mit der zugehörigen Standardabweichung. *** $p < 0,002$; ns = nicht signifikant.

3.3 Induktion der *XYLT*-Gene durch Cytokine der TGF β -Familie

In Studien zur myokardialen Fibrose konnte gezeigt werden, dass das *XYLT1*-Gen durch Cytokine der TGF β -Familie in kardialen Fibroblasten induzierbar ist [58]. Ein ähnlicher Effekt wurde ebenfalls während der durch TGF β_3 induzierten chondrogenen Differenzierung mesenchymaler Stammzellen beschrieben [60]. Im Gegensatz dazu konnte in keinem der beiden Fälle eine direkte Beeinflussung der Expression des *XYLT2*-Gens beobachtet werden.

Um dieses Ergebnis für die im Rahmen dieser Arbeit verwendeten SW1353-Chondrosarkomzellen zu verifizieren, erfolgte eine Behandlung dieses Zelltyps mit 5 ng/ml der Wachstumsfaktoren TGF β_1 oder TGF β_3 . Nach einer Inkubationszeit von 24 h erfolgte die Quantifizierung der vorhandenen *XYLT1*- und *XYLT2*-Transkripte mittels quantitativer *Real-Time* PCR. Hierbei konnte für die mit TGF β_1 -behandelten Zellen eine Steigerung der *XYLT1*-Transkriptionsrate auf das 2,6 ($\pm 0,4$)-fache und für die mit TGF β_3 behandelten Zellen eine Erhöhung auf das 2,0 ($\pm 0,1$)-fache detektiert werden (Abb. 3.3.1). Im Gegensatz dazu wurden für das *XYLT2*-Gen keine signifikanten Alterationen in der mRNA-Expression beobachtet. Für die Untersuchung, inwieweit sich eine TGF β -vermittelte Erhöhung der *XYLT1*-Transkription durch den Zusatz von Curcumin bzw. von SB431542, eines Inhibitors der an der TGF β -Signaltransduktion beteiligten *Activin receptor-like kinase 5* (Alk5), blockieren lässt, wurden die Zellen zusammen mit TGF β_1 und 20 μ M Curcumin bzw. 20 μ M SB431542 inkubiert. Hierbei konnte in beiden Ansätzen keine Alteration der XT-I mRNA-Expression gegenüber einer unbehandelten Kontrolle beobachtet werden.

Zur Identifizierung potentieller Regionen des *XYLT1*-Promotors, die durch TGF β induzierbar sind (*TGF β responsive elements*, TRE), wurden die Promotorfragmente -1638+1, -797+1 und -601+1 in SW1353-Zellen transfiziert. Nach einem Zeitraum von 24 h erfolgte ein Wechsel des Zellkulturmediums gegen Kultivierungsmedium, das mit 5 ng/ml TGF β_1 supplementiert wurde. Im Anschluss wurden die Zellen für weitere 24 h kultiviert. Nach Ablauf dieser Inkubationszeit erfolgte die Analyse der relativen Luziferase-Aktivität mittels des *Dual-Luciferase-Assays*. Hierbei konnte allerdings für keines der untersuchten Fragmente eine signifikante Veränderung in der transkriptionellen Aktivität gegenüber der TGF β -freien Kultivierung detektiert werden.

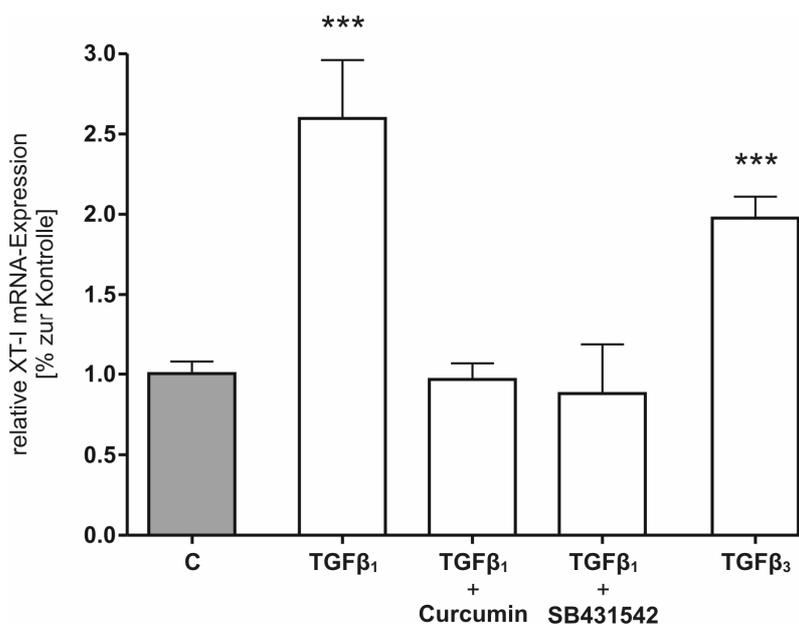


Abb. 3.3.1: Ergebnisse der quantitativen *Real-Time* PCR-Analyse des XT-I mRNA-Gehaltes von SW1353-Zellen. Die Zellen wurden für 24 h mit 5 ng/ml TGFβ₁ oder TGFβ₃ behandelt. Zusätzlich zur Behandlung mit TGFβ₁ wurden die Zellen noch mit Curcumin (20 μM) oder dem Alk5-Inhibitor SB431542 (20 μM) inkubiert. Die dargestellten Werte repräsentieren den Mittelwert mit der korrespondierenden Standardabweichung. *** p<0,0001; C = Kontrolle.

4 DISKUSSION

Die Xylosyltransferase I (XT-I) und, wie kürzlich gezeigt werden konnte, auch deren Isoform XT-II katalysiert den Transfer von Xylose ausgehend von der UDP-aktivierten Form auf spezifische Serin-Reste von PG-Core-Proteinen. Beide Enzyme initiieren somit den ersten und geschwindigkeitsbestimmenden Schritt der posttranslationalen GAG-Biosynthese in PGs [41-45, 112].

Obwohl die Klonierung der cDNA beider Xylosyltransferasen bereits im Jahr 2000 erfolgte und zumindest für XT-I wichtige Funktionen in einer Reihe von physiologischen und pathophysiologischen Prozessen beschrieben wurden, ist nur sehr wenig über die transkriptionelle Regulation beider Enzyme bekannt [43, 44, 49, 52-54, 58-60, 113, 114]. Bisher konnte in einigen Studien gezeigt werden, dass XT-I und XT-II divergente Expressionsmuster sowohl in verschiedenen humanen und murinen Gewebetypen als auch in verschiedenen humanen Zelllinien aufweisen [43, 45, 47]. Überdies wurde auch eine unterschiedliche Regulation beider Xylosyltransferasen während der osteogenen und chondrogenen Differenzierung mesenchymaler Stammzellen sowie eine differente Induktion durch das Cytokin $TGF\beta_1$ in humanen kardialen Fibroblasten beobachtet [58-60].

Um ein detaillierteres Verständnis der transkriptionellen Regulation beider Xylosyltransferasen zu erhalten, wurden im Rahmen dieser Arbeit erstmalig die Promotoren des humanen *XYLT1*- und *XYLT2*-Gens identifiziert, kloniert und umfassend charakterisiert.

4.1 Identifizierung und Charakterisierung des humanen *XYLT1*-Promotors

Die humane Xylosyltransferase I wird in zahlreichen Geweben und Zelllinien exprimiert, wobei die Stärke der Expression deutlich variiert. Um ein besseres Verständnis der involvierten transkriptionellen Regulationsmechanismen zu erhalten, erfolgte daher erstmals die Identifizierung und funktionelle Analyse der Promotorregion des *XYLT1*-Gens. In einem ersten Schritt wurde hierzu eine *in silico*-Analyse der Sequenz unmittelbar stromaufwärts des *XYLT1*-Translationsstarts durchgeführt. Hierbei konnte gezeigt werden, dass innerhalb des untersuchten Bereiches von 1638 bp keine TATA- bzw. CAAT-Box oder andere typische Promotorelemente vorhanden waren. Im Gegensatz dazu wurde eine deutlich über der statistischen Erwartung liegende Akkumulation von GC-Nukleotiden von über 78% innerhalb der ersten 300 bp stromaufwärts des *XYLT1*-Translationsstarts beobachtet (vgl. Abb. 3.1.1 und Abb. 3.1.2). Das Vorhandensein einer solchen CpG-Insel und das Fehlen einer TATA-Box wird häufig aber nicht ausschließlich in den regulatorischen Bereichen von Haushaltsgenen

gefunden [64, 70, 72]. So konnte z.B. auch in der GC-reichen Promotorregion des humanen *GPC3*-Gens, das für das HS-PG-Core-Protein Glypican-3 codiert, keine TATA-Box identifiziert werden [115]. *GPC3* gehört allerdings zur Kategorie der gewebespezifisch exprimierten Gene, da *Glypican-3*-Transkripte fast ausschließlich während der frühen Entwicklung von mesodermalem Gewebe (wie z.B. der Niere) detektiert werden können [116]. Da nur in bestimmten Geweben und Zelllinien *XYLT1*-Transkripte nachweisbar sind und überdies die Stärke der Expression deutlich variiert, ist das *XYLT1*-Gen ebenfalls eher den gewebespezifisch exprimierten Genen zuzuordnen [43, 47]. Auch die in diversen Zelltypen beschriebene Induktion des *XYLT1*-Gens durch Wachstumsfaktoren der TGF β -Familie deutet auf das Vorhandensein von gewebespezifischen Regulationsmechanismen hin [58, 117].

4.1.1 Identifizierung der minimal funktionalen Promotorregion und aktiver Transkriptionsfaktor-Bindestellen

Für eine detaillierte Analyse der *XYLT1*-Promotorregion erfolgte die Generierung diverser Promotorfragmente verschiedener Länge. Wie sich herausstellte, war sowohl die Etablierung eines PCR-Systems für die Amplifikation von Regionen des *XYLT1*-Promotors aus genomischer DNA, die die ersten 470 bp unmittelbar stromaufwärts des Translationsstarts enthielten als auch die Identifizierung des TSS durch 5'-RACE, nicht möglich. Eine Erklärung hierfür könnte der extrem hohe GC-Gehalt innerhalb dieser Region sein. Hierdurch bedingt kommt es sehr wahrscheinlich zur Ausbildung stabiler Sekundärstrukturen, die die *in vitro* DNA-Synthese dieses Bereiches durch die Aktivität der DNA-Polymerase bzw. der Reversen Transkriptase verhindern [43]. Aus diesem Grund wurden die ersten 600 bp unmittelbar stromaufwärts des *XYLT1*-Translationsstarts im Rahmen einer Gensynthese generiert. Alle weiteren Fragmente konnten mittels PCR oder mithilfe geeigneter Restriktionsschnittstellen erhalten und in den pGI4.10 Luziferase-Reporter-gen-Vektor inseriert werden (vgl. Abschnitt 5.1.8). Die anschließend durchgeführten Promotor-Aktivitätsanalysen erfolgten zunächst in SW1353-Chondrosarkom-Zellen, da diese Zelllinie eine vergleichsweise hohe *XYLT1*-Expression aufweist und demzufolge über alle notwendigen TF für die konstitutive Transkription des *XYLT1*-Gens verfügen sollte [47]. Die Analysen der verschiedenen 5'- und 3'-trunkierten *XYLT1*-Promotorvarianten ergab, dass die höchsten relativen Luziferase-Aktivitäten für die Konstrukte -1031+1 und -797+1 detektiert werden konnten (vgl. Abb. 3.1.3). Alle größeren untersuchten Fragmente wiesen nur etwa die Hälfte der transkriptionellen Aktivität auf, was sehr wahrscheinlich auf negativ-wirksame *cis*-regulatorische Elemente innerhalb dieser Region zurückzuführen ist.

Sowohl das -1031+1- als auch das -797+1-Konstrukt enthalten eine Erkennungssequenz, die bereits durch das Programm *MatInspector* mit hoher Wahrscheinlichkeit als aktive Bindestelle für TF der AP-1-Familie eingestuft wurde. Experimentell konnte die Bedeutung dieser Bindestelle zum einen dadurch bestätigt werden, dass für alle weiteren verkürzten Konstrukte, denen diese AP-1-Erkennungssequenz fehlt, nur eine basale Promotoraktivität, die etwa einem Zehntel der Aktivität des -797+1-Konstrukts entsprach, detektiert wurde. Zum anderen führte die gezielte Mutation von zwei Basen innerhalb dieser AP-1-Erkennungssequenz im -797+1-Fragment zu einem vergleichbar hohen Verlust an Promotoraktivität wie sie in den weiter 5'-trunkierten Promotorvarianten zu beobachten war. Ein weiterer Beleg für die substantielle Beteiligung des AP-1-Bindemotivs an der Regulation des *XYLT1*-Promotors erfolgte durch den direkten Nachweis einer spezifischen Protein-DNA-Interaktion mittels EMSA. Durch Verwendung eines Antikörpers gegen das Protein cJun, als Bestandteil des dimeren AP-1-TF-Komplexes, konnte überdies ein *Supershift* erzeugt werden. Hierdurch wurde dieses Protein eindeutig als an der DNA-Bindung beteiligte Spezies identifiziert.

Eine funktionelle Aktivität von AP-1-Bindestellen wurde auch in zahlreichen anderen Genen, die für Proteine der ECM codieren, nachgewiesen. Hierzu zählen unter anderem das humane *DCN*- und *BGN*-Gen, die für die SLRPs Decorin und Biglycan codieren sowie das *COL1A2*-Gen, das für die $\alpha 2$ -Kette des humanen Kollagen Typ 1 codiert [118-121]. Erst kürzlich konnten Domenzain-Reyna *et al.* zeigen, dass Mitglieder der AP-1-TF-Familie auch eine substantielle Rolle in der transkriptionellen Regulation des Versican-Promotors spielen [85].

Ein phylogenetischer Vergleich der humanen und murinen Promotorregion des Xylosyltransferase I-Gens zeigte überdies eine Konservierung dieser AP-1-Bindestelle in beiden Promotoren (Abb. 4.1.1). Da die regulatorischen Bereiche eines spezifischen Gens einem geringeren Selektionsdruck unterliegen, weisen diese zwischen einzelnen Individuen einer Spezies sowie speziesübergreifend einen weitaus geringeren Grad an Konservierung auf als die in Form von Exons vorliegenden codierenden Regionen. Im Fall einer phylogenetisch konservierten Nukleotidabfolge innerhalb des Promotors ist daher das Vorhandensein wichtiger Bindestellen für TF sehr wahrscheinlich. Überdies konnte eine vergleichsweise hohe Homologie von 61% in einem 229 bp umfassenden Abschnitt beider Promotoren festgestellt werden. Dieser ist zwischen den Nukleotiden -732 bis -517 stromaufwärts des humanen *XYLT1*-Translationsstarts und den Positionen -961 bis -733 des murinen *Xylt1*-Promotorbereichs lokalisiert.

4.1.2 Auswirkungen einer Inhibition der AP-1-Bindung auf die XT-I mRNA-Expression

Aufgrund der Ergebnisse der *in vitro* durchgeführten Charakterisierung des *XYLT1*-Promotors und des Nachweises einer essentiellen Bedeutung des TFs cJun/AP-1 an der transkriptionellen Regulation des *XYLT1*-Gens, wurden in einem weiteren experimentellen Schritt die Auswirkungen einer AP-1-Inhibition auf die XT-I mRNA-Expression *in vivo* untersucht. Hierzu wurden SW1353-Zellen mit Curcumin und Tanshinon IIA behandelt. Wie in mehreren Studien gezeigt werden konnte, verhindern beide Inhibitoren effektiv die Bindung des dimeren AP-1-TF-Komplexes an die DNA [110, 111, 122, 123]. Überdies wird die Expression von cJun selbst durch AP-1 reguliert, so dass eine Inhibition der AP-1 vermittelten Transkription auch durch eine geringere Konzentration an AP-1 selbst erfolgt [111].

Beide Inhibitoren führten bereits innerhalb eines Zeitraums von 6 h zu einer signifikanten Reduktion der *XYLT1*-Expression. Im Kontext der Ergebnisse der Promotoraktivitäts-Analysen und der EMSA-Experimente konnte durch die AP-1-Inhibitorbehandlungen auch eine essentielle Rolle dieses TFs für die *in vivo* stattfindende Transkription des *XYLT1*-Gens gezeigt werden.

4.1.3 Beteiligung von Transkriptionsfaktoren der Sp1-Familie an der Regulation des *XYLT1*-Gens

Neben dem AP-1-Bindungsmotiv wurden durch das Programm *MatInspector* diverse Sequenzbereiche als potentiell aktive Bindestellen für TF der Sp1-Familie eingestuft. Diese sind besonders innerhalb der ersten sehr GC-reichen 650 bp umfassenden Region unmittelbar stromaufwärts des *XYLT1*-Translationsstarts lokalisiert. Es konnte gezeigt werden, dass die Expression vieler TATA-Box-loser Gene auf die Aktivität von Sp1-TF zurückzuführen ist, wobei die entsprechenden Bindemotive, wie im Fall des *XYLT1*-Promotors auch, häufig innerhalb von CpG-Inseln lokalisiert sind [72]. Überdies wurde in zahlreichen Studien die Bedeutung von TF der Sp1-Familie für die basale transkriptionelle Aktivität vieler Gene, die für Komponenten der ECM codieren, beschrieben [124, 125]. Dies konnte im Rahmen dieser Arbeit auch für den *XYLT1*-Promotor gezeigt werden. Speziell die Fragmente, die den Bereich von -531 bis -709 stromaufwärts des Translationsstartes enthielten und demzufolge die gesamte als CpG-Insel identifizierte Region ohne die AP-1-Bindestelle an Position -730 umfassten, wiesen noch eine basale transkriptionelle Aktivität auf (vgl. Abb. 3.1.3 bzw. Abb. 3.1.4).

Für eine eingehendere Untersuchung, ob TF der Sp1-Familie direkt an der Regulation des *XYLT1*-Gens beteiligt sind, wurden SW1353-Zellen zunächst mit Mithramycin A behandelt. Dieses Antibiotikum bindet spezifisch an GC-reiche Sequenzen und verhindert auf diese Weise eine Interaktion von Sp1-TF mit der DNA [126, 127]. In anschließend durchgeführten

quantitativen *Real-Time PCR*-Analysen konnte eine drastische Reduktion des XT-I mRNA-Gehaltes von mehr als 85% im Vergleich zu unbehandelten Kontrollen bereits bei sehr geringen Konzentrationen von 10 nM beobachtet werden. Auch in anderen Studien konnte durch Mithramycin A eine Inhibierung der Expression von vielen Genen, die direkt oder indirekt am Aufbau der ECM beteiligt sind und über Sp1 reguliert werden, nachgewiesen werden [119, 124, 126, 128, 129].

Eine Verifizierung dieser Ergebnisse erfolgte durch die Verwendung von spezifischer siRNA gegen die ubiquitären TF Sp1 und Sp3. Hierbei wurde interessanterweise nur bei einer selektiven Inhibition der Sp3-Expression eine signifikante Reduktion sowohl der XT-I mRNA als auch der XT-Aktivität im ZKÜ von SW1353-Zellen auf weniger als 40% bzw. 50%, im Vergleich zur jeweiligen Kontrolle, beobachtet. Im Gegensatz dazu konnte bei einer spezifischen Herabregulierung von Sp1 keine signifikante Veränderung der XT-I mRNA detektiert werden. Auch in Studien zur Regulation des durch Sp1 und Sp3 regulierten *HAS2*-Gens konnte durch Einsatz von Sp1- und Sp3-siRNA eine deutliche Reduktion der durch das *HAS2*-Gen codierten Hyaluronan-Synthase-2 erzielt werden [130].

Die genauen Mechanismen in der Sp1-Protein vermittelten Regulation der Transkription sind bislang allerdings nur unzureichend verstanden. Die Funktion von Sp1-Proteinen und besonders der von Sp3 ist vom Zelltyp und der Zellphysiologie, der Struktur und Anordnung der Erkennungssequenzen sowie vom Verhältnis von Sp1 zu Sp3 innerhalb der Zelle abhängig [87, 91]. Veränderungen der zellphysiologischen Konditionen, z.B. durch externe Stimuli, können eine Modifikation dieses Sp1/Sp3-Verhältnisses innerhalb der Zelle bewirken. Hierdurch kann es zu einer geänderten Funktionsweise der TF und zu einer veränderten transkriptionellen Regulation kommen [87, 91, 131, 132]. Überdies besteht die Möglichkeit, dass es durch eine siRNA-induzierte Herabregulierung von Sp3 zu einer generellen Alteration der zellulären Transkription und in deren Folge auch der zellulären Funktion kommt. Aus diesem Grund sind diese Mechanismen ebenfalls als Ursache für die geringe XT-I mRNA-Expression denkbar. Insgesamt deuten die Ergebnisse auf eine Beteiligung von Sp1-Proteinen und im Speziellen von Sp3 an der transkriptionellen Regulation des *XYLT1*-Gens hin. Ein weiterer Hinweis hierfür ist die Tatsache, dass eine Vielzahl weiterer Gene, die für Proteine oder Enzyme, die am Auf- und Umbau der ECM beteiligt sind, ebenfalls über TF der Sp1-Familie reguliert werden. Hierzu zählen unter anderem die humanen Kollagen-Gene *COL11A2* [129] und *COL24A1* [133], das humane *GPC3*- [115] und das murine *Gpc4*-Gen [134], die für die HS-PG-Core-Proteine Glypican-3 und Glypican-4 codieren sowie die Glykosyltransferase GlcAT-I oder die UDP-Glukose-Dehydrogenase [128, 135]. Da XT-I den initialen Schritt in der Biosynthese von GAGs katalysiert und eine analoge Regulation von Genen sehr wahrscheinlich ist, die Funktionen innerhalb eines metabolischen Biosyntheseweges wie z.B. den Aufbau von PGs ausüben, erscheint daher eine Beteiligung von Sp1-Proteinen sehr wahrscheinlich [136].

4.1.4 Induktion der *XYLT1*-Genexpression über Wachstumsfaktoren der TGF β -Familie

Die Regulation einer Vielzahl von Komponenten der ECM erfolgt unter anderem über Wachstumsfaktoren der TGF β -Familie. So konnte für zahlreiche Kollagenvarianten, PG-Core-Proteine sowie am Auf- und Umbau der ECM beteiligter Enzyme eine Induktion durch verschiedene TGF β -Isoformen gezeigt werden [81, 119, 135, 137]. In Studien zur myokardialen Fibrose wurde auch für das *XYLT1*-Gen eine TGF β_1 -vermittelte Steigerung der Expression in humanen kardialen Fibroblasten beobachtet [58]. Ein vergleichbares Bild zeigte sich während der TGF β_3 -induzierten chondrogenen Differenzierung mesenchymaler Stammzellen [60].

Aus diesem Grund erfolgte auch im Rahmen der Charakterisierung des *XYLT1*-Promotors eine Analyse der Induzierbarkeit der untersuchten Promotorfragmente mittels TGF β_1 und TGF β_3 . Hierzu wurde zunächst untersucht, ob die Expression des *XYLT1*-Gens in der Chondrosarkomzelllinie SW1353 durch diese Cytokine beeinflusst wird. Es konnte gezeigt werden, dass sowohl durch die Behandlung mit TGF β_1 als auch TGF β_3 eine um mehr als das doppelte gesteigerte XT-I mRNA-Expression zu detektieren war. In zahlreichen Studien wurde überdies gezeigt, dass die durch TGF β -induzierte Genexpression über den TF AP-1 auf Promotorebene vermittelt werden kann [120]. Ferner wurde auch die Inhibierung der TGF β -induzierten Genexpression durch Curcumin beschrieben [138]. Zur Überprüfung, ob dies auch für das *XYLT1*-Gen zutrifft, erfolgte eine gleichzeitige Inkubation von SW1353-Zellen mit TGF β_1 und dem AP-1-Inhibitor Curcumin. Hierdurch konnte, ebenso wie durch die Inhibierung der an der TGF β -Signaltransduktion beteiligten Alk5-Kinase durch den Inhibitor SB431542, eine durch TGF β -vermittelte Induktion verhindert werden.

Zur Analyse, welche Regionen des *XYLT1*-Promotors für eine durch TGF β -induzierte gesteigerte Genexpression verantwortlich sind, wurden sowohl das größte, 1638 bp umfassende *XYLT1*-Promotorkonstrukt als auch die beiden weiteren Promotorkonstrukte -797+1 und -601+1 in SW1353-Zellen transfiziert. 24 h nach der Transfektion erfolgte eine Behandlung für weitere 24 h mit TGF β_1 . Im Anschluss wurden die relativen Luziferase-Aktivitäten dieser Fragmente im Vergleich zu nicht mit TGF β_1 -behandelten Zellen analysiert. Interessanterweise konnte hierbei weder für die größeren Fragmente, die die als essentiell für die volle Promotoraktivität identifizierte AP-1-Bindungsstelle enthielten, noch für das weiter 5'-trunkierte Fragment -601+1 eine Steigerung der relativen Luziferase-Aktivität gegenüber den Kontrollen detektiert werden. Obwohl eine Beteiligung der AP-1-Bindestelle sehr wahrscheinlich ist, deuten diese Ergebnisse daraufhin, dass für eine Induzierbarkeit der *XYLT1*-Genexpression weitere *cis*-regulatorische Elemente erforderlich sind, die sich nicht innerhalb des untersuchten Promotorbereiches befinden. Wie für eine Vielzahl weiterer Promotoren gezeigt werden konnte, können diese Bereiche in großer Distanz zum proximalen Promotor lokalisiert sein. Hierzu zählen unter anderem die Promotoren des *COL1A2*- oder des *JunB*-Gens [139, 140].

4.2 Identifizierung und Charakterisierung des humanen *XYLT2*-Promotors

Neben der XT-I konnte kürzlich in unserer und anderen Arbeitsgruppen gezeigt werden, dass auch die XT-II in der Lage ist, den initialen und geschwindigkeitsbestimmenden Schritt in der Biosynthese von CS/DS, HS und Heparin, durch Übertragung einer Xylose auf spezifische Serin-Reste in PG-Core-Proteinen, zu katalysieren [45, 112, 141]. Obwohl bisher noch wenig über die Funktion der XT-II bekannt ist, mehren sich die Hinweise, dass dieses Enzym *in vivo* eine mindestens ebenso wichtige Rolle spielt wie die XT-I. So konnten Condac *et al.* in *Xylt2-Knockout*-Mäusen eine bedeutende Funktion der XT-II in der Aufrechterhaltung der Leber-PG-Homöostase nachweisen [142]. Die Inaktivierung des murinen *Xylt2*-Gens führte neben einer Reduktion des Leber-PG-Gehaltes zur Entwicklung von Zysten des Gallenepithels, einer Dilatation der Nieren-Tubuli sowie zu Veränderungen der Basalmembran [142]. Ferner konnte auch ein bedeutender Beitrag der in der Leber synthetisierten XT-II zur XT-Aktivität in humanem und murinem Serum nachgewiesen werden [51]. Mutationen in den codierenden Bereichen des humanen *XYLT2*-Gens wurden überdies als genetische Risikofaktoren für Krankheiten, die mit einem veränderten PG-Metabolismus einhergehen, eingestuft. Hierzu zählen die Erbkrankheit Pseudoxanthoma elasticum sowie Osteoarthritis und die diabetische Nephropathie [113, 114, 143, 144]. Diese Ergebnisse demonstrieren, dass die XT-II *in vivo* ebenfalls eine wichtige Funktion besitzt.

Zum Verständnis der Regulation dieses Gens sowie zur Identifizierung möglicher Unterschiede zu den transkriptionellen Mechanismen des *XYLT1*-Gens ist die Kenntnis der Promotorregion sowie der beteiligten *cis*- und *trans*-regulatorischen Faktoren obligat.

Analog zur Untersuchung der regulatorischen Bereiche des *XYLT1*-Gens erfolgte zunächst eine computergestützte Analyse der Sequenz unmittelbar stromaufwärts des *XYLT2*-Translationsstarts. Hierbei wurde ebenfalls weder eine TATA- noch eine CAAT-Box identifiziert. Durch eine Analyse der Basenzusammensetzung konnte stattdessen eine CpG-Insel unmittelbar stromaufwärts des *XYLT2*-Translationsstarts lokalisiert werden (vgl. Abb. 3.2.2). Dieser 550 bp umfassende Bereich liegt mit einem GC-Anteil von 74% deutlich über dem statistisch zu erwartenden Gehalt von 50%. Innerhalb der ersten 250 bp steigt dieser Anteil sogar auf 81% an. Es konnten ferner eine Reihe von GC-Boxen mit der Sequenz GGGCGG innerhalb dieser 250 bp umfassenden Region lokalisiert werden. Diese Basenabfolge fungiert ebenfalls als Erkennungssequenz für die Zink-Finger-Proteine der Sp1-Familie [91]. In mehreren Studien konnte gezeigt werden, dass das Vorhandensein dieser Bindungsstellen bzw. die Bindung von Sp1-Proteinen an diese Erkennungssequenzen eine Methylierung des Cytosins zu 5-Methylcytosin innerhalb dieser GC-Boxen verhindert [74, 75]. Überdies liegen Bindestellen für Sp1-Proteine häufig in unmittelbarer Nähe in einem Abstand von 40–80 bp zum

TSS [66]. Dies ist im Einklang mit der durch 5'-RACE ermittelten Position des *XYLT2*-TSS 13 bp stromaufwärts des Translationsstarts.

Wie bereits unter Abschnitt 4.1 erwähnt, sind TATA-Box-lose Promotoren mit CpG-Inseln häufig an der Regulation von Haushaltsgenen beteiligt. Dies könnte somit eine Erklärung für die nahezu ubiquitäre Expression der XT-II sein [43, 45, 47, 112]. Im Gegensatz zum *XYLT1*-Gen konnte das *XYLT2*-Gen auch bisher in keiner untersuchten Zelllinie durch Wachstumsfaktoren wie TGF β_1 oder TGF β_3 induziert werden.

4.2.1 Identifizierung der minimal aktiven *XYLT2*-Promotorregion und essentieller Transkriptionsfaktor-Bindestellen

Vergleichbar zur Charakterisierung des *XYLT1*-Promotors erfolgte auch für die Analyse der *XYLT2*-Promotorregion die Generierung verschiedener Promotorfragmente. Im Gegensatz zum *XYLT1*-Promotor konnten allerdings, trotz des hohen GC-Gehaltes innerhalb der ersten 550 bp unmittelbar stromaufwärts des *XYLT2*-Translationsstarts, alle Konstrukte mittels PCR aus humaner genomischer DNA amplifiziert und in den pGI4.10-Luziferase-Reporter-gen-Vektor inseriert werden.

Die Promotor-Aktivitätsanalysen der unterschiedlichen *XYLT2*-Promotorfragmente erfolgten zunächst in HepG2-Hepatoma-Zellen. Wie mehrfach gezeigt werden konnte, exprimiert diese Zelllinie vergleichbar dem humanen und murinen Lebergewebe nahezu exklusiv das *XYLT2*-Gen, wohingegen *XYLT1*-Transkripte kaum nachweisbar waren [43, 45, 47, 112]. Aus diesem Grund kann davon ausgegangen werden, dass diese Zelllinie alle erforderlichen TF für die konstitutive Expression des *XYLT2*-Gens besitzt. Die Analysen der verschiedenen *XYLT2*-Promotorvarianten ergaben, dass ein 177 bp umfassender unmittelbar den Translationsstart 5'-flankierender Bereich die höchste relative Luziferase-Aktivität aufwies (vgl. Abb. 3.2.3). Durch eine Deletion dieser Region innerhalb der umfangreicheren Fragmente (-1477+1 und -731+1, vgl. Abb. 3.2.4) konnte überdies gezeigt werden, dass die Aktivierung der *XYLT2*-Transkription essentiell von diesem Promotorabschnitt abhängt. Durch die Analyse weiterer 3'-trunkierter Promotorvarianten dieses Fragmentes konnte der minimale proximale Promotor auf den Bereich zwischen der Position -177 und -58 eingegrenzt werden. Innerhalb dieser Region konnten mehrere potentielle Bindestellen für TF der Sp1-Proteinfamilie identifiziert werden. Eine sukzessive Mutation jeder dieser Bindestellen bestätigte experimentell die Beteiligung dieser Erkennungssequenzen an der Regulation des *XYLT2*-Gens. Die durch einen Basenaustausch hervorgerufene Inaktivierung der Erkennungssequenz SpA führte hierbei zum stärksten Verlust der relativen Luziferase-Aktivität auf ein Drittel gegenüber der Wildtyp-Sequenz.

Durch einen phylogenetischen Vergleich des murinen und humanen Xylosyltransferase II-Promotorbereiches konnte ebenfalls eine Konservierung dieser Erkennungssequenz innerhalb des Genoms gezeigt werden (Abb. 4.2.1). Wie bereits unter Abschnitt 4.1.1 beschrieben, ist daher von einer essentiellen Bedeutung einer solchen TF-Bindestelle für die Regulation des *XYLT2*-Gens auszugehen. Überdies konnte eine vergleichsweise hohe Homologie von 66% zwischen beiden Promotorbereichen innerhalb der ersten 155 bp stromaufwärts des *XYLT2*-Translationsstartes festgestellt werden. Dieser Promotorbereich erwies sich in den experimentellen Analysen als unentbehrlich für die Aktivierung der *XYLT2*-Transkription.

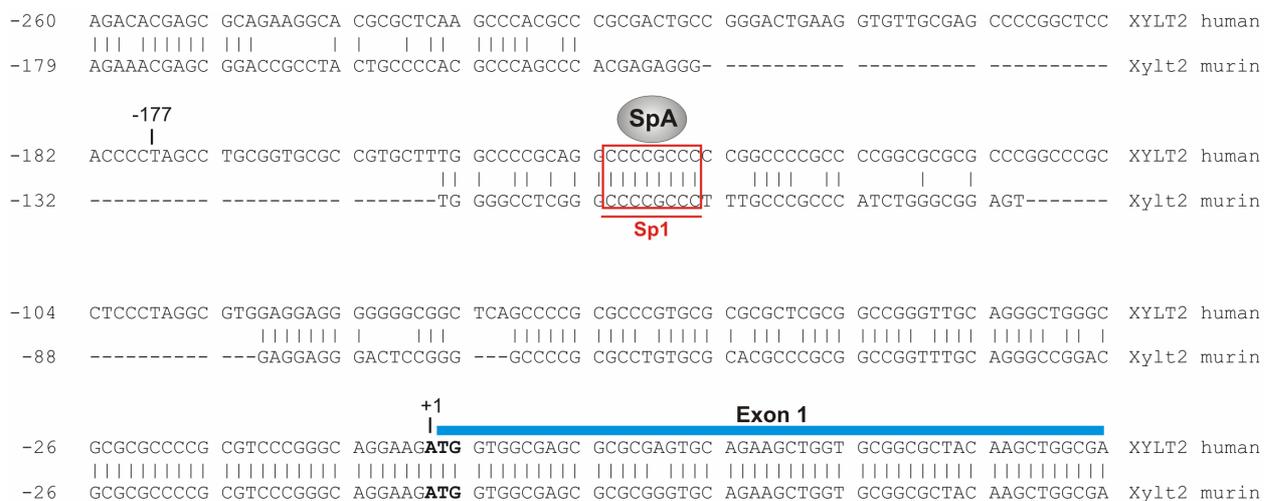


Abb. 4.2.1: Sequenzvergleich zwischen den Promotorregionen des humanen und murinen *XYLT2*-Gens.

Die dargestellte Region entspricht den Nukleotiden 48.423.242 bis 48.423.553 des humanen Chromosoms 17 (*GenBank accession no.* NC_000017.10) bzw. den Nukleotiden 94.538.670 bis 94.538.900 des murinen Chromosoms 11 (*GenBank accession no.* NC_000077.5). Identische Basen sind mit einem senkrechten Strich verbunden. Der Translationsstart beider Gene (ATG) ist fettgedruckt. Zusätzlich ist das 5'-Ende des -177+2-Promotorfragmentes dargestellt. Die phylogenetisch konservierte Erkennungssequenz für den Transkriptionsfaktor der Sp1-Familie ist durch einen roten Kasten hervorgehoben.

Der direkte Nachweis einer spezifischen Protein-DNA-Interaktion an dieser SpA-Erkennungssequenz erfolgte mittels eines EMSA. Hierbei konnte ein typisches Bandenmuster, das für die Bindung von mindestens zwei verschiedenen TF spricht, beobachtet werden. Durch die Verwendung von spezifischen Antikörpern im Rahmen eines *Supershift-Assays* wurden diese TF eindeutig als die ubiquitär exprimierten Zink-Finger-Proteine Sp1 und Sp3 identifiziert. Das Auftreten zweier unterschiedlich schnell migrierender Banden ist zum einen durch den Größenunterschied zwischen Sp1 und Sp3 als auch durch das Vorhandensein von drei verschiedenen Transkriptvarianten des Sp3-Proteins zu erklären. Die schneller migrierenden Banden gehen hierbei auf die zwei kurzen Sp3-Transkriptvarianten zurück, die durch zwei

zusätzliche interne Startcodons gebildet werden [91]. Die Ausbildung eines nur schwachen *Supershift*-Signals bei Verwendung des Sp3-Antikörpers ist wahrscheinlich darauf zurückzuführen, dass der tertiäre Komplex aus Antikörper, Sp3-Protein und DNA-*Probe* nicht in die Taschen des Polyacrylamidgels migriert ist. Im Gegensatz dazu konnte eine deutliche Reduktion des Signals für den Komplex aus Protein und DNA-*Probe* beobachtet werden. Dieser Effekt wurde auch schon in zahlreichen anderen Studien beschrieben [91, 129, 145].

Neben der SpA-Bindestelle bewirkte auch eine Mutation in der SpB-Bindestelle eine deutliche Reduktion der relativen Luziferase-Aktivität. Hierbei konnte allerdings im Vergleich zur SpA-Sequenz nur eine Verminderung um etwa 30% detektiert werden. Durch eine EMSA-Analyse wurde auch hier die Bindung von Sp1- und Sp3-Proteinen bestätigt. Überdies konnte durch eine vergleichende densitometrische Auswertung der Bandenintensitäten gezeigt werden, dass das verwendete rekombinante Sp1-Protein eine 5fach höhere Affinität zur Sequenz der SpA-Bindestelle besitzt als zur SpB-Bindestelle. Dies ist eine mögliche Erklärung für den geringeren Verlust an transkriptioneller Aktivität nach Mutation dieser Erkennungssequenz.

Eine Alteration in der Nukleotidabfolge der SpB2-Sequenz resultierte nur in einer schwachen Reduktion der relativen Luziferase-Aktivität um etwa 15%. Im Gegensatz dazu bewirkte eine Mutation der SpC-Bindestelle sogar eine Steigerung um etwa 20%. Dies ist möglicherweise mit der Bindung von negativ-regulatorisch wirksamen TF in dieser Region zu erklären. Ein weiterer möglicher Aspekt könnte in der Repressor-Aktivität des Sp3-Proteins begründet liegen. So konnte in mehreren Studien gezeigt werden, dass die Struktur und Anordnung der Sp-Erkennungssequenzen einen Einfluss darauf hat, ob Sp3 als starker Aktivator, transkriptionell inaktiv oder sogar als Repressor einer Sp1-vermittelten Transkription fungiert [91, 99, 100]. Promotoren mit einer einzigen Sp-Bindestelle scheinen durch Sp3 generell aktiviert zu werden, wohingegen Promotoren mit mehreren Sp-Bindestellen, vergleichbar mit dem des *XYLT2*-Gens, keine oder nur eine schwache Aktivierung über Sp3 zeigen [99, 100]. Durch diese Beobachtungen könnten auch die Ergebnisse, die für die Mutationen in mehreren Sp-Bindestellen erhalten wurden, erklärt werden. So führte eine gleichzeitige Alteration der Nukleotidabfolge in SpB und SpB2 zu einem Verlust der relativen Luziferase-Aktivität, der der Summe der Einzelmutationen entspricht. Im Gegensatz dazu blieb die relative Aktivität der Luziferase bei multiplen Mutationen mit Beteiligung der SpA-Bindestelle nahezu konstant oder erhöhte sich sogar um bis zu 15% (vgl. Abb. 3.2.6). Die genauen Mechanismen sind bislang jedoch nicht vollständig aufgeklärt. Zusammenfassend scheint die Hauptaktivierung der *XYLT2*-Genexpression ausgehend von der SpA-Bindestelle zu erfolgen, wohingegen die weiteren Erkennungssequenzen für Sp-Proteine eine Feinjustierung der Transkriptionsstärke zu bewirken scheinen. Diese kann, wie bereits unter Abschnitt 4.1.3 beschrieben, ebenfalls durch eine Veränderung des Verhältnisses von Sp1 zu Sp3, als Reaktion auf externe Stimuli oder als Antwort auf Änderungen in der zellulären Umgebung erfolgen [87, 91, 131, 132].

Ein weiterer interessanter Aspekt ist die Identifizierung einer HNF4 α -Erkennungssequenz innerhalb des proximalen 177 bp umfassenden Promotorfragmentes. Obwohl nach einer Mutation dieser Bindestelle keine Änderung in der relativen Luziferase-Aktivität detektiert werden konnte, kann eine mögliche Funktion für die transkriptionelle Regulation des *XYLT2*-Gens, z.B. in primären Hepatocyten, nicht ausgeschlossen werden. HNF4 α ist ein speziell in Lebergewebe und auch in Hepatoma-Zelllinien wie HepG2 exprimierter TF. Für eine Aktivierung der Transkription, ausgehend von HNF4 α , ist allerdings das Vorhandensein von Co-Aktivatoren, im Besonderen von SRC1 und PGC1 α , erforderlich. Diese Co-Aktivatoren werden in HepG2-Zellen nur in sehr geringen Mengen exprimiert [146]. Daher kommt dieser Aspekt als mögliche Ursache dafür in Frage, dass in HepG2-Zellen keine Regulation des *XYLT2*-Gens über HNF4 α nachzuweisen war.

4.3 Vergleich der Regulation und Expression des *XYLT1*- und *XYLT2*-Gens in SW1353- und HepG2-Zellen

Sowohl im murinen als auch im humanen Lebergewebe sowie in der Hepatoma-Zelllinie HepG2 sind nahezu keine *XYLT1*-Transkripte nachweisbar. Zur Analyse, inwieweit hierfür der Promotorbereich des *XYLT1*-Gens verantwortlich ist, wurden zusätzlich zur Charakterisierung des *XYLT1*-Promotors in SW1353-Zellen weitere relative Luziferase-Aktivitätsanalysen in HepG2-Zellen durchgeführt. Hierbei konnte gezeigt werden, dass die untersuchten *XYLT1*-Promotorfragmente in dieser Leberzelllinie keine detektierbare Aktivität aufweisen. Im Gegensatz dazu konnte speziell für das -797+1-Promotorfragment in SW1353-Zellen die nahezu höchste Aktivität der untersuchten Konstrukte bestimmt werden. Diese Ergebnisse lassen daher vermuten, dass die im *XYLT1*-Promotor vorhandenen TF-Bindestellen in HepG2-Zellen nicht aktiv sind und demzufolge keine Transkription dieses Gens erfolgt. Auch für andere Gene, wie z.B. das Chemokin RANTES/CCL5, konnte gezeigt werden, dass Erkennungssequenzen für TF in einer Zelllinie aktiv sind, in einer anderen hingegen keine Funktion besitzen. Eine mögliche Erklärung hierfür ist, dass Erkennungssequenzen für TF sich teilweise überlappen. Aus diesem Grund können verschiedene Kombinationen von TF mit diesen Bindeelementen interagieren. Auf diese Weise kann eine zell- oder gewebspezifische Regulation der Transkription erfolgen [136].

Neben der Charakterisierung des *XYLT2*-Promotors in HepG2-Zellen erfolgte zusätzlich eine Analyse in SW1353-Zellen zur Untersuchung einer voneinander abweichenden Regulation in beiden Zelllinien. Hierbei konnte festgestellt werden, dass der 177 bp umfassende Bereich unmittelbar stromaufwärts des *XYLT2*-Translationsstarts ebenfalls eine essentielle Bedeutung für die vollständige Promotoraktivität besitzt. Durch eine weitere Verkürzung der Fragmente

konnte eine zu HepG2-Zellen vergleichbare Abnahme der relativen Luziferase-Aktivität beobachtet werden. Dies lässt darauf schließen, dass die gleichen TF-Bindestellen wie in HepG2-Zellen auch in SW1353-Zellen aktiv sind. Im Gegensatz dazu konnten bei den umfangreicheren Promotorfragmenten deutliche Unterschiede festgestellt werden. So lag die Aktivität des -263+2-Promotorfragmentes in HepG2-Zellen etwa 1,7fach über der in SW1353-Zellen, wohingegen die des -1477+2-Promotorfragmentes nur etwa die Hälfte der Aktivität aufwies. Dies ist möglicherweise durch die Bindung zusätzlicher aktivierender- bzw. negativ-regulatorischer TF in den verschiedenen Zelllinien zu erklären. Insgesamt scheint die Regulation des *XYLT2*-Gens in beiden Zelllinien jedoch relativ äquivalent zu verlaufen.

Da die Regulation des *XYLT2*-Gens *in vivo* in beiden untersuchten Zelllinien essentiell von TF der Sp1-Proteinfamilie abhängig ist, konnte überdies durch die nahezu identische Verminderung der XT-II mRNA-Expression, hervorgerufen durch Mithramycin A, demonstriert werden (vgl. Abb. 3.2.11).

4.4 Ausblick

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurden erstmals die Promotoren der Xylosyltransferasen I und II identifiziert, kloniert und detailliert charakterisiert. Hierbei konnte gezeigt werden, dass der TF cJun/AP-1 entscheidend an der Regulation des *XYLT1*-Gens beteiligt ist, wohingegen die Regulation des *XYLT2*-Gens primär durch TF der Sp1-Proteinfamilie erfolgt.

Beide Enzyme spielen eine bedeutende Rolle während physiologischer und pathophysiologischer Prozesse. Um ein umfangreicheres Verständnis über die involvierten regulatorischen Mechanismen zu erhalten, sollte eine umfassende zelltypspezifische Analyse der transkriptionellen Aktivität der im Rahmen dieser Arbeit erstmals charakterisierten *XYLT*-Promotoren erfolgen. Des Weiteren könnte durch die Identifizierung weiterer regulatorisch funktioneller Bereiche, z.B. für die Aktivierung des *XYLT1*-Gens durch verschiedene TGF β -Isoformen, ein detaillierter Überblick über die Regulation der Xylosyltransferasen erhalten werden. In den codierenden Bereichen beider *XYLT*-Gene wurden in zahlreichen Studien Polymorphismen in der Basenzusammensetzung identifiziert, die mit einem erhöhten Risiko für Erkrankungen wie der diabetischen Nephropathie oder Pseudoxanthoma elasticum assoziiert werden konnten. Daher sollte eine entsprechende Analyse auch in den Promotoren der *XYLT*-Gene durchgeführt werden. Hierdurch könnten weitere Erkenntnisse über den potentiellen Einfluss der Regulation beider Xylosyltransferasen auf die Entstehung oder den Verlauf von Erkrankungen, die mit einem veränderten Proteoglykan-Metabolismus einhergehen, gewonnen werden.

5 METHODEN

5.1 Molekularbiologische Methoden

5.1.1 Isolierung von Gesamt-RNA

Zur Isolierung der Gesamt-RNA aus Zellen wurde das *NucleoSpin RNAII-Kit* verwendet. Die Extraktion der RNA basiert auf einer Anionentauscherchromatographie, bei der die RNA in Gegenwart hoher Konzentrationen chaotroper Salze an eine Silikamembran gebunden wird. Alle während der Isolierung durchgeführten Zentrifugationsschritte wurden bei $11.000 \times g$ durchgeführt.

Die Lyse der Zellen erfolgte direkt in der Zellkulturschale mit 350 μ l Puffer RA1 (incl. 1% β -Mercaptoethanol). Das Lysat wurde auf eine *NucleoSpin Filter-Säule* überführt und für 1 min durch Zentrifugation homogenisiert. Zur Fällung der Nukleinsäuren wurde der Durchlauf mit 350 μ l Ethanol (70%) versetzt, vollständig auf eine *NucleoSpin RNAII-Säule* gegeben und für 30 s zentrifugiert. Da bei diesem Schritt neben der RNA auch DNA an das Säulenmaterial gebunden wird, wurde die Säulenmatrix nach einem vorangegangenen Entsalzungsschritt mit 350 μ l Puffer MDB und anschließender Zentrifugation für 1 min, für 15 min bei RT mit rDNase inkubiert. Die Inaktivierung des Enzyms erfolgte mit 200 μ l Puffer RA2 und einem daran angeschlossenen Zentrifugationsschritt von 30 s. Im Anschluss wurde die Säule zunächst mit 600 μ l und in einem zweiten Schritt mit 250 μ l Puffer RA3 gewaschen und jeweils 30 s bzw. 2 min zentrifugiert. Die Elution der RNA erfolgte durch Zugabe von 30 μ l RNase-freiem Wasser auf die Säule und anschließender Zentrifugation für 1 min in ein 1,5 ml Mikrozentrifugengefäß. Die RNA wurde entweder sofort für die cDNA-Synthese eingesetzt oder bei -80°C gelagert.

5.1.2 Isolierung von Plasmid-DNA aus *Escherichia coli*

Das Verfahren zur Extraktion von Plasmid-DNA aus Bakterien beruht auf einer modifizierten alkalischen Lyse der Zellen mit NaOH (aq.) und einer anschließenden alkalischen Denaturierung hochmolekularer genomischer DNA [147]. Die Plasmid-DNA bleibt in Lösung und wird über die Bindung an eine Anionentauschermatrix gereinigt und isoliert [148]. Für die Isolierung hochreiner Plasmid-DNA aus 50 ml Kulturen wurde das *GenElute (HP) Plasmid Midiprep Kit* verwendet.

Es wurden 50 ml einer Übernachtskultur für 15 min bei $4.600 \times g$ zentrifugiert. Das Zellpellet wurde in 4 ml *Resuspension-Solution* (incl. 0,5% RNase A) aufgenommen. Die Lyse der Zellen erfolgte durch Zugabe von 4 ml *Lysis Solution* und nachfolgender Inkubation für 3 min.

Im Anschluss wurden 4 ml *Neutralisation Solution* hinzugegeben und durch dreimaliges Invertieren gemischt. Diese Suspension wurde mit 3 ml *Binding Solution* versetzt und nach mehrmaligem Invertieren zur Fällung der Proteine für 5 min in Filterspritzen gegeben. Zur Äquilibration der Säulenmatrix wurde diese mit 4 ml *Column Preparation Solution* bei $3.000 \times g$ für 2 min zentrifugiert und das Eluat verworfen. Das geklärte Lysat aus den Spritzen wurde auf die Säulen gegeben und für 2 min bei $3.000 \times g$ zentrifugiert. Die Säulen wurden anschließend mit 4 ml *Wash Solution 1* und *Wash Solution 2* entsalzt und sukzessive bei $3.000 \times g$ für 2 min bzw. 5 min zentrifugiert. Der Durchlauf wurde jeweils verworfen. Die Plasmid-DNA wurde mit 1 ml *Aqua dest.* und durch anschließende Zentrifugation für 5 min bei $3.000 \times g$ von der Säule eluiert. Die Lagerung der Plasmid-DNA erfolgte bei $-20 \text{ }^\circ\text{C}$.

5.1.3 Photometrische Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren

Die Quantifizierung der DNA- bzw. RNA-Konzentration in einer wässrigen Lösung erfolgte photometrisch durch die Bestimmung der Absorption (optische Dichte, OD) der Probe mithilfe eines Spektralphotometers bei einer Wellenlänge von $\lambda = 260 \text{ nm}$ (OD_{260}). Die OD_{260} ist direkt proportional zur Konzentration c der jeweiligen Nukleinsäure. Der ermittelte Messwert bei einer Quarzküvette mit 10 mm Strahlengang wird mit einem Proportionalitätsfaktor f multipliziert. Bei doppelsträngiger DNA beträgt $f = 50$, bei einzelsträngiger RNA entspricht $f = 40$.

Zusätzlich zu der Absorption bei 260 nm erfolgte die Messung der Absorption bei 280 nm und 320 nm, um die Reinheit der isolierten Nukleinsäurelösung zu bestimmen. Der Quotient von OD_{260} zu OD_{280} gibt Aufschluss über die Kontamination durch Proteine und besitzt für reine Nukleinsäurelösungen einen Wert zwischen 1,8 und 2,0. Die OD_{320} dient der Hintergrundkorrektur und wird von der OD_{260} subtrahiert.

Zur Konzentrationsbestimmung wurde die Plasmid-DNA 1:10 und die RNA 1:20 mit RNase-freiem Wasser verdünnt, so dass sich die Konzentration der jeweiligen Nukleinsäure nach folgender Gleichung berechnen lässt:

$$c(\text{RNA/DNA})[\text{ng}/\mu\text{l}] = f \cdot (OD_{260} - OD_{320}) \cdot D_F$$

mit: $c(\text{RNA/DNA})$ = Konzentration der RNA- bzw. DNA-Lösung in $\text{ng}/\mu\text{l}$

OD_{260} = optische Dichte bei einer Wellenlänge von $\lambda = 260 \text{ nm}$

D_F = Verdünnungsfaktor

f = Nukleinsäure-spezifischer Faktor (DNA: $f = 50$; RNA: $f = 40$)

5.1.4 cDNA-Synthese aus isolierter Gesamt-RNA

Bei der reversen Transkription wird die aus Zellen oder Geweben isolierte mRNA in eine zu dieser komplementären DNA (*complementary DNA*, cDNA) umgeschrieben. Für diese Reaktion wird die Aktivität des retroviralen Enzyms Reverse Transkriptase (RT) genutzt. Dieses Enzym besitzt eine RNA-abhängige DNA-Polymeraseaktivität und kann einen zur RNA komplementären DNA-Strang in 3'-Richtung aufbauen. Aufgrund der Polyadenylierung des 3'-Endes eukaryotischer mRNA können zur Synthese des DNA-Stranges Oligo(dT)-*Primer* verwendet werden.

Zur cDNA-Synthese wurde im Rahmen dieser Arbeit die kommerziell erhältliche *SuperScript II Reverse Transcriptase* verwendet. Diese besitzt eine reduzierte RNase H-Aktivität, wodurch die Geschwindigkeit des RNA-Abbaus reduziert wird, sowie eine erhöhte Temperatur-Stabilität im Vergleich zu einer konventionellen *Molony-Murine-Leukemia-Virus-Reverse-Transcriptase* (MMLV-RT). Hierdurch wird der Ablauf der Synthese bei höheren Temperaturen ermöglicht. Die für die cDNA-Synthese eingesetzte RNA-Menge wurde bei allen Ansätzen auf dieselbe Gesamt-RNA-Konzentration (500 ng bis 2 µg) eingestellt.

Der verwendete Standardansatz für die cDNA-Synthese setzte sich wie folgt zusammen:

- 2,0 µl Oligo(dT)₁₂₋₁₈-*Primer* (14 pmol)
- 2,0 µl dNTPs (dATP, dTTP, dGTP, dCTP, je 25 mM)
- x µl *Template* (500 ng bis 2 µg Gesamt-RNA)
- ad 24 µl Wasser

Der Ansatz wurde für 5 min bei 65 °C inkubiert, auf Eis abgekühlt und anschließend kurz zentrifugiert. Nach Zugabe von 8 µl 5x *First Strand Buffer* und 4 µl 0,1 M Dithiotreitol (DTT) erfolgte ein Inkubationsschritt von 2 min bei 42 °C. Anschließend wurden 2 µl *SuperScript II Reverse Transcriptase* zugegeben und der Reaktionsansatz für 50 min bei 42 °C inkubiert. Die Inaktivierung des Enzyms erfolgte durch Erhitzen des Reaktionsansatzes auf 70 °C für 15 min. Die cDNA wurde bei -20 °C gelagert.

5.1.5 Polymerase-Kettenreaktion (PCR) zur Generierung von *XYLT1*- und *XYLT2*-Promotor-Fragmenten

Bei der Polymerase-Kettenreaktion (*polymerase chain reaction*, PCR) handelt es sich um ein *in vitro*-Verfahren zur DNA-Amplifikation. Es basiert auf drei Schritten, die in aufeinanderfolgenden Zyklen wiederholt werden: 1. Denaturierung doppelsträngiger DNA, 2. Spezifische Anlagerung von kurzen Oligonukleotiden (*Primer*) an die einzelsträngige DNA und 3. Extension dieser Oligonukleotide durch eine thermostabile Polymerase.

Ein Standardreaktionsansatz (50 µl) hatte die folgende Zusammensetzung:

- 10,0 µl *Template*-DNA (genomische DNA oder Plasmid-DNA)
- 5,0 µl 10x PCR-Puffer (250 mM Tris-HCl, 500 mM KCl, 15 mM MgCl₂)
- 10,0 µl *Q-Solution*
- 1,0 µl *Forward-Primer* (25 µM)
- 1,0 µl *Reverse-Primer* (25 µM)
- 0,5 µl dNTP-Mix (dATP, dCTP, dGTP und dTTP, je 25 mM)
- 0,2 µl *HotStarTaq* DNA Polymerase (5 U/µl)
- 22,1 µl Wasser

Das Standard-PCR Programm kann Tabelle 5.1 entnommen werden.

Tabelle 5.1 Standard PCR-Programm zur Amplifikation von *XYLT1*- und *XYLT2*-Promotorfragmenten.

Programmprozess	Zeit	Temperatur	Zyklenzahl
Aktivierung	15 min	95 °C	1
Denaturierung	1 min	94 °C	35
<i>Annealing</i>	1 min	53 – 68 °C	
Elongation	30 s–3 min	72 °C	
Elongation	15 min	72 °C	1

Bei der Amplifikation bestimmter DNA-Fragmente wurde statt des Standardprogramms zur Steigerung der Spezifität eine *Touchdown*-PCR verwendet. Hierbei wurde die *Annealing*-Temperatur von 71 °C innerhalb von 20 Zyklen sukzessive um 0,25 °C verringert und anschließend das Standard-PCR-Programm für weitere 25 Zyklen ausgeführt.

Die für die Generierung der einzelnen *XYLT1*- und *XYLT2*-Promotorfragmente verwendeten Oligonukleotide können Tabelle 6.1 und Tabelle 6.2 entnommen werden.

5.1.6 Klonanalyse mittels PCR (*Colony-PCR*)

Die aus einer Transformation resultierenden Klone wurden bezüglich einer Amplifikat-Insertion in einer PCR analysiert. Als *Template* wurde jeweils etwas Zellmaterial von einzelnen, auf Agarplatten gewachsenen *E. coli*-Kolonien entnommen. Der verwendete Standardansatz (20 µl) der PCR setzte sich wie folgt zusammen:

2,00 µl 10x PCR-Puffer (250 mM Tris-HCl, 500 mM KCl, 15 mM MgCl₂)

0,25 µl dNTP-Mix (dATP, dTTP, dGTP, dCTP, je 25 mM)

0,20 µl *HotFirePol* DNA-Polymerase I (5 U/µl)

0,50 µl *Forward-Primer* (25 µM)

0,50 µl *Reverse-Primer* (25 µM)

5,00 µl *Q-Solution*

11,50 µl Wasser

Das zugehörige Standard-PCR-Programm kann Tabelle 5.2 entnommen werden.

Tabelle 5.2 In der *Colony-PCR* verwendetes Temperaturprofil.

Programmprozess	Zeit	Temperatur	Zyklenzahl
Aktivierung	15 min	95 °C	1
Denaturierung	1 min	94 °C	35
<i>Annealing</i>	1 min	53 °C	
Elongation	1–3 min	72 °C	
Elongation	15 min	72 °C	1

5.1.7 Real-Time quantitative PCR

Die *Real-Time quantitative PCR* (Echtzeit-PCR) ist ein PCR-Verfahren, das den Prozess der Amplifikation mit der Echtzeit-Detektion des entstehenden PCR-Produktes durch fluorenzmarkierte Sonden oder DNA-bindende Farbstoffe verbindet. Diese Methode ermöglicht unter definierten Bedingungen die direkte Quantifizierung von Nukleinsäuren in einer Probe.

Im Rahmen dieser Arbeit wurde zur Detektion von PCR-Amplifikaten das *Platinum SYBR Green qPCR SuperMix-UDG-Kit* verwendet, das den an doppelsträngige DNA-bindenden Cyanin-Farbstoff *SYBR Green I* enthält. Die Detektion und Quantifizierung der PCR-Produkte erfolgte jeweils nach der Elongationsphase, in der die Amplifikate als doppelsträngige DNA-Moleküle (dsDNA) vorliegen, durch Messung der Fluoreszenzintensität bei $\lambda = 520$ nm. Diese Wellenlänge entspricht dem Emissionsmaximum von *SYBR Green I* [149, 150]. Da die Fluoreszenz des gebundenen Farbstoffes nach Anregung bei $\lambda = 480$ nm etwa um den Faktor 1000 höher als die des freien Farbstoffes ist, besteht eine direkte Proportionalität zwischen Fluoreszenz-Intensität und der Konzentration an dsDNA. Für die relative Quantifizierung der mRNA-Expression eines bestimmten Zielgens wird der C_T -Wert (*Cycle Threshold*, Schwellenwert-Zyklus) verwendet. Hierbei handelt es sich um die Zyklenanzahl, bei der das Fluoreszenz-Grundsignal überschritten wird. Die ermittelten C_T -Werte des Zielgens werden mit denen eines konstant exprimierten Haushaltsgens verglichen. Da die Effizienz der PCR unter anderem von der Art und Konzentration der verwendeten *Primer* sowie von der Sequenz des amplifizierten Nukleinsäureabschnitts abhängt, muss diese für die Berechnung der relativen mRNA Expression berücksichtigt werden. Daher wurde im Rahmen dieser Arbeit die folgende Gleichung zur Ermittlung der relativen Genexpression verwendet, die die verschiedenen PCR-Effizienzen mit einbezieht:

$$RGE = \frac{(E_{Ref})^{C_{T_{Sample}}} \cdot (E_{Target})^{C_{T_{Calibrator}}}}{(E_{Ref})^{C_{T_{Calibrator}}} \cdot (E_{Target})^{C_{T_{Sample}}}}$$

- mit:
- RGE = relative Genexpression
 - E_{Ref} = Effizienz der PCR-Amplifikation des Haushaltsgens
 - E_{Target} = Effizienz der PCR-Amplifikation des Zielgens
 - $C_{T_{Sample}}$ = C_T -Wert der Probe
 - $C_{T_{Calibrator}}$ = C_T -Wert des Kalibrators

Zur Berechnung der PCR-Effizienzen wurde eine serielle Verdünnung der verwendeten cDNA erstellt und in der *Real-Time* PCR eingesetzt. Durch Auftragung der jeweiligen Ausgangsmenge gegen die erhaltenen C_T -Werte wird eine Gerade erhalten, aus deren Steigung sich die PCR-Effizienz wie folgt berechnen lässt:

$$E = 10^{-\frac{1}{m}}$$

mit: E = Effizienz der PCR-Amplifikation
m = Steigung der Geraden

Um eine Co-Amplifikation von genomischer DNA auszuschließen, wurden ausschließlich Intron-überspannende *Primer* verwendet, so dass nur aus gespleißter mRNA revers transkribierte cDNA amplifiziert wurde. Der verwendete Standard *Real-Time* PCR-Ansatz mit einem Gesamtvolumen von 10 μ l setzte sich wie folgt zusammen:

2,50 μ l *Template* (cDNA)
5,00 μ l *Platinum SYBR Green qPCR SuperMix-UDG*
0,25 μ l *Forward-Primer*
0,25 μ l *Reverse-Primer*
2,00 μ l *Aqua dest.*

Das verwendete *Real-Time* PCR-Programm kann Tabelle 5.3 entnommen werden.

Tabelle 5.3 Standardprogramm in der quantitativen *Real-Time* PCR.

Programmprozess	Zeit	Temperatur	Zyklenzahl
UDG-Inkubation	2 min	50 °C	1
Aktivierung	2 min	95 °C	1
Denaturierung	10 s	95 °C	45
<i>Annealing</i>	15 s	58 °C	
Elongation	20 s	72 °C	
Schmelzkurve	15 s	95 °C	1
	15 min	60 - 95 °C	

Zur Amplifikation der Haushalts- und Zielgene wurden die in Tabelle 6.3 angegebenen Oligonukleotide verwendet.

5.1.8 Klonierungsstrategie zur Generierung von Promotor-Reporter-Gen-Konstrukten

Die Untersuchung der Promotoraktivität erfolgte mithilfe des *Firefly*-Luziferase-Reporter-Gen-Vektors pGI4.10. Dieser Vektor besitzt ein für die Expression in Säugerzellen Codon-optimiertes *Firefly*-Luziferase-Gen (*luc2*) mit einer vorgeschalteten *multiple cloning site*, in die die zu untersuchenden Promotorfragmente inseriert werden.

Da eine Amplifikation der ersten 470 bp des *XYLT1*-Promotors mittels PCR nicht möglich war, erfolgte die Generierung des Bereiches von Position -601 bis -1 stromaufwärts des *XYLT1*-Translationsstarts durch eine Gensynthese. Für eine Insertion in den pUC57-Vektor wurde zusätzlich eine *XhoI*- und eine *EcoRI*-Restriktionsschnittstelle am 5'- bzw. 3'-Ende dieses Fragmentes synthetisiert (vgl. Abb. 5.1.1). Anschließend erfolgte die Exzision dieses 600 bp umfassenden *XYLT1*-Promotorfragmentes mittels der Restriktionsendonukleasen *EcoRV* und *XhoI* aus dem pUC57-Vektor und eine Insertion in den pGI4.10-Vektor. Für eine Elongation der *XYLT1*-Promotorregion wurde dieser Bereich zunächst um 71 bp mittels der Restriktionsendonuklease *Acc65I* verkürzt, so dass das 5'-Ende des im Vektor verbleibenden Promotorfragmentes der Position -530 stromaufwärts des *XYLT1*-Translationsstarts entsprach. In einem zweiten Schritt wurden diverse *XYLT1*-Promotorfragmente mittels PCR amplifiziert, deren 3'-Ende der Position -469 entsprach; durch die Verwendung diverser *Forward-Primer* wurden Promotorfragmente mit verschiedenen 5'-Enden generiert (maximal bis Position -1638 stromaufwärts des *XYLT1*-Translationsstarts; entsprechende *Primer*-Sequenzen sind Tabelle 6.1 zu entnehmen). Zusätzlich zu der im *XYLT1*-Promotor an Position -530 lokalisierten *Acc65I*-Restriktionsschnittstelle wurde über diese *Forward-Primer* eine weitere Schnittstelle für die Restriktionsendonuklease *Acc65I* eingeführt. Nach einer Subklonierung der Promotorfragmente in den Vektor pCR2.1TOPO erfolgte die Exzision dieser Konstrukte unter Verwendung dieser *Acc65I*-Restriktionsschnittstellen. Die so erhaltenen Promotorkonstrukte wurden in den ebenfalls mittels *Acc65I* restringierten pGI4.10-Vektor, der bereits die ersten 530 bp unmittelbar stromaufwärts des *XYLT1*-Translationsstarts enthielt, inseriert (Abb. 5.1.1).

Für die Generierung der *XYLT1*-Promotorfragmente -531+1 und -218+1, die kleiner als die mittels Gensynthese erhaltenen 601 bp waren, wurde der pGI4.10-Vektor, der das 601 bp umfassende *XYLT1*-Promotorkonstrukt enthielt, verwendet. Das -218+1-Promotorfragment konnte hierbei durch einen Restriktionsverdau mittels der Enzyme *Acc65I* und *EcoNI* erhalten werden. Nach Abtrennung der ausgeschnittenen DNA-Fragmente mittels Gelelektrophorese wurde der restringierte Vektor aus dem Agarosegel isoliert (vgl. Abschnitt 5.1.12). Im Anschluss erfolgte die Generierung von glatten Enden mittels T4-DNA-Polymerase und eine Religation des Vektors. Das -531+1-Promotorkonstrukt wurde hingegen durch eine Restriktion des Vektors mit dem Restriktionsenzym *Acc65I* erhalten. Die um 218 bp 3'-trunkierten *XYLT1*-

Promotorfragmente wurden durch Exzision dieses Bereiches aus den jeweiligen Promotor-Vektor-Konstrukten mittels der Restriktionsendonukleasen *EcoNI* und *EcoRV* generiert.

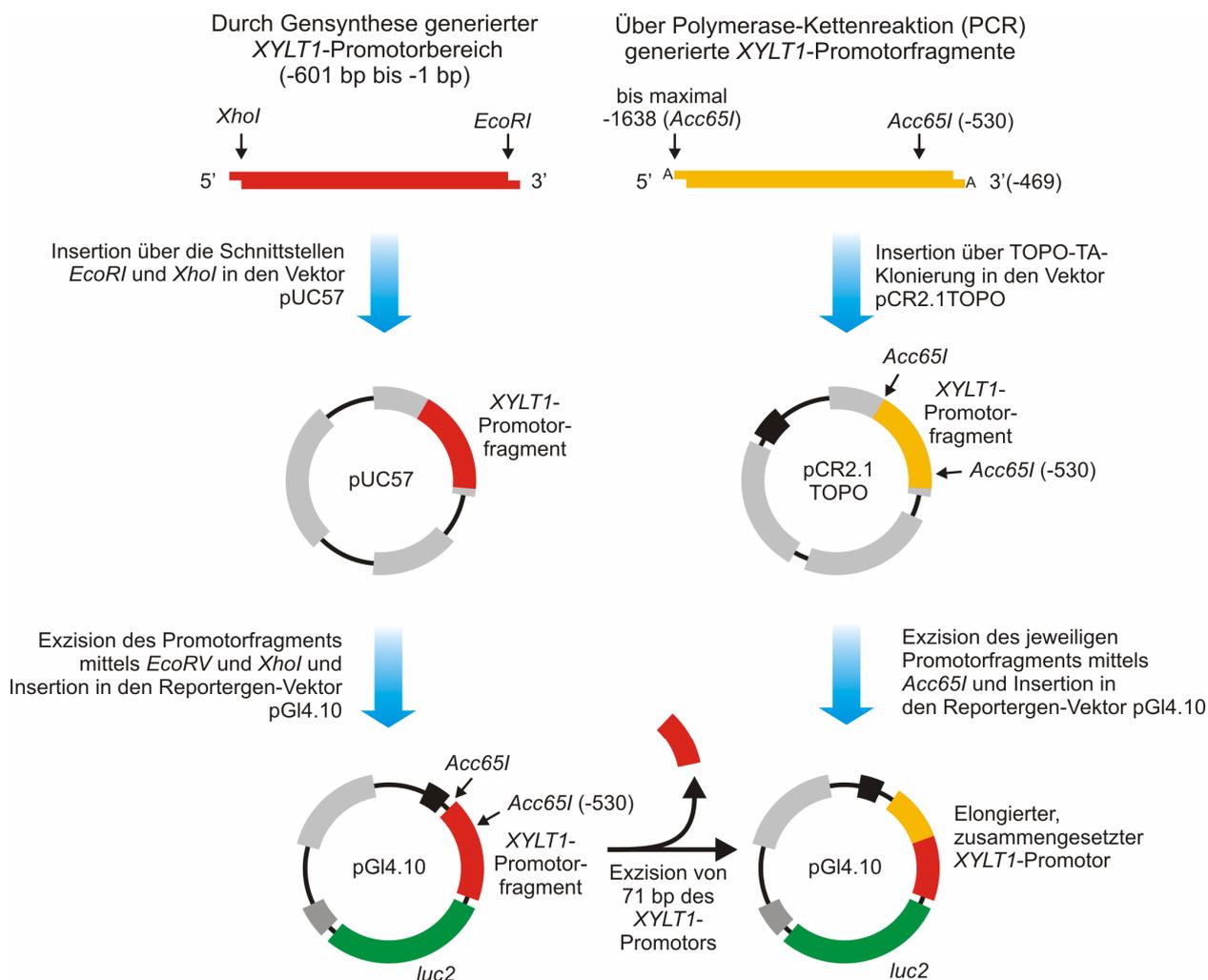


Abb. 5.1.1: Schematische Darstellung der Klonierungsstrategie zur Generierung von XYLT1-Promotor-Reporter-Gen-Konstrukten.

Alle untersuchten XYLT2-Promotorfragmente wurden mittels PCR aus humaner genomischer DNA amplifiziert und anschließend zunächst in den pCR2.1TOPO-Vektor inseriert (entsprechende *Primer*-Sequenzen sind Tabelle 6.2 zu entnehmen). Im Anschluss erfolgte die Exzision dieser Fragmente mittels der Restriktionsendonukleasen *SacI* und *HindIII* und die Insertion in den Reporter-Gen-Vektor pGI4.10.

5.1.9 Bestimmung des *XYLT2*-Transkriptionsstartpunktes mittels 5'-RACE

Die Bestimmung des *XYLT2*-Transkriptionsstarts (TSS) erfolgte mittels 5'-RACE (*rapid amplification of cDNA ends*) durch die Firma Vertis. Hierzu wurde mRNA aus humanen Zellen mittels des *mirVana* RNA-Isolierungs-Kits isoliert. In einem ersten Schritt wurden die mRNAs mittels *Calf Intestine Phosphatase* dephosphoryliert (vgl. Abb. 5.1.2). Intakte, vollständige mRNA bleibt hierbei unverändert, weil deren 5'-Enden durch eine 7-Methylguanosin-Kappe geschützt werden. Im Gegensatz dazu findet eine Dephosphorylierung der 5'-Enden von teilweise degradierten mRNAs statt. Durch die Aktivität der *Tobacco Acid Pyrophosphatase* (TAP) erfolgte anschließend die Entfernung der 7-Methylguanosin-Kappe, wobei ein 5'-Phosphatrest verbleibt. An diesen wurde ein Adapter-Oligonukleotid (*antisense*) durch die Aktivität einer RNA-Ligase ligiert. Im Anschluss erfolgte die Synthese eines komplementären DNA-Stranges. Dieser wurde im Rahmen einer PCR unter Verwendung des *sense*-Adapter-Oligonukleotids und des genspezifischen *Primers* amplifiziert und anschließend in den pCR2.1TOPO-Vektor inseriert. Durch die Sequenzierung des inserierten Fragmentes mittels vektorspezifischer *Primer* erfolgte die Lokalisation des TSS.

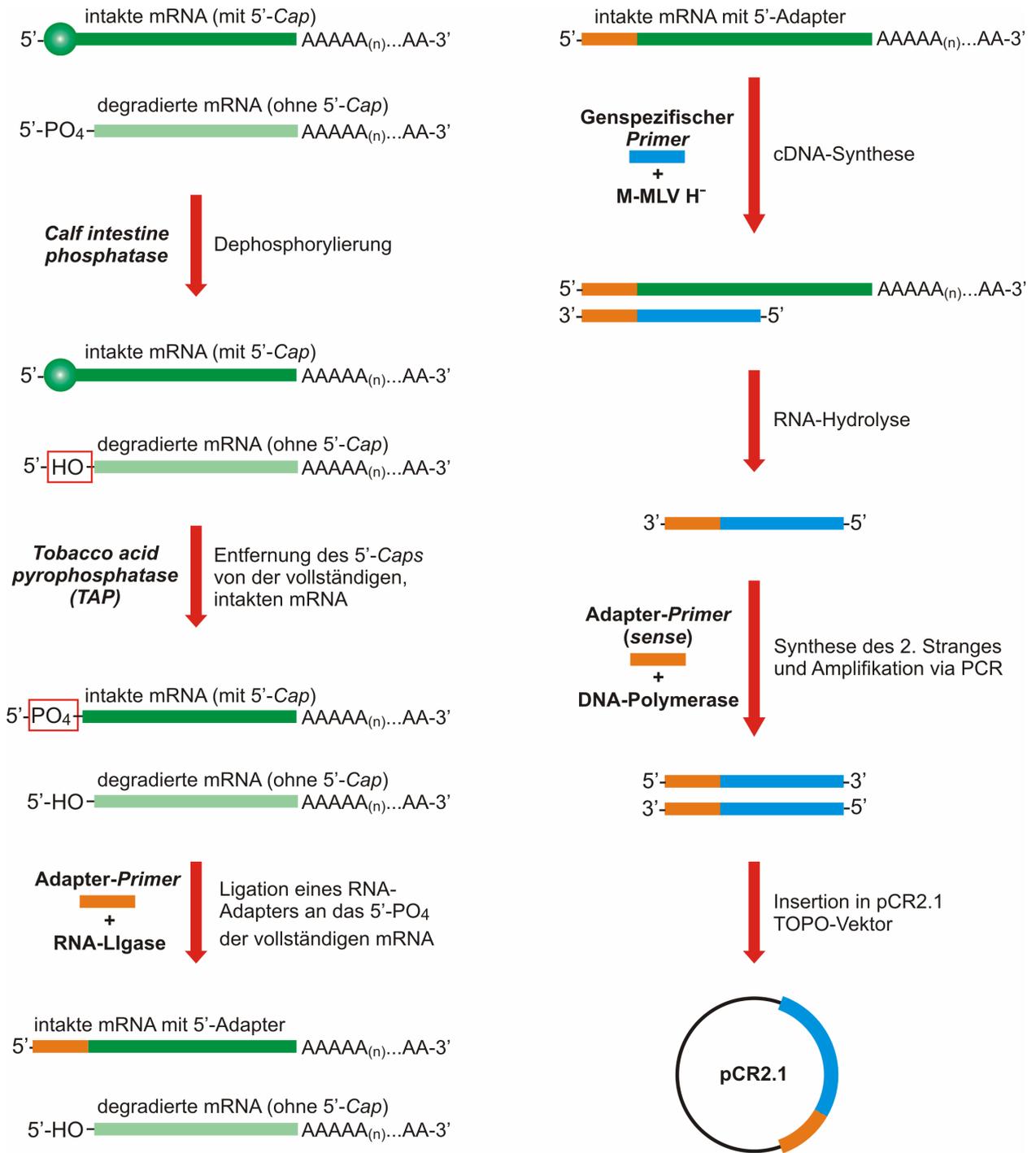


Abb. 5.1.2: Schematische Darstellung der Identifizierung des *XYLT2*-Transkriptionsstartes mittels 5'-RACE.

5.1.10 Sequenzierung von DNA-Fragmenten

Die DNA-Sequenzierung erfolgte nach dem Didesoxyverfahren (auch Kettenabbruchverfahren) nach Sanger [151]. Diese Methode basiert auf der enzymatisch katalysierten Synthese einer Population von basenspezifisch terminierten DNA-Fragmenten, die nach ihrer Größe gelelektrophoretisch getrennt werden können.

Das im Rahmen dieser Arbeit verwendete *BigDye Terminator v1.1 Cycle Sequencing Kit* enthält neben Desoxynukleotiden (dNTPs) auch ein Gemisch aus vier Didesoxynukleotiden (ddATP, ddGTP, ddTTP, ddCTP), die mit jeweils einem anderen Fluoreszenzfarbstoff markiert sind. Im Rahmen der Sequenzierreaktion erfolgt der Einbau dieser ddNTP-Moleküle und bewirkt einen Kettenabbruch. Hieraus resultiert eine Akkumulation von unterschiedlich langen fluoreszenzmarkierten Produkten. Durch die spezifischen Emissionsspektren nach Anregung durch einen Laserstrahl ist es möglich, alle Didesoxynukleotide in einem Ansatz zu detektieren. Die Auftrennung der DNA-Fragmente erfolgt durch eine Kapillargelelektrophorese mit anschließender Fluoreszenzdetektion, aus der sich die Sequenz ergibt.

Für die Sequenzierung der angegebenen Vektoren wurden die in Tabelle 6.4 angegebenen Oligonukleotide verwendet.

Ein typischer Sequenzieransatz hatte die folgende Zusammensetzung:

4,0 µl *BigDye v1.1* Sequenzier-Prämix

2,0 µl *BigDye* Sequenzier-Puffer (10x)

1,5 µl *Primer* (25 µM)

500 ng *Template*-DNA (Plasmid-DNA)

5,0 µl *Q-Solution*

ad 20 µl *Aqua dest.*

Zur Vermeidung von Verdunstung wurde der Ansatz mit einem Tropfen Mineralöl überschichtet. Das Temperaturprofil der Sequenzierreaktion kann Tabelle 5.4 entnommen werden.

Tabelle 5.4 Standardprogramm für die Sequenzierreaktion.

Programmprozess	Zeit	Temperatur	Zyklenzahl
Initiale Denaturierung	5 min	98 °C	1
Denaturierung	10 s	96 °C	25
<i>Annealing</i>	15 s	50 °C	
Elongation	20 s	63 °C	

Zur Abtrennung des Mineralöls und nicht eingebauter Didesoxynukleotide erfolgte eine Aufreinigung der Reaktionsansätze mittels einer Sephadex G50 Gelfiltration. Hierzu wurden *Receiver Columns* verwendet, die mit 800 µl Sephadex G50 in TE-Puffer beladen und bei 1.000 × g für 3 min zentrifugiert wurden. Anschließend wurde der Reaktionsansatz auf die gepackte Säule aufgetragen und für 4 min bei 1.000 × g zentrifugiert. Das erhaltene Eluat wurde mit HPLC-gereinigtem Wasser auf ca. 40 µl Endvolumen aufgefüllt und nach einem Denaturierungsschritt von 2 min bei 94 °C für die Sequenzierung eingesetzt.

Die elektrophoretische Injektion der Probe erfolgte für 30 s bei einer Spannung von 10 kV. Die Kapillargelelektrophorese wurde bei 15 kV und 50 °C für 45 min durchgeführt.

5.1.11 Auftrennung von DNA-Fragmenten mittels Agarosegel-Elektrophorese

Die Agarosegel-Elektrophorese wird zur Auftrennung und zur Bestimmung von DNA-Fragmenten unterschiedlicher Länge verwendet. Die elektrophoretische Mobilität der negativ geladenen Nukleinsäuren wird hierbei durch verschiedene Faktoren, wie der Agarosekonzentration, der angelegten Spannung, der Konformation der Nukleinsäure sowie der Zusammensetzung und Ionenstärke des verwendeten Laufpuffers beeinflusst.

Als Gelmatrix wurde 0,5–2,0% Agarose (w/v) in TBE-Puffer durch Aufkochen gelöst und zur optischen Detektion der Nukleinsäuren 20 µl des DNA-interkalierenden Farbstoffs Ethidiumbromid (1,0% in wässriger Lösung) zugesetzt (Extinktion: 302 nm, Emission: 590 nm).

Nach der Polymerisation wurde das Gel in der Elektrophoresekammer mit TBE-Puffer überschichtet und die mit 30% Auftragspuffer versetzten Nukleinsäureproben aufgetragen. Die Elektrophorese wurde bei einer Spannung von 15 V/cm² durchgeführt. Zur Längenbestimmung der aufgetrennten Oligonukleotide wurden zusätzlich zu den Proben Längenstandards mit DNA-Fragmenten genau definierter Größe aufgetragen. Die Dokumentation erfolgte mithilfe eines computergestützten Bilderfassungssystems.

5.1.12 Aufreinigung von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen

Nach Extraktion der gewünschten DNA-Bande aus dem Agarosegel mit einem sterilen Skalpell erfolgte die Isolierung der DNA mithilfe des *NucleoSpin Extract II Kits*. Die Methode basiert auf der Bindung von DNA an eine Silikamembran in Gegenwart von chaotropen Salzen. Alle während der Isolierung durchgeführten Zentrifugationsschritte wurden bei 11.000 × g durchgeführt.

Zu der ausgeschnittenen Gelbande wurden 200 µl Buffer NT pro 100 mg Agarosegel gegeben und der Ansatz für 5–10 min bei 50 °C im Wasserbad inkubiert. Das Schmelzen der Agarose wurde durch Vortexen in Intervallen von 2 min beschleunigt. Im Anschluss wurde der vollständig gelöste Ansatz auf eine *NucleoSpin Extract II* Säule gegeben und für 1 min zentrifugiert. Die Säule wurde durch Zugabe von 700 µl Buffer NT3 und anschließender Zentrifugation für 1 min gewaschen und der Durchfluss verworfen. Zur quantitativen Entfernung des Waschpuffers wurde nochmals für 2 min zentrifugiert. Die Elution der DNA erfolgte durch Zugabe von 20 µl DNase-freiem Wasser direkt auf die Säule und anschließender Zentrifugation für 1 min in ein steriles Mikrozentrifugengefäß.

5.1.13 Hydrolytische Spaltung von DNA durch Restriktionsendonukleasen

Restriktionsendonukleasen sind Enzyme bakteriellen Ursprungs, die die Phosphodiesterbindungen beider Stränge eines DNA-Moleküls hydrolytisch an spezifischen, häufig palindromischen 4–8 bp langen Erkennungssequenzen spalten. Die Effizienz und Spezifität der Restriktion ist abhängig von den Reaktionsbedingungen und für jedes Restriktionsenzym individuell verschieden.

Ein typischer Restriktionsansatz (50 µl) hatte die folgende Zusammensetzung:

- 1,0 µg Plasmid-DNA
- 5,0 µl 10x Restriktionspuffer
- 1,0 µl Restriktionsenzym (10 U/µl)
- ad 50 µl *Aqua dest.*

Bei Verwendung bestimmter Restriktionsenzyme wurde nach Herstellerangaben den Ansätzen zusätzlich noch 0,5 µl BSA (100x, 10 mg/ml) zugesetzt.

Die resultierenden Fragmente wurden anschließend durch Agarosegel-Elektrophorese aufgetrennt (vgl. 5.1.11) und mittels des unter Abschnitt 5.1.12. angegebenen Verfahrens aus dem Agarosegel aufgereinigt.

5.1.14 Dephosphorylierung von DNA-Fragmenten

Zur Vermeidung einer Religation erfolgte die Dephosphorylierung der 5'-Enden von DNA-Fragmenten mithilfe der *Antartic Phosphatase*.

Ein typischer Reaktionsansatz (50 µl) setzte sich wie folgt zusammen:

- 2,0 µg Plasmid-DNA
- 5,0 µl 10x Reaktionspuffer (50 mM Bis-Tris-Propan, 1 mM MgCl₂, 0,1 mM ZnCl₂, pH 6,0)
- 1,0 µl *Antartic Phosphatase*
- ad 50 µl *Aqua dest.*

Der Reaktionsansatz wurde für 1 h bei 37 °C inkubiert. Im Anschluss erfolgte eine Hitzeinaktivierung der Phosphatase für 45 min bei 65 °C.

5.1.15 Generierung von glatten DNA-Enden (*blunt ends*)

Bei der Restriktion eines DNA-Fragmentes mit verschiedenen Restriktionsenzymen kann es zur Bildung verschiedener kohäsiver Überhänge an den jeweiligen Enden dieses Fragmentes kommen. Zur Generierung von glatten DNA-Enden (*blunt ends*), die eine Religation des Fragmentes ermöglichen, wurde die T4-DNA-Polymerase eingesetzt. Dieses Enzym katalysiert die Synthese von DNA in 5'→3'-Orientierung und besitzt eine 3'→5'-Exonukleaseaktivität.

Nach Ablauf des Restriktionsverdau wurden dem inaktivierten Restriktionsansatz 2 µl dNTPs (2,5 mM) und 1 µl T4-DNA-Polymerase zugesetzt. Der Ansatz wurde für 10 min bei RT inkubiert und die Reaktion durch Erhöhung der Temperatur auf 70 °C für 30 min gestoppt.

5.1.16 Ligation mit der T4-Ligase

DNA-Ligasen sind NAD⁺- bzw. ATP-abhängige Enzyme, die die Bildung einer Phosphodiesterbindung zwischen der 3'-OH-Gruppe am Ende eines DNA-Stranges und der 5'-Phosphatgruppe eines anderen DNA-Stranges katalysieren. Durch eine Ligase können DNA-Fragmente in eine zirkuläre Form überführt werden.

Ein typischer Ansatz für eine Ligationsreaktion sah wie folgt aus:

- 2,0 µl Plasmid-DNA (200 ng/µl)
- 16,0 µl *Insert*-DNA
- 1,0 µl T4-DNA-Ligase (1 U/µl)
- 2,0 µl T4-DNA-Ligase Puffer (10x, incl. 10 mM ATP)

Der Ansatz wurde für 8 h bei RT inkubiert.

5.1.17 Zielgerichtete Mutagenese (*site-directed mutagenesis*)

Mithilfe der zielgerichteten Mutagenese ist es möglich, basenspezifisch Mutationen, Deletionen oder Insertionen in ein DNA-Fragment einzuführen. Im Rahmen dieser Arbeit wurde das *QuikChange XL Site-directed Mutagenesis Kit* der Firma Stratagene verwendet. Bei dieser Methode erfolgt die Einführung der Mutation in ein zirkuläres Plasmid durch die Verwendung von zwei komplementären Oligonukleotid-*Primern* mit einer Gesamtlänge von jeweils 30–45 Basen, die die gewünschte Mutation beinhalten. Durch die Verwendung einer *Pfu*-Polymerase, die über eine 3'→5'-Exonukleaseaktivität verfügt, erfolgt die Amplifikation

beider DNA-Stränge des Plasmids mit sehr hoher Genauigkeit. Die so generierten Plasmide besitzen die von den Oligonukleotid-*Primern* vorgegebene Mutation und liegen als zirkuläre Plasmide mit einem Einzelstrangbruch vor. Die Elimination von nicht mutierter parentaler DNA erfolgt durch das Restriktionsenzym *DpnI*. Dieses Enzym erkennt und spaltet spezifisch methylierte und hemimethylierte DNA, wie sie bei Plasmiden, die aus Bakterienstämmen mit *dam*-Methylierungssystem isoliert wurden, vorliegt. Nach Transformation der mutierten Plasmide in den *E. coli*-Stamm XL10-Gold erfolgt die Ligation des Einzelstrangbruchs durch Enzyme der Bakterienzelle.

Ein typischer Mutagenese-Ansatz (50 μ l) setzte sich wie folgt zusammen:

5,0 μ l 10x Reaktionspuffer

125 ng *Forward-Primer*

125 ng *Reverse-Primer*

1,0 μ l dNTP-Mix

25 ng Plasmid-DNA

ad 50 μ l *Aqua dest.*

Die in der Mutagenese des *XYLT1*- und *XYLT2*-Promotors verwendeten *Primer* sind Tabelle 6.5 und Tabelle 6.6 zu entnehmen, das verwendete Standardprogramm der PCR-Reaktion ist in Tabelle 5.5 dargestellt.

Tabelle 5.5 Standardprogramm für die *QuikChange Site-Directed Mutagenesis*-Reaktion.

Programmprozess	Zeit	Temperatur	Zyklenzahl
Denaturierung	30 s	95 °C	1
Denaturierung	30 s	95 °C	18
<i>Annealing</i>	1 min	55 °C	
Elongation	5 min	68 °C	

Nach Beendigung der PCR-Reaktion wurde der Ansatz für 2 min auf Eis abgekühlt. Hiernach erfolgte die Zugabe von 1 μ l (10 U/ μ l) des Restriktionsenzym *DpnI* mit anschließender Inkubation bei 37 °C für 1 h. Ein Aliquot von 4 μ l dieses Ansatzes wurde in der Transformation, wie unter Abschnitt 5.2.2 beschrieben, eingesetzt.

5.1.18 *Annealing* komplementärer Oligonukleotide

Das *Annealing* zweier komplementärer einzelsträngiger Oligonukleotide erfolgte in einem Ansatz von 100 µl durch die Mischung äquimolarer Anteile (10 µM) beider Oligonukleotide in 0,5x PCR-Puffer (125 mM Tris·HCl, 250 mM KCl, 7,5 mM MgCl₂). Das Gemisch wurde in einem *Thermocycler* für 5 min auf 98 °C erhitzt und anschließend um 1 °C/2 min auf 20 °C abgekühlt.

5.2 Zellbiologische Methoden

5.2.1 Anzucht und Kryokonservierung von *Escherichia coli*

Im Rahmen dieser Arbeit wurden für alle Klonierungsexperimente die kommerziellen *E.coli*-Stämme TOP10 oder XL10-Gold verwendet. Für Plasmidisolierungen wurden 5 bzw. 50 ml mit 75 µg/ml Ampicillin versetztes LB-Medium (*lysogeny broth*) mit dem entsprechenden Klon inokuliert und ü.N. bei 37 °C inkubiert. Zur revitalisierbaren Lagerung der Kulturen wurde ein 750 µl Aliquot der Zellsuspension mit 750 µl Glycerin vorsichtig gemischt und bei –80 °C gefroren.

5.2.2 Transformation von *E. coli* TOP10- und XL10-Gold-Zellen

Die Transformation von kommerziell erhältlichen, chemisch kompetenten *E. coli* TOP10- und XL10-Gold-Zellen wurde mittels einer Hitzeschockinkubation durchgeführt. Hierzu wurden die bei –80 °C gelagerten Zellen auf Eis aufgetaut und anschließend mit 4 µl Ligationsansatz versetzt. Hiernach erfolgte eine Inkubation für 30 min auf Eis mit anschließendem Hitzeschock für 30 s bei 42 °C und erneuter Abkühlung auf Eis für 2 min. Nach Zugabe von 250 µl des auf 37 °C vortemperierten SOC-Mediums wurde der Transformationsansatz für 50–75 min rotierend im Brutschrank bei 37 °C inkubiert. Im Anschluss erfolgte die Ausplattierung des Ansatzes auf Selektionsmedium (LB-Agar-Platten mit 75 µg/ml Ampicillin) mit anschließender Inkubation ü.N. bei 37 °C im Brutschrank.

Zur weiteren Analyse erfolgte eine PCR der transformierten Klone (vgl. Abschnitt 5.1.6) sowie der Ansatz einer Flüssigkultur mit anschließender Plasmid-DNA-Isolierung. Die korrekte Orientierung des inserierten Fragmentes wurde durch DNA-Sequenzierung verifiziert.

5.2.3 Kultivierung von humanen Zellen

5.2.3.1 Kulturmedien und Zusätze

Alle Zellkulturmedien wurden, sofern nicht anders angegeben, mit 100 U/ml Penicillin, 100 µg/ml Streptomycin und 250 ng/ml Amphotericin B versetzt. Serumhaltiges Medium enthielt 10% fetales Kälberserum (FCS).

Im Folgenden sind die verwendeten Medien und die zugehörigen Zelltypen aufgeführt:

RPMI 1640	SW1353 (human, Chondrosarkom)
DMEM	HepG2 (human, Hepatoma)

5.2.3.2 Kultivierung humaner Zelllinien

Alle Zellkulturarbeiten wurden unter einer sterilen Werkbank und mit sterilem Einwegmaterial durchgeführt. Die eukaryotischen Zelllinien wurden in sterilen 75 cm²-Zellkulturflaschen respektive 4 cm²-Zellkulturschalen kultiviert, deren Oberfläche das adhärente Wachstum der Zellen begünstigt. Die Kultivierung erfolgte bei 37 °C in einer Atmosphäre von 5% CO₂ und 99% Luftfeuchtigkeit.

Das jeweilige Zellkulturmedium wurde alle 3 bis 4 Tage gewechselt. Hierzu wurde der Zellkulturüberstand (ZKÜ) mit einer Pasteurpipette aus den Zellkulturflaschen abgezogen und der Zellrasen zur Entfernung abgestorbener Zellen zweimal mit 0,1 ml/cm² DPBS gewaschen. Anschließend wurde 0,2 ml/cm² des auf RT erwärmten Zellkulturmediums zu den Zellen gegeben.

5.2.3.3 Passagieren von adhärennten Zellen

Zur Vermeidung einer Kontaktinhibition wurden die adhärent wachsenden Zellkulturen nach Erreichen einer 80–90%igen Konfluenz passagiert. Hierzu wurde, wie unter 5.2.3 beschrieben, der ZKÜ entfernt und die Zellen mit DPBS gewaschen. Die Ablösung der Zellen von der Kulturoberfläche erfolgte durch Zugabe von 5 ml einer Trypsin/EDTA-Lösung (0,05% Trypsin, 0,02% EDTA in PBS) und anschließender Inkubation für ca. 10 min bei 37 °C. Nach Ablösung der Zellen erfolgte die Zugabe von 5 ml FCS-haltigem Zellkulturmedium. Die Zellsuspension wurde in ein Zentrifugenröhrchen überführt und für 5 min bei 1.000 × g zentrifugiert. Das Zellpellet wurde in 2 ml Zellkulturmedium resuspendiert und die Zellen in der gewünschten Zelldichte auf neue Zellkulturflaschen mit 0,2 ml/cm² Medium ausgesät.

5.2.3.4 Kryokonservierung humaner Zellen

Zur Kryokonservierung von Zellkulturen wurde der Inhalt einer zu 80% konfluenten Zellkulturschale in 1 ml Zellkulturmedium aufgenommen und ein Aliquot von je 500 µl in ein vorgekühltes Kryoröhrchen mit 500 µl kaltem Einfriermedium (10% DMSO in FCS) gegeben. Um ein schonendes Einfrieren zu gewährleisten, wurden die Kryoröhrchen in Aluminiumblöcke und Styroporboxen verpackt und für 24–48 h bei –80 °C gelagert. Anschließend erfolgte die Überführung der Proben in flüssigen Stickstoff.

5.2.3.5 Revitalisierung humaner Zellen

Die Revitalisierung von kryokonservierten Zellkulturen erfolgte möglichst rasch durch Verwendung eines auf 37 °C vortemperierten Wasserbades. Die Zellsuspension wurde in ein Zentrifugenröhrchen mit 10 ml auf 37 °C vortemperierten Zellkulturmedium gegeben und bei RT 5 min bei 500 × g zentrifugiert. Das Pellet wurde in 1 ml Zellkulturmedium aufgenommen und in eine neue 75 cm²-Zellkulturflasche ausgesät.

5.2.3.6 Bestimmung der Zellzahl und Vitalität

Die Bestimmung der Zellzahl erfolgte mithilfe einer Neubauer-Zählkammer. Hierzu wurde ein Aliquot von 25 µl der Zellsuspension mit 225 µl einer 0,2%igen Trypanblau-Lösung vermischt und 20 µl dieser Lösung in die Zählkammer pipettiert. Der Farbstoff kann zerstörte Membranen toter Zellen durchdringen, so dass diese dunkelblau erscheinen; vitale Zellen erscheinen dagegen nahezu farblos. Die ermittelte Zellzahl ($\times 10^4$) entspricht der Zellzahl in 1 ml Medium, wobei zusätzlich der Verdünnungsfaktor zu berücksichtigen ist.

5.2.3.7 Inkubation von SW1353- und HepG2-Zellen mit verschiedenen TGFβ-Isoformen und Transkriptionsfaktor-Inhibitoren

Zur Untersuchung des Einflusses verschiedener TGFβ-Isoformen auf die Expression der *XYLT*-Gene erfolgte die Behandlung von SW1353-Chondrosarkomzellen mit TGFβ₁ oder TGFβ₃. Die Zellen wurden hierzu in 9,6 cm²-Zellkulturschalen ausgesät. Nach 24 h wurde das Standardkultivierungsmedium gegen TGFβ₁- oder TGFβ₃-haltiges Medium (5 ng/ml) ausgetauscht und die Zellen für weitere 24 h kultiviert. Die eingesetzten Transkriptionsfaktor-Inhibitoren Curcumin und Tanshinon IIA sowie der Alk5-Inhibitor SB431542 wurden in DMSO gelöst und in einer Endkonzentration von 20 µM (Curcumin und SB431542) bzw.

100 μM (Tanshinon IIA) in den Zellkulturexperimenten eingesetzt. Das Antibiotikum Mithramycin A, das die Bindung von Sp-Proteinen an die DNA verhindert, wurde in Wasser gelöst und in der jeweils angegebenen Konzentration für die Behandlung von SW1353- und HepG2-Zellen verwendet.

5.2.4 Liposomen-vermittelte Plasmid-Transfektion

Die Transfektion von SW1353-Chondrosarkom- und HepG2-Hepatoma-Zellen erfolgte mithilfe des auf Liposomen basierenden Transfektionsreagenzes *Lipofectamin 2000*. Für die Transfektion von Plasmiden wurden die Zellen einen Tag zuvor in antibiotikafreiem Medium so ausgesät, dass sie am nächsten Tag zu 80–90% konfluent waren.

Ein Transfektionsansatz für eine Zellkultivierungsoberfläche von $4,0 \text{ cm}^2$ setzte sich wie folgt zusammen:

Lösung A:	100 μl Kultivierungsmedium (Antibiotika- und FCS-frei)
	1 μg <i>Firefly</i> -Luziferase-Plasmid
	10 ng <i>Renilla</i> -Luziferase-Plasmid
Lösung B:	100 μl Kultivierungsmedium (Antibiotika- und FCS-frei)
	4 μl <i>Lipofectamin 2000</i>

Die beiden Lösungen wurden vereint und für 20 min bei RT inkubiert. Anschließend erfolgte die Zugabe des Gemisches zu den Zellen, die hiernach bei $37 \text{ }^\circ\text{C}$ im Zellkulturschrank inkubiert wurden. Das Medium wurde 12–16 h nach der Transfektion erneuert und die Zellen 48 h nach Transfektion zur Analyse der Luziferase-Expression lysiert.

5.2.5 Liposomen-vermittelte *short interference RNA* (siRNA)-Transfektion

Die Transfektion von *short interference RNA* (siRNA) in die jeweiligen Zellen erfolgte analog zu der unter Abschnitt 5.2.4 beschriebenen Plasmid-Transfektion. Im Gegensatz hierzu wurden die Zellen allerdings in $9,6 \text{ cm}^2$ -Zellkulturschalen so ausgesät, dass die Konfluenz am Folgetag etwa 50% betrug. Zur Herabregulation der mRNA-Expression der Transkriptionsfaktoren Sp1 und Sp3 wurden die in Tabelle 6.7 angegeben sequenzspezifischen siRNAs in einer Endkonzentration von 15 nM eingesetzt. Die Verdünnung der siRNA-Oligonukleotide sowie 5 μl des Transfektionsreagenzes erfolgten in jeweils 250 μl FCS- und antibiotikafreiem Kultivierungsmedium.

5.3 Proteinchemische Methoden

5.3.1 Isolierung von nukleären Proteinen

Die Isolierung von nukleären Proteinen erfolgte mithilfe des *NE-PER Nuclear and cytoplasmic extraction reagents Kit* der Firma Pierce. Die Methode basiert auf einer stufenweisen Separation und Präparation von cytoplasmatischen und nukleären Proteinen aus kultivierten Säugerzellen. In einem ersten Schritt erfolgt die selektive Lyse der Zellmembran, wobei die Kernmembran und somit die Nuklei intakt bleiben. Die Zellkerne werden in einem zweiten Schritt durch Zentrifugation pelletiert und anschließend durch ein weiteres Detergenz lysiert, so dass in dieser Fraktion hoch angereichertes nukleäres Proteinextrakt vorliegt.

Nukleäre Proteine wurden aus SW1353-Chondrosarkom- und HepG2-Hepatom-Zellen isoliert. Hierzu wurden die Zellen zunächst mit Trypsin-EDTA von der Kultivierungsoberfläche abgelöst, bei $500 \times g$ für 5 min pelletiert, mit 1 ml PBS gewaschen und anschließend in ein 1,5 ml Mikrozentrifugengefäß überführt. Nach einem erneuten Zentrifugationsschritt von 2 min bei $500 \times g$ wurde der Überstand abgenommen und 100 μ l eiskaltes CER I-Reagenz pro 20 mg Zellmasse hinzugegeben. Das Zellpellet wurde durch vortexen für 15 s auf der höchsten Stufe resuspendiert und anschließend für 10 min auf Eis inkubiert. Nach Zugabe von 5,5 μ l eiskalter CER II-Lösung pro 20 mg Zellmasse und erneuter Resuspendierung durch vortexen für 5 s erfolgte eine Inkubation für 1 min auf Eis. Im Anschluss wurde der Ansatz für 5 min bei $16.000 \times g$ zentrifugiert und der Überstand, der den cytoplasmatischen Proteinextrakt enthält, in ein vorgekühltes Mikrozentrifugengefäß überführt. Die unlösliche pelletierte Fraktion, die die Zellkerne enthält, wurde in 100 μ l eiskaltem NER-Reagenz durch mehrfaches alternierendes vortexen für 15 s und 10 min Inkubation auf Eis über einen Zeitraum von 40 min resuspendiert. Anschließend erfolgte ein finaler Zentrifugationsschritt bei $16.000 \times g$ für 10 min. Der Überstand mit den nukleären Proteinen wurde in ein vorgekühltes Mikrozentrifugengefäß überführt und wie die cytoplasmatische Fraktion bei $-80 \text{ }^\circ\text{C}$ gelagert.

5.3.2 Electrophoretic Mobility Shift Assay (EMSA)

Mithilfe des EMSA ist es möglich, Protein-DNA-Interaktionen nachzuweisen. Das Prinzip dieser Methode beruht darauf, dass Komplexe aus Proteinen und DNA in einer elektrophoretischen Auftrennung langsamer laufen als freie DNA.

Im Rahmen dieser Arbeit wurde das *LightShift Chemiluminescent EMSA Kit* verwendet. Zur Untersuchung der Bindung von Transkriptionsfaktoren (TF) wurden doppelsträngige, 5'-biotinylierte, 20–32 bp lange DNA-Oligonukleotide als *Probes* eingesetzt, die der jeweiligen Sequenz im Promotorbereich des *XYLT1*- bzw. *XYLT2*-Gens entsprachen. Die entsprechenden Sequenzen und Positionen im jeweiligen Promotor sind Tabelle 6.8 zu entnehmen.

Der Ansatz (20 µl) zur Untersuchung der Bindung des TFs AP-1 an die entsprechende Zielsequenz im *XYLT1*-Promotorbereich hatte die folgende Zusammensetzung:

- 2,0 µl 10x Bindungspuffer (100 mM Tris, 500 mM KCl, 10 mM DTT (pH 7,5))
- 3,0 µl Glycerin (50%)
- 1,5 µl Poly (dl-dC) (1 µg/µl)
- 2,0 µl Nukleärer Proteinextrakt (2 µg/µl)
- 2,0 µl 5'-biotinyliertes DNA-Oligonukleotid (10 fmol/µl)
- ad 20 µl *Aqua dest.*

Der Ansatz (20 µl) zum Nachweis der Bindung von TF der Sp1-Proteinfamilie an die entsprechenden Erkennungssequenzen im *XYLT2*-Promotor setzte sich wie folgt zusammen:

- 2,0 µl 10x Bindungspuffer (100 mM Tris, 500 mM KCl, 10 mM DTT (pH 7,5))
- 2,0 µl Glycerin (50%)
- 1,5 µl Poly (dl-dC) (1 µg/µl)
- 1,0 µl MgCl₂ (100 mM)
- 0,5 µl BSA (10 mg/ml)
- 0,5 µl NP-40 (1%)
- 3,0 µl Nukleärer Proteinextrakt (3 µg/µl)
- 2,0 µl 5'-biotinyliertes DNA-Oligonukleotid (12,5 fmol/µl)
- ad 20 µl *Aqua dest.*

In einigen Proben wurde zusätzlich 1 µl eines spezifisch gegen cJun, Sp1 oder Sp3 gerichteten Antikörpers (2 µg/µl) zur Identifizierung des gebundenen Proteins eingesetzt. Zur Überprüfung der Spezifität der Protein-DNA-Interaktion wurde einigen Ansätzen zusätzlich zu den biotinylierten DNA-Oligonukleotiden sequenzhomologe, nicht-biotinylierte DNA-Oligonukleotide in einem 40- bis 200-fachem molaren Überschuss zugesetzt. Zur Verifizierung der erhaltenen Ergebnisse erfolgte in bestimmten Reaktionsansätzen der Zusatz von 1 µg der rekombinanten TF cJun oder Sp1 statt des nukleären Proteinextraktes. Die Mischung wurde 20 min bei RT inkubiert. In den Ansätzen, die einen spezifischen Antikörper gegen einen der untersuchten TF beinhalteten, erfolgte zuvor eine weitere Inkubation von 20 min auf Eis, um eine Bindung der Antikörper an ihr entsprechendes Antigen zu ermöglichen. Danach wurden 5 µl Auftragspuffer hinzugegeben und 20 µl dieses Gemisches auf ein natives 6%iges Polyacrylamidgel aufgetragen. Zur Äquilibrierung des Gels und des 0,5x TBE-Laufpuffers sowie zur Gewährleistung einer konstanten Stromstärke und Geltemperatur wurde das Gel vor dem Beladen der Proben für 1 h einer Spannung von 100 V ausgesetzt. Die Auftrennung der Proben erfolgte für einen Zeitraum von 1,5 h bei einer Spannung von ebenfalls 100 V.

Nach erfolgter Auftrennung der Protein-DNA-Komplexe wurden diese mittels Elektrotransfer auf eine positiv geladene Nylonmembran übertragen. Hierzu wurde ein Stapel aus zwei *Blotting pads*, zwei Filterpapieren, dem Polyacrylamidgel, einer Nylonmembran, zwei Filterpapieren und zwei *Blotting*-Schwämmen in eine *Blotting*-Vorrichtung eingespannt. Die Nylonmembran wurde zuvor für 10 min in 0,5x TBE-Puffer äquilibriert. Vor der Verwendung der Blottingschwämme und Filterpapiere wurden diese ebenfalls mit 0,5x TBE-Puffer angefeuchtet. Die innere Blotkammer wurde mit Transferpuffer (0,5x TBE-Puffer), die äußere Kammer hingegen mit *Aqua dest.* gefüllt. Der Transfer wurde für 30 min bei 380 mA und 100 V durchgeführt. Anschließend erfolgte die Fixierung der Protein-DNA-Komplexe auf der Membran für 15 min mittels UV-Licht ($\lambda = 320 \text{ nm}$) auf einem Transilluminator.

Zur Detektion der immobilisierten Protein-DNA-Komplexe wurden zunächst freie Bindungsstellen der Nylonmembran mittels *Blocking Buffer* abgesättigt und für 15 min bei RT kontinuierlich geschüttelt. Im Anschluss wurde der *Blocking Buffer* dekantiert und die Membran für weitere 15 min mit 20 ml eines Streptavidin-HRP-Konjugates (1:300 verdünnt in *Blocking Buffer*) unter kontinuierlichem Schütteln inkubiert. Hiernach wurde die Membran 5 mal im Abstand von jeweils 5 min mit 20 ml *Wash Buffer* gewaschen und anschließend mit 30 ml *Substrate Equilibration Buffer* für 5 min behandelt. Nachdem die Membran in ein neues Gefäß überführt wurde, erfolgte eine lichtgeschützte Inkubation der Membran mit 12 ml *Substrate Solution*. Die Detektion der markierten Protein-DNA-Komplexe erfolgte mithilfe einer CCD-Kamera.

5.3.3 Bestimmung der Proteinkonzentration in nukleären Zellextrakten

Die Bestimmung der Proteinkonzentration erfolgte mittels des Bicinchoninsäure-(BCA)-Proteinassays. Die Methode beruht auf der Bildung von Cu^{2+} -Protein-Komplexen unter alkalischen Bedingungen und anschließender Reduktion von Cu(II) zu Cu(I) durch Cystein-, Tryptophan- und Tyrosinreste sowie durch die Peptidbindung selbst. Diese Reaktion ist direkt proportional zur Proteinkonzentration. 2,2'-Bichinolin-4,4'-dicarbonsäure (*Bicinchoninic acid*) ist ein für Cu(I) spezifisches chromogenes Reagenz, dessen Umsetzung photometrisch bei 562 nm quantifiziert werden kann. Zur Eichung wurde eine Verdünnungsreihe aus Rinderserumalbumin-Lösung (0–1000 mg/ml) verwendet. Die Durchführung erfolgte gemäß den Herstellerangaben. Die Extinktion der jeweiligen Probe wurde mittels des *Magellan*-Fluoreszenzplattendetektors bestimmt.

5.3.4 Reporter-gendetektion in Zelllysaten

Die transkriptionelle Aktivität der generierten *XYLT1*- und *XYLT2*-Promotor-Fragmente wurde mittels des *Dual-Luciferase Assays* bestimmt. Die Methode basiert auf der simultanen Expression und Messung von zwei individuellen Luziferase-Reporter-Enzymen in einem Ansatz. Durch die Co-Transfektion des pGI4.10-Vektors, der die verschiedenen *XYLT1*- und *XYLT2*-Promotorelemente stromaufwärts eines *Firefly*-Luziferase-Gens beinhaltet mit dem pGI4.74-Vektor, der als interne Kontrolle dient und einen *HSV-TK*-Promotor stromaufwärts des *Renilla*-Luziferase-Gens besitzt, erfolgt eine Co-Expression beider Luziferasen (vgl. Abschnitt 5.2.4). Diese besitzen eine unterschiedliche Enzymstruktur und katalysieren die Umsetzung verschiedener Substrate, wodurch eine selektive Diskriminierung der jeweiligen Reaktionen ermöglicht wird (Abb. 5.3.1). Hierdurch ist eine Normalisierung der gemessenen Werte für die *Firefly*-Luziferase auf die erhaltenen Werte für die konstant exprimierte *Renilla*-Luziferase möglich. Die Verwendung des *Renilla*-Luziferase-Vektors als interne Kontrolle ermöglicht somit eine drastische Reduzierung von Aktivitätsschwankungen, die durch Unterschiede in der Transfektionseffizienz, der Zellviabilität oder Effizienz der Lyse hervorgerufen werden können.

Zur Bestimmung der jeweiligen enzymatischen Aktivität wurden die Zellen 48 h nach der Transfektion in 250 μl 1x PLB (*Passive Lysis Buffer*) für 1 h unter Schütteln lysiert. Anschließend wurde jeweils ein Aliquot von 20 μl in ein Messröhrchen überführt und die durch die enzymatische Aktivität der Luziferasen hervorgerufene Lumineszenz in einem Luminometer bestimmt. Durch die automatische Zugabe von 100 μl *LARII*-Reagenz wurde in einem ersten Messschritt die Aktivität der *Firefly*-Luziferase gemessen. In einem zweiten Schritt erfolgte die automatische Zugabe von 100 μl *Stop&Glo*-Reagenz. Diese Mischung enthält sowohl einen

Inhibitor der *Firefly*-Luziferase-Reaktion als auch Coelenterazin als Substrat für die Reaktion, die durch die *Renilla*-Luziferase katalysiert wird.

Durch Bildung des Quotienten aus den gemessenen relativen Lichteinheiten (RLU) (*Firefly*-Luziferase-Aktivität/*Renilla*-Luziferase-Aktivität) wurde die relative Promotoraktivität bestimmt.

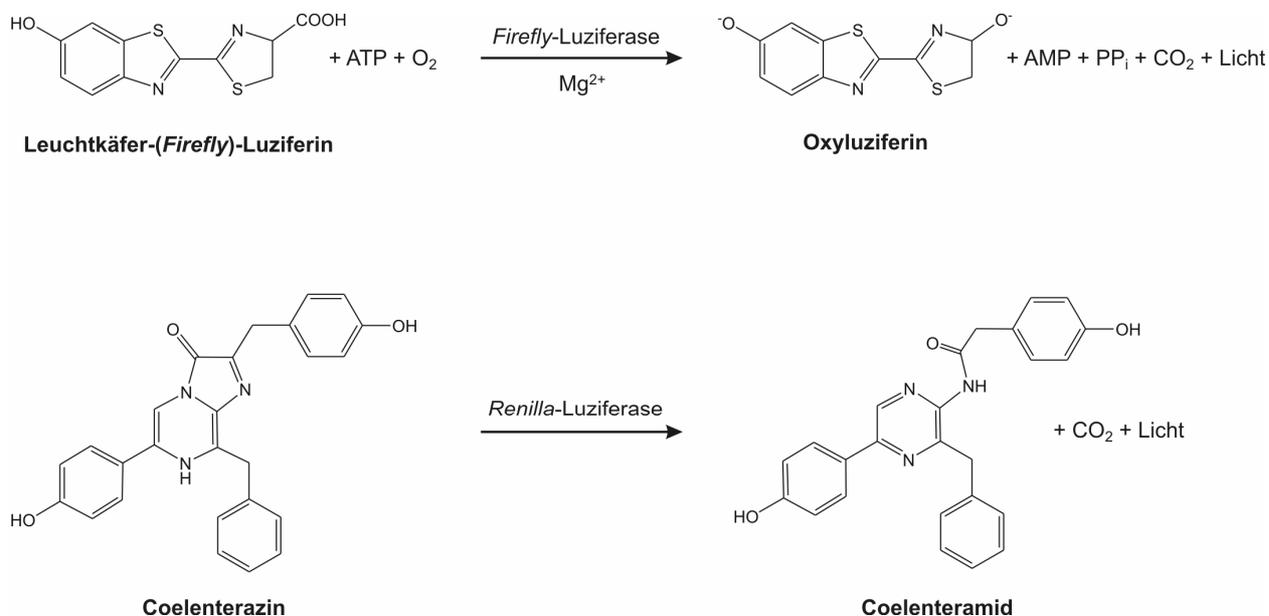


Abb. 5.3.1: Darstellung der durch die *Firefly*- und *Renilla*-Luziferase katalysierten Biolumineszenzreaktionen. Das jeweils emittierte Licht kann mithilfe eines Luminometers detektiert und quantifiziert werden.

5.3.5 Bestimmung der enzymatischen Xylosyltransferase-Aktivität im Zellkulturüberstand

Für die Bestimmung der Xylosyltransferase-Aktivität (XT-Aktivität) im Zellkulturüberstand (ZKÜ) wurde die Menge der eingebauten radioaktiv-markierten Xylose in ein Akzeptorprotein, katalysiert durch die XT, detektiert [152].

Hierzu wurden 50 µl ZKÜ mit 50 µl Substratreagenz vermischt und für 90 min bei 37 °C inkubiert. Von den Reaktionsansätzen wurden je 90 µl auf eine Nitrozellulose-Membran pipettiert und für 2 h bei RT getrocknet. Die Membranen wurden in Szintillations-Gefäße überführt und nach dem in Tabelle 5.6 angegebenen Protokoll gewaschen.

Tabelle 5.6 Waschprotokoll der Nitrozellulosemembranen pro Szintillationsröhrchen für den XT-Enzym-Aktivitätstest.

Inkubationszeit	Reagenz
10 min	3 ml 10% TCA (Präzipitation des Proteins auf der Nitrozellulose)
15 min	3 ml 5% TCA (Abwaschen ungebundener UDP-[¹⁴ C]Xylose)
10 min	4 ml 5% TCA
15 min	3 ml 5% TCA

Zusammensetzung des Substratreagenzes:

10 µl UDP-[¹⁴C]Xylose (50 pM, 9,78 GBq/mmol)

30 µl 1%iges solvatisiertes Seidenfibroin

5 µl MES-Puffer (0,5 M 4-Morpholinoethansulfonsäure-HCl, 100 mM KF, pH 6,5)

5 µl Salzlösung (100 mM MnCl₂, 100 mM MgCl₂, 100 mM KCl)

Abschließend wurde zu jeder Nitrozellulose-Membran 3,5 ml Szintillationsflüssigkeit gegeben. Die Radioaktivität wurde nach einer Inkubationszeit von 12 h im β-Counter bestimmt.

6 MATERIAL UND GERÄTE

6.1 Zelllinien

HepG2 (human, Hepatokarzinom), DSMZ, ACC 180	DSMZ, Braunschweig
SW1353 (human, Chondrosarkom), ATCC, HTB-94	ATCC, Rockville, USA

6.2 Zellkulturmedien und Zusätze

DMEM (<i>High Glucose</i>)	Cambrex, Vervies, Belgien
RPMI 1640	Cambrex, Vervies, Belgien
Fetales Kälberserum (FCS)	Biowest, Nuaille, Frankreich
L-Glutamin (100x)	PAA, Pasching, Österreich
DPBS	Invitrogen, Groningen, NL
Trypsin-EDTA-Lösung (10x)	Cambrex, Vervies, Belgien

6.3 Bakterienstämme

<i>Escherichia coli</i> TOP 10	Invitrogen, Groningen, NL
Genotyp: F ⁻ mcrA Δ(mrr-hsdRMS-mcrBC) φ80lacZΔM15 ΔlacX74 nupG recA1 araD139 Δ(ara-leu)7697 galE15 galK16 rpsL(StrR) endA1 λ ⁻	
<i>Escherichia coli</i> XL-10 Gold	Stratagene, La Jolla, USA
Genotyp: endA1 glnV44 recA1 thi-1 gyrA96 relA1 lac Hte Δ(mcrA)183 Δ(mcrCB-hsdSMR-mrr)173 tet ^R F ⁺ [proAB lacI ^q ZΔM15 Tn10(Tet ^R Amy Cm ^R)]	

6.4 Nährmedien für *Escherichia coli*

Ampicillin-Lösung	50 mg/ml Ampicillin in 70%igem Ethanol
LB-Medium (<i>low salt</i>)	1% Pepton; 0,5% Hefeextrakt, 0,5% NaCl in <i>Aqua dest.</i>
LB-Amp-Medium	LB-Medium mit 75 µg/ml Ampicillin
LB-Amp-Agar	LB-Medium mit 1,5% (w/v) Agar
SOC-Medium	2% Trypton; 0,5% Hefeextrakt; 10 mM NaCl; 2,5 mM KCl; 10 mM MgCl ₂ ; 10 mM MgSO ₄ ; 20 mM Glukose in <i>Aqua dest.</i>

6.5 Vektoren

pCR2.1TOPO	Invitrogen, Groningen, NL
pGI4.10 [<i>luc2</i>]	Promega, Mannheim
pGI4.74 [<i>hRluc/TK</i>]	Promega, Mannheim
pUC57	Fermentas, St. Leon-Rot

6.6 Oligonukleotide

Tabelle 6.1 *Primer*-Sequenzen für die Amplifikation von *XYLT1*-Promotorfragmenten. Die fettgedruckten Nukleotide am 5'-Ende des jeweiligen *Forward-Primers* repräsentieren eine nicht zur *XYLT1*-Promotorsequenz komplementäre Basenabfolge und beinhalten eine Schnittstelle für das Restriktionsenzym *Acc65I*.

Primer-Bezeichnung	Primer-Sequenz
XT-I/Prom/-1031U23 Acc65I	5' - GGTACC ACTAGTGGTACCAAGCTTGGGCTCAGGGAGGAGTC - 3'
XT-I/Prom/-1441U24 Acc65I	5' - GGTACC ACTAGTGGTACCTGGCCAGTGTCTGACACAAG - 3'
XT-I/Prom/-797U23 Acc65I	5' - GGTACC ACTAGTGGTACCGCCGCTATACCACTTGCCAACTG - 3'
XT-I/Prom/-1281U23 Acc65I	5' - GGTACC ACTAGTGGTACCATGCGAAGCATTACGCCAAGTC - 3'
XT-I/Prom/-1638U24 Acc65I	5' - GGTACC ACTAGTGGTACCGGCAAGGCTGATCTCGAACTTCTG - 3'
XT-I/Prom/-748U20 Acc65I	5' - GGTACC ACTAGTGGTACCCCTCAGGGACCAGAGAAGTG - 3'
XT-I/Prom/-708U20 Acc65I	5' - GGTACC ACTAGTGGTACCATCGTTGGCACCGGGGATTG - 3'
XT-I/Prom/-647U20 Acc65I	5' - GGTACC ACTAGTGGTACCCCTCCAGAAACTCACCCAAAG - 3'
XT-I/Prom/-471L23	5' - GCAGTGCGTGGAGGAAGCTCCTA - 3'

Tabelle 6.2 Primer-Sequenzen für die Amplifikation von *XYLT2*-Promotorfragmenten.

Primer-Bezeichnung	Primer-Sequenz
XT-II/Prom/-2568U22	5' - TCAAGCGATCCCTCCTATCTCAG - 3'
XT-II/Prom/-1477U22	5' - CGCGGAGGAACAGAATGATTAC - 3'
XT-II/Prom/-1071U22	5' - TCCAATGCGGTGCTCATTGAAC - 3'
XT-II/Prom/-731U20	5' - AGGCCTCACTACCGACCTAC - 3'
XT-II/Prom/-602U20	5' - AGCGGCCTGAGGATGCTTAG - 3'
XT-II/Prom/-263U21	5' - CGGAGACACGAGCGCAGAAGG - 3'
XT-II/Prom/-177U22	5' - TAGCCTGCGGTGCGCCGTGCTT - 3'
XT-II/Prom/-104U19	5' - CTCCTAGGCGTGGAGGAG - 3'
XT-II/Prom/-75U18	5' - TCAGCCCCGCGCCCGTGC - 3'
XT-II/Prom/-43U18	5' - GGGTTGCAGGGCTGGGCG - 3'
XT-II/Prom/-191L20	5' - GGCTCGCAACACCTTCAGTC - 3'
XT-II/Prom/-58L18	5' - CACGGGCGCGGGGCTGAG - 3'
XT-II/Prom/2L18	5' - ATCTTCCTGCCCCGGGACG - 3'

Tabelle 6.3 In der *Real-Time* PCR eingesetzte *Primer* zur Amplifikation von Haushalts- und Zielgenen.

Zielgen	Primer-Bezeichnung	Primer-Sequenz	Referenzsequenz
<i>XYLT1</i>	XT-I/E8/1601U18	5' - CGGTCCTGGAGAACAGCC - 3'	NM_022166
	XT-I/E9/1810L21	5' - CCAATGATTTCCCTGATTAC - 3'	
<i>XYLT2</i>	hXT-II/E10/2258U18	5' - TGGCCTGTGAGACCCTCG - 3'	NM_022167
	hXT-II/E11/2352L18	5' - AGAAGGTGGGTCTGGAGACT - 3'	
<i>GAPDH</i>	hGAPDH/E2/116U18	5' - AGGTCGGAGTCAACGGAT - 3'	NM_002046
	hGAPDH/E4/338L18	5' - TCCTGGAAGATGGTGATG - 3'	
<i>SP1</i>	SP1/E5/2111U22	5' - GAGCTACAGAGGCACAAACG - 3'	NM_138473
	SP1/E6/2244L21	5' - CCTGGGCCTCCCTTCTTATTC - 3'	
<i>SP3</i>	SP3/E5/1962U22	5' - TGCACCTGTCCCAACTGTAAAG - 3'	NM_003111
	SP3/E6/2115L20	5' - AAGGGCGTTCTCCAGAATGC - 3'	

Tabelle 6.4 Zur Sequenzierung verwendete Vektor-Primer.

Primer-Bezeichnung	Primer-Sequenz	Vektor
M13 forward	5' - GTAAAACGACGGCCAG - 3'	pCR2.1TOPO
M13 reverse	5' - CAGGAAACAGCTATGAC - 3'	
pGI4 forward	5' - CTAGCAAAAATAGGCTGTCCC - 3'	pGI4.10
pGI4 reverse	5' - CTTAATGTTTTTTGGCATCTTCCA - 3'	
pUC57 forward	5' - GTAAAACGACGGCCAGTG - 3'	pUC57
pUC57 reverse	5' - GGAAACAGCTATGACCATG - 3'	

Tabelle 6.5 Primer für die *in vitro* Mutagenese der AP-1-Transkriptionsfaktor-Bindestelle des *XYLT1*-Promotors.

Primer-Bezeichnung	Primer-Sequenz
AP-1 F mut	5' - CCTCAGGGACCAGAGAAGTGGTTCAGTGAACACTTAGTACATC - 3'
AP-1 R mut	5' - GATGTACTAAGTGTTCACTGAACCACTTCTCTGGTCCCTGAGG - 3'
AP-1 F del	5' - CCTCAGGGACCAGAGAAGAGTGAACACTTAGTACATC - 3'
AP-1 R del	5' - GATGTACTAAGTGTTCACTCTTCTCTGGTCCCTGAGG - 3'

Tabelle 6.6 Primer für die *in vitro* Mutagenese von Transkriptionsfaktor-Bindestellen im *XYLT2*-Promotor.

Primer-Bezeichnung	Primer-Sequenz
AP-2 mut	5' - GGAATTGCCCTTTAGAGTGCTCTGCGCCGTGCTTTGG - 3'
AP-2 mut	5' - CCAAAGCACGGCGCAGAGCACTCTAAAGGGCAATTCC - 3'
HNF4 α mut F	5' - GCCTGCGGTGCGCCGTGTCTAGACCCCGCAGGCC - 3'
HNF4 α mut R	5' - GGGGCCTGCGGGTCTAGACACGGCGCACCCGAGGC - 3'
Sp1A mut F	5' - CGTGCTTTGGCCCCGCAGGGAATTCCTCCGCCCCGCCCCGGC - 3'
Sp1A mut R	5' - GCCGGGGCGGGGCCGGGGGAATTCCTGCGGGGCCAAAGCACG - 3'
Sp1B mut F	5' - CGCAGGCCCGCCCCGGGAATTCCTCCGCGCGCGCCCGGCCG - 3'
Sp1B mut R	5' - CGGGCCGGGCGCGCGCCGGGAATTCCTGGGGCGGGGCCTGCG - 3'
Sp1B2 mut F	5' - CGGCGCGCGCCCGCCGAATTCCTAGGCGTGAGGAG - 3'
Sp1B2 mut R	5' - CTCCTCCACGCCTAGGGAATTCGGCCGGGCGCGCGCCG - 3'
Sp1AB mut F	5' - GCTTTGGCCCCGCAGGCTTTCTTCCCGCTTTCTTCCGGCGCGCCCCGGCCG - 3'
Sp1AB mut R	5' - CGGGCCGGGCGCGCGCCGGAAGAAAGCCGGGAAGAAAGCCTGCGGGGCCAAAGC - 3'
Sp1C mut F	5' - CCTAGGCGTGAGGAGGGTTTCTTCTCAGCCCCGCGCCGTGC - 3'
Sp1C mut R	5' - GCACGGGCGGGGCTGAGAAGAAACCCCTCCTCCACGCCTAGG - 3'

Tabelle 6.7 Sequenzen und Lokalisation der verwendeten siRNA-Oligonukleotide.

Zielgen	siRNA-Bezeichnung	siRNA-Sequenz	Referenzsequenz/Exon
<i>Sp1</i>	si143158	5' -GGAUGGUUCUGGUCAAUAAtt-3' 5' -UAUUUGACCAGAACCAUCctg-3'	NM_138473/Exon 3
<i>Sp3</i>	si115337	5' -GCUAUGGAUAGUUCAGACAAtt-3' 5' -UGUCUGAACUAUCCAUAAGCtt-3'	NM_003111/Exon 4
<i>Sp3</i>	si13325	5' -CGAUAGAUAGUACAGGUAUtt-3' 5' -AUACCGUACUAUCUAUCGta-3'	NM_003111.3/Exon 4
<i>Sp3</i>	si13326	5' -GACGGACAUUUGAUAAACAAtt-3' 5' -UGUUUAUCAA AUGUCCGUCgg-3'	NM_003111.3/Exon 4

Tabelle 6.8 Sequenzen der in EMSA-Experimenten eingesetzten 5'-biotinylierten Oligonukleotid-*Probes*.

<i>Probe-Bezeichnung</i>	<i>Probe-Sequenz</i>
<i>AP-1_XYLT1</i>	5' -Biotin-GGGACCAGAGAAGTGACTCAGTGAACACTTAG-3' 5' -Biotin-CTAAGTGTTCACTGAGTCACTTCTCTGGTCCC-3'
<i>SpA_XYLT2</i>	5' -Biotin-TTGGCCCCGCAGGCCCGCCCCGGGCC-3' 5' -Biotin-GGGCCGGGGCGGGCCTGCGGGCCAA-3'
<i>SpB_XYLT2</i>	5' -Biotin-CCCGCCCCGCCCCGGCGCG-3' 5' -Biotin-CGCGCCGGGGCGGGCCGGG-3'

6.7 Reagenzien

Agar	Sigma, Taufkirchen
Agarose	Roth, Karlsruhe
Albumin (BSA)	Merck, Darmstadt
Ampicillin	Biowest, Nuailé, Frankreich
Curcumin	Sigma, Taufkirchen
Desoxyribonukleotridtriphosphate (dNTPs, 100 mM)	Promega, Mannheim
Dithiothreitol (DTT)	Invitrogen, Groningen, NL
DNA-Längenstandard (1 kb Leiter)	Invitrogen, Groningen, NL
DNA-Längenstandard (pUC19/ <i>MspI</i>)	MBLL, Bielefeld
Ethanol	Roth, Karlsruhe
Ethidiumbromid	Sigma, Taufkirchen
Glycerin	Merck, Darmstadt
Hefeextrakt	Roth, Karlsruhe
Humanalbumin	Merck, Darmstadt
Kaliumchlorid	Merck, Darmstadt
Kaliumfluorid	Sigma, Taufkirchen
Magnesiumchlorid	Sigma, Taufkirchen
Manganchlorid	Sigma, Taufkirchen
MES	Sigma, Taufkirchen
Methanol	Roth, Karlsruhe
Mineralöl	Sigma, Taufkirchen
Natriumchlorid	Sigma, Taufkirchen
Natriumcitrat	Merck, Darmstadt
Natriumhydroxid	Merck, Darmstadt
Novex DNA Retardation Gels 6%	Invitrogen, Groningen, NL
Oligo dT- <i>Primer</i>	Invitrogen, Groningen, NL
Pepton	Roth, Karlsruhe

Protease-Inhibitor Cocktail	Sigma, Taufkirchen
SB431542	Ascent Scientific, Bristol, UK
Seide (unbehandelt)	Idee, Bielefeld
Szintillationsflüssigkeit	Beckmann Coulter, CA, USA
Tanshinon IIA	BioCat, Heidelberg
Trichloressigsäure (TCA)	Sigma, Taufkirchen
Tris	Roth, Karlsruhe
UDP-[¹⁴ C]Xylose	Perkin Elmer, Boston, USA
Wasser (<i>Aqua ad iniectabilia</i>)	Braun, Melsungen

6.8 Enzyme, Antikörper und rekombinante Proteine

<i>HotFire-Taq</i> -DNA-Polymerase	Solis, Biodyne, Tartu, Estland
<i>HotStar-Taq</i> -DNA-Polymerase	Qiagen, Hilden
Restriktionsenzyme und Restriktionspuffer	Fermentas, St. Leon-Rot New England Biolabs, Beverly, USA
<i>Superscript II RNase H⁻ Reverse Transcriptase</i>	Invitrogen, Groningen, NL
T4-DNA Ligase	New England Biolabs, Beverly, USA
T4-Polynukleotidkinase	New England Biolabs, Beverly, USA
Anti-AP-2 α -Antikörper (polyklonal aus Kaninchen)	Santa Cruz Biotechnology, Heidelberg
Anti-cJun-Antikörper (polyklonal aus Kaninchen)	Santa Cruz Biotechnology, Heidelberg
Anti-Sp1-Antikörper (polyklonal aus Kaninchen)	Santa Cruz Biotechnology, Heidelberg
Anti-Sp3-Antikörper (polyklonal aus Kaninchen)	Santa Cruz Biotechnology, Heidelberg
cJun-Protein (human, rekombinant)	Promega, Mannheim
Sp1-Protein (human, rekombinant)	Promega, Mannheim
TGF β ₁ (human, rekombinant)	Miltenyi, Bergisch Gladbach
TGF β ₃ (human, rekombinant)	Miltenyi, Bergisch Gladbach

6.9 Reagenziensätze

<i>BigDye Terminator Cycle Sequencing Kit</i>	ABI, Foster City, USA
<i>Dual Luciferase-Assay</i>	Promega, Mannheim
<i>GenElute (HP) Plasmid Midiprep Kit</i>	Sigma, Taufkirchen
<i>GenElute HP Plasmid Midiprep Kit</i>	Sigma, Taufkirchen
<i>Lightshift Chemiluminescent EMSA Kit</i>	Fisher Scientific, Schwerte
<i>NucleoSpin RNA II</i>	Machery & Nagel, Düren
<i>NucleoSpin Extract II</i>	Machery & Nagel, Düren
<i>Platinum SYBR Green qPCR SuperMix UDG</i>	Invitrogen, Groningen, NL
<i>NE-PER Nuclear and Cytoplasmic Extraction Reagents</i>	Fisher Scientific, Schwerte
<i>QIAamp DNA Blood Mini Kit</i>	Qiagen, Hilden
<i>QIAprep Spin Miniprep Kit</i>	Qiagen, Hilden
<i>QIAquick PCR Purification Kit</i>	Qiagen, Hilden
<i>QuikChange XL Site-Directed Mutagenesis Kit</i>	Stratagene, La Jolla, USA
<i>TOPO TA Cloning Kit</i>	Invitrogen, Groningen, NL

6.10 Software

<i>Chromas</i>	Technelysium Pty Ltd.
<i>Clone Manager Suite 7</i>	Scientific & Educational Software, Cary, USA
<i>CorelDraw 12</i>	Corel Corporation
<i>EMBOSS CpGPlot</i>	http://www.ebi.ac.uk
<i>EndNote 7</i>	Thomson ISI ResearchSoft
<i>Genomatix (Gene2promotor, MatInspector, DiAlignTF)</i>	http://www.genomatix.com
<i>ImageJ 1.40g</i>	http://rsb.info.nih.gov/ij/
<i>Mastercycler Software 1.0</i>	Eppendorf, Wesseling-Berzdorf
<i>Microsoft Office 2003</i>	Microsoft Corporation
<i>Prism 4.0</i>	GraphPad Software, San Diego, USA
<i>Sequence Analysis 3.7</i>	Perkin Elmer ABI, Foster City, USA

6.11 Puffer und Lösungen

Auftragspuffer	0,05% Xylencyanol 0,05% Bomphenolblau 60% Saccharose in <i>Aqua dest.</i>
Substratreagenz (XT-Test)	1 µM UDP-[¹⁴ C]Xylose 0,6% solvatisiertes Seidenfibroin 50 mM KCl 10 mM KF 10 mM MgCl ₂ 10 mM MnCl ₂ 50 mM 4-Morpholinoethan- sulfonsäure-HCl (MES) pH 6,5
Tris-Borat-EDTA (TBE)-Puffer (10x)	90 mM Tris-HCl 2,5 mM EDTA 90 mM Borsäure pH 8,3
Trypsin-Lösung	Trypsin-Lösung (Trypsin 0,5 g/l, NaCl 0,9 g/l) in PBS.

6.12 Sonstige Materialien

Zellkulturschalen (verschiedene Größen)	Greiner Bio-One, Frickenhausen
Eppendorf Reaktionsgefäße	Eppendorf, Wesseling-Berzdorf
Glasgeräte	Schott, Mainz
Klebefolie für 96er PCR-Platten	Eppendorf, Wesseling-Berzdorf
Neubauer-Zählkammer	Fleischhacker, Meckenheim
Nitrozellulosemembranen	Sartorius, Göttingen
Nylonmembranen	Roche, Mannheim
Parafilm	Fleischhacker, Meckenheim
Pipettenspitzen	Sarstedt, Heidelberg
Pipettenspitzen (RNase frei/gestopft)	Nerbe plus GmbH, Winsen/Luhe
<i>Receiver Columns</i> , 20 µm	Machery und Nagel, Dühren
Sterilfilter	Sartorius, Göttingen
Zellkulturflaschen	Greiner Bio-One, Frickenhausen
Zellkulturmaterial	Becton Dickinson, Heidelberg
Zentrifugenröhrchen	Falcon, Heidelberg

6.13 Geräte

ABI Prism 7200 Sequence Detector	Perkin Elmer ABI, Foster City, USA
ABI Prism 310 Genetic	Perkin Elmer ABI, Foster City, USA
Autoklav	Tecnorma, Fernwald
Automatikpipetten	Eppendorf, Wesseling-Berzdorf
Brutschrank für Zellkultur	Tritec, Hannover
Elektrophoresekammern	Pharmacia, Freiburg AGS, Heidelberg
Fluoreszenzmikroskop TE2000-S	Nikon, Düsseldorf
Fluoreszenzplattendetektor	Tecan, Crailsheim
Magnetrührer	Renner, Darmstadt
<i>Mastercycler ep realplex</i>	Eppendorf, Wesseling-Berzdorf
pH-Meter Calimatic 761	Knick, Berlin
Foto-Kamera	Polaroid, St. Albans, England
Schüttler Celloshaker Variospeed	Renner, Darmstadt
Spannungsgerät PS 3002	Gibco BRL, Eggenstein
Sterilwerkbank Variolab W 90	Waldner, Wangen
Szintillationszähler Tri-Carb 2800 TR	Perkin Elmer, Foster City, USA
T-gradient <i>Thermocycler</i>	Biometra, Göttingen
<i>Thermocycler</i>	Landgraf Laborgeräte, Langenhagen
UV-Illuminator	Renner, Darmstadt
UV/VIS-Spektrophotometer Ultraspec 2100 pro	Amersham Biosciences, Cambridge, GB
Vortex Genie 2	Scientific Industries, NY, USA
Waage	Sartorius, Göttingen
Wasserbad	Haake, Dreieich
Zentrifuge Biofuge 13	Heraeus, Hanau
Zentrifuge Eppendorf	Eppendorf, Wesseling-Berzdorf

7 ABKÜRZUNGEN

A	Ampère
Abb.	Abbildung
AP-1	<i>Activator protein 1</i>
ATP	Adenosintriphosphat
bp	Basenpaare
BSA	Bovines Serumalbumin
c	Konzentration
C	Cytosin
°C	Grad Celsius
cDNA	<i>Complementary DNA</i>
cm	Zentimeter
CS	Chondroitinsulfat
CTP	Cytidintriphosphat
Da	Dalton
ddNTP	Didesoxyribonukleotidtriphosphat
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoxyribonukleotidtriphosphat
DS	Dermatansulfat
dpm	Zerfälle pro Minute
dT	Desoxythymidin
DPE	<i>Downstream</i> -Promotorelement
DTT	Dithiothreitol
ECM	Extrazelluläre Matrix
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EDTA	Ethylendiamintetraacetat

ER	Endoplasmatisches Retikulum
g	Erdbeschleunigung
G	Guanin
G	Glycin
GAG	Glykosaminoglykan
Gal	Galaktose
GalNAc	N-Acetylgalaktosamin
GlcA	Glukuronsäure
GlcAC5E	Glukuronyl-C5-Epimerase
GlcAT-I	Glukuronosyltransferase
GlcNAc	N-Acetylglukosamin
GTF	Generelle Transkriptionsfaktoren
GTP	Guanintriphosphat
h	Stunde (<i>hour</i>)
HS	Heparansulfat
HPLC	<i>High Performance Liquid Chromatography</i>
IdoA	Iduronsäure
Inr	Initiator Element
kb	Kilobasen
kDa	Kilodalton
λ	Wellenlänge
m	Milli
mg	Milligramm
ml	Milliliter
mm	Millimeter
M	molar
μ l	Mikroliter
MES	2-Morpholinoethansulfonsäure

min	Minute
N	Normal
ng	Nanogramm
nm	Nanometer
OD	optische Dichte
PBS	<i>Phosphate buffered saline</i>
PCR	<i>Polymerase chain reaction</i> (Polymerase-Kettenreaktion)
pH	negativer dekadischer Logarithmus der H ⁺ -Ionenkonzentration
PIC	Präinitiationskomplex
PG	Proteoglykan
RNA	Ribonukleinsäure
rpm	Umdrehungen pro Minute (<i>Rounds per minute</i>)
RT	Raumtemperatur
s	Sekunde
S	Serin
Sp1	<i>Specificity protein 1</i>
<i>Taq</i>	<i>Thermus aquaticus</i>
TBE	Tris-Borat-EDTA
TCA	Trichloressigsäure
TE	Tris-EDTA
TGFβ	<i>Transforming growth factor β</i>
TF	Transkriptionsfaktor
Tris	Tris(hydroxymethyl)-aminoethan
TSS	Transkriptionsstart
TTP	Thymintriphosphat
U	<i>Unit</i>
UDP	Uridindiphosphat
UV	Ultraviolett

V	Volt
XT	Xylosyltransferase (Protein, mRNA)
Xyl	Xylose
<i>XYLT</i>	Xylosyltransferase (Gen)
ZKÜ	Zellkulturüberstand

8 LITERATUR

- [1] Aumailley, M., Gayraud, B. (1998). Structure and biological activity of the extracellular matrix. *J Mol Med* 76: 253-65.
- [2] Streuli, C. (1999). Extracellular matrix remodelling and cellular differentiation. *Curr Opin Cell Biol* 11: 634-40.
- [3] Ganter, S., Sauermost, R. (1997) Herder Lexikon der Biochemie und Molekularbiologie, Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg.
- [4] Iozzo, R. V. (1998). Matrix proteoglycans: from molecular design to cellular function. *Annu Rev Biochem* 67: 609-52.
- [5] Kolset, S. O., Prydz, K., Pejler, G. (2004). Intracellular proteoglycans. *Biochem J* 379: 217-27.
- [6] Berg, J. M., Tymoczko, J. L., Stryer, L. (2003) Biochemie, Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg.
- [7] Kjellen, L., Lindahl, U. (1991). Proteoglycans: structures and interactions. *Annu Rev Biochem* 60: 443-75.
- [8] Prydz, K., Dalen, K. T. (2000). Synthesis and sorting of proteoglycans. *J Cell Sci* 113 Pt 2: 193-205.
- [9] Iozzo, R. V., Murdoch, A. D. (1996). Proteoglycans of the extracellular environment: clues from the gene and protein side offer novel perspectives in molecular diversity and function. *Faseb J* 10: 598-614.
- [10] Hurtado, A., Podinin, H., Oudega, M., Grimpe, B. (2008). Deoxyribozyme-mediated knockdown of xylosyltransferase-1 mRNA promotes axon growth in the adult rat spinal cord. *Brain* 131: 2596-605.
- [11] Vives, R. R., Lortat-Jacob, H., Chroboczek, J., Fender, P. (2004). Heparan sulfate proteoglycan mediates the selective attachment and internalization of serotype 3 human adenovirus dodecahedron. *Virology* 321: 332-40.
- [12] Patel, M., Yanagishita, M., Roderiquez, G., Bou-Habib, D. C., Oravec, T., Hascall, V. C., Norcross, M. A. (1993). Cell-surface heparan sulfate proteoglycan mediates HIV-1 infection of T-cell lines. *AIDS Res Hum Retroviruses* 9: 167-74.

-
- [13] Hardingham, T. E., Fosang, A. J. (1992). Proteoglycans: many forms and many functions. *Faseb J* 6: 861-70.
- [14] Hardingham, T., Bayliss, M. (1990). Proteoglycans of articular cartilage: changes in aging and in joint disease. *Semin Arthritis Rheum* 20: 12-33.
- [15] Reed, C. C., Iozzo, R. V. (2002). The role of decorin in collagen fibrillogenesis and skin homeostasis. *Glycoconj J* 19: 249-55.
- [16] Ruhland, C., Schönherr, E., Robenek, H., Hansen, U., Iozzo, R. V., Bruckner, P., Seidler, D. G. (2007). The glycosaminoglycan chain of decorin plays an important role in collagen fibril formation at the early stages of fibrillogenesis. *Febs J* 274: 4246-55.
- [17] Schönherr, E., Hausser, H., Beavan, L., Kresse, H. (1995). Decorin-type I collagen interaction. Presence of separate core protein-binding domains. *J Biol Chem* 270: 8877-83.
- [18] Markmann, A., Hausser, H., Schönherr, E., Kresse, H. (2000). Influence of decorin expression on transforming growth factor-beta-mediated collagen gel retraction and biglycan induction. *Matrix Biol* 19: 631-6.
- [19] Taipale, J., Keski-Oja, J. (1997). Growth factors in the extracellular matrix. *Faseb J* 11: 51-9.
- [20] Nelson, D., Cox, M. (2001) *Lehninger Biochemie*, Springer Verlag, Heidelberg, Berlin, New York.
- [21] Lindahl, U., Hook, M. (1978). Glycosaminoglycans and their binding to biological macromolecules. *Annu Rev Biochem* 47: 385-417.
- [22] Greiling, H., Gressner, A. M. (1995) *Lehrbuch der Klinischen Chemie und Pathobiochemie*, Schattauer, F. K. Verlag, Stuttgart.
- [23] Gulberti, S., Lattard, V., Fondeur, M., Jacquinet, J. C., Mulliert, G., Netter, P., Magdalou, J., Ouzzine, M., Fournel-Gigleux, S. (2005). Phosphorylation and sulfation of oligosaccharide substrates critically influence the activity of human beta1,4-galactosyltransferase 7 (GalT-I) and beta1,3-glucuronosyltransferase I (GlcAT-I) involved in the biosynthesis of the glycosaminoglycan-protein linkage region of proteoglycans. *J Biol Chem* 280: 1417-25.

- [24] Koike, T., Izumikawa, T., Tamura, J., Kitagawa, H. (2009). FAM20B is a kinase that phosphorylates xylose in the glycosaminoglycan-protein linkage region. *Biochem J* 421: 157-62.
- [25] Tone, Y., Pedersen, L. C., Yamamoto, T., Izumikawa, T., Kitagawa, H., Nishihara, J., Tamura, J., Negishi, M., Sugahara, K. (2008). 2-o-phosphorylation of xylose and 6-o-sulfation of galactose in the protein linkage region of glycosaminoglycans influence the glucuronyltransferase-I activity involved in the linkage region synthesis. *J Biol Chem* 283: 16801-7.
- [26] Salmivirta, M., Lidholt, K., Lindahl, U. (1996). Heparan sulfate: a piece of information. *Faseb J* 10: 1270-9.
- [27] Hirschberg, C. B., Robbins, P. W., Abeijon, C. (1998). Transporters of nucleotide sugars, ATP, and nucleotide sulfate in the endoplasmic reticulum and Golgi apparatus. *Annu Rev Biochem* 67: 49-69.
- [28] Hirschberg, C. B., Snider, M. D. (1987). Topography of glycosylation in the rough endoplasmic reticulum and Golgi apparatus. *Annu Rev Biochem* 56: 63-87.
- [29] Mandon, E., Kempner, E. S., Ishihara, M., Hirschberg, C. B. (1994). A monomeric protein in the Golgi membrane catalyzes both N-deacetylation and N-sulfation of heparan sulfate. *J Biol Chem* 269: 11729-33.
- [30] Mandon, E. C., Milla, M. E., Kempner, E., Hirschberg, C. B. (1994). Purification of the Golgi adenosine 3'-phosphate 5'-phosphosulfate transporter, a homodimer within the membrane. *Proc Natl Acad Sci U S A* 91: 10707-11.
- [31] Coutinho, P. M., Deleury, E., Davies, G. J., Henrissat, B. (2003). An evolving hierarchical family classification for glycosyltransferases. *J Mol Biol* 328: 307-17.
- [32] Campbell, J. A., Davies, G. J., Bulone, V., Henrissat, B. (1997). A classification of nucleotide-diphospho-sugar glycosyltransferases based on amino acid sequence similarities. *Biochem J* 326 (Pt 3): 929-39.
- [33] Hu, Y., Walker, S. (2002). Remarkable structural similarities between diverse glycosyltransferases. *Chem Biol* 9: 1287-96.
- [34] Paulson, J. C., Colley, K. J. (1989). Glycosyltransferases. Structure, localization, and control of cell type-specific glycosylation. *J Biol Chem* 264: 17615-8.

- [35] Kitagawa, H., Shimakawa, H., Sugahara, K. (1999). The tumor suppressor EXT-like gene EXTL2 encodes an alpha1, 4-N-acetylhexosaminyltransferase that transfers N-acetylgalactosamine and N-acetylglucosamine to the common glycosaminoglycan-protein linkage region. The key enzyme for the chain initiation of heparan sulfate. *J Biol Chem* 274: 13933-7.
- [36] Sugumaran, G., Katsman, M., Sunthakar, P., Drake, R. R. (1997). Biosynthesis of chondroitin sulfate. Purification of glucuronosyl transferase II and use of photoaffinity labeling for characterization of the enzyme as an 80-kDa protein. *J Biol Chem* 272: 14399-403.
- [37] Sugumaran, G., Katsman, M., Silbert, J. E. (1998). Subcellular co-localization and potential interaction of glucuronosyltransferases with nascent proteochondroitin sulphate at Golgi sites of chondroitin synthesis. *Biochem J* 329 (Pt 1): 203-8.
- [38] Lidholt, K., Lindahl, U. (1992). Biosynthesis of heparin. The D-glucuronosyl- and N-acetyl-D-glucosaminyltransferase reactions and their relation to polymer modification. *Biochem J* 287 (Pt 1): 21-9.
- [39] Lidholt, K., Kjellen, L., Lindahl, U. (1989). Biosynthesis of heparin. Relationship between the polymerization and sulphation processes. *Biochem J* 261: 999-1007.
- [40] Wilson, I. B. (2004). The never-ending story of peptide O-xylosyltransferase. *Cell Mol Life Sci* 61: 794-809.
- [41] Schwartz, N. B. (1977). Regulation of chondroitin sulfate synthesis. Effect of beta-xylosides on synthesis of chondroitin sulfate proteoglycan, chondroitin sulfate chains, and core protein. *J Biol Chem* 252: 6316-21.
- [42] Kearns, A. E., Campbell, S. C., Westley, J., Schwartz, N. B. (1991). Initiation of chondroitin sulfate biosynthesis: a kinetic analysis of UDP-D-xylose: core protein beta-D-xylosyltransferase. *Biochemistry* 30: 7477-83.
- [43] Götting, C., Kuhn, J., Zahn, R., Brinkmann, T., Kleesiek, K. (2000). Molecular cloning and expression of human UDP-D-Xylose:proteoglycan core protein beta-D-xylosyltransferase and its first isoform XT-II. *J Mol Biol* 304: 517-28.
- [44] Götting, C., Kuhn, J., Kleesiek, K. (2007). Human xylosyltransferases in health and disease. *Cell Mol Life Sci* 64: 1498-517.

- [45] Pönighaus, C., Ambrosius, M., Casanova, J. C., Prante, C., Kuhn, J., Esko, J. D., Kleesiek, K., Götting, C. (2007). Human xylosyltransferase II is involved in the biosynthesis of the uniform tetrasaccharide linkage region in chondroitin sulfate and heparan sulfate proteoglycans. *J Biol Chem* 282: 5201-6.
- [46] Schön, S., Prante, C., Bahr, C., Kuhn, J., Kleesiek, K., Götting, C. (2006). Cloning and recombinant expression of active full-length xylosyltransferase I (XT-I) and characterization of subcellular localization of XT-I and XT-II. *J Biol Chem* 281: 14224-31.
- [47] Roch, C., Kuhn, J., Kleesiek, K., Götting, C. (2009). Differences in gene expression of human xylosyltransferases and determination of acceptor specificities for various proteoglycans. *Biochem Biophys Res Commun*. Epub ahead of print.
- [48] Brinkmann, T., Weilke, C., Kleesiek, K. (1997). Recognition of acceptor proteins by UDP-D-xylose proteoglycan core protein beta-D-xylosyltransferase. *J Biol Chem* 272: 11171-5.
- [49] Götting, C., Sollberg, S., Kuhn, J., Weilke, C., Huerkamp, C., Brinkmann, T., Krieg, T., Kleesiek, K. (1999). Serum xylosyltransferase: a new biochemical marker of the sclerotic process in systemic sclerosis. *J Invest Dermatol* 112: 919-24.
- [50] Götting, C., Kuhn, J., Tinneberg, H. R., Brinkmann, T., Kleesiek, K. (2002). High xylosyltransferase activities in human follicular fluid and cultured granulosa-lutein cells. *Mol Hum Reprod* 8: 1079-86.
- [51] Condac, E., Dale, G. L., Bender-Neal, D., Ferencz, B., Towner, R., Hinsdale, M. E. (2009). Xylosyltransferase II is a significant contributor of circulating xylosyltransferase levels and platelets constitute an important source of xylosyltransferase in serum. *Glycobiology* 19: 829-33.
- [52] Götting, C., Kuhn, J., Sollberg, S., Huerkamp, C., Brinkmann, T., Krieg, T., Kleesiek, K. (2000). Elevated serum xylosyltransferase activity correlates with a high level of hyaluronate in patients with systemic sclerosis. *Acta Derm Venereol* 80: 60-1.
- [53] Götting, C., Hendig, D., Adam, A., Schön, S., Schulz, V., Szliska, C., Kuhn, J., Kleesiek, K. (2005). Elevated xylosyltransferase I activities in pseudoxanthoma elasticum (PXE) patients as a marker of stimulated proteoglycan biosynthesis. *J Mol Med* 83: 984-92.
- [54] Götting, C., Kuhn, J., Kleesiek, K. (2008). Serum xylosyltransferase activity in diabetic patients as a possible marker of reduced proteoglycan biosynthesis. *Diabetes Care* 31: 2018-9.

- [55] Kuhn, J., Gressner, O. A., Götting, C., Gressner, A. M., Kleesiek, K. (2009). Increased serum xylosyltransferase activity in patients with liver fibrosis. *Clin Chim Acta* 409: 123-6.
- [56] Pönighaus, C., Kuhn, J., Kleesiek, K., Götting, C. (2009). Involvement of a cysteine protease in the secretion process of human xylosyltransferase I. Eingereicht.
- [57] Pönighaus, C., Kuhn, J., Kleesiek, K., Götting, C. (2009). Involvement of gamma-secretase in the secretion process of mamillian xylosyltransferase II. Eingereicht.
- [58] Prante, C., Milting, H., Kassner, A., Farr, M., Ambrosius, M., Schön, S., Seidler, D. G., Banayoso, A. E., Körfer, R., Kuhn, J., Kleesiek, K., Götting, C. (2007). Transforming growth factor beta1-regulated xylosyltransferase I activity in human cardiac fibroblasts and its impact for myocardial remodeling. *J Biol Chem* 282: 26441-9.
- [59] Müller, B., Prante, C., Gastens, M., Kuhn, J., Kleesiek, K., Götting, C. (2008). Increased levels of xylosyltransferase I correlate with the mineralization of the extracellular matrix during osteogenic differentiation of mesenchymal stem cells. *Matrix Biol* 27: 139-49.
- [60] Prante, C., Bieback, K., Funke, C., Schön, S., Kern, S., Kuhn, J., Gastens, M., Kleesiek, K., Götting, C. (2006). The formation of extracellular matrix during chondrogenic differentiation of mesenchymal stem cells correlates with increased levels of xylosyltransferase I. *Stem Cells* 24: 2252-61.
- [61] Löffler, G., Petrides, P., Heinrich, P. (2007) *Biochemie und Pathobiochemie*, Springer Verlag, Berlin.
- [62] Hahn, S. (2004). Structure and mechanism of the RNA polymerase II transcription machinery. *Nat Struct Mol Biol* 11: 394-403.
- [63] Heintzman, N. D., Ren, B. (2007). The gateway to transcription: identifying, characterizing and understanding promoters in the eukaryotic genome. *Cell Mol Life Sci* 64: 386-400.
- [64] Butler, J. E., Kadonaga, J. T. (2002). The RNA polymerase II core promoter: a key component in the regulation of gene expression. *Genes Dev* 16: 2583-92.
- [65] Smale, S. T. (2001). Core promoters: active contributors to combinatorial gene regulation. *Genes Dev* 15: 2503-8.

- [66] Smale, S. T., Kadonaga, J. T. (2003). The RNA polymerase II core promoter. *Annu Rev Biochem* 72: 449-79.
- [67] Lee, T. I., Young, R. A. (2000). Transcription of eukaryotic protein-coding genes. *Annu Rev Genet* 34: 77-137.
- [68] Fickett, J. W., Hatzigeorgiou, A. G. (1997). Eukaryotic promoter recognition. *Genome Res* 7: 861-78.
- [69] Blake, M. C., Jambou, R. C., Swick, A. G., Kahn, J. W., Azizkhan, J. C. (1990). Transcriptional initiation is controlled by upstream GC-box interactions in a TATAA-less promoter. *Mol Cell Biol* 10: 6632-41.
- [70] Gardiner-Garden, M., Frommer, M. (1987). CpG islands in vertebrate genomes. *J Mol Biol* 196: 261-82.
- [71] Kim, T. H., Barrera, L. O., Zheng, M., Qu, C., Singer, M. A., Richmond, T. A., Wu, Y., Green, R. D., Ren, B. (2005). A high-resolution map of active promoters in the human genome. *Nature* 436: 876-80.
- [72] Zhu, J., He, F., Hu, S., Yu, J. (2008). On the nature of human housekeeping genes. *Trends Genet* 24: 481-4.
- [73] Carninci, P., Sandelin, A., Lenhard, B., Katayama, S., Shimokawa, K., Ponjavic, J., Semple, C. A., Taylor, M. S., Engstrom, P. G., Frith, M. C., Forrest, A. R., Alkema, W. B., Tan, S. L., Plessy, C., Kodzius, R., Ravasi, T., Kasukawa, T., Fukuda, S., Kanamori-Katayama, M., Kitazume, Y., Kawaji, H., Kai, C., Nakamura, M., Konno, H., Nakano, K., Mottagui-Tabar, S., Arner, P., Chesi, A., Gustincich, S., Persichetti, F., Suzuki, H., Grimmond, S. M., Wells, C. A., Orlando, V., Wahlestedt, C., Liu, E. T., Harbers, M., Kawai, J., Bajic, V. B., Hume, D. A., Hayashizaki, Y. (2006). Genome-wide analysis of mammalian promoter architecture and evolution. *Nat Genet* 38: 626-35.
- [74] Brandeis, M., Frank, D., Keshet, I., Siegfried, Z., Mendelsohn, M., Nemes, A., Temper, V., Razin, A., Cedar, H. (1994). Sp1 elements protect a CpG island from de novo methylation. *Nature* 371: 435-8.
- [75] Macleod, D., Charlton, J., Mullins, J., Bird, A. P. (1994). Sp1 sites in the mouse aprt gene promoter are required to prevent methylation of the CpG island. *Genes Dev* 8: 2282-92.

- [76] Smale, S. T., Schmidt, M. C., Berk, A. J., Baltimore, D. (1990). Transcriptional activation by Sp1 as directed through TATA or initiator: specific requirement for mammalian transcription factor IID. *Proc Natl Acad Sci U S A* 87: 4509-13.
- [77] Levine, M., Tjian, R. (2003). Transcription regulation and animal diversity. *Nature* 424: 147-51.
- [78] Lemon, B., Tjian, R. (2000). Orchestrated response: a symphony of transcription factors for gene control. *Genes Dev* 14: 2551-69.
- [79] Glass, C. K., Rosenfeld, M. G. (2000). The coregulator exchange in transcriptional functions of nuclear receptors. *Genes Dev* 14: 121-41.
- [80] Barre, L., Venkatesan, N., Magdalou, J., Netter, P., Fournel-Gigleux, S., Ouzzine, M. (2006). Evidence of calcium-dependent pathway in the regulation of human beta1,3-glucuronosyltransferase-1 (GlcAT-I) gene expression: a key enzyme in proteoglycan synthesis. *Faseb J* 20: 1692-4.
- [81] Iozzo, R. V., Pillarisetti, J., Sharma, B., Murdoch, A. D., Danielson, K. G., Uitto, J., Mauviel, A. (1997). Structural and functional characterization of the human perlecan gene promoter. Transcriptional activation by transforming growth factor-beta via a nuclear factor 1-binding element. *J Biol Chem* 272: 5219-28.
- [82] Vihinen, T., Maatta, A., Jaakkola, P., Auvinen, P., Jalkanen, M. (1996). Functional characterization of mouse syndecan-1 promoter. *J Biol Chem* 271: 12532-41.
- [83] Pearson, D., Sasse, J. (1992). Differential regulation of biglycan and decorin by retinoic acid in bovine chondrocytes. *J Biol Chem* 267: 25364-70.
- [84] Ungefroren, H., Krull, N. B. (1996). Transcriptional regulation of the human biglycan gene. *J Biol Chem* 271: 15787-95.
- [85] Domenzain-Reyna, C., Hernandez, D., Miquel-Serra, L., Docampo, M. J., Badenas, C., Fabra, A., Bassols, A. (2009). Structure and regulation of the versican promoter: the versican promoter is regulated by AP-1 and TCF transcription factors in invasive human melanoma cells. *J Biol Chem* 284: 12306-17.
- [86] Latchman, D. (1995) Eukaryotic transcription factors, 3rd edition, Academic press Inc, London.

- [87] Bouwman, P., Philipsen, S. (2002). Regulation of the activity of Sp1-related transcription factors. *Mol Cell Endocrinol* 195: 27-38.
- [88] Courey, A. J., Tjian, R. (1988). Analysis of Sp1 in vivo reveals multiple transcriptional domains, including a novel glutamine-rich activation motif. *Cell* 55: 887-98.
- [89] Murata, Y., Kim, H. G., Rogers, K. T., Udvardia, A. J., Horowitz, J. M. (1994). Negative regulation of Sp1 trans-activation is correlated with the binding of cellular proteins to the amino terminus of the Sp1 trans-activation domain. *J Biol Chem* 269: 20674-81.
- [90] Kardassis, D., Papakosta, P., Pardali, K., Moustakas, A. (1999). c-Jun transactivates the promoter of the human p21(WAF1/Cip1) gene by acting as a superactivator of the ubiquitous transcription factor Sp1. *J Biol Chem* 274: 29572-81.
- [91] Suske, G. (1999). The Sp-family of transcription factors. *Gene* 238: 291-300.
- [92] Hagen, G., Müller, S., Beato, M., Suske, G. (1994). Sp1-mediated transcriptional activation is repressed by Sp3. *Embo J* 13: 3843-51.
- [93] Hagen, G., Müller, S., Beato, M., Suske, G. (1992). Cloning by recognition site screening of two novel GT box binding proteins: a family of Sp1 related genes. *Nucleic Acids Res* 20: 5519-25.
- [94] Kingsley, C., Winoto, A. (1992). Cloning of GT box-binding proteins: a novel Sp1 multigene family regulating T-cell receptor gene expression. *Mol Cell Biol* 12: 4251-61.
- [95] Ihn, H., Trojanowska, M. (1997). Sp3 is a transcriptional activator of the human alpha2(I) collagen gene. *Nucleic Acids Res* 25: 3712-7.
- [96] Dennig, J., Hagen, G., Beato, M., Suske, G. (1995). Members of the Sp transcription factor family control transcription from the uteroglobin promoter. *J Biol Chem* 270: 12737-44.
- [97] Majello, B., De Luca, P., Hagen, G., Suske, G., Lania, L. (1994). Different members of the Sp1 multigene family exert opposite transcriptional regulation of the long terminal repeat of HIV-1. *Nucleic Acids Res* 22: 4914-21.
- [98] Zhao, L., Chang, L. S. (1997). The human POLD1 gene. Identification of an upstream activator sequence, activation by Sp1 and Sp3, and cell cycle regulation. *J Biol Chem* 272: 4869-82.

- [99] Dennig, J., Beato, M., Suske, G. (1996). An inhibitor domain in Sp3 regulates its glutamine-rich activation domains. *Embo J* 15: 5659-67.
- [100] Birnbaum, M. J., van Wijnen, A. J., Odgren, P. R., Last, T. J., Suske, G., Stein, G. S., Stein, J. L. (1995). Sp1 trans-activation of cell cycle regulated promoters is selectively repressed by Sp3. *Biochemistry* 34: 16503-8.
- [101] Supp, D. M., Witte, D. P., Branford, W. W., Smith, E. P., Potter, S. S. (1996). Sp4, a member of the Sp1-family of zinc finger transcription factors, is required for normal murine growth, viability, and male fertility. *Dev Biol* 176: 284-99.
- [102] Zenz, R., Eferl, R., Scheinecker, C., Redlich, K., Smolen, J., Schonhaler, H. B., Kenner, L., Tschachler, E., Wagner, E. F. (2008). Activator protein 1 (Fos/Jun) functions in inflammatory bone and skin disease. *Arthritis Res Ther* 10: 201.
- [103] Wagner, E. F. (2001). AP-1--Introductory remarks. *Oncogene* 20: 2334-5.
- [104] Wisdom, R. (1999). AP-1: one switch for many signals. *Exp Cell Res* 253: 180-5.
- [105] Zenz, R., Wagner, E. F. (2006). Jun signalling in the epidermis: From developmental defects to psoriasis and skin tumors. *Int J Biochem Cell Biol* 38: 1043-9.
- [106] Shaulian, E., Karin, M. (2002). AP-1 as a regulator of cell life and death. *Nat Cell Biol* 4: E131-6.
- [107] Chang, L., Karin, M. (2001). Mammalian MAP kinase signalling cascades. *Nature* 410: 37-40.
- [108] Oka, S., Shiraishi, Y., Yoshida, T., Ohkubo, T., Sugiura, Y., Kobayashi, Y. (2004). NMR structure of transcription factor Sp1 DNA binding domain. *Biochemistry* 43: 16027-35.
- [109] Müller, B. (2006). Untersuchungen zur Biosynthese der extrazellulären Matrix bei osteogener Differenzierung und zur physiologischen Funktion der humanen Xylosyltransferasen. Diplomarbeit.
- [110] Jin, U. H., Suh, S. J., Chang, H. W., Son, J. K., Lee, S. H., Son, K. H., Chang, Y. C., Kim, C. H. (2008). Tanshinone IIA from *Salvia miltiorrhiza* BUNGE inhibits human aortic smooth muscle cell migration and MMP-9 activity through AKT signaling pathway. *J Cell Biochem* 104: 15-26.

- [111] Park, C. H., Lee, J. H., Yang, C. H. (2005). Curcumin derivatives inhibit the formation of Jun-Fos-DNA complex independently of their conserved cysteine residues. *J Biochem Mol Biol* 38: 474-80.
- [112] Cuellar, K., Chuong, H., Hubbell, S. M., Hinsdale, M. E. (2007). Biosynthesis of chondroitin and heparan sulfate in chinese hamster ovary cells depends on xylosyltransferase II. *J Biol Chem* 282: 5195-200.
- [113] Schön, S., Prante, C., Müller, S., Schöttler, M., Tarnow, L., Kuhn, J., Kleesiek, K., Götting, C. (2005). Impact of polymorphisms in the genes encoding xylosyltransferase I and a homologue in type 1 diabetic patients with and without nephropathy. *Kidney Int* 68: 1483-90.
- [114] Schön, S., Schulz, V., Prante, C., Hendig, D., Szliska, C., Kuhn, J., Kleesiek, K., Götting, C. (2006). Polymorphisms in the xylosyltransferase genes cause higher serum XT-I activity in patients with pseudoxanthoma elasticum (PXE) and are involved in a severe disease course. *J Med Genet* 43: 745-9.
- [115] Huber, R., Schlessinger, D., Pilia, G. (1998). Multiple Sp1 sites efficiently drive transcription of the TATA-less promoter of the human glypican 3 (GPC3) gene. *Gene* 214: 35-44.
- [116] Pilia, G., Hughes-Benzie, R. M., MacKenzie, A., Baybayan, P., Chen, E. Y., Huber, R., Neri, G., Cao, A., Forabosco, A., Schlessinger, D. (1996). Mutations in GPC3, a glypican gene, cause the Simpson-Golabi-Behmel overgrowth syndrome. *Nat Genet* 12: 241-7.
- [117] Gris, P., Tighe, A., Levin, D., Sharma, R., Brown, A. (2007). Transcriptional regulation of scar gene expression in primary astrocytes. *Glia* 55: 1145-55.
- [118] Mauviel, A., Korang, K., Santra, M., Tewari, D., Uitto, J., Iozzo, R. V. (1996). Identification of a bimodal regulatory element encompassing a canonical AP-1 binding site in the proximal promoter region of the human decorin gene. *J Biol Chem* 271: 24824-9.
- [119] Heegaard, A. M., Xie, Z., Young, M. F., Nielsen, K. L. (2004). Transforming growth factor beta stimulation of biglycan gene expression is potentially mediated by sp1 binding factors. *J Cell Biochem* 93: 463-75.
- [120] Chung, K. Y., Agarwal, A., Uitto, J., Mauviel, A. (1996). An AP-1 binding sequence is essential for regulation of the human alpha2(I) collagen (COL1A2) promoter activity by transforming growth factor-beta. *J Biol Chem* 271: 3272-8.

- [121] Fisher, L. W., Heegaard, A. M., Vetter, U., Vogel, W., Just, W., Termine, J. D., Young, M. F. (1991). Human biglycan gene. Putative promoter, intron-exon junctions, and chromosomal localization. *J Biol Chem* 266: 14371-7.
- [122] Hergenbahn, M., Soto, U., Weninger, A., Polack, A., Hsu, C. H., Cheng, A. L., Rosl, F. (2002). The chemopreventive compound curcumin is an efficient inhibitor of Epstein-Barr virus BZLF1 transcription in Raji DR-LUC cells. *Mol Carcinog* 33: 137-45.
- [123] Huang, T. S., Lee, S. C., Lin, J. K. (1991). Suppression of c-Jun/AP-1 activation by an inhibitor of tumor promotion in mouse fibroblast cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 88: 5292-6.
- [124] Verrecchia, F., Rossert, J., Mauviel, A. (2001). Blocking sp1 transcription factor broadly inhibits extracellular matrix gene expression in vitro and in vivo: implications for the treatment of tissue fibrosis. *J Invest Dermatol* 116: 755-63.
- [125] Cook, T., Gebelein, B., Urrutia, R. (1999). Sp1 and its likes: biochemical and functional predictions for a growing family of zinc finger transcription factors. *Ann N Y Acad Sci* 880: 94-102.
- [126] Sandorfi, N., Louneva, N., Hitraya, E., Hajnoczky, G., Saitta, B., Jimenez, S. A. (2005). Inhibition of collagen gene expression in systemic sclerosis dermal fibroblasts by mithramycin. *Ann Rheum Dis* 64: 1685-91.
- [127] Blume, S. W., Snyder, R. C., Ray, R., Thomas, S., Koller, C. A., Miller, D. M. (1991). Mithramycin inhibits SP1 binding and selectively inhibits transcriptional activity of the dihydrofolate reductase gene in vitro and in vivo. *J Clin Invest* 88: 1613-21.
- [128] Vatsyayan, J., Peng, H. L., Chang, H. Y. (2005). Analysis of human UDP-glucose dehydrogenase gene promoter: identification of an Sp1 binding site crucial for the expression of the large transcript. *J Biochem* 137: 703-9.
- [129] Goto, T., Matsui, Y., Fernandes, R. J., Hanson, D. A., Kubo, T., Yukata, K., Michigami, T., Komori, T., Fujita, T., Yang, L., Eyre, D. R., Yasui, N. (2006). Sp1 family of transcription factors regulates the human alpha2 (XI) collagen gene (COL11A2) in Saos-2 osteoblastic cells. *J Bone Miner Res* 21: 661-73.
- [130] Monslow, J., Williams, J. D., Fraser, D. J., Michael, D. R., Foka, P., Kift-Morgan, A. P., Luo, D. D., Fielding, C. A., Craig, K. J., Topley, N., Jones, S. A., Ramji, D. P., Bowen, T. (2006). Sp1 and Sp3 mediate constitutive transcription of the human hyaluronan synthase 2 gene. *J Biol Chem* 281: 18043-50.

- [131] Lania, L., Majello, B., De Luca, P. (1997). Transcriptional regulation by the Sp family proteins. *Int J Biochem Cell Biol* 29: 1313-23.
- [132] Li, L., He, S., Sun, J. M., Davie, J. R. (2004). Gene regulation by Sp1 and Sp3. *Biochem Cell Biol* 82: 460-71.
- [133] Matsuo, N., Tanaka, S., Gordon, M. K., Koch, M., Yoshioka, H., Ramirez, F. (2006). CREB-AP1 protein complexes regulate transcription of the collagen XXIV gene (Col24a1) in osteoblasts. *J Biol Chem* 281: 5445-52.
- [134] Li, H., Melford, K., Judson, A., Bensadoun, A. (2004). Murine glypican-4 gene structure and expression; Sp1 and Sp3 play a major role in glypican-4 expression in 3T3-F442A cells. *Biochim Biophys Acta* 1679: 141-55.
- [135] Bontemps, Y., Vuillermoz, B., Antonicelli, F., Perreau, C., Danan, J. L., Maquart, F. X., Wegrowski, Y. (2003). Specific protein-1 is a universal regulator of UDP-glucose dehydrogenase expression: its positive involvement in transforming growth factor-beta signaling and inhibition in hypoxia. *J Biol Chem* 278: 21566-75.
- [136] Fessele, S., Maier, H., Zischek, C., Nelson, P. J., Werner, T. (2002). Regulatory context is a crucial part of gene function. *Trends Genet* 18: 60-3.
- [137] Inagaki, Y., Truter, S., Ramirez, F. (1994). Transforming growth factor-beta stimulates alpha 2(I) collagen gene expression through a cis-acting element that contains an Sp1-binding site. *J Biol Chem* 269: 14828-34.
- [138] Gaedeke, J., Noble, N. A., Border, W. A. (2004). Curcumin blocks multiple sites of the TGF-beta signaling cascade in renal cells. *Kidney Int* 66: 112-20.
- [139] Jonk, L. J., Itoh, S., Heldin, C. H., ten Dijke, P., Kruijer, W. (1998). Identification and functional characterization of a Smad binding element (SBE) in the JunB promoter that acts as a transforming growth factor-beta, activin, and bone morphogenetic protein-inducible enhancer. *J Biol Chem* 273: 21145-52.
- [140] Ponticos, M., Harvey, C., Ikeda, T., Abraham, D., Bou-Gharios, G. (2009). JunB mediates enhancer/promoter activity of COL1A2 following TGF- β induction. *Nucleic Acids Res* 37: 5378-89.
- [141] Voglmeir, J., Voglauer, R., Wilson, I. B. (2007). XT-II, the second isoform of human peptide-O-xylosyltransferase, displays enzymatic activity. *J Biol Chem* 282: 5984-90.

- [142] Condac, E., Silasi-Mansat, R., Kosanke, S., Schoeb, T., Towner, R., Lupu, F., Cummings, R. D., Hinsdale, M. E. (2007). Polycystic disease caused by deficiency in xylosyltransferase 2, an initiating enzyme of glycosaminoglycan biosynthesis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 104: 9416-21.
- [143] Hendig, D., Tarnow, L., Kuhn, J., Kleesiek, K., Götting, C. (2008). Identification of a xylosyltransferase II gene haplotype marker for diabetic nephropathy in type 1 diabetes. *Clin Chim Acta* 398: 90-4.
- [144] Schön, S., Huep, G., Prante, C., Müller, S., Christ, R., Hagen, F. W., Kuhn, J., Kleesiek, K., Götting, C. (2006). Mutational and functional analyses of xylosyltransferases and their implication in osteoarthritis. *Osteoarthritis Cartilage* 14: 442-8.
- [145] Hughes, T. R., Tengku-Muhammad, T. S., Irvine, S. A., Ramji, D. P. (2002). A novel role of Sp1 and Sp3 in the interferon-gamma -mediated suppression of macrophage lipoprotein lipase gene transcription. *J Biol Chem* 277: 11097-106.
- [146] Martinez-Jimenez, C. P., Gomez-Lechon, M. J., Castell, J. V., Jover, R. (2006). Underexpressed coactivators PGC1alpha and SRC1 impair hepatocyte nuclear factor 4 alpha function and promote dedifferentiation in human hepatoma cells. *J Biol Chem* 281: 29840-9.
- [147] Birnboim, H. C., Doly, J. (1979). A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. *Nucleic Acids Res* 7: 1513-23.
- [148] Vogelstein, B., Gillespie, D. (1979). Preparative and analytical purification of DNA from agarose. *Proc Natl Acad Sci U S A* 76: 615-9.
- [149] Morrison, T. B., Weis, J. J., Wittwer, C. T. (1998). Quantification of low-copy transcripts by continuous SYBR Green I monitoring during amplification. *Biotechniques* 24: 954-8, 960, 962.
- [150] Wittwer, C. T., Herrmann, M. G., Moss, A. A., Rasmussen, R. P. (1997). Continuous fluorescence monitoring of rapid cycle DNA amplification. *Biotechniques* 22: 130-1, 134-8.
- [151] Sanger, F., Coulson, A. R. (1975). A rapid method for determining sequences in DNA by primed synthesis with DNA polymerase. *J Mol Biol* 94: 441-8.

- [152] Campbell, P., Jacobsson, I., Benzing-Purdie, L., Roden, L., Fessler, J. H. (1984). Silk-a new substrate for UDP-D-xylose:proteoglycan core protein beta-D-xylosyltransferase. *Anal Biochem* 137: 505-16.

9 PUBLIKATIONEN UND PRÄSENTATIONEN

9.1 Publikationen

1. **Müller B.**, Prante C., Gastens M., Kuhn J., Kleesiek K., Götting C., Increased levels of xylosyltransferase I correlate with the mineralization of the extracellular matrix during osteogenic differentiation of mesenchymal stem cells.
Matrix Biology (2008), 27(2):139-49.
2. **Müller B.**, Prante C., Kleesiek K., Götting C., Identification and characterization of the human xylosyltransferase I gene promoter region.
Journal of Biological Chemistry (2009), 284 (45): 30775-82.
3. **Müller B.**, Prante C., Kleesiek K., Götting C., First identification and functional analysis of the human xylosyltransferase II promoter.
Biochemical Journal, eingereicht.
4. Yan, J., Charlton-Menys V., Götting C., **Müller B.**, Aeschlimann D., Alexander Y. Regulation of oxidative stress induced osteogenic differentiation of human VSMCs involves decorin GAG synthesis and TGF β signalling.
Circulation Research, eingereicht.

9.2 Kongressvorträge

1. **Müller, B.**, The mineralization of the extracellular matrix during osteogenic differentiation of mesenchymal stem cells correlates with increased levels of human xylosyltransferase I.
2nd Congress of the German Society for Stem Cell Research, 2007, Würzburg, Deutschland.
2. **Müller, B.**, Identification and characterization of xylosyltransferase I and II promoters.
20th Joint Glycobiology meeting, 2009, Köln, Deutschland.

9.3 Kongressbeiträge und Posterpräsentationen

1. Prante, C., **Müller, B.**, Milting, H., Kassner, A. Bahr, C., Busch, S., Carrera, J., Ambrosius, M., Kuhn, J., Kleesiek, K., Götting, C. (2006).
Impact of xylosyltransferase I for the remodeling of the ECM during cardiac fibrosis.
17th Joint Meeting of the „Studiengruppe Glykobiologie der GBM“, the „Nederlandse Vereniging voor Glycobiologie“, the „Group Lillois de Glycobiologie“ and the “Belgian Working Group for Glycosciences”, Bruges, Belgien. *Abstractband 35.*
2. Prante, C., **Müller, B.**, Milting, H., Kassner, A. Bahr, C., Busch, S., Carrera, J., Ambrosius, M., Kuhn, J., Kleesiek, K., Götting, C. (2006)
Inhibition of xylosyltransferase I expression in human cardiac fibroblasts using specific inhibitors of TGF-beta1 signal transduction or small interfering RNA is a promising technique to study cardiac fibrosis.
3. Jahrestagung der Deutschen Vereinten Gesellschaft für Klinische Chemie und Laboratoriumsmedizin (DGKL) gemeinsam mit der Österreichischen Gesellschaft für Laboratoriumsmedizin und Klinische Chemie (ÖGLMKC), Mannheim, Deutschland.
Clin. Chem. Lab. Med. 44, A161.

3. **Müller, B.**, Prante, C., Gastens, M., Kuhn, J., Kleesiek, K., Götting, C. (2007)
Increased levels of human xylosyltransferase I correlate with the mineralization of the extracellular matrix during osteogenic differentiation of mesenchymal stem cells.
4. Jahrestagung der Österreichischen Gesellschaft für Laboratoriumsmedizin und Klinischen Chemie (ÖGLMKC) gemeinsam mit der Deutschen Vereinten Gesellschaft für Klinische Chemie und Laboratoriumsmedizin (DGKL), Wien, Österreich.
Clin. Chem. Lab. Med. 45, A102.
4. **Müller, B.**, Prante, C., Gastens, M., Kuhn, J., Kleesiek, K., Götting, C. (2007)
The mineralization of the extracellular matrix during osteogenic differentiation of human mesenchymal stem cells correlate with increased levels of xylosyltransferase I.
18th Joint meeting of the „Belgian Working Group for Glycosciences“, the „Nederlandse Vereniging voor Glycobiologie“, the „Studiengruppe Glykobiologie der GBM“ and the „Groupe Lillois de Glycobiologie“, Lille-Lesquin, Frankreich. *Abstractband 36*.
5. **Müller, B.**, Prante, C., Kuhn, J., Kleesiek, K., Götting, C. (2008)
Key enzymes of the glycosaminoglycan pathway show a synchronized expression during the osteogenic maturation of mesenchymal stem cells.
5. Jahrestagung der Deutschen Vereinten Gesellschaft für Klinische Chemie und Laboratoriumsmedizin (DGKL), Mannheim, Deutschland.
Clin. Chem. Med. Lab. 46, A158.
6. **Müller, B.**, Prante, C., Kuhn, J., Kleesiek, K., Götting, C. (2008)
Differential regulation of xylosyltransferase I and II during osteogenic differentiation of mesenchymal stem cells.
3rd Congress on Regenerative Biology and Medicine and 3rd Congress of the German Society for Stem Cell Research, Stuttgart, Deutschland.
Tissue Engineering Part A, 15(3): 675-737.
7. Yan, J., Menys, V., Götting, C., **Müller, B.**, Aeschlimann, D., Alexander, Y. (2009)
Oxidative regulates smooth muscle cell calcification via decorin and TGF- β signaling.
5th European Meeting on Vascular Biology and Medicine, Marseille, Frankreich.

8. Yan, J., Menys, V., Götting, C., **Müller, B.**, Aeschlimann, D., Alexander, Y. (2009)
Glycosaminoglycan chain synthesis on decorin contributes to oxidative stress-induced calcification of human vascular smooth muscle cells. British Society for Cardiovascular Research Spring meeting 2009, Oxford, UK. *Heart (2009);95:e2 A37.*

9. **Müller B.**, Prante C., Kleesiek K., Götting C. (2009)
Regulation of the fibrosis marker xyosyltransferase I.
6. Jahrestagung der Deutschen Vereinten Gesellschaft für Klinische Chemie und Laboratoriumsmedizin (DGKL), Leipzig, Deutschland.
Clin. Chem. Med. Lab. 47, A69.

10 LEBENS LAUF*Persönliche Daten*

Name: Benjamin Müller
 Geburtsdatum: 4. November 1980
 Geburtsort: Bünde
 Staatsangehörigkeit: Deutsch
 Familienstand: Ledig, keine Kinder

Schulische Ausbildung

08/1987–07/1988 Grundschole Bünde Mitte
 08/1988–07/1991 Grundschole Unteres Kalletal
 08/1991–06/2000 Weser-Gymnasium Vlotho, Abitur, Gesamtnote: 1,2

Zivildienst und Praktika

09/2000–07/2001 Zivildienst beim DRK-Lemgo (Ausbildung zum Rettungssanitäter)
 03/2004–04/2004 Praktikum bei Bayer HealthCare, Wuppertal

Wissenschaftlicher Werdegang

09/2001–10/2006 Studium der Diplom-Biochemie an der Universität Bielefeld,
 Gesamtnote: mit Auszeichnung

03/2006–10/2006 Diplomarbeit am Herz- und Diabeteszentrum NRW,
 Bad Oeynhausen, Institut für Laboratoriums- und
 Transfusionsmedizin, Prof. Dr. Knut Kleesiek
 Thema: Untersuchungen zur Biosyntese der extrazellulären
 Matrix bei osteogener Differenzierung und zur physiologischen
 Funktion der humanen Xylosyltransferasen
 Note: Sehr gut

Seit 12/2006 Doktorarbeit bei Prof. Dr. Knut Kleesiek am Institut für
 Laboratoriums- und Transfusionsmedizin, Herz- und
 Diabeteszentrum NRW, Universitätsklinik der Ruhr-Universität
 Bochum, Bad Oeynhausen
 Thema: Identifizierung und funktionelle Analyse der Promotoren
 der Xylosyltransferasen I und II

11 ERKLÄRUNG

Hiermit versichere ich, dass ich die vorliegende Arbeit selbstständig und ohne fremde Hilfe verfasst habe, keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel benutzt und Zitate kenntlich gemacht habe.

Kalletal, den 23. Dezember 2009