

Charakterisierung des 5-HT_{3B}-Promotors der Ratte
vor dem Hintergrund eines mit Chemotherapie-induziertem
Erbrechen assoziierten Polymorphismus

Dissertation

zur Erlangung des Doktorgrades „Doctor rerum naturalium“
der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultäten
der Georg-August-Universität Göttingen

vorgelegt von
Kristin Bokelmann
aus Nordhausen

Göttingen 2011

Referent: Prof. Dr. H.-J. Fritz

Korreferent: Prof. Dr. J. Brockmüller

Tag der mündlichen Prüfung: 19.07.2011

Inhaltsverzeichnis

INHALTSVERZEICHNIS	I
ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS	VI
1 EINLEITUNG	1
1.1 Chemotherapie-induzierte Übelkeit und Erbrechen	1
1.2 Serotonin und der Serotoninrezeptor Typ 3 (5-HT ₃)	5
1.2.1 Evolutionäre Konservierung der 5-HT ₃ -Rezeptoruntereinheiten	10
1.2.2 Genetische Variabilität in den 5-HT ₃ -Rezeptoruntereinheiten	10
1.3 Das <i>HTR3B</i> -Gen und sein Promotor	14
1.4 Grundlagen der Regulation der RNA-Polymerase II-abhängigen Transkription in Eukaryoten	16
1.5 Aufgabenstellung	22
2 MATERIAL UND METHODEN	23
2.1 Material	23
2.1.1 Reagenzien, Kits, Medien und Enzyme	23
2.1.2 Verbrauchsmaterialien	26
2.1.3 Geräte	27
2.1.4 Software, Datenbanken und Sequenzen	28
2.1.5 Biologisches Material	28
2.1.5.1 Restriktionsenzyme	28
2.1.5.2 Vektoren	29
2.1.5.3 Bakterienstämme	30
2.1.5.4 Zelllinien	30
2.2 Methoden	31
2.2.1 Sterilarbeit und Umgang mit S1- und toxischem Material	31
2.2.2. DNA-Standardmethoden	31
2.2.2.1 Polymerasekettenreaktion (PCR)	31
2.2.2.2 Kolonie-PCR	32
2.2.2.3 Agarose-Gelelektrophorese	34

2.2.2.4	Photometrische Quantifizierung von DNA und RNA	35
2.2.2.5	Isolierung von genomischer DNA	35
2.2.2.6	Aufreinigung von DNA	35
2.2.2.6.1	aus Agarosegelen	35
2.2.2.6.2	aus Lösungen	35
2.2.2.7	Ankonzentrieren von DNA-Lösungen mittels Vakuum-zentrifugation	36
2.2.2.8	Restriktionsverdau	36
2.2.2.9	Generieren von 3'-A-Überhängen an PCR-Produkten mit glatten Enden	37
2.2.2.10	Auffüllen von 5'-überhängenden Enden (Klenow-Reaktion)	37
2.2.2.11	Ligation.....	38
2.2.2.12	Phenol-Chloroform-Extraktion	38
2.2.3	Herstellung von DNA-Konstrukten.....	39
2.2.3.1	Klonierung von 5'-verkürzten <i>Htr3b</i> -Promotorfragmenten in den pXP2-Vektor	39
2.2.3.2	TOPO-Klonierung	42
2.2.3.3	Klonierung von ECR 1 und ECR 3 in den pXP2- Vektor.....	42
2.2.3.4	Umklonierungen in/von Expressionsplasmide(n)	43
2.2.3.5	Ortsspezifische Mutagenese	43
2.2.4	Sequenzanalyse	45
2.2.4.1	Sequenzierung.....	45
2.2.4.2	Fragmentlängenanalyse	47
2.2.5	Arbeit mit mRNA	48
2.2.5.1	Umgang mit RNA.....	48
2.2.5.2	Isolation von RNA	48
2.2.5.3	cDNA-Synthese (Reverse Transkription)	48
2.2.5.4	Transkriptquantifizierung mittels quantitativer RT-PCR.....	49
2.2.5.4.1	Real-time-PCR mit genspezifischen Sonden	49
2.2.5.4.2	Real-time-PCR mit SYBRgreen	51
2.2.5.4.3	Relative Quantifizierung	52
2.2.5.4.4	Absolute Quantifizierung.....	52
2.2.6	Arbeit mit Bakterien	53
2.2.6.1	Kulturmedium.....	53
2.2.6.2	Anzucht von Bakterien auf Agarplatten.....	53
2.2.6.3	Anzucht von Bakterien in Lösung	54
2.2.6.4	Herstellung von Glycerinkryokulturen	54
2.2.6.5	Transformation durch Elektroporation	54
2.2.7	Isolierung von Plasmid-DNA aus Bakterien	55
2.2.7.1	Minipräparation	55
2.2.7.2	Midipräparation	57
2.2.8	Zellkultur	57
2.2.8.1	Verwendete Zelllinien und deren Kultivierungs-Bedingungen	57

2.2.8.1.1 PC-12-Zellen.....	58
2.2.8.1.2 HEK-293-Zellen	59
2.2.8.1.3 Flp-InTM TREx 293.....	59
2.2.8.1.4 Flp-InTM NR3C1	59
2.2.8.2 Bestimmung der Zellzahl.....	59
2.2.8.3 Einfrieren von Zellen	60
2.2.8.4 Revitalisieren von eingefrorenen Zellen	60
2.2.8.5 Ausdifferenzierung von Zellen	60
2.2.8.6 Transfektion.....	61
2.2.8.6.1 Transiente Transfektion	61
2.2.8.6.2 Stabile Transfektion	63
2.2.8.7 Bestimmung der Promotoraktivität mit dem <i>Dual-Luciferase-System</i>	64
2.2.9 Proteinbiochemische Methoden	65
2.2.9.1 <i>In vitro</i> Transkription und Translation.....	65
2.2.9.2 Zellkernproteinisolierung.....	66
2.2.9.3 Konzentrationsbestimmung des Proteingehaltes.....	71
2.2.9.4 Auftrennung von Proteinen durch SDS-Polyacrylamid.....	71
2.2.9.5 Silberfärbung	73
2.2.10 DNase I hypersensitivity Assay.....	74
2.2.11 Electrophoretic mobility shift assay	75
2.2.11.1 Herstellung alpha- ³² P-dCTP-markierter Sonden.....	75
2.2.11.2 Bindungsreaktion.....	81
2.2.11.3 Nicht-denaturierende Gelelektrophorese	82
2.2.11.4 Konkurrenz im EMSA	82
2.2.11.5 Supershift.....	83
2.2.12 Separation und Identifikation eines Proteins aus Gesamtprotein via FPLC, Dynabead-Bindung und Massenspektrometrie.....	83
2.2.12.1 FPLC.....	84
2.2.12.1.1 Vorbereitung der FPLC-Säule.....	84
2.2.12.1.2 Proteinfractionierung mittels FPLC	84
2.2.12.2 <i>Dynabead</i> -Bindung.....	85
2.2.12.2.1 Zusammenlagerung einzelsträngiger Oligonukleotide.....	86
2.2.12.2.2 Bindung von dsOligonukleotiden an Dynabeads	86
2.2.12.2.2 Bindung der FPLC-aufgereinigten Proteine an Dynabeads	87
2.2.13 RLM 5' RACE	88
2.2.14 Methylierungsanalyse.....	91
2.2.14.1 <i>In vitro</i> Methylierung von Reportergenplasmiden mit CpG-Methyltransferase	91
2.2.14.2 <i>In vivo</i> Methylierung nach PC-12 Ausdifferenzierung (Bisulfit-Sequenzierung).....	93
2.2.14.3 Demethylierung durch den Methyltransferase-Hemmer 5-Aza-2'-Deoxycytidin	94

3	ERGEBNISSE	96
3.1	Charakterisierung des <i>Htr3b</i>-Promotors der Ratte	96
3.1.1	Bedeutung des Differenzierungsstatus von PC-12-Zellen für die transkriptionelle Regulation von <i>Htr3a</i> und <i>Htr3b</i>	96
3.1.2	Identifizierung der <i>Htr3b</i> -Transkriptionsstartseiten	98
3.1.3	Analyse der Promotormethylierung des <i>Htr3b</i> -Gens	102
3.1.3.1	<i>In vitro</i> -Methylierung von Reportergenplasmiden mit CpG-Methyltransferase	103
3.1.3.2	<i>In vivo</i> -Analyse der Promotormethylierung nach PC-12 Ausdifferenzierung (Bisulfit-Sequenzierung)	104
3.1.3.3	<i>In vivo</i> -Hemmung der Methylierung durch den Methyltransferase-Hemmer 5-Aza-2'-Deoxycytidin	107
3.1.4	Funktionelle Untersuchungen im <i>Htr3b</i> -Promotorbereich	108
3.1.4.1	Definition des Promotorbereichs mittels DNase I Hypersensitivity Assay	108
3.1.4.4	Identifikation und Charakterisierung der <i>cis</i> - und <i>trans</i> - wirkenden Elemente des proximalen <i>Htr3b</i> -Promotors	116
3.1.4.4.1	Evolutionär konservierte Motive	116
3.1.4.4.2	Nicht evolutionär konservierte Motive	121
3.1.4.4.2.1	E-Box 2	123
3.1.4.4.2.2	TFII-I	125
3.1.4.4.2.3	NF-1 und YY1	126
3.1.4.4.2.4	Egr-1	132
3.2	Untersuchung der -100_-102-Region im menschlichen <i>HTR3B</i>-Promotor	134
3.2.1.	Bestimmung der Kernbindungssequenz in der -100_-102 Region	134
3.2.2.	Überprüfung bioinformatischer Hinweise über die Identität des -100_-102-Bindungsproteins	135
3.2.3.	Identifizierung des -100_-102-Bindungsprotein mittels Affinitätsaufreinigung	141
4	DISKUSSION.....	146
4.1	Transkriptionelle Charakterisierung des Ratten-<i>Htr3b</i>-Promotors.....	147
4.1.1	Transkriptionsstartseiten.....	147
4.1.2	DNA-Methylierung in der CpG-Insel.....	148
4.1.3	Eingrenzung des <i>Htr3b</i> -Promotorbereichs - Die Rolle der ECRs	149
4.1.4	Charakterisierung des proximalen <i>Htr3b</i> -Promotors.....	151
4.1.4.1	Evolutionär konservierte Motive	151
4.1.4.2	Nicht evolutionär konservierte Motive	153
4.1.5	Kernerkenntnisse über die transkriptionelle Regulation des <i>Htr3b</i> -Promotors	157
4.2	Suche nach dem -100_-102delAAG-Polymorphismus-bindenden Protein.....	159

4.3 Generelle Transkriptionsmechanismen im <i>HTR3B</i>-Promotor.....	162
5 ZUSAMMENFASSUNG.....	167
6 LITERATURVERZEICHNIS.....	170
7 DANKSAGUNG.....	180
8 LEBENSLAUF.....	182

Abkürzungsverzeichnis

Abkürzung	Bedeutung
(v/v)	Volumen pro Volumen
(w/v)	Gewicht pro Volumen
5-HT _{3B}	Serotoninrezeptor 3-Untereinheit B
Aqua bidest.	zweifach destilliertes Wasser
bp	Basenpaare
bzw.	beziehungsweise
ca.	circa
cDNA	copy DNA
CpG	Cytosin-phosphatidyl-Guanin
d-	Desoxy-
dCTP	Desoxy-Cytosintriphosphat
dd-	Didesoxy-
ddH ₂ O	zweifach destilliertes Wasser
DMEM	<i>Dulbecco's Modifiziertes Eagle Medium</i>
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoxynukleotidtriphosphat
DTT	Dithiothreitol
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
ECR	<i>evolutionary conserved region</i>
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
Egr-1	<i>Early growth response factor 1</i>
<i>et al.</i>	et alii
FAM	6-Carboxyfluorescein
g	Erdbeschleunigung (9.81 m/s ²)
GR	Glukokortikoid-Rezeptor
h	Stunde
<i>HTR3B</i>	Gen der Serotoninrezeptor 3-Untereinheit B
inkl.	inklusive

Inr	Initiator-Sequenzelement
kb	Kilobasenpaare
LB	Luria-Bertani Medium
LCR	Lokus-Kontrollregion
M	Molarität
min	Minute
mind.	mindestens
mRNA	messenger RNA
NGF	Nervenwachstumsfaktor 7S
NF-1	Nuclear factor 1
NK1	Neurokinin 1
n. s.	nicht signifikant
OD	Optische Dichte
p	Signifikanzniveau
PBS	Phosphatgepufferte Salzlösung
PCR	Polymerasekettenreaktion
pH	pH-Wert
RNA	Ribonukleinsäure
RT	Raumtemperatur
SAM	S-Adenosylmethionin
SDS	Natriumdodecylsulfat
Taq	Thermus aquaticus
TBE-Puffer	Tris-Borat-EDTA-Puffer
TBP	TATA-Box-Bindeprotein
TE-Puffer	Tris-hydroxymethyl-aminomethan-EDTA-Puffer
TFII-I	Transkriptionsfaktor II-I
Tris	Tris-hydroxymethyl-aminomethan
TSS	Transkriptionsstartseite
U	unit
u. a.	unter anderem
USF1	Upstream stimulatory factor 1
YY1	Ying Yang 1
z. B.	zum Beispiel

Code der Nukleinsäuren

Abkürzung	Bedeutung
A	Adenin
C	Cytosin
G	Guanin
T	Thymin
R	Adenin oder Guanin
Y	Cytosin oder Thymin
W	Adenin oder Thymin
S	Cytosin oder Guanin
M	Adenin oder Cytosin
K	Guanin oder Thymin
H	Adenin, Cytosin oder Thymin
B	Cytosin, Guanin oder Thymin
D	Adenin, Guanin oder Thymin
V	Adenin, Cytosin oder Guanin
N	Beliebige Base

1 Einleitung

1.1 Chemotherapie-induzierte Übelkeit und Erbrechen

Übelkeit und Erbrechen im Verlauf einer Chemotherapie oder Bestrahlung sind häufig beobachtete, unerwünschte Nebenwirkungen der Tumor-Therapie und lösen bei vielen Patienten schon im Vorfeld Ängste aus. Chemotherapie-induzierte Übelkeit und Erbrechen lässt sich heutzutage bei den meisten Patienten gut behandeln. Jedoch sprechen nicht alle Patienten gleich gut auf die Antiemetik-Therapie an: 20-30% der Patienten, die mit hochemetogenen Zytostatika behandelt werden, leiden weiterhin an Übelkeit und Erbrechen (Kaiser et al., 2002; Perwitasari et al., 2011), wenn auch mit einem geringeren Schweregrad.

Es gibt interindividuelle Faktoren, wie Geschlecht und Alter, die die Wahrscheinlichkeit für das Auftreten von Chemotherapie-induzierter Übelkeit und Erbrechen bedingen können. So sind z. B. Frauen und jüngere Patienten häufiger betroffen (Hesketh, 2008). Hingegen ist langjähriger Alkoholmissbrauch mit einem niedrigeren Risiko für Chemotherapie-induzierte Übelkeit und Erbrechen assoziiert. Schlechte Erfahrungen aus früheren Chemotherapien stellen ebenfalls einen erheblichen Risikofaktor dar. Das sogenannte antizipatorische Erbrechen wird bei unzureichender Antiemetik-Therapie in den ersten Zyklen einer Chemotherapie „erlernt“ und kann schon beim Gedanken an eine weitere Therapie Übelkeit und Erbrechen verursachen. Auch interindividuelle, genetische Unterschiede in den Serotonin Typ 3 (5-HT₃)-Rezeptoren oder in den 5-HT₃-Rezeptorantagonisten-abbauenden Enzymen (Cytochrome P450) wurden mit dem Risiko, während der Chemotherapie Erbrechen zu müssen, in Verbindung gebracht (Kaiser et al., 2002; Tremblay et al., 2003; Perwitasari et al., 2011).

Chemotherapie-induziertes Erbrechen wird durch eine massive Freisetzung von Serotonin (5-HT) aus den enterochromaffinen Zellen im Dünndarm, infolge der Verabreichung von Zytostatika oder Bestrahlung, verursacht (Hesketh, 2008). Wie in Abb. 1.1 verdeutlicht, dockt das Serotonin dann an 5-HT₃-Rezeptoren an den Afferenzen des *Nervus vagus* an. Es kommt zu einer Reizweiterleitung zum Hirnstamm, infolge derer dort wiederum Serotonin sowie andere Neurotransmitter, wie Substanz P und Dopamin freigesetzt werden. Durch Bindung der diversen Neurotransmitter an Rezeptoren (u. a. mACh-, H₁-, 5-HT_{1A}-, 5-HT₃-, 5-HT₄-, NK₁-, Dopamin-D2-

Rezeptoren) in der Chemorezeptor-Triggerzone der *Area postrema* wird das Signal weiterverarbeitet (Jensen et al., 2008). Am *Nucleus tractus solitarii* wird dann zentral das Erbrechen ausgelöst, was sich in Kontraktion abdominalen Muskeln, Zwerchfell, Magen und Speiseröhre äußert (Perwitasari et al., 2011). Eine direkte Erregung der *Area postrema* durch die Zytostatika im Blutstrom ist auch nicht auszuschließen, spielt wohl aber nur eine untergeordnete Rolle, was sich in diversen Tierversuchen gezeigt hat: Durch elektrische Stimulation von abdominalen, vagalen Afferenzen, konnte bei Frettchen eine erhöhte 5-HT-Ausschüttung am *Nucleus tractus solitarii* und der *Area postrema* sowie Erbrechen ausgelöst werden (Andrews et al., 1990; Minami et al., 2003). Dass Zytostatika die Auslöser der Emesis sind, konnte durch Cisplatingabe nachgewiesen werden, infolge derer die abdominale Aktivität des *Nervus vagus*, genauso wie die Häufigkeit von Erbrechen, zunahm (Endo et al., 2000). Mit Hilfe von 5-HT₃-Rezeptorantagonisten konnte beides unterdrückt werden. Außerdem führte abdominale Vagotomie bei Frettchen zu einer 85%igen Reduktion von Cisplatin-induziertem Erbrechen (Endo et al., 2000).

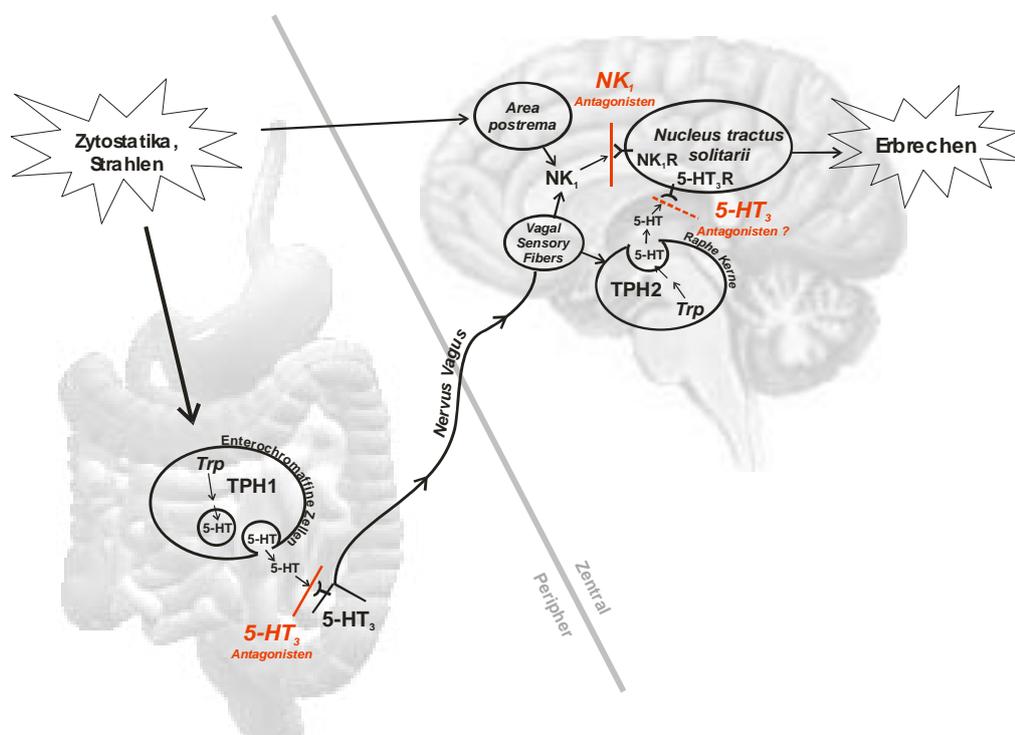


Abb. 1.1: Schematische Darstellung der aktuell vermuteten Signalvermittlung des akuten Chemotherapie-induzierten Erbrechens (aus Meineke, 2006). Dargestellt sind die peripheren (links im Bild) und zentralen (rechts im Bild) Stellen, die an der Initiation, Weiterleitung und Regulation des Chemotherapie-induzierten Erbrechens beteiligt sind. Die Bereiche, an denen 5-HT₃- und NK₁-Rezeptorantagonisten vermutlich angreifen, um die Emesis zu unterbinden, sind rot markiert. Als geschwindigkeitsbestimmende Isoenzyme der Serotoninsynthese aus Tryptophan (Trp) sind die Tryptophanhydroxylase 1 und 2 (TPH1 und TPH2) in die Signalübermittlung involviert.

Neben dem 5-HT₃-Rezeptor sind u.a. auch die Serotoninrezeptoren 5-HT_{1A} und 5-HT₄ an der Vermittlung von Chemotherapie-induzierter Übelkeit und Erbrechen beteiligt (Endo et al., 2000). Eine agonistische Bindung an 5-HT_{1A}-Rezeptoren vermindert Erbrechen, das durch Cisplatin ausgelöst wurde, sowie zusätzlich die Emesis im Verlauf der Reisekrankheit. Eine agonistische Bindung an 5-HT₄-Rezeptoren bewirkt eine erhöhte 5-HT-Ausschüttung aus dem Ileum des Frettchens.

Bei der Behandlung von Chemotherapie-induzierter Übelkeit und Erbrechen sind die unterschiedlichen Emesis-Risikogruppen der angewandten Zytostatika bzw. Bestrahlungen, die verschiedenen Verlaufsformen von Übelkeit und Erbrechen beim Patienten, sowie pharmakokinetische Aspekte der einzelnen Antiemetika zu beachten. Zytostatika und Bestrahlungen werden in vier Emesis-Risikogruppen eingeteilt, die der Häufigkeit, mit der sie bei Patienten zu Übelkeit und Erbrechen führen, entsprechen: hoch (>90%), moderat (31-90%), gering (10-30%) und minimal (<10%) (Hesketh, 2008). Zu den hochgradig emetogenen Substanzen bei intravenöser Applikation gehören z. B. Cisplatin, Dacarbazin und Cyclophosphamid (>1,5 mg/m²); zu den moderaten Doxorubicin, Daunorubicin und Oxaliplatin; zu den geringgradigen 5-Fluorouracil, Gemcitabin und Trastuzumab; sowie Bevacizumab, Vincristin und Vinorelbin zu den minimal emetogenen Substanzen (Hesketh, 2008). Bei oraler Applikation kann sich das emetogene Potential eines Zytostatikums erhöhen. Oral verabreicht, wird Vinorelbin z. B. als moderat emetogen eingestuft. In der Strahlentherapie gelten Ganzkörperbestrahlungen als hoch-, Oberkörperbestrahlungen als moderat-, Becken- sowie Hals- und Kopfbestrahlungen als gering-, und Brust- und Extremitätenbestrahlungen als minimal-emetogen.

Allgemein unterscheidet man zwischen der akuten (0-24 Stunden nach Chemotherapie) und der verzögerten (24-120 Stunden nach Chemotherapie) Verlaufsform von Chemotherapie-induzierter Übelkeit und Erbrechen (Herrstedt und Dombernowsky, 2007; Hesketh, 2008). Verschiedene Zytostatika bewirken wiederum innerhalb dieser Verlaufsformen charakteristische, zeitliche Verläufe. Cisplatin bewirkt z. B. 4-6 Stunden nach der Verabreichung sehr heftiges Erbrechen, danach aber innerhalb des 1. Tages kaum noch (Aapro, 2005). Erst im Laufe des 2. Tages kommt es dann wieder zu vermehrtem Erbrechen, dass bis zum 4.-5. Tag nach der Chemotherapie andauern

kann. Bei Cyclophosphamid tritt Erbrechen erst nach 8-14 Stunden auf, zieht sich dann aber mit gleicher Intensität konstant bis zum 3. Tag hin.

Die Pharmakokinetik der diversen Antiemetika, besonders die Metabolisierung über die Cytochrome P450 (CYP), ist bei ihrer Anwendung, Kombination und Dosierung ebenfalls zu beachten, um unerwünschte Wechselwirkungen sowie Über- oder Unterdosierungen zu vermeiden (Herrstedt und Dombernowsky, 2007). Außerdem ist es sinnvoll, die Patienten auf Genvarianten zu testen, die die Pharmakokinetik der Antiemetika interindividuell beeinflussen (Kaiser et al., 2002; Perwitasari et al., 2011).

Zur Behandlung von Chemotherapie-induzierter Übelkeit und Erbrechen werden, entsprechend der aktuellen Leitlinien der *Multinational Association of Supportive Care in Cancer* (MASCC; www.onkosupport.de), in der Klinik verschiedene Kombinationen von 5-HT₃-Rezeptorantagonisten, Glukokortikoiden und Neurokinin 1 (NK1)- und Dopamin-Rezeptorantagonisten eingesetzt.

Erste Mittel der Wahl bei akuter Übelkeit und Erbrechen im Rahmen einer Chemotherapie oder Bestrahlung sind 5-HT₃-Rezeptorantagonisten. In Europa sind aktuell fünf 5-HT₃-Rezeptorantagonisten zugelassen: Ondansetron, Granisetron, Tropisetron, Dolasetron und Palonosetron (Thompson und Lummis, 2007). Als erster selektiver 5-HT₃-Rezeptorantagonist wurde 1991 Ondansetron in Deutschland eingeführt. Ondansetron erwies sich als deutlich effektiver in der Verminderung von Chemotherapie-induzierter Emesis, als der zuvor in der Therapie eingesetzte, unselektive Dopamin D₂-, 5-HT₃- und 5-HT₄-Rezeptorantagonist Metoclopramid (Herrstedt und Dombernowsky, 2007; Perwitasari et al., 2011). Die Entwicklung von Palonosetron und dessen Markteinführung 2003 (bzw. 2005 in Deutschland) brachte die antiemetische Therapie einen weiteren entscheidenden Schritt weiter. Palonosetron ist ein hoch-selektiver und hoch-affiner 5-HT₃-Rezeptorantagonist und hat eine deutlich verlängerte Halbwertszeit von ~40 Stunden (Hesketh, 2008). Die Halbwertszeit von Ondansetron beträgt dagegen nur ~4-6 Stunden (Herrstedt und Dombernowsky, 2007).

Die Kombinationen von 5-HT₃-Rezeptorantagonisten mit Dexamethason (Glukokortikoid) und Aprepitant (NK1-Rezeptorantagonist) zeigen in der Therapie deutliche Erfolge (Italien-Group-for-Antiemetic-Research, 1995; Perwitasari et al., 2011). Wird ein 5-HT₃-Rezeptorantagonist mit Dexamethason kombiniert, tritt bei den Patienten 15-20% weniger Emesis auf. Kommt noch Aprepitant dazu, verbessert sich

der Schutz gegen akute Übelkeit und Erbrechen um 10-15%, gegen verzögerte Übelkeit und Erbrechen um 20-30% (Perwitasari et al., 2011).

Des Weiteren werden 5-HT₃-Rezeptorantagonisten auch in der Behandlung von postoperativer Übelkeit und Erbrechen eingesetzt und in den USA ist Alosetron zur Behandlung des Reizdarmsyndroms zugelassen (Thompson und Lummis, 2007). Zudem gibt es Hinweise, dass 5-HT₃-Rezeptorantagonisten auch in der Behandlung von Schwangerschaftserbrechen, Erbrechen nach Kaiserschnitt, Essstörungen, Alkohol- und Morphinentzug, Fibromyalgie und Rheuma wirksam sind (Thompson und Lummis, 2007; Niesler et al., 2008). Allerdings gibt es dafür noch keine medikamentösen Standardtherapien. 5-HT₃-Rezeptorantagonisten sind jedoch keine universellen Antiemetika. Sie helfen z. B. nicht bei Übelkeit, die im Verlauf der Reisekrankheit oder durch Toxine aus der Nahrung bzw. durch Morphin ausgelöst wurde (Endo et al., 2000).

1.2 Serotonin und der Serotoninrezeptor Typ 3 (5-HT₃)

Serotonin (5-Hydroxytryptamin; 5-HT) kommt als Neurotransmitter und Gewebshormon in vielen Spezies, vom Fadenwurm *C. elegans* über Pflanzen und höhere Pilze, bis ins Tierreich vor und entstand in der Evolution vermutlich vor ca. 750 Millionen Jahren (Hannon und Hoyer, 2008). Im menschlichen Körper ist es zu ca. 80% im Darm zu finden und ca. 90% davon lagert in den enterochromaffinen Zellen des Dünndarms, die es auch produzieren. Insgesamt enthält der menschliche Darm etwa 4,5-7,5 mg Serotonin (Endo et al., 2000).

Serotonin wurde erstmals Ende der 1930er Jahre von V. Erspamer aus der Magen-Darm-Schleimhaut isoliert (Erspamer, 1940). Er nannte es „Enteramin“. Später wurde der Stoff von der Gruppe um M. Rapport als Substanz, die zur Kontraktion von Blutgefäßen führt, identifiziert und erhielt den heutigen Namen „Serotonin“ (Rapport et al., 1948). 1951 wurde Serotonin erstmals chemisch synthetisiert (Hamlin und Fischer, 1951).

Bei Mensch und Tier wird Serotonin in zwei Schritten aus der Aminosäure L-Tryptophan synthetisiert (Lüllmann and Mohr, 1999). Zuerst wird das Tryptophan zu 5-Hydroxy-L-Tryptophan (5-HTP) hydroxyliert und dann zu 5-Hydroxytryptamin (=Serotonin) decarboxyliert. Der Abbau von Serotonin zu 5-Hydroxyindolessigsäure (5-HIAA) verläuft über die Monoaminoxidase A (MAO). Die Ausscheidung von

5-HIAA erfolgt über den Urin. Die Halbwertszeit von Serotonin beträgt beim Menschen 7-12 Stunden, beim Hund z. B. nur 6-8 Stunden (Endo et al., 2000).

Serotonin hat vielfache und mitunter sehr verschiedene Wirkungen im Körper, was darin begründet liegt, dass es sowohl im zentralen als auch im peripheren Nervensystem vorkommt und an diversen, verschiedenartigen Serotoninrezeptoren seine Wirkung entfaltet (Lüllmann und Mohr, 1999). So beeinflusst es z. B. Schlaf, Stimmungen, Aufmerksamkeit und Lernen (zentrale Wirkungen) als auch den Tonus von Blutgefäßen, Darm, Uterus und Bronchien (periphere Wirkungen). Pathophysiologisch wird Serotonin in Zusammenhang mit Übelkeit, Erbrechen, Reizdarmsyndrom, Essstörungen, Depressionen, Schizophrenie, Schmerzempfinden, Migräne und Hypertonie gebracht (Hoyer et al., 2002).

Serotoninrezeptoren wurden erstmals 1957 von Gaddum und Picarelli als M- und D-Rezeptoren beschrieben (Gaddum und Picarelli, 1957). Sie unterschieden sich aufgrund verschiedener Wirkungen in Tierversuchen: Die serotonerge Wirkung des M-Rezeptors (heute bekannt als 5-HT₃-Rezeptor) konnte durch Morphin geblockt werden, die des D-Rezeptors durch Dibenamin.

Es sind derzeit, je nach Autor, mindestens 18 verschiedene Serotoninrezeptorsubtypen bekannt, die nach strukturellen und funktionellen Übereinstimmungen in sieben Serotoninrezeptorfamilien zusammengefasst werden: 5-HT₁₋₇. Mit Ausnahme vom Serotoninrezeptor Typ 3 (5-HT₃) handelt es sich bei diesen Rezeptoren um G-Protein-gekoppelte Rezeptoren.

Der Serotoninrezeptor Typ 3 (5-HT₃) ist ein Serotonin-abhängiger Ionenkanal, der für Na⁺, K⁺ und Ca²⁺ permeabel ist. 5-HT₃-Rezeptoren werden auf neuronalen Zellen im zentralen und peripheren Nervensystem, aber auch auf nicht-neuronalen Zellen des Immunsystems exprimiert (Thompson und Lummis, 2007). Im zentralen Nervensystem sind sie vor allem im dorsal-vagalen Komplex im Hirnstamm, welcher den *Nucleus tranctus solitarius*, die *Area postrema* und den dorsal-vagalen Motornucleus beinhaltet, exprimiert (Barnes et al., 2009). Diese Gehirn-Regionen sind in die Initiation und Koordination von Übelkeit und Erbrechen involviert. Im Vorderhirn ist die Expression der 5-HT₃-Rezeptoren, bis auf einzelne Bereiche, wie *Hippocampus*, *Amygdala*, *Nucleus accumbens*, *Substantia nigra*, vergleichsweise gering (Thompson und Lummis, 2007). Im peripheren Nervensystem sind 5-HT₃-Rezeptoren auf prä- und

postganglionären Neuronen des sensorischen und enterischen Nervensystems zu finden (Hannon und Hoyer, 2008). Durch ihre Lokalisation an den vagalen Afferenzen wird z. B. das Signal einer erhöhten Serotoninausschüttung aus den enterochromaffinen Zellen des Darms, infolge einer Zytostatikabehandlung, an das Gehirn weitergeleitet.

Der 5-HT₃-Rezeptor gehört zur Familie der Cys-loop ligandengesteuerten Ionenkanäle und ähnelt daher im allgemeinen Aufbau dem nikotinischen Acetylcholin- (nACh), dem Glycin-, dem γ -Aminobuttersäure- (GABA_A) Rezeptor sowie dem neu entdeckten Zn²⁺-aktivierten Kationenkanal (Thompson et al., 2006; Barnes et al., 2009). Der 5-HT₃-Rezeptor weist eine hetero-pentamere Struktur auf (Barrera et al., 2005). Jede einzelne 5-HT₃-Untereinheit besteht, wie in Abb. 1.2A gezeigt, aus einer großen extrazellulären N-terminalen Domäne, vier transmembranären Domänen (M1-M4), zwei intrazellulären Schleifen (*loops*), einem extrazellulären *loop*, und einem C-Terminus (Thompson et al., 2006; Barnes et al., 2009). Der N-Terminus enthält sechs *loops*, die für den Aufbau der Ligandenbindungsstelle erforderlich sind (Lochner und Lummis, 2010). Im N-Terminus befinden sich weiterhin das Signalpeptid und der Cys-*loop* (Disulfidbrücke zwischen zwei Cysteinen), der der Cys-loop-Rezeptorfamilie ihren Namen gibt.

Die verschiedenen Rezeptoruntereinheiten sind jeweils so zueinander positioniert, dass die M2 immer die Innenseite des Ionenkanals säumt (Abb. 1.2B). Der M2 wird eine Beteiligung an der Koordination von Kanalöffnung, Ionenselektivität, Öffnung und Desensibilisierung zugeschrieben (Reeves et al., 2005). Der extrazelluläre M2-M3-loop wird für die Kanalöffnung verantwortlich gemacht (Lummis et al., 2005). Der intrazelluläre M3-M4 loop mit dem α -helikalen *membrane associated* (MA)-stretch hat Einfluss auf die Leitfähigkeit des Ionenkanals (Jansen et al., 2008; Peters et al., 2010). An den kompletten Rezeptor können fünf Serotoninmoleküle binden, zur Kanalöffnung sind mindestens drei notwendig (Mott et al., 2001).

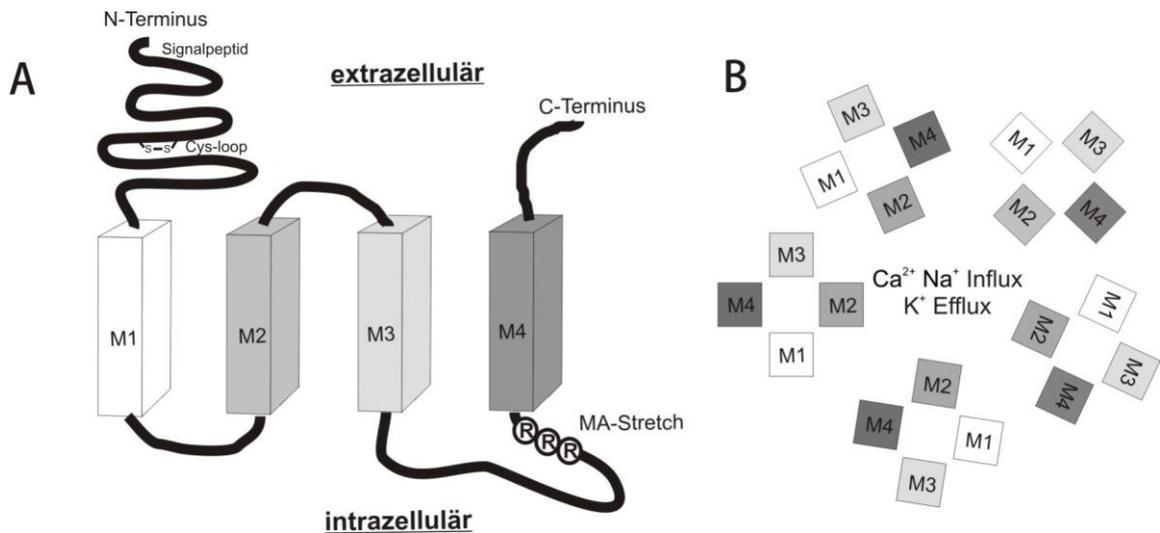


Abb. 1.2: Struktur der 5-HT₃-Rezeptoruntereinheit (nach Meineke, 2006 (verändert)). **A** Aufbau und Organisation einer einzelnen 5-HT₃-Rezeptoruntereinheit in der Plasmamembran. Besonders aus der Peptidsequenz hervorgehoben sind der charakteristische Cys-loop im N-Terminus und der MA-stretch im intrazellulären M3-M4 loop. **B** Organisation von fünf einzelnen 5-HT₃-Rezeptoruntereinheiten zu einem Ionenkanal. Aufsicht von oben. Die M2 Domäne säumt immer das Innere der Ionenpore. Die Bindung von Liganden führt zur Öffnung der Pore und es kommt zum Ca²⁺- und Na⁺-Influx und K⁺-Efflux.

Bisher wurden fünf verschiedenartige 5-HT₃-Rezeptoruntereinheiten identifiziert: 5-HT_{3A}; 5-HT_{3B}; 5-HT_{3C}; 5-HT_{3D} und 5-HT_{3E}.

1991 wurde die heute mit 5-HT_{3A} benannte 5-HT₃-Rezeptoruntereinheit aus einer murinen Neuroblastomzelllinie kloniert und in *Xenopus* Oocyten als homomerer Rezeptor exprimiert (Maricq et al., 1991). 1995 wurden dann auch menschliche 5-HT_{3A}-Rezeptoruntereinheiten kloniert (Belelli et al., 1995; Miyake et al., 1995). Allerdings wies der *in vitro*-gebildete homopentamere Rezeptor eine stark verminderte Leitfähigkeit im Vergleich zu nativen 5-HT₃-Rezeptoren auf, was die Existenz anderer Untereinheiten vermuten ließ (Fletcher und Barnes, 1998). 1999 wiesen die Arbeitsgruppen um Davies und Dubin unabhängig voneinander eine weitere 5-HT₃-Rezeptoruntereinheit nach, die 5-HT_{3B} genannt wurde (Davies et al., 1999; Dubin et al., 1999). Heteropentamere 5-HT_{3AB}-Rezeptoren weisen eine stark erhöhte Einzelkanalleitfähigkeit, verringerte Ca²⁺-Leitfähigkeit, eine lineare Strom-Spannungsbeziehung, schnellere Rezeptoraktivierung und -desensibilisierung, eine verringerte Affinität zu 5-HT und eine erhöhte maximale Erregungsantwort (E_{max}) zu 5-HT auf (Davies et al., 1999; Dubin et al., 1999; Hapfelmeier et al., 2003; Walstab et al., 2007). Die heteropentameren Rezeptoren sind den nativen 5-HT₃-Rezeptoren in ihren elektrophysiologischen Eigenschaften damit deutlich ähnlicher. 2003 wurden die drei weiteren 5-HT₃-Rezeptoruntereinheiten, 5-HT_{3C}, 5-HT_{3D} und 5-HT_{3E}, entdeckt

(Karnovsky et al., 2003; Niesler et al., 2003). Auch für diese Untereinheiten wurde durch gleichzeitige Expression mit 5-HT_{3A} die Bildung heteropentamerer 5-HT₃-Rezeptoren mit nachweisbar veränderten Rezeptoreigenschaften dokumentiert (Niesler et al., 2007).

Die Gene, die für die 5-HT₃-Rezeptoruntereinheiten kodieren, sind im menschlichen Genom auf zwei verschiedenen Chromosomen lokalisiert. Die Gene *HTR3A* und *HTR3B*, die für 5-HT_{3A} und 5-HT_{3B} kodieren, liegen hintereinander in Tandem-Orientierung auf Chromosom 11 (11q23.1) (Davies et al., 1999; Dubin et al., 1999). Die Gene *HTR3C*, *HTR3D* und *HTR3E*, die für 5-HT_{3C}, 5-HT_{3D} und 5-HT_{3E} kodieren, liegen auf Chromosom 3 (3q27-28) (Karnovsky et al., 2003; Niesler et al., 2003).

Hinsichtlich der gewebespezifischen Genexpression sind sich *HTR3A*, *HTR3B* und *HTR3C* ziemlich ähnlich. Ihre Transkripte sind prädominant im Gehirn und im Darm und weniger in inneren Organen, wie dem Magen, exprimiert (Davies et al., 1999; Dubin et al., 1999; Doucet et al., 2007; Thompson und Lummis, 2007; Tzvetkov et al., 2007). *HTR3D* ist dagegen prädominant und *HTR3E* ausschließlich im Darm exprimiert (Karnovsky et al., 2003; Niesler et al., 2003; Niesler et al., 2007).

In ihrer Aminosäuresequenz stimmen 5-HT_{3B} zu 41%, 5-HT_{3C} zu 36% und 5-HT_{3E} zu 39% mit 5-HT_{3A} überein (Karnovsky et al., 2003). Die Proteine von 5-HT_{3A-C} sowie 5-HT_{3E} sind ähnlich strukturiert. Der 5-HT_{3D}-Untereinheit fehlen dagegen große Teile des N-Terminus, inklusive Signalpeptid und Cys-loop.

Ob die Untereinheiten 5-HT_{3A-E} *in vivo* alle an der Formierung des 5-HT₃-Rezeptors beteiligt sind, ist noch ungeklärt. Fest steht, dass die 5-HT_{3A}-Untereinheit essentiell für die Membranlokalisierung und damit für die Funktionsfähigkeit des Rezeptors ist (Davies et al., 1999; Niesler et al., 2007). 5-HT_{3A} kann alleine die Zellaußenmembran erreichen, die 5-HT_{3B-E}-Untereinheiten können dies allerdings nicht (Davies et al., 1999; Dubin et al., 1999; Boyd et al., 2003; Niesler et al., 2007). Im Fall von 5-HT_{3B} wird dies durch ein ER-Retentionssignal im M1-M2-loop verursacht, welches die Ablösung des Proteins vom endoplasmatischen Retikulum und seine Oberflächenexpression verhindert (Boyd et al., 2003). Erst bei gleichzeitiger Expression von 5-HT_{3A} kann 5-HT_{3B} die Oberfläche der Zellaußenmembran erreichen und dort zusammen mit 5-HT_{3A} funktionelle Rezeptoren aufbauen. Durch Kraftfeldmikroskopie konnte so ein 5-HT₃-Rezeptor mit einer B-B-A-B-A-Konformation nachgewiesen werden (Barrera et al., 2005). Was die Oberflächenexpression der Untereinheiten 5-HT_{3C-E} verhindert, ist

noch unklar. Das ER-Retentionssignal im M1-M2-loop gibt es dort allerdings nicht (Niesler et al., 2007).

1.2.1 Evolutionäre Konservierung der 5-HT₃-Rezeptoruntereinheiten

Die 5-HT₃-Untereinheiten sind innerhalb der Säugetiere unterschiedlich stark evolutionär konserviert. In der vorliegenden Doktorarbeit liegt der Fokus vor allem auf der Konservierung von 5-HT_{3B} zwischen Mensch und Nagetieren, insbesondere der Ratte. Die Aminosäuresequenz von 5-HT_{3B} ist zwischen Mensch und Nagetier zu 73% konserviert, zwischen Maus und Ratte zu 95% (Hanna et al., 2000). Hoch konserviert zwischen humanem und murinem 5-HT_{3B} ist die transmembranäre Domäne M2. Dagegen gibt es einige Variationen im N-Terminus sowie im intrazellulären M3-M4-loop.

Noch vor einigen Jahren wurde behauptet, dass zwar 5-HT_{3A}, nicht aber 5-HT_{3B} im ZNS von Nagetieren vorhanden ist (van Hooft und Yakel, 2003). Allerdings konnten mittlerweile verschiedene Arbeitsgruppen 5-HT_{3B} auch dort nachweisen (Monk et al., 2001; Reeves und Lummis, 2006; Doucet et al., 2007). Pentamere 5-HT₃-Rezeptoren werden im Vorderhirn von Mensch, Maus und Ratte jedoch an unterschiedlichen Stellen exprimiert (Rajkumar und Mahesh, 2010). Beim Menschen sind die 5-HT₃-Rezeptoren im Vorderhirn nur in geringem Maße im *Cortex*, aber zahlreich im *Hippocampus* und der *Amygdala* exprimiert. Bei der Ratte wurden hohe Expressionslevel im *Cortex*, im *Hippocampus* und der *Amygdala* beobachtet. Im Vergleich dazu, ist bei der Maus die Expression in der *Amygdala* und im *Hippocampus* geringer.

Die Untereinheiten 5-HT_{3C}, 5-HT_{3D} und 5-HT_{3E} sind nicht in Nagetieren vorhanden (Karnovsky et al., 2003). Hingegen wurde die Expression orthologer Gene dieser Untereinheiten in Hunden, Kühen, Hühnern, Schweinen und Kaninchen nachgewiesen.

1.2.2 Genetische Variabilität in den 5-HT₃-Rezeptoruntereinheiten

Mit zunehmender Erforschung der 5-HT₃-Rezeptor-Untereinheiten tauchen immer mehr Erkenntnisse über interindividuelle genetische Unterschiede, Polymorphismen, innerhalb der Rezeptorkomponenten auf. Aktuell sind in der NCBI-Datenbank für das menschliche *HTR3A*-Gen 272 Varianten, für *HTR3B* 436 Varianten, für *HTR3C* 124 Varianten, für *HTR3D* 119 Varianten und für *HTR3E* 103 Varianten gelistet

(<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/sites/entrez>; Stand Juni 2011). Die bestdokumentierten Polymorphismen und ihre Effekte sind im Folgenden tabellarisch gezeigt. Sie können für den strukturellen und funktionellen Aufbau des Rezeptors relevant sein (Tab. 1.1) und/oder klinisch mit der Wahrscheinlichkeit für das Auftreten bestimmter Krankheiten oder deren Therapieeffizienz assoziiert sein (Tab. 1.2).

Tab. 1.1: Auswirkungen von Polymorphismen in den Genen der 5-HT₃-Untereinheiten auf die strukturellen und funktionellen Eigenschaften des 5-HT₃-Rezeptors.

Gen	Variante	Verändertes Ansprechen auf 5-HT	Veränderte Oberflächen-expression	Veränderte Signaleigenschaften	Sonstiges	Quelle
HTR3A	-42C>T	-	erhöht	-	-erhöhte Aktivität im Reporterassay -verminderte Aktivität in <i>Amygdala</i> , sowie im dorsalen und präfrontalen <i>Cortex</i>	-Krzywkowski et al., 2007 -Kapeller et al., 2008 -Thompson und Lummis, 2007
	A33T, M257I	ja	vermindert	-	-	Krzywkowski et al., 2007
	S253N	ja	-	-	-	
	R344H	nein	vermindert	Kanalöffnungs-dauer verlängert	-	
HTR3B	-100_-102del AAG	-	-	-	-erhöhte Promotoraktivität -Bindung eines Proteins	-Ji et al., 2008 -Meineke et al., 2008
	Y129S	erhöht	nein	Kanalöffnungs-dauer verlängert	-	Jensen et al., 2008
	I143T	-	vermindert	ja	-	Krzywkowski et al., 2008
	S156R	erhöht	kaum	ja	-	-Walstab et al., 2008 -Krzywkowski et al., 2008
	V183I	-	vermindert	-	-	Walstab et al., 2008
	A223T	erhöht	nein	-	-	
HTR3C	K163N	vermindert	-	-	-	Walstab et al., 2008
HTR3E	c.*76G >A	-	-	-	erhöhte Aktivität im Reporterassay	Kapeller et al., 2008

Tab. 1.2: Polymorphismen in den Genen der 5-HT₃-Untereinheiten, die mit dem Auftreten bestimmter Krankheiten assoziiert sind.

Gen	Variante	Phänotyp (Krankheit)	Bemerkungen	Quelle
HTR3A	IVS1-19G>A	Magersucht	erhöhtes Risiko	Hammer et al., 2009
	c.-42C>T	Magersucht	erhöhtes Risiko, aber nur in Teilgruppe der Studie nachweisbar	Hammer et al., 2009
		-manische Depression -„Harm avoidance“ bei Frauen -Ansprechen auf Paroxetin	-	Niesler et al., 2008
		Diarrhoe bei Reizdarmsyndrom bei Frauen	nur bei Studiengruppe aus Großbritannien nachweisbar	Kapeller et al., 2008
	R344H	-Schizophrenie -manische Depression	-	-Niesler et al., 2001 -Thompson und Lummis, 2007
	P391R	-Schizophrenie - manische Depression	-	-Niesler et al., 2001 -Thompson und Lummis, 2007
	c1377A>G	Postoperatives Erbrechen	erhöhtes Risiko	Rueffert et al., 2009
HTR3B	c6-137C>T	Postoperatives Erbrechen	niedrigeres Risiko	Rueffert et al., 2009
	-100_-102delAAG	Übelkeit und Erbrechen nach Chemotherapie	erhöhtes Risiko	Tremblay et al., 2003
		Übelkeit nach Paroxetingabe	erhöhtes Risiko	Tanaka et al., 2008
		Manische Depression	niedrigeres Risiko	Frank et al., 2004
	Y129S	behandlungsresistente Schizophrenie	erhöhtes Risiko	Ji et al., 2008
		-Depression bei Frauen -Übelkeit nach Paroxetingabe -manische Depression	erhöhtes Risiko	-Frank et al., 2004 -Walstab et al., 2008
	V183I	Übelkeit und Erbrechen nach Chemotherapie	Trend zu erhöhtem Risiko (n. s.)	-Tremblay et al., 2003 -Fasching et al., 2008
		-manische Depression -Schizophrenie	-	-Krzywkowski et al., 2008 -Walstab et al., 2008
rs3782025	Alkoholismus	-	Ducci et al., 2009	
HTR3C	K163N	Übelkeit und Erbrechen nach Chemotherapie	erhöhtes Risiko	Fasching et al., 2008
	A405G	-Übelkeit und Erbrechen nach Chemotherapie -Schwangerschaftsübelkeit	Trend zu erhöhtem Risiko (n. s.)	-Fasching et al., 2008 -Goecke et al., 2010
	rs6807670	Schwangerschaftsübelkeit	erhöhtes Risiko	Goecke et al., 2010
HTR3E	c.*76G>A	Diarrhoe bei Reizdarmsyndrom bei Frauen	-	Kapeller et al., 2008

Bei der Untersuchung von Assoziationen zwischen Varianten in den Genen der 5-HT₃-Rezeptoruntereinheiten und dem Auftreten von Chemotherapie-induzierter Übelkeit und Erbrechen, stellte sich der -100_-102delAAG-Polymorphismus bei den ersten Untersuchungen in *HTR3A* und *HTR3B* als einziger als signifikant heraus (Tremblay et al., 2003; Kaiser et al., 2004). Patienten, bei denen das -100_-102delAAG-Allel homozygot auftrat, litten signifikant häufiger an Chemotherapie-induzierter Übelkeit und Erbrechen. Zudem konnte *in vitro* gezeigt werden, dass die Deletionsvariante des -100_-102delAAG-Polymorphismus eine erhöhte Promotoraktivität aufweist und dass im Bereich des Polymorphismus ein, bis jetzt unbekannter, Transkriptionsfaktor an die DNA bindet (Meineke et al., 2008) (Abb. 1.3). Es zeigte sich weiterhin, dass die Proteinbindung polymorphismusabhängig ist, denn die Insertionsvariante weist eine reproduzierbar stärkere Proteinbindung auf, als die Deletionsvariante. Um welches Protein es sich handelt, bleibt aber noch herauszufinden.

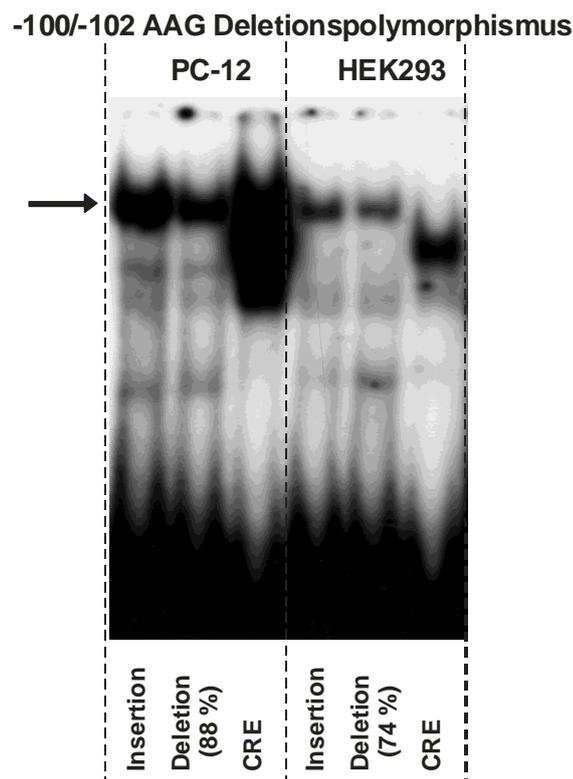


Abb. 1.3: Electrophoretic mobility shift assay (EMSA) mit radioaktiv-markierten Sonden für die Insertions- und Deletionsvariante des 100_-102delAAG-Polymorphismus mit PC-12- und HEK-293-Zellkernextrakten (aus Meineke, 2006). Für beide Zellkernextrakte konnte eine stärkere Bindung eines unbekanntes Proteins an die Insertionssonde detektiert werden. Eine Quantifizierung der Bandenstärken ergab jeweils eine Stärke der Deletionssonde im Vergleich zu Insertionssonde von 88% für PC-12 und 74% für HEK-293. Als Positivkontrolle liefen auf dem Gel radioaktiv-markierte Sonden für das cAMP-responsiv-Element (CRE) mit. Das sondenspezifische Signal der Insertions- und Deletionsvariante ist durch einen Pfeil gekennzeichnet.

Für den -100_-102delAAG–Polymorphismus wurden außerdem Assoziationen mit manischer Depression, Übelkeit nach Paroxetingabe und behandlungsresistenter Schizophrenie identifiziert (Frank et al., 2004; Ji et al., 2008; Tanaka et al., 2008).

Ein weiterer Polymorphismus im *HTR3B*-Gen, Y129S, zeigte einen Trend, aber keine Signifikanz zu einem erhöhten Risiko für Chemotherapie-induzierte Übelkeit und Erbrechen (Tremblay et al., 2003; Fasching et al., 2008). Im *HTR3C*-Gen wurden mittlerweile zwei Varianten, K163N und A405G (n. s.), mit einem erhöhten Risiko für Chemotherapie-induzierte Übelkeit und Erbrechen identifiziert (Fasching et al., 2008).

1.3 Das *HTR3B*-Gen und sein Promotor

Das *HTR3B*-Gen umfasst eine Gesamtgröße von mehr als 41 Kilobasenpaaren, die sich in 9 Exons und 8 Introns aufteilt (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/9177>).

Unsere Arbeitsgruppe konnte im Vorfeld zeigen, dass es für das menschliche *HTR3B*-Gen zwei verschiedene funktionelle Promotorbereiche, P1 und P2, gibt (Tzvetkov et al., 2007). Beide liegen im Genom ca. 4.000 bp voneinander entfernt und steuern die Expression von alternativen Transkripten, die sich in ihrem 5'-kodierenden Bereich unterscheiden (Abb. 1.4). Transkripte, die über den P1 reguliert werden, sind Darm- und Dünndarm-spezifisch. Transkripte, die über den stromabwärtsgelegenen P2 reguliert werden, sind dagegen ausschließlich in verschiedenen Hirnarealen lokalisiert.

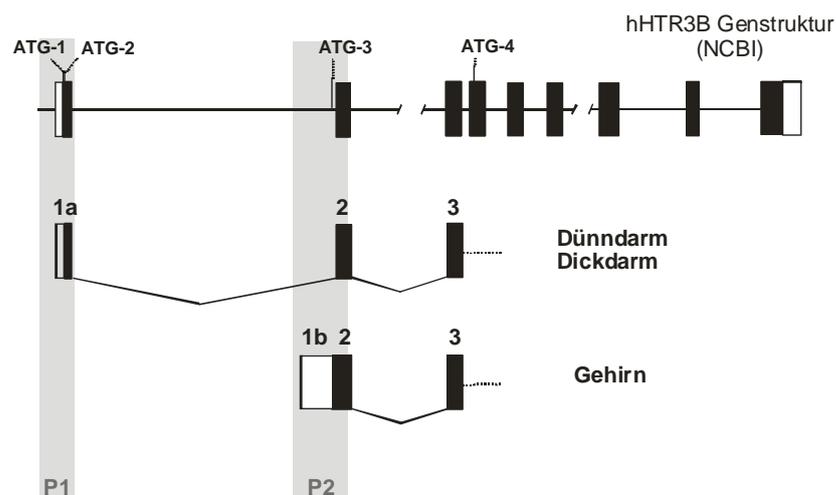


Abb. 1.4: Genstruktur und alternative Transkriptionsstartpunkte des *HTR3B*-Gens (nach Meineke, 2006). A Die Genstruktur des humanen *HTR3B*-Gens, wie sie in der NCBI-Datenbank angegeben ist. Schwarze Rechtecke stehen für die kodierenden Bereiche der Exons, weiße Kästen symbolisieren die 5'- und 3'-UTR-Regionen. Hellgrau unterlegt sind die zwei alternativen Transkriptionsstartbereiche Promotor 1 (P1) und Promotor 2 (P2). Mit ATG und einer durchlaufenden Nummer gekennzeichnet, sind die möglichen alternativen Translationsstartpunkte.

Für beide Promotorbereiche konnten in Luciferase-Reporterassays signifikante Promotoraktivitäten nachgewiesen werden (Bokelmann, 2007; Tzvetkov et al., 2007; Meineke et al., 2008). Bisher fehlen aber Erkenntnisse über die genauen Mechanismen der transkriptionellen Regulation des *HTR3B*-Gens.

Um diese Mechanismen aufzudecken, wurde dazu übergegangen den Promotorbereich des *Htr3b*-Gens der Ratte zu untersuchen. Der ausschlaggebende Grund hierfür war, dass es für *in vitro*-Versuche keine ideale menschliche Zelllinie gibt, mit der sich nahezu realistische Bedingungen im Hinblick auf neurale Eigenschaften und eigenständige Expression des *HTR3A*- und *HTR3B*-Gens nachbilden lassen. Die Ratten-Phäochromozytom-Zelllinie PC-12 hingegen, exprimiert nach einer Behandlung mit dem Nervenwachstumsfaktor NGF, die 5-HT_{3A}- und 5-HT_{3B}-Untereinheiten und bildet funktionelle 5-HT₃ Rezeptoren (Yoffe und Borchardt, 1982; Hanna et al., 2000). Des Weiteren ist der *HTR3B*-Promotorbereich in vielen Säugetierspezies evolutionär konserviert. Insbesondere die Region ab -450 bp vor dem ATG ist zwischen Mensch und Ratte zu 67% konserviert. Dies könnte auf eine ähnliche transkriptionelle Regulation hindeuten. Es gibt jedoch keine Hinweise auf die Existenz alternativer Promotoren für das *Htr3b*-Gen der Ratte.

Für den Bereich zwischen -2675 und -15 bp vor dem ATG des Ratten-*Htr3b*-Gens wurde bereits eine signifikante Promotoraktivität festgestellt (Abb. 1.5) (Bokelmann, 2007). Durch 5'-Deletionen des Promotorbereichs konnte gezeigt werden, dass der relevante Promotorbereich -445 bp vor dem ATG beginnt.

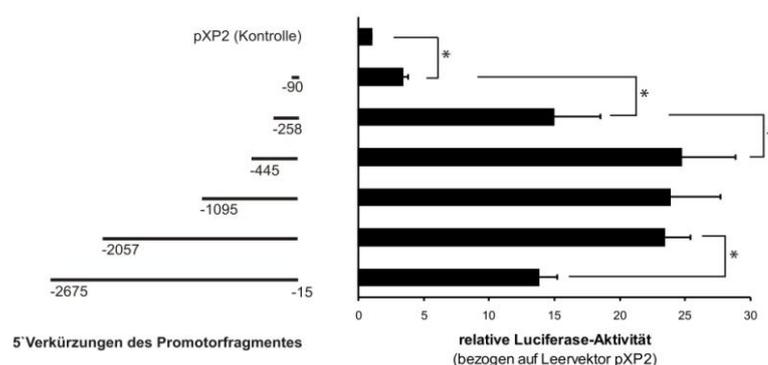


Abb. 1.5: Aktivitäten der 5'-verkürzten Fragmente des *Htr3b*-Promotors der Ratte (nach (Bokelmann, 2007)(verändert)). Dargestellt ist der Effekt diverser 5'-Verkürzungen des Ratten-*Htr3b*-Promotors (links im Bild) auf die relativen Luciferase-Aktivitäten im Reporterassay in differenzierten PC-12-Zellen (rechts im Bild). Die Länge der Promotorfragmente ist jeweils als Entfernung vom ATG-Kodon des *Htr3b*-Gens angegeben. Alle Fragmente enden bei -15 bp vom ATG. Gezeigt sind die Mittelwerte \pm SEM aus mindestens 3 unabhängigen Messungen, die in Duplikaten durchgeführt wurden. * Signifikante Unterschiede ($p < 0,05$; Mann-Whitney-U Test) zwischen den jeweiligen Konstrukten.

Mit Hilfe von bioinformatischen Analysen wurde nach Transkriptionsfaktorbindungsstellen gesucht, über die die Promotoraktivität vermittelt wird. Zwischen -185 und -178 bp wurde ein sogenanntes *E-box*-Strukturmotiv mit der Sequenz CANNTG identifiziert, zwischen -112 und -105 bp eine potentielle Bindungsstelle für den Transkriptionsfaktor II-I (TFII-I). Bei der gleichzeitigen Mutation von vier Basenpaaren zwischen -185 und -182 bp und 3 Basenpaaren zwischen -105 und -107 bp vor dem ATG zeigte sich im -2057 bp-Promotor eine signifikante Abnahme der Promotoraktivität um 50% (Bokelmann, 2007). Kenntnisse über die endgültige Identität der bindenden Proteine und weiterer regulatorischer Elemente, die für die Initiation der Transkription inkl. der Rekrutierung der DNA-abhängigen RNA-Polymerase II an den *Htr3b*-Promotor notwendig sind, stehen noch aus.

1.4 Grundlagen der Regulation der RNA-Polymerase II-abhängigen Transkription in Eukaryoten

Die Transkription der Protein-kodierenden Gene wird in Eukaryoten von der DNA-abhängigen RNA-Polymerase II durchgeführt. Die Rekrutierung der Polymerase an den Promotorbereich kann durch ganz unterschiedliche Faktoren bzw. Mechanismen erfolgen. Es gibt z. B. eine ganze Reihe an Sequenzelementen (*cis*-wirkende Elemente) in eukaryotischen Promotoren, die die Initiation und Regulation der Transkription durch Interaktionen mit DNA-bindenden Proteinen (*trans*-wirkende Elemente) steuern. Das „einfache“ TATA-Box-Modell, wobei die Transkription durch die Bindung des Präinitiationskomplexes (PIC) im Bereich des Sequenzelements TATAAA initiiert wird, kann nur die transkriptionelle Regulation in einer begrenzten Zahl der Promotoren der Vertebraten erklären. Der Prozess der transkriptionellen Regulation ist viel variabler und komplexer, als zuvor vermutet (Butler und Kadonaga, 2002; Juven-Gershon und Kadonaga, 2010).

Die Notwendigkeit eines PIC scheint dagegen allgemein gültig zu sein. Der PIC setzt sich am Promotor nach und nach aus 6 generellen Transkriptionsfaktoren (TFIIA, TFIIB, TFIID, TFIIIE, TFIIF, TFIIH) und der DNA-abhängigen RNA-Polymerase II zusammen (Butler und Kadonaga, 2002). Die erste Kontaktaufnahme zum Promotorbereich der DNA findet mit dem Transkriptionsfaktor IID (TFIID) statt, der

wiederum aus dem TATA-Box-Bindeprotein (TBP) und diversen TBP-assoziierten Faktoren (TAFs) aufgebaut ist. Nach diversen Auf- und Umbaureaktionen im PIC startet die Transkription, wobei sich die Polymerase von den generellen Transkriptionsfaktoren löst, an einem DNA-Einzelstrang entlangläuft und dabei mRNA synthetisiert.

Man unterscheidet fokussierte und unfokussierte „*dispersed*“ Promotoren (Juven-Gershon und Kadonaga, 2010).

- Bei fokussierten Promotoren wird die Transkription an einem bestimmten Punkt initiiert, es gibt also nur eine Transkriptionsstartseite (TSS). Fokussierte Promotoren enthalten meist eine TATA-Box und regulieren größtenteils die Transkription gewebespezifisch-regulierter Gene (Schug et al., 2005). In einfacheren Organismen sind sie die vorherrschende Form.
- Unfokussierte Promotoren haben dagegen diverse TSS (über einen Bereich von 50-100 bp), sind oft mit Cytosin-phosphatidyl-Guanin (CpG)-Inseln gekoppelt und steuern die Transkription von ubiquitär exprimierten Genen (Schug et al., 2005; Juven-Gershon und Kadonaga, 2010). Sie sind die vorherrschende Form in Vertebraten und regulieren die Transkription in ca. 2/3 der menschlichen Gene.
- Des Weiteren gibt es Zwischenformen, bei denen es z. B. eine starke und mehrere schwächere TSS gibt (Juven-Gershon und Kadonaga, 2010).

Der eukaryotische Promotor, insbesondere der fokussierte Promotor, bei dem die Bereiche wie im Folgenden beschrieben abgrenzbar sind, setzt sich in der Regel aus drei Teilbereichen zusammen: Kernpromotor, proximaler Promotor und distaler Promotor.

- Der Kernpromotor liegt in einem Bereich von -40 bis +40 bp um die TSS und ist definiert als die minimale DNA-Region, die *in vitro* ausreichend ist, um einen geringen Level Aktivator-unabhängiger (basaler) Transkription über die RNA-Polymerase II auszulösen (Kadonaga, 2002; Gross und Oelgeschlager, 2006). Er ist Bindungsstelle für den generellen Transkriptionsapparat.
- Der proximale Promotor erstreckt sich von ca. -40 bis -250 bp um die TSS und enthält Erkennungssequenzen (z. B. E-Box oder GC-Box) für diverse sequenzspezifische DNA-Bindeproteine (Kadonaga, 2002).

- Im distalen Promotor, der sich bis zu mehrere Kilobasenpaare stromaufwärts der TSS erstrecken kann, können sich Enhancer- und Silencer-Elemente befinden, die durch Bindung von DNA-Bindeproteinen aktiviert werden und z. B. durch spezielle Faltung und Schleifenbildung der DNA mit dem generellen Transkriptionsapparat in Verbindung treten und ihn regulieren können (Blackwood und Kadonaga, 1998).

Die Wirkung von Enhancer und Silencern auf den Promotor kann durch sogenannte Isolatoren verhindert werden (Blackwood und Kadonaga, 1998). Isolatoren, oder auch Begrenzungselemente genannt, sind transkriptional neutrale DNA-Bereiche mit einer Länge von 0,5 bis 3 kbp, die die Ausbreitung des Einflusses von aktivierenden DNA-Elementen (Enhancer) oder reprimierenden DNA-Elementen (Silencer) blockieren.

Außerdem können sich viele tausend Basenpaare stromaufwärts von der TSS Locus-Kontrollregionen (LCRs) befinden, die für die Transkriptionsinitiation gleich mehrerer Gene erforderlich sein können (Blackwood und Kadonaga, 1998). Im Falle von Genen, die über eine LCR reguliert werden, ist vor der eigentlichen Genaktivierung der Aufbau einer transkriptionellen Kompetenz erforderlich; die LCR selbst muss erst aktiviert („geöffnet“) werden. Dazu ist die Bindung sequenzspezifischer, transkriptioneller Aktivatoren an den zuvor inaktiven Locus notwendig. Erst im Anschluss werden die Gene durch spezifische Enhancer oder Silencer reguliert.

Der Kernpromotor kann diverse Kernpromotorelemente (*cis*-wirkende Elemente) enthalten (Abb. 1.6). Diese steuern einzeln oder in diversen Kombinationen die Transkriptionsinitiation. Universelle Kernpromotorelemente gibt es nicht (Juvengerhon und Kadonaga, 2010).

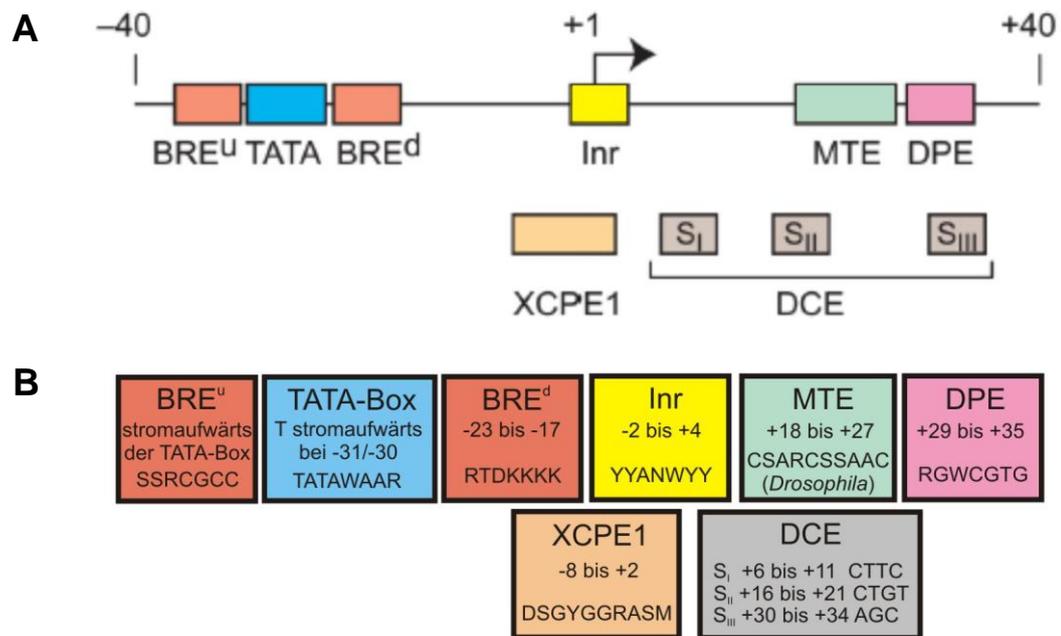


Abb. 1.6: Einige Kernpromotorelemente für die Initiation der Transkription durch die DNA-abhängige RNA-Polymerase II (nach Juven-Gershon und Kadonaga, 2010 (verändert)). **A** Schematische Darstellung des Kernpromotorbereichs. In diesem Bereich können sich diverse *cis*-wirkende Elemente, symbolisiert durch bunte Rechtecke, befinden. Die Transkriptionsstartseite (TSS) ist durch den Pfeil gekennzeichnet und die Zahlen entsprechen dem Abstand von der TSS. **B** zeigt die genauen Lokalisationen und Konsensussequenzen der *cis*-wirkenden Elemente.

- Die TATA-Box wurde 1979 als erstes Kernpromotorelement entdeckt (Goldberg, 1979). Entgegen früherer Vermutungen kommt sie aber nur zu ca. 15% in Promotoren von Säugetieren vor (Cooper et al., 2006; Juven-Gershon und Kadonaga, 2010). Die TATA-Box hat die Konsensussequenz TATAWAAR und ist bei -30 bis -25 bp von der TSS lokalisiert. Durch die Anlagerung der generellen Transkriptionsfaktoren kann vom TATA-Box-Element aus, ohne die Beteiligung anderer Sequenzelemente, die Transkription gestartet werden.
- Das Initiator Element (Inr) ist das wahrscheinlich am häufigsten vorkommende Kernpromotorelement (Juven-Gershon und Kadonaga, 2010). Inr hat die Konsensussequenz YYANWYY (Smale, 1997). Für Inr konnte eine Interaktion mit diversen Proteinen nachgewiesen werden: TFIID, TFII-I, YY1 und RNA-Polymerase II. Das Inr Element kann, wie die TATA-Box, aber im Gegensatz zu allen im Folgenden beschriebenen Elementen, als einzelnes Sequenzelement die Transkription initiieren. Inr kann auch mit der TATA-Box zusammenarbeiten und erhöht damit die Expressionsstärke des Promotors.

-
- Die TFIIB-recognition-Elemente (BREs) sind zwei verschiedene Elemente, die stromauf- und -abwärts die TATA-Box flankieren und durch die Bindung von TFIIB aktiviert werden (Deng und Roberts, 2005; Juven-Gershon et al., 2008). Das distale BRE (BRE_{up}) liegt von -38 bis -32 bp vor der TSS und hat die Konsensussequenz SSRCGCC. Funktionell ist es unabhängig von TBP und hilft bei der Orientierung des PIC. Das proximale BRE (BRE_{down}) ist von -23 bis -17 bp vor der TSS lokalisiert und besitzt die Konsensussequenz RTDKKKK. Es arbeitet in Abhängigkeit von TBP. Beide BREs können auch in Promotoren ohne TATA-Box vorkommen und können sowohl aktivierende als auch reprimierende Effekte vermitteln.
 - Das Downstream-Promotorelement (DPE) erstreckt sich von +29 bis +35 von der TSS und funktioniert, über gleichzeitige Interaktion mit TFIID, nur zusammen mit dem Inr-Element (Burke und Kadonaga, 1996; Butler und Kadonaga, 2002; Thomas und Chiang, 2006). DPE-enthaltene Promotoren haben meistens keine TATA-Box. Die DPE Konsensussequenz lautet RGWCGTG (Thomas und Chiang, 2006).
 - Das Motif ten Element (MTE) hat in *Drosophila* die Konsensussequenz CSARCSSAAC und liegt von +18 bis +27 bp von der TSS (Lim et al., 2004). In Säugetieren ist für MTE keine einheitliche Konsensussequenz bekannt. Es wird angenommen, dass die Konsensussequenz für MTE in Säugetieren variabler und weniger restriktiv ist, als in *Drosophila* (Juven-Gershon et al., 2008). MTE kooperiert mit Inr und kann mit TATA und/oder DPE zusammenarbeiten. Dabei kann es bei Mutationen in TATA oder DPE die Transkription aufrechterhalten. Die Kombination aus MTE, Inr, TATA und DPE wird als Super Core Promoter (SCP) bezeichnet. Er zeigt *in vitro* die stärkste bekannte Promotoraktivität und die stärkste Affinität zu TFIID.
 - Das Downstream Core Element (DCE) setzt sich aus 3 Teilen zusammen, die sich in einem Bereich zwischen +6 und +34 bp von der TSS befinden und unterschiedliche Konsensussequenzen aufweisen: $S_I = +6$ bis +11 bp = CTTC, $S_{II} = +16$ bis +21 bp = CTGG und $S_{III} = +30$ bis +34 bp = AGC (Lewis et al., 2000; Juven-Gershon et al., 2008). DCE ist ungleich des DPE und tritt oft mit der TATA-Box auf. DCE wird durch TAF1 kontaktiert.
-

-
- Das X Core Promoter Element 1 (XCPE1) kommt in 1% der menschlichen Kernpromotoren vor, die meisten davon besitzen keine TATA-Box (Tokusumi et al., 2007). XCPE1 ist im Bereich der TSS, von -8 bis +2 bp zu finden und hat die Konsensussequenz DSGYGGRASM. Es ist selbst nur wenig aktiv, kooperiert aber mit sequenzspezifischen Aktivatoren wie NRF1, NF-1 und Sp1. XCPE1 gehört vermutlich zu einer Familie von Sequenzelementen die, in Synergie mit Aktivatoren, die Transkription innerhalb von CpG-Inseln initiieren (Juven-Gershon et al., 2008).

Weitgehend ohne die genannten Kernpromotorelemente kommen unfokussierte Promotoren mit CpG-Inseln aus. CpG-Inseln sind 0,5-2 kbp lange Regionen im Genom, die einen erhöhten GC-Gehalt und eine erhöhte Dichte von CpG-Dinukleotiden aufweisen (Smale und Kadonaga, 2003). Die Cytosine innerhalb einer CpG-Insel liegen meist unmethyliert vor. Sie sind daher kaum von der, im Laufe der Evolution spontan durch Desaminierung, häufig vorkommenden Umwandlung von 5-Methylcytosin zu Thymin betroffen (Strachan und Read, 2005). Im Genom sind CpG Bereiche daher in der Regel unterrepräsentiert. CpG-Inseln bilden regulatorische Bereiche, über die die Genexpression ohne Veränderung der Gensequenz an- (unmethyliert) und abgeschaltet (methyliert) werden kann und spielen daher auch in der Epigenetik eine große Rolle. CpG-Inseln sind in den Promotoren vieler Gene nachgewiesen worden, in Säugetieren zu 40%, im Menschen sogar zu 70% (Fatemi et al., 2005; Weber et al., 2007). Die meisten dieser Gene werden ubiquitär exprimiert und ihre Promotoren weisen fast immer diverse TSS auf. Promotorbereiche mit CpG-Inseln besitzen meist keine TATA-Box und kein DPE (Smale und Kadonaga, 2003). Auffällig ist jedoch, dass sie in einem Bereich zwischen -80 und -40 bp von den diversen TSSs oft viele Bindungsstellen für den Transkriptionsfaktor Sp1 aufweisen (Smale und Kadonaga, 2003). In Kombination mit CpG-Inseln, wurden im Bereich zwischen +1 und +25 stromabwärts von der TSS, außerdem YY1-Bindungsstellen identifiziert (Schug et al., 2005). Es wird vermutet, dass Sp1 und YY1 die Rekrutierung und Positionierung des PIC beeinflussen (Smale und Kadonaga, 2003; Xi et al., 2007).

1.5 Aufgabenstellung

Die zentrale Aufgabenstellung dieser Doktorarbeit ist es, grundlegende Mechanismen der transkriptionellen Regulation im *HTR3B*-Gen, welches für die 5-HT_{3B}-Untereinheit des Serotonin-Typ 3-Rezeptors kodiert, aufzudecken.

Aus Mangel an einer geeigneten menschlichen *HTR3B*-exprimierenden Neuralzelllinie, wird dazu hauptsächlich mit der PC-12-Zelllinie aus der Ratte gearbeitet. Um für das Expressionssystem möglichst realistische Bedingungen zu gewährleisten, wird der *Htr3b*-Promotorbereich der Ratte charakterisiert. Mit Hilfe von RACE-Techniken wird/werden als erstes die TSS des Ratten-*Htr3b*-Promotors klar definiert. Dann wird die Promotorregion auf CpG-Inseln untersucht. Dem schließt sich eine genauere Eingrenzung und Charakterisierung des Promotorbereichs an. Der Promotorbereich wird dazu als erstes mittels bioinformatischer Analyse in Kombination mit dem DNase I Hypersensitivity Assay grob eingegrenzt. Durch anschließende Reporterassays mit 5'-Deletionen der Promotorregion und ortsspezifischer Mutagenese werden *cis*-wirkende Elemente identifiziert. Mit Hilfe von Electrophoretic Mobility Shift Assays (EMSAs) werden die daran bindenden *trans*-wirkenden Elemente (Transkriptionsfaktoren) identifiziert. Durch eine Analyse der evolutionären Konservierung wird dann versucht die Erkenntnisse aus der Charakterisierung des Ratten-*Htr3b*-Promotors auf den menschlichen *HTR3B*-Promotor zu übertragen und damit generelle Regulationsmechanismen aufzuklären.

Ein zweiter Fokus dieser Arbeit liegt auf dem Versuch das Protein, das im Bereich des -100_-102delAAG-Polymorphismus an den menschlichen *HTR3B*-P1-Promotor bindet, zu identifizieren.

2 Material und Methoden

2.1 Material

2.1.1 Reagenzien, Kits, Medien und Enzyme

Reagenzien, Kits, Medien und Enzyme	Lieferant/Hersteller
[α - ³² P]-dCTP	Hartmann Analytic, Braunschweig
1 kb Längenstandard für Agarosegel	Rapidozym, Berlin
100 bp Längenstandard für Agarosegel	Rapidozym, Berlin
2-Mercaptoethanol \geq 99%	Sigma-Aldrich, Deisenhofen
5-Aza-2'-deoxycytidine	Sigma-Aldrich, Deisenhofen
40% (w/v) Acrylamid/ Mix 37,5:1	Biomol, Hamburg
Agar (für die Bakteriologie)	AppliChem, Darmstadt
Agarose Ultra Pure	Invitrogen, Karlsruhe
Ammoniumperoxiddisulfat \geq 98%	Sigma-Aldrich, Deisenhofen
Ammoniumsulfat \geq 99,5%	Sigma-Aldrich, Deisenhofen
Ampicillin min. 99%	AppliChem, Darmstadt
Bicinchoninic Acid Solution	Sigma-Aldrich, Deisenhofen
BigDye® Sequencing Kit	Applied Biosystems, Darmstadt
Borsäure 100%	Merck, Darmstadt
Bromphenolblau Na-Salz (für die Elektrophorese)	Roth, Karlsruhe
Chloroform \geq 99,8%	J.T. Baker, Phillipsburg, USA
Collagen A	Biochrom, Berlin
Dexamethason Pulver \geq 98%	Sigma-Aldrich, Deisenhofen
Dimethylsulfoxid (DMSO)	AppliChem, Darmstadt
di-Natriumhydrogenphosphat \geq 99,9%	Merck, Darmstadt
Dithiothreitol \geq 99,5% (für die Molekularbiologie)	AppliChem, Darmstadt
DnaseI-Lösung	usb, Staufen
Dneasy Blood & Tissue Kit	Qiagen, Hilden
dNTP Set	ABgene, Hamburg
Dual-Luciferase® Reporter Assay System	Promega, Mannheim
Dulbecco's Modified Eagle Medium	Gibco/Invitrogen, Karlsruhe
Dynabeads M-280 Streptavidin	Invitrogen, Karlsruhe
EDTA 0,5M in wässriger Lösung	Sigma-Aldrich, Deisenhofen
Egr-1 (588) X antibody	Santa cruz Biotechnology, Heidelberg
Entwickler G150	AGFA, Leverkusen
EpiTect Bisulfite Kit	Qiagen, Hilden
Ethanol 96%	Merck, Darmstadt
Ethanol vergällt 99% (Desinfektionsmittel)	Chemie-Vertrieb Hannover
Essigsäure 100%, pro analysis	Merck, Darmstadt
Ethidiumbromid 1% in H ₂ O (für die Elektrophorese)	Merck, Darmstadt

Exonuclease I E.coli (20u/µl)	Fermentas, St. Leon-Roth
Expand Long Template PCR System	Roche Diagnostics, Mannheim
EZ1 DNA Blood Kit	Qiagen, Hilden
Ficoll-Biocoll Separation Solution	Biochrom, Berlin
Fixierer G354	AGFA, Leverkusen
Fötales Kälberserum	Gibco/Invitrogen, Karlsruhe
FuGene 6	Roche, Mannheim
Glucocorticoid Rezeptor Antikörper BuGR2	Abcam, Cambridge
Glycerin 85 %	Zentralapotheke, Klinikum Göttingen
Gene Scan 400 HD [ROX] Size Standard	Applied Biosystems, Darmstadt
GeneScanLIZ120 Längenstandard für <i>SNaPshot</i> TM	Applied Biosystems, Darmstadt
Genomics Millipore Kit	Millipore, Bedford, USA
Hefeextrakt	AppliChem, Darmstadt
Helipur® H plus N Desinfektionsmittel	Braun, Melsungen
HEPES 99,5%	AppliChem, Darmstadt
HotStarTaq Master Mix Kit (250 units)	Qiagen, Hilden
Hygromycin B (50mg/ml)	Invitrogen, Karlsruhe
Isoamylalkohol 98%	Schuchardt, Hohenbrunn
Isopropanol ≥ 99,9%	Merck, Darmstadt
Kaliumchlorid ≥ 99,5%	Riedel-De Haën AG, Seelze
Kaliumdihydrogenphosphat 100%	Merck, Darmstadt
Kanamycin ≥ 750U/mg	AppliChem, Darmstadt
Klenow-Fragment	Fermentas, St. Leon-Roth
KOD HotStart DNA Polymerase	Novagen Merck, Darmstadt
Kupfersulfat-Pentahydrat	Sigma-Aldrich, Deisenhofen
Ligate-IT TM Rapid Ligation Kit	usb, Staufen
Lipofectamine TM 2000	Invitrogen, Karlsruhe
Szintillationsflüssigkeit Quicksafe A	ZinserAnalytic, Berkshire
Magermilchpulver	Real, Göttingen
Magnesiumchlorid ≥ 99%	Riedel-De Haën AG, Seelze
Magnesiumsulfat ≥ 99,5%	Merck, Darmstadt
mini Quick Spin Oligo Columns	Roche, Mannheim
Multiplex PCR Kit	Qiagen, Hilden
Natriumchlorid	Merck, Darmstadt
Natriumhydroxid Plätzchen reinst.	Merck, Darmstadt
Neodisher® A 8, Reinigungspulver	Chem. Fabrik Dr. Weigert, Mühlenhagen
Nerven-Wachstumsfaktor-7S	Sigma-Aldrich, Deisenhofen
Nonidet®P40 Substitute (Nonylphenylethylenglycol)	Sigma-Aldrich, Deisenhofen
Normal rabbit igG (sc-2027)	Santa cruz Biotechnology, Heidelberg
Oct-1 Antikörper	Abcam, Cambridge
P11 bifunktionelle Kationenaustauscherzellulose	VWR, Hannover
PBS Pulver (Dulbeccos 10-fach)	AppliChem, Darmstadt
Penicillin/Streptomycin-Lösung	Invitrogen, Karlsruhe
Pferde-Serum	Gibco/Invitrogen, Karlsruhe

Phenylmethansulfonyl fluoride (PMSF)	Sigma-Aldrich, Deisenhofen
Plasmid Midi Kit	Qiagen, Hilden
Poly(deoxyinosinic-deoxycytidylic)	Sigma-Aldrich, Deisenhofen
Polylysin-D-hydrobromid	Sigma-Aldrich, Deisenhofen
Polymer POP6 und POP7 für Sequenzer	Applied Biosystems, Darmstadt
Protease Inhibitor Cocktail Tabletten (Complete Mini EDTA free)	Roche, Mannheim
PureYield™ Midiprep Kit	Promega, Mannheim
QIAquick Gel Extraction Kit	Qiagen, Hilden
QIAquick PCR Purification Kit	Qiagen, Hilden
qPCR® Core Kit (RT-QP73-05)	Eurogentec, Köln
qPCR® Core Kit for SYBR® Green (RT-SN10-15)	Eurogentec, Köln
Random Hexanukleotid Primer <i>dN6</i>	Roche, Mannheim
Rinderserumalbumin (BSA)	Sigma-Aldrich, Deisenhofen
RNase Inhib P/N 71571 (40un/μl)	usb, Staufen
RNase A ~70%	AppliChem, Darmstadt
RNase Zap	Sigma-Aldrich, Deisenhofen
RNeasy Mini Kit	Qiagen, Hilden
RNeasy Plus Mini Kit	Qiagen, Hilden
Roti-Aqua® Phenol/Chloroform/Isoamylalkohol pH = 4,5-5	Roth, Karlsruhe
Roti-Aqua® Phenol/Chloroform/Isoamylalkohol pH = 7-8	Roth, Karlsruhe
Sephadex™ G-50 Superfine	Amersham Bioscience, Freiburg
Shrimp Alkaline Phosphatase (1u/μl)	usb, Staufen
SilverQuest Silver Staining Kit	Invitrogen, Karlsruhe
SnapShot™ Multiplex Kit	Applied Biosystems, Darmstadt
<i>Sodium Dodecyl Sulfate</i>	BioRad, Hercules, USA
Supersignal West Pico (Kit/100ml)	Thermo Scientific
Super Script II Reverse Transcriptase	Invitrogen, Karlsruhe
T4 DNA Ligase	MBI Fermentas, St. Leon-Roth
Taq DNA Polymerase	Qiagen, Hilden
TEMED ≥ 99%	Sigma-Aldrich, Deisenhofen
TOPO® XL PCR Cloning Kit	Invitrogen, Karlsruhe
TNT T7 Quick Coupled Transcription/Translation System	Promega, Mannheim
Trichostatin A	Sigma-Aldrich, Deisenhofen
Tris 100%	Roth, Karlsruhe
Trypanblau-Lösung (0,4 %)	Sigma-Aldrich, Deisenhofen
Trypton	AppliChem, Darmstadt
Tween 20 (Polyoxyethylen-Sorbit-Monolaurat)	BioRad, München
USF-1 (C20):sc-229X	Santa cruz Biotechnology, Heidelberg
USF-2 (N18):sc-861X	Santa cruz Biotechnology, Heidelberg

Venor® GeM-Kit	Minerva Biolabs, Berlin
Xylencyanol FF (für Molekularbiologie)	AppliChem, Darmstadt
Zeocin	Invitrogen, Karlsruhe

2.1.2 Verbrauchsmaterialien

Verbrauchsmaterialien	Lieferant/Hersteller
50 ml Zentrifugenröhrchen	Beckman, München
96 Millipore MAHV N45 Platte	Millipore, Bedford, USA
96 Platten weiß für Lumineszenzmessungen	Greiner, Frickenhausen
96 Millipore MANU 030 PCR-Platte	Millipore, Bedford, USA
96er PCR-Platten	ABgene, Epsom
Adhesive PCR Foil Seals	ABgene, Epsom
Amersham Hyperfilm MP (18 × 24 cm) (Röntgenfilm für EMSA)	GE Healthcare
Dialysefilter VSWP01300	Millipore, Bedford, USA
Elektroporationsküvetten 2 mm	PeqLab, Erlangen
Filterpapier Nr. 2668	Schleicher und Schuell
Filterpapier Nr. 2CHR	Schleicher und Schuell
Flat cap strips, 8er	ABgene, Epsom
Flat cap strips, 12er	ABgene, Epsom
FPLC-Säule Tricorn 5/50 column	GE Healthcare
FrameStar 384	4titude, Wotton
Glas Pasteur Pipetten 230 mm	WU, Mainz
Kulturflaschen 25 cm ² und 75 cm ²	Sarstedt, Nümbrecht
Küvetten (UVetten) 50-1000 µl	Eppendorf, Hamburg
Küvetten 10x4x45 mm	Sarstedt, Hamburg
Lochplatte für Sephadex	Millipore, Schwabach
Minisart 2000 0,2 µm	Sartorius, Göttingen
Minisart-plus 0,2 µm	Sartorius, Göttingen
Nunclon™ Multischalen 6 und 12 Well	Nunc, Wiesbaden
Absolute QPCR Seal (Optische Folie für Taqman) Parafilm®	Thermo Scientific Brand, Wertheim
Petrischalen	Sarstedt, Hamburg
Petrischalen für Zellkultur, Falcon 353003	Schütt, Göttingen
Petrischalen für Zellkultur, Falcon 353025	Schütt, Göttingen
Pipettenspitzen (10 µl, 100 µl, 1000 µl)	Sarstedt, Hamburg
Quali-Filterpipettenspitzen steril	Kisker, Steinfurt
Rahmen und Septen für Sequenzierung	Applied Biosystems, Darmstadt
Reaktionsgefäße 0,2 ml (RNase-frei)	Biozym, Hessisch Oldendorf
Reaktionsgefäße 1,5 ml und 2 ml	Sarstedt, Hamburg
Sterile Pipetten (5 ml, 10 ml, 25 ml)	Sarstedt, Hamburg
Sterile Polypropylen-Röhrchen 15 ml	Greiner, Frickenhausen

Sterile Polypropylen-Röhrchen 50 ml	Sarstedt, Hamburg
Thermo-Fast 384er Platten (PCR-Platten für Taqman)	ABgene Epsom
Thermo-Fast 96er Platten	ABgene, Epsom

2.1.3 Geräte

Geräte	Hersteller
3130xl Genetic Analyser	Applied Biosystems, Darmstadt
Bakterieninkubator-Incudrive	Schütt, Göttingen
Biofuge fresco	Heraeus, Hanau
Biofuge pico	Heraeus, Hanau
BioPhotometer	Eppendorf, Hamburg
BioRobot® EZ1	Qiagen, Hilden
Blot-Aparatur	Biometra, Göttingen
Centrifuge 5810 R	Eppendorf, Hamburg
CO2-Inkubator BBD 6220	Heraeus, Hanau
ComPhor Mtl Maxi Gel-Kammer	Biozym, Hessisch Oldendorf
ComPhor L Mini Gel-Kammer	Biozym, Hessisch Oldendorf
Concentrator 5301	Eppendorf; Hamburg
DRYgelSR SE1160	Hoefler, San Francisco, USA
Elektroporator Gene Pulser II	BioRad, Hercules USA
Feinwaage	Sartorius, Göttingen
Fluor-STM MultiImager	BioRad, Hercules, USA
Gelkammer Ruby SE600	Hoefler, San Francisco, USA
GloMax	Turner BioSystems, Sunnyvale, USA
Laborfuge 400R	Heraeus, Hanau
Magnetrührer	IKAMAG
Mastercycler gradient	Eppendorf, Hamburg
Membran-Vakuumpumpe	Vacuubrand, Wertheim
Microskop Axiovert 40 CFL	Zeiss, Jena
MS 2 Minishaker-Vortexer	IKA, Staufen
Nanotropfküvette	Implen, München
Neubauer-Zählkammer	Schütt, Göttingen
PTC-200 Peltier Thermal Gradient Cycler	MJ Research/BioRad, Hercules, USA
QiaCube	Qiagen, Hilden
Transilluminator TI 2	Biometra
Schüttler für Bakterien K2 260 basic	IKA, Staufen
Sterilbank-Clean Air type DFL/REC4 KL2A	Mahl, Trendelburg
Stereomikroskop Stemi 1000	Zeiss, Jena
Szintillationsmessgerät LS1801	Beckman, München
TaqMan 7900HT	Applied Biosystems, Darmstadt
Thermomixer 5436	Eppendorf, Hamburg

Vertikal-Autoklav KSG 40/60	KSG, Olching
Vertikal-Autoklav: FV für Sterilgut	Tecnorama, Fernwald
Wasserbad GFL 1083	Schütt, Göttingen
Zentrifuge Isotopenlabor: Biofuge 15 R	Heraeus, Hanau
Zentrifuge JA-20 Rotor	Beckman, München

2.1.4 Software, Datenbanken und Sequenzen

Software, Datenbanken und Sequenzen	Hersteller
3100 Data Collection Software	Applied Biosystems
Adobe Photoshop	Adobe Systems GmbH, München
Advanced Image Data Analyzer (AIDA) V.4.15 025	Raytest Isotopenmeßgeräte GmbH, Sprockhövel
BASReader (FujiFilm BAS1800-II)	Raytest Isotopenmeßgeräte GmbH, Sprockhövel
Clone Manager Suite	SECentral
CorelDRAW X3	Corel Corporation
DNA Sequencing Analysis	Applied Biosystems
Endnote 9	Wintertree Software Inc.
GeneMapper, Version 3.7	Applied Biosystems
Methyl Primer Express Software v1.0	Applied Biosystems
MS Office	Microsoft, USA
National Center for Biotechnology Information	NCBI, Bethesda, USA
Oligo	Molecular Biology Insights
Quantity One S	Bio-Rad, München
SDS 2.1	Applied Biosystems
SPSS	SPSS Inc., Chicago, USA
Staden Package	SourceForge.net
TRANSFAC-Datenbank	BIOBASE, Göttingen
XFluor4 Software	Tecan, Crailsheim

2.1.5 Biologisches Material

2.1.5.1 Restriktionsenzyme

Restriktionsenzym	Hersteller
<i>AflIII</i>	New England Biolabs, Beverly, USA
<i>BamHI</i>	Fermentas, St. Leon-Roth
<i>BanII</i>	New England Biolabs, Beverly, USA
<i>BclI</i>	New England Biolabs, Beverly, USA
<i>BglI</i>	Fermentas, St. Leon-Roth
<i>BstUI</i>	New England Biolabs, Beverly, USA

<i>Cla</i> I	New England Biolabs, Beverly, USA
<i>Dpn</i> I	New England Biolabs, Beverly, USA
<i>Eco</i> RI	Fermentas, St. Leon-Roth
<i>Eco</i> RV	Fermentas, St. Leon-Roth
<i>Hind</i> III	Fermentas, St. Leon-Roth
<i>Pac</i> I	New England Biolabs, Beverly, USA
<i>Pst</i> I	Fermentas, St. Leon-Roth
<i>Pvu</i> II	Fermentas, St. Leon-Roth
<i>Sac</i> I	Fermentas, St. Leon-Roth
<i>Sal</i> I	Fermentas, St. Leon-Roth
<i>Sty</i> I	New England Biolabs, Beverly, USA
<i>Xho</i> I	Fermentas, St. Leon-Roth
<i>Xma</i> I	New England Biolabs, Beverly, USA

2.1.5.2 Vektoren

Klon-Nr.	Vektoren	Verwendung	Restistenz	Bezug
IRATp970D09107D	pCMV-SPORT6::EGR-1	Ausgangskonstrukt (komplette cDNA EGR1)	Ampicillin	Imagenes, Berlin
IRAUp969G09103D	pOTB7::POU2F1	Ausgangskonstrukt (komplette cDNA POU2F1)	Chloramphenicol	Imagenes, Berlin
IRAU969B0272D	pOTB7::NR3C1	Ausgangskonstrukt (komplette cDNA NR3C1)	Chloramphenicol	Imagenes, Berlin
IRBPp993D0730D	pExpress-1::Usf1	Ausgangskonstrukt (komplette cDNA Usf1 der Ratte)	Ampicillin	Imagenes, Berlin
	p566	Leervektor	Ampicillin	Dr. N. Chen (University of Texas MD Anderson Cancer center)
	p566-AUSF	Dominant negative Varinate von USF	Ampicillin	Dr. N. Chen (University of Texas MD Anderson Cancer center)
	pcDNA5:FRT	Expressionsvektor	Ampicillin	Invitrogen, Karlsruhe
	pCR [®] -XL-TOPO	Zwischenklonierung	Kanamycin	Invitrogen, Karlsruhe
	pT81	Expressionsvektor	Ampicillin	Molekulare Pharmakologie Prof. W. Knepel
	pXP2	Luciferasereporter-Plasmid ohne eigenen Promotor	Ampicillin	Molekulare Pharmakologie Prof. W. Knepel

2.1.5.3 Bakterienstämme

Stamm		Verwendung für Transfektion	Bezug
Top10 (One shot TOP10 Electrocomp. E.coli)	Escherichia coli	Elektro-kompetent	Invitrogen, Karlsruhe
<i>E.coli</i> DH10B	Escherichia coli	-	Imagenes, Berlin

2.1.5.4 Zelllinien

Zelllinie	Herkunft	Charakteristika	Bezug von:
Flp-In TM TREx 293	Human	Embryonale Nierenzelllinie (hat Flp Recombination Target (FRT)-Stellen stabil im Genom integriert)	Invitrogen, Karlsruhe
HEK-293	Human	Embryonale Nierenzelllinie (immortalisiert mit <i>human adenovirus</i> <i>type 5</i> DNA)	DMSZ Braunschweig
PC-12	Ratte	Adrenale Phäochromozytom-Zelllinie	DMSZ, Braunschweig

2.2 Methoden

2.2.1 Sterilarbeit und Umgang mit S1- und toxischem Material

Zur Verhinderung von Kontaminationen durch Mikroorganismen oder linienfremde Zellen, wurden Bakterien und Säugetierzellen unter sterilen Bedingungen bearbeitet. Für die Pipettierungsschritte wurden dabei von den Herstellern sterilisierte Einweg-Plastikverbrauchsmaterialien benutzt. Lösungen, Glasgeräte sowie Mehrweg-Plastikverbrauchsmaterialien wurden im Autoklav (Vertikal-Autoklav FV, Tecnorama) unter Druck für 20 Minuten bei 120°C sterilisiert. Hitzeempfindliche Lösungen (z. B. Ampicillin) wurden durch Filter der Porengröße 0,2 µm steril filtriert.

Genetisch verändertes, biologisches Material der Sicherheitsstufe S1 wurde vor der Entsorgung mit folgenden Methoden behandelt, um eine Unschädlichkeit für die Umwelt zu gewährleisten. Flüssige Abfälle von eukaryotischen Zellen wurden mit Helipur® plus H-Lösung, jene von Bakterien mit Neodisher® chemisch inaktiviert. Feste Abfälle wurden im KSG-Autoklav bei 120°C unter Druck für mindestens 20 Minuten autoklaviert.

Abfälle, die mit toxischen Substanzen wie z. B. Ethidiumbromid, 2-Mercaptoethanol und Phenol/Chloroform behaftet waren, wurden separat in gekennzeichneten Gefahrstoffbehältern gesammelt und entsorgt.

2.2.2. DNA-Standardmethoden

2.2.2.1 Polymerasekettenreaktion (PCR)

Die Polymerasekettenreaktionen wurden mit der *KOD Hot Start DNA Polymerase* (Novagen Merck, Darmstadt) durchgeführt. Sie besitzt eine Korrekturlesefunktion und arbeitet daher weniger fehlerhaft als z. B. die *Taq*-Polymerase.

Um die optimale Temperatur für die Anlagerung der Primer an die DNA herauszufinden, wurde mit jedem neuen Primer-Paar zuerst eine so genannte Gradienten-PCR durchgeführt. Dafür wurden fünf identische 20 µl PCR-Ansätze mit verschiedenen Primer-Anlagerungstemperaturen (50-70°C) im Gradient-Cycler amplifiziert. Die Identifizierung der optimalen Primer-Anlagerungstemperatur fand durch Analyse der PCR-Produkte auf einem Agarosegel [2.2.2.3] statt. Optional wurde

den PCR-Ansätzen *Q-Solution* (im Qiagen *Taq-Polymerase-Kit* enthalten; Qiagen, Hilden) zugesetzt.

Standard-PCR-Ansatz:

10 x Puffer	10 µl
dNTPs (2 mM)	10 µl
MgSO ₄ (25 mM)	4 µl
<i>Q-Solution</i> (optional)	20 µl
Vorwärts-Primer (100 µM)	1 µl
Rückwärts-Primer (100 µM)	1 µl
DNA (300 µg/ml)	2 µl
<i>KOD HotStart Polymerase</i> (1.0 U/µl)	2 µl
ddH ₂ O	ad 100 µl

Standard-PCR-Bedingungen:

Phase	Dauer	Temperatur	
Denaturierung	5 min	94°C	
Denaturierung	15 sec	94°C	} 35 x
Primeranlagerung	30 sec	50-70°C	
Elongation	30 sec – 2:30 min	72°C	
Finale Elongation	8 min	72°C	
Kühlung	for ever	8°C	

2.2.2.2 Kolonie-PCR

Mit der Kolonie-PCR ist eine Unterscheidung von positiven und negativen Bakterienklonen ohne vorherige Plasmidisolation möglich. Diese Methode eignet sich vor allem dann, wenn man eine große Anzahl an Bakterienklonen hat, von denen aber vermutlich nur ein geringer Teil das gewünschte Insert besitzt.

Die Kolonie-PCRs wurden mit der *Taq-Polymerase* (Qiagen) durchgeführt. Zur Amplifizierung wurden dieselben Primer verwendet, mit denen auch das Insert synthetisiert worden war.

Pro Probe wurden je 20 µl Mastermix in ein Well einer 96-Well PCR-Platte pipettiert. In jedes Well wurde ein Klon von der Agarplatte [2.2.6.2] übertragen. Dafür wurde die Kolonie mit einer sterilen Pipettenspitze von der Agarplatte gepickt und im Mastermix durch auf- und abpipettieren resuspendiert. Die verwendeten Klone wurden zur weiteren Kultivierung entweder zusätzlich auf einer Masterplatte ausgestrichen oder auf der ursprünglichen Platte noch einmal inkubiert, um damit später Kulturen für eine Plasmid-Isolierung [2.2.7] anzusetzen. Außerdem war eine Positivkontrolle, entweder ein frischer, positiver Bakterienklon oder eine bereits isolierte Plasmid-DNA, in der PCR-Reaktion mitzuführen.

Den Standard-PCR-Bedingungen wurde ein 10-minütiger Schritt bei 95°C vorangestellt um die bakteriellen Zellen zu lysieren.

Kolonie-PCR:

dNTPs (10mM]	0,4 µl
Vorwärts-Primer (100µM)	0,2 µl
Rückwärts-Primer (100 µM)	0,2 µl
10 x Puffer	2 µl
ddH ₂ O	17 µl
Taq-Polymerase (5U/µl))	0,2 µl
Frisch gepickter Bakterienklon	Pipettenspitze

Kolonie-PCR-Bedingungen:

Phase	Dauer	Temperatur	
Aufschluss der Bakterienhülle	10 min	95°C	
Denaturierung	30 sec	96°C	} 35 x
Primeranlagerung	30 sec	50°C	
Elongation	1 min/kbp	72°C	
Finale Elongation	5 min	72°C	
Kühlung	for ever	8°C	

2.2.2.3 Agarose-Gelelektrophorese

TBE-Puffer (pH 8,3):

Tris	0,1 M
Borsäure	0,1 M
EDTA	3,0 mM

5 x Probenpuffer:

Glycerol	30% (v/v)
EDTA	50 mM
Bromphenolblau	0,25%(v/v)
Xylencyanol	0,25%(v/v)

Die Agarosegelelektrophorese dient der Auftrennung von DNA-Fragmenten nach ihrer Größe. Die Agarosegele wurden je nach Größe der zu erwartenden DNA in unterschiedlichen Konzentrationen (0,8–3%) angesetzt. Dafür wurde die entsprechende Masse Agarose (Agarose Ultra Pure; Invitrogen), unter Aufkochen in der Mikrowelle, im entsprechenden Volumen TBE-Puffer gelöst. Nach kurzem Abkühlen wurden 0,5 µg/ml Ethidiumbromid (Merck, Darmstadt) hinzugefügt und mit dem Magnetrührer gleichmäßig in der Lösung verteilt. Im Anschluss wurde das Gel in eine Gelkammer mit Kämmen, welche die Taschen zum Probenauftrag formen, gegossen. Das Gel war nach ca. 30 Minuten ausgehärtet und konnte mit den Proben beladen werden. Die Proben wurden zuvor mit der entsprechenden Menge 5 x Probenpuffer versetzt. Zur Identifikation der Banden auf dem Gel wurde ein Längenstandard (100 bp oder 1 kbp Längenstandard, Rapidozym) mit aufgetragen.

Die Elektrophorese fand in ComPhor L Mini- bzw. ComPhor Mtl Maxi-Gelkammern (Biozym) bei 120 V statt. Die Elektrophorese wurde gestoppt wenn die Bromphenolbande $\frac{2}{3}$ des maximalen Laufwegs erreicht hatte. Zur Auswertung der Gele wurden der *Fluor-S™ MultiImager* (BioRad, Hercules, USA) und die Software *Quantity One® S Version 4.3.1* (Bio-rad) benutzt.

2.2.2.4 Photometrische Quantifizierung von DNA und RNA

Die Quantifizierung von DNA- und RNA-Konzentrationen erfolgte photometrisch bei einem Absorptionsmaximum von 260 nm. Dazu wurden je 3 µl der Nukleinsäure-Lösung auf die Implen-Nanotropfküvette (Implen) aufgetragen und im BioPhotometer (Eppendorf) gemessen.

Eine Extinktion bei 260 nm (E_{260}) von 1 entspricht 50 µg DNA/ml bzw. 40 µg RNA/ml. Mit dem Quotienten E_{260}/E_{280} kann auf die Reinheit der Präparation geschlossen werden. Ein Wert von ca. 2 indiziert eine hohe Reinheit der Probe.

2.2.2.5 Isolierung von genomischer DNA

Genomische DNA aus eukaryotischen Zellen oder Bakterienzellen wurde mit Hilfe des *DNeasy Blood & Tissue Kits* (Qiagen) und des *QiaCubes* (Qiagen) isoliert. Entsprechend des Hersteller-Protokolls wurden pro Isolation etwa 5×10^6 Zellen benutzt. Diese wurden entweder ausgezählt und aus dem Medium abzentrifugiert oder aus 12- bzw. 6-Well-Platten geerntet. Der DNA-Gehalt der Proben wurde anschließend photometrisch [2.2.2.4] bestimmt.

2.2.2.6 Aufreinigung von DNA

2.2.2.6.1 aus Agarosegelen

Die Aufreinigung von DNA aus Agarosegelen wurde mit dem *QIAquick Gel Extraction Kit* (Qiagen) im *QiaCube* (Qiagen) nach Herstellerprotokoll durchgeführt.

2.2.2.6.2 aus Lösungen

Um DNA aus Lösungen (z. B. PCR- oder Restriktionsansätzen) aufzureinigen, wurde das *QIAquick PCR-Purification Kit* (Qiagen), gemäß dem Hersteller-Protokoll angewandt.

2.2.2.7 Ankonzentrieren von DNA-Lösungen mittels Vakuum-zentrifugation

Um DNA in einer Lösung anzukonzentrieren, wurde die Flüssigkeit der Lösung durch Vakuumzentrifugation abgedampft. Das geöffnete Reaktionsgefäß wurde dafür in der *SpeedVac Plus SC110A* (Schütt, Göttingen) bei höchster Temperatur, unter Vakuum (200 mbar, Membran-Vakuumpumpe, Vacuubrand, Wertheim) für ca. 10 Minuten zentrifugiert. Dabei wurde eine Reduktion des Probenvolumens von ca. 60% erreicht. DNA, die sich an der Wand des Reaktionsgefäßes abgelagert hatte, wurde im Anschluss mit der verbleibenden Flüssigkeit abgewaschen.

2.2.2.8 Restriktionsverdau

Restriktionsenzyme gehören zu der Gruppe der Endonukleasen und sind in der Lage doppelsträngige DNA sequenzspezifisch zu schneiden. Diese Eigenschaft wurde sich z. B. im Verlauf einer Klonierung zur passgerechten Zusammenführung von Vektor und Insert (präparativer Verdau) oder zur Analyse von Plasmiden (analytischer Verdau) zu Nutze gemacht. Die Auftrennung der resultierenden DNA-Fragmente erfolgte über die Agarosegelelektrophorese [2.2.2.3].

Mit herkömmlichen Restriktionsenzymen wurde ein analytischer Verdau für 1 Stunde bei Optimaltemperatur inkubiert, ein präparativer Verdau wurde zuerst für 2 Stunden oder über Nacht inkubiert, dann wurde 1 µl Enzym nachgelegt und für eine weitere Stunde inkubiert. Wurden zwei Enzyme eingesetzt, die unterschiedlicher Puffer bedurften, wurde entweder ein Universalpuffer (Tango; Fermentas, St. Leon-Roth) benutzt, oder die verschiedenen Enzyme wurden in separaten nacheinander folgenden Reaktionen eingesetzt. Dabei wurde zwischen den Reaktionen eine Aufreinigung direkt aus der Lösung [2.2.2.6.2] oder aus einem Agarosegel [2.2.2.6.1] durchgeführt.

Mit den neuartigen *FastDigest*-Enzymen (Fermentas) war die DNA bereits nach 10-20 Minuten vollständig geschnitten. Hier war es auch problemlos möglich mit mehreren Enzymen gleichzeitig zu schneiden, da es nur einen Universalpuffer für alle Enzyme gibt.

Analytischer Verdau:

10 x Restriktionspuffer	1 µl
BSA (optional)	0,1 µl
DNA	1µl (~1 µg)
Enzym	1 µl
ddH ₂ O	ad 10 µl

Präparativer Verdau:

10 x Restriktionspuffer	5 µl
BSA (optional)	0,5 µl
DNA	max. 10 µg
Enzym	5 µl
ddH ₂ O	ad 50 µl

2.2.2.9 Generieren von 3'-A-Überhängen an PCR-Produkten mit glatten Enden

Für die Klonierung eines DNA-Fragments in einen *TOPO*-Vektor war ein 3'-Adenosin-Überhang am Insert zu generieren. Aufgrund ihrer Template-unabhängigen terminalen Transferase-Aktivität ist die *Taq*-Polymerase, im Gegensatz zur *KOD*-Polymerase, dazu befähigt, den 3'-A-Überhang zu erzeugen. Der Reaktionsansatz wurde für 15 Minuten bei 72°C im Thermocycler inkubiert.

Ansatz zur Generierung von 3'-A-Überhängen:

dATPs (10mM)	1 µl
10 x Puffer	5 µl
Taq-Polymerase (5 U/µl)	1 µl
DNA-Fragment	43 µl

2.2.2.10 Auffüllen von 5'-überhängenden Enden (Klenow-Reaktion)

Zum Auffüllen von 5'-überhängenden DNA-Enden wurde das Enzym *DNA-Polymerase I Large Fragment* (Klenow Enzym) benutzt. Die Reaktionskomponenten wurden

gemischt und der Ansatz wurde für 1 Stunde bei 37°C inkubiert. Die Inaktivierung des Enzyms erfolgte bei 65°C für 20 min.

Ansatz zum Auffüllen von 5'-überhängenden Enden:

dNTPs (2 mM)	1 µl
10 x Puffer	5 µl
Klenow-Fragment (10 U/µl)	3 µl
DNA-Fragment	37 µl

2.2.2.11 Ligation

Das Enzym Ligase verknüpft DNA-Fragmente miteinander. Die Fragmente müssen dafür entweder glatte („*blunt*“) oder überstehende, zueinander passende („*sticky*“) Enden, die z. B. durch einen Restriktionsverdau [2.2.2.8] generiert worden waren, besitzen.

Mit dem *Ligate-ITTM Rapid Ligation Kit* (USB, Staufen) war eine Ligation innerhalb von 10 Minuten durchführbar. Dafür wurden Insert und Vektor im Verhältnis 13:2 (v/v) mit einem Endvolumen von 15 µl vermischt. Zu der DNA wurden dann noch 4 µl 5x Puffer und 1 µl Ligase gegeben. Die Ligation erfolgte dann für 5 -10 Minuten bei Raumtemperatur. Zur Überprüfung, ob ein Vektor, der zwei verschiedene „*sticky ends*“ besitzen sollte, wirklich vollständig geschnitten worden war, wurde er in einer Negativkontrolle mit sich selbst ligiert. Fanden sich nach dem Klonierungsschritt keine bzw. deutlich weniger Klone auf der Kontrollplatte, konnte davon ausgegangen, dass sich auch in den Vektor-Insert-Klonen keine bzw. kaum „falsche“, selbstligierte Plasmide befanden.

2.2.2.12 Phenol-Chloroform-Extraktion

Mit der Phenol-Chloroform-Extraktion können DNA oder RNA aus einer Lösung aufgereinigt und ggf. durch anschließende Resuspension in einem kleineren Volumen ankonzentriert werden.

In der Regel wurde die Extraktion mit einem Ausgangsvolumen von 400 µl begonnen, ggf. wurde auf dieses Volumen verdünnt. Als erstes wurden der Probe 1/10 Volumen

Ammonium-Acetat oder 3 M Natriumacetat-Lösung zugesetzt, welches die Löslichkeit der DNA in einem apolaren Lösungsmittel herabsetzt. Dann wurde ein Volumen Phenol-Chloroform hinzupipettiert. Für die Extraktion von RNA eignet sich Phenol-Chloroform mit einem pH-Wert von 4,5-5, für DNA solches mit pH 7-8. Das ganze wurde kräftig geschüttelt und dann bei 13.000 rpm (Biofuge pico; Heraeus) für 10 Minuten bei Raumtemperatur zentrifugiert. Die obere Phase wurde in ein neues Reaktionsgefäß überführt, mit 400 µl Chloroform/Isoamylalkohol (24:1) versetzt, geschüttelt und ebenso zentrifugiert. Die obere Phase wurde wiederum in ein neues Reaktionsgefäß überführt und zur Ausfällung der DNA oder RNA mit 400 µl Isopropanol (-20°C) geschüttelt, für 5-10 Minuten auf -80°C gelagert (es durfte aber nicht durchfrieren) und dann bei 13.000 rpm (Biofuge fresco; Heraeus) für 20 Minuten bei 4°C zentrifugiert. Das DNA- bzw. RNA-Pellet wurde dann mit 500 µl eiskaltem 70%igem Ethanol gewaschen und bei 13.000 rpm für 7 Minuten bei 4°C zentrifugiert. Das überstehende Ethanol wurde verworfen und das Pellet bei 37°C für ca. 5-10 Minuten getrocknet bevor es in RNase-freiem H₂O (für RNA) oder TE-Puffer (für DNA) aufgenommen wurde.

2.2.3 Herstellung von DNA-Konstrukten

2.2.3.1 Klonierung von 5'-verkürzten *Htr3b*-Promotorfragmenten in den pXP2-Vektor

Um die Aktivität unterschiedlicher Fragmentlängen des Ratten-*Htr3b*-Promotors messbar zu machen, wurden Luciferase-Reportergenplasmide hergestellt. Dafür wurden die verschiedenen 5'-verkürzten Promotorfragmente, wie in Abb. 2.1 veranschaulicht, direkt vor das Luciferase-Gen im Luciferase-Reportergenvektor pXP2 kloniert.

Als Ausgangskonstrukt für die PCRs [2.2.2.1] diente das bereits zuvor in der Arbeitsgruppe hergestellte Plasmid pXP2::*Htr3b* (8809 bp). In den Tabellen 2.1 und 2.2 sind die verwendeten Primer und individuellen PCR-Bedingungen dargestellt. Als Rückwärtsprimer diente in allen Fällen „Ratte_rev“. Alle PCRs wurden mit *Q-Solution* angesetzt.

Tab. 2.1: Oligonukleotid-Primer zur Amplifizierung der *Htr3b*-Promotorfragmente (Fett markiert sind die veränderten Nukleotide zur Herstellung neuer Restriktionsschnittstellen (unterstrichen))

Primer	5' – 3' Sequenz
Ratte_2kb_for	TAA TGA GGA TCC AAG CCT GCC AGA ACG ATC TA
Ratte_1,1kb_for	TGA GCT GGA TCC TGG GCC CCG ACA AGG ACA TTA
Ratte_450bp_for	ACG TCT GGA TCC TTA AGG CAA CAA TCT GGA TCT CAA
Ratte_250bp_for	GGC CAT CGG ATC CTA GGG CAC AGC CAA ATG
200_for_1	AGG CAT AAG CTT CCA AAC CTC TGT GCG GTG CAC
120_for_1	ACC AAA AAG CTT ACA AGT GAG CAG ACA GGA GAC G
100_for_1	CAG ACA AAG CTT GAG GGT GGA GGG GCA CTG AGA G
Ratte_100bp_for	ACT GAG AGG ATC CAA GGT CGA GCA GTG CTC T
Ratte_rev	CCA AGC TCA GAT CTC GAG CT

Tab. 2.2: Bedingungen zur Amplifizierung der *Htr3b*-Promotorfragmente

Vorwärts-primer	Annealing-Temperatur	Elongationszeit	Größe der PCR-Produkte	5'-Startpunkt der resultierenden Promotorfragmente zum ATG
Ratte_2kb_for	50 °C	2 min	2082 bp	-2057 bp
Ratte_1,1kb_for	50 °C	2 min	1124 bp	-1095 bp
Ratte_450bp_for	50 °C	2 min	471 bp	-445 bp
Ratte_250bp_for	53,2 °C	30 sec	282 bp	-258 bp
200bp_for_1	58°C	30 sec	232 bp	-203 bp
120bp_for_1	58°C	30 sec	165 bp	-136 bp
100bp_for_1	58°C	30 sec	144 bp	-115 bp
Ratte_100bp_for	50 °C	30 sec	118 bp	-90 bp

Die PCR-Produkte wurden anschließend mit *XmaI* und *BamHI* bzw. *HindIII* geschnitten [2.2.2.7]. Es resultierten spezifische Promotorfragmente deren 5'-Enden -2057, -1095, -445, -258, -203, -136, -115 und -90 bp vom translationalen Startpunkt des *Htr3b*-Gens entfernt waren. Für die *XmaI*-Restriktion wurde die natürliche Schnittstelle auf der *Multiple Cloning Site* des pXP2-Konstrukts genutzt. Die Schnittstellen für *BamHI*- bzw. *HindIII* wurde hingegen mit den Vorwärts-Primer künstlich in die Sequenz eingebracht. Die fertigen Promotorfragmente wurden schließlich in den, zuvor ebenfalls mit *XmaI* und *BamHI* bzw. *HindIII* geschnittenen, leeren pXP2-Vektor ligiert [2.2.2.11].

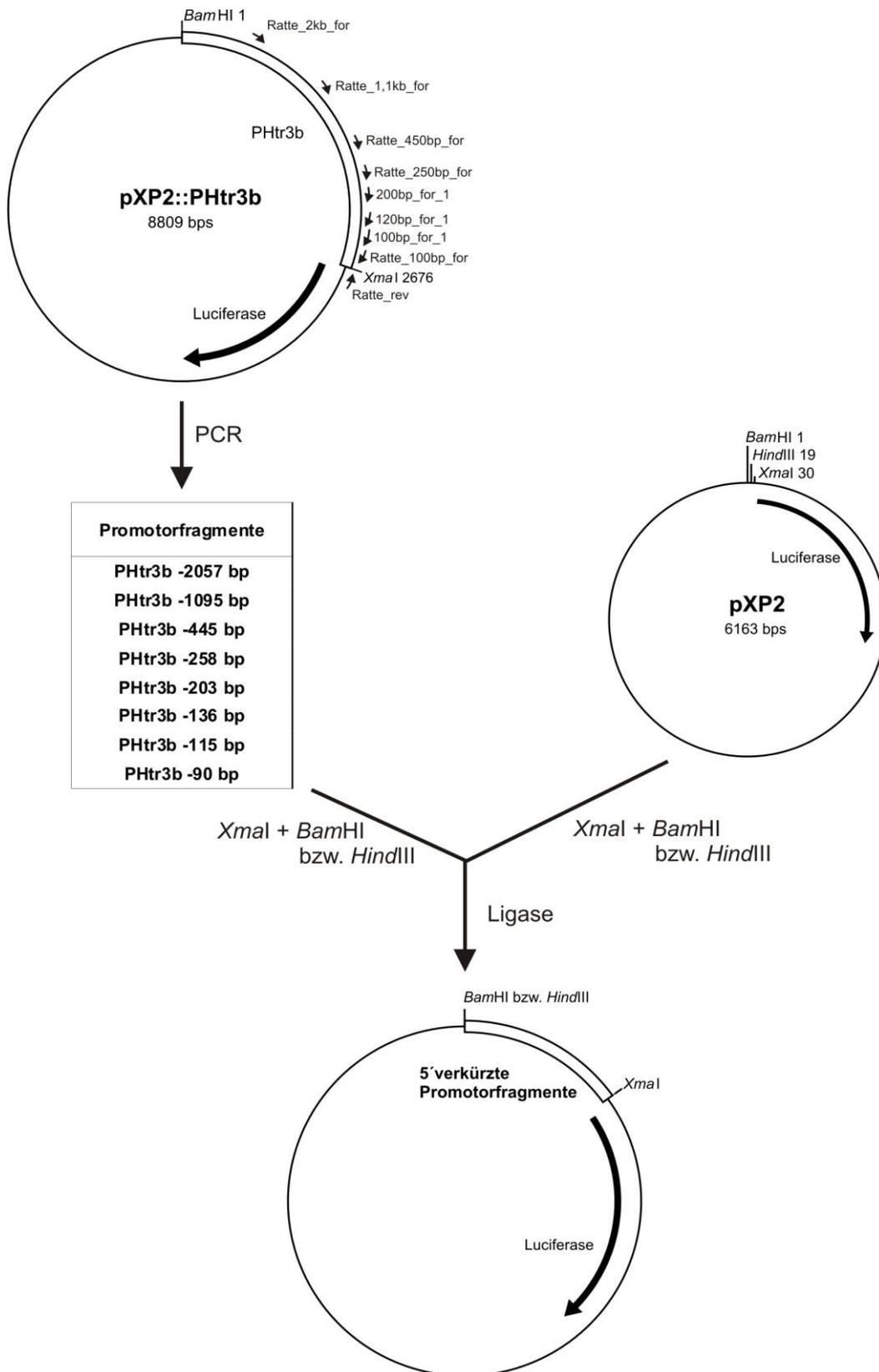


Abb. 2.1: Schematische Darstellung der Klonierung der *Htr3b*-Promotorfragmente in den Luciferase-Reportergen-Vektor pXP2. Am Ausgangskonstrukt pXP2::*Htr3b* sind die Positionen der Primer, mit denen die jeweiligen Amplifizierungen durchgeführt wurden, eingezeichnet. Nach den Restriktionsspaltungen mit *Xma*I und *Bam*HI bzw. *Hind*III wurden die verschiedenen Inserts und der Vektor ligiert.

2.2.3.2 TOPO-Klonierung

Das *TOPO[®] XL PCR Cloning Kit* ermöglicht eine schnelle und einfache Ligation eines PCR-Produkts in den TOPO-Vektor. Bei der Ligation wird die Energie der, kovalent an das 3'-Phosphat des geschnittenen Vektors gebundenen, Topoisomerase I aus dem *Vaccinia* Virus ausgenutzt. Ein Insert, welches 3'-Adenosin-Überhänge besitzt [2.2.2.9], wird innerhalb von 5 Minuten in den TOPO-Vektor, der einzelne 3'-Thymidin-Überhänge besitzt, ligiert. Die Topoisomerase I wird bei der Ligation wieder freigesetzt.

TOPO-Ligation:

DNA-Fragment-Lösung	4,5 µl
<i>TOPO XL[®] PCR Cloning</i> Vektor	0,5 µl

Es wurde exakt 5 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Dann wurde 1 µl der dem Kit beiliegenden Salz-Stop-Lösung (0,3 M NaCl, 0,06 m MgCl₂) hinzugefügt und der Reaktionsansatz wurde für ca. 10 Minuten auf Eis gestellt. Anschließend wurde dialysiert und in *E.coli* elektroporiert [2.2.6.5].

2.2.3.3 Klonierung von ECR 1 und ECR 3 in den pXP2-Vektor

Die weit stromaufwärts vom ATG des *Htr3b*-Gens gelegenen ECR 1 und ECR 3, wurden mit den Primern aus Tabelle 2.3 amplifiziert. Die PCRs wurden nach dem Standardprotokoll [2.2.2.1] mit *Q-Solution* bei einer Primeranlagerungstemperatur von 58,4°C und Elongationszeiten von 1 min für ECR 3 und 45 sec für ECR 1 durchgeführt. Durch Restriktionsverdau [2.2.2.8] der PCR-Produkte sowie des Vektors pXP2 mit *Bam*HI und *Hind*III wurden überhängende Enden geschaffen, über die die PCR-Produkte und der Vektor ligiert [2.2.2.11] werden konnten.

Tab. 2.3: Oligonukleotid-Primer zur Amplifizierung der ECRs (Fett markiert sind die veränderten Nukleotide zur Herstellung neuer Restriktionsschnittstellen (unterstrichen))

Primer	5' – 3' Sequenz
ECR1f_BamHI	GGC AGG TAG GAT CCC CAG ACT GCT GTT AAA TCA
ECR1r_HindIII	GTC TGC TTA AGC <u>TTA</u> TGG GGA AGA ATC TGG ACA AG
ECR3f_BamHI	AAG TTC AAG GAT CCA CAC AGG GAT GCA CAG TGA G
ECR3r_HindIII	GTC CAG GT A AGC <u>TTG</u> GGG ACA GCA CGC TGT AAG A

2.2.3.4 Umklonierungen in/von Expressionsplasmide(n)

Um pCMV-SPORT6- und pExpress-1-Leervektoren zu erhalten, wurden diese jeweils mit *EcoRI* und *XhoI* aus dem pCMV-SPORT6::EGR-1- bzw. dem pExpress-1::Usf1-Konstrukt (imágenes, Berlin) ausgeschnitten [2.2.2.8] und nach Klenow-Reaktionen [2.2.2.10] mit sich selbst ligiert [2.2.2.11].

Das *POU2F1*-Gen, das für den Transkriptionsfaktor Oct-1 kodiert, wurde mit *BamHI* und *XhoI* aus dem pOTB7::POU2F1-Konstrukt (imágenes) herausgeschnitten und in einen ebenso geschnittenen, leeren pcDNA5:FRT-Vektor ligiert.

Das *NR3C1*-Gen, das für den Glukokortikoid-Rezeptor kodiert, wurde mit den Primern aus Tabelle 2.4 nach dem Standardprotokoll [2.2.2.1] ohne Q-Solution, bei einer Primeranlagerungstemperatur von 64°C und mit 2:30 min Elongationszeit amplifiziert. Als DNA-*template* diente pOTB7::NR3C1 (imágenes). Anschließend wurden das PCR-Produkt und der leere pcDNA5:FRT-Vektor jeweils mit *EcoRV* und *XhoI* geschnitten und dann zusammenligiert.

Tab. 2.4: Oligonukleotid-Primer zur Amplifizierung der ECRs (Fett markiert sind die veränderten Nukleotide zur Herstellung neuer Restriktionsschnittstellen (unterstrichen))

Primer	5' – 3' Sequenz
GR_alpha_f	CAG AGT TGA TAT CAC TGA TGG ACT CCA AAG AAT C
GR_alpha_r	GAC TTT CTC GAG GCA ACC ATT CTT ATT AAG GCA G

2.2.3.5 Ortsspezifische Mutagenese

Im Gegensatz zur Bestrahlung oder Behandlung mit chemischen Mutagensubstanzen, geht es bei dieser Methode um die gezielte Veränderung (Mutierung) eines definierten kurzen (bis zu vier Basen) DNA-Bereichs. Dies lässt sich durch eine PCR mit fehlgepaarten Primern (Tab. 2.5) erreichen. Im Gegensatz zu einer herkömmlichen PCR, bei der meist nur ein DNA-Stück amplifiziert wird, wird hier ein komplettes Plasmid, welches das Insert mit der zu mutierenden Sequenz trägt, amplifiziert. Zu beachten ist, dass die Plasmide aus einem Klonierungsschritt hervorgegangen sein müssen, also aus Bakterien isoliert und ein bakterienspezifisches Methylierungsmuster tragen müssen. Die zur Amplifikation verwendeten Oligonukleotid-Primer besitzen Sequenzen, die zur Gensequenz im Bereich der geplanten Mutation genau

komplementär sind, mit Ausnahme der Nukleotide, die sich an der Mutationsstelle befinden. Diese sind komplementär zu den gewünschten mutierten Nukleotiden.

Tab. 2.5: Oligonukleotid-Primer für die ortsspezifische Mutagenese (veränderte Nukleotide sind fett markiert)

Primer	5' – 3' Sequenz
Egr1_445_mut_f	TTC CTC TCC TTG GGG TAC CAT CTA AAA TTG CAT TA
Egr1_445_mut_r	TAA TGC AAT TTT AGA TGG TAC CCC AAG GAG AGG AA
Egr1_Sp1_mut_f	CAG ACA GGA GAC GAG TTT TGA GGG GCA CTG AGA G
Egr1_Sp1_mut_r	CTC TCA GTG CCC CTC AAA ACT CGT CTC CTG TCT G
M4_mut_f	ATC TCA ATT ATT TTT GAA AAA AGG GTC CTG AAT
M4_mut_r	ATT CAG GAC CCT TTT TTC AAA AAT AAT TGA GAT
M7_mut_f	AAA TTA GGG TCC TGA TCC CCA GCA AGA ACA TTG
M7_mut_r	CAA TGT TCT TGC TGG GGA TCA GGA CCC TAA TTT
M14_mut_f	TTG GGG CCC CCT CTA AAA AAG CAG GAT TCA CTT AGC TGG CTC C
M14_mut_r	GGA GCC AGC TAA GTG AAT CCT GCT TTT TTA GAG GGG GCC CCA A
M10_mut_f	CTT CGT GAA GGC ATT GGT CCC CAA ACC TCT GT
M10_mut_r	ACA GAG GTT TGG GGA CCA ATG CCT TCA CGA AG
PrHtr3b_Ebox2_f	CTG GAC AGG CAC AAT ATC ACC GCA CAG AGG
PrHtr3b_Ebox2_r	CCT CTG TGC GGT GAT ATT GTG CCT GTC CAG
PrHtr3b_TFIII_f	ATC TCT CAG TGC CAA ACC ACC CTC GCT TC
PrHtr3b_TFIII_r	GAG ACG AGG GTG GTT TGG CAC TGA GAG AT

PCR-Mastermix:

10 x Puffer	5 µl
dNTPs (2 mM)	5 µl
MgSO ₄ (25 mM)	2 µl
Q-Solution (optional)	10 µl
Vorwärts-Primer (10 µM)	1,3 µl
Rückwärts-Primer (10 µM)	1,3 µl
Plasmid-DNA (50 ng/µl)	1 µl
KOD HotStart Polymerase (1.0 U/µl)	1 µl
ddH ₂ O	ad 50 µl

PCR-Bedingungen:

Phase	Dauer	Temperatur	
Denaturierung	3 min	95°C	
Denaturierung	30 sec	95°C	} 19 x
Primeranlagerung	30 sec	60°C	
Elongation	2:30 min	72°C	
Kühlung	for ever	8°C	

Die neu synthetisierten Plasmide waren im Gegensatz zu den Ausgangsplasmiden, welche aus Bakterien isoliert worden waren, nicht methyliert. Aufgrund dieser Tatsache waren die neu synthetisierten Plasmide, mit Hilfe des methylierungsspezifisch-schneidenden Restriktionsenzym *DpnI*, leicht von den Ausgangsplasmiden zu selektieren. Im Anschluss an die Amplifizierung wurden 2 µl *DpnI* zum Reaktionsmix gegeben und der Ansatz wurde für 1 Stunde bei 37°C inkubiert. Die methylierten Ausgangsplasmide wurden durch *DpnI* vielfach geschnitten und dadurch zerstört, während die neuen, mutationstragenden Konstrukte übrig blieben.

Nach vorheriger Dialyse konnten die Plasmide nun durch Elektroporation in Bakterien transformiert [2.2.6.5] werden. Aus den gewachsenen Klonen wurde mittels Minipräparation [2.2.7.1] die Plasmid-DNA isoliert. Um zu überprüfen, ob wirklich eine Mutation im Plasmid erzeugt worden war, wurde der entsprechende Abschnitt sequenziert [2.2.4.1].

2.2.4 Sequenzanalyse

2.2.4.1 Sequenzierung

Die Sequenzierung dient der basengenauen Visualisierung einer DNA-Sequenz. Mit Hilfe des *BigDye® Sequencing Kits* (Applied Biosystems, Darmstadt) und auf 10 µM verdünnter Primer (Tab. 2.6) wurde dazu eine Sequenzierungs-PCR angesetzt.

Tab. 2.6: Primer, die ausschließlich der Sequenzierung dienen.

Primer	5' – 3' Sequenz
LUCP_FLUpXP2_rev	CCA TTT TAC CAA CAG TAC CG
Oct-1_seq1_f	CGG AGG AGC AGC GAG TCA AGA TGA G
Oct-1_seq2_f	ATC GGG GGA TTC GCA GCA GCC AAG C

Oct-1_seq3_f	CGC CCC AGG GCC AGC AGG GTC TCC T
Oct-1_seq4_f	AAG CCA CTT TTA GAG AAG TGG CTA A
Oct-1_seq5_f	CAG CCC TGT CCT CCC TCT GAC CAG T
Oct-1_seq6_f	TGC GGC TGG AGG TGC CTT ACT CAG T
Oct-1_seq_7f	CCG CCT CCA AGG CAC AGT GAG CTG G
Oct-1_seq_r	CGA TTC TTC ATT AGA TTT AGA CTG T
TOPO_seq_f	GAT TAC GCC AAG CTA TTT AGG T
TOPO_seq_r	TAA AAC GAC GGC CAG TGA AAT G

Sequenzierungs-PCR:

DMSO	0,25 µl
Primer (10 µM)	0,5 µl
BigDye®	1 µl
ddH ₂ O	2,25 µl
DNA (~300 µg/ml)	1 µl

PCR-Bedingungen:

Phase	Dauer	Temperatur	
Denaturierung	2 min	94°C	
Denaturierung	15 sec	96°C	} 25 x
Primeranlagerung	15 sec	56,5°C	
Elongation	4 min	60°C	
Finale Elongation	7 min	72°C	
Kühlung	for ever	8°C	

Neben den dNTPs (Desoxytriphosphate) befinden sich im *BigDye®* auch fluoreszenzmarkierte ddNTPs (Didesoxynukleotidtriphosphate). Jedes ddNTP ist mit einem anderen Farbstoff markiert. Diese werden an einer zufälligen Position in den DNA-Strang eingebaut und führen aufgrund ihrer fehlenden 3'-OH-Gruppe zum Abbruch der Kettenverlängerung. Bei der Sequenzierung wurden die diversen Kettenabbruchprodukte aus der PCR mittels einer Kapillar-Gelelektrophorese nach ihrer Größe aufgetrennt und durch einen Laser wurde das entsprechende fluoreszenzmarkierte ddNTP detektiert. Aus der Abfolge der 4 verschiedenen Farbsignale wurde schließlich die Sequenz abgeleitet. Die durchschnittliche Länge der dabei gewonnenen Sequenzen betrug 700 – 900 Basenpaare.

Vor der Sequenzierungs-Reaktion wurde jedes PCR-Produkt durch Sephadex-Filtration aufgereinigt. Dafür wurden zuerst je 35 mg *Sephadex G50 superfine* (Amersham, Freiburg) in die Wells einer 96er Filterplatte (MAHV-N45, Millipore) verteilt und nach Zugabe von 300 µl ddH₂O für 3 Stunden quellen gelassen. Das überschüssige Wasser wurde dann durch Zentrifugation (Centrifuge 5810 R, Eppendorf, 650 x g, 5 min, RT) entfernt. Mit 150 µl ddH₂O erfolgte eine zweite Quellung über 30 Minuten. Es wurde nochmals unter gleichen Bedingungen zentrifugiert. Nun war die Platte gebrauchsbereit. Die Sequenzierungsreaktionen wurden durch Zugabe von 35 µl ddH₂O ad 40 µl gebracht, auf die Sephadex-Platte gegeben und zentrifugiert (650 x g, 5 min, RT). Dabei wurde das aufgereinigte Sequenzierungsprodukt in einer sauberen 96-Well-Platte gesammelt. Diese Platte wurde direkt zur Sequenzierung im *3130xl Genetic Analyser* (Applied Biosystems) eingesetzt.

Die Analyse der Sequenzdaten erfolgte mit der PC-Software *Sequencing Analysis* Version 5.2 (Applied Biosystems) und anschließend mit *Staden Package* Version 4.0 (SourceForge.net) oder *Clone Manager* (SECentral).

2.2.4.2 Fragmentlängenanalyse

Die Fragmentlängenanalyse dient der exakten Längenbestimmung eines PCR-Produktes. Dafür muss während der PCR allerdings ein farblich markierter Primer in das Produkt eingebaut worden sein. In der Regel handelt es sich hierbei um den Fluoreszenz-Farbstoff 6-Carboxyfluorescein (FAM). Mit Hilfe eines ebenfalls fluoreszenzmarkierten Standards (*Gene Scan 400 HD [ROX] Size Standard*) lässt sich die genaue Länge des PCR-Produktes errechnen.

Ansatz für Fragmentlängenanalyse:

<i>HIDI</i> (Formamid)	14,7 µl
<i>Gene Scan 400 HD [ROX] Size Standard</i>	0,3 µl
PCR-Produkt	1 µl

Die Ansätze wurden für 5 Minuten bei 95°C denaturiert, dann sofort auf Eis gestellt und anschließend im *3130xl Genetic Analyser* analysiert.

2.2.5 Arbeit mit mRNA

2.2.5.1 Umgang mit RNA

Da RNA sehr schnell durch das Enzym RNase degradiert werden kann, war darauf zu achten, dass alle Arbeitsmaterialien möglichst RNase-frei waren. Daher wurde stets unter einem Abzug gearbeitet, es wurden saubere Handschuhe getragen und alle Gerätschaften sowie der Arbeitsplatz wurden vor Arbeitsbeginn mit einem Anti-RNase-Spray (*RNaseZap*; Sigma-Aldrich) dekontaminiert. Als Verbrauchsmaterialien wurden ausschließlich RNase-freie Pipettenspitzen (Quali-Filterpipettenspitzen steril; Kisker, Steinfurt) und Reaktionsgefäße (0,2 ml; Biozym) benutzt.

2.2.5.2 Isolation von RNA

Um RNA aus eukaryotischen Zellen zu gewinnen, wurden das *RNeasy Mini Kit* bzw. das *RNeasy Plus Mini Kit* (Qiagen) in Kombination mit dem *QiaCube* (Qiagen) gemäß der Anleitungen des Herstellers benutzt.

2.2.5.3 cDNA-Synthese (Reverse Transkription)

Bei der reversen Transkription synthetisiert eine RNA-abhängige Polymerase, genannt Reverse Transkriptase, anhand einer RNA-Matrize den dazu komplementären cDNA-Strang (*copy* oder *complementary DNA*). Da die cDNA direkt aus mRNA hergestellt wird, ist sie frei von Introns.

Für die reverse Transkription wurde 1 µg RNA ad 17,5 µl verdünnt. Als Primer wurde 1 µl (2 nmol = 0,1 A₂₆₀ units) der unspezifischen Random Hexanucleotide *dN6* (Roche, Mannheim) zugegeben und die Mischung wurde für 10 Minuten auf 70°C erhitzt. Dieser Schritt diente der Denaturierung möglicher RNA-Sekundärstrukturen. Das anschließende langsame Herunterkühlen des Ansatzes auf Raumtemperatur (20 Minuten Inkubation bei Raumtemperatur) diente der Primeranlagerung. In der Zwischenzeit wurde der Mastermix für die reverse Transkription zusammenpipettiert.

RT-Mastermix (pro Ansatz):

5 x Superscript RT-Puffer	6 µl
DTT (0,1 M)	3,5 µl
dNTPs (10 mM)	1 µl
RNase Inhib P/N (40 un/µl)	0,5 µl
Super Script™ II (200 U/µl)	0,25 µl

Je 11,5 µl des RT-Mastermixes wurden zum abgekühlten RNA-Primer-Ansatz hinzugefügt. Nach einer 60-minütigen Inkubation bei 42°C war die cDNA fertig synthetisiert und wurde mit 70 µl ddH₂O aufgefüllt, um eine cDNA-Konzentration von 10 ng/µl zu erhalten.

2.2.5.4 Transkriptquantifizierung mittels quantitativer RT-PCR

Die quantitative RT-PCR (qRT-PCR), die sogenannte Echtzeit-PCR, dient der Bestimmung der Expressionsstärke von Genen. Dazu wird cDNA, die zuvor aus der Gesamt-RNA eukaryotischer Zellen synthetisiert worden war, eingesetzt [2.2.5.3]. Je mehr RNA eines Gens in der Gesamt-RNA der Zelle vorlag, desto stärker war das Gen exprimiert und demnach eher wird das PCR-Produkt in der Echtzeit-PCR zu detektieren sein. Den PCR-Zyklus, bei dem ein signifikanter Anstieg des Signals gegenüber der Hintergrund-Fluoreszenz erfolgt, also eine Überschreitung des so genannten Schwellenwerts eintritt, nennt man *Threshold Cycle* (Ct).

Die qRT-PCR wurde im *Sequence detection system 7900HT* (Applied Biosystems) entweder mit genspezifischen Sonden oder mit Hilfe des interkalierenden Farbstoffs *SYBRgreen* und genspezifischen Primern durchgeführt.

2.2.5.4.1 Real-time-PCR mit genspezifischen Sonden

Die genspezifischen Sonden sind Fluoreszenz-gekoppelte Oligonukleotide, die am 5'-Ende einen fluoreszierenden Reporterfarbstoff (z. B. FAM) und am 3'-Ende ein *Quencher*-Molekül besitzen. Die Sonden lagern sich an den komplementären DNA-Strang an. Während der Amplifikation des jeweiligen Gegenstranges wird, durch die 5'-3'-Exonuklease-Aktivität der *Taq*-Polymerase, das 5'-Ende der Sonde abgebaut.

Damit wird auch der Reporterfarbstoff frei und durch seine Entfernung vom *Quencher* zur Emission eines detektierbaren Fluoreszenzsignals befähigt. Aus dem Anstieg der freien Reporterkonzentration ergibt sich ein wachsendes Fluoreszenzsignal, das proportional zur Menge des PCR-Produkts ist.

2 x Mastermix (Eurogentec):

10 x Puffer	1,8 µl
MgCl ₂ (50 mM)	1,26 µl
dNTPs (5 mM)	0,72 µl
<i>Hot Goldstar Polymerase</i> (5 U/µl)	0,09 µl
ddH ₂ O	11,13 µl

Für die Bestimmung der relativen Transkriptmengen von *EGR1*, *Htr3a*, *Htr3b*, *Nr3c1*, *POU2F1*, *Usf1* und der Haushaltsgene *18S*, *TBP* und *Tbp* wurden fertige Assays von *Applied Biosystems* benutzt (Tab. 2.7). In 20-facher Konzentration enthalten sie die PCR-Primer und die Sonden.

Tab. 2.7: Verwendete Genexpressions-Assays (*Applied Biosystems*):

Gen	Assay-No.
<i>18S</i>	Hs99999901_s1
<i>EGR1</i>	Hs00152928_m1
<i>Htr3a</i>	Rn00577803_m1
<i>Htr3b</i>	Rn00573408_m1
<i>Nr3c1</i>	Rn01405580_m1
<i>POU2F1</i>	Hs00231250_m1
<i>TBP</i>	4326322E
<i>Tbp</i>	Rn01455648_m1
<i>Usf1</i>	Rn00582310_m1

Die anderen PCR-Komponenten wurden dem Ansatz mit dem 2-fach konzentrierten *Eurogentec*-Mastermix zugeführt.

Mastermix (für 18 µl Endvolumen):

2 x Mastermix (<i>Eurogentec</i>)	9 µl
20 x AssayMix	0,9 µl
cDNA (10 ng/µl)	3 µl
ddH ₂ O	5,1 µl

qRT-PCR-Bedingungen:

Phase	Dauer	Temperatur	
Uracil N-Glykosylase-Verdau	2 min	50°C	
Taq-Polymerase-Aktivierung	10 min	95°C	
Denaturierung	15 sec	95°C	} 40 x
Primeranlagerung	1 min	60°C	

Zunächst wurden je 15 µl des *TaqMan*-Mastermixes pro Well einer 384-Well-Platte (*Thermo Fast Plate 384 PCR*, ABgene) vorgelegt. Zu jedem Well wurden 3 µl der cDNA pipettiert. Dabei wurden alle Proben als Duplikate gemessen. Die Platte wurde mit spezieller Transparentfolie (Adhäsiv PCR-Folie, ABgene) verschlossen und in den *7900HT* gesetzt.

Die Ergebnisse wurden mit Hilfe der *SDS 2.1 Software* ausgewertet, womit die Ct-Werte für jede Probe automatisch bestimmt werden konnten.

2.2.5.4.2 Real-time-PCR mit SYBRgreen

SYBRgreen ist ein asymmetrischer Cyanin-Farbstoff, der in doppelsträngige DNA interkaliert. Findet die DNA-Farbstoff-Bindung während einer PCR statt, wird mit jedem Zyklus mehr des Fluoreszenz-Farbstoffes eingebaut und die Fluoreszenz des PCR-Produkts nimmt zu. Der dabei entstehende DNA-Fluoreszenzfarbstoff-Komplex absorbiert blaues Licht bei einer Wellenlänge $\lambda_{\max} = 494$ nm und emittiert grünes Licht bei $\lambda_{\max} = 521$ nm.

Es wurde mit *SYBRgreen* aus dem *qPCR[®] Core Kit (Eurogentec)* gearbeitet.

Mastermix (für 13 µl Endvolumen):

2 x Mastermix (<i>Eurogentec</i>)	6,5 µl
Primer_for (10 µM)	0,14 µl
Primer_rev (10 µM)	0,14 µl
<i>SYBRgreen</i> (gelöst in 1 ml DMSO)	0,51 µl
cDNA (10 ng/µl)	3 µl
ddH ₂ O	5,1 µl

qRT-PCR-Bedingungen:

Phase	Dauer	Temperatur	
Taq-Polymerase-Aktivierung	10 min	95°C	
Denaturierung	15 sec	95°C	} 40 x
Primeranlagerung	30 sec	50-70°C	
Elongation	1-2 min	68-72°C	
+ Dissoziationskurve			

2.2.5.4.3 Relative Quantifizierung

Bei der relativen Quantifizierung wurde die jeweilige Expression relativ zu einem internen Kontroll-Gen (NGen), einem so genannten „Haushaltsgen“ (z. B. TATA-Box Bindeprotein (TBP)), dessen Expression unabhängig von Zellzyklus bzw. Stress ist, bestimmt.

$$\begin{aligned} \text{relative Expression} &= 2^{-[(Ct - Ct \text{ NGen}) - (Ct \text{ Kontrolle} - Ct \text{ NGen Kontrolle})]} \\ &= 2^{-[\Delta\Delta Ct]} \end{aligned}$$

Nachdem die Ct-Werte aus den Doppelbestimmungen jeder Probe gemittelt worden waren, wurden die Werte der internen Kontrollen von den Werten der Proben subtrahiert (ΔCt). Als nächstes wurden von den normierten Proben die Mittelwerte der Kontrollproben (0-Werte) abgezogen ($\Delta\Delta Ct$).

Der $-\Delta\Delta Ct$ Wert wurde als Exponent zur Basis 2 gesetzt, dabei ergab sich die jeweilige Expression als n-facher Wert der Grundexpression.

2.2.5.4.4 Absolute Quantifizierung

Für eine absolute Quantifizierung ist als erstes eine Eichreihe aus verschiedenen konzentrierten DNA-Lösungen von Nöten. Dafür wurde unter Berücksichtigung der jeweiligen Länge der DNA, deren Konzentration und des spezifischen Molekulargewichts doppelsträngiger DNA (660 Da/Nukleotid-Paar), die Zahl der DNA-Moleküle in den DNA-Lösungen berechnet. Die Verdünnungen der DNA-Lösungen sollten im Messbereich der Proben liegen, meist 10^7 - 10^3 Moleküle.

2.2.6 Arbeit mit Bakterien

2.2.6.1 Kulturmedium

Die *Escherichia coli*-Bakterien vom Stamm Top 10 (Invitrogen) wurden in Luria-Bertani (LB)-Medium gezüchtet. Dieses setzte sich wie folgt zusammen:

LB-Medium:

Trypton bzw. Pepton	10 g
Hefeextrakt	5 g
NaCl	5 g
ddH ₂ O	1000 ml

Die Lösung wurde autoklaviert und dann bei 4°C im Kühlschrank aufbewahrt.

Für LB-Agarplatten wurden pro 1000 ml LB-Medium noch 14 g Agar (AppliChem, Darmstadt) hinzugegeben. Die LB-Agar Lösung wurde autoklaviert, bis ca. 50°C abgekühlt und unter sterilen Bedingungen (in der Sterilbank) in Petrischalen gegossen.

Wenn nötig wurde dem abgekühlten Medium ein Antibiotikum (Tab. 2.8) zugegeben. Die Antibiotika waren in ddH₂O gelöst, steril filtriert, je zu 1 ml aliquotiert und bei -20°C eingefroren.

Tab. 2.8: Antibiotika zur Bakterienselektion

Antibiotikum	Stammlösung (mg/ml)	Endkonzentration (µg/ml)
Ampicillin	50	100
Kanamycin	10	20
Chloramphenicol	25	170

2.2.6.2 Anzucht von Bakterien auf Agarplatten

Nach der Transformation oder zur Vermehrung bereits gezüchteter Klone wurden Bakterien auf Agarplatten mit dem entsprechenden Antibiotikum kultiviert. Zum Ausstreichen dienten abgeflamnte, gebogene Pasteurpipetten bzw. sterile Pipettenspitzen. Die Platten wurden dann über Nacht bei 37°C im Bakterieninkubator Incudrive (Schütt, Göttingen) mit dem Deckel nach unten inkubiert. Bis zu einem Monat

konnten die Platten mit Parafilm (Brand; Wertheim) verschlossen im Kühlschrank bei 4°C gelagert werden. Danach sind die meisten Bakterien tot.

2.2.6.3 Anzucht von Bakterien in Lösung

Um eine Bakteriensuspension herzustellen, wurde LB-Medium mit dem entsprechenden Selektionsantibiotikum gemischt und anschließend mit einer Bakterienkolonie von einer Agarplatte versetzt. Kulturen bis zu einem Gesamtvolumen von 5 ml wurden in sterilen 15 ml Röhrchen (Greiner, Frickenhausen) über Nacht leicht schräg stehend bei 37°C auf dem K2 260 basic-Schüttler für Bakterien (IKA, Staufen) mit 250 rpm geschüttelt. Durch die Schräglage (~40°) wurde eine große Oberfläche geschaffen, wodurch sich die Bakterien gut mit Sauerstoff versorgen konnten.

Ansätze mit 30-100 ml Kulturvolumen (z. B. für Midipräparation [2.2.7.2]) wurden in autoklavierten Glasflaschen (500 ml) über Nacht rotiert. Der Deckel der Gefäße wurde nie fest verschlossen, sodass Luft in die Flasche gelangen konnte.

2.2.6.4 Herstellung von Glycerinkryokulturen

Von allen generierten, positiven Klonen wurde eine Bakterienstammlösung hergestellt. Dazu wurden 600 µl aus einer frischen 5 ml Über-Nacht-Kultur mit 600 µl einer sterilen 50%-igen Glycerinlösung in einem 1,5 ml Reaktionsgefäß vermischt und sofort bei -80°C eingefroren. So können die bakteriellen Stämme über mehrere Jahre gelagert werden.

2.2.6.5 Transformation durch Elektroporation

Durch Transformation werden Plasmide in Bakterienzellen eingeschleust. Von den Bakterien werden die Plasmide vermehrt und können später in großer Zahl geerntet werden.

Um die Salzkonzentration in der Elektroporationsmischung so gering wie möglich zu halten, wurden die einzusetzenden Plasmidlösungen vor der Elektroporation dialysiert. Dafür wurde eine kleine Petrischale mit ddH₂O befüllt und ein Dialysefilter vom Typ VSWP01300 (Millipore, Schwalbach) wurde mit der glänzenden Seite nach oben auf

die Wasseroberfläche gesetzt. Im Anschluss wurde die Plasmidlösung auf den Filter aufgetragen, für 30 Minuten dialysiert, dann wieder vorsichtig vom Filter entfernt und in ein neues 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt.

Für die Transformation wurde ein 50 µl Aliquot der *One shot TOP10 Electrocomp. E.coli* (Invitrogen, Karlsruhe) möglichst schnell aufgetaut und dann auf Eis gelagert. Je 10 µl der Bakterien wurden mit 40 µl ddH₂O in einem 1,5 ml Reaktionsgefäß vermischt und dann in eine vorgekühlte 2 mm Elektroporationsküvette (PeqLab, Erlangen) überführt. Danach wurden zwischen 1 - 3 µl der Plasmidlösung hinzugegeben und durch mehrmaliges auf- und abpipettieren homogen in der Bakterienlösung verteilt. Die Elektroporation wurde im *Gene Pulser II* (BioRad, Hercules USA) unter folgenden Bedingungen durchgeführt: 2.500 kV, 25 µF und 200 Ω. Der Hochspannungspuls dauerte ca. 5 ms. Nach der Elektroporation wurden umgehend 800 µl LB-Medium (auf 37°C vorgewärmt) hinzupipettiert und die Suspension wurde für eine Stunde bei 37°C inkubiert. Anschließend wurden je 50 – 300 µl des Transformationsansatzes auf Selektionsagarplatten [2.2.6.2] ausgestrichen.

2.2.7 Isolierung von Plasmid-DNA aus Bakterien

Plasmide wurden in zwei verschiedenen Maßstäben isoliert. Die Minipräparation von Plasmiden liefert geringere Mengen und weniger reine DNA, lässt sich aber mit wenig Materialaufwand durchführen und wurde für die Erstisolation und -analyse neuer Bakterienklone sowie als Ausgangsmaterial für eine Umklonierung eingesetzt. Die Midipräparation liefert reine Plasmid-DNA in größeren Mengen (300-3.000 ng/µl), die dann für die Transfektion in Säugetierzellen verwendet wurde.

2.2.7.1 Minipräparation

Resuspensionspuffer (Puffer 1; pH 8,0):

bei 4°C gelagert

Tris-HCl	50 mM
EDTA	10 mM
RNase A (nach Autoklavierung zugesetzt)	100 µg/ml

Lysepuffer (Puffer 2):

NaOH	200 mM
SDS	1% (w/v)

Neutralisationspuffer (Puffer 3; pH 5,5):

Kaliumacetat	3 M
--------------	-----

TE-Puffer (pH 7,5):

Tris	10 mM
EDTA	1 mM

Ausgangsmaterial für die Minipräparation waren 5 ml Bakterien-Kulturen, die für etwa 12-16 Stunden kultiviert worden waren. Circa 5 µl aus jeder Kultur wurden mit einer sterilen Pipettenspitze auf $\frac{1}{4}$ - $\frac{1}{8}$ einer Agarplatte (mit dem entsprechenden Antibiotikum) ausgestrichen und wiederum über Nacht bei 37°C inkubiert. Damit wurde der Klon kurzzeitig für weitere Anwendungen wie z. B. Midipräparation [2.2.7.2] oder Herstellung von Glycerinkryokulturen [2.2.6.4] asserviert.

Die 5 ml Kulturen wurden abzentrifugiert (Centrifuge 5810 R; Eppendorf, 3.220 x g, 10 min, RT). Der Überstand wurde restlos verworfen (ggf. abpipettiert) und das Pellet in 250 µl Puffer 1 resuspendiert. Nach dem Überführen in ein 1,5 ml Reaktionsgefäß wurden 250 µl des alkalischen Lysepuffers zu der Suspension pipettiert. Durch kräftiges Schütteln des Reaktionsgefäßes wurden die Komponenten durchmischt, das Zelllysat wurde viskos. Eine Zugabe von 350 µl des schwach sauren Neutralisationspuffers mit anschließender 4-6-maliger Inversion des Reaktionsgefäßes führte zur Präzipitierung der Proteine in Form eines weißen Niederschlags, der anschließend durch Zentrifugation (Biofuge pico; 13.000 rpm, 10 min, RT) sedimentiert wurde. Der Überstand wurde in ein neues 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt, mit 500 µl Chlorform/Isoamylalkohol (24 : 1) versetzt und nach kräftigem Schütteln weitere 5 Minuten bei den gleichen Bedingungen zentrifugiert. Die obere Phase, welche die Plasmid-DNA enthielt, wurde abermals in ein neues 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt. Nach Zugabe von 650 µl eiskaltem Isopropanol und sorgfältigem Ausschütteln der DNA wurden die Proben zentrifugiert (Biofuge fresco; 13.000 rpm, 15 min., 4 °C). Das entstandene Plasmid-DNA-Pellet wurde nun mit 500 µl eiskaltem Ethanol (70%)

gewaschen. Es wurde nochmals für 8 Minuten bei den gleichen Bedingungen zentrifugiert. Nachdem der Überstand komplett verworfen worden war, wurde das Plasmid-Pellet bei 37°C solange getrocknet (der Deckel des Reaktionsgefäßes wurde hierbei geöffnet, damit das Ethanol verdampfen konnte) bis es transparent erschien. Zum Abschluss wurde das Plasmid-Pellet in 50 µl TE-Puffer aufgenommen.

2.2.7.2 Midipräparation

Die Midipräparation wurde mit dem *PureYieldTM Plasmid Midiprep System* (Promega, Mannheim) oder mit dem *CompactPrep Plasmid Midi Kit (25)* (Qiagen), das sich für die Isolation von pXP2-Plasmiden als besser herausgestellt hat, nach Anweisungen der Hersteller durchgeführt.

2.2.8 Zellkultur

2.2.8.1 Verwendete Zelllinien und deren Kultivierungs-Bedingungen

Alle Arbeiten mit eukaryotischen Zellen wurden unter sterilen Bedingungen [2.2.1] in einer Sterilbank durchgeführt. Um eine mikrobielle Kontaminierung auszuschließen wurden die Zellen regelmäßigen Kontrollen unter dem Mikroskop (Axiovert 40 CFL, Zeiss, Jena) unterzogen bzw. in regelmäßigen Abständen mit dem *Venor®GeM-Kit* (Minerva Biolabs, Berlin) auf Mycoplasmen untersucht.

Die Kultivierung erfolgte in Zellkulturflaschen mit 75 cm² Kulturoberfläche (*Tissue Culture Flask 75 cm², PE Vented Cap*, Sarsted, Nümbrecht-Rommelsdorf) im Brutschrank (CO₂-Inkubator BBD 6220; Heraeus) unter folgenden Bedingungen: 37°C, 95% Luftfeuchtigkeit, 5% CO₂. Das Kulturmedium wurde vor Gebrauch im Wasserbad (GFL 1083; Schütt, Göttingen) auf 37°C erwärmt, um den Zellen eine gleich bleibende Temperatur zu bieten. Das Passagieren fand zweimal pro Woche in zellspezifischen Split-Verhältnissen statt [2.2.8.1].

PBS-Puffer, pH 7,4:

NaCl	140,0 mM
KCl	2,5 mM
Na ₂ HPO ₄	8,1 mM
KH ₂ PO ₄	1,5 mM

2.2.8.1.1 PC-12-Zellen

PC-12-Zellen (DMSZ, Braunschweig) stammen von einem Nebennierenrinden-Tumor (Phäochromozytom) einer Ratte ab. In Kultur wachsen die PC-12-Zellen als Suspensionszellen. Als Kulturmedium diente DMEM-Medium mit 10% Pferdeserum (HS), 5% fötalem Kälberserum (FCS) und 1% Penicillin/Streptomycin. Sie wurden im Verhältnis 1:3 passagiert.

Um PC-12-Zellen in Experimenten, in denen ein regelmäßiger Mediumwechsel nötig war (z. B. Transfektion), einsetzbar zu machen, war adhärentes Zellwachstum unerlässlich. Dafür war eine oberflächliche Beschichtung der Kulturschalen (Multischalen; Nunc) bzw. Petrischalen (Schütt, Göttingen) mit Collagen (Collagen A; Biochrom, Berlin) oder auch Polylysin-D-hydrobromid (Sigma) notwendig. Beide Beschichtungsvarianten sind gleich gut geeignet. Bei der Beschichtung mit Collagen wurde je 1 ml eines 1:1 Collagen/PBS-Gemisches auf 10 cm² Wachstumsfläche aufgetragen. Nach einer 30-minütigen Inkubation im Brutschrank wurde das Gemisch wieder abgezogen und bis zur Wiederverwertung im Kühlschrank gelagert. Die beschichtete Oberfläche wurde einmal mit PBS gewaschen, bevor die Zellen ausgesät wurden. Bei der Beschichtung mit Polylysin-D-hydrobromid, welches in sterilem ddH₂O in einer Konzentration von 2 mg/ml gelöst worden war, wurde ebenfalls je 1 ml auf 10 cm² Wachstumsfläche aufgetragen. Die Inkubation im Brutschrank erfolgte hier allerdings nur für 10 Minuten. Danach wurde es wieder abgezogen und konnte ebenfalls bei 4°C im Kühlschrank aufbewahrt und mehrmals wiederverwendet werden. Die Platten wurden für etwa 5 Minuten unter der Sterilbank getrocknet, bis kein Flüssigkeitsfilm mehr sichtbar war.

2.2.8.1.2 HEK-293-Zellen

Bei HEK-293-Zellen handelt es sich um humane embryonale Nierenzellen. Sie wachsen adhären und wurden im Verhältnis 1:10 passagiert. Als Kulturmedium diente DMEM mit 10% FCS und 1% Penicillin/Streptomycin.

2.2.8.1.3 Flp-InTM TREx 293

Bei dieser Zelllinie handelt es sich um HEK-293-Zellen, die *Flp Recombination Target* (FRT)-Stellen stabil im Genom integriert haben, durch die sie sich zur stabilen Transfektion [2.2.8.6.2] mit dem *Flp-InTM System* (Invitrogen) eignen. Als Kulturmedium wurde DMEM mit 10% FCS und 1% Penicillin/Streptomycin und 0,1% Zeocin verwendet. Passagiert wurden die Zellen 1:10.

2.2.8.1.4 Flp-InTM NR3C1

Diese Linie wurde durch die stabile Transfektion von pcDNA5:FRT::NR3C1 in *Flp-InTM TREx 293* Zellen selbst hergestellt. In diesen Zellen wird das Gen *NR3C1*, welches für den Glukokortikoid-Rezeptor (GR) kodiert, exprimiert. Die Zellen wurden in DMEM mit 10% FCS und 1% Penicillin/Streptomycin und 100 µg/ml Hygromycin B kultiviert und 1:10 passagiert.

2.2.8.2 Bestimmung der Zellzahl

Die Anzahl der Zellen in einer Zellsuspension wurde durch Auszählen in einer Neubauer-Zählkammer ermittelt. Der Mittelwert aus den 4 Quadraten ergibt die Zellzahl $\times 10^4/\text{ml}$. Um lebendige von toten Zellen unterscheiden zu können, wurde die Zellsuspension im Verhältnis 1:1 (je 20 µl) mit Trypanblau (Sigma-Aldrich) vermischt. Der Farbstoff Trypanblau wird von lebenden Zellen ins Medium zurückgepumpt. Daher erscheinen sie unter dem Mikroskop heller als die blaue Hintergrundfarbe des Mediums. Die abgestorbenen Zellen können das Trypanblau nicht mehr aus ihrem Zellinneren herauszupumpen und erscheinen daher dunkelblau.

2.2.8.3 Einfrieren von Zellen

Das Einfrieren der Zellen erfolgte in einer möglichst frühen Passage. Vom Inhalt einer dicht bewachsenen 75 cm² Kulturflasche wurden 4 Aliquots zum Einfrieren hergestellt. Dazu wurden die Zellen mit Medium zuerst in ein 50 ml Röhrchen überführt und dann bei 300 x g für 3 min bei RT abzentrifugiert. Das Medium wurde anschließend abgesaugt, die Zellen wurden in 8 ml eiskaltem Einfriermedium (90% FCS + 10% DMSO) resuspendiert und schnell in vorbeschriftete Kryoröhrchen (Nunc) abgefüllt (je 2 ml). Die Kryoröhrchen wurden dann schnell in ein Eisbad (Eis + NaCl + Wasser) gesteckt und dort für eine Stunde gekühlt. Im Anschluss wurde die Zellsuspension für ca. eine Woche auf -80°C gelagert, bevor sie letztendlich für die dauerhafte Aufbewahrung in flüssigen Stickstoff überführt wurde.

2.2.8.4 Revitalisieren von eingefrorenen Zellen

Um die Zellen, welche aliquotiert im flüssigen Stickstoff (ca. -170°C) lagerten, zu revitalisieren, wurde die Kryokultur möglichst rasch aufgetaut, in einem 50 ml-Röhrchen mit 10 ml vorgewärmtem Medium vermischt und abzentrifugiert (Heraeus Laborfuge 400R, 300 x g, 3 min, RT). Der Überstand wurde abgesaugt und das Pellet in 5 ml Medium resuspendiert. Die Zellsuspension wurde in eine 25 cm²-Kulturflasche überführt und für 2-3 Tage im Brutschrank kultiviert.

In der Folge wurden die Zellen wie unter 2.2.8.1 beschrieben, passagiert. Nach 3-4 Folgepassagen war die ursprüngliche Vitalität der Zellen wiederhergestellt und sie konnten experimentell verwendet werden.

2.2.8.5 Ausdifferenzierung von Zellen

NGF Stammlösung (10 µg/ml):

in 1 ml Aliquots bei -20°C gelagert

NGF	0,1 mg
90% DMEM + 10% FCS	10 ml

PC-12-Zellen differenzieren sich unter Zugabe des Nerven-Wachstumsfaktors 7S (NGF; Sigma-Aldrich) zu neuronalen Zellen aus, d.h. sie stellen ihre Vermehrung weitgehend ein und bilden Dendriten aus (Yoffe und Borchardt, 1982). Zellen, die ausdifferenziert werden sollten, wurden in geringerer Dichte ($8,57 \times 10^4$ Zellen/cm²) ausgesät, da sie in Folge der Dendritbildung mehr Platz benötigen, als native kugelige Zellen ($1,37 \times 10^5$ Zellen pro cm²). Die Zellen wurden einen Tag vor der NGF-Zugabe ausplattiert, um eine Anheftung der Zellen zu gewährleisten. Sie wurden dann für mehrere Tage im Standard-Kulturmedium mit 100 ng/ml NGF kultiviert. Für eine vollständige Ausdifferenzierung ist laut Greene eine solche Kultivierung über 14 Tage notwendig (Greene und Tischler, 1976). In der vorliegenden Arbeit wurden die Zellen im Normalfall nur über 3 Tage differenziert.

2.2.8.6 Transfektion

Bei einer Transfektion wird Fremd-DNA in eukaryotische Zellen eingebracht. Dafür gibt es verschiedene biologische, chemische oder physikalische Verfahren. In der vorliegenden Arbeit wurde die Lipofektion genutzt, bei der die zu transfizierende DNA durch ein lipophiles Reagenz tröpfchenförmig umschlossen wird und so die Zellmembran durchdringen kann. Im Zellkern wird die DNA wieder freigesetzt und kann exprimiert werden. Als Transfektionsreagenzien dienten *LipofectamineTM2000* (Invitrogen) für PC-12-Zellen und *Fugene* (Roche) für HEK-293-Zellen.

2.2.8.6.1 Transiente Transfektion

Bei der transienten Transfektion findet kein Einbau in das Genom der Zelle statt. Deshalb ist die eingeschleuste Plasmid-DNA auch nur für eine gewisse Zeit stabil. Diese Methode eignet sich für eine kurzfristige Überexpression eines bestimmten Gens z. B. im Rahmen eines Reportergenversuchs, bei dem die Zellen zwei Tage nach der Transfektion geerntet werden.

Tab. 2.9: Transfektionsbedingungen

	PC-12	HEK-293
Transfektionsreagenz	<i>LipofectamineTM2000</i>	<i>Fugene</i>
Transfektionsreagenz:DNA (µl:µg)	10 : 4	3 : 1
Zelldichte bei Aussaat (Zellen pro cm ²)	nativ: 1,37 x 10 ⁵ diff.: 8,57 x 10 ⁴	5 x 10 ⁴
Menge DNA für 9,6 cm ²	4 µg	0,8 µg
Transfektionsvolumen für 9,6 cm ²	2 ml	2 ml
Transfektionsvolumen für 3,5 cm ²	1 ml	1 ml

Die zu transfizierenden Zellen wurden 1-2 Tage vor der Transfektion in Collagen- bzw. Polylysin-D-hydrobromid-beschichteten Multischalen (Nunc) ausgesät (Zelldichte siehe Tab. 2.9). Durch leichte horizontale Schwenkbewegungen direkt nach der Aussaat wurden die Zellen gleichmäßig in den Wells verteilt.

PC-12-Zellen konnten entweder im differenzierten oder nicht-differenzierten Zustand transfiziert werden. Sollte der Versuch mit ausdifferenzierten Zellen durchgeführt werden, wurde das Medium am Tag nach der Aussaat (wenn sich die Zellen gut am Boden des Wells angeheftet hatten) gegen Medium mit NGF (Endkonzentration 100 ng/ml) [2.2.8.5] ausgetauscht. Die Transfektion fand 24 Stunden nach der NGF-Zugabe statt. Nicht zu differenzierende PC-12-Zellen wurden, wie HEK-293-Zellen auch, einen Tag nach der Aussaat (bei ca. 80% Konfluenz der Zellen) transfiziert.

Für die Transfektion wurden in einem 1,5 ml Reaktionsgefäß pro Well 100 µl DMEM-Medium vorgelegt. Das entsprechende Volumen des Transfektionsreagenzes (Tab. 2.9) wurde hinzupipettiert und der Ansatz wurde für 5 Minuten inkubiert. Es wurde darauf geachtet, dass das Reagenz nicht an den Rand des Gefäßes sondern direkt ins Medium pipettiert wurde. Dann wurde ein entsprechendes Volumen pCMV-Renilla-Plasmid (1,7 ng/cm²) zu der DMEM-Transfektionsreagenz-Mischung hinzupipettiert. Die Renilla-Luciferaseaktivität diente im Rahmen der Auswertung des Versuchs als Referenz-Wert für die Transfektionseffizienz. Diese Mischung wurde nun aliquotiert und mit der zu transfizierenden Plasmid-DNA versetzt. Für 15 (*Fugene*) bzw. 20 Minuten (*Lipofectamine*), in denen das Transfektionsreagenz die DNA einschließen konnte, wurde bei Raumtemperatur inkubiert. In der Zwischenzeit wurde das Medium aus den Wells abgesaugt und durch DMEM-Medium + Serum (ohne Antibiotikum oder

NGF, da sie die Transfektion stören könnten) ersetzt. Pro Well wurden nun 100 µl des DNA-Transfektionsreagenz-Gemisches vorsichtig hinzupipettiert. Nach 4-6-stündiger Inkubation im Brutschrank wurde das Medium gegen DMEM + Serum und Antibiotikum (und gegebenenfalls NGF) ausgetauscht.

Standardmäßig wurden die Zellen 48 Stunden nach der Transfektion geerntet und für die Bestimmung der Luciferase-Aktivität eingesetzt [2.2.8.7].

2.2.8.6.2 Stabile Transfektion

Die stabile Transfektion, also der künstliche Einbau eines Gens in das Genom der Wirtszelle, wurde mit Hilfe des *Flp-InTM Systems* (Invitrogen) durchgeführt. Als zu transfizierende Zelllinie diente die von HEK-293-Zellen abstammende Linie *Flp-InTM TREx 293*, welche das Plasmid *pFRT/lacZeo* mit einer *Flp-Recombination Target* (FRT)-Stelle bereits stabil im Genom integriert hat. Bei der Kultivierung der *Flp-InTM TREx 293* Linie wurde dem Medium 0,1% Zeocin zugemischt, um die Selektivität auf die *pFRT/lacZeo*-Plasmid tragenden Zellen zu erhalten. Das Gen, das stabil in die Zelllinie transfiziert werden sollte, wurde zuvor in den Expressionsvektor pcDNA5 kloniert, welcher ebenfalls eine FRT-Stelle und zusätzlich eine Hygromycin B-Resistenz besitzt. Außerdem war ein pOG44-Plasmid notwendig, der die *Flp*-Rekombinase exprimiert.

Für die Transfektion in einer 6-Well-Platte wurden zuerst je 100 µl DMEM mit je 6 µl *Fugene* vermischt und für 5 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Dann wurden je 3,6 µg pOG44 und 0,4 µg pcDNA5 (inkl. entsprechendes Gen) hinzupipettiert. Ein Verhältnis von mindestens 9:1 von pOG44 zu pcDNA5 war wichtig, da eine reichliche Expression der *Flp* Rekombinase für das Gelingen des stabilen Einbaus in das Genom von Nöten war. Nach 15 Minuten Inkubationszeit wurde das Gemisch auf die konfluent gewachsenen Zellen (waren 2 Tage zuvor mit einer Dichte von 6×10^5 ausplattiert worden) pipettiert. Zu diesem Zeitpunkt gab es kein Antibiotikum im Medium. Nach 1-2 Tagen wurden die Zellen vom Well der 6-Well-Platte abgespült und mit DMEM + 10% FCS + 1% Penicillin/Streptomycin in eine Zellkultur-Petrischale (Durchmesser 10 cm, Schütt) umgesetzt. Ein bis zwei Tage später wurden 300 µg/ml Hygromycin B auf die nahezu konfluent gewachsenen Zellen gegeben, um die Zellen, welche pcDNA5 inkl. des gewünschten Gens in ihr Genom integriert hatten, zu selektieren. Kurz darauf

war zu beobachten, dass sich die Zellen vom Boden der Petrischale ablösten. Es dauerte nun etwa eine Woche bis sich Zellklone, aus positiv selektierten Zellen, am Boden anlagerten. Das Wachstum der Klone wurde täglich unter dem Mikroskop beobachtet. Wenn die Klone eine Größe erreicht hatten, mit der sie schon mit bloßem Auge erkennbar waren, wurde das Medium von der Petrischale abgezogen und die Klone wurden punktuell mit etwa 10 µl DMEM + 10% FCS + 1% Penicillin/Streptomycin + 100 µg/ml Hygromycin B abgespült und in je ein Well einer 12-Well Platte mit demselben Medium überführt. Dort wuchsen sie bis zur Konfluenz, wurden dann in eine 6-Well-Platte umgesetzt, dann in eine Zellkulturflasche mit 25 cm² Kulturoberfläche und schließlich in eine 75 cm² Zellkulturflasche. An diesem Punkt wurden sie eingefroren [2.2.8.3] bzw. für Versuche genutzt.

2.2.8.7 Bestimmung der Promotoraktivität mit dem *Dual-Luciferase-System*

Die *Htr3b*-Promotoraktivitäten wurden indirekt über die Aktivität des Luciferase-Reportergens, dessen Expression direkt über vorangestellte *Htr3b*-Promotorfragmente reguliert worden war, bestimmt. Mit dem *Dual-Luciferase®Reporter Assay System* (Promega, Mannheim) wurde, über die Luciferase-Enzymaktivitäten, für jede Probe in zwei Schritten die relative Promotoraktivität (über „*Firefly*-Luciferase“) und die Transfektionseffizienz (über „*Renilla*-Luciferase“) bestimmt.

Ausgehend von transient transfizierten, eukaryotischen Zellen [2.2.8.6.1] wurde das *Dual-Luciferase*-Kit wie folgt angewendet. Die Zellernte erfolgte in der Regel 48 Stunden nach der Transfektion. Dazu wurde das Medium von den Zellen abgesaugt, die Zellen wurden mit 0,5 – 1 ml PBS gewaschen, dann mit dem PBS abgespült und in ein 2 ml Reaktionsgefäß überführt. Es folgte eine 10-minütige Zentrifugation bei 3.000 rpm und 4°C (Biofuge fresco, Heraeus). Das PBS wurde anschließend abgesaugt und das Zellpellet wurde in 125 µl (für 12-Well-Platten) bzw. 300 µl (für 6-Well-Platten) 1 x *Passive Lysis Buffer* (in 5 x Konzentration im Kit enthalten) resuspendiert. Im Anschluss wurden die teil-lysierten Zellen 3 x in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei 37°C unter Schütteln auf dem Thermomixer wieder aufgetaut, um eine vollständige Lyse zu gewährleisten. Die Zelltrümmer wurden zentrifugiert (Biofuge fresco; 13.000 rpm, 5 min, 4°C) und der proteinhaltige Überstand entweder

direkt zur Messung eingesetzt oder alternativ in 1,5 ml Reaktionsgefäße überführt und bis zur Messung bei -80°C gelagert.

Die Messung der relativen Luciferase-Aktivität erfolgte im *GloMax-96-Plate-Luminometer* (Turner BioSystems, Sunnyvale, USA). Das Gerät verfügt über zwei Injektoren, was eine vollautomatische Durchführung der Messung ermöglicht.

Die beiden Luciferin-Lösungen, LAR II (*Luciferase Assay Reagent II*) und *Stop & Glo*, wurden, da sie extrem lichtempfindlich sind, nicht fertig mit dem Kit geliefert, sondern mussten selbst hergestellt werden. LAR II (*Luciferase Assay Substrate*, lyophilisiert) wurde im entsprechenden Volumen LAR II-Puffer (*Luciferase Assay Buffer II*) gelöst, zu 1-2 ml aliquotiert und lichtgeschützt (mit Alufolie umwickelt) bei -80°C eingefroren. Die *Stop & Glo*-Lösung wurde vor jeder Messung frisch aus *Stop & Glo*[®] Substrat (50 x) und *Stop & Glo*[®]-Puffer im Verhältnis 1:50 angesetzt.

In die Wells einer weißen 96-Well-Platte (Greiner, Frickenhausen) wurden je 16 µl der Protein-Extrakte vorgelegt. Im Luminometer wurden dann vollautomatisch nacheinander jeweils 80 µl der beiden Puffer hinzupipettiert. Das Lumineszenzsignal wurde nach jeder Pufferzugabe für 10 Sekunden aufgenommen.

Aus dem Verhältnis der beiden Lumineszenzen (Firefly/Renilla) wurde anschließend die relative Luciferase-Aktivität berechnet. Nach einer Normierung der Werte am Firefly/Renilla-Quotienten des Leervektors, erhielt man die n-fache Aktivität des Promotors gegenüber der Grundaktivität der Kontrolle.

2.2.9 Proteinbiochemische Methoden

2.2.9.1 *In vitro* Transkription und Translation

Mit der „*In vitro* Transkription/Translation“ ist es möglich, Proteine außerhalb von Zellen zu exprimieren. Dies hat gewisse Vorteile gegenüber der *in vivo* Genexpression. So sind vor allem eine große Zeitersparnis und eine besondere Reinheit des erzeugten Proteins zu verzeichnen. Des Weiteren ist die *in vitro* Genexpression von Vorteil, wenn das erzeugte Protein toxisch gegenüber der produzierenden Zelle, nur schwer löslich oder anfällig für intrazelluläre Proteasen ist.

Das hier verwendete *TNT*[®] *T7 Quick Coupled Transcription/Translation System* (Promega) beinhaltet im beiliegenden *Quick Master Mix* alle notwendigen Reaktionskomponenten (RNA Polymerase, Nukleotide, Salze, Ribonuclease Inhibitor

und eine Retikulozytenlysat-Lösung) um aus Plasmid-DNA innerhalb einer Stunde vollständige Proteine zu erzeugen. Bedingung dafür ist allerdings, dass das Plasmid einen T7-Promotor vor dem zu exprimierenden Gen besitzt.

Der Reaktionsansatz wurde auf Eis pipettiert, dann für 1 Stunde bei 30°C inkubiert und zum Abstoppen der Reaktion wiederum auf Eis gestellt. Für die kurzfristige Lagerung des erzeugten Proteins empfahl sich die Aufbewahrung auf Eis. Für die langfristige Lagerung wurde der Proteinlösung 20% Glycerol zugesetzt und sie wurde bei -80°C eingefroren.

Reaktionsansatz:

TNT [®] T7 Quick Master Mix	40 µl
Methionin (1 mM)	2 µl
Plasmid-DNA (0,5 µg/µl)	2 µl
Nuklease-freies H ₂ O	ad 50 µl

2.2.9.2 Zellkernproteinisolierung

Zellkernproteine wurden nach zwei verschiedenen, jeweils zum Original modifizierten, Protokollen isoliert: nach dem Protokoll von Dignam (Dignam et al., 1983) und nach dem Protokoll für das *CellLyticTM NuCLEARTM Extraction Kit* von Sigma.

Zu beachten war jeweils, dass alle Schritte bei 4°C stattfanden und die pH-Werte der verwendeten Puffer bei 4°C genau auf 7,9 eingestellt waren, um eine Denaturierung der Proteine zu verhindern. Für die vorliegende Arbeit wurden Zellkernproteinextrakte aus PC-12-Zellen und HEK-293-Zellen hergestellt.

Protokoll nach Dignam

Tab. 2.10: Puffer A (pH 7,9 bei 4°C)

Reagenz	Stammlösung	Menge für 600 ml	Endkonzentration
HEPES/KOH	1 M	6 ml	10 mM
MgCl ₂	1 M	0,9 ml	1,5 mM
KCl	2 M	3 ml	10 mM
DTT (<i>kurz vor Gebrauch zusetzen</i>)	1 M	0,3 ml	0,5 mM
ddH ₂ O		ad 600 ml	

Tab. 2.11: Puffer C (pH 7,9 bei 4°C)

Reagenz	Stammlösung	Menge für 60 ml	Endkonzentration
HEPES/KOH	1 M	6 ml	10 mM
Glycerin 85 %		17,6 ml	25%
NaCl	2,5 M	10 ml	420 mM
MgCl ₂	1 M	90 µl	1,5 mM
EDTA	0,5 M	24 µl	0,2 mM
DTT (<i>kurz vor Gebrauch zusetzen</i>)	1 M	30 µl	0,5 mM
PMSF (<i>kurz vor Gebrauch zusetzen</i>)	0,25 M	0,12 ml	0,5 mM
ddH ₂ O		ad 60 ml	

Tab. 2.12: Puffer D (pH 7,9 bei 4°C)

Reagenz	Stammlösung	Menge für 1000 ml	Endkonzentration
HEPES/KOH	1 M	20 ml	20 mM
Glycerin 85 %		234 ml	20%
KCl	2 M	50 ml	100 mM
EDTA	0,5 M	0,4 ml	0,2 mM
DTT (<i>kurz vor Gebrauch zusetzen</i>)	1 M	0,5 ml	0,5 mM
PMSF (<i>kurz vor Gebrauch zusetzen</i>)	0,25 M	2 ml	0,5 mM
ddH ₂ O		ad 1000 ml	

Ausgangsmaterial dieser Variante der Zellkernproteinextraktion waren die kultivierten Zellen von zehn zu 80-90% konfluent bewachsenen, großen Kulturschalen (Petrischalen Falcon 353025, Schütt Göttingen). Das Medium wurde abgesaugt und die Zellen wurden mit je 7 ml PBS abgespült bzw. mit einem Zellschaber abgekratzt. Die Zellen wurden in vorgekühlte 50 ml Röhren überführt, die Platten wurden mit je 3 ml PBS nachgespült und ebenfalls überführt. Die 2 Röhren mit je 50 ml Zellsuspension wurden bei 4°C in der gekühlten Laborfuge 400R bei 900 x g für 10 Minuten zentrifugiert. Der Überstand wurde abgesaugt. Die Pellets wurden jeweils mit 4,5 ml Puffer A (Tab. 2.10) resuspendiert und in einem 50 ml Röhren gepoolt. Es schloss sich eine 10 minütige Quellung auf Eis an. Danach wurde erneut unter gleichen Bedingungen zentrifugiert. Das Pellet wurde in 1,8 ml Puffer A aufgenommen und die

Zellen im gekühlten Glashomogenisator (B-Typ Pistill) mit 18 Hüben zerstört, wobei die Zellkerne intakt blieben. Im Anschluss wurde das Zellysate in ein gekühltes Beckman Zentrifugenröhrchen (30 ml) überführt und bei 4°C für 10 Minuten bei 5.000 rpm (3.000 x g) in der Beckmanzentrifuge (Beckman JA-20 Rotor) zentrifugiert. Der Überstand wurde abgesaugt und das Pellet wiederum in 1,8 ml Puffer A resuspendiert und unter genannten Bedingungen nochmals zentrifugiert. Nach erneutem Absaugen des Überstandes und erneuter Aufnahme des Pellets in 1,8 ml Puffer A wurden die Zellkerne bei 4°C für 20 Minuten bei 11.000 rpm (14.500 x g) zentrifugiert. Die zytosolischen Verunreinigungen wurden mit dem Überstand entfernt.

Das Pellet aus groben Kernextrakten wurde in 1 ml Puffer C (Tab. 2.11) aufgenommen und in den Glashomogenisator Typ-B überführt. Durch 10 Hübe wurden nun auch die Zellkerne zerstört. Das Lysat wurde in ein Beckman-Zentrifugenröhrchen gegeben und auf Eis liegend im 4°C-Kühlraum auf einem Plattformschüttler geschaukelt. Anschließend wurde bei 11.000 rpm für 30 Minuten bei 4°C in der Beckmanzentrifuge zentrifugiert. Die Kernproteine befanden sich nun im Überstand, der in ein kleines Becherglas mit Magnetührer überführt wurde. Im 4°C-Kühlraum erfolgte nun die kontinuierliche, langsame (über ca. 30 Minuten) Zugabe von 0,33g Ammoniumsulfat-Kristallen, wodurch die Proteine ausgefällt wurden. Nach dem Lösen der letzten Kristalle wurde das Becherglas mit Parafilm verschlossen und der Rührvorgang bei 4°C weitere 30 Minuten fortgesetzt. Die trübe Flüssigkeit wurde in ein vorgekühltes 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt und die gefällten Proteine bei 4°C in der Biofuge fresco bei 13.000 rpm für 20 Minuten zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das Proteinpellet wurde mit 500 µl eiskaltem, sterilfiltriertem Puffer D (Tab. 2.12) resuspendiert.

Die anschließende Dialyse diente der Aufreinigung der Kernproteine von Salzen. Dazu wurde ein ca. 30 cm langes Stück Dialyseschlauch (Dialysis Tubing, Sigma) in destilliertem Wasser eingeweicht, durchgespült und in der Mikrowelle aufgeköcht. Es folgte ein langsamer Abkühlungsprozess durch die Zugabe von kaltem Wasser, gefolgt von erneutem Aufkochen in neuem destilliertem Wasser. Nachdem der Schlauch wieder abgekühlt war, wurde er mit Hilfe von Pasteurpipetten und einer elektrischen Pipettierhilfe mit dem Proteinextrakt gefüllt. Der Schlauch wurde mit etwas Druck befüllt und auf jeder Seite mit einem Knoten und einer Schlauchklemme (Schütt, Göttingen) verschlossen. Dann wurde der Schlauch an einer 10 ml Pipette (aus der

Zellkultur) festgeklebt und in ein 500 ml Becherglas, das mit 500 ml eiskaltem Puffer D (nicht steril) gefüllt war, hineingestellt. Die Dialyse erfolgte über Nacht unter langsamem Rühren auf einem Magnetrührer im 4°C-Kühlraum. Am nächsten Tag wurde das Dialysat in ein gekühltes 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt und bei 4°C in der Biofuge fresco bei 13.000 rpm für 20 Minuten zentrifugiert. Der Überstand mit den Zellkernproteinen wurde in ein neues Reaktionsgefäß überführt. Es folgte eine Konzentrationsbestimmung des Proteingehaltes [2.2.9.3]. Der Extrakt wurde dann in 200 µg Portionen (reicht für 10 EMSA-Proben) aliquotiert und nach Schockgefrieren in flüssigem Stickstoff bei -80°C gelagert.

Protokoll nach dem CellLyticTM NuCLEARTM Extraction Kit

Es wurde sich zwar an dem Protokoll von Sigma orientiert, aber alle Puffer wurden selbst hergestellt.

Tab. 2.13: Puffer A (pH 7,9 bei 4°C)

Reagenz	Stammlösung	Menge für 100 ml	Endkonzentration
HEPES/KOH	0,5 M	2 ml	10 mM
MgCl ₂	1 M	0,15 ml	1,5 mM
KCl	1 M	1 ml	10 mM
DTT (<i>kurz vor Gebrauch zusetzen</i>)	0,1 M	0,5 ml	0,5 mM
PMSF (<i>kurz vor Gebrauch zusetzen</i>)	gesättigte Lösung	1 ml	
Na-Vanadat (<i>kurz vor Gebrauch zusetzen</i>)	0,2 M	0,5 ml	1 mM
ddH ₂ O		ad 100 ml	

Tab. 2.14: Puffer B (pH 7,9 bei 4°C)

Reagenz	Stammlösung	Menge für 100 ml	Endkonzentration
HEPES/KOH	0,5 M	4 ml	20 mM
Glycerin 85 %		29,3 ml	25%
NaCl	5 M	8,4 ml	420 mM
MgCl ₂	1 M	150 µl	1,5 mM
EDTA	0,5 M	40 µl	0,2 mM

1% NP40 (=Modifikation)			
0,5% Na-DOC (=Modifikation)			
DTT (<i>kurz vor Gebrauch zusetzen</i>)	0,1 M	500 µl	0,5 mM
PMSF (<i>kurz vor Gebrauch zusetzen</i>)	gesättigte Lösung	1 ml	
Na-Vanadat (<i>kurz vor Gebrauch zusetzen</i>)	0,2 M	0,5 ml	1 mM
ddH ₂ O		ad 100 ml	

Ausgangsmaterial waren ca. $1,25 \times 10^8$ PC-12-Zellen (5 dicht bewachsene 75 cm²-Zellkulturflaschen) bzw. ca. $1,8 \times 10^8$ HEK-293-Zellen (10 dicht bewachsene 75 cm²-Zellkulturflaschen). Diese wurden mit ihrem Zellkulturmedium vom Flaschenboden abgespült und in vorgekühlte 50 ml Röhren (zwei für PC-12 bzw. vier für HEK-293) überführt. Die Röhren wurden bei 300 x g für 5 Minuten in der Laborfuge 400R bei 4°C zentrifugiert. Dann wurde der Überstand abgesaugt und die Zellen wurden mit je 10 ml 1 x PBS inkl. 1 mM Na-Orthovanadat gewaschen und der Inhalt der zwei bzw. vier Röhren wurde in einem Röhren zusammengepoolt. Die Röhren wurden bei 600 x g für 5 Minuten in der Laborfuge 400R bei 4°C zentrifugiert. Der Überstand wurde abgesaugt und die Zellen wurden mit je 1 ml 1 x PBS inkl. 1 mM Na-Orthovanadat gewaschen, in 2 ml Reaktionsgefäße überführt und in der Biofuge fresco bei 4°C bei 600 x g für 5 Minuten zentrifugiert. Nachdem der Überstand abgesaugt worden war, wurde das Packvolumen des Zellpellets bestimmt und das Pellet wurde im 5-fachen Volumen Puffer A (Tab. 2.13) aufgenommen. Schaumbildung war zu vermeiden. Die Zellen wurden nun für 20 Minuten auf Eis schwellen gelassen. Durch Trypanblau-Färbung wurde die Zerstörung der Zellen unter dem Mikroskop überprüft. Als nächstes wurden je 10 µl pro 100 µl Lösung 10% NP-40-Lösung hinzugeben (Endkonzentration = 1%) und der Ansatz wurde für 10 Sekunden heftig gevortext. Dann wurde bei 11.000 x g für 2 Minuten in der Biofuge fresco bei 4°C zentrifugiert. Der Überstand enthält die cytoplasmatische Fraktion, wurde aber hier nicht benötigt und deshalb verworfen. Das Pellet wurde nun in 2/3 seines Packvolumens Puffer B (Tab. 2.14) aufgenommen bzw. damit überschichtet. Zur Durchmischung der flüssigen und festen Phase wurden die Reaktionsgefäße auf einem Vortexer im 4°C-Kühlraum festgeklebt und es wurde für 30 Minuten bei ca. 1.800 rpm geschüttelt. Dann wurde bei 17.000 x g für 10 Minuten in der Biofuge fresco bei 4°C zentrifugiert. Der Überstand wurde in neue Reaktionsgefäße überführt. Er enthält die Zellkernproteine. Um noch

mehr Zellkernproteine aus den Zelllysaten zu isolieren, wurde zu dem Pellet nochmals Puffer B (etwa 1/3 bis 1/4 des vorherigen Volumens) gegeben und die Reaktionsgefäße wurden für 3 Stunden auf dem Vortexer im Kühlraum geschüttelt und dann wiederum zentrifugiert. Der Überstand wurde zum 1. Überstand gepoolt. Anschließend wurde der Proteingehalt des Zellkernproteinextrakts bestimmt [2.2.9.3]. Der Extrakt wurde dann aliquotiert und bei -80°C eingefroren.

2.2.9.3 Konzentrationsbestimmung des Proteingehaltes

Zur quantitativen Bestimmung der Proteinmenge in einer Lösung wurde das *Bicinchoninic Acid* (BCA) Assay durchgeführt. Bei dieser Methode werden zweiwertige Kupferionen durch die Reaktion mit Proteinen zu einwertigen Kupferionen umgewandelt. Dadurch färbt sich die Lösung violett.

In eine 96-Well-Platte (Sarstedt) wurde zuerst eine Eichgerade mit 1 µg/µl BSA-Lösung pipettiert. Es wurden je 3, 5, 7, 9 und 11 µl BSA-Lösung in Doppelbestimmungen eingesetzt. Die Proteinlösungen wurden unverdünnt oder in bis zu 1:10-facher Verdünnung in 3 separate Wells pipettiert. Dann wurde BCA-Kupfersulfat-Lösung hergestellt. Dafür wurden 50 Anteile der *Bicinchoninic Acid*-Lösung mit einem Anteil 4%iger Kupfersulfat-Lösung vermischt. Es entstand eine grüne Lösung. Zu der BSA-Lösung für die Eichgeradenbestimmung und den Proben wurden dann je 200 µl der Bicinchoninic-Kupfersulfat-Lösung hinzugegeben. Die 96-Well-Platte wurde dann für 30 Minuten bei 37°C inkubiert. Im Anschluss wurde der Proteingehalt in den einzelnen Wells über die Messung der Absorption bei 570 nm im *Tecan Ultra* Mikroplattengerät (Tecan, Crailsheim) bestimmt. Mit Hilfe der Geradengleichung aus der Eichgerade konnte die Proteinkonzentration mittels folgender Formel berechnet werden:

$$\frac{\text{Verdünnungsfaktor} * \text{Messwert}}{\text{Pipettiertes Volumen} * \text{Steigung der Geradengleichung}}$$

2.2.9.4 Auftrennung von Proteinen durch SDS-Polyacrylamid

SDS-Polyacrylamid-Gele dienen der elektrophoretischen Auftrennung denaturierter, negativ geladener Proteine entsprechend ihres Molekulargewichts. Bei dem so genannten *SDS-PAGE*-Verfahren werden die Proteine zuerst in einem Sammelgel

angereichert und anschließend in einem konzentrierteren Trenngel aufgetrennt. Die gleichmäßige Denaturierung der Proteine, die sich durch eine negative Ladung und die ellipsoide Form der Proteine auszeichnet, wird durch eine Vorabbehandlung des Proteingemischs mit dem anionischen Detergens SDS und β -Mercaptoethanol als Reduktionsmittel, sowie anschließender Erhitzung auf 95°C garantiert. Dadurch werden alle Sekundär-, Tertiär- und Quartärstrukturen der Proteine aufgebrochen, was zu einer vollständigen Entfaltung führt. Durch die Umhüllung der Proteine mit den negativ geladenen Sulfatgruppen wird außerdem jegliche Eigenladung der enthaltenen Aminosäurereste aufgehoben.

Für das Trenngel wurden zuerst alle Zutaten außer 10% Ammoniumperoxiddisulfat (APS) und N,N,N',N'-Tetramethylethyldiamin (TEMED) zusammenpipettiert (Tab. 2.15).

Tab. 2.15: Polyacrylamidgelzusammensetzung

Reagenz	12% Trenngel	4% Sammelgel
ddH ₂ O	4,35 μ l	3,25 μ l
1,5 M Tris-HCl (pH 8,8)	2,5 μ l	
0,5 M Tris-HCl (pH 6,8)		1,25 μ l
10% (w/v) SDS	0,1 μ l	0,05 μ l
40% (w/v) Acrylamid/Mix 37:5:1	3 μ l	0,5 μ l
10% APS	50 μ l	25 μ l
TEMED	5 μ l	2,5 μ l

Diese Lösung wurde dann für 10 Minuten entgast. Unterdessen wurde die *Mighty Small SE Dual Gel Caster*-Kammer zusammengebaut. Durch Zusatz von TEMED und APS zur Lösung wurde anschließend die radikalische Polymerisation gestartet. Das Trenngel wurde gegossen und sofort mit Wasser überschichtet, um eine exakte Grenzschicht zu gewährleisten. Etwa 30 Minuten später war das Trenngel auspolymerisiert und das Wasser konnte abgegossen werden. Das Sammelgel wurde auf gleiche Weise zusammenpipettiert (Tab. 2.15) und auf das Trenngel gegossen. Um Taschen für den Probenauftrag zu formen, wurde ein Kamm (10 Zähne) zwischen die Trennwände gesteckt. Das Sammelgel war ebenfalls nach 30 Minuten ausgehärtet.

Für die Gelelektrophorese wurde das Gel in die Elektrophoresekammer *Mighty Small II* eingespannt und diese wurde mit 1 x Elektrophorese-Puffer befüllt.

1 x Elektrophoresepuffer (pH 8,4):

Tris-HCl	3,03 g
Glycin	14,41 g
SDS	1 g
ddH ₂ O	ad 1 l

4 x Probenpuffer:

in 100 µl Aliquots bei -20°C gelagert

0,5 M Tris-HCl (pH 6,8)	6,6 ml
Glycerin	7,5 ml
10% (w/v) SDS	12,0 ml
2% (w/v) Bromphenolblau	0,5 ml
ddH ₂ O	ad 25 ml

Das Gel lief etwa 30 Minuten bei 12 mA vor. In der Zwischenzeit wurden die Proteinextrakte mit 4 x Probenpuffer für 5 min bei 95°C denaturiert, auf Eis abgekühlt und kurz abzentrifugiert. In die Taschen des Gels wurden dann je ca. 10 µg Proteingemisch aufgetragen. Als Größenstandard wurde 5 µl *SeeBlue® Plus2 Prestained Standard* (Invitrogen) aufgetragen. Während der Elektrophorese wurde die Gelkammer mit Wasser gekühlt. Die Proben durchliefen das Sammelgel bei 12 mA (pro Gel) für etwa 10-20 Minuten. Die Auftrennung im Trenngel erfolgte bei 25 mA (pro Gel) bis die Bromphenolblaufront fast aus dem Gel herauslief.

2.2.9.5 Silberfärbung

Die Silberfärbung zeichnet sich gegenüber der Coomassie-Färbung durch eine bis zu 1000-fach höhere Empfindlichkeit aus. Hiermit können also schon Banden mit nur 0,1 ng Protein nachgewiesen werden. Bei der Silberfärbung bildet das Ag⁺-Ion Komplexe mit den Glu-, Asp- und Cys-Resten der Proteine. Alkalischer Formaldehyd reduziert dann die Silberionen der Komplexe zu elementarem Silber und färbt somit die Proteine auf dem Gel ein. Nachteile der Silberfärbung sind allerdings, dass verschiedene Proteine mit unterschiedlicher Intensität färben und dass neben Proteinen auch Nukleinsäuren, Lipopolysaccharide, Lipide und Glykolipide eingefärbt werden.

Die Silberfärbung wurde mit dem *SilverQuest Silver Staining Kit* (Invitrogen) laut Hersteller-Anweisungen durchgeführt.

2.2.10 DNase I hypersensitivity Assay

Der Desoxyribonuklease I (DNase I) hypersensitivity Assay bietet eine Möglichkeit, um genregulatorische Regionen im Chromatin isolierter Zellkerne aufzuspüren. Dabei macht man sich den Umstand zunutze, dass Stellen im Chromatin, die potentielle Bindungsstellen für regulatorische Elemente aufweisen, eine offenere Konformation besitzen. Das heißt, dass an diesen Stellen nur eine schwache Bindung der DNA an Histone vorliegt. Transkriptionsfaktoren können die Histone leicht verdrängen und an die DNA binden. Gleichmaßen sind diese DNA-Abschnitte für Nukleasen, wie die DNase I, leicht angreif- und abbaubar und lassen sich dadurch mit dem DNase I hypersensitivity Assay identifizieren.

Tab. 2.16: Primer für den DNase I hypersensitivity Assay

Primer	5' – 3' Sequenz
ECR1_f	GCA GCG CCA GAC TGC TGT TAA ATC A
ECR1_r	GCT CAT GGG GAA GAA TCT GGA CAA G
ECR2_f	TCC AGC AGG ACC AGA TGT GCT CAG A
ECR2_r	TAT AGG CCC GTA CCT CAG AAT CCT C
ECR3-spezifische Taqman-Sonde	FAM-TCT CAC TGC ACA GAA TTT GCT AAC GG A-TAMRA
core_prom_f	CTA GGG CAC AGC CAA ATG GAG AAG C
core_prom_r	GCC CGG CAG AAT CAT TCA CAG GAC T

Die Zellernte und die Präparation der Zellkerne wurden wie bei Sambrook et al. (Sambrook und Russel, 2001) unter „*Mapping DNase-I-hypersensitive Sites*“ beschrieben, durchgeführt. Alle diese Schritte wurden auf Eis durchgeführt. Als Ausgangsmaterial dienten PC-12 Zellen, die zu ~80% adhären je mit oder ohne NGF auf zwei 15 cm Petrischalen (Falcon 353025, Schütt) gewachsen waren.

Für den DNase I-Verdau wurde in einigen, wie folgt beschriebenen, Schritten vom Sambrook-Protokoll abgewichen. Ab diesem Punkt des Experimentes wurden z. B. Kontrollen, in Form von aus PC-12-Zellen isolierter genomischer DNA, mitgeführt. Diese wurden unter gleichen Bedingungen, mit den gleichen DNase I-Konzentrationen versetzt. Es wurden je 180 µl der resuspendierten Nuclei bzw. je 20 µl gDNA (~600 ng/µl) + 160 µl Puffer A in die vorbeschrifteten Reaktionsgefäße überführt und

auf dem Thermomixer für ca. 5 Minuten auf 37°C vorgewärmt. Unterdessen wurde die DNase I (2 units/µl) mit DNase I-Puffer gemäß der gewünschten Konzentrationen (0; 0,1; 0,5; 1; 2; 5 units) ad 20 µl verdünnt. Der DNase I-Verdau bei 37°C wurde durch die Zugabe der verdünnten DNase I zu den Nuclei bzw. der gDNA gestartet und nach genau 20 Minuten mit je 25 µl Stop-Puffer (5% SDS, 0,1 M EDTA) abgestoppt. Es empfahl sich zwischen den jeweiligen Zugaben der DNase I und des Stop-Puffers je 30 Sekunden Zeit zu lassen, um für jede Probe die exakte Inkubationszeit zu gewährleisten. Nun wurde zu jeder Probe 40 µl Proteinase K (0,2 mg/ml) hinzupipettiert und der Ansatz wurde für 16 Stunden bei 50°C geschüttelt. Es folgte eine weitere Zugabe von je 100 µl Proteinase K und eine weitere Inkubation unter Schütteln für 2-3 Stunden bei 50°C. Dem schloß sich eine Phenol-Chloroform-Extraktion [2.2.2.12] und die Wiederaufnahme der DNA in TE-Puffer (Nuclei = 200µl, gDNA = 50 µl) an. Um das DNA-Pellet gleichmäßig zu lösen, wurden die Reaktionsgefäße bei 55°C über Nacht geschüttelt. Die DNA-Konzentration wurde dann photometrisch [2.2.2.4] bestimmt und auf 10 ng/µl verdünnt. Später wurden Taqman-SYBRgreen-Assays mit ECR-spezifischen Primern [2.2.5.4.2] bzw. für ECR 3 ein Taqman-Sonden-Assay [2.2.5.4.1] durchgeführt (Tab. 2.16).

2.2.11 Electrophoretic mobility shift assay

Der *Electrophoretic Mobility Shift Assay* (EMSA) ist eine Methode um die Bindung von Proteinen, z. B. Transkriptionsfaktoren, an DNA nachzuweisen.

2.2.11.1 Herstellung alpha-³²P-dCTP-markierter Sonden

Tab. 2.17: Oligonukleotide für EMSA

Oligonukleotide	5' – 3' Sequenz
282_core-lang_f	GAT CCT GTA AGG GAG ATG GAG TCT TGG
282_core-lang_r	GAT CCC AAG ACT CCA TCT CCC TTA CAG
282_core-l-mut_f	GAT CCT GTA AGG GAG TAC CAG TCT TGG
282_core-l-mut_r	GAT CCC AAG ACT GGT ACT CCC TTA CAG
282_GATA_mut_f	GAT CAA GGG ACT TGG AGT CTT GGC CAT CAT CCT AGG G
282_GATA_mut_r	GAT CCC CTA GGA TGA TGG CCA AGA CTC CAA GTC CCT T
282_YY1_mut_f	GAT CAA GGG AGA TAA AGT CTT GGC CAT CAT CCT AGG G
282_YY1_mut_r	GAT CCC CTA GGA TGA TGG CCA AGA CTT TAT CTC CCT T
282_YY1-mut3_f	GAT CAA GGG AGT ACC AGT CTT GGG GAT CAT CCT AGG G

282_YY1-mut3_r	GAT CCC CTA GGA TGA TCC CCA AGA CTG GTA CTC CCT T
282_ZID_mut_f	GAT CAA GGG AGG GAG AGT CTT GGC CAT CAT CCT AGG G
282_ZID_mut_r	GAT CCC CTA GGA TGA TGG CCA AGA CTC TCC CTC CCT T
AP-1_f	GAT CCC CGA CCG CAG TCA TCG CTC GTA
AP-1_r	GAT CTA CGA GCG ATG ACT GCG GTC GGG
Bio_POU_cons_f	GAT CGC TTA TGC AAA TAA GGT GCT
CRE_r	TAC TCT CTC TCT GAC GTC AGC CAA GGA GG
CRE2_f	ACT GGT CCT TGG CTG ACG TCA GAG AGA GAG
Del_kurz_lnk_f	CAA ACG GAG GAG GAG AAC AGA GTG
Del_kurz_lnk_r	CAC TCT GTT CTC CTC CT
E-Box1_f	GAT CCA AAG TTA CCA CAA GTG AGC AGA CA
E-Box1_r	GAT CTG TCT GCT CAC TTG TGG TAA CTT TG
E-Box2_f	GAT CCT CTG TGC GGT GCA CAT GTG CCT GTC CA
E-Box2_r	GAT CTG GAC AGG CAC ATG TGC ACC GCA CAG AG
E-Box2_mut_f	GAT CCT CTG TGC GGT GAT ATT GTG CCT GTC CA
E-Box2_mut_r	GAT CTG GAC AGG CAC AAT ATC ACC GCA CAG AG
Egr1_f	GAT CTC TCC TTG GGG CCC CCT CTA AAA TTG CG
Egr1_r	GAT CCG CAA TTT TAG AGG GGG CCC CAA GGA GA
Egr/Sp/TF_f	GAT CTG ACA GGA GAC GAG GGT GGA GGG GCA CTG AGA GA
Egr/Sp/TF_r	GAT CCT CTC TCA GTG CCC CTC CAC CCT CGT CTC CTG TC
EMSA_Del-ver_f	GAT CGG AGG AGG AGA ACA GAG TGG AGA GGA ACC CT
EMSA_Del-ver_r	GAT CAG GGT TCC TCT CCA CTC TGT TCT CCT CCT CC
Ins_kurz_lnk_f	CAA ACG GAG AAG GAG GAG AAC AGA GTG
Ins_kurz_lnk_r	CAC TCT GTT CTC CTC CTT CT
GATA_cons_f	GAT CCA CTT GAT AAC AGA AAG TGA TAA CTC T
GATA_cons_r	GAT CAG AGT TAT CAC TTT CTG TTA TCA AGT G
GS_5HT3b_Ins_s	AAC TGG CAA ACG GAG AAG GAG GAG AAC AGA GTG
GS_5HT3b_Ins_as	CAC TCT GTT CTC CTC CTT CTC CGT TTG
GS_Del_f	AAC TGG CAA ACG GAG GAG GAG AAC AGA GTG
GS_Del_r	CAC TCT GTT CTC CTC CTC CGT TTG
GS_Del-kurz_f	AAC TGG CAA ACG GAG GAG GAG AA
GS_Del-kurz_r	TTC TCC TCC TCC GTT TG
GS_Del-kurz_Bio	Biotin-TEG-AAC TGG CAA ACG GAG GAG GAG AA
GS_GR-cons_f	GAT CAG AAC AAT CTG TTC TAG AT
GS_GR-cons_r	ATC TAG AAC AGA TTG TTC T
GS_Ins_s_verk	CTG GCA AAC GGA GAA GGA GGA GAA
GS_Ins_as_verk	TTC TCC TCC TTC TCC GTT TG
GS_Ins_kurz_Bio_f	Biotin-TEG-AAC TGG CAA ACG GAG AAG GAG GAG AA
GS_Ins-lang_Bio_f	Biotin-TEG-AAC TGG CAA ACG GAG AAG GAG GAG AAC AGA GTG
GS_Ins-lang_f	AAC TGG CAA ACG GAG AAG GAG GAG AAC AGA GTG
GS_Ins-lang_r	CAC TCT GTT CTC CTC CTT CTC CGT TTG
GSIns_ver-del_f	GAT CGG AGA AGG AGG AGA AGA GAG GAA CC T
GSIns_ver-del_r	GAT CAG GGT TCC TCT CTT CTC CTC CTT CTC C
GSIns_ver_f	GAT CGG AGA AGG AGG AGA ACA GAG TGG AGA GGA ACC CT

GSIns_ver_r	GAT CAG GGT TCC TCT CCA CTC TGT TCT CCT CCT TCT CC
GSIns_ver-mut_f	GAT CGG AGA AGG AGG AGA TGT GAG TGG AGA GGA ACC CT
GSIns_ver-mut_r	GAT CAG GGT TCC TCT CCA CTC ACA TCT CCT CCT TCT CC
GS-272_f	GAT CGA GTC TTG GCC ATC ATC CTA GGG CAC
GS-272_r	GAT CGT GCC CTA GGA TGA TGG CCA AGA CTC
GS-282_f	GAT CAA GGG AGA TGG AGT CTT GGC CAT CAT CCT AGG G
GS-282_r	GAT CCC CTA GGA TGA TGG CCA AGA CTC CAT CTC CCT T
GS-282del1_f	GAT CAG ATG GAG TCT TGG CCA TCA TCC TAG GG
GS-282del1_r	GAT CCC CTA GGA TGA TGG CCA AGA CTC CAT CT
GS-282del2_f	GAT CAA GGG GAG TCT TGG CCA TCA TCC TAG GG
GS-282del2_r	GAT CCC CTA GGA TGA TGG CCA AGA CTC CCC TT
GS-282del3_f	GAT CAA GGG AGA TGT TGG CCA TCA TCC TAG GG
GS-282del3_r	GAT CCC CTA GGA TGA TGG CCA ACA TCT CCC TT
GS-282del4_f	GAT CAA GGG AGA TGG AGT CTT GGC TCC TAG GG
GS-282del4_r	GAT CCC CTA GGA GCC AAG ACT CCA TCT CCC TT
GS-282del5_f	GAT CAA GGG AGA TGG AGT CTT GGC CAT CAG GG
GS-282del5_r	GAT CCC CTG ATG GCC AAG ACT CCA TCT CCC TT
GS-282del6_f	GAT CAA GGG AGA TGG AGT CTT GGC CAT CAT CCT A
GS-282del6_r	GAT CTA GGA TGA TGG CCA AGA CTC CAT CTC CCT T
GS-247_f	GAT CGA GAA GCT TGT GGG CTT CGT GAA G
GS-247_r	GAT CCT TCA CGA AGC CCA CAA GCT TCT C
GS-96_f	GAT CGA GAT GCA AGG TCG AGC AGT G
GS-96_r	GAT CCA CTG CTC GAC CTT GCA TCT C
GS-78_f	GAT CGT GCT CTC GCT CGC CCG ACC GCC AGA
GS-78_r	GAT CTC TGG CGG TCG GGC GAG CGA GAG CAC
GS-22_f	GAT CGG GAG AAC AAT AGG CAA GTG CGA TG
GS-22_r	GAT CCA TCG CAC TTG CCT ATT GTT CTC CC
GS_M15_f	GAT CGG CAA CAA TCT GGA T
GS_M15_r	GAT CAT CCA GAT TGT TGC C
GS-282_NF1-mut_f	GAT CAA GGG AGA TGG AGT CTT AAT CAT CAT CCT AGG G
GS-282_NF1-mut_r	GAT CCC CTA GGA TGA TGA TTA AGA CTC CAT CTC CCT T
GS-282_SMAD-mut_f	GAT CAA GGG AGA TGG AGG AAT GGC CAT CAT CCT AGG G
GS-282_SMAD-mut_r	GAT CCC CTA GGA TGA TGG CCA TTC CTC CAT CTC CCT T
GS_M4_f	GAT CTC AAT TAT TAA TGA AAT TAG
GS_M4_r	GAT CCT AAT TTC ATT AAT AAT TGA
GS_M4_mut_f	GAT CTC AAT TAT TTT TGA AAT TAG
GS_M4_mut_r	GAT CCT AAT TTC AAA AAT AAT TGA
GS_M4_mut1_r	GAC CCT AAT TTC ATT AAT AAT TGA
GS_M4_mut2_f	GAC CCT TTT TTC AAA AAT AAT TGA
GS_M4_mut2_r	GAC CCT AAT TTC AAA AAT AAT TGA
GS_M4_new_r	GAT CTC AAT TAT TTT TGA AAA AAG
GS_M7_f	GAT CCC TGA ATG CCA GCA AGA ACA
GS_M7_r	GAT CTG TTC TTG CTG GCA TTC AGG
GS_M7_mut_f	GAT CCC TGA TCC CCA GCA AGA ACA

GS_M7_mut_r	GAT CTG TTC TTG CTG GGG ATC AGG
GS_M2-378_f	GAT CCT TAG GTA AAG GCT GGA AAG
GS_M2-378_r	GAT CCT TTC CAG CCT TTA CCT AAG
GS_M5_f	GAT CAA ATC ATA TTA GCC TGG AAT
GS_M5_r	GAT CAT TCC AGG CTA ATA TGA TTT
GS_M1_f	GAT CCC TCT CCT TGG GGC CCC CTC
GS_M1_r	GAT CGA GGG GGC CCC AAG GAG AGG
GS_M14_f	GAT CAA ATT GCA TTA TTC A
GS_M14_r	GAT CTG AAT AAT GCA ATT T
GS_M14_mut_f	GAT CAA AAA GCA GGA TTC A
GS_M14_mut_r	GAT CTG AAT CCT GCT TTT T
GS_M2-298_f	GAT CCT TAG CTG GCT CCT GTA AGG
GS_M2-298_r	GAT CCC TTA CAG GAG CCA GCT AAG
GS_M3-253_f	GAT CAG GGC ACA GCC AAA TGG AGA
GS_M3-253_r	GAT CTC TCC ATT TGG CTG TGC CCT
GS_M10_f	GAT CGA AGG CAT TAA TCC CCA AAC
GS_M10_r	GAT CGT TTG GGG ATT AAT GCC TTC
GS_M10_mut_f	GAT CGA AGG CAT TGG TCC CCA AAC
GS_M10_mut_r	GAT CGT TTG GGG ACC AAT GCC TTC
GS_M20_f	GAT CTC TGT GCG GTG CAC A
GS_M20_r	GAT CTG TGC ACC GCA CAG A
GS_M13_f	GAT CGT TTA CAA AAT CGC ACC AAA
GS_M13_r	GAT CTT TGG TGC GAT TTT GTA AAC
GS_M3-39_f	GAT CTC GTC TCT GGT ACC TGC CCC
GS_M3-39_r	GAT CGG GGC AGG TAC CAG AGA CGA
NF-1_cons_f	GAT CTT TTG GAT TGA AGC CAA TAT GAT AA
NF-1_cons_r	GAT CTT ATC ATA TTG GCT TCA ATC CAA AA
POU_cons_H2B_f	GAT CGC TTA TGC AAA TAA GGT GCT
POU_cons_H2B_r	GAT CAG CAC CTT ATT TGC ATA AGC
SMAD_cons_f	GAT CAG TAT GTC TAG ACT GA
SMAD_cons_r	GAT CTC AGT CTA GAC ATA CT
TFII-I_f	GAT CCA GGA GAC GAG GGT GGA GGG GCA CTG A
TFII-I_r	GAT CTC AGT GCC CCT CCA CCC TCG TCT CCT G
TFII-I_cons_f	GAT CGG AGG GAG G
TFII-I_cons_r	GAT CCC TCC CTC C
USF_cons_f	CAC CCG GTC ACG TGG CCT ACA CC
USF_cons_r	GGT GTA GGC CAC GTG ACC GGG TG
YY1_cons_f	GAT CCG CTC CCC GGC CAT CTT GGC GGC TGG T
YY1_cons_r	GAT CAC CAG CCG CCA AGA TGG CCG GGG AGC G
ZID_cons_f	GAT CTG GCT CCA TCA TC
ZID_cons_r	GAT CGA TGA TGG AGC CA

Bei der Konstruktion einer EMSA-Sonde wurde darauf geachtet, dass sich nach der Zusammenlagerung zweier Oligonukleotide mindestens ein überhängendes 5'-Ende ergab (meist GATC), an dem später die radioaktive Markierung stattfinden konnte. Die beiden, bis auf die Enden komplementären, Einzelstrang-Oligonukleotide (Tab. 2.17) wurden wie folgt in einem 1,5 ml Reaktionsgefäß vermischt:

Ansatz für Oligonukleotid-Zusammenlagerung:

Oligo_for (100 µM)	1 µl
Oligo_rev (100 µM)	1 µl
NaCl (0,5 M)	1 µl
ddH ₂ O	ad 50 µl

Das Reaktionsgefäß wurde in einen Schaumstoffträger gesteckt und damit in ein Becherglas mit ~95°C heißem Wasser und einem Magnetrührstab gesetzt. Das Becherglas wurde über Nacht auf den Magnetrührer mit ca. 100 rpm gestellt. Ziel war es, unter langsamem Abkühlen des Wassers, die Einzelstrang-Oligonukleotide zu doppelsträngigen DNA-Stücken zusammenzulagern.

Mit Hilfe des Klenow-Enzyms wurden dann die 5'-Überhänge aufgefüllt. Dabei wurde, neben den nicht radioaktiven dATP, dGTP und dTTP-Nukleotiden, alpha-³²P-markiertes dCTP eingebaut. Bevor die radioaktive Markierung stattfinden konnte, wurde der Arbeitsplatz im Isotopenlabor wie folgt vorbereitet. Die Arbeitsfläche wurde zuerst zur Feststellung eventueller Vorkontaminationen „abgetickert“. Dann wurden sterile Pipettenspitzen sowie ein Abfallbehälter zurechtgestellt und der Arbeitsplatz durch einen Plexiglasschirm abgeschirmt. Vor dem Betreten des „heißen“ Bereiches wurden die ds-Oligonukleotide mit dNTPs (A, G, T), dem 10 x Klenow-Puffer und ddH₂O auf Eis gemischt. Im radioaktiven Bereich wurden anschließend Klenow-Fragment und α-³²P-dCTP zugegeben und der Ansatz wurde für 1 Stunde bei 37°C inkubiert.

Ansatz für Einbau von α -³²P-dCTP:

ds-Oligonukleotide (2 pmol/ μ l)	1 μ l
dNTPs (A, G, T je 1 mM)	1 μ l
10 x Klenow-Puffer	2 μ l
ddH ₂ O	12 μ l
α - ³² P-dCTP (10 μ Ci/ μ l)	2 μ l
Klenow-Fragment (1 U/ μ l)	2 μ l

Zur Aufreinigung der markierten Oligonukleotide von den nicht eingebauten radioaktiven und nicht radioaktiven dNTPs wurden *mini Quick Spin Oligo Columns* (Roche) verwendet. Die Sephadexmatrix der Säule wurde durch über Kopf drehen, schütteln und anschnipsen homogenisiert. Der Durchlaufstopfen und der Deckel der Säule wurden dann entfernt und die Säule wurde in einem 1,5 ml Reaktionsgefäß zentrifugiert (3.200 x g = 900 rpm, 2 min, RT; Biofuge 15 R, Heraeus). Die Säule wurde dann in ein neues 1,5 ml Reaktionsgefäß gestellt, der radioaktive Ansatz (der zuvor kurz abzentrifugiert worden war, um das Herausspritzen der bei der Inkubation kondensierten Radioaktivität zu vermeiden) wurde auf die Mitte der Säule pipettiert und es wurde erneut für 4 Minuten zentrifugiert. Das Eluat enthielt die gereinigte Sonde. Die quantitative Bestimmung der Radioaktivität erfolgte im Szintillationsmessgerät LS1801. Dazu wurden 4 ml Szintillationslösung in einem Messröhrchen vorgelegt. Dann wurde 1 μ l der Sonde hinzupipettiert und die Menge der Radioaktivität wurde als *counts per minute* (cpm) ermittelt. Wenn die Aktivität hoch genug war, wurde die Sonde mit ddH₂O annähernd auf eine Konzentration von 15.000 cpm pro μ l verdünnt. Im EMSA wurde dann die Menge Sonde eingesetzt, die laut Messung genau einer Radioaktivität von 30.000 cpm entsprach.

2.2.11.2 Bindungsreaktion

4 x Bindungspuffer (pH 7,9):

bei 4°C gelagert

Hepes (pH 7,8)	80 mM
EDTA (pH 8)	4 mM
DTT	2 mM
Glycerin	40%
KCl	560 mM

Bindungsreaktion:

4 x Bindungspuffer	5 µl
Zellkernproteinextrakt [2.2.9.2]	20 µg
Poly dI-dC (1 µg/µl)	2 µl
ddH ₂ O	ad 18 µl

6 x Ladungspuffer:

bei -20 °C gelagert

Glycerin 87%	30 % (v/v)
Bromphenol Blau	0,25 % (w/v)
Xylen Cyanol FF	0,25 % (w/v)

Die Bindungsreaktion wurde ausschließlich auf Eis pipettiert und inkubiert. Das synthetische Polymer Poly dI-dC dient als unspezifischer Kompetitor und damit der Verringerung unspezifischer DNA-Bindungen. Der Bindungsreaktionsansatz wurde 10 Minuten inkubiert. Anschließend erfolgte die Zugabe der jeweiligen radioaktiven Sonde (30.000 cpm). Nach einer erneuten 15-minütigen Inkubation wurden je 4 µl des 6 x Ladungspuffers zugegeben und die Proben wurden auf ein Polyacrylamid-Gel geladen.

2.2.11.3 Nicht-denaturierende Gelelektrophorese

5% Polyacrylamidgel:

40% (w/v) Acrylamid/Mix 37:5:1	4,4 ml
5 x TBE	3,5 ml
ddH ₂ O	27 ml
<hr/>	
APS 10 % (w/v)	350 µl
TEMED	35 µl

5 x TBE (pH 8):

Tris	450 mM
Borsäure	450 mM
EDTA	10 mM

Vor dem Probenauftrag lief das Gel mit 0,5% TBE-Puffer etwa 30-60 Minuten bei 180 V (mA maximal) vor. Mit den Proben wurde das Gel dann etwa 1,5 Stunden, bis die untere, dunkelblaue Ladungspufferfront etwa 2 cm vor dem unteren Gelende war, laufen gelassen. Danach wurde das Gel auf ein Filterpapier (Nr. 2668, Schleicher und Schuell) transferiert, mit Frischhaltefolie überdeckt und dann mit einem weiteren Filterpapier als Unterlage auf den Gelrockner gelegt. Unter Vakuum wurde das Gel bei 70°C auf dem Gelrockner für 1,5 - 2 Stunden getrocknet. Zum sichtbar machen der Banden wurde das getrocknete Gel über Nacht in einer Kassette auf eine Fujifilm BAS1500-Platte gelegt und dann im PhosphorImager mit Hilfe der Softwares *BASreader* und *AIDA* ausgelesen bzw. bearbeitet. Am nächsten Tag wurde das getrocknete Gel in eine Röntgenfilm-Kassette überführt, mit einem Röntgenfilm (Hyperfilm MP (18 × 24 cm); GE Healthcare) belegt und über 7-10 Tage bei -80°C belichtet. Es folgte die Entwicklung des Röntgenfilms mit Entwickler G150 und Fixierer G354 (AGFA, Leverkusen) in der Dunkelkammer.

2.2.11.4 Konkurrenz im EMSA

Durch die Konkurrenz einer radioaktiv-markierten Sonde mit einem Überschuss einer nicht markierten Sonde lässt sich die Spezifität der EMSA-Bande nachweisen. Dafür wird der Bindungsreaktionsansatz nach der 10-minütigen Inkubation [2.2.11.2] mit der

nicht markierten, doppelsträngigen Sonde im entsprechenden Molekülverhältnis (ca. 5- bis 300-facher Überschuss zur radioaktiven Sonde) versetzt und weitere 10 Minuten inkubiert, bevor die radioaktive Sonde hinzukommt. Befindet sich auf der kalten Sonde eine Bindungssequenz für das Protein, welches die Bande verursacht, bindet dieses im Vorfeld an die kalte Sonde. Für die Bindungsreaktion mit der radioaktiven Sonde ist dann weniger oder kein entsprechendes Protein mehr im Kernextrakt vorhanden und die radioaktive Bande wird schwächer oder verschwindet komplett.

2.2.11.5 Supershift

Durch eine Antikörper-Reaktion zwischen dem zu identifizierenden Protein und einem spezifischen Antikörper gegen dieses, lässt sich eine Protein-DNA-Interaktion im Gelbild eindeutig nachweisen. Zur Auswahl des entsprechenden Antikörpers muss allerdings das Bindeprotein bekannt sein bzw. eine Vermutung vorliegen. Im Versuch wurden 0,5-2 µg des Antikörpers eine Stunde oder über Nacht vor der Zugabe der radioaktiven Sonde zur Bindungsreaktion pipettiert. Der Antikörper bindet dabei das entsprechende Protein. Im Gelbild wird eine Protein-Antikörper-Bindung als eine weiter oben laufende Bande sichtbar. Sie entsteht durch die Bildung eines größeren Komplexes aus Protein, Antikörper und DNA. Es kann aber auch passieren, dass durch die Antikörper-Protein-Bindung die DNA-Bindungsdomäne des Proteins verlegt wird und dadurch die Bande im Gel komplett verschwindet. Auch dies wird als Nachweis der spezifischen Protein-DNA-Interaktion akzeptiert.

2.2.12 Separation und Identifikation eines Proteins aus Gesamtprotein via FPLC, Dynabead-Bindung und Massenspektrometrie

Um ein bestimmtes DNA-Bindeprotein aus einem komplexen Proteingemisch zu isolieren, diente das Protokoll von Yaneva & Tempst als Vorlage (Yaneva und Tempst, 2006). Dieses beschreibt detailliert die methodischen Schritte von der Präfraktionierung der Proteine mit Hilfe von FPLC, über die Bindung von DNA an magnetische beads und anschließende Protein-Bindung und abschließend die Identifikation des Proteins mittels massenspektrometrischer Analyse. In der vorliegenden Arbeit wurde das

Protokoll auf die Identifizierung des -100_-102-Polymorphismus-bindenden Proteins abgestimmt.

2.2.12.1 FPLC

Bei der *Fast protein liquid chromatography* (FPLC) handelt es sich um eine Flüssigkeitschromatographie, mit der Proteine aus einer komplexen Proteinmischung aufgereinigt werden können.

2.2.12.1.1 Vorbereitung der FPLC-Säule

10 x Vor-Laufpuffer:

HEPES/KOH (pH 7,9 bei 4°C)	200 mM
EDTA	2 mM
NaCl	750 mM

Da keine passende Säule zu erwerben war, wurde eine Leersäule (Tricorn 5/50; GE Healthcare) selbst mit Ionenaustauscher-Cellulose (Whatman-P11-Cellulose; VWR) befüllt. Zur Vorbereitung wurde die Cellulose, gemäß der Anleitung des Herstellers, mehrfach, unter Kontrolle des pH-Werts, in 0,5 M NaOH, 0,5 M HCl, 10 x Vor-Laufpuffer und letztendlich 1 x Vor-Laufpuffer gewaschen und dann mit einem Trichter in die Säule gefüllt bis die Säule dicht mit der Cellulose gestopft war. Die frisch befüllte Säule wurde dann direkt in die FPLC-Anlage eingesetzt und über ca. 65 Stunden mit 1 x Vor-Laufpuffer bei 0,4 ml/min einlaufen gelassen.

2.2.12.1.2 Proteinfractionierung mittels FPLC

1 x Laufpuffer A:

HEPES/KOH (pH 7,9 bei 4°C)	20 mM
EDTA	0,2 mM
NaCl	75 mM
Glycerol	10%
DTT (<i>kurz vor Gebrauch zugeben</i>)	15 mM
PMSF (<i>kurz vor Gebrauch zugeben</i>)	0,5 mM

1 x Laufpuffer B:

HEPES/KOH (pH 7,9 bei 4°C)	20 mM
EDTA	0,2 mM
NaCl	1 M
Glycerol	10%
DTT (<i>kurz vor Gebrauch zugeben</i>)	15 mM
PMSF (<i>kurz vor Gebrauch zugeben</i>)	0,5 mM

Alle Schritte liefen bei 4°C ab. Pro FPLC-Lauf wurden 5 µg Zellkernproteine aus HEK-293-Zellen [2.2.9.2; Dignam-Protokoll] eingesetzt. Die Proteine waren ad 1 ml in 1 x Laufpuffer A gelöst. Vor dem Einspritzen der Proteinlösung lief die Säule für mindestens 30 Minuten mit 1 x Laufpuffer A ein. Es folgte ein Probedurchgang des Laufs ohne Proteine. Dabei wurde mit Hilfe der Software UNICORN 5.01 der stufenweise Anstieg der NaCl-Konzentration (75 mM, 100 mM, 300 mM, 500 mM, 800 mM, 1 M) in der Säule verfolgt und verifiziert. Nun wurde die Säule wieder mit Puffer A gespült bis die NaCl-Konzentration wieder 75 mM erreicht hatte. Für den Lauf mit den Zellkernproteinen wurden diese über einen 1 ml *loop* auf die Säule eingespritzt. Über einen Zeitraum von ca. 90 Minuten wurden 26 Fraktionen von je 1 ml Proteinlösungen mit steigender NaCl-Konzentration gesammelt, die dann sofort auf Eis gestellt wurden. Mit den 26 Fraktionen plus 3 Kontrollen (nicht FPLC-aufgereinigte Zellkernproteine (konzentriert), nicht FPLC-aufgereinigte Zellkernproteine (5 mg/ml-Verdünnung), 0-Wert aus FPLC-Aufreinigung (= Durchlauf direkt nach Einspritzen der Proteine auf die Säule)) wurde dann ein EMSA [2.2.11] durchgeführt. Als Sonde dienten GS_Ins-lang (Tab. 2.17) bzw. Ins_concat_Bio (Tab. 2.18), bei denen sich mit nicht FPLC-aufgereinigten Zellkernproteinen stets eine spezifische Bande gezeigt hatte. Hier sollten die Sonden dabei helfen, die Fraktionen und damit die Salzkonzentration, bei der das gesuchte Protein von der Säule gespült wird, zu identifizieren.

2.2.12.2 Dynabead-Bindung

Bei den *Dynabeads* der Firma Invitrogen handelt es sich um winzige magnetische Kügelchen, an deren Oberfläche kovalent Streptavidin gebunden ist. Über das Streptavidin lässt sich daran Biotin-markierte DNA binden. Beinhaltet die gebundene

DNA eine Bindesequenz für ein DNA-Bindeprotein kann dieses spezifisch an die beads gekoppelt und aus einem komplexen Proteingemisch isoliert werden.

2.2.12.2.1 Zusammenlagerung einzelsträngiger Oligonukleotide

Tab. 2.18: Oligonukleotide für *Dynabead*-Bindung

Oligonukleotid	5' – 3' Sequenz
Ins_concat_f_Bio	Biotin-GGA GAA GGA GGA GAA CAG AGT GGG AGA AGG AGG AGA ACA GAG TG
Ins_concat_r	CAC TCT GTT CTC CTC CTT CTC CCA CTC TGT TCT CCT CCT TCT CC
Ins_kurz_concat_f_Bio	Biotin-GGA GAA GGA GGA GAA GGA GAA GGA GGA GAA
Ins_kurz_concat_r	GAT CTT CTC CTC CTT CTC CTT CTC CTC CTT CTC C
Oligo dIdC	CIC ICI CIC ICI CIC ICI CIC ICI CIC ICI

Das Zusammenlagern zweier komplementärer Oligonukleotide (Tab. 2.18) lief wie schon unter 2.2.11.1 beschrieben ab. Die Unterschiede bestanden nur darin, dass jeweils ein Oligonukleotid eine Biotin-Markierung trug und dass die molare Konzentration der einzelnen Oligonukleotide im Ansatz mit 20 µM höher war. Das doppelsträngige Oligonukleotid mit der Ins_concat_Bio-Sequenz diente in der Folge als die Sonde, die das gesuchte Protein binden sollte, das Oligonukleotid mit der Ins_kurz_concat_Bio-Sequenz sollte nach den Vorhersagen aus EMSA-Versuchen kaum eine spezifische Protein-Bindung aufweisen und diente daher als Negativkontrolle.

2.2.12.2.2 Bindung von *ds*Oligonukleotiden an *Dynabeads*

2 x Bindungs- & Waschpuffer:

Tris-HCl (pH 7,5)	10 mM
EDTA	1 mM
NaCl	2 M

Zuerst wurden pro anstehender Bindungsreaktion 5 mg (= 500 µl) Dynabeads, gemäß der Anweisungen des Hersteller in 1 x Bindungs- & Waschpuffer gewaschen und anschließend in 1 ml 2 x Bindungs- & Waschpuffer aufgenommen.

Als nächstes wurden ca. 20 µg (= 51,5 µl) der zusammengelagerten ca. 30 bp langen Oligonukleotide mit ddH₂O ebenfalls auf ein Volumen von 1 ml gebracht und dann mit

den gewaschenen beads vermischt. Der 2 x Bindungs- & Waschpuffer wurde somit auf seine einfache Konzentration verdünnt und vermittelte nun optimale Bindungsbedingungen. Die Reaktion wurde für 10 Minuten bei Raumtemperatur auf dem Thermomixer bei ca. 700 rpm geschüttelt. Danach wurden die beads erneut gemäß den Hersteller-Angaben gewaschen.

Um im Vorfeld die Bindungseffizienz der dsOligonukleotide zu den *Dynabeads* zu überprüfen, wurde mit α -³²P-dCTP-markierten dsOligonukleotiden gearbeitet. Dafür wurde die Bindungsreaktion mit verschiedenen Mengen an *Dynabeads* und einer festen Menge (Überschuss) an radioaktiv-markierten dsOligonukleotiden durchgeführt. Die Radioaktivität in den Überständen der Bindungsreaktion und der einzelnen Waschschriffe sowie die letztendlich an die *Dynabeads* gebundene Radioaktivität wurde als cpm im Szintillationsmessgerät LS1801 gemessen. Darüber konnte die Menge gebundener dsOligonukleotide berechnet werden.

2.2.12.2.2 Bindung der FPLC-aufgereinigten Proteine an Dynabeads

Zur Vorbereitung wurden die beads 2 x mit je 500 μ l 1 x DNA-Bindungspuffer [2.2.11.2] gewaschen. Für den 2. Waschschriff wurden dem Puffer jeweils 0,1 mg/ml der unspezifischen Kompetitoren Poly dI-dC (Sigma) und Oligo dI-dC (selbst hergestellt aus zusammengelagerten einzelsträngigen Oligonukleotiden mit 30 bp langer, repetitiver Inosin-Cytosin-Sequenz (Tab. 2.18)) zugesetzt.

Bindungsreaktion:

4 x DNA-Bindungspuffer	375 μ l
FPLC-aufgereinigtes Protein	500 μ l
Poly dI-dC (1 μ g/ μ l)	150 μ l
Oligo dI-dC (40 μ M)	225 μ l
Protease-Inhibitor	225 μ l
ddH ₂ O	ad 1500 μ l

Die Bindungsreaktion wurde für 10 Minuten auf Eis inkubiert, bevor sie zu den „trockenen“ beads (der Waschpuffer war vorher abgesaugt worden) pipettiert wurde. Die gesamte Bindungsreaktion wurde nun für 6 Stunden im 4°C-Kühlraum inkubiert.

Dabei war das Reaktionsgefäß auf einem Vortexer festgeklebt und schüttelte bei ca. 500 rpm.

Anschließend wurden die beads inkl. der spezifisch gebundenen Proteine 3 x mit 1 x DNA-Bindungspuffer inkl. verschiedener unspezifischer Kompetitoren gewaschen. Der 1. Waschschrift wurde mit je 2,5 ml Puffer inkl. 0,1 mg/ml Poly dI-dC durchgeführt, der 2. Waschschrift mit je 1 ml Puffer inkl. je 0,001 mg/ml einzel- und doppelsträngiger *E. coli* DNA [2.2.2.5] (einzelssträngige DNA entstand durch 20-minütige Denaturierung bei 95°C) und der 3. Waschschrift mit je 5 ml Puffer ohne weitere Zusätze.

Nun wurden die Proteine von den beads eluiert. Dazu wurden je 50 µl 1 x Probenpuffer [2.2.9.4] zu den beads pipettiert und durch eine Inkubation bei 95°C für 5 Minuten eluiert. Der Probenpuffer mit den Proteinen wurde dann abgezogen und bis zur Weiterverarbeitung bei -20°C gelagert.

Im nächsten Schritt wurden je 10 µl der Proteine auf ein SDS-Polyacrylamid-Gel [2.2.9.4] aufgetragen. Die Proteinbanden wurden dann mittels Silberfärbung [2.2.9.5] sichtbar gemacht. Die Banden der Proteine, die von der Ins_concat_Bio-Sonde und der Negativkontrolle (Ins_kurz_concat_Bio-Sonde) eluiert worden waren, wurden verglichen und jene, die bei der Ins_concat_Bio-Sonde stärker waren, wurden ausgeschnitten und zur massenspektrometrischen Analyse (durchgeführt im Proteomanalyse-Labor der UMG unter der Leitung von Dr. A.R. Asif) gegeben.

2.2.13 RLM 5' RACE

Um die Transkriptionsstartpunkte des *Htr3b*-Gens zu identifizieren, wurde die 5'-RACE (*Rapid Amplification of cDNA ends*)-PCR Methode verwendet. Mit dieser Methode ist es möglich die 5'-untranslatierten Bereiche eines Transkripts, welche regulatorische Elemente für mRNA-Stabilität und Translation tragen, sichtbar zu machen, also den 5'-Startpunkt des Transkriptes zu identifizieren. Die hier angewandte *RNA Ligase Mediated RACE* (RLM 5'-RACE) Methode basiert auf der Capfinder-Strategie und dient der selektiven Darstellung der vollständigen 5'-Enden der cDNA. Falsch positive Ergebnisse aus degradierter mRNA, rRNA, tRNA und aus DNA werden ausgeschlossen.

In der vorliegenden Arbeit wurde laut Herstellerprotokoll mit dem *First Choice*[®] *RLM-RACE-Kit* (Ambion) gearbeitet. Ausgangsmaterial waren PC-12-Zellen, die zuvor mit

pXP2::*Htr3b*_{-2057bp} bzw. pXP2::*Htr3b*_{-258bp} transfiziert worden waren. Sie wurden dann für 24 Stunden mit NGF weiterbehandelt und anschließend geerntet. Ihre RNA wurde mit dem *RNeasy Plus Mini Kit* (Qiagen) [2.2.5.2] isoliert. Die RNA wurde als erstes mit einer alkalischen Phosphatase (*Calf Intestine Phosphatase*, CIP) behandelt, um freie 5'-Phosphatenden zu dephosphorylieren. Dieser Schritt zerstört alle mRNAs, die keine Cap-Struktur (7-Methyl-Guanidin und 3 Phosphatgruppen) besitzen, lässt aber alle mRNAs mit Kappe intakt.

Nun wurde der Ansatz mittels Phenol-Chloroform-Extraktion [2.2.2.12] aufgereinigt und anschließend in 11 µl RNase-freiem H₂O aufgenommen.

Als nächstes folgte die Behandlung mit einer Nikotinsäure-Pyrophosphatase (*Tobacco Acid Pyrophosphatase*; TAP), die der Abspaltung der Caps dient und nur die letzte 5'-Phosphatgruppe intakt lässt. Anschließend wurde die mRNA mit dem 5'-RACE-Adapter-Oligonukleotid (Tab. 2.19) ligiert. Ab diesem Schritt wurde eine Negativkontrolle mit nur CIP-behandelter mRNA mitgeführt. Der letzte Schritt, der mit den Komponenten des *First Choice*[®] *RLM-RACE-Kits* durchgeführt wurde, ist die Reverse Transkription, also die cDNA-Synthese.

Nun schlossen sich 2-3 *nested*-PCRs an. Von den dazu verwendeten Primern war jeweils einer komplementär zum 5'-RACE-Adapter war und der andere lag innerhalb des translatierten Bereichs des *Htr3b*-Gens (Tab. 2.19).

Tab. 2.19: Primer für den 5'-RACE-Versuch

Primer	5' – 3' Sequenz
RACE_Adapter_f	GCT GAT GGC GAT GAA TGA ACA CTG CGT TTG CTG GCT TTG ATG AAA AGG GCA CAG CCA AAT GGA GAA GCT
RACE_Htr3b_r1	GGA CGC AAA GGT CCA GGT AGA CAG
RACE_Htr3b_r2	GTG GTG GCC TCA GCC CAG TTG TAA
RACE_Htr3b_r3	CTG GTG AGG CGA TGC AGA GAG GAA
RACE_outer_Ambion_f	GCT GAT GGC GAT GAA TGA ACA CTG
RACE_inner_Ambion_f	CGC GGA TCC GAA CAC TGC GTT TGC TGG CTT TGA TG
5-RASE_int-FAM	FAM-CGC GGA TCC GAA CAC TGC GTT TGC TGG CTT TGA TG

RACE-PCR-Ansatz:

10 x Taq-Polymerase-Puffer	5 µl
Q-Solution	5 µl
dNTP-Mix	4 µl
5'-RACE-Primer_f (10 µM)	2 µl
genspezifischer Rückwärtsprimer	2 µl
Taq-Polymerase	0,3 µl
cDNA bzw. Negativkontrolle	1 µl
ddH ₂ O	ad 50 µl

PCR-Bedingungen:

Phase	Dauer	Temperatur	
Denaturierung (Hotstart)	3 min	94°C	
Denaturierung	30 sec	94°C	} 35 x
Primeranlagerung	30 sec	61°C	
Elongation	30 sec	72°C	
Finale Elongation	7 min	72°C	
Kühlung	for ever	8°C	

20 µl jeder PCR-Reaktion wurden auf ein 1,5% Agarosegel aufgetragen, um den Amplifikationserfolg zu dokumentieren.

Nun wurden zwei verschiedene methodische Strategien verfolgt, um die Transkriptionsstartpunkte zu identifizieren. Zum einen wurden PCR-Produkte nach der 3. PCR in TOPO-Vektoren kloniert, per Miniprep [2.2.7.1] isoliert und sequenziert [2.2.4.1]. Zum anderen wurde der 5'-RACE-Primer_f in der 3. PCR durch einen Primer mit gleicher Sequenz, aber zusätzlicher 6-Carboxyfluorescein (FAM) Markierung ersetzt. Das PCR-Produkt wurde dann einer Fragmentlängenanalyse [2.2.4.2] im *3130xl Genetic Analyser* unterzogen.

2.2.14 Methylierungsanalyse

2.2.14.1 *In vitro* Methylierung von Reportergenplasmiden mit CpG-Methyltransferase

Durch Inkubation mit der CpG-Methyltransferase M.SssI (New England Biolabs) werden in doppelsträngiger DNA alle Cytosine einer 5'...CG...3'-Sequenz methyliert. Mit Hilfe der CpG-Methyltransferase lassen sich also CpG-Stellen z. B. in DNA-Fragmenten bzw. ganzen Reportergenplasmiden innerhalb kurzer Zeit und ohne Zellsystem methylieren.

Experimentell wurden hier zwei verschiedene methodische Strategien verfolgt. Zum einen wurden komplette Plasmide (pXP2::*Htr3b*_{-445bp} und ein leerer pXP2-Vektor als Negativkontrolle) mit der CpG-Methyltransferase behandelt bzw. ohne die Methyltransferase aber mit dem Methylgruppendonor S-Adenosylmethionin (SAM) nur scheinmethyliert (Abb. 2.2).

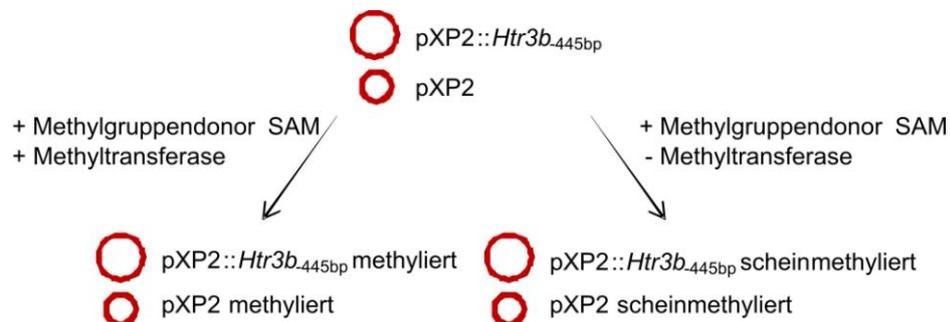


Abb. 2.2: Methylierung und Scheinmethylierung des ganzen pXP2::*Htr3b*_{-445bp}-Plasmids. Nähere Erläuterungen sind im Text zu finden.

Für die andere methodische Strategie wurde das *Htr3b*_{-445bp}-Promotorfragment zuerst durch Restriktionsverdau [2.2.2.8] mit *Bam*HI und *Xma*I aus dem Plasmid herausgeschnitten, separat methyliert bzw. scheinmethyliert, dann wieder in den pXP2-Vektor zurückligiert [2.2.2.11] und mit dem *QIAquick PCR-Purification Kit* (Qiagen) aufgereinigt [2.2.2.6.2] (Abb. 2.3).

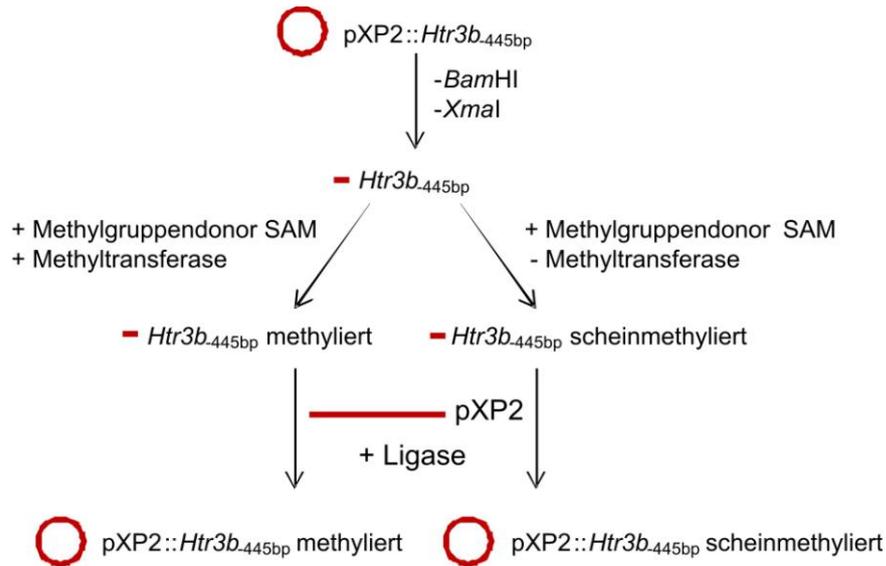


Abb. 2.3: Methylierung und Scheinmethylierung des *Htr3b*.445bp-Promotorfragments. Nähere Erläuterungen sind im Text zu finden.

Der CpG-Methyltransferase-Reaktionsansatz setzte sich in beiden Fällen wie in Tab. 2.20 gezeigt zusammen, konnte aber je nach verfügbarer DNA-Menge noch angepasst werden. Es wurden DNA-Mengen von 0,4-10 µg benutzt.

Tab. 2.20: Ansätze für die Methylierungsreaktion mit 5 µg DNA

Reagenz	Methylierung	Scheinmethylierung
10 x NEB-Puffer 2	5 µl	5 µl
SAM [3,2 mM]	2,5 µl	2,5 µl
M.SssI [4 U/µl]	3,75 µl	-
DNA	5 µg	5 µg
ddH ₂ O	ad 50 µl	ad 50 µl

Die Ansätze wurden für 3 Stunden bei 37°C inkubiert und dann mit dem *QIAquick PCR Purification Kit* [2.2.2.6.2] aufgereinigt.

Die Reporter-Gen-Plasmide wurden später transient in PC-12-Zellen transfiziert [2.2.8.6.1] und die Promotoraktivität wurde mit Hilfe des *Dual-Luciferase-Systems* [2.2.8.7] ermittelt.

2.2.14.2 *In vivo* Methylierung nach PC-12-Ausdifferenzierung (Bisulfit-Sequenzierung)

Die Bisulfit-Sequenzierung wird zur Identifizierung von Methylierungsmustern der DNA eingesetzt. Hierfür wird DNA mit Bisulfit behandelt wodurch unmethyliertes Cytosin zu Uracil umgewandelt wird. 5-Methylcytosin bleibt jedoch unverändert. Es wird also eine Veränderung der DNA-Sequenz hervorgerufen, die durch eine anschließende Sequenzierung der DNA identifiziert werden kann.

Ausgangsmaterial für diesen Versuch war genomische DNA aus PC-12-Zellen, die über unterschiedlich lange Zeiten auf 6-Well-Platten adhärent kultiviert [2.2.8.1.1] und mit NGF differenziert [2.2.8.5] worden waren. Die DNA wurde aus den Zellen isoliert [2.2.2.5]. Je 700 ng DNA wurde dann mit Bisulfit behandelt. Die Bisulfit-Konvertierung wurde laut Hersteller-Protokoll mit Hilfe des *EpiTect Bisulfite Kits* (Qiagen) vorgenommen.

Die Aufreinigung der Bisulfit-Reaktion erfolgte ebenfalls laut Protokoll mit dem *EpiTect Bisulfite Kit* (Qiagen) und dem *QiaCube-Roboter* (Qiagen). Die DNA-Ausbeuten nach der Aufreinigung lagen zwischen 3-13 ng/ μ l.

Im Anschluss wurde eine PCR mit Bisulfit-spezifischen Primern durchgeführt (Tab. 2.21). Diese Primer wurden mit Hilfe der *Methyl Primer Express Software v1.0* (Applied Biosystems) herausgesucht. Sie sind komplementär zur Bisulfit-veränderten DNA-Sequenz, binden also selektiv an diese und nicht an unkonvertierte DNA. Die Primer liegen allerdings nicht direkt an den potentiellen Methylierungsstellen, sondern flankieren den CpG-Insel tragenden Bereich.

Tab. 2.21: Primer für die Bisulfitsequenzierung

Primer	5' – 3' Sequenz
Htr3b_BSP_f	AGT TAA ATG GAG AAG TTT GTG G
Htr3b_BSP_r	AAC AAA ACC ACA AAA AAA TCA T

Bisulfit-spezifische PCR:

Hotstar Mastermix (Qiagen)	12,5 µl
Htr3b_BSP_f (10 µM)	1 µl
Htr3b_BSP_r (10 µM)	1 µl
Bisulfit-konvertierte DNA (~10 ng/µl)	6 µl
ddH ₂ O	ad 25 µl

PCR-Bedingungen:

Phase	Dauer	Temperatur	
Denaturierung	15 min	95°C	
Denaturierung	30 sec	94°C	} 50 x
Primeranlagerung	30 sec	54°C	
Elongation	1:30 min	65°C	
Finale Elongation	5 min	65°C	
Kühlung	for ever	8°C	

Der Erfolg der PCR wurde mit einem Agarose-Gel [2.2.2.3] dokumentiert. Die PCR-Produkte wurden dann entweder aus dem Gel [2.2.2.6.1] oder der verbleibenden Lösung [2.2.2.6.2] aufgereinigt und in TOPO-Vektoren kloniert [2.2.3.2]. Pro Bedingung wurden später je 10 der aus *E.coli* aufgereinigten [2.2.7.1] TOPO-Plasmide sequenziert [2.2.4.1]. Das Methylierungsmuster wurde für jeden Klon einzeln dokumentiert.

2.2.14.3 Demethylierung durch den Methyltransferase-Hemmer 5-Aza-2'-Deoxycytidin

Das zytostatisch wirkende 5-Aza-2'-Deoxycytidin wirkt durch Einbau in DNA bzw. RNA hemmend auf Methyltransferasen und bewirkt damit eine Demethylierung der Nukleinsäuren. In lebenden Zellen hat dieser Prozess große Auswirkungen auf die Stoffwechselprozesse, da durch die fehlende Methylierung die Genregulation erheblich verändert wird. Nicht methylierte Gene gelten als potentiell „angeschaltet“.

Am Tag vor der Methyltransferase-Hemmer-Zugabe wurden die Zellen mit einer Dichte von 3×10^5 Zellen pro Well in 12-Well-Platten ausgesät und dort adhärent kultiviert [2.2.8.1.1]. Am nächsten Tag wurde das Zellkulturmedium durch Medium mit

0–2,5 μM 5-Aza-2'-Deoxycytidin (Sigma), welches zuvor in DMSO gelöst worden war, ersetzt. Jeweils 24 Stunden vor der Zellernte wurde dem Medium zusätzlich 300 nM Trichostatin A (Sigma), ebenfalls gelöst in DMSO, zugesetzt. Die Zellernte mit je 350 μl RLT-Puffer + β -Mercaptoethanol erfolgte 24, 48, 72 und 96 Stunden nach 5-Aza-2'-Deoxycytidin-Zugabe. Aus den behandelten Zellen wurde RNA isoliert [2.2.5.2] und diese wurde in cDNA [2.2.5.3] umgeschrieben. Mit der cDNA und Genexpressionsassays für *Htr3a*, *Htr3b* und *Tbp* (Applied Biosystems) wurden *Real-time-PCRs* durchgeführt [2.2.5.4] und darüber die Veränderung der jeweiligen Genexpression bestimmt.

3 Ergebnisse

3.1 Charakterisierung des *Htr3b*-Promotors der Ratte

3.1.1 Bedeutung des Differenzierungsstatus von PC-12-Zellen für die transkriptionelle Regulation von *Htr3a* und *Htr3b*

Ein Großteil der Experimente im Rahmen dieser Doktorarbeit wurde mit der Ratten-Phäochromozytom-Zelllinie PC-12 durchgeführt. Diese Zellen wachsen ohne Beschichtung der Kulturgefäßoberfläche und ohne Zugabe von Wachstumsfaktoren als Suspensionszellen. Wenn die Kulturgefäße mit Collagen oder Poly-D-Lysin-Hydrobromid vorbeschichtet sind, wachsen die Zellen adhärent. Alternativ können die Zellen durch die Zugabe von 100 ng/ml des Nervenwachstumsfaktors NGF (Nerve growth factor) differenziert werden. Die Differenzierung konnte über die allmähliche Ausbildung von Dendriten unter dem Mikroskop verfolgt werden (Abb. 3.1).

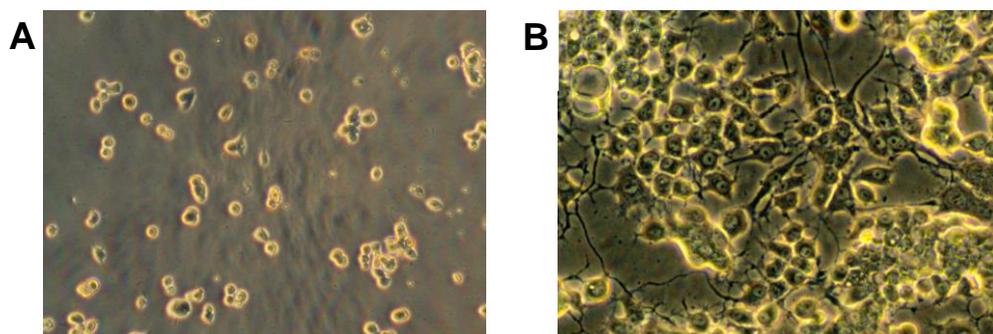


Abb. 3.1: Adhärenz wachsende PC-12-Zellen. **A** Zellen direkt nach Anheftung an den Boden der Zellkulturschale, 200-fache Vergrößerung. **B** Zellen 3 Tage nach der NGF-Zugabe, 400-fache Vergrößerung.

Auch die endogene Genexpression der Ratten-5-HT₃-Rezeptoruntereinheiten *Htr3a* und *Htr3b* verändert sich während einer Differenzierung der PC-12-Zellen durch NGF (Abb. 3.2). Unbehandelte Suspensionszellen (Tag -1) exprimierten im Vergleich zu unbehandelten aber adhärenz wachsenden Zellen nur etwa 2/3 bzw. die Hälfte der Menge an *Htr3a* bzw. *Htr3b*. Nach der Zugabe von NGF zu adhärenz Zellen stiegen die *Htr3a*- und *Htr3b*-Expressionen sprunghaft auf das 3,5- bis 5,5-fache an und blieben bis zum Tag 3 relativ konstant. Ab Tag 5 waren Rückgänge der Expressionen zu beobachten.

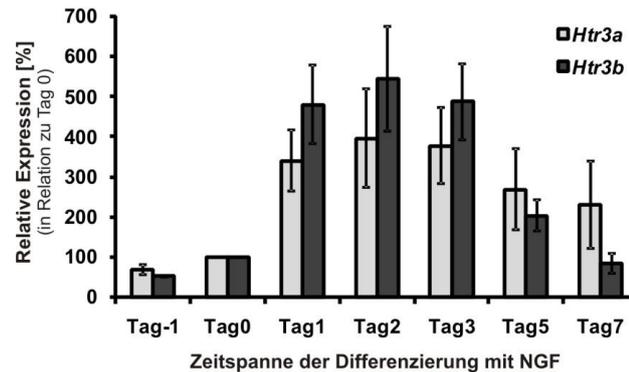


Abb. 3.2: Effekte der NGF-Behandlung auf die Expression von *Htr3a* und *Htr3b* in PC-12-Zellen. PC-12-Zellen wurden adhären über unterschiedliche Zeitspannen (0-7 Tage) kultiviert und ab Tag 0 mit 100 ng/ml NGF behandelt. „Tag -1“ steht für PC-12-Zellen, die vor der adhären Kultivierung, als Suspensionszellen, geerntet wurden. Die Messwerte sind in Relation zu adhären, undifferenzierten Zellen (Tag 0 = 100%) angegeben. Gezeigt sind die Mittelwerte +/-SEM aus mindestens 2 unabhängigen Versuchen. Die Messungen wurden in Doppelbestimmungen durchgeführt.

Bei den Luciferasemessungen zeigten die *Htr3b*-Promotorfragmente in NGF-behandelten PC-12-Zellen deutlich höhere Promotoraktivitäten, als in undifferenzierten Zellen (Abb. 3.3). Die gemessenen Promotoraktivitäten derselben Promotorfragmente waren in differenzierten Zellen 2-4,5-fach höher als in undifferenzierten Zellen. Reporter-genversuche wurden in der vorliegenden Arbeit überwiegend mit differenzierten PC-12-Zellen durchgeführt. Dies bedeutet, dass die Zellen über die Versuchsdauer von 3 Tagen mit NGF kultiviert worden waren.

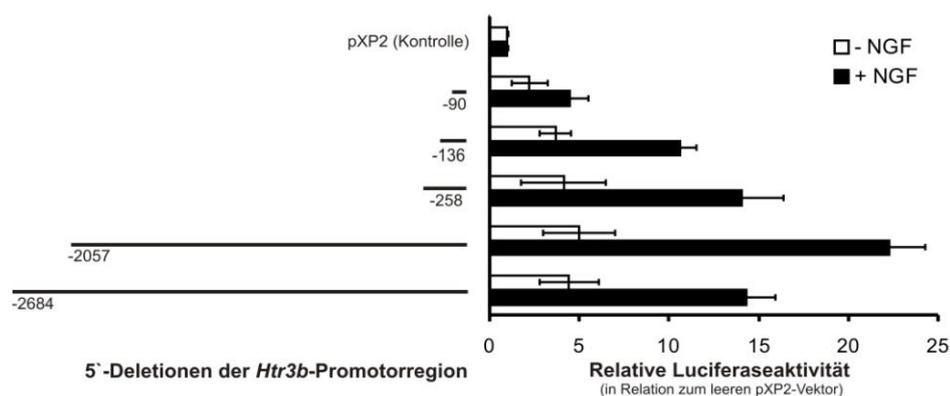


Abb. 3.3: Promotoraktivitäten der 5'-verkürzten Ratten-*Htr3b*-Promotorfragmente in PC-12-Zellen in Abhängigkeit von der Zelldifferenzierung mittels NGF. Links in der Abbildung sind die Abstufungen der 5'-Deletionen schematisch dargestellt. Die Beschriftungen am jeweiligen 5'-Ende geben die Position zum ATG wieder. Alle Fragmente enden -15 bp vor dem ATG. Am Tag nach der Aussaat wurde dem Kulturmedium 100 ng/ml NGF zugesetzt und die Zellen wurden bis zur transienten Transfektion für 24 Stunden mit NGF kultiviert. Während der Transfektion durfte kein NGF im Medium sein, weil es die Transfektion stören könnte. Vier bis sechs Stunden nach der Transfektion wurde dem Medium wieder NGF zugegeben und die Zellen wurden bis zur Ernte (48 Stunden nach der Transfektion) mit diesem Medium kultiviert. Experimente mit undifferenzierten PC-12-Zellen folgten demselben Schema, aber ohne die Zugabe von NGF. Die Messwerte sind als Vielfaches der Grundaktivität des pXP2-Plasmids ohne den *Htr3b*-Promotor dargestellt. Gezeigt sind die Mittelwerte +/-SEM aus mindestens 2 unabhängigen Messungen, die in Doppelbestimmungen durchgeführt wurden.

3.1.2 Identifizierung der *Htr3b*-Transkriptionsstartseiten

Die Transkriptionsstartseiten (TSS) innerhalb des Ratten-*Htr3b*-Promotors wurden mit Hilfe der RLM-5'-RACE-Methode identifiziert. Dazu wurde RNA aus PC-12-Zellen, die über 48 Stunden mit NGF behandelt worden waren, benutzt. Mit der gewonnenen cDNA wurden dann *nested PCR*s mit je einem genspezifischen Primer und einem Primer mit der 5'-RACE-Adapter-Sequenz durchgeführt, um die 5'-Bereiche des *Htr3b*-Gens inkl. der TSS zu amplifizieren. (Die Sequenzen der benutzten Primern sind in Tab. 2.19 gezeigt.) Zur Kontrolle, dass auch wirklich nur die cDNA der RNA, die ursprünglich eine Cap-Struktur aufwies, amplifiziert wurde, wurden Negativkontrollen ohne *Tobacco Acid Pyrophosphatase* (TAP)-Behandlung mitgeführt.

Im Agarosegel waren ab der 2. PCR diverse Banden bei den TAP-behandelten Proben, aber nicht bei den Proben ohne TAP-Behandlung zu sehen (Abb. 3.4A). Es zeigte sich eine gewisse Variabilität in der Größe und der Intensität der PCR-Produkte, die aus der gleichen Ausgangs-cDNA und mit den gleichen Primern, in parallel durchgeführten Reaktionen, amplifiziert worden waren (Abb. 3.4B). Die Gründe für diese Unterschiede sind unbekannt. Kontaminationen durch Fremd-DNA wurden jedoch durch jeweils parallel mitgeführte PCR's ohne DNA-template, die keinerlei Banden im Agarosegel zeigten (Daten nicht gezeigt), ausgeschlossen. Am stärksten war aber jeweils die Bande bei ca. 380 bp. Weitere Experimente, die mit mehreren unabhängigen PCR's durchgeführt wurden, zeigten im Wesentlichen immer die gleichen Ergebnisse.

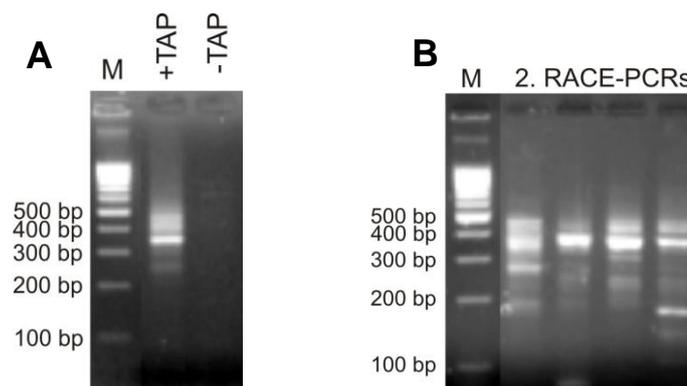


Abb. 3.4: PCR-Produkte der 2. *nested RACE-PCR*s aus jeweils derselben Ausgangs-RNA. A Spezifität der PCR's, mal mit (+TAP) und ohne (-TAP) Vorbehandlung mit *Tobacco Acid Pyrophosphatase* (TAP). **B** Reproduzierbarkeit der PCR's. Gezeigt sind vier unabhängige PCR's aus zwei verschiedenen cDNA-Extrakten. Die PCR-Produkte in Spalte 2+3 und 4+5 sind jeweils aus dem gleichen cDNA-Extrakt amplifiziert worden. M = 100 bp Längenstandard (Rapidozym, Berlin)

Zur eigentlichen Analyse der TSS wurden zwei verschiedene Strategien verfolgt. Zum einen wurde der Primer mit der 5'-RACE-Adapter-Sequenz in der 3. PCR durch einen Primer mit gleicher Sequenz, aber zusätzlicher 6-Carboxyfluorescein (FAM) Markierung ersetzt. Das PCR-Produkt wurde dann einer Fragmentlängenanalyse unterzogen um die TSS zu identifizieren und, basierend auf ihren Signalstärken, zu quantifizieren. Zum anderen wurden die PCR-Produkte nach der 3. PCR in TOPO-Vektoren kloniert und 24 dieser Klone wurden sequenziert um die TSS zu identifizieren und, basierend auf der Anzahl der Klone, zu quantifizieren.

Durch die Fragmentlängenanalyse wurde ein breites Spektrum an TSS ermittelt (Abb. 3.5A). Fasst man die gestreuten TSS zu Clustern um den jeweils höchsten Peak zusammen, so ergeben sich TSS im Bereich von -271, -239, -209, -197, -180, -169, -156, -133, -126, -119, -109, -95, und -81 bp vor dem ATG. Am häufigsten (höchste Peaks und/oder enger Streubereich) traten die TSS um die Positionen -209, -197, -133, -119, -109, -95, und -81 bp auf.

Die Sequenzanalyse der in TOPO klonierten PCR-Produkte, ergab *Htr3b*-Transkriptionsstartseiten bei -299, -242, -240, -236, -211, -172, -170, -145, -136, -134, -120, -119, -101 und -79 bp vor dem ATG (Abb. 3.5B). Am häufigsten (7-mal = 29%) trat die TSS an Position -211 bp auf, während die anderen 1- bis 2-mal (= 4% bzw. 8%) vorkamen.

Es wurden leichte Verschiebungen bei der Lokalisation der TSS durch Fragmentlängenanalyse und durch Sequenzierung beobachtet. In solchen Fälle wurden die Sequenzierungsergebnisse als genauer angenommen. Vier Bereiche, -211 bis -209, -136 bis -133, -120 bis -119 und -81 bis -79 bp, repräsentieren 35% bzw. 67% der durch Fragmentlängenanalyse bzw. durch Sequenzierung beobachteten TSS. Die TSS bei -211 bp ist insgesamt am stärksten ausgeprägt.

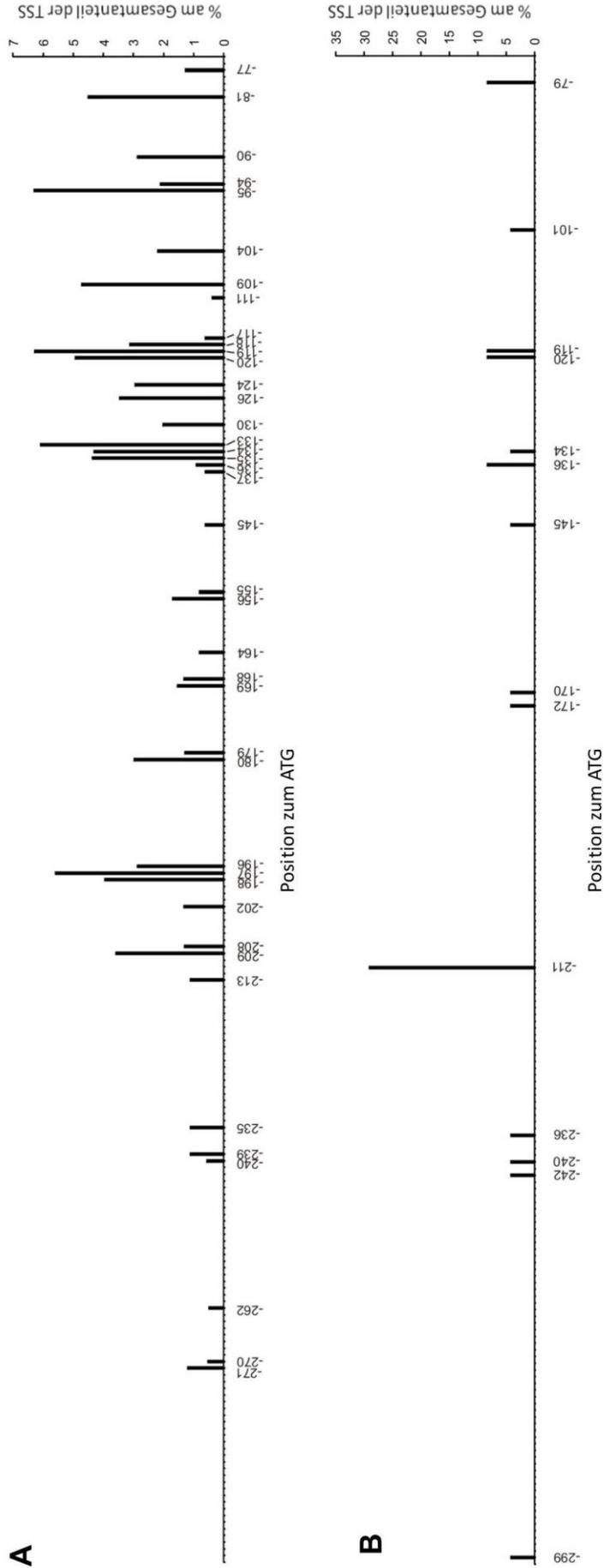


Abb. 3.5: Transkriptionsstartseiten im *Htr3b*-Promotor der Ratte. Dargestellt sind die Ergebnisse zweier verschiedener Methoden, um die Transkriptionsstartseiten zu ermitteln; Fragmentlängenanalyse (A) und TOPO-Klonierung mit nachfolgender Sequenzierung der Klone (B). Die beiden Diagramme zeigen auf der X-Achse die Position der Basenpaare zum ATG (Bereich zwischen -300 bis -75 bp) und auf der Y-Achse den Prozentsatz der jeweiligen Transkriptionsstartseite an der Gesamtzahl der Transkriptionsstartseiten im jeweiligen Versuch. A zeigt die Ergebnisse eines einmaligen Versuchs. Für B wurden 24 Klone untersucht.

Zusammenfassend ist zu sagen, dass multiple TSS im *Htr3b*-Gen beobachtet wurden. Nach der Gegenüberstellung der Ergebnisse beider Strategien, unter Beachtung möglicher Rundungsfehler (Auswertung über Fragmentlängenanalyse) und dem Fakt, dass die Transkription meist mit einer Adenosin-Base beginnt, sind die wesentlichsten Transkriptionsstartseiten an den Positionen -211, -197, -180, -170, -133, -126, -119, -109, -95 und -79 bp vor dem ATG des *Htr3b*-Gens zu verorten (Abb. 3.6). Vier Positionen, bei -211, -133, -119 und -79 bp, treten dabei besonders in den Vordergrund; sie repräsentieren allein 12% der durch Fragmentlängenanalyse und 54% der durch Sequenzierung beobachteten TSS. Die TSS bei -211 bp ist mit 29% (Klonsequenzierung) insgesamt am stärksten ausgeprägt. Die Dominanz dieser TSS wurde auch schon im Agarosegelbild (Abb. 3.4) sichtbar. Das dort am besten reproduzierbare PCR-Produkt bei ca. 380 bp, entspricht in etwa einem Promotorfragment, das bei -211 bp starten müsste.

```

-450 CTGATTTAAGGCAACAATCTGGATCTCAATTATTAATGAAATTAGGGTCCTGAATGCCAG
-390 CAAGAACATTGCCTTAGGTAAAGGCTGGAAAGGAAAInrTCATATTAGCCTGGAATTCCTCT
-330 CCTTGGGGCCCCCTCTAAAATTGCATTATTCACCTTAGCTGGCTCCTGTAAGGGAGATGGA
-270 GTCTTGGCCATCATCCTAGGGCACAGCCAAATGGAGAAGCTTGTGGGCTTCGTGAAGGCA
-210 InrTTAATCCInrCCAAACCTCTGTGCGGTGCACATGTGCCTGTCCAGTCCGGATGTTTACAAAATC
-150 GCACCAAAGTTACCACAAGTGAGCAGACAGGAGACGAGGGTGGAGGGGCACTGAGAGATG
-90 CAAGGTCGAGCAGTGCTCTCGCTCGCCCGACCGCCAGACCGCAGTCATCGCTCGTCTCTG
-30 GTACCTGCCCCAGAACAATAGGCAAGTGCATG

```

Abb. 3.6: Lokalisation der wichtigsten Transkriptionsstartseiten (TSS) des *Htr3b*-Gens innerhalb der -450 bp 5'-Region des Gens. Gezeigt ist die DNA-Sequenz der -450 bp 5'-Region des *Htr3b*-Gens. Identifizierte TSS sind mit Pfeilen über der Sequenz markiert. Je größer der Pfeil ist, desto häufiger trat die dazugehörige TSS in den Analysen auf. Potentielle Inr-Elemente sind eingerahmt.

Mit dem Wissen um die Lokalisation der Transkriptionsstartseite eines Gens, lässt sich in der Regel auf den engeren Promotorbereich, also den Anlagerungspunkt des Präinitiationskomplexes (PIC) schließen. Damit verbunden wären für den „klassischen“ Transkriptionsstart auch die unter 1.4 beschriebenen Kernpromotorelemente. Im *Htr3b*-Promotor findet sich solch eine kanonische Anordnung der Kernpromotorelemente zur Transkriptionsinitiation allerdings nicht.

Sequenzanalysen im *Htr3b*_{-450bp}-Promotor zeigen zwar drei Sequenzelemente (bei -354 bis -348 bp, -210 bis -204 und -203 bis -197 bp; Abb. 3.6), die der Konsensussequenz des Inr-Elements (YYANWYY) entsprechen, aber in keiner davon befindet sich eine TSS an der dafür vorgesehenen Position 3. Weiterhin konnten keine TATA-, BRE-, DPE-, MTE-, DCE- oder XCPE1-Kernpromotorelemente gefunden werden.

3.1.3 Analyse der Promotormethylierung des *Htr3b*-Gens

Die Existenz mehrerer Transkriptionsstartseiten ist oft mit der Existenz von CpG-Inseln verknüpft, die dann an der Regulation der Transkriptionsinitiation beteiligt sind. Daher wurden Methylierungsanalysen mit dem *Htr3b*-Promotor durchgeführt.

Durch eine gezielte Betrachtung des *Htr3b*_{-450bp}-Promotorbereichs konnten zwischen -220 und -2 bp insgesamt 14 Cytosine detektiert werden, auf die unmittelbar ein Guanin folgt (Abb. 3.7). Diese Cytosine sind potentiell methylierbar, können also durch das Anhängen einer Methylgruppe modifiziert werden, und bilden in ihrer Gesamtheit eine CpG-Insel.

```

-450 CTGATTTAAGGCAACAATCTGGATCTCAATTATTAATGAAATTAGGGTCCTGAATGCCAG
-390 CAAGAACATTGCCTTAGGTAAAGGCTGGAAAGGAAATCATATTAGCCTGGAATTTCTCT
-330 CCTTGGGGCCCCCTCTAAAATTGCATTATTCAGCTAGCTGGCTCCTGTAAGGGAGATGGA
-270 GTCTTGGCCATCATCCTAGGGCACAGCCAAATGGAGAAGCTTGTGGGCTTCGTGAAGGCA
-210 TTAATCCCCAACCTCTGTGGGTGCACATGTGCCTGTCCAGTGGATGTTTACAAAATC
-150 GCACCAAAGTTACCACAAGTGAGCAGACAGGAGAGAGAGGGTGGAGGGGCACTGAGAGATG
-90 CAAGGTGAGCAGTGCTCTGCTCGCCGACCGCCAGACCGCAGTCATGCTGTCTCTG
-30 GTACCTGCCCCAGAACAATAGGCAAGTGGATG

```

Abb. 3.7: Lokalisation der methylierbaren Cytosine innerhalb der -450 bp 5'-Region des *Htr3b*-Gens. Die insgesamt 14 methylierbaren Cytosine, die im Bereich zwischen -220 bis -2 bp vor dem ATG liegen, sind in der Abbildung blau unterlegt.

Um zu überprüfen, ob und unter welchen Bedingungen die Methylierung stattfindet, wurden *in vitro*- und *in vivo*-Methylierungsanalysen durchgeführt.

3.1.3.1 *In vitro*-Methylierung von Reportergenplasmiden mit CpG-Methyltransferase

Für die *in vitro*-Methylierung wurden *Htr3b*_{-445bp}-Promotorfragmente mit der CpG-Methyltransferase M.SssI und S-Adenosylmethionin (SAM) als Methylgruppendonor behandelt. Hierfür kamen zwei verschiedene methodische Strategien zum Einsatz: Zum einen wurden komplette pXP2::*Htr3b*_{-445bp}-Plasmide mit M.SssI behandelt und zum anderen wurden die *Htr3b*_{-445bp}-Promotorfragmente zuerst mittels Restriktionsverdau aus den pXP2::*Htr3b*_{-445bp}-Plasmiden herausgeschnitten, dann mit M.SssI behandelt und anschließend wieder in pXP2 ligiert. (In Abb. 2.2 und 2.3 findet sich eine schematische Darstellung beider Strategien.) Die *in vitro*-methylierten Plasmide wurden in PC-12-Zellen transfiziert und deren Reportergenaktivität wurde gemessen. Um die Effekte der Methylierung von möglichen anderen Nebeneffekten der Reaktion abzugrenzen, wurden zusätzlich Scheinmethylierungsreaktionen durchgeführt, bei denen die DNA-Stücke parallel zur eigentlichen Methylierungsreaktion, aber nur mit SAM und ohne M.SssI behandelt wurden.

Die Methylierung des gesamten pXP2::*Htr3b*_{-445bp}-Plasmids resultierte in einer Abnahme der Promotoraktivität um 88%, bei der Scheinmethylierung kam es zu einer leichten Zunahme der Aktivität (Abb. 3.8A). Die ausschließliche Methylierung des *Htr3b*_{-445bp}-Promotorfragments resultierte in einer Abnahme der Promotoraktivität um 83%, bei der Scheinmethylierung nahm die Aktivität um 57% ab (Abb. 3.8B).

Mit beiden methodischen Strategien war also infolge der Methylierung eine deutliche Abnahme der *Htr3b*_{-445bp}-Promotoraktivität zu verzeichnen.

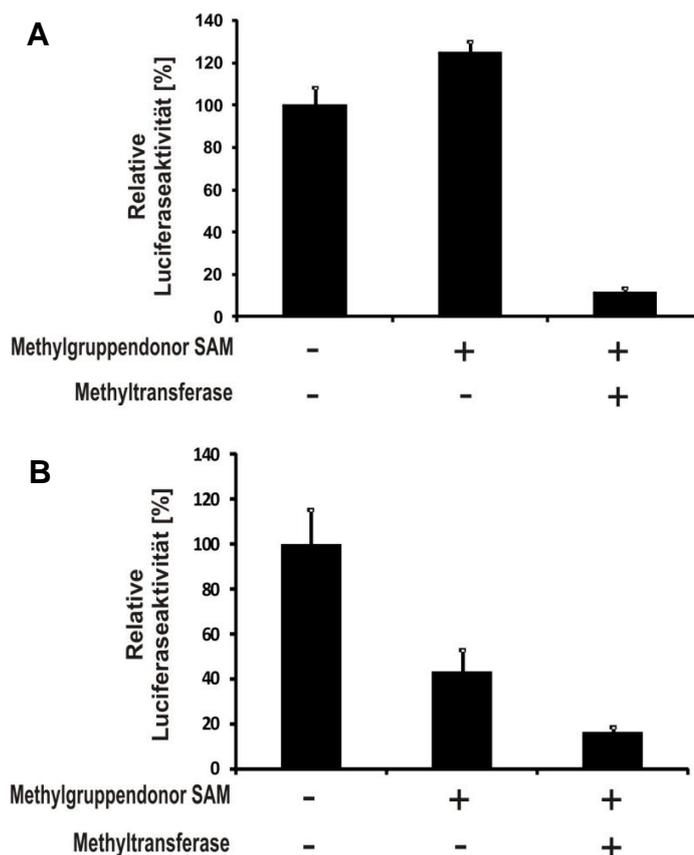


Abb. 3.8: Aktivität des *Htr3b*_{-445bp}-Promotors in Abhängigkeit vom Methylierungsstatus. Dargestellt sind jeweils die relativen Luciferaseaktivitäten des unbehandelten Promotorfragments (= 100%), des scheinmethylierten und des methylierten *Htr3b*_{-445bp}-Bereichs (von links nach rechts). Die zwei Diagramme zeigen die Ergebnisse zweier, verschiedener Strategien zur Durchführung der Methylierungsreaktion: **A** mit dem kompletten pXP2::*Htr3b*_{-445bp}-Plasmid; **B** nur mit *Htr3b*_{-445bp}-Promotorfragmenten und anschließende Ligation in pXP2. Gezeigt sind die Mittelwerte \pm SEM aus 3 (für **A**) bzw. 2 (für **B**) unabhängigen Messungen, die in Doppelbestimmungen durchgeführt wurden. SAM = S-Adenosylmethionin.

3.1.3.2 *In vivo*-Analyse der Promotormethylierung nach PC-12-Ausdifferenzierung (Bisulfit-Sequenzierung)

Ausgangsmaterial für die *in vivo*-Methylierungsanalysen war genomische DNA aus PC-12-Zellen, die bis zu 3 Tage adhärent kultiviert und mit NGF behandelt worden waren. Die Zellen wurden an Tag -1 als Suspensionszellen in Collagen-beschichtete 6-Well-Platten ausgesät und gingen zum adhären Wachstum über. An Tag 0 wurde dem Kultivierungsmedium 100 ng/ml NGF zugesetzt. Die aus den PC-12-Zellen isolierte genomische DNA wurde einer Bisulfit-Behandlung unterzogen, mit Bisulfit-spezifischen Primern amplifiziert und in TOPO-Vektoren kloniert. Die TOPO-Plasmide (mindestens 4 pro Bedingung, insgesamt 77) wurden dann sequenziert und die Methylierungsmuster wurden separat dokumentiert.

In Abb. 3.9A sind die Ergebnisse zweier unabhängiger Versuche dargestellt. Insgesamt war bei 70% der Klone mindestens eine der insgesamt 14 methylierbaren Positionen methyliert. Die Positionen 7 bis 13, die im DNA-Strang von -71 bis -38 bp vor dem ATG relativ dicht beieinander liegen, waren besonders stark methyliert. Einzelne Basen waren zwischen 5% und 54% methyliert (Abb. 3.9B). In 12% der Fälle waren alle Cytosine der Positionen 7 bis 13 methyliert, in weiteren 21% waren mindestens vier Positionen innerhalb dieser sieben methylierbaren Positionen gleichzeitig in einem Klon methyliert. Die Positionen 1 bis 6 und 14 waren dagegen relativ selten und unabhängig voneinander methyliert, wobei Position 4 nur in einem einzigen Klon an Tag -1 methyliert war.

Diese Ergebnisse illustrieren, dass es in Bezug auf die verschiedenen Differenzierungsstatus der PC-12-Zellen keine relevanten Veränderungen des Methylierungsmusters gibt.

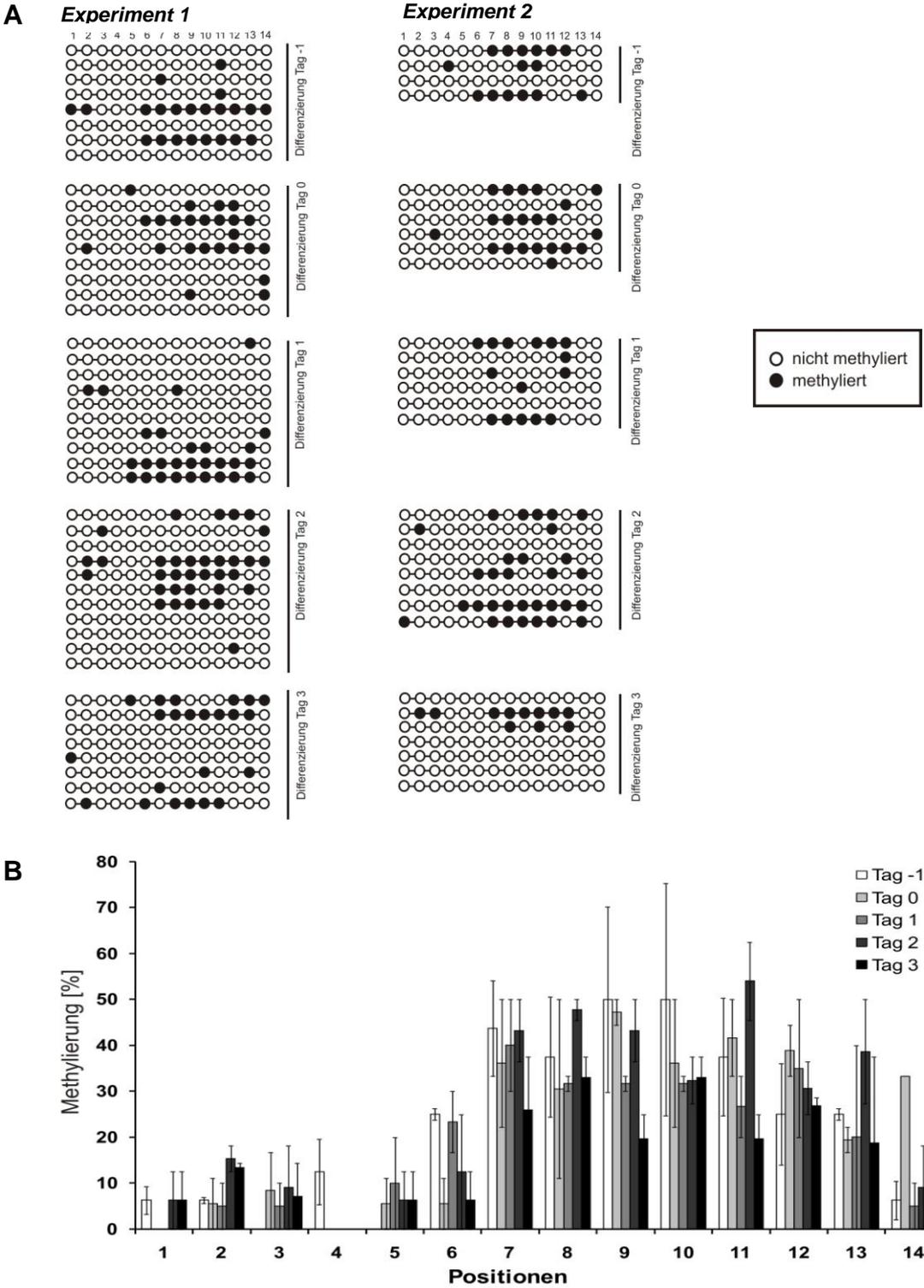


Abb. 3.9: Muster und Häufigkeiten der *in vivo*-Methylierung im *Htr3b*_{450bp}-Promotor. A Methylierungsmuster einzelner Klone. Gezeigt sind die Ergebnisse zweier unabhängiger Experimente. Es sind jeweils die Positionen der methylierbaren Cytosine in 5'-3'-Richtung (Position 1 = -220 bp; Position 14 = -2 bp) und die Zeitspannen der Differenzierung der PC-12-Zellen durch NGF-Behandlung („Tag -1“ = PC-12-Zellen, die vor der adhärennten Kultivierung, als Suspensionszellen, geerntet wurden; Tag 0 = adhärennte Kultivierung, aber ohne NGF) angegeben. Nicht methylierte Cytosine sind schematisch durch weiße Kreise und methylierte durch schwarze Kreise dargestellt. B Quantifizierung der Methylierung der jeweiligen Positionen während der verschiedenen Zeiten der Ausdifferenzierung der PC-12-Zellen. Gezeigt sind die Mittelwerte +/-SEM aller Ergebnisse aus A.

3.1.3.3 *In vivo*-Hemmung der Methylierung durch den Methyltransferase-Hemmer 5-Aza-2'-Deoxycytidin

Als Nächstes wurde untersucht, welchen Effekt eine fehlende Methylierung (Hypomethylierung) der DNA auf die Expression des *Htr3b*-Gens hat. Dabei wurden PC-12-Zellen mit dem Methyltransferase-Hemmer 5-Aza-2'-Deoxycytidin und dem Histon-Deacetylase-Hemmer Trichostatin A behandelt. Die Zellen wurden dafür für 24 bis 96 Stunden mit 0 - 2,5 μM 5-Aza-2'-Deoxycytidin behandelt. In den jeweils letzten 24 Stunden der Behandlung wurde 300 nM Trichostatin A hinzugegeben. Aus den geernteten Zellen wurde RNA isoliert, diese wurde in cDNA umgeschrieben und damit wurden quantitative RT-PCRs durchgeführt.

Würde die *Htr3b*-Transkriptionsinitiation hauptsächlich über die Aufhebung der Promotormethylierung reguliert sein, müsste eine Demethylierung auch ohne eine NGF-Zugabe in einer erhöhten Transkription resultieren. Dies war für das *Htr3b*-Gen nicht zu beobachten (Abb. 3.10). In den PC-12-Zellen ging die *Htr3b*-Expression bei allen 5-Aza-2'-Deoxycytidin-Konzentrationen und -Behandlungsdauern bis auf 12% gegenüber den unbehandelten Zellen zurück.

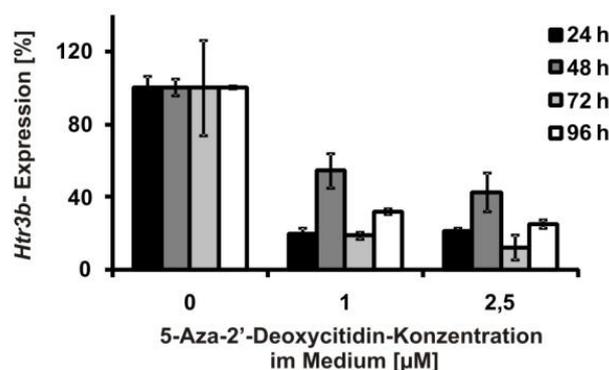


Abb. 3.10: Effekte der Hemmung der Methyltransferase in undifferenzierten PC-12-Zellen auf die Expression von *Htr3b*. Gezeigt sind die Mittelwerte \pm Standardabweichung aus zwei unabhängigen Versuchen, die in Duplikaten durchgeführt wurden.

Da es keine Unterschiede im Methylierungsstatus des *Htr3b*-Promotors während der Differenzierung der PC-12-Zellen (Abb. 3.9B) und keine Steigerung der *Htr3b*-Expression infolge einer künstlichen Blockade der Methylierung gibt (Abb. 3.10), ist zu folgern, dass die Methylierung des *Htr3b*-Promotorbereichs keinen Einfluss auf die Regulation der Transkriptionsinitiation *in vivo* hat.

3.1.4 Funktionelle Untersuchungen im *Htr3b*-Promotorbereich

Da die *Htr3b*-Transkriptionsinitiation keinem bekannten Muster, weder über die Kernpromotorelemente noch über Methylierung, zu folgen scheint, ist zu vermuten, dass vornehmlich bestimmte, *cis*-wirkende DNA-Sequenzelemente (Transkriptionsfaktorbindungsstellen) und daran bindende, *trans*-wirkende DNA-Bindeproteine (Transkriptionsfaktoren) an der Regulation der *Htr3b*-Transkriptionsinitiation beteiligt sind. Um diese gezielt detektieren zu können, wurde der *Htr3b*-Promotorbereich zunächst mittels DNase I Hypersensitivity Assay und 5'-Deletionen weiter eingegrenzt.

3.1.4.1 Definition des Promotorbereichs mittels DNase I

Hypersensitivity Assay

Durch eine bioinformatische Analyse mit Hilfe der ECR-Browser-Datenbank (<http://ecrbrowser.dcode.org>) wurden stromaufwärts vom proximalen, konservierten *Htr3b*-Promotorbereich drei intergenische Regionen entdeckt, die vom Menschen bis in diverse andere Säugetierspezies (Rind, Hund, Ratte, Maus, Opossum) evolutionär konserviert sind (Abb. 3.11). Diese drei *evolutionary conserved regions* (ECRs) sind von -7314 bis -6733 bp, von -2941 bis -2374 bp und von -1841 bis -1541 bp vor dem ATG zu finden und werden im Folgenden als ECR 3, ECR 2 und ECR 1 bezeichnet. ECR 3 ist allerdings nicht im Opossum konserviert.

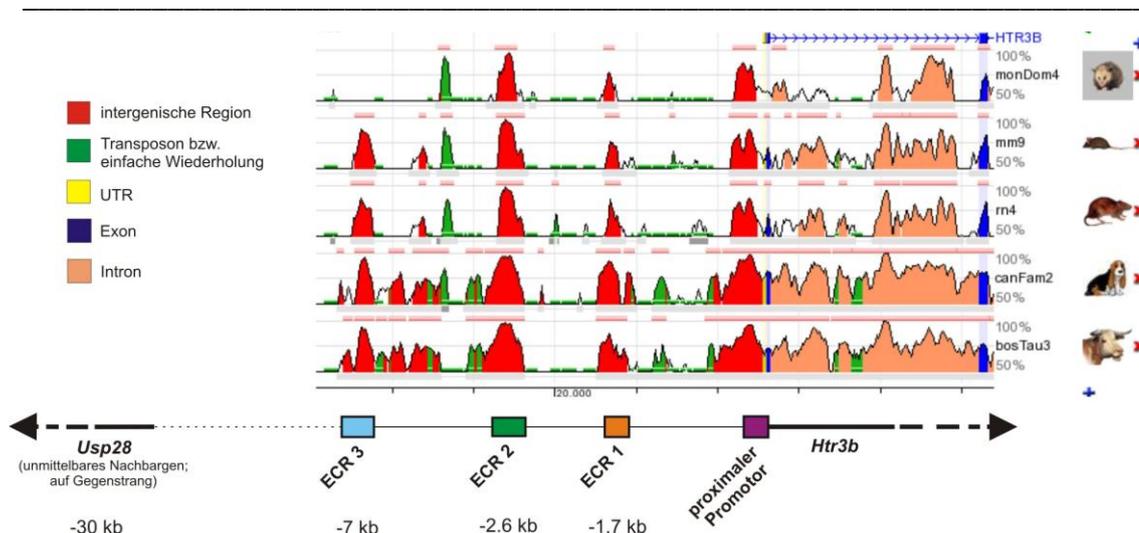


Abb. 3.11: Überblick über die evolutionäre Konservierung der 8 kbp 5'-Region des *HTR3B*-Gens und Identifikation von stark evolutionär konservierten Regionen (ECRs). Der obere Teil der Abbildung zeigt die evolutionäre Konservierung innerhalb der DNA-Sequenz der 8 kbp 5'-Bereiche des *HTR3B*-Gens von fünf verschiedenen Spezies (v. o.: Opossum, Maus, Ratte, Hund, Rind) im Vergleich zum Menschen (erzeugt mit Hilfe des ECR-Browsers; <http://ecrbrowser.dcode.org>). Je stärker eine Sequenz konserviert ist, desto höher sind die Peaks. Aus diesen Daten wurde auf die Existenz von drei stromaufwärts gelegenen konservierten Regionen und eines konservierten proximalen Promotorbereichs geschlossen. Im unteren Teil der Abbildung ist schematisch die 5'-DNA-Sequenz des Ratten-*Htr3b*-Gens inkl. der Lokalisationen der ECRs (ECR 3 = -7314 bis -6733 bp; ECR 2 = -2941 bis -2374 bp; ECR 1 = -1841 bis -1541 bp vom ATG) und des „proximalen Promotors“ (= -255 bis + 43 bp vom ATG) gezeigt. Ca. 30 kb stromaufwärts vom ATG der *Htr3b*-Gens entfernt, liegt der ATG des unmittelbaren Nachbargens *Usp28* auf dem Gegenstrang.

Diese auffallend starke Konservierung innerhalb einer sonst als funktionslos angesehenen Region, warf die Frage nach einer Bedeutung als Enhancer/Silencer für die Transkription von *Htr3b* auf. Um diese Frage zu klären, wurden die Regionen gezielt auf ihre DNase I-Sensitivität und Effekte, die sie durch die direkte Klonierung vor den proximalen *Htr3b*-Promotor auf dessen Aktivität ausüben, überprüft.

Enhancer/Silencer-Sequenzelemente zeichnen sich im Chromatin durch eine offenere Konformation (nur schwache Bindung der DNA an Histone) und erhöhte DNase I-Sensitivität aus (Gross und Garrard, 1988). Sie können daher mit Hilfe des Desoxyribonuklease I (DNase I) Hypersensitivity Assays identifiziert werden.

Dazu wurde Chromatin aus über 3 Tage-differenzierten und undifferenzierten PC-12-Zellen isoliert, mit 0 - 5 units DNase I und zuletzt mit Proteinase K behandelt. Im Anschluss wurde in quantitativen PCRs mit spezifischen Primern bzw. Sonden für die drei ECRs und den proximalen Promotor, die Anzahl der nicht durch DNase I verdauten DNA-Kopien bestimmt (Abb. 3.12).

Zunächst wurden differenzierte PC-12-Zellen getestet (Abb. 3.12A). Bei der quantitativen PCR zeigte sich, dass sich die Anzahl der verbleibenden intakten DNA-Kopien für ECR 3, ECR 1 und den proximalen Promotor bei steigender DNase I-Konzentration reduzierte. Am stärksten war dieser Effekt für ECR 3 zu beobachten. Bei ECR 2 zeigte sich infolge der DNase I-Behandlung kein DNA-abbauender Effekt, weshalb geschlussfolgert wurde, dass ECR 2 nicht als regulatorische Region funktionell sein kann.

Vor der Hypothese, dass die Differenzierung von PC-12-Zellen mittels NGF Auswirkungen auf die Konformation des Chromatins haben könnte, wurde der DNase I Hypersensitivity Assay auch mit Chromatin aus undifferenzierten Zellen durchgeführt und in Abb. 3.12B im direkten Vergleich zu den Ergebnissen aus Abb. 3.12A dargestellt. Es zeigte sich, dass die Sensitivität gegenüber DNase I im Chromatin undifferenzierter PC-12-Zellen für ECR 1 und den proximalen Promotor tatsächlich geringer war. Dagegen war in ECR 3 kein signifikanter Unterschied zwischen den NGF-behandelten und nicht behandelten Zellen zu beobachten.

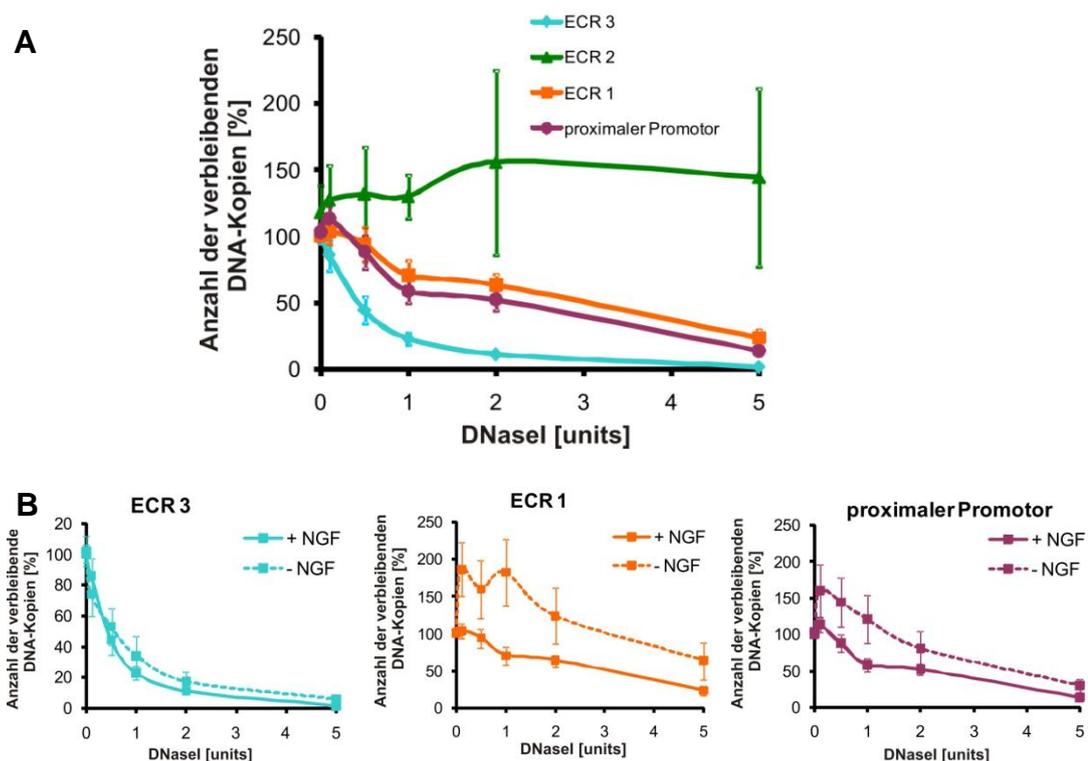


Abb. 3.12: DNase I Hypersensitivity Assay mit den drei ECR-Bereichen und dem proximalen Promotor. Dargestellt sind die Sensitivitäten der DNA-Fragmente auf DNase I, als Anzahl der verbleibenden DNA-Kopien [%] bei steigenden Konzentrationen von DNase I. In den Abbildungen sind die Ergebnisse von mindestens 3 unabhängigen Versuchen dargestellt. Gezeigt sind die Mittelwerte \pm SEM. **A** Versuch mit 3 Tage-differenzierten PC-12-Zellen. **B** Vergleich zwischen 3 Tage-differenzierten (+NGF) und undifferenzierten (-NGF) PC-12-Zellen.

Als nächstes wurde getestet, ob ECR 3 und ECR 1 Promotoraktivität vermitteln. ECR 3 und ECR 1 wurden jeweils direkt vor den -258 bp-*Htr3b*-Promotorbereich im pXP2-Luciferase-Reportergenplasmid kloniert. Im Fall von ECR 3 kam es zu keiner Veränderung der Promotoraktivität gegenüber der Aktivität des nativen, proximalen Promotors (Abb. 3.13A), im Fall von ECR 1 kam es zu einer signifikanten Abnahme der Promotoraktivität um 32% (Abb. 3.13B).

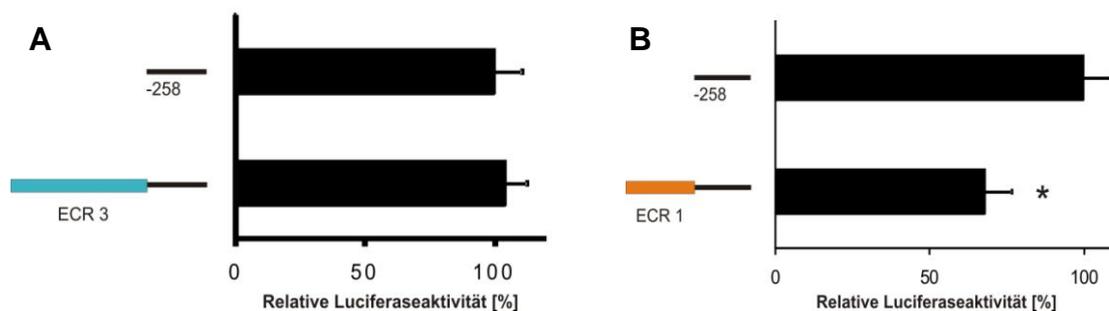


Abb. 3.13: Effekt von ECR 3 (A) und ECR 1 (B) auf die *Htr3b*_{-258bp}-Promotoraktivität in differenzierten PC-12-Zellen. Links in jeder Abbildung ist jeweils der *Htr3b*_{-258bp}-Promotorbereich schematisch dargestellt, zuoberst der native, darunter jener, dem ECR 3/ECR 1 durch Klonierung vorangestellt wurde. Rechts sind jeweils die relativen Luciferase-Aktivitäten gezeigt. Die Messwerte sind prozentual zum nativen *Htr3b*_{-258bp}-Promotor angegeben. Gezeigt sind die Mittelwerte \pm SEM aus 3 unabhängigen Messungen, die in Duplikaten durchgeführt wurden. * Signifikanter Unterschied ($p < 0,05$ Mann-Whitney-U Test)

Damit zeigen die DNase I Hypersensitivity Assays, dass die proximale Promotorregion und die ECR 1, die zwischen -1841 bis -1541 bp stromaufwärts vom ATG-Startkodon liegt, eine Rolle in der transkriptionellen Regulation des *Htr3b*-Gens spielen können.

3.1.4.2. Charakterisierung der evolutionären Konservierung des proximalen *HTR3B*-Promotors

Die evolutionäre Konservierung des *HTR3B*-Promotorbereichs war ein zentrales Thema der vorliegenden Doktorarbeit und sollte dabei helfen, generelle Mechanismen der *HTR3B*-Transkription aufzudecken. Durch eine bioinformatische Analyse, die auf dem Vorkommen von DNA-Sequenzmotiven in 32 Säugetierspezies beruht, konnte ein hohes Maß an evolutionärer Konservierung im -1.000 bp Bereich des *HTR3B*-Gens festgestellt werden (Abb. 3.14A). Es wurden 20 verschiedene evolutionär konservierte DNA-Sequenzmotive identifiziert (Abb. 3.14B). Diese Motive machen im Ratten-*Htr3b*-Promotor 41% der -1.000 bp-Region und 54% der -450 bp-Region aus. Die

Analysen wurden in Kooperation mit Sven Krause und Martin Haubrock aus der Abteilung Bioinformatik der Universitätsmedizin Göttingen durchgeführt.

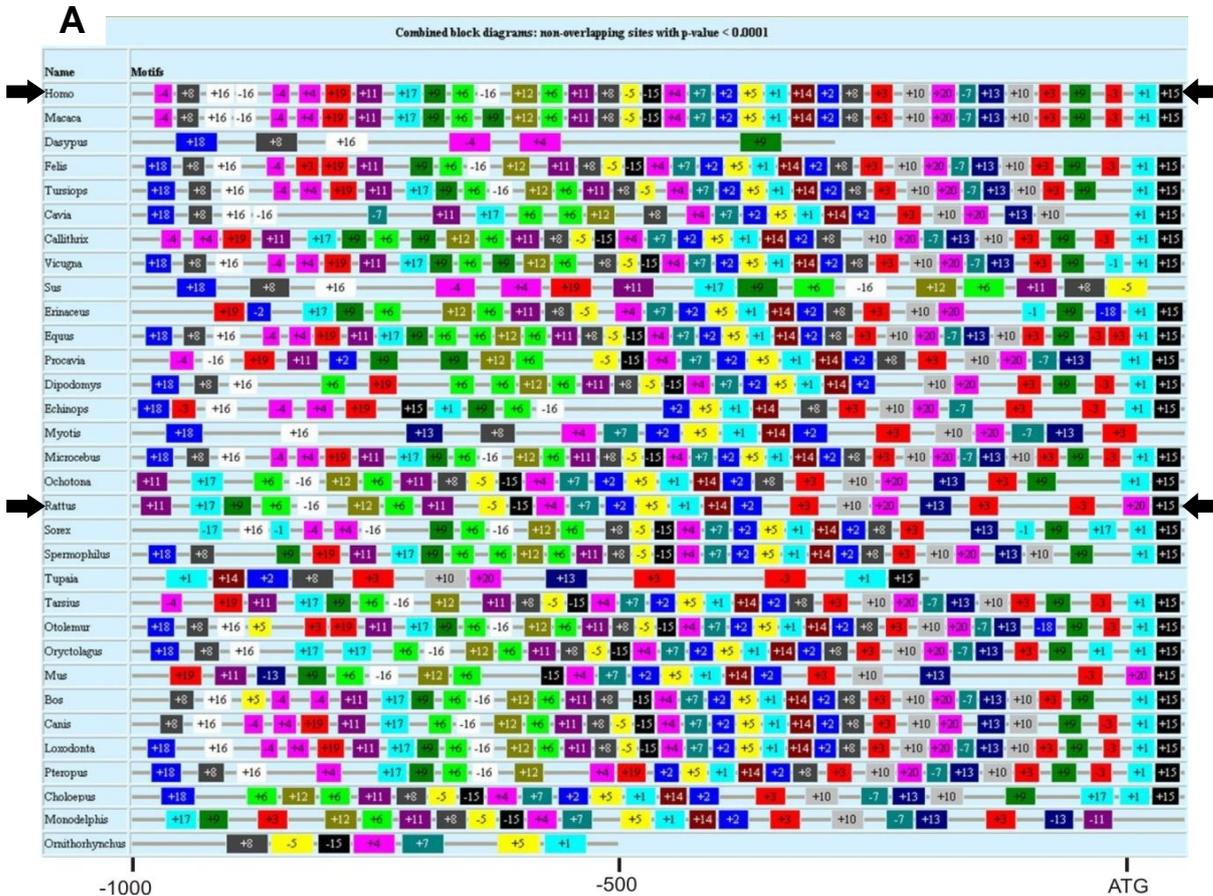


Abb. 3.14A: Überblick über die evolutionäre Konservierung des -1.000 bp-Bereichs des *HTR3B*-Gens. Die 1.000 bp 5'-UTR-Bereiche des *HTR3B*-Gens für 32 Säugetier-Spezies (Mensch (*Homo*) und Ratte (*Rattus*) sind durch Pfeile gekennzeichnet) sind hier bioinformatisch gegenübergestellt. Die verschiedenfarbigen Rechtecke symbolisieren die 20 (Nummerierung 1-20) verschiedenen, evolutionär konservierten Sequenzmotive (siehe B), die sich durch diese Gegenüberstellung ergeben hatten. Die Motive können sowohl auf dem DNA-Sinnstrang (+) oder dem Gegenstrang (-) gelegen sein.

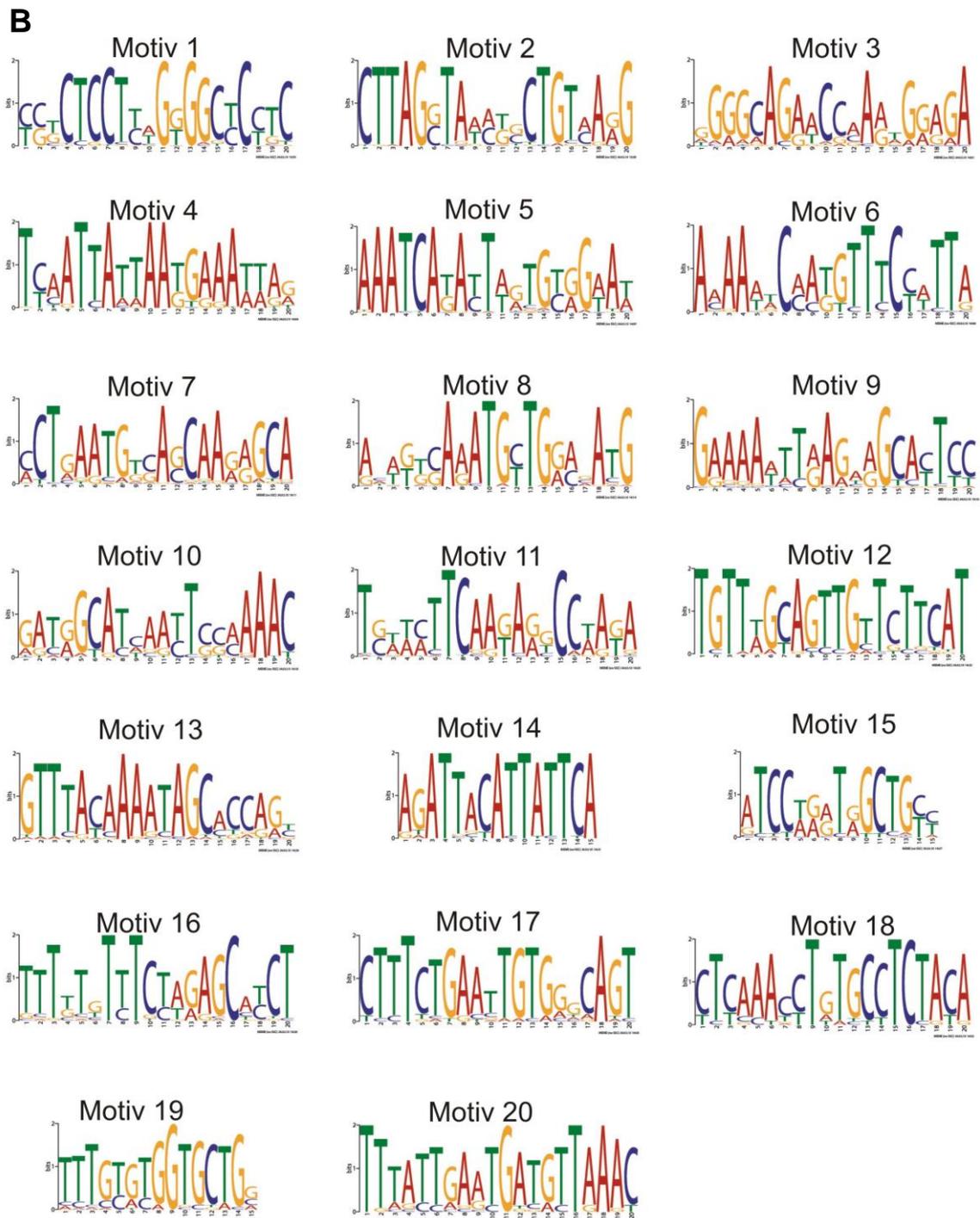


Abb. 3.14B: Die 20 evolutionär konservierten Sequenzmotive für den *HTR3B*-Promotor. Dargestellt sind die Konsensussequenzen der Motive. Auf der X-Achse sind jeweils die Basen durchnummeriert. Die Größe der Buchstaben entlang der Y-Achse steht für die unterschiedlich starke evolutionäre Konservierung der jeweiligen Base. Je größer der Buchstabe, desto stärker die Konservierung. Es können auch verschiedene, weniger stark konservierte Basen an einer Position vorkommen, was als 2 oder mehr Buchstaben übereinander dargestellt ist. Die Sequenzmotive haben also keine 100%-ig festgelegte Sequenz, sondern können an manchen Stellen mehr oder weniger stark variieren.

3.1.4.3. Definition des *Htr3b*-Promotorbereichs mittels 5'-Deletionen

Die direkt dem *Htr3b*-Gen vorstehende -445 bp-Region, die sich als wesentlich für die Vermittlung der Promotoraktivität herausgestellt hatte ((Bokelmann, 2007) bzw. Abb. 1.5), wurde im Folgenden weiter spezifisch eingegrenzt.

Dazu wurden durch 5'-Deletionen *Htr3b*-Promotorfragmente mit spezifischen Abständen von -445, -258, -203, -136, -115 und -90 bp zum ATG angefertigt und in pXP2-Reportergenplasmide kloniert. Die Luciferase-Reportergenaktivitäten für jedes Fragment wurden dann in differenzierten PC-12-Zellen und HEK-293-Zellen gemessen (Abb. 3.15). Die Steigerung der Luciferaseaktivität des gesamten -445 bp Fragments gegenüber dem pXP2-Leervektor war in beiden Zelllinien etwa gleich; 21,5-fach in PC-12-Zellen und 23,3-fach in HEK-293-Zellen.

Bei PC-12-Zellen waren wesentliche Abstufungen der Aktivität im Bereich -445 bis -258 bp (30% der Aktivität des Gesamtfragments), im Bereich -203 bis -136 bp (36% der Aktivität des Gesamtfragments) und im Bereich -115 bis -90 bp (20% der Aktivität des Gesamtfragments) zu beobachten. Die stärkste Abnahme zwischen zwei Fragmenten gab es zwischen -115 und -90 bp (-68%). Bei HEK-293-Zellen waren wesentliche Abstufungen der Aktivität im Bereich -445 bis -258 bp (26% der Aktivität des Gesamtfragments), im Bereich -258 bis -203 bp (24% der Aktivität des Gesamtfragments) und im Bereich -203 bis -115 bp (37% der Aktivität des Gesamtfragments) zu beobachten. Die stärkste Abnahme zwischen zwei Fragmenten gab es zwischen -203 und -136 bp (-73%).

Von den unter 3.1.4.4.1 gezeigten evolutionär konservierten Motiven sind dreizehn (M15, M4, M7, M2, M5, M1, M14, M2, M3, M10, M20, M13, M3) in der -445 bp 5'-Region zu finden und schematisch auf den Promotorfragmenten in Abb. 3.15 dargestellt. Da acht davon (M15, M4, M7, M2, M5, M1, M14, M2) besonders dicht am 3'-Ende des -445 bp-Fragments gepackt sind und von dem -445 bis -258 bp-Bereich eine spezifische Aktivität von 30% in PC-12-Zellen und 26% in HEK-293-Zellen ausgeht, ist zu vermuten, dass sich innerhalb der acht Motive z. B. Bindungsstellen für Transkriptionsfaktoren befinden, die diese Aktivität vermitteln. Den Motiven 20 und 13 am 3'-Ende des -203 bp-Fragments könnte, besonders im Hinblick auf die starken Abnahmen der Promotoraktivität bei der 5'-Deletion auf -136 bp in HEK-293-Zellen, eine Bedeutung zukommen. In PC-12-Zellen findet die stärkste Abnahme der Aktivität aber in einem Bereich ohne evolutionär konservierte Motive statt.

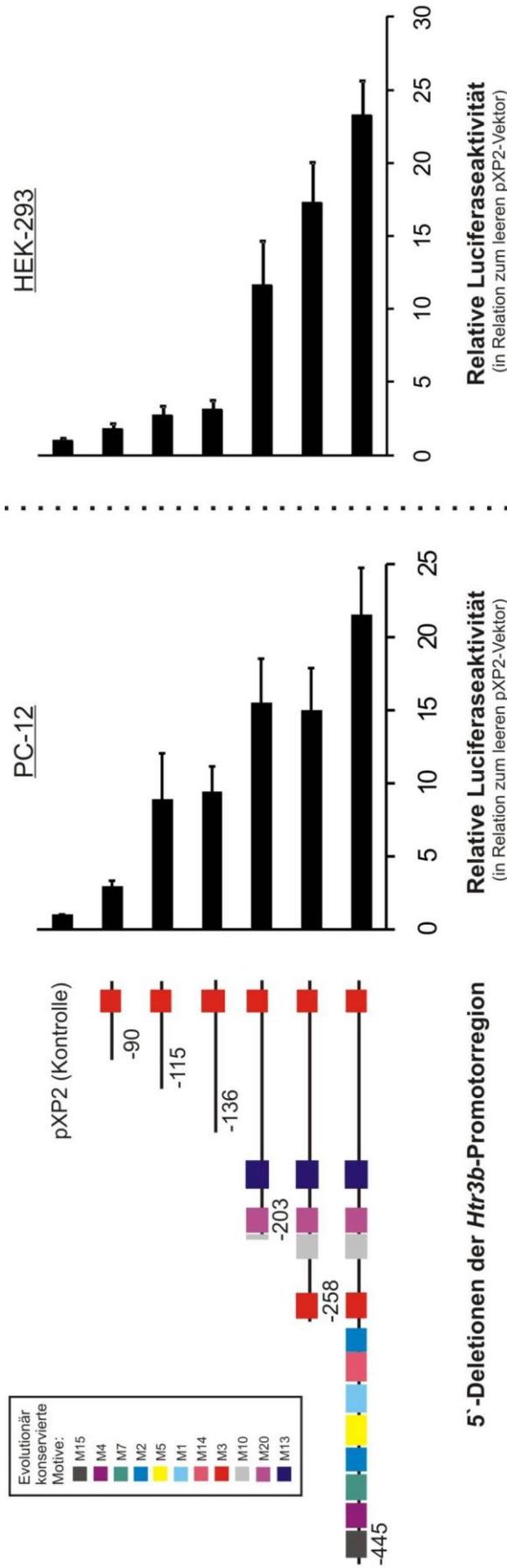


Abb. 3.15: Promotoraktivitäten der 5'-verkürzten Fragmente des *Htr3b*-Promotorbereichs in PC-12- und HEK-293-Zellen. Ganz links in der Abbildung sind die Abstufungen der 5'-Deletionen schematisch dargestellt. Die Beschriftungen am jeweiligen 5'-Ende geben die Position zum ATG wieder. Alle Fragmente enden -15 bp vor dem ATG. Zusätzlich wird durch farbige Rechtecke auf die Positionen der evolutionär konservierten Motive (Farbkodierungen wie in Abb. 3.14A) verwiesen. In der Mitte (PC-12) bzw. rechts (HEK-293) in der Abbildung sind die relativen Luciferase-Aktivitäten der jeweiligen Promotorfragmente 48 Stunden nach der Transfektion in differenzierte PC-12- und HEK-293-Zellen gezeigt. Die Messwerte sind als Vielfaches der Grundaktivität des pXP2-Plasmids ohne Promotor dargestellt. Gezeigt sind die Mittelwerte +/-SEM aus mindestens 3 (für PC-12) bzw. 4 (für HEK-293) unabhängigen Messungen, die in Duplikaten durchgeführt wurden.

3.1.4.4 Identifikation und Charakterisierung der *cis*- und *trans*-wirkenden Elemente des proximalen *Htr3b*-Promotors

Um Transkriptionsfaktorbindungsstellen im *Htr3b*_{-450bp}-Promotor zu identifizieren, wurde die Promotorsequenz zunächst systematisch mit EMSAs auf DNA-Protein-Interaktionen untersucht. Es wurde dabei zwischen Bereichen mit (3.1.4.4.1) und ohne (3.1.4.4.2) evolutionäre Konservierung unterschieden.

3.1.4.4.1 Evolutionär konservierte Motive

Es wurden ³²P-markierte Electrophoretic Mobility Shift Assay (EMSA)-Sonden hergestellt, die exakt den Sequenzen der dreizehn evolutionär konservierten Motive im -450 bp-Promotorbereich (Abb. 3.16A) entsprachen. Mit diesen Sonden wurden EMSAs mit Zellkernextrakten von differenzierten PC-12-Zellen und HEK-293-Zellen durchgeführt (Abb. 3.16B und C). Alle Signale, die für die konservierten Motive beobachtet wurden, hatten eine wesentlich niedrigere Intensität als die Positivkontrollen, wobei es sich um Sonden mit der Insertionsvariante des -100_-102-Polymorphismus aus dem menschlichen *HTR3B*-P1-Promotor und die Konsensussequenz für das *cAMP responsive element* (CRE) handelte. Mit PC-12-Extrakten konnten Banden, die auf eine DNA-Protein-Interaktionen hindeuten, bei den Motiven 4, 7, 14, 3 und 10 festgestellt werden (Abb. 3.16B); mit HEK-293-Extrakten bei den Motiven 4, 7, 5, 10 und 3 (Abb. 3.16C). Die EMSAs wurden mindestens noch einmal wiederholt (Daten nicht gezeigt). Reproduzierbar in PC-12- und/oder HEK-293-Extrakten waren letztendlich die Banden bei den Motiven 4, 7, 14 und 10.

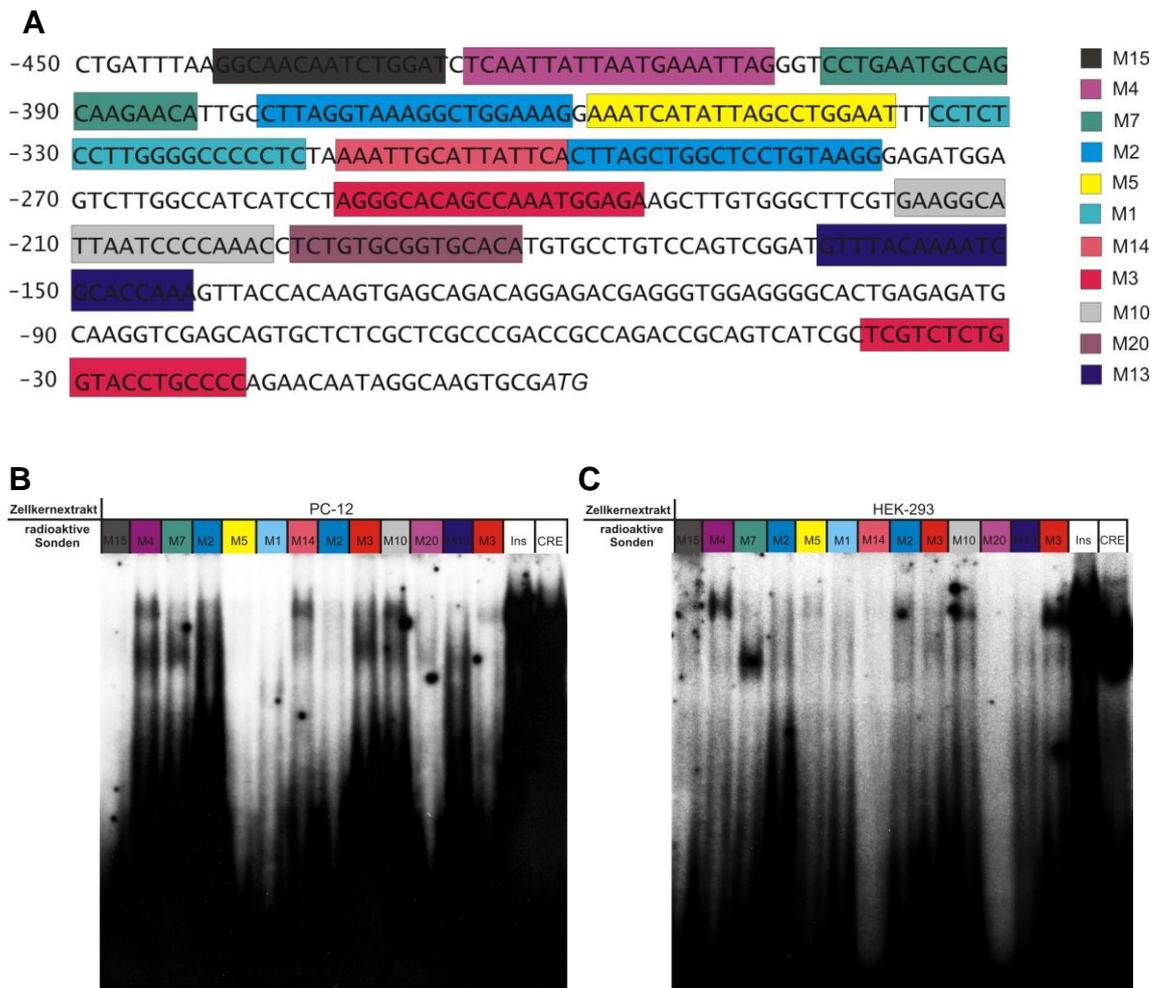


Abb. 3.16: Evolutionär konservierte Bereiche des *Htr3b*_{-450bp}-Promotorbereichs. A Darstellung der Sequenz des *Htr3b*_{-450bp}-Promotorbereichs (-450 bis +3 bp vom ATG) inkl. der evolutionär konservierten Motive. Die Motive tragen dieselbe Farbkodierung wie schon in Abb. 3.14A und 3.15. **B** und **C** EMSA mit Sonden der dreizehn evolutionär konservierten Motive und zwei Positivkontrollen (-100_-102AAG-Insertionssonde (Ins) und *cAMP responsive elements* (CRE)) mit PC-12- (**B**) und HEK-293- (**C**) Zellkernextrakten. Die Sonden sind entsprechend der Abfolge ihres Vorkommens im Promotorbereich angeordnet.

Um die Bedeutung der evolutionär konservierten Motive 4, 7, 14 und 10 zu eruieren, wurden zuerst bioinformatische Analysen mit Hilfe der Internet-Softwares TRANSFAC Professional 9.3 (transfac.bioinf.med.uni-goettingen.de) und *Transcription Factor Affinity Prediction* (TRAP; <http://trap.molgen.mpg.de/cgi-bin/home.cgi>) durchgeführt. Innerhalb der vier Motive wurden, durch diese Softwares, Bindungsstellen für Transkriptionsfaktoren der POU-Familie vorgeschlagen. POU-Transkriptionsfaktoren binden vornehmlich an die konservierte Octamer-Konsensussequenz ATGCAAAT, einige (z. B. Octamer-Transkriptionsfaktor-1, Oct-1) können auch an die nicht-Octamer-Sequenz mit der Basenfolge TAATGARAT oder ähnliche Sequenzen binden (Bendall et al., 1993; Thomson et al., 1994). In den Motiven M7 und M14 liegen Octamer-

Sequenzen mit 3 bzw. 1 mismatches gegenüber der Octamer-Konsensussequenz vor (Abb. 3.17). In M4 ist die nicht-Octamer-Sequenz in perfekter Übereinstimmung zur Konsensussequenz zu finden. In M10 ist nochmals die nicht-Octamer-Sequenz anzutreffen, allerdings mit 3 mismatches.

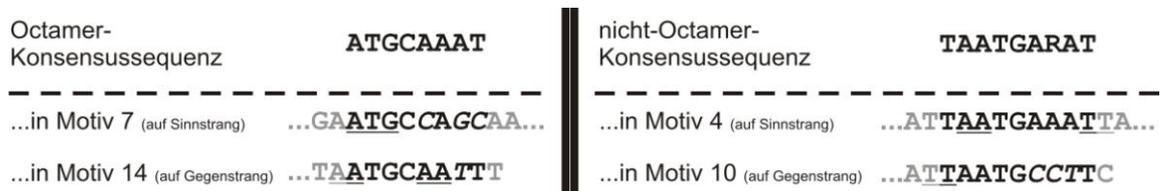


Abb. 3.17: Potentielle Bindungsstellen für POU-Transkriptionsfaktoren in den evolutionär konservierten Motiven 4, 7, 14 und 10. Zuerst sind die Konsensussequenzen für Octamer- (links) und nicht-Octamer- (rechts) Sequenzmotive dargestellt. Darunter sind jeweils die Sequenzmotive, wie sie in den evolutionär konservierten Motiven entweder auf dem Sinn- oder Gegenstrang vorkommen, gezeigt. In den Motiven 7 und 14 ist das Octamer-Motiv zu finden; in den Motiven 4 und 10 das nicht-Octamer-Motiv. Mismatches zur Konsensussequenz sind kursiv dargestellt. Direkt angrenzende Basen sind grau dargestellt. Basen, die für Reporter- und EMSA-Versuche ortsspezifisch mutiert wurden, sind unterstrichen dargestellt.

Da in M4 das nicht-Octamer-Motiv TAATGARAT ohne mismatch vorkommt und eine Bindung von Oct-1 an das TAATGARAT-Motiv bereits in anderen Kontexten nachgewiesen wurde (Baumruker et al., 1988; Bendall et al., 1993; Herr und Cleary, 1995), wurde die Beziehung zwischen M4 und Oct-1 näher untersucht und wird hier exemplarisch dargestellt.

Zuerst wurde mit der M4-Sonde ein EMSA mit kalten Kompetitionen gegen diese, sowie ein EMSA-Supershift-Assay mit einem Antikörper gegen Oct-1 durchgeführt (Abb. 3.18). Es zeigte sich, dass sich die M4-Sonde konzentrationsabhängig durch sich selbst verdrängen ließ, während dieser Effekt mit der mutierten M4-Sonde deutlich schwächer ausfiel. Für die Sonde, die die Octamer-Konsensussequenz enthielt, reichte bereits ein 20-facher Überschuss um das M4-spezifische Signal komplett verschwinden zu lassen. Das Protein, welches an M4 bindet, bindet also effizienter an die Octamer-Konsensussequenz als an M4. Die Vorinkubation der HEK-293-Zellkernextrakte mit 1-4 µg eines spezifischen Oct-1-Antikörpers führte aber weder zu einem Supershift, noch zu einer Änderung der Signalintensität.

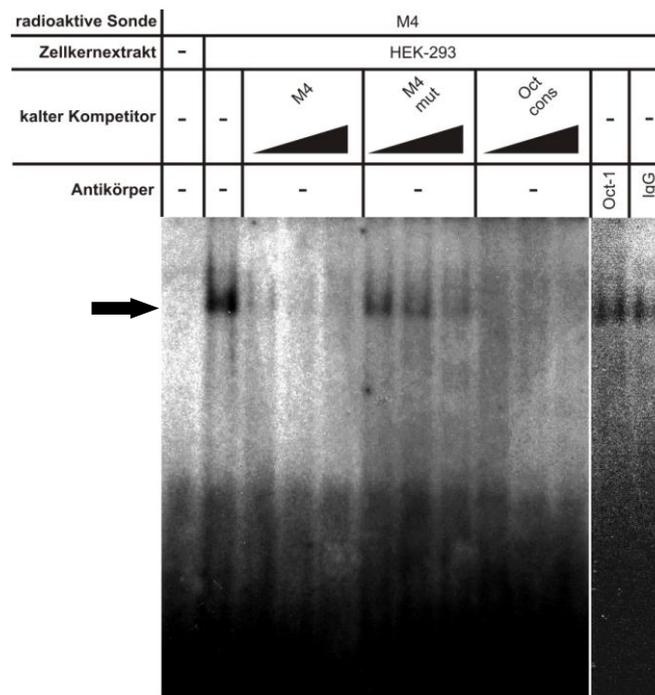


Abb. 3.18: EMSA mit der radioaktiven Sonde des evolutionär konservierten Motivs 4 (M4) mit HEK-293-Zellkernextrakt. In der 1. Spalte wurde die radioaktive M4-Sonde ohne Kernextrakt aufgetragen, ab der 2. mit HEK-293-Zellkernextrakt. Die M4-Sonde wurde mit sich selbst (Spalten 3-5), mit einer mutierten M4-Sonde (Spalten 6-8) und der Octamer-Konsensussequenz (Spalten 9-11) kompetiert. Die nicht radioaktiven (kalten) Sonden wurden je in 20-, 50- und 100-fachem molarem Überschuss zugegeben. Die Spalten 12-13 zeigen ein Supershift-Experiment mit der M4-Sonde. Dazu war der HEK-293-Zellkernextrakt vor der Zugabe der radioaktiven Sonde mit dem Antikörper gegen den Transkriptionsfaktor Oct-1 bzw. normalem IgG (Negativkontrolle) inkubiert worden. Das M4-spezifische Signal ist durch einen Pfeil gekennzeichnet.

EMSA für M7, M14 und M10 mit kalten Kompetitionen gegen sich selbst, gegen die jeweils mutierte Variante und gegen die Octamer-Konsensussequenz zeigten ähnliche Ergebnisse (Daten nicht gezeigt).

Ferner zeigten sich in EMSAs mit reinen, *in vitro*-translatierten Oct-1-Proteinen bei keinem der vier Motive spezifische Signale (Daten nicht gezeigt).

Die Motive 4, 7, 14 und 10 wurden auf ihre Funktionalität im *Htr3b*_{-445bp}-Promotorbereich überprüft. Dazu wurden spezifische Basen (Abb. 3.17), die an den potentiellen Bindungsstellen der POU-Proteine beteiligt sind, im pXP2::*Htr3b*_{-445bp}-Reporterplasmid ortsspezifisch mutiert und die Promotoraktivitäten wurden im Vergleich zum nativen *Htr3b*_{-445bp}-Promotor in differenzierten PC-12-Zellen und HEK-293-Zellen gemessen (Abb. 3.19). Bei den beiden Zelllinien resultierten die Mutationen innerhalb der Motive in ganz unterschiedlichen Änderungen der Promotoraktivität. Die Mutation von M4 führte zu keiner Veränderung der Promotoraktivität in PC-12 Zellen

aber zu einer 67%-igen, signifikanten Zunahme in HEK-293 Zellen. Die Mutation von M14 führte in PC-12 Zellen zu einer signifikanten Abnahme der Promotoraktivität um 39%, jedoch in HEK-293 Zellen zu einer signifikanten Zunahme der Promotoraktivität um 89%. Die Mutationen von M7 und M10 zeigten in beiden Zelllinien keine signifikanten Effekte auf die Promotoraktivität.

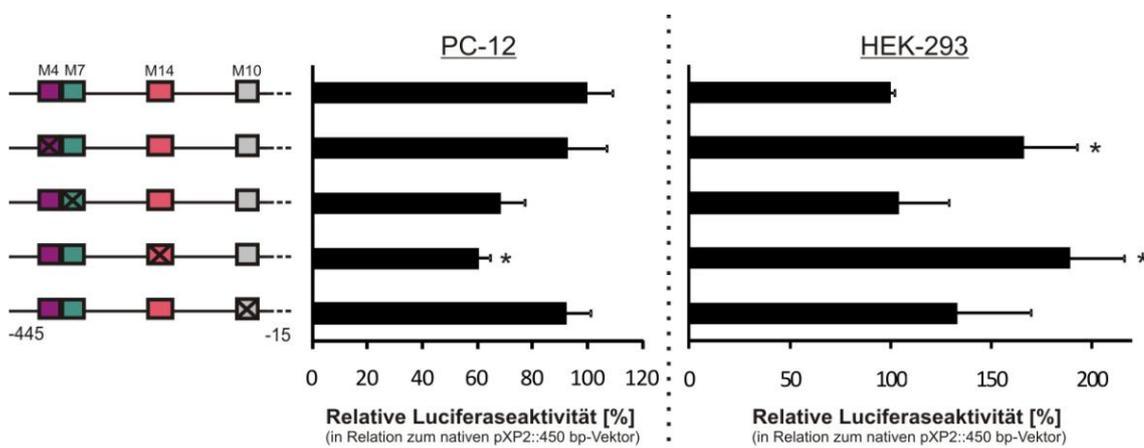


Abb. 3.19: Effekte von Mutationen innerhalb der evolutionär konservierten Motive 4, 7, 14 und 10 auf die Promotoraktivität des *Htr3b*.445bp-Promotorbereichs in differenzierten PC-12- und HEK-293-Zellen. Ganz links in der Abbildung ist der *Htr3b*.445bp-Promotorbereich inkl. der Lokalisationen der Motive 4, 7, 14 und 10 schematisch dargestellt. Zuoberst ist der native Promotorbereich gezeigt. Darunter sind die, durch gezielte Punktmutationen, veränderten Promotorbereiche dargestellt; das jeweilig mutierte Motiv ist durchgestrichen. In der Mitte bzw. rechts in der Abbildung sind die relativen Luciferase-Aktivitäten der Promotorfragmente in PC-12- und HEK-293-Zellen gezeigt. Die Messwerte sind prozentual zum nativen *Htr3b*.445bp-Promotor angegeben. Gezeigt sind die Mittelwerte +/-SEM aus mindestens 2 (für PC-12) bzw. 3 (für HEK-293) unabhängigen Messungen, die in Duplikaten durchgeführt wurden. * Signifikanter Unterschied (p < 0,05 Mann-Whitney-U Test) im Vergleich zum nativen Promotorbereich.

Des Weiteren wurde Oct-1 in Reportergergenversuchen in differenzierten PC-12-Zellen und HEK-293-Zellen überexprimiert. Dazu wurde der Genexpressionsplasmid pcDNA5::POU2F1, der das menschliche Oct-1-Gen trägt, gleichzeitig mit dem nativen und den M4-, M7-, M14- und M10-mutierten *Htr3b*.445bp-Reportergergenplasmiden transient transfiziert. Gegenüber den Promotoraktivitäten der parallel durchgeführten Kontrollen, in denen nur das leere pcDNA5 kotransfiziert wurde, nahmen die Promotoraktivitäten der nativen und mutierten Promotorbereiche unter Oct-1-Einfluss in beiden Zelllinien gleichermaßen ab (Daten nicht gezeigt).

Zusammenfassend lässt sich die bioinformatische Vorhersage für Bindungen von Transkriptionsfaktoren der POU-Familie in den evolutionär konservierten Motiven 4, 7, 14 und 10 im *Htr3b*-Promotor der Ratte experimentell untermauern. Dies zeigte sich vor allem durch die EMSAs mit kalten Kompetitionen der Octamer-Konsensussequenz

gegen die Sonden der vier Motive. Außerdem zeigte vor allem M14 Funktionalität im Reporterassay. Welcher Faktor / welche Faktoren (der POU-Familie) allerdings letztendlich binden, ist noch unklar. Oct-1 kann aber ausgeschlossen werden.

3.1.4.4.2 Nicht evolutionär konservierte Motive

Um *cis*-wirkende Elemente, die außerhalb der evolutionär konservierten Motive Promotoraktivität vermitteln, zu erkennen, wurden die nicht evolutionär konservierten Bereiche des *Htr3b*_{-450bp}-Promotors systematisch, zunächst mittels EMSA, analysiert (Abb. 3.20). Zum einen wurden EMSA-Sonden für sechs Bereiche, die großräumige (>7 bp) Lücken zwischen den evolutionär konservierten Motiven abdeckten, hergestellt (Abb. 3.20A). Diese EMSA-Sonden wurden nach der Position der 1. Base ihres 5'-Endes benannt: -282, -247, -96, -78, -22. Zum anderen wurden vier Bereiche untersucht, an denen laut bioinformatischer Analysen und Literaturrecherchen bestimmte Transkriptionsfaktoren binden können. Es handelt sich um potentielle Bindungsstellen für den *Early Growth Response Factor 1* (Egr-1), zwei E-Boxen und eine potentielle Bindungsstelle für den Transkriptionsfaktor II-I (TFII-I). Die genau vorhergesagten Bindungsstellen sind in Abb. 3.20A unterstrichen. Die entsprechenden EMSA-Sonden überlappten zum Teil, aber nie komplett mit denen der evolutionär konservierten Motive.

EMSA wurden mit Zellkernextrakten von PC-12- (Abb. 3.20B) und HEK-293-Zellen (Abb. 3.20C) durchgeführt. In zwei unabhängigen Experimenten mit Extrakten von differenzierten und undifferenzierten PC-12-Zellen zeigten sich die DNA-Protein-Interaktionen mit den Sonden Egr-1, -282 und E-Box 2 als reproduzierbar. In zwei unabhängigen Experimenten mit HEK-293-Extrakten zeigten sich die Signale der Sonden -282, E-Box 2, TFII-I und -22 als reproduzierbar.

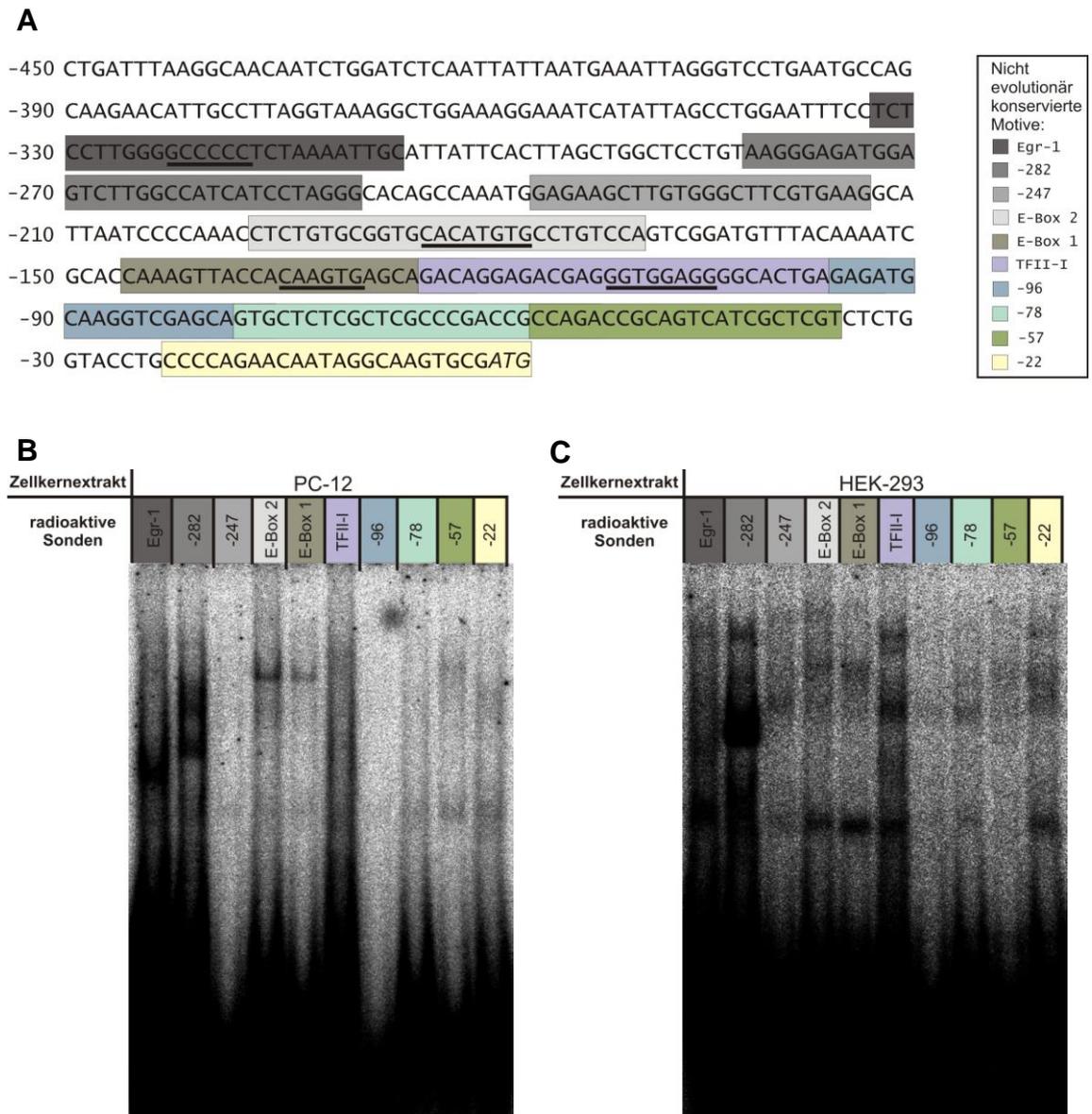


Abb. 3.20: Nicht evolutionär konservierte Bereiche des *Htr3b*_{.450bp}-Promotorbereichs. A Darstellung der Sequenz des proximalen *Htr3b*-Promotorbereichs (-450 bis +3 bp vom ATG). In unterschiedlichen Farben hervorgehoben sind Bereiche, die nicht evolutionär konserviert sind bzw. die potentielle Bindungsstellen für regulatorische Faktoren tragen, die sich aber nicht mit den vorher untersuchten konservierten Motiven komplett überlappen. Die potentiellen Bindungsstellen sind unterstrichen. B und C EMSA mit radioaktiven Sonden der unter A dargestellten Bereiche. Die Versuche wurden mit differenzierten PC-12- (B) und HEK-293- (C) Zellkernextrakten durchgeführt. Die Sonden sind entsprechend der Abfolge ihres Vorkommens im Promotorbereich angeordnet.

Die Bereiche der Sonden E-Box 2, TFII-I, -282 und Egr-1 wurden funktionell untersucht. Diese Untersuchungen sind unter 3.1.4.4.2.1 bis 3.1.4.4.2.4 beschrieben.

3.1.4.4.2.1 E-Box 2

Aufbauend auf den Vorarbeiten, in denen durch eine Doppelmutation der sogenannten E-Box 2 (-183 bis -178 bp) und einer potentiellen Transkriptionsfaktor II-I (TFII-I)-Bindungsstelle (-113 bis -105 bp) eine signifikante Abnahme der Promotoraktivität im *Htr3b*_{-2057bp}-Promotor zu verzeichnen war (Bokelmann, 2007), wurde zunächst die E-Box 2 näher charakterisiert.

In der vorliegenden Arbeit wurde die E-Box 2 im *Htr3b*_{-445bp}- und *Htr3b*_{-258bp}-Promotorfragment mutiert und die resultierenden Promotoraktivitäten wurden durch Reporterassays bestimmt. Im *Htr3b*_{-445bp}-Fragment führte die Mutation von E-Box 2, wie schon zuvor beim *Htr3b*_{-2057bp}-Fragment beobachtet (Bokelmann, 2007), zu keiner Veränderung der Promotoraktivität (Daten nicht gezeigt). Dagegen resultierte die Mutation der E-Box 2 im *Htr3b*_{-258bp}-Fragment in einer Abnahme der Promotoraktivität um 55% (Abb. 3.21A).

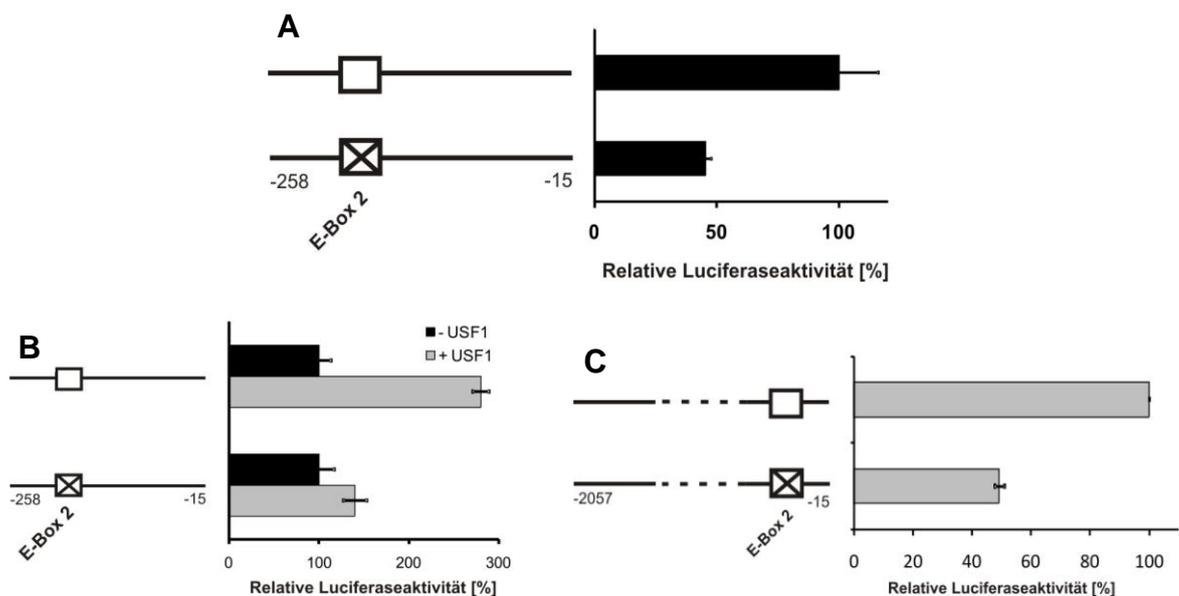


Abb. 3.21: Effekt der E-Box 2-Mutation innerhalb des *Htr3b*_{-258bp}-Promotorfragments und Effekte der USF1-Überexpression in differenzierten PC-12-Zellen. Links ist jeweils der *Htr3b*_{-258bp}-Promotorbereich inkl. der Lokalisation der E-Box 2 schematisch dargestellt. Zuerst ist der native Promotorbereich gezeigt, darunter die E-Box 2-mutierte Variante (durchgestrichen). Rechts sind jeweils die relativen Luciferase-Aktivitäten gezeigt. Gezeigt sind die Mittelwerte +/-SEM aus mindestens 3 unabhängigen Messungen, die in Duplikaten durchgeführt wurden. **A** Effekt der E-Box 2-Mutation auf die Promotoraktivität. **B** Effekt der USF1-Überexpression auf die Promotoraktivität im *Htr3b*_{-258bp}-Promotor. Die Messwerte sind prozentual zum nativen bzw. E-Box 2-mutierten *Htr3b*_{-258bp}-Promotor ohne USF1-Überexpression angegeben. **C** Effekt der E-Box 2-Mutation bei USF1-Überexpression auf die Promotoraktivität im *Htr3b*_{-2057bp}-Promotor.

Durch eine bioinformatische Analyse wurde die Bindung des *Upstream Stimulatory Factors 1* (USF1) an die E-Box 2 vorgeschlagen.

Das Genexpressionsplasmid pExpress-1::Usf1, das das rattenspezifische Usf1 trägt, bzw. der pExpress-1-Leervektor wurde mit dem nativen bzw. E-Box 2-mutierten *Htr3b*_{-258bp}-Reportergenplasmid in PC-12-Zellen kotransfiziert und die Promotoraktivität wurde gemessen. Eine Überexpression von rattenspezifischem Usf1 führte im nativen *Htr3b*_{-258bp}-Promotorfragment zu einer 2,8-fachen Steigerung der Promotoraktivität, im E-Box 2-mutierten *Htr3b*_{-258bp}-Promotorfragment gab es dagegen keine signifikante Steigerung (Abb. 3.21B).

Im Gegensatz zum „herkömmlichen“ Reportergenversuch ohne USF1-Überexpression, halbierte sich unter USF1-Einfluss auch im *Htr3b*_{-2057bp}-Promotorfragment bei einer Mutation von E-Box 2 die Promotoraktivität im Vergleich zum nativen Fragment (Abb. 3.21C).

Ein möglicher Effekt einer Überexpression der dominant negativen Variante von USF1, genannt AUSF, auf die Promotoraktivität wurde im *Htr3b*_{-258bp}-Promotorfragment getestet. Die AUSF-Überexpression vermittelte aber keine Aktivitätsänderung (Daten nicht gezeigt).

Um die Bindung von USF1 an das E-Box 2-Sequenzmotiv zu verifizieren, wurde ein EMSA mit kalten Kompetitionen gegen die E-Box 2-Sonde, sowie ein Supershift-Assay mit einem Antikörper gegen USF1 durchgeführt (Abb. 3.22). Dabei ließ sich die radioaktive E-Box 2-Sonde konzentrationsabhängig durch sich selbst, aber kaum durch die mutierte E-Box 2-Sonde, verdrängen. Die Sonde mit der USF1-Konsensussequenz kompetierte die E-Box 2-Sonde bereits bei 5-fachem Überschuss komplett. Im Supershift Assay, verschwand die Bande mit dem USF1-Antikörper, blieb aber mit dem USF2 und IgG-Antikörper unverändert. Mit HEK-293-Zellkernextrakten ergab sich ein ähnliches Ergebnis (Daten nicht gezeigt).

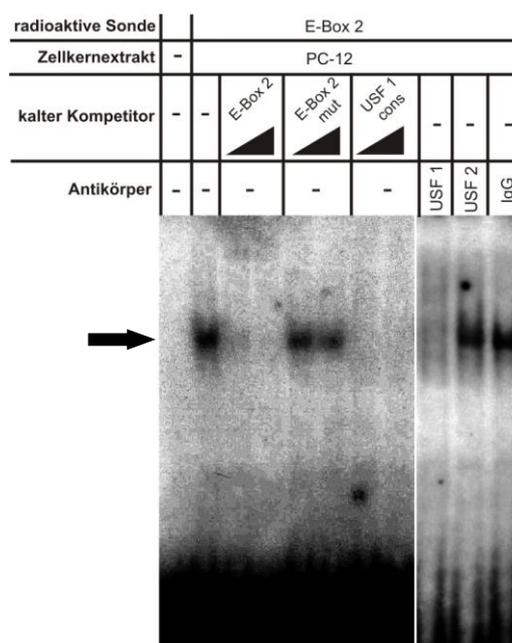


Abb. 3.22: EMSA mit der radioaktiven Sonde der E-Box 2 Sequenz aus dem *Htr3b*-Promotor. In der 1. Spalte wurde die radioaktive E-Box 2-Sonde ohne Kernextrakt aufgetragen, ab der 2. mit PC-12-Zellkernextrakt. Die E-Box 2-Sonde wurde mit sich selbst (Spalten 3-4), mit einer mutierten E-Box 2-Sonde (Spalten 5-6) und der Konsensussequenz für den USF1 Transkriptionsfaktor (Spalten 7-8) kompetiert. Die nicht radioaktiven (kalten) Sonden wurden je in 5- und 20-fachem molarem Überschuss zugegeben. Die Spalten 9-11 zeigen ein Supershift-Experiment mit der Zugabe von Antikörpern gegen USF1 und USF2 bzw. normalem IgG (Negativkontrolle). Die Antikörper gegen USF1, USF2 und normales IgG (je 1 µg) wurden für 1 Stunde mit Zellkernextrakt von differenzierten PC-12-Zellen vorinkubiert. Das USF1-spezifische Signal ist durch einen Pfeil gekennzeichnet.

Zusammenfassend konnte gezeigt werden, dass USF1 die *Htr3b*-Transkription durch eine Bindung an der E-Box-Sequenz, die -183 bis -178 bp stromaufwärts vom ATG-Kodon lokalisiert ist, steuert.

3.1.4.4.2.2 TFII-I

In der vorliegenden Arbeit wurde die potentielle TFII-I Bindungsstelle im *Htr3b*_{-445bp}- und *Htr3b*_{-258bp}-Promotorfragment mutiert und die resultierenden Promotoraktivitäten wurden durch Reporterassays bestimmt. Die Mutation der potentiellen TFII-I-Stelle führte schon im *Htr3b*_{-445bp}-Promotorfragment zu einer Reduktion der Promotoraktivität um 57%, im *Htr3b*_{-258bp}-Promotorfragment sogar um 68% (Abb. 3.23). Bei einer Doppelmutation von E-Box 2 und der potentiellen TFII-I Bindungsstelle änderte sich die Aktivität im Vergleich zur TFII-I-Einzelmutation nicht weiter.

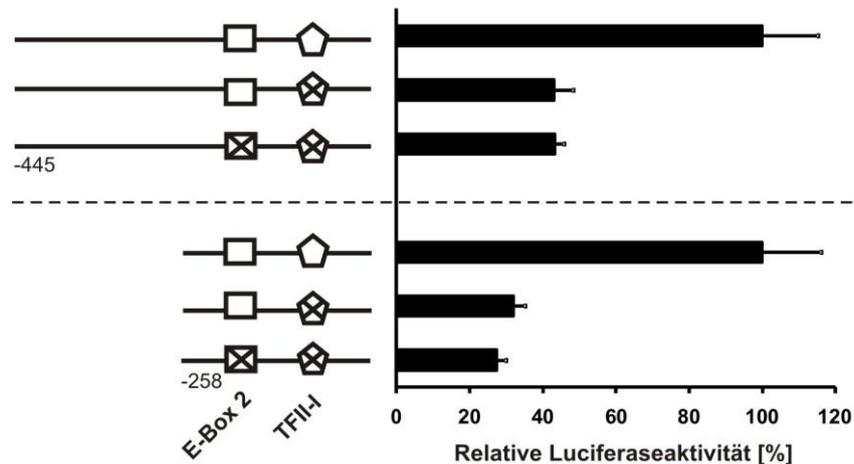


Abb. 3.23: Effekte der Mutationen der potentiellen TFII-I-Bindungsstelle und der Doppelmutation der potentiellen TFII-I-Bindungsstelle mit E-Box 2 innerhalb der *Htr3b*^{-445bp}- und *Htr3b*^{-258bp}-Promotorfragmente in differenzierten PC-12-Zellen. Links sind die Promotorbereiche inkl. der Lokalisationen von E-Box 2 (Viereck) und TFII-I (Fünfeck) schematisch dargestellt. Zuoberst ist jeweils der native Promotorbereich gezeigt, darunter die mutierten Varianten (durchgestrichen). Rechts sind die relativen Luciferase-Aktivitäten gezeigt. Die Messwerte sind jeweils prozentual zum nativen Promotor angegeben. Gezeigt sind die Mittelwerte \pm SEM aus mindestens 2 unabhängigen Versuchen, die in Duplikaten gemessen wurden.

Die Suche nach einem Transkriptionsfaktor, der an die potentielle TFII-I-Bindungsstelle bindet, gestaltete sich problematisch. Im EMSA mit unterschiedlichen PC-12- und HEK-293-Zellkernextrakten variierten die Signale der DNA-Protein-Interaktion für die TFII-I-Sonde (siehe auch Abb. 3.20). Oft konnte gar kein Signal erzeugt werden und wenn es Signale gab, liefen sie nicht immer auf gleicher Höhe im Acrylamid-Gel. Somit war es nicht möglich einen Transkriptionsfaktor, der an diese Stelle bindet, zu identifizieren.

Wahrscheinlicher ist es daher, dass die, in den Reporter-genversuchen mit TFII-I-mutierten Promotorfragmenten, beobachteten Effekte gar nicht durch die Bindung eines Transkriptionsfaktors, sondern durch die Verlegung einer Transkriptionsstartseite verursacht werden. Eine TSS, bei -109 bp, liegt genau innerhalb der potentiellen TFII-I Bindungsstelle.

3.1.4.4.2.3 NF-1 und YY1

Die -282-Sonde zeigte im EMSA die stärksten Bandenintensitäten, die innerhalb des -450 bp-Promotorfragments zu beobachten waren (Abb. 3.20). Auffällig war, dass es mit PC-12-Extrakten jeweils mindestens zwei (dominante) Banden gab, während mit HEK-293-Zellkernextrakten meist nur eine dominante Bande auftrat, die sich im Gel auf gleicher Höhe, wie die obere dominante Bande von PC-12 befand (Abb. 3.24).

Erste bioinformatische Analysen zeigten eine hohe Wahrscheinlichkeit für NF-1- und SMAD-Proteinbindungsstellen innerhalb der -282-Sonde (Tab. 3.1). Durch EMSAs mit kalten Kompetitionen gegen die spezifisch mutierten -282-Sonden bzw. gegen die Konsensussequenzen dieser Transkriptionsfaktoren wurde festgestellt, dass NF-1 (*Nuclear factor-1*) für die schwache obere Bande bei EMSAs mit PC-12-Zellkernextrakt verantwortlich ist (Abb. 3.24A, Abb. 3.25). Um den/die Transkriptionsfaktor(en) zu identifizieren, der/die für die starken unteren Banden verantwortlich ist/sind, wurden systematisch je 5 bp innerhalb der -282-Sonde deletiert (Del 1-6; Tab. 3.1). Dabei zeigte sich, dass mit HEK-293-Extrakten nur schwache Kompetitionen mit der Del 1- und der Del 2-Sonde, eine stärkere Kompetition mit der Del 3-Sonde und vollständige Kompetitionen mit den Del 4-6-Sonden auftraten (Abb. 3.24B). Durch eine gezielte bioinformatische Suche in diesem Bereich wurden weitere potentielle Transkriptionsfaktorbindungsstellen ermittelt: für GATA, ZID und YY1 (Tab. 3.1; Abb. 3.24C). Letztendlich konnten über weitere EMSA-Reaktionen mit kalten Kompetitionen zwei Bindungsstellen für *Ying Yang 1* (YY1) identifiziert werden (Tab. 3.1, Abb. 3.24D, Abb. 3.26).

Tab. 3.1: Übersicht über die verwendeten EMSA-Sonden, um Transkriptionsfaktorbindungsstellen innerhalb der -282-Sonde zu identifizieren. Ganz oben sind die Entfernungen der Basen vom ATG-Kodon dargestellt; darunter die Originalsequenz der -282-Sonde und wiederum darunter diverse Bindungsstellen-spezifisch-mutierte -282-Sonden (mut), die Konsensussequenzen der potentiellen Transkriptionsfaktorbindungsstellen (cons, Zeilen hellgrau unterlegt) und spezifisch-deletierte -282-Sonden (Del 1-6). Mutierte bzw. deletierte Basen innerhalb der Sequenz sind dunkelgrau unterlegt. Die letzten beiden Spalten der Tabelle geben Auskunft darüber, ob und wie stark (-, +, ++, +++) die kalten EMSA-Sonden spezifisch die -282-Sonde kompetieren.

Name	Label	5'-3'-Sequenz	Kompetition in PC-12	Kompetition in HEK-293
Original seq	GATC	-288 -287 -286 -285 -284 -283 -282 -281 -280 -279 -278 -277 -276 -275 -274 -273 -272 -271 -270 -269 -268 -267 -266 -265 -264 -263 -262 -261 -260 -259 -258 -257 -256 -255 -254 -253 -252 -251 -250 -249 -248 -247 A A G G G G A G A T G G A G T C T T G G C C A T C A T C C T A G G G	+++	+++
SMAD mut	GATC	A A G G G A G A T G G A G G A A T G G C C A T C A T C C T A G G G	+	++
SMAD cons	GATC	A G T A T G T C T A G A C T G A	+	-
NF-1 mut	GATC	A A G G G A G A T G G A G T C T T A A T C A T C A T C C T A G G G	++	+++
NF1 cons	GATC	T T A T C A T A T T G G C T T C A A T C C A A A A	++	-
Del 1	GATC	A G A T G G A G T C T T G G C C A T C A T C C T A G G G	keine Daten	+
Del 2	GATC	A A G G G G A G T C T T G G C C A T C A T C C T A G G G	keine Daten	+
Del 3	GATC	A A G G G A G A T G T T G G C C A T C A T C C T A G G G	keine Daten	++
Del 4	GATC	A A G G G A G A T G G A G T C T T G G C C A T C A T C C T A G G G	keine Daten	+++
Del 5	GATC	A A G G G A G A T G G A G T C T T G G C C A T C A G G G	keine Daten	+++
Del 6	GATC	A A G G G A G A T G G A G T C T T G G C C A T C A T C C T A	keine Daten	+++
GATA mut	GATC	A A G G G A C T T G G A G T C T T G G C C A T C A T C C T A G G G	keine Daten	++
GATA cons	GATC	C A C T T G A T A A C A G A A A G T G A T A A C T C T	keine Daten	-
ZID mut	GATC	A A G G G A G G G A G A G T C T T G G C C A T C A T C C T A G G G	keine Daten	++
ZID cons	GATC	G A T G A T G A T T G A G C C A	keine Daten	-
YY1 mut1	GATC	A A G G G A G A T A A A G T C T T G G C C A T C A T C C T A G G G	keine Daten	++
YY1 mut2	GATC	A A G G G A G T A C C A G T C T T G G C C A T C A T C C T A G G G	keine Daten	++
YY1 mut3	GATC	A A G G G A G T A C C A G T C T T G G C C A T C A T C C T A G G G	-	-
YY1 cons	GATC	A C C A G C C G C C A A A G A T G C C C G G G A G C G G	+++	+++
YY1 cons	GATC	C G C T C C C G G C C A T C T T G G C G G C T G G T	+++	+++
YY1 cons mut	GATC	A C C A G C C G C C A A A G A T A A T C G G G A G C G	keine Daten	-
-282 core		T A A G G G A G A T G G A G T	keine Daten	-
-288	GATC	C T G T A A G G G A G A T G G A G T C T T G G	+++	++
-288 mut	GATC	C T G T A A G G G A G T A C C A G T C T T G G	-	-
-272	GATC	G A G T C T T G G C C A T C A T C C T A G G G C A C	-	-

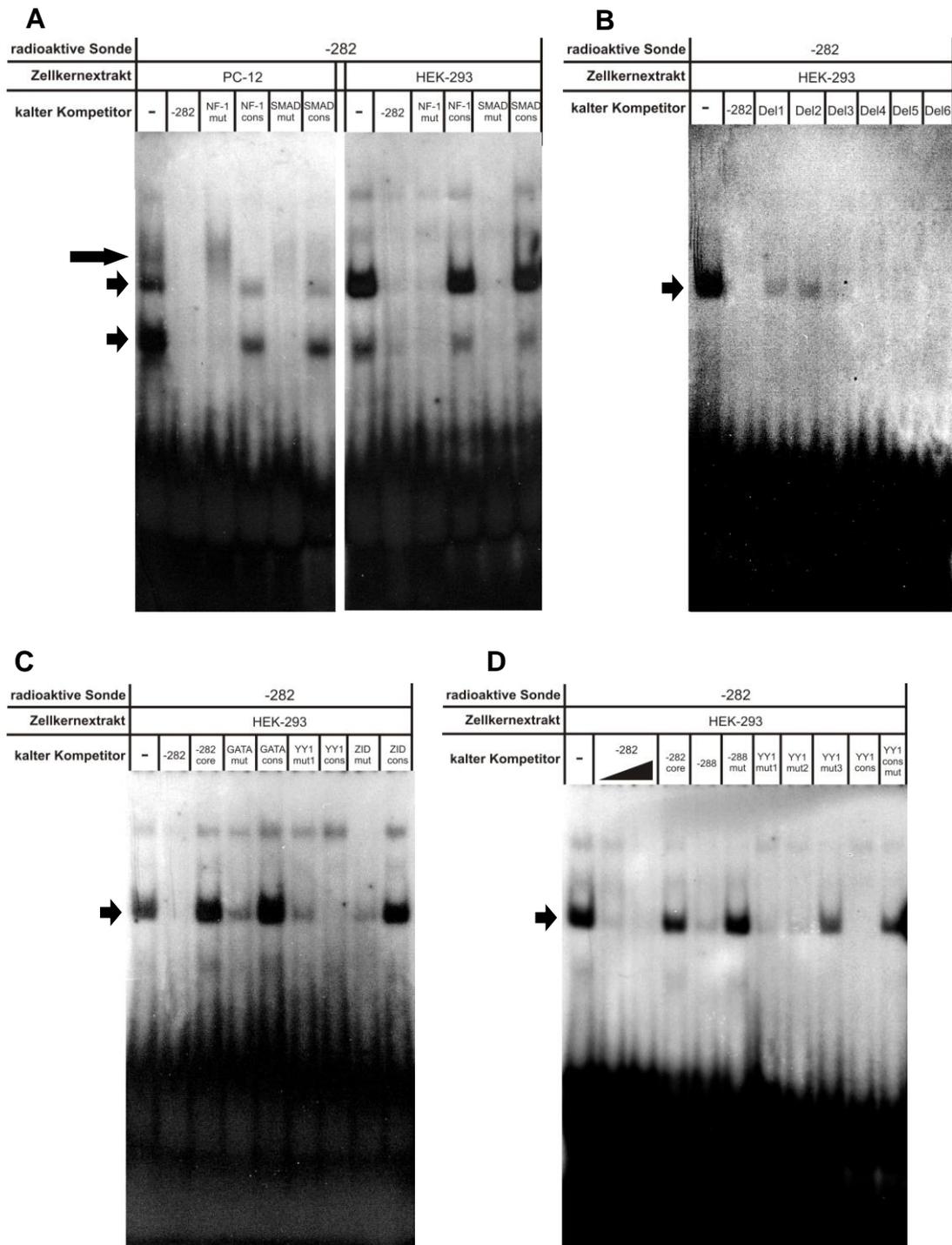


Abb. 3.24: EMSAs, um Transkriptionsfaktorbindungsstellen innerhalb der -282-Sonde zu identifizieren. Dargestellt sind vier verschiedene EMSAs mit kalten Kompetitionen mit denen letztendlich NF-1 und YY1 als Transkriptionsfaktorbindungsstellen identifiziert werden konnten. Die verwendeten EMSA-Sonden sind in Tab. 3.1 dargestellt. Das NF-1-spezifische Signal ist durch einen langen Pfeil gekennzeichnet, die YY1-spezifischen Signale durch kurze Pfeile. **A** Kalte Kompetitionen mit 50-fachen molaren Überschüssen an NF-1mut bzw. cons und SMADmut bzw. cons mit PC-12- und HEK-293-Zellkernextrakten. **B** Kalte Kompetitionen mit 50-fachen molaren Überschüssen der verschiedenen Del-Sonden mit HEK-293-Zellkernextrakten. **C** Kalte Kompetitionen mit 50-fachen molaren Überschüssen an GATAmut bzw. cons, YY1mut bzw. cons und ZIDmut bzw. cons mit HEK-293-Zellkernextrakten. **D** Kalte Kompetitionen mit HEK-293-Zellkernextrakten mit 20- (nur bei -282) bis 50-fachen molaren Überschüssen an diversen Sonden, um die für YY1-relevante Bindungsstelle näher einzugrenzen.

Die NF-1-Bindungsstelle befindet sich, überlappend mit der YY1 1-Bindungsstelle, am 3'-Ende der -282-Sonde bei -267 bis -253 bp (Tab. 3.1).

Im EMSA mit PC-12-Extrakten konnte, wenn auch mit vergleichsweise schwacher Bandenintensität, die NF-1-Bindung an die -282-Sonde nachgewiesen werden (Abb. 3.24A und 3.25). Es zeigte sich, dass sich das NF-1-spezifische Signal nicht durch die NF-1 mut-Sonde, in der die (YY1-relevanten) Basen -265 bis -263 bp mutiert waren, kompetieren ließ. Mit der NF-1-Konsensussequenz wurde das NF-1-spezifische Signal kompetiert, nicht jedoch das YY1-spezifische. Auch mit einem NF-1-spezifischen Antikörper konnte die NF-1-spezifische Bindung, aber nicht die YY1-spezifischen Bindungen aufgehoben werden. Mit HEK-293-Extrakten gab es kein NF-1-spezifisches Signal (Abb. 3.24A).

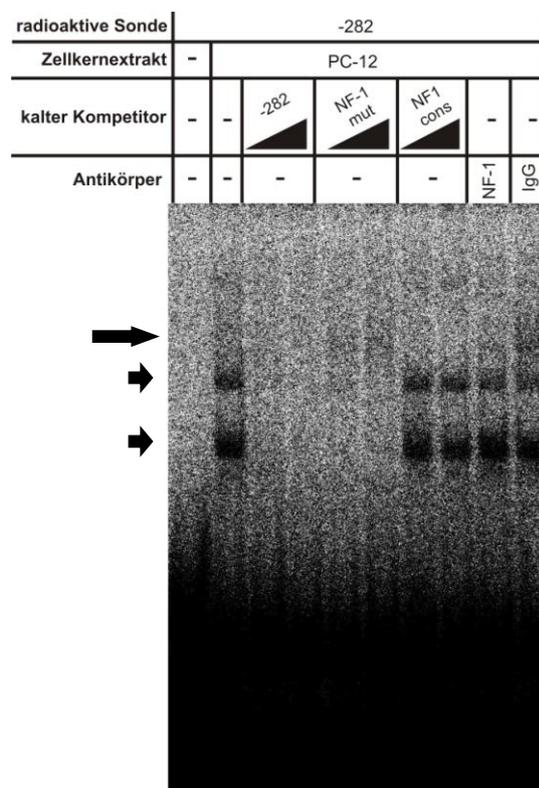


Abb. 3.25: EMSA mit der radioaktiven -282-Sonde aus dem *Htr3b*-Promotor. In der 1. Spalte wurde die radioaktive -282-Sonde ohne Kernextrakt aufgetragen, ab der 2. mit PC-12-Zellkernextrakt. Die -282-Sonde wurde mit sich selbst (Spalten 3-4), mit der NF-1 mut-Sonde (Spalte 5-6), und der Konsensussequenz für den NF-1-Transkriptionsfaktor (Spalte 7-8) mit je 20- und 100-fachem molaren Überschuss kompetiert. Die Spalten 8-9 zeigen ein Supershift-Experiment mit einem NF-1-Antikörper (2 µg) und normalem IgG (Negativkontrolle, 1 µg). Die Antikörper waren für eine Stunde mit PC-12-Zellkernextrakt vorinkubiert worden. Das NF-1-spezifische Signal ist durch einen langen Pfeil gekennzeichnet, die YY1-spezifischen Signale durch kurze Pfeile.

Die beiden identifizierten YY1-Bindungsstellen liegen palindromisch zueinander vor: YY1 2 = -283 bis -269 bp; YY1 1 = -266 bis -252 bp (Tab. 3.1; Abb. 3.26). Um die DNA-Protein-Interaktion spezifisch für jede einzelne Bindungsstelle bewerten zu können, wurden die -288- und die -272-Sonde, die jeweils nur eine YY1-Stelle enthielten, angefertigt.

EMSAs mit der -282- und der -288-Sonde sahen nahezu identisch aus, wobei sich das Signal der -282-Sonde schon mit niedrigeren Konzentrationen des kalten -282-Kompetitors komplett kompetieren ließ, als das Signal der -288-Sonde (Abb. 3.24D, Spalten 3 und 5). Außerdem zeigte sich im EMSA mit der -282-Sonde die Bedeutung der YY1 1-Bindungssequenz. War nur die ATGG-Basenfolge an den Positionen -275 bis -272 bp mutiert (Sonde YY1 mut2; Tab. 3.1), wurde das Signal der -282-Sonde etwa mit gleicher Intensität kompetiert, wie das der unmutierten -282-Sonde (Abb. 3.24D, Spalten 3 und 8). Waren jedoch zusätzlich die beiden Cytosine an den Positionen -263 und -262 bp mutiert (Sonde YY1 mut3; Tab. 3.1), die zur Bindungssequenz von YY1 1 gehören, kam es zu keiner Competition (Abb. 3.24D, Spalte 9). An der -272-Sonde, die nur die YY1 1-Bindungsstelle trägt, konnte allerdings keine eigenständige Proteinbindung nachgewiesen werden (Daten nicht gezeigt). Die YY1 1-Bindungsstelle scheint also von geringerer Bedeutung und nur zusammen mit der YY1 2-Bindungsstelle zur Bindung des YY1-Proteins fähig zu sein. In weiteren EMSAs wurde daher der Fokus auf die YY1 2-Bindungsstelle gelegt und es wurde mit der -288-Sonde gearbeitet, die die vollständige YY1 2-Bindungsstelle beinhaltet (Tab. 3.1).

Abbildung 3.26 zeigt EMSAs mit der -288-Sonde mit PC-12- bzw. HEK-293-Zellkernextrakten. Auffällig war hierbei, dass mit PC-12-Extrakten weniger Überschuss an kalter -288-Sonde notwendig war, um die Banden verschwinden zu lassen, als mit HEK-293-Extrakten. Mit PC-12-Extrakten wurde dazu ein 100-facher molarer Überschuss benötigt, mit HEK-293-Extrakten ein 200-facher Überschuss. Die YY1-Konsensussequenz kompetierte bereits bei 30-fachem Überschuss komplett die Banden bei beiden Zellkernextrakten. Auch YY1-spezifische Antikörper konnten, im Gegensatz zur IgG-Negativkontrolle, die Bindung in beiden Zellextrakten komplett aufheben.

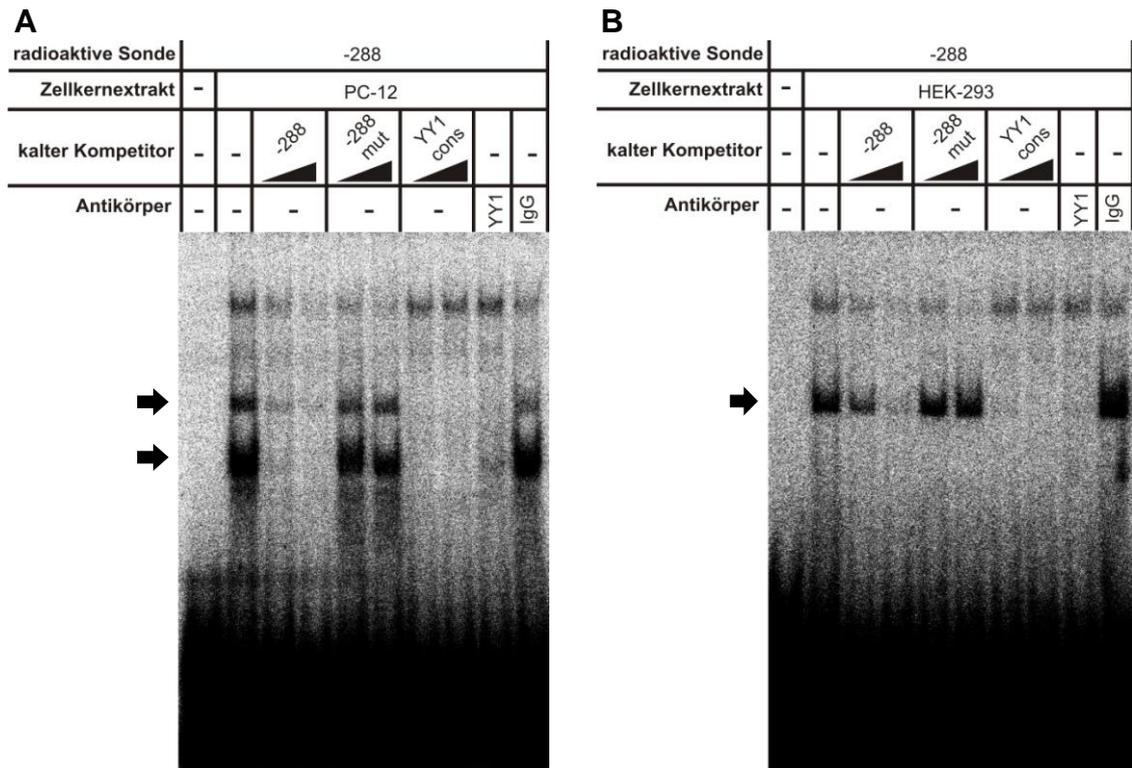


Abb. 3.26: EMSA mit der radioaktiven -288-Sonde (trägt die YY1 2-Bindungsstelle) aus dem *Htr3b*-Promotor. EMSA mit PC-12-(A) und HEK-293-Zellkernextrakten (B). In der 1. Spalte wurde die radioaktive -288-Sonde ohne Kernextrakt aufgetragen, ab der 2. mit Zellkernextrakten. Die -288-Sonde wurde mit sich selbst (Spalten 3-4), mit der mutierten -288-Sonde (Spalten 5-6) und der Konsensussequenz für den YY1 Transkriptionsfaktor (Spalten 7-8) kompetiert. Die nicht radioaktiven (kalten) Sonden wurden für PC-12-Extrakte in 30- und 100-fachem molarem Überschuss zugegeben, für HEK-293-Extrakte in 30- und 200-fachem molarem Überschuss. Die Spalten 9-10 zeigen ein Supershift-Experiment, wobei die Zellkernextrakte mit 2 µg eines Antikörpers gegen YY1 bzw. normalem IgG (Negativkontrolle, 1 µg) für eine Stunde vorinkubiert worden war. Die YY1-spezifischen Signale sind durch Pfeile gekennzeichnet.

Zusammenfassend lässt sich durch EMSAs für die -282-Sonde sagen, dass dort drei Transkriptionsfaktorbindungsstellen vorliegen: YY1 2 = -283 bis -269 bp; YY1 1 = -266 bis -252 bp und NF-1 = -267 bis -253 bp. Die Bindung der entsprechenden *trans*-wirkenden Elemente wurde über EMSA-Supershift-Assays nachgewiesen. Die YY1-Bindung konnte mit PC-12- und HEK-293-Zellkernextrakten beobachtet werden; jedoch zeigte sie sich mit PC-12-Zellkernextrakt durch zwei spezifische Banden, mit HEK-293-Zellkernextrakt nur durch eine spezifische Bande. Überdies konnte die NF-1-Bindung nur mit PC-12-Zellkernextrakten nachgewiesen werden. Die funktionelle Bedeutung der YY1- und NF1-Bindung für die *Htr3b*-Expression muss noch in Reporter-genversuchen geklärt werden.

3.1.4.4.2.4 Egr-1

Während der Literaturrecherchen, die auf den bisherigen Erkenntnissen über den *Htr3b*-Promotor aufbauten und Hinweise auf weitere bindende Transkriptionsfaktoren zum Ziel hatten, tat sich der Transkriptionsfaktor Egr-1 (*Early growth response factor 1*) durch seinen Einfluss in Zusammenhang mit der NGF-gesteuerten Differenzierung in PC-12-Zellen und durch die Zusammenarbeit mit USF1 in anderen Genen besonders hervor (Ebert et al., 1994; Carrasco-Serrano et al., 1998; Nagavarapu et al., 2001; Tai et al., 2006).

Durch bioinformatische Analysen wurde im *Htr3b*-Promotor eine potentielle Egr-1-Bindungsstelle bei -323 bis -318 bp identifiziert. Als Erstes wurde überprüft, ob diese Egr-1-Bindungsstelle einen Effekt auf die *Htr3b*-Promotoraktivität in Zusammenhang mit der NGF-Behandlung von PC-12-Zellen hat. Dass sich die endogene *Htr3b*-Expression durch die Behandlung der PC-12-Zellen mit NGF steigern lässt, wurde bereits unter Kapitel 3.1.1 beschrieben (Abb. 3.3). Die Behandlung mit NGF führte auch hier zu einer knapp 2-fachen Steigerung der Promotoraktivität des *Htr3b*_{-445bp}-Promotorfragments (Abb. 3.27A). Die Mutation von 3 bp innerhalb der potentiellen Egr-1-Bindungsstelle hatte jedoch keinen weiteren Einfluss auf die Promotoraktivität.

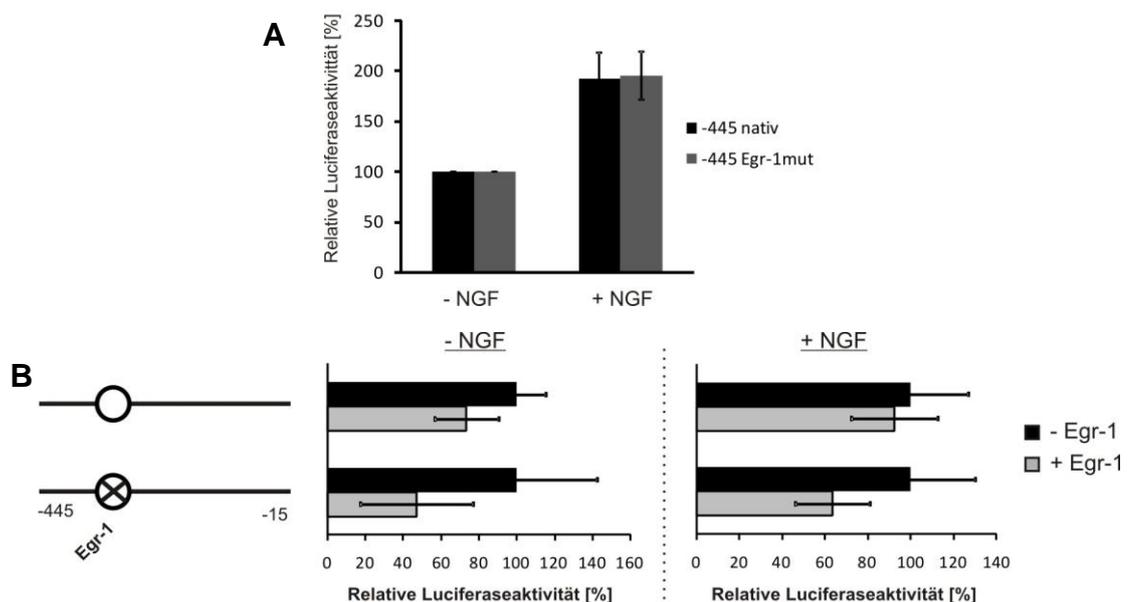


Abb. 3.27: Effekt der Egr-1-Mutation im *Htr3b*_{-445bp}-Promotorbereich auf die Promotoraktivität in PC-12-Zellen ohne und mit NGF-Behandlung. **A** Vergleich der Promotoraktivitäten zwischen Zellen ohne und mit NGF-Behandlung. Die Luciferaseaktivitäten, die unter NGF-Behandlung gemessen wurden, sind prozentual zu denen ohne NGF-Behandlung angegeben. **B** Effekt einer Egr-1-Überexpression auf die Promotoraktivitäten ohne und mit NGF-Behandlung. Die Messwerte sind prozentual zum nativen bzw. Egr-1-mutierten *Htr3b*_{-445bp}-Promotor ohne Egr-1-Überexpression angegeben. Gezeigt sind die Mittelwerte \pm SEM aus 3 (**A**) bzw. 2 (**B**) unabhängigen Messungen, die in Doppelbestimmungen durchgeführt wurden.

Eine künstliche Überexpression von Egr-1, initiiert durch die transiente Transfektion von pCMV-SPORT6::EGR-1 zusammen mit dem Reporterplasmid, das das *Htr3b*_{-445bp}-Promotorfragment trägt, zeigte immer einen Trend zur Abnahme der Promotoraktivität im Vergleich zu transienten Kotransfektionen mit dem leeren pCMV-SPORT6-Plasmid (Abb. 3.27B). Da dies die nativen und Egr-1-mutierten Promotorfragmente in undifferenzierten (- NGF) und differenzierten (+ NGF) PC-12-Zellen gleichermaßen betraf, ist davon auszugehen, dass Egr-1 keine spezifische Wirkung innerhalb des *Htr3b*-Promotors vermittelt. Des Weiteren konnte im EMSA keine konstante DNA-Protein-Interaktion für die Egr-1-Sonde gezeigt werden (Abb. 3.20).

Eine Wechselwirkung mit USF1 an der E-Box 2-Bindungsstelle ist ebenfalls auszuschließen, da die Doppelmutation der E-Box 2- und Egr-1-Bindungsstelle im *Htr3b*_{-445bp}-Promotorfragment keine veränderten Promotoraktivitäten zeigte (Daten nicht gezeigt).

Zusammenfassend lässt sich also ausschließen, dass Egr-1 in die Regulierung der *Htr3b*-Transkription in PC-12 Zellen involviert ist.

3.2 Untersuchung der -100_-102-Region im menschlichen HTR3B-Promotor

Der menschliche *HTR3B*-Promotor wurde bereits zuvor durch unsere Arbeitsgruppe untersucht; Transkriptionsstartseiten wurden bestimmt, die Promotoraktivität wurde grob eingegrenzt und es wurde mittels EMSA die Bindung eines unbekanntes Proteins im Bereich des -100_-102-Polymorphismus festgestellt (Meineke, 2006; Tzvetkov et al., 2007; Meineke et al., 2008). In der vorliegenden Doktorarbeit wurde der Frage nach der Identität des Proteins, das an der polymorphen -100_-102 Region bindet, nachgegangen.

3.2.1. Bestimmung der Kernbindungssequenz in der -100_-102 Region

Um die Kernbindungssequenz innerhalb der EMSA-Sonde zu identifizieren, wurden verschiedene Basen innerhalb der Sequenz deletiert und dann mit kalter Konkurrenz im EMSA gegen die Insertionsvariante des -100_-102-Polymorphismus getestet (Abb. 3.28). Die Insertionsvariante wurde bewusst gewählt, da für sie eine stärkere Bindung des unbekanntes Proteins gezeigt worden war (Meineke, 2006). Im EMSA zeigte die Ins-Sonde ein starkes Signal (Spalte 1), das durch 100-fachen Überschuss der nicht-radioaktiven Ins-Sonde bereits fast komplett verdrängt wurde (Spalte 2). Mit der Ins-3'-kurz-Variante, der 7 bp am 3'-Ende fehlen, kam es selbst mit 300-fachem Überschuss kaum zu einer Konkurrenz (Spalte 5). Die Ins-5'-kurz-Variante, der 6 bp am 5'-Ende fehlen, kompetierte nahezu gleich gut wie die native Sonde (Spalten 6-7). Hingegen gab es für die Del-5'-kurz-Variante, der ebenfalls die 6 bp am 5'-Ende fehlen und bei der die Deletionsvariante des -100_-102-Polymorphismus vorliegt, keine Konkurrenz (Spalten 8-9). Da es nun so aussah, als läge die wesentliche Bindungssequenz mehr am 3'-Ende, wurden außerdem zwei Sonden gegen die Ins-Sonde getestet, deren Sequenz nach 3' verschoben war; es fehlten hier 11 bp am 5'-Ende, dafür kamen 12 bp am 3'-Ende hinzu. Die vollständige, verschobene Sonde kompetierte nahezu gleich gut wie die native Sonde (Spalten 12-13); die mit einer Deletion von 7 bp, die auch schon der Ins-3'-kurz-Sonde fehlten, kompetierte schwächer (Spalten 14-15). Alle Ergebnisse zusammengefasst, lässt sich als Konsensus die Kernbindungssequenz GGAGAAGGAGGAGAACAGAGTG ableiten.

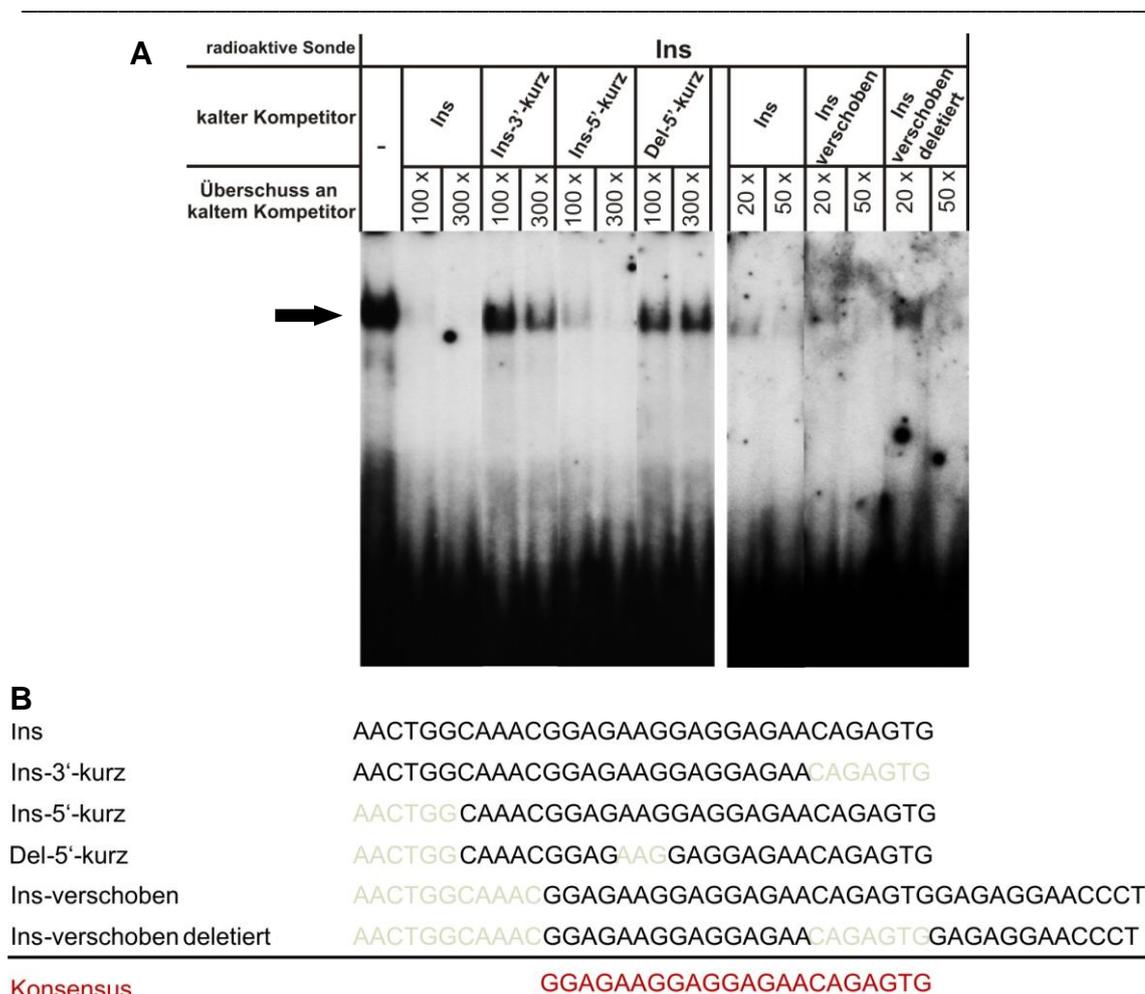


Abb. 3.28: Identifikation der Kernbindungssequenz des unbekannten Proteins in der Region des -100_-102-Polymorphismus. **A** EMSA mit einer radioaktiven Sonde für die Insertionsvariante des -100_-102-Polymorphismus (Ins) mit kalten Kompetitionen gegen verschiedene Variationen dieser Sequenz mit HEK-293-Zellkernextrakten. Das Ins-spezifische Signal ist durch einen Pfeil gekennzeichnet. **B** Variationen der EMSA-Sonde für den -100_-102-Polymorphismus. Die Sequenz der benutzten Sonde ist in schwarzen Buchstaben gezeigt. Graue Buchstaben sind in der Sondensequenz jeweils deletiert. In roten Buchstaben ist die aus den EMSA-Ergebnissen (siehe **A**) geschlossene Konsensussequenz für die essentielle Bindungsstelle des unbekannten Proteins dargestellt.

3.2.2. Überprüfung bioinformatischer Hinweise über die Identität des -100_-102-Bindungsproteins

Durch bioinformatische Analysen wurden in dieser Kernbindungssequenz zwei Halbseiten einer potentiellen Bindungsstelle für den Glukokortikoid-Rezeptor (GR) vorgeschlagen (Abb. 3.29). Eine vollständige GR-Bindungsstelle besitzt die palindromische Sequenz: AGAACAN₃TGTTCT (Faisst und Meyer, 1992). Die weiter 3'-gelegene Halbseite entsprach genau der Konsensussequenz AGAACA; die weiter 5'-gelegene, in deren Bereich sich auch der -100_-102delAAG-Polymorphismus befindet, wich in 2 Basen bei der Insertions- und in 3 Basen bei der Deletionsvariante

davon ab. Die bessere Kompatibilität mit der Insertionsvariante könnte die stärkere DNA-Protein-Interaktion bei der Ins-Sonde im EMSA erklären.

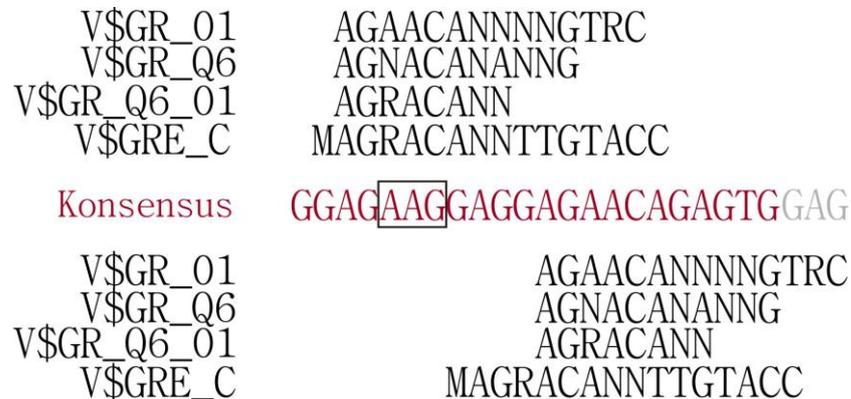


Abb. 3.29: Vergleich verschiedener Glukokortikoid-Rezeptor-Matrizen mit der Kernbindungssequenz rund um den -100_-102-Polymorphismus. Mittig in der Abbildung ist die, in Abb. 3.28 ermittelte, Kernbindungssequenz des unbekanntes Proteins rot hervorgehoben. Darüber und darunter sind je vier verschiedene Matrizen für die Glukokortikoid-Rezeptor-Bindungsstellen dargestellt. Der -100_-102-Polymorphismus ist durch einen Rahmen in der Sequenz hervorgehoben.

Um die Bedeutung dieser potentiellen GR-Bindungsstellen für den menschlichen *HTR3B*-Promotor erfassen zu können, wurden zunächst Reporterassays in PC-12- und HEK-293-Zellen durchgeführt, in denen der GR überexprimiert wird. Die GR-Überexpression wurde durch eine transiente Transfektion des pCDNA5::NR3C1-Plasmids (NR3C1 ist das Gen, welches für den menschlichen GR kodiert) erreicht. Am Tag nach der Transfektion wurde ein Teil der Zellen mit dem Glukokortikoid Dexamethason (1 μ M) behandelt. Dies ist notwendig um die Glukokortikoid-Rezeptoren, die normalerweise inaktiv im Cytoplasma vorliegen, durch Bindung zu aktivieren. Erst dann können die GR in den Zellkern wandern und dort als Transkriptionsfaktoren agieren.

Entgegen den Erwartungen war in allen Proben zu beobachten, dass die Zugabe von Dexamethason die Promotoraktivitäten dämpfte (Abb. 3.30).

In PC-12-Zellen überstiegen alle gemessenen Aktivitäten der *HTR3B*_{-2155bp}-Promotoren nur knapp die der pXP2-Leervektoren (max. 39% Zunahme), wobei die Deletionsvariante jeweils im Mittel etwas stärkere Aktivitäten zeigte, als die Insertionsvariante (Abb. 3.30A). Ohne Dexamethasonzugabe waren die Aktivitäten in den Zellen, in denen GR überexprimiert worden war, etwas stärker. Mit Dexamethasonzugabe sanken diese Aktivitäten allerdings unter jene, die aus Zellen resultierten, die nur mit dem leeren pCDNA5-Vektor kotransfiziert worden waren

(- GR) und sogar unter die Grundaktivität des pXP2-Leervektors (max. 35% Abnahme (Ins-Variante)). In HEK-293-Zellen zeigten sich deutliche (bis zu 15,9-fache) Zunahmen in den Aktivitäten der *HTR3B*_{-2155bp}-Promotoren gegenüber der Grundaktivität des pXP2-Leervektors (Abb. 3.30B). Hier wurden ohne und mit Dexamethasonzugabe jeweils um 33-47% schwächere Aktivitäten in den Zellen mit GR-Überexpression verzeichnet. Die stärkste Abnahme gab es auch hier bei der Ins-Variante mit Dexamethasonzugabe.

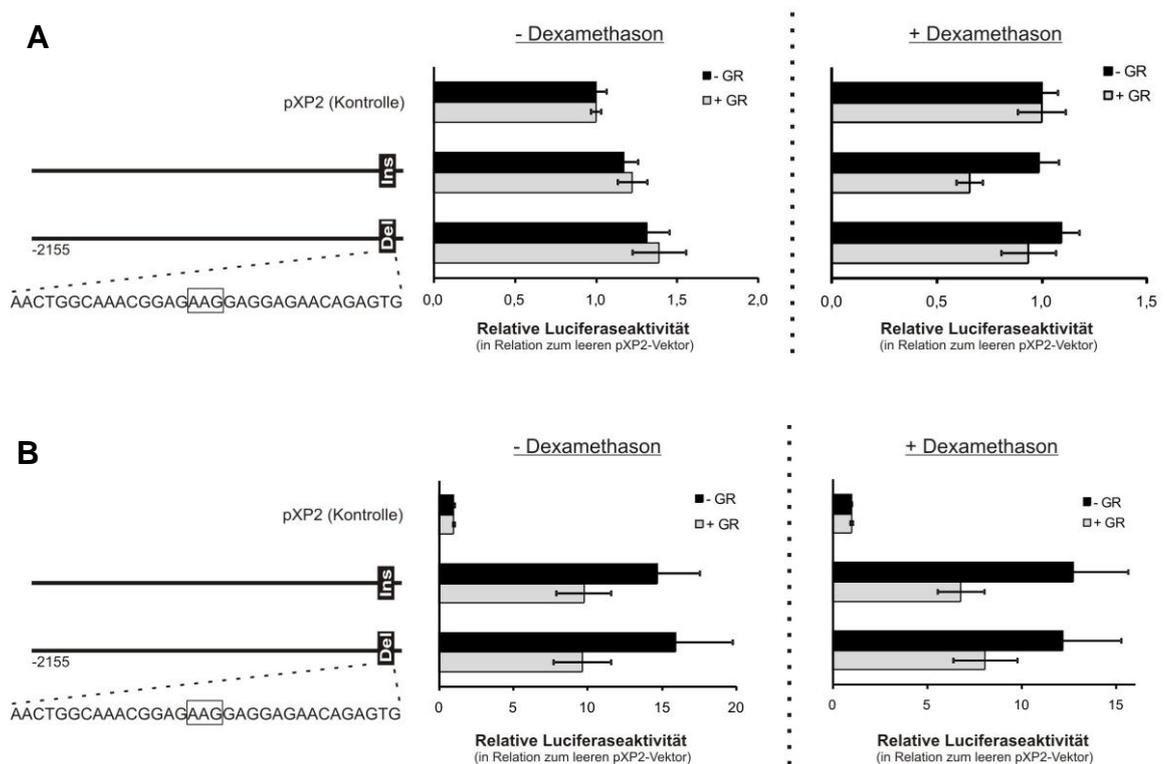


Abb. 3.30: Effekt der Überexpression des Glukokortikoid-Rezeptors und dessen Dexamethason-Abhängigkeit auf die Aktivität des *HTR3B*-Promotors mit der Insertions- und Deletionsvariante des -100_-102-Polymorphismus in PC-12- (A) und HEK-293- (B) Zellen. Ganz links ist jeweils der Promotor mit und ohne -100_-102-Polymorphismus (durch Rahmen in der Sequenz hervorgehoben) schematisch dargestellt. In der Mitte sind die Promotoraktivitäten (als Vielfaches der Grundaktivität von pXP2) ohne Dexamethasonzugabe zum Zellmedium und rechts jene mit Dexamethasonzugabe angegeben. Die Ergebnisse der Proben ohne GR-Überexpression (-GR) sind schwarz dargestellt, jener Proben mit GR-Überexpression (+GR) grau. Gezeigt sind die Mittelwerte +/-SEM aus je 3 unabhängigen Messungen, die in Doppelbestimmungen durchgeführt wurden.

Weiterhin wurden Zellen hergestellt, die GR konstitutiv überexprimierten. Dafür wurde pCDNA5::NR3C1 stabil in HEK-293-T-Rex-Zellen transfiziert. Diese GR-überexprimierenden, sowie die nativen HEK-293-T-Rex, wurden transient mit den pXP2::*HTR3B*_{-2155bp}-Reportergenplasmiden transfiziert und am Tag nach der Transfektion bis zur Ernte mit 1 μ M Dexamethason behandelt. Auch hier zeigte sich,

dass eine GR-Überexpression eine hemmende Wirkung auf die Promotoraktivitäten hat (Abb. 3.31). Damit konnte ein Artefakt durch die transiente GR-Transfektion ausgeschlossen werden.

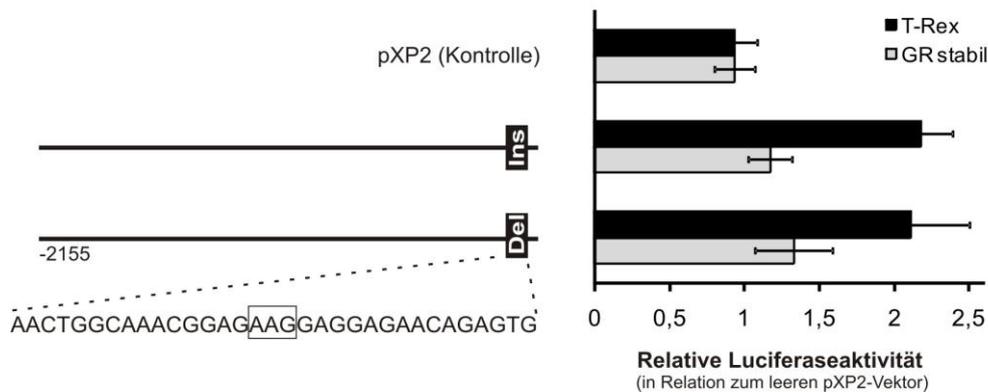


Abb. 3.31: Effekt des -100_-102-Polymorphismus auf die Aktivität des *HTR3B*-Promotors in „normalen“ und mit dem NR3C1-Gen, welches für den GR-Rezeptor kodiert, stabil transfizierten HEK-293-T-Rex-Zellen. Links ist der Promotor mit und ohne -100_-102-Polymorphismus (durch Rahmen in der Sequenz hervorgehoben) schematisch dargestellt. Rechts sind die Promotoraktivitäten als Vielfaches der Grundaktivität von pXP2 angegeben. Die Zellen waren nach der Transfektion mit Dexamethason behandelt worden. Gezeigt sind die Mittelwerte \pm SEM aus je 3 unabhängigen Messungen, die in Doppelbestimmungen durchgeführt wurden.

Gleichermaßen wurden Reporter-genversuche mit den schon zuvor beschriebenen (Meineke et al., 2008) pT81::1 x Ins/Del- bzw. pT81::3 x Ins/Del-Plasmiden in PC-12- und HEK-293-Zellen durchgeführt. In diesen Plasmiden sind die Ins- (33 bp) bzw. Del- (30 bp) Varianten des -100_-102-Polymorphismus 1 x bzw. 3 x hintereinander vor einen konstitutiven Thymidinkinase-Promotor kloniert. Die 3 x Tandemkonstrukte zeigten Dexamethason-abhängige, bis zu 14-fache in PC-12-Zellen bzw. bis zu 7-fache in HEK-293-Zellen, Steigerungen der Promotoraktivitäten nach der GR Überexpression (Daten nicht gezeigt). Andererseits zeigte sich die Promotoraktivität der singulären (1 x Ins oder 1 x Del) pT81-Konstrukte ähnlich wie bei dem nativen *HTR3B*_{-2155bp} Konstrukt; es gab hier keine Dexamethason-abhängigen Steigerungen der Promotoraktivitäten nach einer GR Überexpression (Daten nicht gezeigt).

Für die pT81::3 x Ins/Del-Plasmide wurden auch unter GR-stabilen Bedingungen und Dexamethasonzugabe beträchtliche Steigerungen der Promotoraktivitäten verzeichnet. Es kam zu einer Steigerung um das 4,7-fache für die 3 x Ins-Variante und um das 9,5-fache für die 3 x Del-Variante (Abb. 3.32).

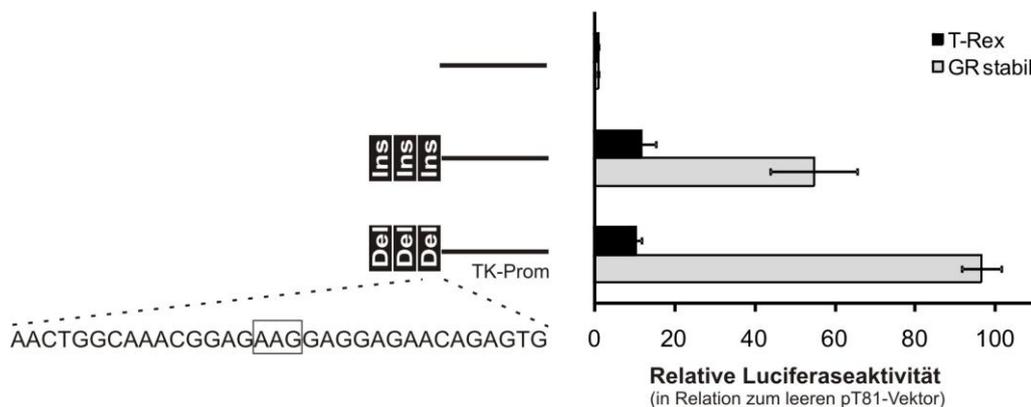


Abb. 3.32: Effekt einer 3 x Tandemklonierung der Insertions- und Deletionsvariante des -100_-102-Polymorphismus auf die Aktivität des TK-Promotors in nativen und mit dem NR3C1-Gen, welches für den GR-Rezeptor kodiert, stabil transfizierten HEK-293-T-Rex-Zellen. Links ist der TK-Promotor ohne und mit Tandemklonierungen, die dem Promotor direkt vorangestellt sind, schematisch dargestellt. Rechts sind die Promotoraktivitäten als Vielfaches der Grundaktivität von pT81 angegeben. Die Zellen waren nach der Transfektion mit Dexamethason behandelt worden. Gezeigt sind die Mittelwerte +/-SEM aus je 3 unabhängigen Messungen, die in Duplikaten durchgeführt wurden.

Aufgrund dieser Erkenntnisse und gestützt durch eine bioinformatische Analyse ist davon auszugehen, dass durch die 3 x Tandemklonierungen der Insertions- und Deletionsvariante des -100_-102-Polymorphismus zwei künstliche GR-Bindungsstellen geschaffen wurden, die im nativen *HTR3B*-Promotor nicht vorkommen (Abb. 3.33). Innerhalb der zehn größten Unterschiede für die Bindungsaffinität verschiedener Transkriptionsfaktoren, kommt bei beiden Varianten jeweils dreimal eine GR-Matrize vor (Abb. 3.33A und B). Für die Matrize V\$GR_Q6 ist der Unterschied am größten; sie steht mit großem Abstand zu den anderen Matrizen in beiden Tabellen ganz oben. Unter den Top 10 befinden sich des Weiteren verschiedene Matrizen für die Transkriptionsfaktoren Androgen-Rezeptor (AR) und Progesteron-Rezeptor (PR), beides dem GR ähnliche Steroidrezeptoren. Die Lokalisationen der GR-Bindungsstellen, die sich aus der Matrize V\$GR_Q6 ergeben, sind in Abb. 3.33C rot markiert: in den 1 x Ins/Del-Varianten gibt es keine Bindungsstelle, in den 3 x Ins/Del-Varianten gibt es jeweils zwei.

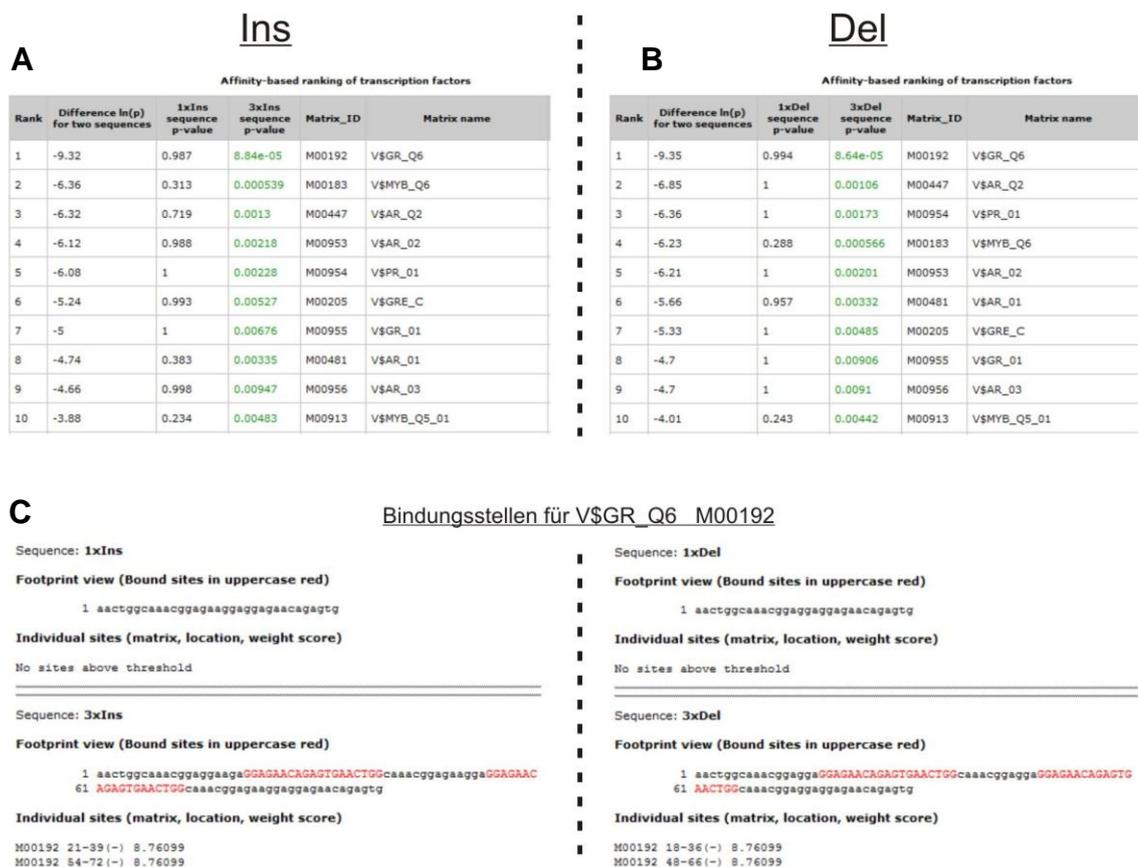


Abb. 3.33: Wahrscheinlichkeiten für Transkriptionsfaktorbindungsstellen in den 1 x/3 xIns- (links) bzw. 1 x/3 x Del- (rechts) Sequenzen). Alle Einzelabbildungen wurden mit der *Transcription Factor Affinity Prediction*-Software (TRAP) im Internet (<http://trap.molgen.mpg.de/cgi-bin/home.cgi>) erstellt. In der oberen Tabelle (A (=Ins) und B (=Del)) sind jeweils die zehn größten Unterschiede für die Bindungsaffinität verschiedener Transkriptionsfaktoren zwischen der 1 x- und 3 x-Variante dargestellt: Spalte 1 = Rang, Spalte 2 = p-Wert für die unterschiedliche Bindungsaffinität zwischen der 1 x- und 3 x-Variante, Spalte 3 = p-Wert für die Bindungsaffinität der Faktoren an die 1 x-Variante, Spalte 4 = p-Wert für die Bindungsaffinität der Faktoren an die 3 x-Variante, Spalte 5 = Identifikationsnr. der Transkriptionsfaktoren, Spalte 6 = Name der Transkriptionsfaktoren. In der Grafik C sind die Lokalisationen der GR-Bindungsstelle (Matrize V\$GR_Q6 (M00192)) innerhalb der Sequenzen dargestellt. Die Bindungsstellen sind rot markiert.

Ein EMSA mit der Ins-Sonde in 100- bzw. 300-facher kalter Konkurrenz mit der GR-Konsensussequenz, bei der es zu keinerlei Verringerung der Bindungsaffinität des Proteins kommt, bestätigt ebenfalls, dass GR nicht das gesuchte Protein ist (Abb. 3.34).

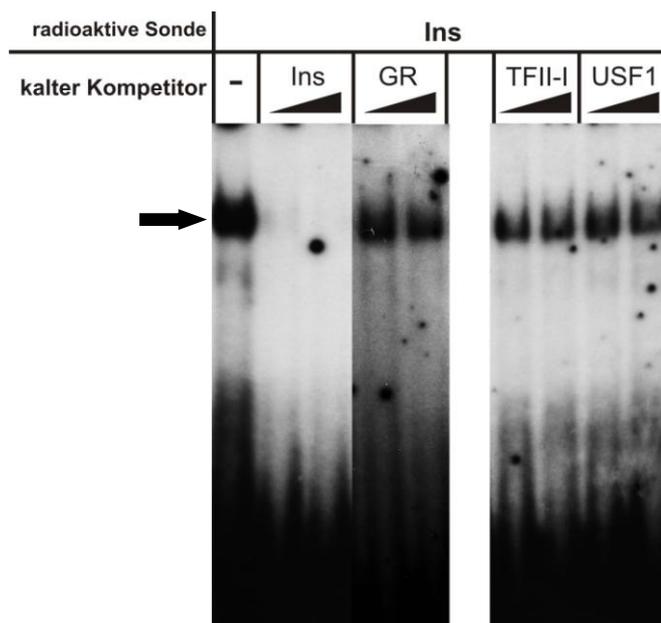


Abb. 3.34: Ausschluss von GR, TFII-I und USF1 als Bindeproteine am -100_-102-Polymorphismus. EMSA mit einer radioaktiven Sonde für die Insertionsvariante des -100_-102-Polymorphismus (Ins) mit kalten Kompetitionen (in 100- bis 300-fachem molaren Überschuss) gegen die Konsensussequenzen des Glukokortikoid-Rezeptors (GR), vom Transkriptionsfaktor II-I (TFII-I) und vom *Upstream Stimulatory Factor 1* (USF1). Das Ins-spezifische Signal ist durch einen Pfeil gekennzeichnet.

Zuvor war bereits die Bindung von neun anderen Transkriptionsfaktoren (AP-1, cMyb, cMyc, E2F1, Östrogen- und Progesteron-Rezeptor, Ets, PPAR, PU1), die laut bioinformatischer Analyse mit hoher Wahrscheinlichkeit in dem Bereich binden könnten, ausgeschlossen (Meineke et al., 2008). Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurde zusätzlich auch die Bindung des Transkriptionsfaktors II-I (TFII-I) und des *Upstream Stimulatory Factors 1* (USF1) an den Bereich um den -100_-102-Polymorphismus ausgeschlossen (Abb. 3.34).

3.2.3. Identifizierung des -100_-102-Bindungsprotein mittels

Affinitätsaufreinigung

Da über die Bioinformatik-EMSA-Vorgehensweise in diesem Fall keine Lösung gefunden werden konnte, wurde versucht, das Protein auf eine komplett andere Weise zu identifizieren: mittels Affinitätsaufreinigung und massenspektrometrischer Analyse. Dabei wurde die Methode von Yaneva et al. mit kleinen Modifikationen benutzt (Yaneva und Tempst, 2006).

Als Erstes wurden HEK-Zellkernproteine mittels einer *Fast protein liquid chromatography* (FPLC) fraktioniert. Durch einen stufenweisen Anstieg der NaCl-

Konzentration (75 mM, 100 mM, 300 mM, 500 mM, 800 mM, 1 M) innerhalb der Säule aus Ionenaustauscher-Cellulose, wurden die Proteine systematisch von der Säule eluiert und gesammelt (Abb. 3.35A). Der Erhöhung der NaCl-Konzentration folgte jeweils ein Absorptionspeak. Insgesamt wurden 26 Proteinfractionen zu je 1 ml gewonnen. Es folgte ein EMSA mit der Ins-Sonde (Abb. 3.35B), mit der geprüft wurde, welche Fraktion das gesuchte -100_-102-Bindungsprotein enthält. Ins-spezifische Signale wurden in den FPLC-Fractionen A7 bis A11 detektiert, die nach 16- bis 26-minütigen Elutionszeit bei einer Konzentration von ~450 mM NaCl von der Säule eluiert worden waren (Abb. 3.35).

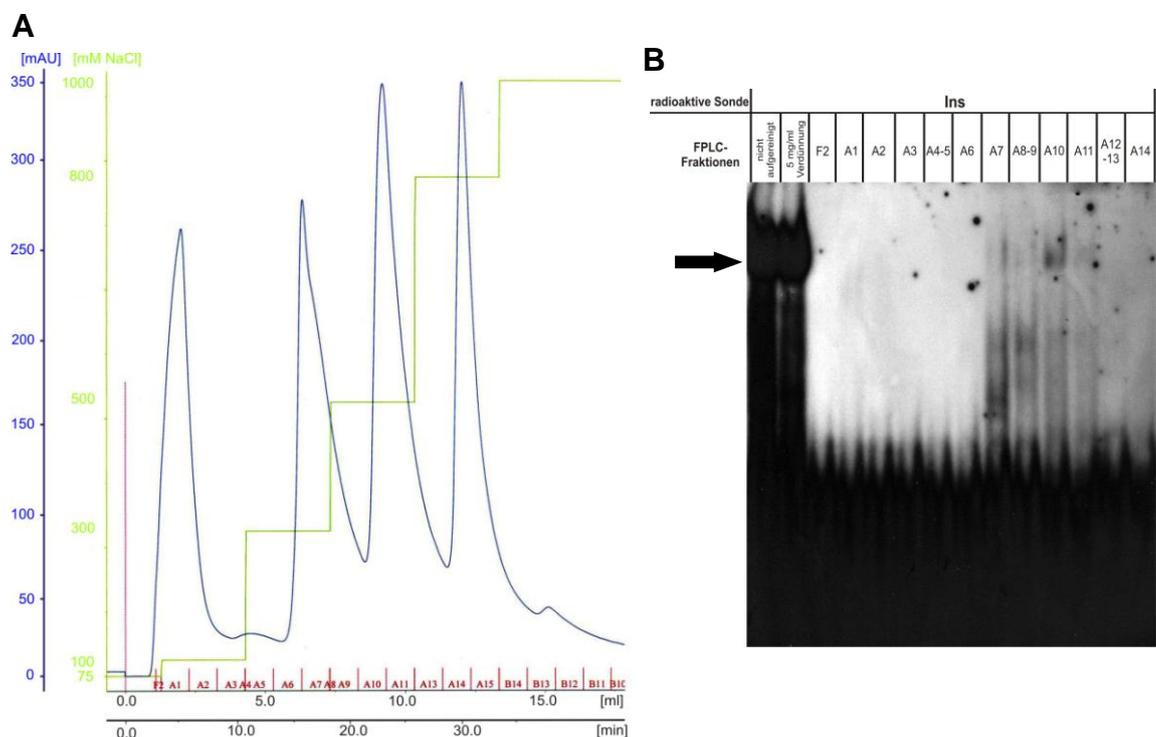


Abb. 3.35: Präfraktionierung der HEK-293-Zellkernproteine mittels FPLC und Identifikation der Fraktion, die das Ins-Sonde-bindende Protein enthält, mittels EMSA. A Chromatogramm des FPLC-Laufs. Auf der X-Achse sind Laufpuffer-Volumen [ml] und Zeitspanne [min] angegeben. In rot sind die verschiedenen FPLC-Fractionen und deren Grenzen gekennzeichnet. Auf der Y-Achse ist, in grün, der stufenweise Anstieg der NaCl-Konzentration [mM], in blau die UV-Absorption bei 280nm [mAU] verzeichnet. **B** EMSA mit den FPLC-Fractionen F2 bis A14. Gezeigt sind die EMSA-Reaktionen zweier Positivkontrollen mit nicht aufgereinigten Proteinen (Spalte 1 = 20 µg; Spalte 2 = 5 µl der 5 mg/ml-Verdünnung, die auf die FPLC-Säule gespritzt wurde) sowie die Reaktionen mit je 5 µl aus den FPLC-Fractionen. Das Ins-spezifische Signal ist durch einen Pfeil gekennzeichnet.

Für eine ganz gezielte Aufreinigung des gesuchten Proteins wurde eine Reaktion durchgeführt, die im Kern der EMSA-Reaktion glich: die FPLC-Fractionen wurden gepoolt und mit der Ins-Sonde vermischt. Die Sonde war hierbei aber nicht radioaktiv

markiert, sondern über eine Biotin-Markierung an Streptavidin-*Dynabeads* gebunden. *Dynabeads* sind Metallkugeln mit einer Größe von 2,8 μm , die kovalent mit Streptavidin beschichtet sind. Mit Hilfe eines Magneten wurden die *Dynabeads* inkl. der an sie gebundenen Proteine vom Rest der Kernproteine getrennt. Dann wurden die gebundenen Proteine mittels Hitzedenaturierung eluiert. Als Negativkontrolle wurde der Versuch parallel auch mit der Ins-3'-kurz-Sonde durchgeführt. Je 10 μl der eluierten Proteine wurden später separat voneinander über zwei SDS-Polyacrylamid-Gele laufen gelassen (Abb. 3.36). Die Proteinbanden wurden durch Silberfärbung sichtbar gemacht. Wie in Abb. 3.36 zu sehen ist, gab es beim Vergleich der Bandenmuster der nichtaufgereinigten (Spalte(n) 2 (und 3)) und der aufgereinigten (Spalten 5-6 und 8-9) Proteine deutliche Unterschiede. Ebenfalls unterschieden sich die Banden aus den verschiedenen FPLC-Fractionen in ihrer Intensität. Des Weiteren zeigte sich, dass die Negativkontrolle (Spalten 6 und 9) nicht so restriktiv war, wie zuvor gedacht und jeweils nahezu das gleiche Muster der gebundenen Proteine wie die eigentliche Probe (Spalten 5 und 8) aufweist. Beim Abgleich mit der Negativkontrolle zeigten sich auf beiden Gelen insgesamt sieben Banden, die bei den Proben stärker waren, als bei der Negativkontrolle. Diese (in Abb. 3.36 durch Pfeile und die Nummern 1-7 markiert) wurden ausgeschnitten und massenspektrometrisch untersucht.

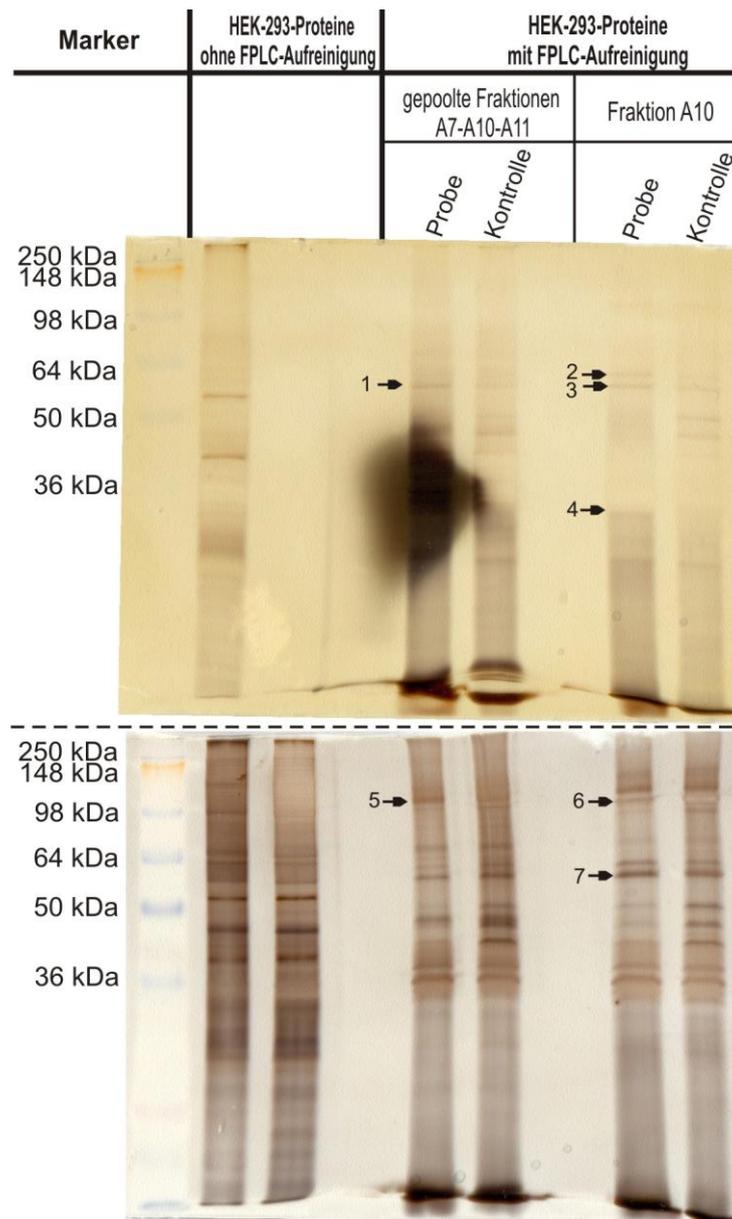


Abb. 3.36: SDS-Polyacrylamid-Gele. In Spalte 1 ist jeweils der Marker aufgetragen, in Spalte 2 (und 3) nichtaufgereinigte HEK-293-Zellkernproteine und in den Spalten 5-6 bzw. 8-9 HEK-293-Zellkernproteine, die zuvor durch FPLC fraktioniert und über *Dynabeads*-Bindung separiert worden waren. Die Spalten 5 und 8 zeigen jeweils die Probe (mit Ins-Sonde separiert) und die Spalten 6 und 9 die (Negativ-)Kontrollen (mit Ins-3'-kurz-Sonde separiert). Die Banden, die anschließend für die massenspektrometrische Analyse ausgeschnitten wurden, sind durch Pfeile und die Nummern 1-7 markiert.

Durch die massenspektrometrischen Analyse wurden vier potentielle -100_-102-Bindeproteine identifiziert (Tab. 3.2): Zinc finger protein 207 (ZNF207); Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein U (hnRNP U); Splice factor, proline- and glutamine-rich (SFPQ) und Non-POU domain-containing octamer-binding protein (NonO). Funktionelle Untersuchungen, ob eines dieser Proteine wirklich an den Bereich

um den -100_-102-Polymorphismus bindet, stehen zwar noch aus, aber durch Literatur-Daten (Iacobazzi et al., 2005; Bianconcini et al., 2009) und eine Sequenzanalyse, ergaben sich hohe Wahrscheinlichkeiten für die Bindung von SFPQ und NonO.

Tab. 3.2: Durch massenspektrometrische Analyse vorgeschlagene -100_-102-Bindungsproteine. Die Nummern der Banden wurden in Abb. 3.36 festgelegt.

Nr. der Bande	Molekülmasse [kDa]	Vorgeschlagene DNA-Bindeproteine
1	-	-
2	-	-
3	~60	Zinc finger protein 207 (ZNF207)
4	-	-
5	~100	Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein U (hnRNP U)
6	~100	Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein U (hnRNP U); Splice factor, proline- and glutamine-rich (SFPQ)
7	~60	Non-POU domain-containing octamer-binding protein (NonO)

4 Diskussion

Der 5-HT₃ Rezeptor spielt eine kritische Rolle in der Vermittlung des Brechreizes nach einer Chemotherapie. Ein genetischer Polymorphismus, -100_-102delAAG, im Promotorbereich des menschlichen *HTR3B*-Gens, das für die B-Untereinheit des Serotonin Typ 3-Rezeptors (5-HT_{3B}) kodiert, wurde mit häufigerer Chemotherapie-induzierter Übelkeit und Erbrechen nach einer Tumor-Therapie mit moderat- bis hochemetogenen Zytostatika assoziiert (Tremblay et al., 2003). In *in vitro*-Untersuchungen zeigte der Promotorbereich mit der Deletionsvariante des -100_-102delAAG-Polymorphismus eine erhöhte Promotoraktivität und es wurde die Bindung eines noch unbekanntes Proteins an den Bereich um den Polymorphismus nachgewiesen (Meineke et al., 2008). Es zeigte sich außerdem, dass das *HTR3B*-Gen durch zwei alternative Promotoren reguliert wird, P1 und P2 (Tzvetkov et al., 2007). Des Weiteren wurde auch schon eine initiale Charakterisierung des Ratten-*Htr3b*-Promotors in Ratten-PC-12-Zellen durchgeführt (Bokelmann, 2007). Dessen wesentliche Promotoraktivität konnte auf einen Bereich ab -445 bp vor dem ATG eingegrenzt werden.

Der erste Fokus der vorliegenden Doktorarbeit lag auf der Identifizierung der Mechanismen der transkriptionellen Regulation des, dem menschlichen *HTR3B* orthologen, Rattengens *Htr3b*. Es zeigte sich, dass es im Ratten-*Htr3b*-Promotor multiple Transkriptionsstartseiten (TSS) gibt, dass sich um die TSS aber keine kanonisch angeordneten Kernpromotorelemente befinden. Ortspezifische Mutationen im direkten Umfeld der TSS, die innerhalb der zuvor als potentielle TFII-I-Bindungsstelle beschriebenen Region bei -109 bp liegt, führten zur Abnahme der Promotoraktivität. Die CpG-Insel innerhalb des Promotorbereichs ist nicht in die Regulation der Transkriptionsinitiation involviert. Es wurden Transkriptionsfaktorbindungsstellen für USF1 (*Upstream Stimulatory Factor 1*), YY1 (*Ying Yang 1*) und NF-1 (*Nuclear Factor-1*) nachgewiesen. Die Funktionalität der USF1-Bindungsstelle wurde in Reportergerätenversuchen belegt, für YY1 und NF-1 stehen die entsprechenden Versuche noch aus.

Der zweite Fokus dieser Doktorarbeit war die Identifizierung des Proteins, welches an den -100_-102-Polymorphismus im humanen P1 bindet. Mittels Affinitätsaufreinigung

und massenspektrometrischer Analyse wurden vier potentiell bindende Proteine identifiziert.

4.1 Transkriptionelle Charakterisierung des Ratten-*Htr3b*-Promotors

4.1.1 Transkriptionsstartseiten

Durch eine Transkriptionsstartseitenanalyse mit der 5'-RLM-RACE-Methode wurden für das Ratten-*Htr3b*-Gen vier „Haupt“-Transkriptionsstartseiten (TSS) und mindestens sechs weitere TSS, über einen Bereich von insgesamt 132 bp identifiziert (Abb. 3.6 und 4.1). Alle TSS liegen innerhalb des proximalen 5'-Bereichs, für den schon in Vorarbeiten Promotoraktivität nachgewiesen werden konnte (Bokelmann, 2007). Multiple TSS für ein Gen sind der „Normalfall“ für die Transkriptionsinitiation in Vertebraten (Suzuki et al., 2001; Juven-Gershon und Kadonaga, 2010); sie erstrecken sich im Durchschnitt über 71 bp, aber selten weiter als über 150 bp (Sandelin et al., 2007). Der *Htr3b*-Promotor ist also ein unfokussierter Promotor.

Als „Haupt“-TSS wurden die TSS eingestuft, die sowohl durch TOPO-Klonierung mit nachfolgender Sequenzierung, als auch durch Fragmentlängenanalyse mit hohen Gesamtanteilen an der jeweiligen TSS-Gesamtmenge identifiziert worden waren. Bei der TOPO-Klonierung wurde eine auffällige Häufigkeit der TSS bei -211 bp beobachtet. Sie machte 29% am Gesamtanteil der TSS aus. Für eine vornehmliche Rolle dieser TSS spricht auch die Größe des Haupt-PCR-Produkts, das sich nach den RACE-*nested PCRs* auf dem Agarosegel gezeigt hatte (Abb. 3.4). Die „Hochrechnung“ der TSS, die sich aus der Fragmentlängenanalyse ergeben hatte, zeigte zwar keine klare Präferenz für die Position bei -211 bp, aber drei Positionen in deren Umgebung (bei -213, -209 und -208 bp) machten immerhin 7% am Gesamtanteil der durch Fragmentlängenanalyse identifizierten TSS aus. Die Häufigkeiten der aufgezeigten TSS müssen über weitere Auszählungen einzelner Klone oder alternativ über Methoden wie *cap analysis gene expression* (CAGE; (Shiraki et al., 2003)) überprüft werden.

Es ist möglich, dass die Zahl der TSS im *Htr3b*-Promotor unterschätzt wurde. Aus zwei oder mehr TSS, die sich aus der TSS-Analyse ergaben, wurden in der Auswertung Cluster gebildet um eventuelle Rundungsfehler aus der Fragmentlängenanalyse

auszugleichen. Dabei wurden z. T. 2-5 mitunter schwache TSS zu einer einzigen TSS zusammengelegt. In der Literatur ist aber auch beschrieben, dass TSS an direkt aufeinander folgenden Basenpaaren auftreten können (Suzuki et al., 2001; Sandelin et al., 2007).

Besonders häufig sind diverse TSS in Promotoren ohne TATA-Box (Suzuki et al., 2001). Auch der *Htr3b*-Promotor besitzt keine TATA-Box und auch sonst keine kanonisch angeordneten Kernpromotorelemente. Im Bereich der TSS wurden zwar zwei direkt aufeinanderfolgende Sequenzelemente mit der Inr-Konsensussequenz (YYANWYY) bei -210 bis -204 und -203 bis -197 bp vor dem ATG identifiziert, aber keine der ermittelten TSS stimmt mit den Soll-TSS innerhalb der potentiellen Inr-Elemente überein (Abb. 3.6). Dass es keine bekannten Kernpromotorsequenzelemente in der Nähe von TSS gibt, ist auch für diverse andere Promotoren bekannt (Suzuki et al., 2001).

4.1.2 DNA-Methylierung in der CpG-Insel

DNA-Methylierung innerhalb einer CpG-Insel kann, abseits von Kernpromotorelementen, die Transkriptionsinitiation steuern. Bei methylierter DNA sind Methylgruppen an die Cytosine einer CG-Basenfolge (CpG) gebunden. Die modifizierte DNA ist daher unzugänglich für Transkriptionsfaktoren, die Genexpression wird unterbunden. DNA-Methylierung ist ein Mechanismus der epigenetischen Genregulation und spielt weiterhin eine Rolle bei der Krebsentstehung, wenn die DNA-Methylierung in den Tumorzellen gestört ist (Baylin, 1997).

In der Literatur ist beschrieben, dass CpG-Inseln häufig in Promotoren mit diversen TSS vorkommen (Sandelin et al., 2007). Im *Htr3b*-Promotor wurde eine 220 bp lange CpG-Insel mit einem G/C-Gehalt von 57,7% und 14 CpGs identifiziert (Abb. 3.7). Durch drei verschiedene Methylierungsanalysen wurde ihre Funktionalität geprüft: Für eine Funktionalität spricht eine *in vitro*-Methylierung des *Htr3b*_{-445bp}-Promotorbereichs, die in einem starken Rückgang der Promotoraktivität resultierte (Abb. 3.8). Die zwei *in vivo*-Versuche sprechen allerdings dagegen. Bisulfit-Sequenzierungen zeigten, dass sich die Methylierungen vorwiegend auf sieben dicht beieinander gelegene Cytosine (Positionen 7 bis 13) beschränkt (Abb. 3.9, Abb. 4.1). Gleichzeitig waren diese aber nur in 12% aller untersuchten Klone methyliert. Ein Zusammenhang zwischen der

Häufigkeit der Methylierung und den NGF-gesteuerten Differenzierungsstadien der PC-12-Zellen, innerhalb derer die *Htr3b*-Expression und die *Htr3b*-Promotoraktivität zunehmen, war nicht zu erkennen. Beim 2. *in vivo*-Versuch handelte es sich um eine PC-12-Zellkultivierung mit 5-Aza-2'-Deoxycytidin- und Trichostatin A-Behandlung. 5-Aza-2'-Deoxycytidin bewirkt eine Hypomethylierung der DNA und Trichostatin A eine Acetylierung der Histone. Die Transkriptionsfaktorbindungsstellen CpG-abhängiger Gene werden durch die Behandlung für die entsprechenden Transkriptionsfaktoren leichter zugänglich, was zur Steigerung der Expression führt. Für *Htr3b* wurden allerdings zu verschiedenen Zeitpunkten und mit verschiedenen 5-Aza-2'-Deoxycytidin-Konzentrationen nur Rückgänge der Expression gemessen (Abb. 3.10).

Des Weiteren beinhaltet die CpG-Insel auch keine Sp1-Transkriptionsfaktorbindungsstellen (Konsensussequenz: GGGCGG), die in Zusammenhang mit der Transkriptionsinitiation innerhalb von CpG-Inseln beschrieben werden (Smale und Kadonaga, 2003; Yang et al., 2007).

Aus diesen Daten wird geschlussfolgert, dass die CpG-Insel im *Htr3b*-Promotor nicht die Transkriptionsinitiation steuert.

4.1.3 Eingrenzung des *Htr3b*-Promotorbereichs - Die Rolle der ECRs

Vorherige Analysen in PC-12-Zellen zeigten, dass sich die proximale Promotoraktivität des *Htr3b*-Gens auf einen Bereich ab -445 bp vor dem ATG beschränkt (Bokelmann, 2007). Darüber hinaus wurden stromaufwärts vom proximalen *Htr3b*-Promotor drei Bereiche mit einer starken evolutionären Konservierung innerhalb der Säugetiere identifiziert (*evolutionary conserved regions*, ECRs; Abb. 3.11). Ihre starke Konservierung innerhalb einer sonst als unfunktionell angesehenen, intergenischen Region warf die Frage nach der Funktionalität als Enhancer/Silencer auf. Enhancer/Silencer-Elemente können über ihre charakteristische DNase I Hypersensitivität identifiziert werden (Gross und Garrard, 1988). Für die ca. 7 kb stromaufwärts gelegene ECR 3 konnte eine solche Hypersensitivität in einer quantitativen PCR nachgewiesen werden (Abb. 3.12). Allerdings vermittelte sie, direkt vor den *Htr3b*_{-258bp}-Promotor kloniert, keine zusätzliche Promotoraktivität im Reporter-genversuch (Abb. 3.13A). Auch die ECR 1 (ca. -1,7 kb vom ATG) und der

proximale Promotorbereich zeigten Sensitivitäten auf DNase I (Abb. 3.12). ECR 1 wurde ebenfalls vor den *Htr3b*_{258bp}-Promotor kloniert. Hier zeigte sich eine signifikante Abnahme der Promotoraktivität (Abb. 3.13B). ECR 2 war überhaupt nicht DNase I-sensitiv.

Außerdem wurde der Einfluss des NGF-gesteuerten Differenzierungsstatus der PC-12-Zellen auf die DNase I Hypersensitivität getestet (Abb. 3.12). Für ECR 3 konnte kein Unterschied im Chromatin aus nativen und differenzierten PC-12-Zellen festgestellt werden. Für ECR 1 und den proximalen Promotor zeigte sich hingegen, dass das Chromatin von differenzierten PC-12-Zellen deutlich anfälliger für den DNase I-Verdau ist, als das von nativen PC-12-Zellen. In differenzierten PC-12-Zellen weisen diese beiden Bereiche also eine offenere Konformation auf und können damit leichter durch regulierende Proteine gebunden werden. Ähnliches wurde von Reeben et al. in PC-12-Zellen für den NF-L-Genpromotor beschrieben (Reeben et al., 1995).

Damit kann für ECR 3 geschlussfolgert werden, dass sie zwar stets eine offene Konformation aufweist und damit höchstwahrscheinlich ein Enhancer/Silencer-Element ist, welches aber nicht mit dem *Htr3b*-Promotor zusammenarbeitet. Für ECR 1 kann geschlussfolgert werden, dass sie spezifisch während einer Konformationsänderung des Chromatins in Zusammenhang mit der PC-12-Ausdifferenzierung „geöffnet“ wird und dass sie als Silencer-Element mit dem *Htr3b*-Promotor zusammenarbeitet. Durch bioinformatische Analysen wurden in ECR 1 u. a. Bindungsstellen für Hox (*Homeobox*)-Transkriptionsfaktoren, die als Repressoren agieren können (Svingen und Tonissen, 2006), vorgeschlagen.

Bei der Betrachtung dieser Ergebnisse sei jedoch darauf hingewiesen, dass die direkte Klonierung vor den Promotor nur ein kryptisches Modell ist, das die wahren Verhältnisse im Chromatin nicht nachbilden kann. Innerhalb des Chromatins kann es zu ganz bestimmten Faltungen der DNA und/oder der Beteiligung bzw. Wechselwirkung von/mit weiteren Transkriptionsfaktoren kommen (Gross und Garrard, 1988; Felsenfeld, 1992). Um die mögliche Funktionalität von ECR 3 und ECR 1 auf Chromatin-Ebene zu untersuchen, wären stabile Transfektionen der Promotorkonstrukte notwendig. Li et al. konnten so z. B. nachweisen, dass DNase I hypersensitive Stellen aus dem PU.1-Locus, die transient transfiziert kaum einen Effekt auf die Aktivität des

PU.1-Kernpromotors hatten, stabil in die humane Myeloid-Zelllinie U937 transfiziert, eine 200-fache Steigerung der Promotoraktivität verursachten (Li et al., 2001).

4.1.4 Charakterisierung des proximalen *Htr3b*-Promotors

Zur weiteren Eingrenzung des -445 bp-Bereichs wurden Luciferase-Reporterassays in Ratten-PC-12- sowie humanen HEK-293-Zellen vorgenommen. Während PC-12-Zellen eigenständig Ratten-*Htr3b* exprimieren, exprimieren HEK-293-Zellen kein (humanes) *HTR3B*. Die Promotoraktivitäten der verschiedenen 5'-Deletionen des *Htr3b*-Promotorbereichs fielen in den beiden Zelllinien unterschiedlich aus. Während die Aktivitäten des *Htr3b*_{-445bp}-Promotorbereiches in beiden Zelllinien mit der 21,5- (PC-12) bzw. 23,3- (HEK-293) -fachen Aktivität des Leervektors etwa gleich waren, ging die Aktivität infolge der Deletionen in den PC-12- allmählicher zurück, als in HEK-293-Zellen (Abb. 3.15). Dieser zellspezifische Unterschied könnte durch die Existenz bzw. Abwesenheit bestimmter Transkriptionsfaktoren und deren zur Transkriptionsinitiation benötigten Wechselwirkungen mit der DNA erklärt werden.

In der vorliegenden Arbeit wurden zehn verschiedene Transkriptionsfaktorbindungsstellen im *Htr3b*_{-445bp}-Promotorbereich untersucht; eine E-Box, zwei YY1-Bindungsstellen, eine NF-1-Bindungsstelle, vier Bindungsstellen für Faktoren der POU-Familie und eine Egr-1-Bindungsstelle.

Für vier Bindungsstellen (E-Box, zwei YY1-Stellen und eine NF-1-Stelle) konnten die daran bindenden Proteine (USF1, YY1 und NF-1) identifiziert werden. Ihre genaue Positionierung ist in Abb. 4.1 gezeigt.

4.1.4.1 Evolutionär konservierte Motive

Evolutionär konservierte Motive wurden durch bioinformatische Analysen über die Konservierung des 1000 bp stromaufwärts gelegenen Bereichs des *HTR3B*-Gens in 32 Säugetierspezies identifiziert (Abb. 3.14). Im proximalen *Htr3b*_{-445bp}-Promotorbereich liegen 13 evolutionär konservierte Sequenzelemente vor (Abb. 3.15). Die meisten davon (8 Stück) liegen im Bereich zwischen -445 bis -258 bp. Die restlichen fünf Motive

verteilen sich im *Htr3b*_{-258bp}-Promotorfragment. Zwischen -136 und -90 bp gibt es keine konservierten Motive.

Um Bindungsstellen für Transkriptionsfaktoren innerhalb der Motive zu identifizieren, wurden ³²P-markierten Sonden, die die Sequenzen der Motive aufwiesen, hergestellt. Mit ihnen wurden EMSAs mit PC-12- und HEK-293-Zellkernextrakten durchgeführt (Abb. 3.16). DNA-Proteininteraktionen mit den Sonden der Motive 4, 7, 14 und 10 waren jeweils mindestens in einer der beiden Zelllinien reproduzierbar. Die Motive 4, 7 und 14 liegen im Bereich zwischen -445 bis -258 bp, Motiv 10 liegt zwischen -217 und -198 bp, wird also erst bei der 5'-Deletion auf -136 bp vollständig deletiert.

Bioinformatische Analysen schlugen in jedem der vier verschiedenen Motive Bindungsstellen für Transkriptionsfaktoren der POU-Familie vor. Die POU-Transkriptionsfaktoren binden zum einen an die konservierte Octamer-Konsensussequenz ATGCAAAT, andererseits können sie aber auch sehr variabel an Sequenzen wie z. B. TAATGARAT binden (Bendall et al., 1993; Thomson et al., 1994; Herr und Cleary, 1995). In den Motiven 7 und 14 kam die Octamer-Konsensussequenz mit 3 bzw. einem mismatch(es) vor, in den Motiven 4 und 10 kam die TAATGARAT ohne bzw. mit 3 mismatches vor (Abb. 3.17). Diese Sequenzen wurden ortsspezifisch in *Htr3b*_{-445bp}-Reportergenplasmiden mutiert. Ihre Promotoraktivität wurde dann in Luciferase-Reportergenversuchen in PC-12- und HEK-293-Zellen mit der Promotoraktivität des nativen *Htr3b*_{-445bp}-Reportergenplasmids verglichen. Die Effekte der Mutationen waren zellspezifisch verschieden. Während in PC-12-Zellen die Promotoraktivitäten eher abnahmen (signifikant für M14), nahmen sie in HEK-293-Zellen eher zu (signifikant für M4 und M14) (Abb. 3.19). Für PC-12-Zellen könnte sich also die 30%-ige Abnahme der Promotoraktivität, die bei der 5'-Deletion auf -258 bp auftritt (Abb. 3.15), durch den Wegfall der Transkriptionsfaktorbindungsstelle im Motiv 14 erklären lassen. Wie in diesem Zusammenhang aber die 26%-ige Abnahme der Promotoraktivität bei selbiger 5'-Deletion in HEK-Zellen zu erklären ist, bleibt noch zu klären. Die Deletion/Mutation des Motivs 10 zeigte aber generell keine signifikante Veränderung der Promotoraktivitäten in PC-12- und HEK-293-Zellen (Abb. 3.15, Abb. 3.19), was dafür spricht, dass Motiv 10 eher nicht funktionell ist.

In der Literatur (Baumruker et al., 1988; Bendall et al., 1993; Herr und Cleary, 1995) sind die TAATGARAT-Sequenz und die Octamer-Konsensussequenz als Bindungsstellen für den Octamer-Transkriptionsfaktor-1 (Oct-1 oder auch POU2F1

genannt) beschrieben worden. Die vier evolutionär konservierten Motive 4, 7, 14 und 10 wurden in EMSAs auf die Interaktion mit dem Oct-1 Transkriptionsfaktor untersucht. Seine Bindung konnte jedoch in keinem Motiv nachgewiesen werden. In EMSAs mit kalter Konkurrenz zeigte sich allerdings, dass sich die spezifischen DNA-Protein-Interaktionssignale der Sonden durch kalte Sonden mit der Octamer-Konsensussequenz kompetieren ließen. Dies spricht dafür, dass es sich bei den Proteinen, die an die vier verschiedenen Motive binden, tatsächlich um Proteine aus der Familie der POU-Transkriptionsfaktoren handelt. Ihre genaue Identität ist noch unklar, Oct-1 kann aber ausgeschlossen werden.

4.1.4.2 Nicht evolutionär konservierte Motive

Da sich die Promotoraktivität kaum über Transkriptionsfaktorbindungsstellen in den evolutionär konservierten Sequenzmotiven erklären ließ, wurden auch die nicht evolutionär konservierten Bereiche des *Htr3b*_{-445bp}-Promotors untersucht. Dies geschah im EMSA mit Sonden, die die nicht evolutionär konservierten Bereiche abdeckten und mit Sonden, in denen durch bioinformatische Analysen eine hohe Wahrscheinlichkeit für die Bindung bestimmter Transkriptionsfaktoren ermittelt worden war (Abb. 3.20). Letztere überlappten zum Teil, aber nie komplett mit den evolutionär konservierten Sequenzmotiven. In den EMSAs mit PC-12- und HEK-293-Zellkernextrakten zeigten sich die DNA-Protein-Interaktionen mit der Sonde für E-Box 2 und der Sonde für die -282 Region als reproduzierbar.

Für die ortsspezifische Doppelmutation von E-Box 2 (bei -183 bis -178 bp) und einer potentiellen TFII-I-Bindungsstelle (bei -113 bis -105 bp) war schon in Vorarbeiten eine 50%-ige Reduktion der *Htr3b*_{-2057bp}-Promotoraktivität im Reporterassay in PC-12-Zellen gezeigt worden (Bokelmann, 2007). Einzelmutationen der beiden Stellen hatten keinen signifikanten Effekt auf die Aktivität des *Htr3b*_{-2057bp}-Promotors gezeigt. Für E-Box- und TFII-I-Sequenzelemente wurden in der Literatur schon mehrfach Kooperationen beschrieben (Roy et al., 1991; Sadowski und Mitchell, 2005). Beide sind strukturell verwandt, können an dieselben DNA-Sequenzmotive binden und TFII-I kann die Bindung von USF1 an E-Box und Inr-Elemente stabilisieren (Roy et al., 1991).

Reportergergenversuche im Rahmen der vorliegenden Doktorarbeit konnten zeigen, dass eine Einzelmutation der E-Box 2 auch im *Htr3b*_{-445bp}-Promotor keinen Effekt zeigte, jedoch im *Htr3b*_{-258bp}-Promotor zu einer Abnahme der Promotoraktivität um 55% führte (Abb. 3.21A). Die Einzelmutation der potentiellen TFII-I-Bindungsstelle führte bereits im *Htr3b*_{-445bp}-Promotor zu einer Abnahme der Promotoraktivität um 57%, die sich durch eine zusätzliche Mutation der E-Box 2 nicht mehr verändern ließ (Abb. 3.23). Für die Aktivitätsabnahme ist hier also allein die potentielle TFII-I-Stelle verantwortlich. Einen noch größeren Einfluss (-68%) hatte die Einzelmutation der potentiellen TFII-I-Stelle im *Htr3b*_{-258bp}-Promotor. Bei einer Doppelmutation der potentiellen TFII-I-Stelle und E-Box 2 ging die Aktivität insgesamt um 73% zurück, also gerade mal um 5% mehr als bei der Einzelmutation der potentiellen TFII-I-Stelle, aber um 18% mehr als bei der Einzelmutation der E-Box 2. Die potentielle TFII-I-Bindungsstelle zeigt also auch im *Htr3b*_{-258bp}-Promotor einen dominierenden Einfluss.

In weiteren Analysen, stellte sich die Bindung eines Transkriptionsfaktors an der bisher als potentielle TFII-I-Bindungsstelle beschriebenen Region als unwahrscheinlich heraus. Im EMSA konnte keine reproduzierbare Proteinbindung mit der TFII-I-Sonde nachgewiesen werden. Darüber hinaus befindet sich in dieser Region (bei -109 bp) aber eine Transkriptionsstartseite, die sogar an fast gleicher Position in den beiden menschlichen Promotoren P1 und P2 konserviert ist (Abb. 4.2). Es besteht also die Möglichkeit, dass diese durch die Mutation verlegt wurde und dass es daher zu den beschriebenen Abnahmen der Promotoraktivität kam.

Als E-Box 2 bindendes Protein konnte der *Upstream Stimulatory Factor 1* (USF1) identifiziert werden. USF1 ist ein ubiquitär exprimierter Transkriptionsfaktor mit *basic-helix-loop-helix*-Struktur und kann als Homo- oder Heterodimer an E-Box- und Inr-Sequenzelemente binden (Gregor et al., 1990; Roy et al., 1991; Sirito et al., 1994). In der Literatur ist beschrieben, dass USF1 in TATA-Box- und TATA-Box-losen Promotoren direkt mit der Transkriptionsmaschinerie, genauer mit TFIID, interagiert (Sawadogo und Roeder, 1985; Bungert et al., 1992; Chiang und Roeder, 1995). In diesem Zusammenhang ist auch interessant, dass genomweit USF1-Bindungsstellen und TSS oft dicht beieinander liegen (FitzGerald et al., 2004; Rada-Iglesias et al., 2008). Im *Htr3b*-Promotor liegen in der direkten Umgebung von E-Box 2 und E-Box 1 (bei -135 bis -130 bp) ebenfalls mehrere TSS.

Im EMSA Supershift wurde nachgewiesen, dass USF1 als Homodimer an das E-Box 2-Element bindet, denn mit dem Antikörper gegen USF1 gab es eine Reaktion, mit dem gegen USF2 nicht (Abb. 3.22). Auch wenn der USF1-Antikörper, wie hier beobachtet, keinen klassischen Supershift, also eine weiter verzögerte Bande im Gel, sondern stattdessen ein Verschwinden der Bande zeigt, ist dies als Zeichen einer spezifischen Reaktion anzusehen. Das Verschwinden der Bande kann durch eine Wechselwirkung zwischen Antikörper und DNA-Bindeprotein zustande kommen, bei der die DNA-Bindedomäne des Proteins verlegt wird. Dieser Effekt wurde mit dem gleichen USF1-Antikörper auch von Steiger et al. beobachtet (Steiger et al., 2004). Eine transiente Überexpression von USF1 führte zu einer knapp 3-fachen Steigerung der *Htr3b*_{-258bp}-Promotoraktivität (Abb. 3.21B). Im E-Box 2-mutierten *Htr3b*_{-258bp}-Promotor war dagegen ein nicht signifikanter Trend für eine Aktivitätssteigerung zu verzeichnen. Dieser könnte auf schwache Wirkungen von USF1 an zwei anderen E-Boxen (E-Box 1 bei -135 bis -130 bp und E-Box 3 bei -243 bis -238 bp) im Promotor zurückgehen. Unter USF1-Einfluss zeigte sich außerdem ein Effekt beim E-Box 2-mutierten *Htr3b*_{-2057bp}-Promotor: im Vergleich zum nativen *Htr3b*_{-2057bp}-Promotor halbierte sich so seine Aktivität (Abb. 3.21C).

Innerhalb der -282-EMSA-Sonde wurden drei Transkriptionsfaktorbindungsstellen, zwei für YY1 (*Ying Yang 1*) und eine für NF-1 (*Nuclear Factor-1*), identifiziert (Tab. 3.1, Abb. 3.24). YY1 ist ein ubiquitär exprimierter Transkriptionsfaktor, der durch unterschiedliche Mechanismen sowohl eine aktivierende als auch reprimierende Wirkung auf die Transkription haben kann (Gordon et al., 2006). NF-1 ist ein Transkriptionsfaktor, der an die konservierte Sequenz TGGA/CN₅GCCAA als Dimer bindet (Nagata et al., 1983). Eine teilweise überlappende Bindungsstelle für YY1 und NF-1 wurde bereits von Furlong et al. im Promotor des humanen p53-Gens beschrieben (Furlong et al., 1996). Beide Faktoren wirkten dort als Aktivatoren, was ungewöhnlich war, da bis zu dieser Publikation für YY1 nur reprimierende Effekte bekannt waren, wenn seine Bindungsstelle mit der einer anderen überlappte. Welche Effekte YY1 und NF-1 auf den *Htr3b*-Promotor haben ist derzeit noch ungeklärt, da Reporter-genversuche mit ortsspezifischen Mutationen und Überexpressionen noch ausstehen. Shrivastava et al. publizierten 1994 Unterschiede zwischen den Konsensussequenzen von YY1 als Aktivator bzw. Repressor (Shrivastava und Calame, 1994). Die Konsensussequenz von

YY1 als Aktivator soll demnach länger, konservierter und GC-reicher sein. Für die YY1-Bindungsstellen im *Htr3b*-Promotor lässt sich damit aber keine klare Vorhersage machen, da ihre Sequenzen an einigen entscheidenden Positionen gleichermaßen von den beiden Konsensussequenzen abweichen. Es fällt aber auf, dass sich der Kernsequenz CCAT bei beiden YY1-Bindungsstellen im *Htr3b*-Promotor ein Cytosin anschließt, was eher für eine aktivierende Wirkung spricht.

Furlong et al. konnten ebenfalls zeigen, dass die Besetzung der YY1/NF-1-gemeinsamen Bindungsstelle gewebespezifisch und unabhängig voneinander ist (Furlong et al., 1996). Dies könnte ein Grund dafür sein, dass sich die YY1-Bindung im EMSA mit HEK-293-Zellkernextrakt nur in einer Bande zeigte, während es mit PC-12-Zellkernextrakt eindeutig und reproduzierbar zwei Banden waren (Abb. 3.26). Warum es mit PC-12-Zellkernextrakt zwei Banden gab, ist noch unklar. Zu vermuten wäre, dass YY1 verschiedene, zell- und/oder speziesspezifische Komplexe mit anderen Transkriptionsfaktoren bildet, die dann je nach Größe auf unterschiedlichen Höhen im Gel laufen. Des Weiteren konnte mit HEK-293-Zellkernextrakt keine NF-1-Bindung nachgewiesen werden (Abb. 3.24A).

Benachbarte Bindungsstellen von YY1, NF-1 und USF1 sind im humanen CYP3A4-Gen nachgewiesen worden (Saito et al., 2001). Weiterhin wurden funktionelle Interaktionen zwischen YY1 und USF1 im Promotor des murinen DNA Topoisomerase IIIa-Gens, des humanen *HOXB7*- und *CXCR4*-Gens festgestellt, wobei YY1 mal als Aktivator und mal als Repressor agiert (Moriuchi et al., 1999; Park et al., 2001; Meccia et al., 2003). Bei Moriuchi et al. zeigten sich mit *in vitro*-synthetisiertem YY1 und spezifischen Sonden für Teile des *CXCR4*-Promotors ebenfalls zwei Banden, wovon sich aber nur die untere spezifisch durch einen YY1-Antikörper verdrängen ließ. In der vorliegenden Arbeit wurden dagegen beide „PC-12-spezifischen“ Banden durch den YY1-Antikörper verdrängt. Eine funktionelle NF-1-Bindungsstelle in Kombination mit einer E-Box wurde im *Htr3a*-Promotor der Maus und des Menschen gefunden (Bedford et al., 1998). Die NF-1-Bindungsstelle liegt im Maus-*Htr3a* bei -180 bis -168 bp und beim humanen *HTR3A* bei -185 bis -173 bp vom ATG. Die Bindung des Transkriptionsfaktors NF-1 wurde über EMSA-Supershift-Versuche verifiziert. Die Mutation der NF-1-Bindungsstelle führte zu einer signifikanten Abnahme der Promotoraktivität.

Bei der Literaturrecherche hatte sich der Transkriptionsfaktor Egr-1 (*Early growth response factor 1*) durch seinen Einfluss im Zusammenhang mit der NGF-gesteuerten Differenzierung in PC-12-Zellen und durch die Zusammenarbeit mit USF1 und dem Glukokortikoid-Rezeptor (GR) als interessant herausgestellt (Ebert et al., 1994; Carrasco-Serrano et al., 1998; Wong et al., 1998; Nagavarapu et al., 2001; Tai et al., 2006). Die Literaturquellen beschreiben Egr-1-gesteuerte Regulationen der Promotoraktivität im, zum *Htr3b*-Gen nahverwandten, nAChR $\alpha 7$ -Gen, das für eine Rezeptoruntereinheit des nikotinischen Acetylcholin-Rezeptors kodiert, und im Promotor des adrenalen Phenylethanolamin-N-Methyltransferase- (*PNMT*)-Gens der Ratte. Diese Effekte wurden in u. a. in PC-12-Zellen nachgewiesen und warfen die Frage nach einer ähnlichen Regulierung für den *Htr3b*-Promotor in PC-12-Zellen auf. In der vorliegenden Arbeit konnte aber weder durch die Mutation der potentiellen Egr-1-Bindungsstelle noch durch die Überexpression von Egr-1 in NGF-behandelten PC-12-Zellen ein Effekt auf die Promotoraktivität oder die Zusammenarbeit mit USF1 nachgewiesen werden (Abb. 3.27). Eine mögliche Zusammenarbeit zwischen der potentiellen Egr-1-Stelle und dem GR wurde hier aufgrund der festgestellten Unfunktionalität dieser Egr-1-Stelle nicht näher untersucht. Zuvor hatte sich aber gezeigt, dass eine Behandlung mit Dexamethason, das notwendig ist um den GR-Rezeptor zum funktionellen Transkriptionsfaktor umzuwandeln, keine Auswirkung auf die *Htr3b*-Promotoraktivität hatte (Bokelmann, 2007).

4.1.5 Kernerkenntnisse über die transkriptionelle Regulation des *Htr3b*-Promotors

Zusammenfassend ergaben sich für die transkriptionelle Regulation des Ratten-*Htr3b*-Promotors folgende Charakteristika, die in Abb. 4.1 auch an der DNA-Sequenz verdeutlicht sind:

- Es gibt multiple Transkriptionsstartseiten (TSS). Vier „Haupt“-TSS, bei -211, -133, -119 und -79 bp, wurden sowohl über eine TOPO-Sequenzierung mit anschließender Sequenzierung als auch über Fragmentlängenanalyse identifiziert.
- Eine weitere TSS bei -109 bp, die bisher nur über Fragmentlängenanalyse identifiziert werden konnte, ist evolutionär konserviert (siehe auch Abb. 4.2).

Durch zwei verschiedene Mutationen im Bereich um diese TSS (jeweils gleichzeitig mutierte Basen sind in Abb. 4.1 grün bzw. orange unterstrichen) konnten starke Abnahmen der Promotoraktivität im Reporter-genversuch gezeigt werden.

- Es wurde eine CpG-Insel von -220 bis -2 bp vor dem Startkodon identifiziert. Eine relativ regelmäßige und kombinierte Methylierung fand aber nur in 7 der 14 methylierbaren Cytosine statt. Vom Differenzierungsstatus der PC-12-Zellen, und damit der *Htr3b*-Expression, sind diese Methylierungen aber unabhängig.
- An der E-Box bei -183 bis -178 bp konnte die Bindung von USF1 nachgewiesen werden. Dass die E-Box als aktivierendes, *cis*-wirkendes Element funktionell und von USF1-abhängig ist, wurde in Reporter-genversuchen bestätigt.
- Der Transkriptionsfaktor YY1 bindet bei -284 bis -269 bp und -266 bis -252 bp an den *Htr3b*-Promotor.
- Der Transkriptionsfaktor NF-1 bindet, überlappend mit einer YY1-Bindungsstelle, bei -267 bis -253 bp.

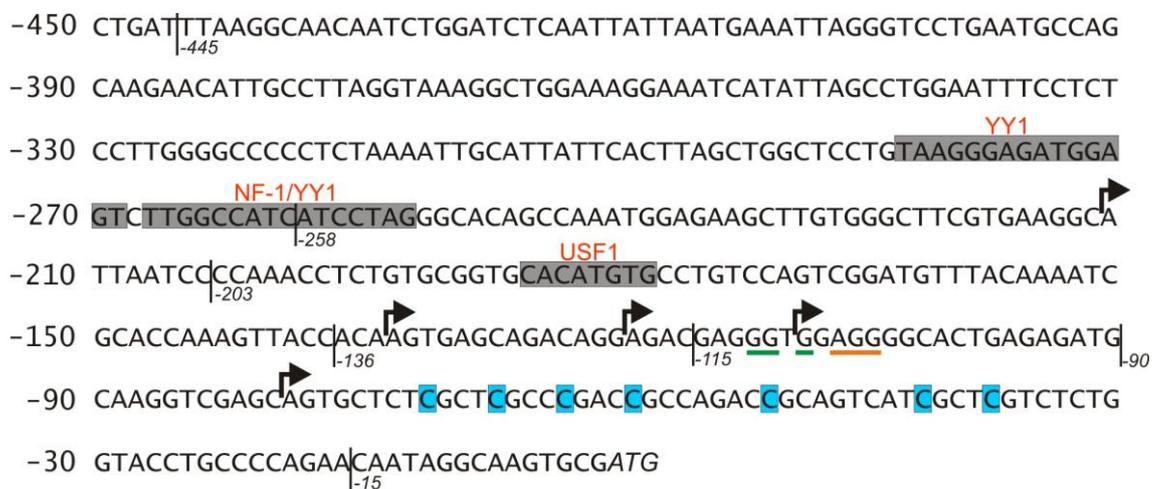


Abb. 4.1: Übersicht über den *Htr3b*_{-450bp}-Promotorbereich inkl. der wesentlichen Ergebnisse. Dargestellt ist die DNA-Sequenz des Promotorbereichs von -450 bis +3 bp. Transkriptionsstartseiten sind durch Pfeile gekennzeichnet. Die verschiedenen Mutationen im Bereich der TSS bei -109 bp sind grün bzw. orange unterstrichen. Die sieben oft kombiniert methylierten Cytosine sind hellblau unterlegt. Die grau unterlegten Bereiche symbolisieren die Positionen der identifizierten Transkriptionsfaktorbindungsstellen. Die Namen der darauf bindenden Proteine sind über diesen Stellen rot hervorgehoben. Die genauen Positionen der durchgeführten 5'-Deletionen sind durch senkrechte Striche mit kursiver Beschriftung unterhalb der Sequenz eingezeichnet.

4.2 Suche nach dem -100_-102delAAG-Polymorphismus-bindenden Protein

Als Kernbindungssequenz des Proteins, welches an den Bereich um den -100_-102-Polymorphismus bindet, wurde GGAGAAGGAGGAGAACAGAGTG ermittelt (Abb. 3.28). Die endgültige Identifizierung des Proteins steht allerdings immer noch aus. Für zwölf Proteine (AP-1, cMyb, cMyc, E2F1, Glukokortikoid-, Östrogen- und Progesteron-Rezeptor, Ets, PPAR, PU1, USF1, TFII-I) konnte eine Bindung an diesem Bereich ausgeschlossen werden (Abb. 3.34) (Meineke et al., 2008). Für alle diese Proteine waren durch bioinformatische Analysen hohe Bindungswahrscheinlichkeiten vorhergesagt worden.

Vor dem medizinischen Hintergrund der vorliegenden Arbeit, der Chemotherapie-induzierten Übelkeit und Erbrechen, war eine mögliche Interaktion mit dem Glukokortikoid-Rezeptor (GR) besonders interessant. Tumorpatienten werden vor bzw. während der Chemotherapie oder Bestrahlung erfolgreich mit Glukokortikoiden (meist Dexamethason) behandelt, um das Chemotherapie-induzierte Erbrechen zu verhindern bzw. abzumildern (Italien-Group-for-Antiemetic-Research, 1995). Wie die Glukokortikoide genau wirken, ist aber noch unbekannt. Ein Eingriff in die transkriptionelle Regulation des Serotonin-Typ 3-Rezeptors (5-HT₃), der einen wesentlichen Anteil an der Vermittlung des Chemotherapie-induzierten Erbrechens hat, wäre ein möglicher Wirkmechanismus.

In EMSAs und Reporter-genversuchen zeigte sich jedoch, dass es zumindest im Promotorbereich rund um den -100_-102-Polymorphismus in der B-Untereinheit des 5-HT₃-Rezeptors (5-HT_{3B}) keine Interaktion mit dem GR gibt (Abb. 3.31, 3.32 und 3.35). Ein Effekt von GR auf die Promotoraktivität konnte im Reporter-genversuch nur mit 3 x hintereinander klonierten Bereichen gezeigt werden (Abb. 3.32). Dieser Effekt wurde durch die Generierung von zwei artifiziellen GR-Bindungsstellen in diesem Konstrukt erklärt (Abb. 3.33). Eine generelle transkriptionelle Steuerung über den GR oder weitere Dexamethason-abhängige Transkriptionsfaktoren ist aber durchaus möglich. Dies zeigt sich durch einen Dexamethason-abhängigen Anstieg der *Htr3b*-Expression in Ratten-PC-12-Zellen (Bokelmann, 2007). Erste Versuche mit einer menschlichen Zelllinie (Lan-1) zeigen diesen Effekt allerdings nicht (Meineke, 2006). Des Weiteren ist in Reporter-genversuchen in PC-12-Zellen kein Effekt auf die *Htr3b*-Promotoraktivität erkennbar (Bokelmann, 2007).

In der vorliegenden Arbeit wurde nun versucht, das im -100_-102-Bereich bindende Protein mittels Affinitätsaufreinigung und massenspektrometrischer Analyse, nach der Methode von Yaneva et al. (Yaneva und Tempst, 2006), zu identifizieren. HEK-293-Zellkernproteine wurden dafür zuerst durch FPLC fraktioniert. Anschließende EMSAs zeigten, dass das zu identifizierende Protein bei ~0,45 M NaCl von einer Säule aus Ionenaustauscher-Cellulose eluiert worden war (Abb. 3.35). Die entsprechenden FPLC-Fractionen wurden dann mit Dynabeads vermischt, an die die biotinmarkierten dsDNA-Sonden Ins (komplette Insertionssonde des -100_-102-Polymorphismus), oder als eine Negativkontrolle die Ins-3'-kurz Sonde (um 7 bp 3'-verkürzte Insertionssonde des -100_-102-Polymorphismus), gebunden waren. Mit der Ins-Sonde war zuvor im EMSA eine reproduzierbare DNA-Protein-Interaktion nachweisbar gewesen, mit der Ins-3'-kurz-Sonde nicht. Über die Dynabeads wurden die Proteine, die an die Sonden binden, spezifisch vom Rest der Proteine innerhalb der FPLC-Fraktion separiert. Die Eluate der Dynabeads sowie native Zellkernextrakte wurden dann auf SDS-Polyacrylamid-Gelen nach ihrer Molekülmasse aufgetrennt. Es zeigte sich, dass sich auch in den Dynabead-Eluaten noch eine Vielzahl an Proteinen befand (Abb. 3.36). Allerdings unterschied sich das Bandenmuster der Dynabead-Eluate komplett von dem der nativen HEK-293-Zellkernproteine. Die Dynabead-Ins- (Probe) und -Ins-3'-kurz- (Negativkontrolle) Eluate unterschieden sich entgegen den Erwartungen jedoch kaum. Trotzdem wurden auf den beiden Gelen, auf denen die gleichen Proben aufgetragen worden waren, insgesamt sieben Banden, die bei der Probe stärker als bei der Negativkontrolle waren, beobachtet (Abb. 3.36). Diese wurden ausgeschnitten und massenspektrometrisch untersucht. In vier Banden konnten Proteine nachgewiesen werden, die als Transkriptionsfaktoren agieren könnten: Zinc finger protein 207 (ZNF207); Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein U (hnRNP U); Splice factor, proline- and glutamine-rich (SFPQ) und Non-POU domain-containing octamer-binding protein (NonO) (Tab. 3.2).

ZNF207 ist noch wenig erforscht, aber es wurde beschrieben, dass es ubiquitär exprimiert ist, zwei Zinkfinger motive besitzt, evolutionär konserviert ist und vermutlich als Transkriptionsfaktor agiert (Pahl et al., 1998).

hnRNP U ist ubiquitär in Zellkernen exprimiert (Fackelmayer und Richter, 1994). Es wurde ursprünglich als Protein in hnRNP-Komplexen (Komplexen aus RNA und Proteinen, die in die RNA-Prozessierung involviert sind) nachgewiesen (Kiledjian und

Dreyfuss, 1992; Fackelmayer und Richter, 1994). Unabhängig davon wurde es als Protein, das an die *scaffold-attached region* (SAR), Bereiche an denen die DNA mit der Kernmatrix verbunden ist / fakultativ sein kann, identifiziert und *Scaffold attachment factor A* (SAF-A) genannt (Romig et al., 1992). Dass hnRNP U/SAF-A durch direkte Promotorbindung eine Rolle in der transkriptionellen Regulierung spielen kann, wurde erst kürzlich gezeigt (Gao et al., 2005; Vizlin-Hodzic et al., 2011). Gao et al. wiesen eine Bindung an der Kernbindungssequenz AGTTATG nach (Gao et al., 2005). Diese Sequenz kommt in der hier benutzten Ins-Sonde allerdings nicht vor.

SFPQ (auch PSF (*protein-associated splicing factor*) genannt) und NonO (auch p54^{nrb} genannt) sind beides multifunktionale Zellkernproteine, die an RNA-Prozessierung und Gentranskription beteiligt sind (Shav-Tal und Zipori, 2002). Sie können an RNA und DNA binden. In ihrer Proteinstruktur sind sich die beiden Faktoren vor allem im Bereich des C-Terminus sehr ähnlich und gehören damit zur DBHS (*Drosophila Behavior Human Splicing*)-Proteinfamilie, die zusammen mit langen nicht-kodierenden RNAs die „*Paraspeckles*“ (subnukleuläre Einheiten, die eine kritische Rolle bei der Kontrolle der Genexpression spielen) bilden (Fox und Lamond, 2010). SFPQ und NonO können einzeln, als Heterodimere oder in Kooperation mit anderen Faktoren, z. B. direkt mit der RNA-Polymerase II, die Transkription beeinflussen (Emili et al., 2002; Iacobazzi et al., 2005). In der Literatur wurde mehrfach beschrieben, dass sie die Transkription reprimieren (siehe (Iacobazzi et al., 2005)). Im humanen CYP17-Gen binden beide Faktoren an die DNA-Sequenz TGAAGA, im P450scc-Gen des Schweins bindet SFPQ an CTGAGTC. Des Weiteren wurde für die Sequenzen TGAAGT und CAGAGC, in der Promotorregion des humanen *PiC* ((phosphate carrier)-Gens), und die Sequenzen TGTGGCAA (NonO) und AGGGGA (SFPQ), im Promotor des Retinol-binding protein (*RBP4*)-Gens, über massenspektrometrische Analysen ebenfalls die Bindung der beiden Faktoren nachgewiesen (Iacobazzi et al., 2005; Bianconcini et al., 2009).

Innerhalb der Ins-Sonde findet sich die Sequenz CAGAGT, die nur in der letzten Position von der CAGAGC-Sequenz, an der eine SFPQ/NonO-Bindung nachgewiesen wurde, abweicht. Eine Bindung von SFPQ/NonO im Bereich des -100_-102-Polymorphismus ist also wahrscheinlich und sollte experimentell durch EMSA-Supershift untersucht werden. Dass die CAGAGT-Sequenz grundsätzlich wichtig für die Proteinbindung in diesem Bereich ist, wurde bereits nachgewiesen, denn diese sechs

Basen fehlen der Ins-3'-kurz-Sonde, an der keine eigenständige Proteinbindung nachgewiesen werden konnte (siehe auch Abb. 3.28).

4.3 Generelle Transkriptionsmechanismen im *HTR3B*-Promotor

Um generelle Transkriptionsmechanismen im *HTR3B*-Promotor aufzudecken, wurden die Ergebnisse, die bisher über die -450 bp-Region des Ratten-*Htr3b*-Promotor und der humanen *HTR3B*-Promotoren P1 und P2 ermittelt worden waren, miteinander verglichen. Die drei Sequenzen wurden mit Hilfe der Clone manager-Software abgeglichen (Abb. 4.2). Allgemein sind sich der Ratten-*Htr3b*-Promotor und der P1 mit 67% Übereinstimmung der DNA-Sequenz zueinander ähnlicher als zu P2, mit nur 44% bzw. 43% Übereinstimmung. Dies war auch zu erwarten, da der Ratten-*Htr3b*-Promotor und P1 die gleiche Position zum jeweiligen ATG einnehmen. Der P2 liegt hingegen im Intron 1 direkt vor dem Exon 2 des *HTR3B*-Gens (Tzvetkov et al., 2007).



Abb. 4.2: Abgleich der -450 bp-Region des Ratten-*Htr3b*-Promotors und der menschlichen *HTR3B*-Promotoren P1 und P2. Konservierte Basen zwischen mindestens zwei Promotorbereichen sind hellblau unterlegt. Die einzige nahezu übereinstimmende TSS ist in den Sequenzen durch Pfeile gekennzeichnet. Transkriptionsfaktorbindungsstellen sind grau (untersucht aber nicht bestätigt) oder rot (eindeutig identifiziert) eingerahmt. Dunkelblau eingerahmt sind zwei konservierte, aber scheinbar unfunktionelle Inr-Sequenzelemente. Der -100_-102delAAG-Polymorphismus im P1 ist eingekreist.

Die TSS in P1 und P2 waren bereits zuvor von unserer Arbeitsgruppe bestimmt worden (Tzvetkov et al., 2007): im P1 gibt es fünf darm- bzw. dünndarmspezifische TSS, im P2 zehn gehirnspezifische vor dem ATG-3. Eine TSS fiel beim direkten Abgleich der Sequenzen besonders ins Auge. Sie liegt im Ratten-*Htr3b*-Promotor bei -109, im P1 bei -98 und beim P2 bei -103 bp zum jeweiligen ATG. Aber beim Sequenzabgleich liegt sie bei P1 und P2 an der gleichen Position und beim Ratten-*Htr3b*-Promotor weicht sie gerade mal um 2 bp ab (Abb. 4.2). Es handelt sich um jene TSS, die im *Htr3b*-Promotor innerhalb der zuvor als potentielle TFII-I-Bindungsstelle beschriebenen Region (an der aber keine Proteinbindung nachgewiesen werden konnte) liegt. Dieser Befund bestärkt die Hypothese, dass diese Position vorrangig als TSS und weniger als Bindungsstelle für nicht generelle Transkriptionsfaktoren funktionell ist. Ansonsten wurden keine weiteren direkten Übereinstimmungen der TSS-Positionen gefunden. Es zeigte sich außerdem, dass auch P1 und P2 jeweils vier Inr-Elemente aufweisen. Mindestens ein Inr-Element in P2 scheint funktionell zu sein, da dort eine TSS an der dafür vorgeschriebenen Position liegt (Tzvetkov et al., 2007). Allerdings ist diese TSS, wie die restlichen Elemente in P2, nicht evolutionär konserviert. Zwischen dem Ratten-*Htr3b*-Promotor und dem P1 sind zwei Inr-Sequenzelemente konserviert (Abb. 4.2, dunkelblau eingerahmt). Bisher konnten in diesen Elementen aber keine TSS nachgewiesen werden. Eine Regulation ganz ohne Inr- und TATA-Box-Elemente ist aber auch möglich und nicht ungewöhnlich. Yang et al. beschreiben, dass dies in ca. 46% aller menschlichen Promotoren der Fall ist (Yang et al., 2007).

In P1 und P2 konnte keine CpG-Insel identifiziert werden. Jedoch stieg im -450 bp Bereich des P1, wie auch im -450 bp Bereich des Ratten-*Htr3b*-Promotors, aber nicht des P2, der GC-Gehalt im Vergleich zum gesamten definierten Promotorbereich an. Auch dies beschreiben Yang et al. als allgemein gültig, insbesondere für TATA-Boxlose Promotoren (Yang et al., 2007).

Die in dieser Arbeit identifizierten bzw. untersuchten Transkriptionsfaktorbindungsstellen sind unterschiedlich stark konserviert (Abb. 4.2 und 4.3). Abbildung 4.3 wurde mit der TRAP-Software erzeugt und zeigt die bioinformatischen Vorhersagen für die Affinitäten der verschiedenen Transkriptionsfaktoren an den jeweiligen Stellen. Es sind jeweils Vergleiche der Bindungsaffinitäten zwischen den Sequenzen des Ratten-*Htr3b*-Promotors und der zwei humanen *HTR3B*-Promotoren dargestellt.

Im Ratten-*Htr3b*-Promotor zeigt sich eindeutig eine Affinität für die Bindung von USF an die E-Box 2 bei -183 bis -178 bp und etwas schwächer an die E-Box 1 bei -135 bis -130 bp (Abb. 4.3A). Zu den menschlichen Promotoren hat USF keine Affinität. Die beiden E-Boxen sind dort auch nicht konserviert (Abb. 4.2). Dafür weisen P1 und P2 vier bzw. zwei weitere E-Box-Sequenzelemente auf. Bei P1 befinden sich diese bei -204 bis -199 bp, bei -133 bis -128 bp, bei -63 bis -58 bp und bei -8 bis -3 bp. Bei P2 befinden sich diese bei -143 bis -138 bp und bei -124 bis -119 bp. Das E-Box-Element in P1 bei -133 bis -128 bp ist in der Gegenüberstellung in Abb. 4.2 nur um 1 bp von der E-Box 1 des Ratten-*Htr3b*-Promotors verschoben. Das E-Box-Element bei -8 bis -3 bp liegt im Ratten-*Htr3b*-Promotor gleichermaßen vor, wurde aber noch nicht analysiert.

NF-1 hat eine hohe Affinität zur nachgewiesenen Bindungsstelle im Ratten-*Htr3b*-Promotor und eine schwächere im P1 (Abb. 4.3B). Die TTGGC-Halbseite ist im P1 konserviert, die zweite Halbseite allerdings nicht (Abb. 4.2).

Für YY1 werden durch die bioinformatische Analyse bei den verschiedenen Promotoren diverse Bindungsstellen vorhergesagt, darunter in allen Promotoren die nachgewiesene Bindungsstelle YY1 2 (Abb. 4.3C). Ihre Kernbindungssequenz CCATNT ist in allen Promotoren konserviert (Abb. 4.2). Die weiteren, bioinformatisch angezeigten, potentiellen YY1-Bindungsstellen wurden noch nicht untersucht. Insbesondere weil YY1-Bindungsstellen auch als Initiator-Elemente funktionieren können (Usheva und Shenk, 1996), wäre es interessant diese zu untersuchen.

In der bioinformatischen Gegenüberstellung der POU-Bindungsstellen spiegelt sich die evolutionäre Konservierung der Motive 4, 7, 14 und 10 wider. An den entsprechenden Stellen werden vor allem in P1, aber z. T. auch in P2 POU-Bindungsstellen vorhergesagt (Abb. 4.3D). Die potentielle POU-Bindungsstelle im Motiv 4 ist zwischen Ratten-*Htr3b*-Promotor und P1 hochkonserviert, im P2 allerdings nicht (Abb. 4.2). Die potentielle Bindungsstelle in Motiv 7 weicht zwischen Ratten-*Htr3b*-Promotor und P1 um eine Base ab. Damit entspricht die Sequenz allerdings nur noch zu 50% der POU-Konsensussequenz. Die potentielle Bindungsstelle in Motiv 14 weicht zwischen Ratten-*Htr3b*-Promotor und P1 um zwei Basen ab. Die potentielle Bindungsstelle in Motiv 10 weicht zwischen Ratten-*Htr3b*-Promotor und P1 ebenfalls um zwei Basen ab, was wiederum dazu führt, dass die Sequenz im P1 nur noch zu 50% der Konsensussequenz entspricht.

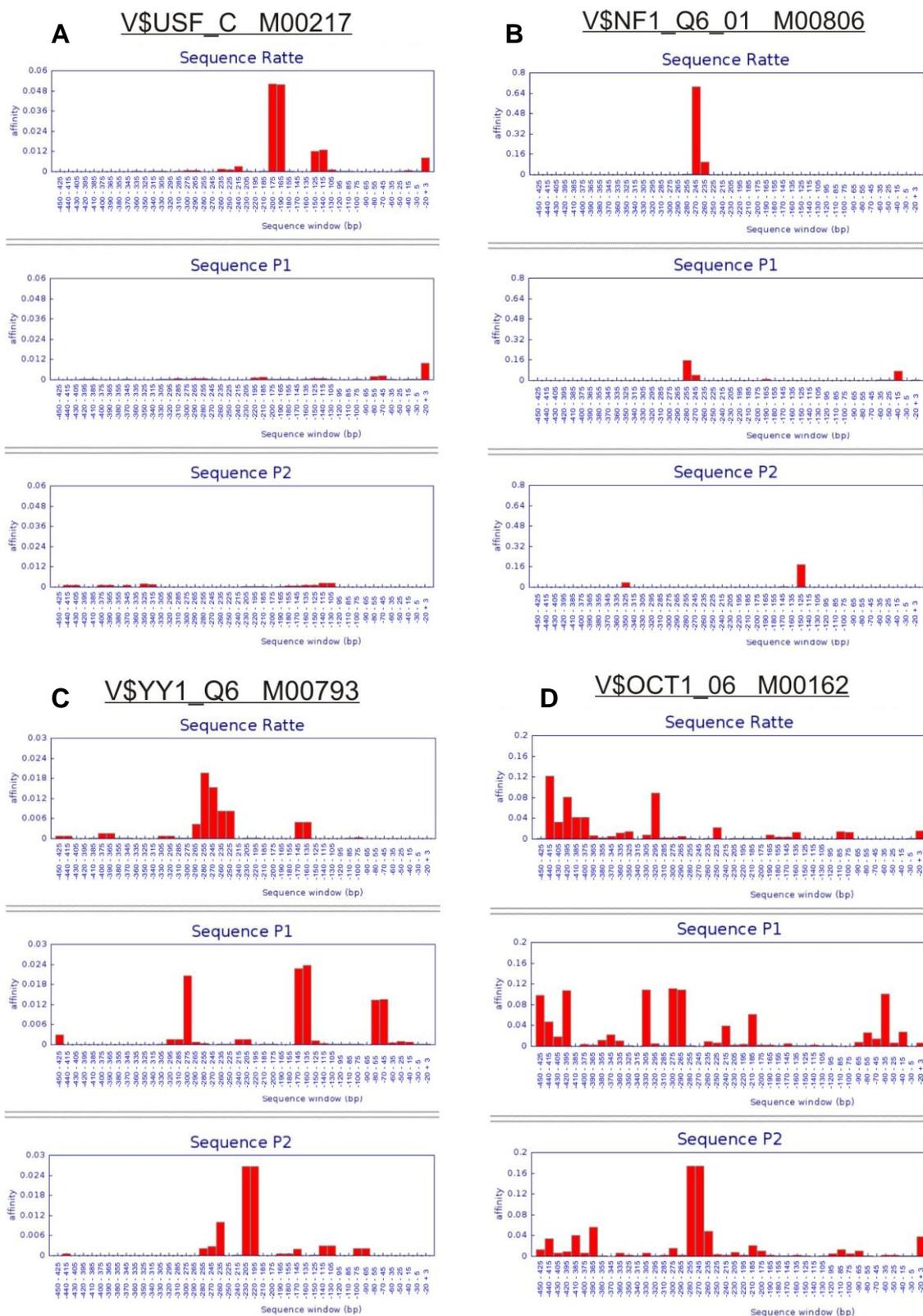


Abb. 4.3: Bioinformatische Vorhersage für die Bindungsaffinitäten der Transkriptionsfaktoren USF (A), NF-1 (B), YY1 (C) und POU (D) im Ratten-*Htr3b*-Promotor und in den menschlichen *HTR3B*-Promotoren P1 und P2. Die Teilabbildungen wurden mit der TRAP-Software (<http://trap.molgen.mpg.de/cgi-bin/home.cgi>) erzeugt. Die Y-Achse beschreibt die jeweiligen Bindungsaffinitäten und die X-Achse die -450 bp DNA-Sequenzen (in überlappenden Intervallen zu je 25 bp). Der Name der verwendeten Matrizen und deren Identifikationsnummer steht als Überschrift über den Teilabbildungen A-D.

Zusammenfassend ist zu sagen, dass sich die Ergebnisse aus der Charakterisierung des Ratten-*Htr3b*-Promotors nicht eins zu eins auf die menschlichen Promotoren übertragen lassen. Es ließ sich aber eine ähnliche Lokalisierung einer Transkriptionsstartseite und die wahrscheinliche Existenz gemeinsamer Transkriptionsfaktorbindungsstellen für NF-1, YY1 und Faktoren der POU-Familie nachweisen.

5 Zusammenfassung

Der Serotoninrezeptor Typ 3 (5-HT₃) ist ein Serotonin-abhängiger Ionenkanal aus der Cys-loop-Rezeptorfamilie. Beim Menschen sind fünf verschiedene Isoformen, 5-HT_{3A}, 5-HT_{3B}, 5-HT_{3C}, 5-HT_{3D} und 5-HT_{3E}, der Rezeptoruntereinheiten bekannt. Die 5-HT_{3A}-Isoform ist für die Bildung und Lokalisierung des Rezeptors essentiell, während die 5-HT_{3B}-Isoform maßgeblich die Kanaleigenschaften bestimmt. 5-HT_{3B} wird durch das *HTR3B*-Gen kodiert. -100_-102delAAG, ein genetischer Polymorphismus im *HTR3B*-Promotor, kann die *HTR3B*-Promotoraktivität beeinflussen und wurde mit Häufigkeit und Schweregrad von Chemotherapie-induzierter Übelkeit und Erbrechen unter der Antiemetik-Therapie mit 5-HT₃-Rezeptorantagonisten assoziiert. Es ist wenig über die transkriptionelle Regulation des *HTR3B*-Gens und über den genauen Mechanismus, wie der -100_-102delAAG-Polymorphismus die *HTR3B*-Expression beeinflusst, bekannt. Ziel dieser Arbeit war es, grundlegende Mechanismen der transkriptionellen Regulation des *HTR3B*-Gens aufzudecken und das regulatorische Protein, das am humanen *HTR3B*-P1-Promotor, im Bereich um den -100_-102delAAG-Polymorphismus bindet, zu identifizieren.

Der Promotor des Ratten-*Htr3b*-Gens wurde in der Ratten-Phäochromozytom-Zelllinie PC-12 und in der menschlichen Zelllinie HEK-293 charakterisiert. Dafür wurden RACE-basierte Transkriptionsstartseitenanalysen, *in vitro*- und *in vivo*-DNA-Methylierungsanalysen, DNase I Hypersensitivity Assays, Luciferase-Reporterassays inkl. ortsspezifischer Mutationen und Proteinüberexpressionen sowie Electrophoretic Mobility Shift Assays (EMSAs) benutzt. Bioinformatische Analysen wurden angewendet, um die gewonnenen Ergebnisse auf den menschlichen Promotor zu übertragen. Um im -100_-102delAAG-Bereich bindende Proteine zu identifizieren, wurden EMSAs sowie eine Affinitätsaufreinigung gekoppelt mit einer massenspektrometrischen Analyse benutzt.

Das Ratten-*Htr3b*-Gen hat multiple Transkriptionsstartseiten (TSS), die -211 bis -79 bp stromaufwärts des Startkodons liegen. Eine TSS, bei -109 bp vor dem Startkodon, ist stark zwischen Mensch und Ratte konserviert. Mutationen im Bereich der -109 bp TSS führten zu einer Abnahme der *Htr3b*-Promotoraktivität um 68%.

Von -220 bis -2 bp vor dem Startkodon wurde eine CpG-Insel mit 7 häufig methylierten Cytosinen identifiziert. *In vitro*-Methylierungen hatten einen hemmenden Effekt auf die *Htr3b*-Promotoraktivität. *In vivo*-Versuche sprachen allerdings gegen die Funktionalität der CpG-Insel. Die Häufigkeit der Methylierung hängt nicht mit den NGF-gesteuerten Differenzierungsstadien der PC-12-Zellen und der damit verbundenen Steigerung der *Htr3b*-Expression zusammen. Auch die Hemmung der Methylierung durch 5-Aza-2'-Deoxycytidin führte zu keinem Anstieg der *Htr3b*-Expression.

Der proximale Promotor ist in einem Bereich ab -445 bp vor dem Startkodon lokalisiert. Darüber hinaus wurde eine evolutionär konservierte Region, die von -1841 bis -1541 bp stromaufwärts lokalisiert ist, als relevant für die transkriptionelle *Htr3b*-Regulation identifiziert.

Es wurden drei *trans*-regulatorische Elemente im proximalen *Htr3b*-Promotor identifiziert; die Transkriptionsfaktoren USF1 (*Upstream Stimulatory Factor 1*), YY1 (*Ying Yang 1*) und NF-1 (*Nuclear Factor-1*). Der Transkriptionsfaktor USF1 bindet an der E-Box zwischen -183 bis -178 bp vor dem Startkodon. Eine Mutation der USF1-Bindungssequenz führte im -258 bp-Promotorfragment zu einer Abnahme der Aktivität um 55%. Die Überexpression von USF1 resultierte in einer signifikanten Zunahme der Promotoraktivität im nativen, aber nicht im E-Box-mutierten Promotor. Der Transkriptionsfaktor YY1 bindet bei -284 bis -269 bp und -266 bis -252 bp an den *Htr3b*-Promotor. Der Transkriptionsfaktor NF-1 bindet, überlappend mit einer YY1-Bindungsstelle, bei -267 bis -253 bp.

Bei der Gegenüberstellung der Ergebnisse des Ratten-*Htr3b*-Promotors und der zwei alternativen, humanen *HTR3B*-Promotoren zeigte sich, dass alle drei Promotoren multiple Transkriptionsstartseiten besitzen, dass die humanen *HTR3B*-Promotoren keine CpG-Inseln aufweisen und dass laut bioinformatischer Analysen Bindungsstellen für YY1, NF-1, aber nicht für USF1, auch in den humanen *HTR3B*-Promotoren vorkommen.

Am humanen *HTR3B*-P1-Promotor, im Bereich um den -100_-102delAAG-Polymorphismus, wurde die Sequenz GGAGAAGGAGGAGAACAGAGTG als essentiell für die Bindung des Proteins identifiziert. Für zwölf Proteine (drei im Rahmen dieser Arbeit), für die bioinformatisch hohe Bindungswahrscheinlichkeiten

vorhergesagt worden waren, wurde die Bindung ausgeschlossen. Darunter befand sich auch der Glukokortikoid-Rezeptor (GR), der zur Klärung des antiemetischen Effekts von Glukokortikoiden bei der antiemetischen Therapie während der Chemotherapie hätte beitragen können. Über Affinitätsaufreinigung und massenspektrometrische Analyse wurden vier potentiell bindende Proteine identifiziert: ZNF207 (*Zinc finger protein 207*), hnRNP U (*Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein U*), SFPQ (*Splice factor, proline- and glutamine-rich*) und NonO (*Non-POU domain-containing octamer-binding protein*). Sequenzanalysen und EMSA-Daten bestätigen die Möglichkeit, dass SFPQ und NonO im Bereich des -100_-102delAAG-Polymorphismus binden.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass die Transkription des Ratten-*Htr3b*-Gens über multiple TSS initiiert und durch USF1, YY1 und NF-1 reguliert wird. Die *Htr3b*-Transkription ist unabhängig von der DNA-Methylierung. Potentielle Bindungsstellen für YY1 und NF-1 kommen in den menschlichen *HTR3B*-Promotorbereichen vor, sind aber nicht für die Effekte des -100_-102delAAG-Polymorphismus verantwortlich. Weitere, über klassische Transkriptionsfaktoren hinausgehende, Kernproteine könnten am Wirkmechanismus des -100_-102delAAG-Polymorphismus beteiligt sein.

6 Literaturverzeichnis

- Aapro, M.: 5-HT(3)-receptor antagonists in the management of nausea and vomiting in cancer and cancer treatment. *Oncology* 69 (2005) 97-109.
- Andrews, P.L., Davis, C.J., Bingham, S., Davidson, H.I., Hawthorn, J. and Maskell, L.: The abdominal visceral innervation and the emetic reflex: pathways, pharmacology, and plasticity. *Can J Physiol Pharmacol* 68 (1990) 325-45.
- Barnes, N.M., Hales, T.G., Lummis, S.C. and Peters, J.A.: The 5-HT3 receptor--the relationship between structure and function. *Neuropharmacology* 56 (2009) 273-84.
- Barrera, N.P., Herbert, P., Henderson, R.M., Martin, I.L. and Edwardson, J.M.: Atomic force microscopy reveals the stoichiometry and subunit arrangement of 5-HT3 receptors. *Proc Natl Acad Sci U S A* 102 (2005) 12595-600.
- Baumruker, T., Sturm, R. and Herr, W.: OBP100 binds remarkably degenerate octamer motifs through specific interactions with flanking sequences. *Genes Dev* 2 (1988) 1400-13.
- Baylin, S.B.: Tying it all together: epigenetics, genetics, cell cycle, and cancer. *Science* 277 (1997) 1948-9.
- Bedford, F.K., Julius, D. and Ingraham, H.A.: Neuronal expression of the 5HT3 serotonin receptor gene requires nuclear factor 1 complexes. *J Neurosci* 18 (1998) 6186-94.
- Belelli, D., Balcarek, J.M., Hope, A.G., Peters, J.A., Lambert, J.J. and Blackburn, T.P.: Cloning and functional expression of a human 5-hydroxytryptamine type 3AS receptor subunit. *Mol Pharmacol* 48 (1995) 1054-62.
- Bendall, A.J., Sturm, R.A., Danoy, P.A. and Molloy, P.L.: Broad binding-site specificity and affinity properties of octamer 1 and brain octamer-binding proteins. *Eur J Biochem* 217 (1993) 799-811.
- Bianconcini, A., Lupo, A., Capone, S., Quadro, L., Monti, M., Zurlo, D., Fucci, A., Sabatino, L., Brunetti, A., Chiefari, E., Gottesman, M.E., Blaner, W.S. and Colantuoni, V.: Transcriptional activity of the murine retinol-binding protein gene is regulated by a multiprotein complex containing HMGA1, p54 nrb/NonO, protein-associated splicing factor (PSF) and steroidogenic factor 1 (SF1)/liver receptor homologue 1 (LRH-1). *Int J Biochem Cell Biol* 41 (2009) 2189-203.
- Blackwood, E.M. and Kadonaga, J.T.: Going the distance: a current view of enhancer action. *Science* 281 (1998) 60-3.
- Bokelmann, K.: Charakterisierung des Promotors für das Gen HTR3B beim Menschen und bei der Ratte unter besonderer Berücksichtigung der Regulation durch Glukokortikoide, Institut für Mikrobiologie und Genetik (IMG). Georg-August-Universität zu Göttingen, Göttingen, 2007, pp. 97.
- Boyd, G.W., Doward, A.I., Kirkness, E.F., Millar, N.S. and Connolly, C.N.: Cell surface expression of 5-hydroxytryptamine type 3 receptors is controlled by an endoplasmic reticulum retention signal. *J Biol Chem* 278 (2003) 27681-7.
- Bungert, J., Kober, I., Düring, F. and Seifart, K.H.: Transcription factor eUSF is an essential component of isolated transcription complexes on the duck histone H5 gene and it mediates the interaction of TFIID with a TATA-deficient promoter. *J Mol Biol* 223 (1992) 885-98.

-
- Burke, T.W. and Kadonaga, J.T.: *Drosophila* TFIID binds to a conserved downstream basal promoter element that is present in many TATA-box-deficient promoters. *Genes Dev* 10 (1996) 711-24.
- Butler, J.E. and Kadonaga, J.T.: The RNA polymerase II core promoter: a key component in the regulation of gene expression. *Genes Dev* 16 (2002) 2583-92.
- Carrasco-Serrano, C., Campos-Caro, A., Viniegra, S., Ballesta, J.J. and Criado, M.: GC- and E-box motifs as regulatory elements in the proximal promoter region of the neuronal nicotinic receptor alpha7 subunit gene. *J Biol Chem* 273 (1998) 20021-8.
- Chiang, C.M. and Roeder, R.G.: Cloning of an intrinsic human TFIID subunit that interacts with multiple transcriptional activators. *Science* 267 (1995) 531-6.
- Cooper, S.J., Trinklein, N.D., Anton, E.D., Nguyen, L. and Myers, R.M.: Comprehensive analysis of transcriptional promoter structure and function in 1% of the human genome. *Genome Res* 16 (2006) 1-10.
- Davies, P.A., Pistis, M., Hanna, M.C., Peters, J.A., Lambert, J.J., Hales, T.G. and Kirkness, E.F.: The 5-HT_{3B} subunit is a major determinant of serotonin-receptor function. *Nature* 397 (1999) 359-63.
- Deng, W. and Roberts, S.G.: A core promoter element downstream of the TATA box that is recognized by TFIIB. *Genes Dev* 19 (2005) 2418-23.
- Dignam, J.D., Lebovitz, R.M. and Roeder, R.G.: Accurate transcription initiation by RNA polymerase II in a soluble extract from isolated mammalian nuclei. *Nucleic Acids Res* 11 (1983) 1475-89.
- Doucet, E., Latremoliere, A., Darmon, M., Hamon, M. and Emerit, M.B.: Immunolabelling of the 5-HT_{3B} receptor subunit in the central and peripheral nervous systems in rodents. *Eur J Neurosci* 26 (2007) 355-66.
- Dubin, A.E., Huvar, R., D'Andrea, M.R., Pyati, J., Zhu, J.Y., Joy, K.C., Wilson, S.J., Galindo, J.E., Glass, C.A., Luo, L., Jackson, M.R., Lovenberg, T.W. and Erlander, M.G.: The pharmacological and functional characteristics of the serotonin 5-HT_{3A} receptor are specifically modified by a 5-HT_{3B} receptor subunit. *J Biol Chem* 274 (1999) 30799-810.
- Ducci, F., Enoch, M.A., Yuan, Q., Shen, P.H., White, K.V., Hodgkinson, C., Albaugh, B., Virkkunen, M. and Goldman, D.: HTR_{3B} is associated with alcoholism with antisocial behavior and alpha EEG power--an intermediate phenotype for alcoholism and co-morbid behaviors. *Alcohol* 43 (2009) 73-84.
- Ebert, S.N., Balt, S.L., Hunter, J.P., Gashler, A., Sukhatme, V. and Wong, D.L.: Egr-1 activation of rat adrenal phenylethanolamine N-methyltransferase gene. *J Biol Chem* 269 (1994) 20885-98.
- Emili, A., Shales, M., McCracken, S., Xie, W., Tucker, P.W., Kobayashi, R., Blencowe, B.J. and Ingles, C.J.: Splicing and transcription-associated proteins PSF and p54nrb/nonO bind to the RNA polymerase II CTD. *Rna* 8 (2002) 1102-11.
- Endo, T., Minami, M., Hirafuji, M., Ogawa, T., Akita, K., Nemoto, M., Saito, H., Yoshioka, M. and Parvez, S.H.: Neurochemistry and neuropharmacology of emesis - the role of serotonin. *Toxicology* 153 (2000) 189-201.
- Erspamer, V.: Pharmakologische Studien über Enteramin. *Arch. exp. Path. Pharmak.* 196 (1940) 343-354.
- Fackelmayer, F.O. and Richter, A.: hnRNP-U/SAF-A is encoded by two differentially polyadenylated mRNAs in human cells. *Biochim Biophys Acta* 1217 (1994) 232-4.
-

-
- Faisst, S. and Meyer, S.: Compilation of vertebrate-encoded transcription factors. *Nucleic Acids Res* 20 (1992) 3-26.
- Fasching, P.A., Kollmannsberger, B., Strissel, P.L., Niesler, B., Engel, J., Kreis, H., Lux, M.P., Weihbrecht, S., Lausen, B., Bani, M.R., Beckmann, M.W. and Strick, R.: Polymorphisms in the novel serotonin receptor subunit gene HTR3C show different risks for acute chemotherapy-induced vomiting after anthracycline chemotherapy. *J Cancer Res Clin Oncol* 134 (2008) 1079-86.
- Fatemi, M., Pao, M.M., Jeong, S., Gal-Yam, E.N., Egger, G., Weisenberger, D.J. and Jones, P.A.: Footprinting of mammalian promoters: use of a CpG DNA methyltransferase revealing nucleosome positions at a single molecule level. *Nucleic Acids Res* 33 (2005) e176.
- Felsenfeld, G.: Chromatin as an essential part of the transcriptional mechanism. *Nature* 355 (1992) 219-24.
- FitzGerald, P.C., Shlyakhtenko, A., Mir, A.A. and Vinson, C.: Clustering of DNA sequences in human promoters. *Genome Res* 14 (2004) 1562-74.
- Fletcher, S. and Barnes, N.M.: Desperately seeking subunits: are native 5-HT₃ receptors really homomeric complexes? *Trends Pharmacol Sci* 19 (1998) 212-5.
- Fox, A.H. and Lamond, A.I.: Paraspeckles. *Cold Spring Harb Perspect Biol* 2 (2010) a000687.
- Frank, B., Niesler, B., Nothen, M.M., Neidt, H., Propping, P., Bondy, B., Rietschel, M., Maier, W., Albus, M. and Rappold, G.: Investigation of the human serotonin receptor gene HTR3B in bipolar affective and schizophrenic patients. *Am J Med Genet B Neuropsychiatr Genet* 131B (2004) 1-5.
- Furlong, E.E., Rein, T. and Martin, F.: YY1 and NF1 both activate the human p53 promoter by alternatively binding to a composite element, and YY1 and E1A cooperate to amplify p53 promoter activity. *Mol Cell Biol* 16 (1996) 5933-45.
- Gaddum, J.H. and Picarelli, Z.P.: Two kinds of tryptamine receptor. *Br J Pharmacol Chemother* 12 (1957) 323-8.
- Gao, C., Guo, H., Mi, Z., Wai, P.Y. and Kuo, P.C.: Transcriptional regulatory functions of heterogeneous nuclear ribonucleoprotein-U and -A/B in endotoxin-mediated macrophage expression of osteopontin. *J Immunol* 175 (2005) 523-30.
- Goecke, T.W., Ekici, A.B., Niesler, B., Loehberg, C.R., Hammer, C., Rappold, G., Schanze, D., Straub, V., Altmann, H.H., Strissel, P., Strick, R., Beckmann, M.W. and Fasching, P.A.: Two naturally occurring variants of the serotonin receptor gene HTR3C are associated with nausea in pregnancy. *Acta Obstet Gynecol Scand* 89 (2010) 7-14.
- Goldberg, M.L. Stanford University, 1979.
- Gordon, S., Akopyan, G., Garban, H. and Bonavida, B.: Transcription factor YY1: structure, function, and therapeutic implications in cancer biology. *Oncogene* 25 (2006) 1125-42.
- Greene, L.A. and Tischler, A.S.: Establishment of a noradrenergic clonal line of rat adrenal pheochromocytoma cells which respond to nerve growth factor. *Proc Natl Acad Sci U S A* 73 (1976) 2424-8.
- Gregor, P.D., Sawadogo, M. and Roeder, R.G.: The adenovirus major late transcription factor USF is a member of the helix-loop-helix group of regulatory proteins and binds to DNA as a dimer. *Genes Dev* 4 (1990) 1730-40.
- Gross, D.S. and Garrard, W.T.: Nuclease hypersensitive sites in chromatin. *Annu Rev Biochem* 57 (1988) 159-97.
-

-
- Gross, P. and Oelgeschlager, T.: Core promoter-selective RNA polymerase II transcription. *Biochem Soc Symp* (2006) 225-36.
- Hamlin, K.E. and Fischer, F.E.: The synthesis of 5-hydroxytryptamine. *J. Am. Chem. Soc* 73 (1951) 5007–5008.
- Hammer, C., Kapeller, J., Endeke, M., Fischer, C., Hebebrand, J., Hinney, A., Friedel, S., Gratacos, M., Estivill, X., Fichter, M., Fernandez-Aranda, F., Ehrlich, S., Rappold, G. and Niesler, B.: Functional variants of the serotonin receptor type 3A and B gene are associated with eating disorders. *Pharmacogenet Genomics* 19 (2009) 790-9.
- Hanna, M.C., Davies, P.A., Hales, T.G. and Kirkness, E.F.: Evidence for expression of heteromeric serotonin 5-HT(3) receptors in rodents. *J Neurochem* 75 (2000) 240-7.
- Hannon, J. and Hoyer, D.: Molecular biology of 5-HT receptors. *Behav Brain Res* 195 (2008) 198-213.
- Hapfelmeier, G., Tredt, C., Haseneder, R., Zieglgansberger, W., Eisensamer, B., Rupprecht, R. and Rammes, G.: Co-expression of the 5-HT3B serotonin receptor subunit alters the biophysics of the 5-HT3 receptor. *Biophys J* 84 (2003) 1720-33.
- Herr, W. and Cleary, M.A.: The POU domain: versatility in transcriptional regulation by a flexible two-in-one DNA-binding domain. *Genes Dev* 9 (1995) 1679-93.
- Herrstedt, J. and Dombernowsky, P.: Anti-emetic therapy in cancer chemotherapy: current status. *Basic Clin Pharmacol Toxicol* 101 (2007) 143-50.
- Hesketh, P.J.: Chemotherapy-induced nausea and vomiting. *N Engl J Med* 358 (2008) 2482-94.
- Hoyer, D., Hannon, J.P. and Martin, G.R.: Molecular, pharmacological and functional diversity of 5-HT receptors. *Pharmacol Biochem Behav* 71 (2002) 533-54.
- Iacobazzi, V., Infantino, V., Costanzo, P., Izzo, P. and Palmieri, F.: Functional analysis of the promoter of the mitochondrial phosphate carrier human gene: identification of activator and repressor elements and their transcription factors. *Biochem J* 391 (2005) 613-21.
- Italien-Group-for-Antiemetic-Research, T.: Dexamethasone, granisetron, or both for prevention of nausea and vomiting during chemotherapy for cancer. *N Engl J Med* 332 (1) (1995) 1-5.
- Jansen, M., Bali, M. and Akabas, M.H.: Modular design of Cys-loop ligand-gated ion channels: functional 5-HT3 and GABA rho1 receptors lacking the large cytoplasmic M3M4 loop. *J Gen Physiol* 131 (2008) 137-46.
- Jensen, A.A., Davies, P.A., Brauner-Osborne, H. and Krzywkowski, K.: 3B but which 3B and that's just one of the questions: the heterogeneity of human 5-HT3 receptors. *Trends Pharmacol Sci* 29 (2008) 437-44.
- Ji, X., Takahashi, N., Branko, A., Ishihara, R., Nagai, T., Mouri, A., Saito, S., Maeno, N., Inada, T. and Ozaki, N.: An association between serotonin receptor 3B gene (HTR3B) and treatment-resistant schizophrenia (TRS) in a Japanese population. *Nagoya J Med Sci* 70 (2008) 11-7.
- Juven-Gershon, T., Hsu, J.Y., Theisen, J.W. and Kadonaga, J.T.: The RNA polymerase II core promoter - the gateway to transcription. *Curr Opin Cell Biol* 20 (2008) 253-9.
- Juven-Gershon, T. and Kadonaga, J.T.: Regulation of gene expression via the core promoter and the basal transcriptional machinery. *Dev Biol* 339 (2010) 225-9.
-

-
- Kadonaga, J.T.: The DPE, a core promoter element for transcription by RNA polymerase II. *Exp Mol Med* 34 (2002) 259-64.
- Kaiser, R., Sezer, O., Papiés, A., Bauer, S., Schelenz, C., Tremblay, P.B., Possinger, K., Roots, I. and Brockmoller, J.: Patient-tailored antiemetic treatment with 5-hydroxytryptamine type 3 receptor antagonists according to cytochrome P-450 2D6 genotypes. *J Clin Oncol* 20 (2002) 2805-11.
- Kaiser, R., Tremblay, P.B., Sezer, O., Possinger, K., Roots, I. and Brockmoller, J.: Investigation of the association between 5-HT_{3A} receptor gene polymorphisms and efficiency of antiemetic treatment with 5-HT₃ receptor antagonists. *Pharmacogenetics* 14 (2004) 271-8.
- Kapeller, J., Houghton, L.A., Monnikes, H., Walstab, J., Moller, D., Bonisch, H., Burwinkel, B., Autschbach, F., Funke, B., Lasitschka, F., Gassler, N., Fischer, C., Whorwell, P.J., Atkinson, W., Fell, C., Buchner, K.J., Schmidtmann, M., van der Voort, I., Wisser, A.S., Berg, T., Rappold, G. and Niesler, B.: First evidence for an association of a functional variant in the microRNA-510 target site of the serotonin receptor-type 3E gene with diarrhea predominant irritable bowel syndrome. *Hum Mol Genet* 17 (2008) 2967-77.
- Karnovsky, A.M., Gotow, L.F., McKinley, D.D., Piechan, J.L., Ruble, C.L., Mills, C.J., Schellin, K.A., Slightom, J.L., Fitzgerald, L.R., Benjamin, C.W. and Roberds, S.L.: A cluster of novel serotonin receptor 3-like genes on human chromosome 3. *Gene* 319 (2003) 137-48.
- Kiledjian, M. and Dreyfuss, G.: Primary structure and binding activity of the hnRNP U protein: binding RNA through RGG box. *Embo J* 11 (1992) 2655-64.
- Krzywkowski, K., Davies, P.A., Irving, A.J., Brauner-Osborne, H. and Jensen, A.A.: Characterization of the effects of four HTR_{3B} polymorphisms on human 5-HT_{3AB} receptor expression and signalling. *Pharmacogenet Genomics* 18 (2008) 1027-40.
- Krzywkowski, K., Jensen, A.A., Connolly, C.N. and Brauner-Osborne, H.: Naturally occurring variations in the human 5-HT_{3A} gene profoundly impact 5-HT₃ receptor function and expression. *Pharmacogenet Genomics* 17 (2007) 255-66.
- Lewis, B.A., Kim, T.K. and Orkin, S.H.: A downstream element in the human beta-globin promoter: evidence of extended sequence-specific transcription factor IID contacts. *Proc Natl Acad Sci U S A* 97 (2000) 7172-7.
- Li, Y., Okuno, Y., Zhang, P., Radomska, H.S., Chen, H., Iwasaki, H., Akashi, K., Klemsz, M.J., McKercher, S.R., Maki, R.A. and Tenen, D.G.: Regulation of the PU.1 gene by distal elements. *Blood* 98 (2001) 2958-65.
- Lim, C.Y., Santoso, B., Boulay, T., Dong, E., Ohler, U. and Kadonaga, J.T.: The MTE, a new core promoter element for transcription by RNA polymerase II. *Genes Dev* 18 (2004) 1606-17.
- Lochner, M. and Lummis, S.C.: Agonists and antagonists bind to an A-A interface in the heteromeric 5-HT_{3AB} receptor. *Biophys J* 98 (2010) 1494-502.
- Lüllmann, H. and Mohr, K.: *Pharmakologie und Toxikologie, Arzneimittelwirkungen verstehen - Medikamente gezielt einsetzen*. 14. Auflage, Georg Thieme Verlag, Stuttgart, New York, 1999.
- Lummis, S.C., Beene, D.L., Lee, L.W., Lester, H.A., Broadhurst, R.W. and Dougherty, D.A.: Cis-trans isomerization at a proline opens the pore of a neurotransmitter-gated ion channel. *Nature* 438 (2005) 248-52.
-

-
- Maricq, A.V., Peterson, A.S., Brake, A.J., Myers, R.M. and Julius, D.: Primary structure and functional expression of the 5HT3 receptor, a serotonin-gated ion channel. *Science* 254 (1991) 432-7.
- Meccia, E., Bottero, L., Felicetti, F., Peschle, C., Colombo, M.P. and Care, A.: HOXB7 expression is regulated by the transcription factors NF-Y, YY1, Sp1 and USF-1. *Biochim Biophys Acta* 1626 (2003) 1-9.
- Meineke, C.: Regulation des Serotoninrezeptor-3B-Gens: Gewebespezifische Transkription und funktionelle Analyse genetischer Polymorphismen, Fakultät für Lebenswissenschaften. Technische Universität Carolo-Wilhelmina, Braunschweig, 2006, pp. 162
- Meineke, C., Tzvetkov, M.V., Bokelmann, K., Oetjen, E., Hirsch-Ernst, K., Kaiser, R. and Brockmoller, J.: Functional characterization of a -100_-102delAAG deletion-insertion polymorphism in the promoter region of the HTR3B gene. *Pharmacogenet Genomics* 18 (2008) 219-30.
- Minami, M., Endo, T., Hirafuji, M., Hamaue, N., Liu, Y., Hiroshige, T., Nemoto, M., Saito, H. and Yoshioka, M.: Pharmacological aspects of anticancer drug-induced emesis with emphasis on serotonin release and vagal nerve activity. *Pharmacol Ther* 99 (2003) 149-65.
- Miyake, A., Mochizuki, S., Takemoto, Y. and Akuzawa, S.: Molecular cloning of human 5-hydroxytryptamine₃ receptor: heterogeneity in distribution and function among species. *Mol Pharmacol* 48 (1995) 407-16.
- Monk, S.A., Desai, K., Brady, C.A., Williams, J.M., Lin, L., Princiville, A., Hope, A.G. and Barnes, N.M.: Generation of a selective 5-HT_{3B} subunit-recognising polyclonal antibody; identification of immunoreactive cells in rat hippocampus. *Neuropharmacology* 41 (2001) 1013-6.
- Moriuchi, M., Moriuchi, H., Margolis, D.M. and Fauci, A.S.: USF/c-Myc enhances, while Yin-Yang 1 suppresses, the promoter activity of CXCR4, a coreceptor for HIV-1 entry. *J Immunol* 162 (1999) 5986-92.
- Mott, D.D., Erreger, K., Banke, T.G. and Traynelis, S.F.: Open probability of homomeric murine 5-HT_{3A} serotonin receptors depends on subunit occupancy. *J Physiol* 535 (2001) 427-43.
- Nagata, K., Guggenheimer, R.A. and Hurwitz, J.: Specific binding of a cellular DNA replication protein to the origin of replication of adenovirus DNA. *Proc Natl Acad Sci U S A* 80 (1983) 6177-81.
- Nagavarapu, U., Danthi, S. and Boyd, R.T.: Characterization of a rat neuronal nicotinic acetylcholine receptor alpha7 promoter. *J Biol Chem* 276 (2001) 16749-57.
- Niesler, B., Frank, B., Kapeller, J. and Rappold, G.A.: Cloning, physical mapping and expression analysis of the human 5-HT₃ serotonin receptor-like genes HTR3C, HTR3D and HTR3E. *Gene* 310 (2003) 101-11.
- Niesler, B., Kapeller, J., Hammer, C. and Rappold, G.: Serotonin type 3 receptor genes: HTR3A, B, C, D, E. *Pharmacogenomics* 9 (2008) 501-4.
- Niesler, B., Walstab, J., Combrink, S., Moeller, D., Kapeller, J., Rietdorf, J., Boenisch, H., Goethert, M., Rappold, G. and Bruess, M.: Characterization of the Novel Human Serotonin Receptor Subunits 5-HT_{3C}, 5-HT_{3D} and 5-HT_{3E}. *Mol Pharmacol* (2007).
- Niesler, B., Weiss, B., Fischer, C., Nothen, M.M., Propping, P., Bondy, B., Rietschel, M., Maier, W., Albus, M., Franzek, E. and Rappold, G.A.: Serotonin receptor gene HTR3A variants in schizophrenic and bipolar affective patients. *Pharmacogenetics* 11 (2001) 21-7.
-

-
- Pahl, P.M., Hodges, Y.K., Meltesen, L., Perryman, M.B., Horwitz, K.B. and Horwitz, L.D.: ZNF207, a ubiquitously expressed zinc finger gene on chromosome 6p21.3. *Genomics* 53 (1998) 410-2.
- Park, E.J., Han, S.Y. and Chung, I.K.: Regulation of mouse DNA topoisomerase IIIalpha gene expression by YY1 and USF transcription factors. *Biochem Biophys Res Commun* 283 (2001) 384-91.
- Perwitasari, D.A., Gelderblom, H., Atthobari, J., Mustofa, M., Dwiprahasto, I., Nortier, J.W. and Guchelaar, H.J.: Anti-emetic drugs in oncology: pharmacology and individualization by pharmacogenetics. *Int J Clin Pharm* 33 (2011) 33-43.
- Peters, J.A., Cooper, M.A., Carland, J.E., Livesey, M.R., Hales, T.G. and Lambert, J.J.: Novel structural determinants of single channel conductance and ion selectivity in 5-hydroxytryptamine type 3 and nicotinic acetylcholine receptors. *J Physiol* 588 (2010) 587-96.
- Rada-Iglesias, A., Ameer, A., Kapranov, P., Enroth, S., Komorowski, J., Gingeras, T.R. and Wadelius, C.: Whole-genome maps of USF1 and USF2 binding and histone H3 acetylation reveal new aspects of promoter structure and candidate genes for common human disorders. *Genome Res* 18 (2008) 380-92.
- Rajkumar, R. and Mahesh, R.: The auspicious role of the 5-HT3 receptor in depression: a probable neuronal target? *J Psychopharmacol* 24 (2010) 455-69.
- Rapport, M.M., Green, A.A. and Page, I.H.: Serum vasoconstrictor, serotonin; isolation and characterization. *J Biol Chem* 176 (1948) 1243-51.
- Reeben, M., Neuman, T., Palgi, J., Palm, K., Paalme, V. and Saarma, M.: Characterization of the rat light neurofilament (NF-L) gene promoter and identification of NGF and cAMP responsive regions. *J Neurosci Res* 40 (1995) 177-88.
- Reeves, D.C., Jansen, M., Bali, M., Lemster, T. and Akabas, M.H.: A role for the beta 1-beta 2 loop in the gating of 5-HT3 receptors. *J Neurosci* 25 (2005) 9358-66.
- Reeves, D.C. and Lummis, S.C.: Detection of human and rodent 5-HT3B receptor subunits by anti-peptide polyclonal antibodies. *BMC Neurosci* 7 (2006) 27.
- Romig, H., Fackelmayer, F.O., Renz, A., Ramsperger, U. and Richter, A.: Characterization of SAF-A, a novel nuclear DNA binding protein from HeLa cells with high affinity for nuclear matrix/scaffold attachment DNA elements. *Embo J* 11 (1992) 3431-40.
- Roy, A.L., Meisterernst, M., Pognonec, P. and Roeder, R.G.: Cooperative interaction of an initiator-binding transcription initiation factor and the helix-loop-helix activator USF. *Nature* 354 (1991) 245-8.
- Rueffert, H., Thieme, V., Wallenborn, J., Lemnitz, N., Bergmann, A., Rudlof, K., Wehner, M., Olthoff, D. and Kaisers, U.X.: Do variations in the 5-HT3A and 5-HT3B serotonin receptor genes (HTR3A and HTR3B) influence the occurrence of postoperative vomiting? *Anesth Analg* 109 (2009) 1442-7.
- Sadowski, I. and Mitchell, D.A.: TFII-I and USF (RBF-2) regulate Ras/MAPK-responsive HIV-1 transcription in T cells. *Eur J Cancer* 41 (2005) 2528-36.
- Saito, T., Takahashi, Y., Hashimoto, H. and Kamataki, T.: Novel transcriptional regulation of the human CYP3A7 gene by Sp1 and Sp3 through nuclear factor kappa B-like element. *J Biol Chem* 276 (2001) 38010-22.
- Sambrook, J. and Russel, D.: *Molecular Cloning*. 3. Auflage, Cold Spring Harbor, New York, 2001.
-

-
- Sandelin, A., Carninci, P., Lenhard, B., Ponjavic, J., Hayashizaki, Y. and Hume, D.A.: Mammalian RNA polymerase II core promoters: insights from genome-wide studies. *Nat Rev Genet* 8 (2007) 424-36.
- Sawadogo, M. and Roeder, R.G.: Interaction of a gene-specific transcription factor with the adenovirus major late promoter upstream of the TATA box region. *Cell* 43 (1985) 165-75.
- Schug, J., Schuller, W.P., Kappen, C., Salbaum, J.M., Bucan, M. and Stoeckert, C.J., Jr.: Promoter features related to tissue specificity as measured by Shannon entropy. *Genome Biol* 6 (2005) R33.
- Shav-Tal, Y. and Zipori, D.: PSF and p54(nrb)/NonO--multi-functional nuclear proteins. *FEBS Lett* 531 (2002) 109-14.
- Shiraki, T., Kondo, S., Katayama, S., Waki, K., Kasukawa, T., Kawaji, H., Kodzius, R., Watahiki, A., Nakamura, M., Arakawa, T., Fukuda, S., Sasaki, D., Podhajski, A., Harbers, M., Kawai, J., Carninci, P. and Hayashizaki, Y.: Cap analysis gene expression for high-throughput analysis of transcriptional starting point and identification of promoter usage. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100 (2003) 15776-81.
- Shrivastava, A. and Calame, K.: An analysis of genes regulated by the multi-functional transcriptional regulator Yin Yang-1. *Nucleic Acids Res* 22 (1994) 5151-5.
- Sirito, M., Lin, Q., Maity, T. and Sawadogo, M.: Ubiquitous expression of the 43- and 44-kDa forms of transcription factor USF in mammalian cells. *Nucleic Acids Res* 22 (1994) 427-33.
- Smale, S.T.: Transcription initiation from TATA-less promoters within eukaryotic protein-coding genes. *Biochim Biophys Acta* 1351 (1997) 73-88.
- Smale, S.T. and Kadonaga, J.T.: The RNA polymerase II core promoter. *Annu Rev Biochem* 72 (2003) 449-79.
- Steiger, J.L., Bandyopadhyay, S., Farb, D.H. and Russek, S.J.: cAMP response element-binding protein, activating transcription factor-4, and upstream stimulatory factor differentially control hippocampal GABABR1a and GABABR1b subunit gene expression through alternative promoters. *J Neurosci* 24 (2004) 6115-26.
- Strachan, T. and Read, A.P.: *Molekulare Humangenetik*. 3. Auflage, Elsevier Spektrum Akademischer Verlag, München, 2005.
- Suzuki, Y., Taira, H., Tsunoda, T., Mizushima-Sugano, J., Sese, J., Hata, H., Ota, T., Isogai, T., Tanaka, T., Morishita, S., Okubo, K., Sakaki, Y., Nakamura, Y., Suyama, A. and Sugano, S.: Diverse transcriptional initiation revealed by fine, large-scale mapping of mRNA start sites. *EMBO Rep* 2 (2001) 388-93.
- Svingen, T. and Tonissen, K.F.: Hox transcription factors and their elusive mammalian gene targets. *Heredity* 97 (2006) 88-96.
- Tai, T.C., Wong-Faull, D.C., Claycomb, R. and Wong, D.L.: Nerve growth factor regulates adrenergic expression. *Mol Pharmacol* 70 (2006) 1792-801.
- Tanaka, M., Kobayashi, D., Murakami, Y., Ozaki, N., Suzuki, T., Iwata, N., Haraguchi, K., Ieiri, I., Kinukawa, N., Hosoi, M., Ohtani, H., Sawada, Y. and Mine, K.: Genetic polymorphisms in the 5-hydroxytryptamine type 3B receptor gene and paroxetine-induced nausea. *Int J Neuropsychopharmacol* 11 (2008) 261-7.
- Thomas, M.C. and Chiang, C.M.: The general transcription machinery and general cofactors. *Crit Rev Biochem Mol Biol* 41 (2006) 105-78.
- Thompson, A.J., Chau, P.L., Chan, S.L. and Lummis, S.C.: Unbinding pathways of an agonist and an antagonist from the 5-HT₃ receptor. *Biophys J* 90 (2006) 1979-91.
-

-
- Thompson, A.J. and Lummis, S.C.: The 5-HT₃ receptor as a therapeutic target. *Expert Opin Ther Targets* 11 (2007) 527-40.
- Thomson, J.A., Leonard, J.H., McGregor, K., Sturm, R.A. and Parsons, P.G.: A nonconsensus octamer-recognition sequence (TAATGARAT-motif) identifies a novel DNA binding protein in human Merkel cell carcinoma cell lines. *Int J Cancer* 58 (1994) 285-90.
- Tokusumi, Y., Ma, Y., Song, X., Jacobson, R.H. and Takada, S.: The new core promoter element XCPE1 (X Core Promoter Element 1) directs activator-, mediator-, and TATA-binding protein-dependent but TFIID-independent RNA polymerase II transcription from TATA-less promoters. *Mol Cell Biol* 27 (2007) 1844-58.
- Tremblay, P.B., Kaiser, R., Sezer, O., Rosler, N., Schelenz, C., Possinger, K., Roots, I. and Brockmoller, J.: Variations in the 5-hydroxytryptamine type 3B receptor gene as predictors of the efficacy of antiemetic treatment in cancer patients. *J Clin Oncol* 21 (2003) 2147-55.
- Tzvetkov, M.V., Meineke, C., Oetjen, E., Hirsch-Ernst, K. and Brockmoller, J.: Tissue-specific alternative promoters of the serotonin receptor gene HTR3B in human brain and intestine. *Gene* 386 (2007) 52-62.
- Usheva, A. and Shenk, T.: YY1 transcriptional initiator: protein interactions and association with a DNA site containing unpaired strands. *Proc Natl Acad Sci U S A* 93 (1996) 13571-6.
- van Hooft, J.A. and Yakel, J.L.: 5-HT₃ receptors in the CNS: 3B or not 3B? *Trends Pharmacol Sci* 24 (2003) 157-60.
- Vizlin-Hodzic, D., Johansson, H., Ryme, J., Simonsson, T. and Simonsson, S.: SAF-A has a role in transcriptional regulation of Oct4 in ES cells through promoter binding. *Cell Reprogram* 13 (2011) 13-27.
- Walstab, J., Combrink, S., Bruss, M., Gothert, M., Niesler, B. and Bonisch, H.: Aequorin luminescence-based assay for 5-hydroxytryptamine (serotonin) type 3 receptor characterization. *Anal Biochem* 368 (2007) 185-92.
- Walstab, J., Hammer, C., Bonisch, H., Rappold, G. and Niesler, B.: Naturally occurring variants in the HTR3B gene significantly alter properties of human heteromeric 5-hydroxytryptamine-3A/B receptors. *Pharmacogenet Genomics* 18 (2008) 793-802.
- Weber, M., Hellmann, I., Stadler, M.B., Ramos, L., Paabo, S., Rebhan, M. and Schubeler, D.: Distribution, silencing potential and evolutionary impact of promoter DNA methylation in the human genome. *Nat Genet* 39 (2007) 457-66.
- Wong, D.L., Siddall, B.J., Ebert, S.N., Bell, R.A. and Her, S.: Phenylethanolamine N-methyltransferase gene expression: synergistic activation by Egr-1, AP-2 and the glucocorticoid receptor. *Brain Res Mol Brain Res* 61 (1998) 154-61.
- Xi, H., Yu, Y., Fu, Y., Foley, J., Halees, A. and Weng, Z.: Analysis of overrepresented motifs in human core promoters reveals dual regulatory roles of YY1. *Genome Res* 17 (2007) 798-806.
- Yaneva, M. and Tempst, P.: Isolation and mass spectrometry of specific DNA binding proteins. *Methods Mol Biol* 338 (2006) 291-303.
- Yang, C., Bolotin, E., Jiang, T., Sladek, F.M. and Martinez, E.: Prevalence of the initiator over the TATA box in human and yeast genes and identification of DNA motifs enriched in human TATA-less core promoters. *Gene* 389 (2007) 52-65.
-

Yoffe, J.R. and Borchardt, R.T.: Characterization of serotonin uptake in cultured pheochromocytoma cells. Comparison with norepinephrine uptake. *Mol Pharmacol* 21 (1982) 368-73.

7 Danksagung

Herrn Prof. Dr. Fritz danke ich für die Bereitschaft diese Arbeit gegenüber der biologischen Fakultät als Erstgutachter zu betreuen.

Herrn Prof. Dr. Brockmöller danke ich für die Möglichkeit diese Arbeit in der Abteilung Klinische Pharmakologie anzufertigen und für die finanzielle Absicherung während der gesamten Arbeit.

Ein besonders großer Dank geht an Herrn Dr. Mladen Tzvetkov, der mir durch seine hervorragenden wissenschaftlichen Fachkenntnisse immer wieder neue Denkanstöße gab, mir half, mich in die verschiedenen Methoden dieser Arbeit einzuarbeiten und mit vielen konstruktiven Ideen maßgeblich zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen hat.

Des Weiteren möchte ich auch allen weiteren, derzeitigen und ehemaligen Kollegen der Klinischen Pharmakologie ein großes Dankeschön für ihre freundliche und hilfsbereite Zusammenarbeit und Unterstützung sagen. Besonders hervorheben möchte ich hierbei Karoline Jobst, die besonders in methodischen Fragen immer eine gute Ansprechpartnerin ist, trotz ihrer so vielseitigen Aufgaben immer den Überblick und die gute Laune behält und den z. T. tristen Laboralltag auch mal mit kleinen akrobatischen Einlagen aufheitert.

Den Mitgliedern des DFG-Graduiertenkollegs 1034 „Die Bedeutung genetischer Polymorphismen in der Onkologie“ danke ich für ihre Kameradschaft und für die Einblicke, die ich durch sie auch in andere wissenschaftliche Themen und Arbeitsgruppen hatte.

Außerdem möchte ich mich bei meinen Kooperationspartnern bedanken, ohne deren Fachwissen, Gerätschaften bzw. zur Verfügung gestellten Räumlichkeiten einige Teile dieser Arbeit nicht durchführbar gewesen wären:

- Dr. Elke Oetjen und der Abteilung Molekulare Pharmakologie/Pharmakologie für die Nutzung ihres „heißen Bereichs“
- Martin Haubrock und Sven Krause für die Identifizierung der evolutionär konservierten DNA-Sequenzmotive
- Dr. Ralph Krätzner für die Anleitung bei der Nutzung „seiner“ FPLC-Anlage
- Dr. A.R. Asif für die massenspektrometrische Analyse

Mladen Tzvetkov, Andrea Köhler und Manar Abu Abed danke ich vielmals für das Korrekturlesen dieser Arbeit.

Ein riesiges Dankeschön geht an meine Familie und Freunde, auf die ich mich immer verlassen kann, die mir Kraft geben, mich zum Lachen bringen und mich immer wieder aufs Neue in vielerlei Hinsicht motivieren können. Besonders herzlich möchte ich mich an dieser Stelle bei meinen Eltern bedanken, die mich in jeder Lebenslage aufopferungsvoll unterstützen und mir einen sicheren „Heimathafen“ bieten, zu dem ich immer wieder gerne zurückkehre.

Last but not least sei all denen ein Dankeschön ausgesprochen, die zwar nicht namentlich Erwähnung fanden, aber zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben.

8 Lebenslauf

Persönliche Daten:

Name: Kristin Bokelmann
Geburtsdatum: 21. November 1982
Geburtsort: Nordhausen

Schulbildung:

1989 – 1993 Grundschule „Thomas Müntzer“ Klettenberg
1993 – 1998 Michael Neander-Gymnasium Ilfeld
1998 – 2001 Herder-Gymnasium Nordhausen
Abschluss: Allgemeine Hochschulreife (Abitur)

Studium:

10/2001-05/2007 Studium der Biologie an der Georg-August-Universität Göttingen
Hauptfach: Anthropologie
Nebenfächer: Pathologie und Pharmakologie
Diplomarbeit: „Charakterisierung des Promotors für das Gen *HTR3B* beim Menschen und bei der Ratte unter besonderer Berücksichtigung der Regulation durch Glukokortikoide“
Abschluss: Diplom

Promotion:

05/2007-07/2011 Doktorarbeit: „Charakterisierung des 5-HT_{3B}-Promotors der Ratte vor dem Hintergrund eines mit Chemotherapie-induziertem Erbrechen assoziierten Polymorphismus“
01/2008-03/2011 Stipendiatin des DFG-Graduiertenkollegs 1034 an der Georg-August-Universität Göttingen