

Aus dem Institut für Entwicklungsneurobiologie
Prof. Dr. rer. nat. H. Chica Schaller
Zentrum für Molekulare Neurobiologie Hamburg

**Charakterisierung
des murinen Germ Cell Nuclear Factor
(GCNF)-Promotors**

Dissertation
zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin
dem Fachbereich Medizin der Universität Hamburg vorgelegt von

Eray Gökkurt
aus Flensburg

Hamburg, 2004

Angenommen vom Fachbereich Medizin
der Universität Hamburg am: 07.04.2004

Gedruckt mit der Genehmigung des Fachbereichs
Medizin der Universität Hamburg

| | |
|-------------------------------------|----------------------|
| Prüfungsausschuss, der Vorsitzende: | PD Dr. U. Borgmeyer |
| Prüfungsausschuss, 2. Gutachter: | PD Dr. I. Bach |
| Prüfungsausschuss, 3. Gutachter: | Prof. Dr. W. Fiedler |

Inhaltsverzeichnis

| | |
|--|----|
| 1 Einleitung | 05 |
| 1.1 Die Transkriptionsmaschinerie | 06 |
| 1.2 Die Superfamilie der nukleären Rezeptoren | 08 |
| 1.2.1 Der Aufbau nukleärer Rezeptoren | 09 |
| 1.3 Der Germ Cell Nuclear Factor (GCNF) | 12 |
| 1.4 Ziel der Arbeit | 15 |
| 2 Material und Methoden | 16 |
| 2.1 Puffer, Lösungen und Medien | 16 |
| 2.2 Molekularbiologische Methoden | 19 |
| 2.2.1 Herstellen von kompetenten Bakterien | 19 |
| 2.2.2 Transformation kompetenter Bakterien | 19 |
| 2.2.3 Minipräparation von Plasmid DNS aus Bakterien | 19 |
| 2.2.4 Maxipräparation von Plasmid DNS | 20 |
| 2.2.5 Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren | 20 |
| 2.2.6 Restriktionsverdau von Nukleinsäuren | 20 |
| 2.2.7 Dephosphorylierung von DNS Enden | 21 |
| 2.2.8 Auftrennung und Isolierung von DNS Fragmenten | 21 |
| 2.2.9 Ligation von DNS-Fragmenten in Plasmide | 21 |
| 2.2.10 Polymerase Kettenreaktion (PCR) | 22 |
| 2.2.11 RNS-Isolierung | 22 |
| 2.2.12 RNase Schutzexperiment | 23 |
| 2.2.12.1 Einführung und Prinzip der Methode | 23 |
| 2.2.12.2 Durchführung | 24 |
| 2.2.13 5' RACE | 26 |
| 2.2.13.1 Einführung und Prinzip der Methode | 26 |
| 2.2.13.2 Durchführung | 27 |
| 2.2.14 Northern Blot | 28 |
| 2.3 Zellkulturtechniken | 29 |
| 2.3.1 Verwendete Zelllinien | 29 |
| 2.3.2 Transfektion von Säugetierzellen durch Lipofektion | 32 |
| 2.3.2.1 Einführung und Prinzip der Methode | 32 |

| | |
|---|----|
| 2.3.2.2 Durchführung | 32 |
| 2.3.3 Luziferase Messung | 33 |
| 2.3.4 β -Galaktosidase (β -Gal) Messung | 33 |
| 3 Ergebnisse | 34 |
| 3.1 Die genomische 5'Region des murinen GCNF | 34 |
| 3.2 Bestimmung der Transkriptionsstartpunkte | 39 |
| 3.2.1 RNase Schutzexperimente identifizieren einen Bereich mit mehreren Transkriptionsstartpunkten | 39 |
| 3.2.2 Identifikation von Transkriptionsstartpunkten durch RLM-5'-RACE | 42 |
| 3.3 Nachweis des GCNF-Transkriptes in P19-, NT2/D1- und JEG3-Zellen | 45 |
| 3.4 Funktionelle Charakterisierung des mGCNF-Promotors | 46 |
| 3.4.1 Die Deletionskonstrukte | 46 |
| 3.4.2 Promotoraktivität und Retinsäureinduzierbarkeit in P19-Zellen | 48 |
| 3.4.3 Identifikation eines DR-1-ähnlichen Elements | 49 |
| 3.4.4 Das proximale Promotorfragment XR5-367 ist durch 9-cis-Retinsäure, aber nicht durch ATRA induzierbar | 50 |
| 3.4.5 Promotoraktivität und Retinsäureinduzierbarkeit in NT2/D1-Zellen | 52 |
| 3.5 Identifizierung regulativer Elemente innerhalb des mGCNF-Promotors | 53 |
| 3.6 Sequenzvergleich 5'-Region mGCNF versus hGCNF | 59 |
| 3.7 Der Einfluß diverser Transkriptionsfaktoren auf die basale Promotoraktivität | 61 |
| 4 Diskussion | 63 |
| 5 Zusammenfassung | 69 |
| 6 Literaturverzeichnis | 70 |
| 7 Anhang | 84 |
| 7.1 Abkürzungen | 84 |
| 7.2 Verwendete Oligonukleotide | 86 |
| 7.3 Danksagung | 88 |
| 7.4 Lebenslauf | 89 |
| 7.5 Publikationen | 90 |
| 7.6 Erklärung nach §4 der Promotionsordnung | 91 |

1. Einleitung

Das menschliche Genom, bestehend aus einer geschätzten Basenzahl von etwa 3,2 Gigabasen, beinhaltet ca. 30.000 Protein-kodierende Gene. Der Anteil der Protein-kodierenden Sequenz an der gesamten Genomsequenz beträgt dabei nur 1,1 bis 1,4% (1). Vergleichende Genomanalysen konnten zeigen, daß die absolute Zahl der Gene nicht alleine wegweisend für die Komplexität eines Organismus ist. So besitzt zum Beispiel *C. elegans*, ein Nematode, ca. 20.000 Gene im Vergleich zu 14.000 Genen der Fruchtfliege *Drosophila*, die aus einem wesentlich breiteren Spektrum von Zelltypen und Geweben besteht (2, 3). Welche weiteren Faktoren spielen also für die evolutionäre Vielfalt eine Rolle? Eine besondere Rolle scheint dabei, neben dem vielfältigeren alternativen *Splicen* und dem komplexeren Proteinaufbau in höheren Organismen, der Expansion der regulativen Komplexität in der Evolution zuzukommen (4). So korreliert die Komplexität eines Organismus unter anderem mit der Zahl der Gene, die für Transkriptionsfaktoren kodieren. Im menschlichen Genom kodieren ca. 3000 Gene für Transkriptionsfaktoren (5). *C. elegans* und *Drosophila* dagegen besitzen in etwa nur 1000 Gene, die für Transkriptionsfaktoren kodieren (2, 6). Transkriptionsfaktoren sind Proteine, die die Expression ihrer Zielgene beeinflussen. Die Gesamtheit der in einer Zelle zu einem bestimmten Zeitpunkt exprimierten Transkriptionsfaktoren nimmt eine Schlüsselposition in der Entstehung des Expressionsmusters dieser Zelle ein. Das Expressionsmuster einer Zelle wiederum entscheidet über deren Bestimmung. Daher wundert es nicht, daß Fehlregulationen durch Transkriptionsfaktoren an diversen Krankheiten beteiligt sind, was deutlich macht wie wichtig es ist beteiligte Kontrollmechanismen zu verstehen (7-9). Eine sich daraus ergebende Konsequenz ist die Tatsache, daß viele Transkriptionsfaktoren, insbesondere die ligandengesteuerten nukleären Rezeptoren, wertvolle pharmakologische Zielmoleküle darstellen, wodurch sich therapeutische Interventionsmöglichkeiten eröffnen (7). Der in dieser Arbeit untersuchte Transkriptionsfaktor Germ Cell Nuclear Factor (GCNF) gehört zu dieser Familie der nukleären Rezeptoren.

1.1 Die Transkriptionsmaschinerie

Die Einteilung eines Gens kann in zwei funktionell unterschiedliche Einheiten erfolgen. Zum einen in den für die Prä-mRNS kodierenden Bereich und zum anderen in einen Bereich, der regulatorische Sequenzen enthält. Diese Einheiten müssen nicht strikt physikalisch voneinander getrennt sein, jedoch liegen die regulatorischen Sequenzen im wesentlichen stromaufwärts des Transkriptionsstartpunktes, in der sogenannten Promotorregion. Die regulatorischen Bereiche eines Gens sorgen dafür, daß ein Gen zeitlich in der Entwicklung, räumlich im richtigen Gewebe und quantitativ als Antwort auf entsprechende Stimuli korrekt exprimiert wird. Innerhalb der Promotorregion finden sich Bindungssequenzen für Transkriptionsfaktoren. Diese Bindungssequenzen können bis zu einigen Kilobasen stromaufwärts des Transkriptionsstartpunktes liegen.

Die Regulation der Transkription von Protein-kodierenden Genen in eukaryontischen Zellen unterliegt dem Zusammenspiel einer Reihe von Proteinen, deren zentrale Komponente die RNS-Polymerase II (Pol II) darstellt. Die Pol II ist ein aus mehreren Untereinheiten bestehendes Enzym und katalysiert im Zusammenspiel mit Transkriptionsfaktoren die Synthese der mRNA. Man unterscheidet zwei Gruppen von Transkriptionsfaktoren (10). Zum einen die Gruppe der generellen Transkriptionsfaktoren (GTF), die DNS-bindend oder nicht bindend sein können, und zum anderen die Gruppe der sequenzspezifischen Transkriptionsfaktoren (STF).

Den STF ist eine Bindungsdomäne, die eine sequenzspezifische Bindung an regulatorische DNS-Sequenzen ermöglicht, gemein. Während GTF essentiell für die Transkription aller Protein-kodierender Gene sind, haben STF promotor- und kontextspezifische Funktionen. Aufgrund der Struktur ihrer DNS-Bindungsdomäne können STF in verschiedenen Familien eingeteilt werden (7, 11). Neben den großen Familien der Helix-Turn-Helix Proteine, der Leucine-Zipper- und der Helix-Loop-Helix-Proteine gibt es zwei weitere Familien, welche Zinkatome in ihrer DNS-Bindungsdomäne komplexieren. Die eine erreicht dies über je zwei Cystein- und Histidinreste, die andere komplexiert Zinkatome über je vier Cysteine. Die letztere stellt die Superfamilie der nukleären Rezeptoren dar, zu

der der in dieser Arbeit im Mittelpunkt stehende GCNF gehört und soll weiter unten ausführlicher behandelt werden.

Zu den GTF zählen Transkriptionsfaktor (TF) IIA, TFIIB, TFIID, TFIIE, TFIIIF und TFIIH. Die Hauptaufgabe der GTF ist das Rekrutieren der Pol II an der Kernpromoterregion eines Gens. Diese Region ist durch regulative Sequenzen, wie z. B. der TATA-Box, CCAAT-Box und/oder dem Initiatorelement charakterisiert (12) Die Pol II-Rekrutierung scheint dabei schrittweise zu erfolgen. Ein Modell geht davon aus, daß zuerst STF als Reaktion auf einen Stimulus an eine Promotorsequenz binden und dann sequentiell verschiedene Kofaktoren der Transkription rekrutieren (13). In einem ersten Schritt wird die Struktur des Chromatins entweder gleichzeitig oder nacheinander durch Histonacetyltransferasen wie z.B. p300/CBP (14) und ATP-abhängige chromatinremodellierende Komplexe wie z.B. SWI2/SNF2 (15) „geschmolzen“ und so durch Freilegung der Bindungssequenzen die Bindung der GTF ermöglicht. Die Reihenfolge kann dabei in verschiedenen Promotorkontexten variieren (16).

GTF sind für jede Transkription Protein-kodierender Gene unabdingbar (17). Von diesen wurde bislang angenommen, daß sie in einer strengen Reihenfolge binden (18). Neuere Ergebnisse sprechen jedoch für eine gewisse Variabilität innerhalb dieses Vorgangs (16). Als erstes bindet die TATA-Box-bindende-Protein (TBP)-Untereinheit des TFIID-Komplexes an die TATA-Box, eine Konsensussequenz, die oft aber nicht immer ca. 25-30 bp 5`-wärts des Transkriptionsstartpunktes gefunden wird (19). Der TFIID-Komplex besteht aus der TBP-Untereinheit und 10 TBP-assoziierten-Faktoren (TAF). Während rekombinantes TBP alleine dazu in der Lage ist die Pol II zu rekrutieren und eine basale Transkription zu stimulieren, integrieren die TAF aktivierende oder reprimierende Signale von Transkriptionsfaktoren (20). Anschließend binden in dieser Reihenfolge TFIIB, TFIIIF, TFIIE und TFIIH mit dem Pol II-Komplex, welcher aus 10-12 Untereinheiten besteht.

Ein Modul, welches Informationen von sequenzspezifischen Transkriptionsfaktoren zum oben geschilderten Transkriptionskomplex vermittelt, scheint der DRIP/TRAP-Komplex zu sein (20, 21). Dieser Komplex besteht aus etwa 20 Einzelproteinen, deren genaue Zusammensetzung je nach Kontext leicht variiert (20).

1.2 Die Superfamilie der nukleären Rezeptoren

Nukleäre Rezeptoren bilden eine große Familie von Transkriptionsfaktoren mit gemeinsamen strukturellen Merkmalen. Sie sind an vielen wichtigen physiologischen Prozessen, wie zum Beispiel Entwicklung, Differenzierung, Energiestoffwechsel und Fortpflanzung, beteiligt und wirken entscheidend an der Integration auto-, para- sowie endokriner Signale mit (9, 22-24).

Ihrer Entdeckung gingen Beobachtungen über die Physiologie einiger ihrer Liganden, wie z.B. des Östrogens, des Progesterons, des Thyroxins und der Retinsäure, lange voraus und früh wurden Vermutungen angestellt, daß die Rezeptoren dieser Hormone direkt an transkriptionellen Prozessen beteiligt sein könnten (25). 1977 schließlich konnte der Progesteronrezeptor als erster nukleäre Rezeptor biochemisch aufgereinigt werden (26). Mitte der achtziger Jahre waren dann die cDNS für alle wichtigen Steroidrezeptoren sowie für den Thyroxin-(TR), Retinsäure- und Retinoid-X-Rezeptor (RAR und RXR) kloniert. Während man eine strukturelle Verwandtschaft der Steroidrezeptoren erwartet hatte, war die Ähnlichkeit der sogenannten Nichtsteroidrezeptoren, wie die des TR oder des RAR, doch überraschend (25). Die Entdeckung dieser Rezeptoren führte zur Suche nach neuen unbekanntem Mitgliedern. Im Laufe der Jahre wurden eine Vielzahl neuer nukleärer Rezeptoren kloniert, deren Liganden zunächst noch unbekannt waren und es zum großen Teil auch heute noch sind. Dies führte zum Begriff der Waisenrezeptoren und der reversen Endokrinologie, in der die Klonierung putativer neuer Hormonrezeptoren der Identifikation ihrer Liganden und der Aufklärung ihrer physiologischen Bedeutung vorangehen (24,27, 28). Bei vielen dieser Waisenrezeptoren muß man davon ausgehen, daß sie die Fähigkeit verloren haben, Liganden zu binden und daher andere Regulationsmechanismen zum Tragen kommen.

1.2.1 Der Aufbau nukleärer Rezeptoren

Allen Mitgliedern der Familie der nukleären Rezeptoren ist eine modulare Organisation in Domänen gemeinsam, anhand derer sich die Zugehörigkeit zur Familie ergibt (22). Charakteristisch für diese Domänenstruktur ist ein schwach konservierter N-terminaler Bereich (A/B), eine hoch konservierte DNS-Bindungsdomäne (DBD oder C), eine Gelenk-Region (D) und ein in der Aminosäuresequenz mäßig, strukturell jedoch stark konservierter C-terminaler Abschnitt, bestehend aus einer Ligandenbindungsdomäne (LBD oder E) und der F-Domäne (Abbildung 1.1).

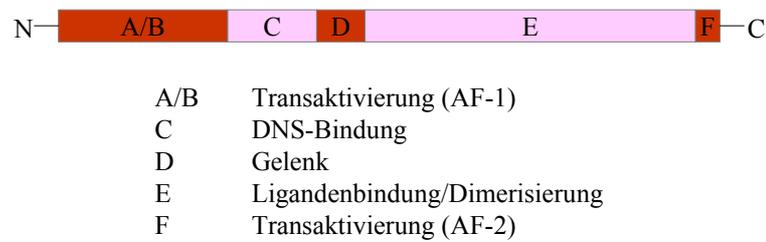


Abbildung 1.1: Schema des modularen Aufbaus nukleärer Rezeptoren.

Die A/B-Domäne, die die am schwächsten konservierte Region innerhalb der Familie der nukleären Rezeptoren darstellt, beherbergt bei einigen Rezeptoren eine ligandenunabhängige, die Transkription aktivierende Domäne, die Aktivierungsfunktion 1 (AF-1) genannt wird (29, 30). Alternatives Splicen führt in dieser Region zu diversen sich im N-Terminus unterscheidenden Isoformen (31, 32). Ferner ist die A/B-Domäne häufig Ziel von Phosphorylierungen, was zu einer Modulation der transaktivierenden Eigenschaften eines Rezeptors führt (33, 34). Zudem gibt es Hinweise, daß die A/B-Domäne zum Teil zell- und promotorkontextspezifische Eigenschaften eines nukleären Rezeptors bestimmt (35-37).

Die DNS-Bindungsdomäne ist die am stärksten konservierte Region bei nukleären Rezeptoren. Sie gliedert sich in zwei sogenannte Zinkfinger, die je ein Zinkatom zwischen vier Cysteinen komplexieren, an die sich die sogenannte „*C-terminal Extension*“ (CTE) anschließt. Diese hat große Bedeutung für die DNS-Bindungsspezifität eines nukleären Rezeptors. Die DNS-Bindungsdomäne bestimmt, an welche Zielsequenzen („*response elements*“) ein Rezeptor bindet und enthält meist ein nukleäres Lokalisationssignal (38, 39). Nach der Verwandtschaft ihrer DBD werden die nukleären Rezeptoren in sechs Familien eingeteilt (40, 41). Abbildung 1.2 zeigt Zielsequenzen nukleärer Rezeptoren. Während die Steroidhormonrezeptoren an invertierte Wiederholungen („*inverted repeats*“ oder IR) der Sequenz AGAACA bzw. AGGTCA im Falle des Östrogenrezeptors, binden, binden die Nicht-Steroidhormonrezeptoren an eine direkte Wiederholung („*direct repeat*“ oder DR) der Sequenz AGGTCA, welche individuell unterschiedlich von 0 bis 5 Basenpaaren separiert sein können (DR0 – DR5) (38, 42). Die meisten nukleären Rezeptoren binden als Hetero- oder Homodimere an ihre Zielsequenz. Durch die Wahl verschiedener Dimerisierungspartner ergibt sich eine größere Flexibilität in der Bindung an Zielsequenzen und damit in der Genregulation. Diese Zielsequenzen liegen typischerweise innerhalb regulatorischer Abschnitte eines Gens, so daß nukleäre Rezeptoren von hier aus Einfluß auf die Transkription eines Gens nehmen können. Dies geschieht entweder dadurch, daß Transkription stimuliert, oder daß die Transkription eines Gens unterdrückt wird. Viele nukleäre Rezeptoren binden in Abwesenheit ihres Liganden statt Koaktivatoren Korepressoren, wodurch sie sowohl als Aktivatoren als auch als Repressoren wirken können (25, 43-45).

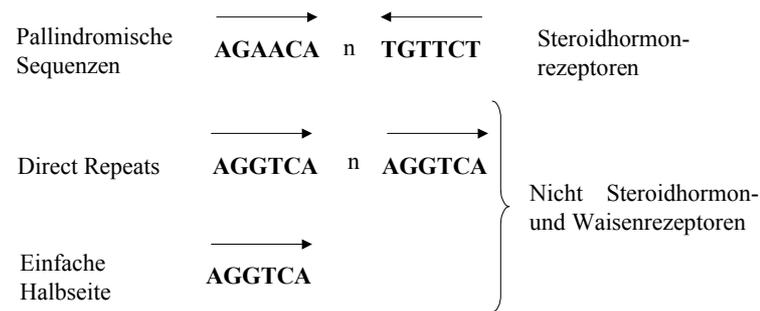


Abbildung 1.2: Zielsequenzen nukleärer Rezeptoren. Die einzelnen Elemente werden als Halbseiten bezeichnet, ihre Orientierung ist durch den Pfeil angedeutet. Typisch für die Steroidhormonrezeptoren ist die Sequenz AGAACA, die in einem Steroidhormonrezeptor-Response Element als ein von 3 Nucleotiden unterbrochenem Palindrom vorliegt. Nicht-Steroidhormonrezeptoren binden an die direkte Wiederholung der Halbseite AGGTCA (DR, *Direct Repeat*), unterbrochen von 0 bis 5 Nucleotiden (DR 0–5). Je nach Rezeptor haben auch die flankierenden Sequenzen einen Einfluss auf die Bindung. Einige Rezeptoren binden als Monomere an eine einzelne Halbseite.

Charakteristisch für die strukturell konservierte LBD sind 12 α -Helices und ein β -Faltblatt zwischen den Helices 5 und 6. Die LBD formen unterschiedlich große „Ligandentaschen“, welche von hydrophoben Aminosäuren gesäumt sind und die Ligandenspezifität eines Rezeptors bestimmen (46, 47). Eine besondere Bedeutung kommt der Helix 12 zu, die die Aktivierungsfunktion 2 (AF-2), die sogenannte ligandenabhängige Aktivierungsdomäne, beherbergt (48, 49). Ein gängiges Modell geht davon aus, daß nach Ligandenbindung die Helix 12 in die Nähe der Helix 3 transloziert und eine sogenannte Spannungsklemme entsteht, welche Koregulatoren über deren LXXLL-Motive binden soll (43). In Abwesenheit von einem Liganden oder bei gestörter Translokation der Helix 12 durch einen Antagonisten, bindet die LBD Korepressoren. Neben der Fähigkeit zur Liganden- und Koaktivatorbindung beherbergt die LBD üblicherweise eine Dimerisierungsfunktion.

1.3 Der Germ Cell Nuclear Factor (GCNF)

Der nukleäre Waisenrezeptor GCNF konnte erstmals 1994 aufgrund seiner Ähnlichkeit mit Retinsäurerezeptoren aus einer Maus cDNS-Bank kloniert werden (50). Weitere Bezeichnungen für GCNF sind „*Retinoid Acid Receptor Related Testis Associated Receptor*“ (51), *Neuronal Cell Nuclear Factor* (52) und nach der systematischen von dem „*Nuclear Receptors Nomenclature Committee*“ vorgeschlagenen Nomenklatur NR6A1 (40). Seit seiner Entdeckung konnte GCNF in *Mus musculus* (50), *Xenopus laevis* (53), *Danio rerio* (54) und mit 4 Varianten im *Homo sapiens* nachgewiesen werden (50, 55-57). Die GCNF-Varianten sind stark konserviert, jedoch zeigen alle humanen Varianten gegenüber Maus-GCNF Deletionen im N-terminalen Bereich in Domäne A auf (58). Die DNS-Bindungsdomäne ist innerhalb der Familie in der Regel besonders gut konserviert. Während die DNS-Bindungsdomäne von GCNF im Vergleich zu Retinsäurerezeptoren zu etwa 60% konserviert ist, zeigt die Ligandenbindungsdomäne von GCNF mit etwa 25% nur eine geringe Verwandtschaft zu anderen Rezeptoren der Familie (50, 58). Da die Ligandenbindungsdomäne bei GCNF nur sehr gering konserviert ist und die Ligandensuche bisher erfolglos blieb, wird vermutet, daß für GCNF kein Ligand existiert (52, 59).

Aufgrund seines Dimerisierungs- und Bindungsverhaltens und der relativ geringen Verwandtschaft mit anderen nukleären Rezeptoren, bildet GCNF als einziges Mitglied die Subfamilie VI in der Superfamilie der nukleären Rezeptoren (40).

GCNF bindet als Homodimer an das Element DR0 und ist ein Repressor der Transkription (60, 61). *In vitro* Untersuchungen konnten eine mögliche Involvierung des nukleären Kofaktors N-CoR im Rahmen dieser Repression zeigen (60). Eine Bindung an die Elemente DR1 bis DR5 erfolgt nicht (62, 63). Andere Dimerisierungspartner sind bisher nicht bekannt. Dieses Bindungsverhalten unterscheidet GCNF von anderen bekannten nukleären Rezeptoren.

Im adulten Organismus findet man eine hohe GCNF-Expression in den Spermatozyten und runden Spermatiden im Hoden, sowie in den Ovarien und der Plazenta (50, 53, 56; 64, 65). Im adulten Hoden konnten zwei Transkripte (7,5

und 2,4 kb) nachgewiesen werden (Abbildung 1.3), die sich lediglich in der 3' untranslatierten Region unterscheiden (65). Dagegen findet man beim sich entwickelnden Embryo nur die 7,5 kb Bande, die nur bis Tag 10,5 nachzuweisen ist (62).

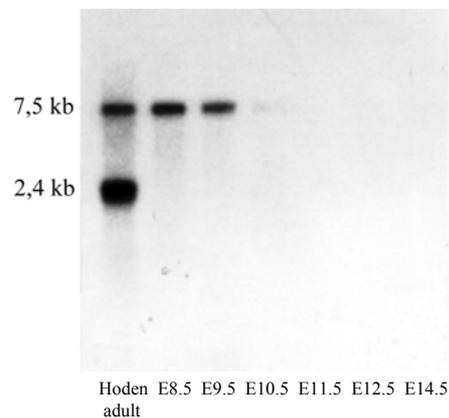


Abbildung 1.3: Northern Blot. Nachweis des GCNF-Transkripts im adulten Maus-Testis mit 2 Banden (2,4 und 7,5 kb) und im Maus-Embryo bis Tag E10.5 mit der 7,5 kb-Bande. Aus Süsens et al., 1997.

Es wird postuliert, daß GCNF eine Bedeutung in der Meiose während der Spermatogenese und der Oogenese zukommt (50, 51, 55, 65-67) und eine Rolle als Repressor in der Inaktivierung der Sexchromosomen während der Meiose spielen könnte (61, 64).

Durch *in situ* Studien in der Maus konnte gezeigt werden, daß schon während Tag 6,5 der murinen Embryonalentwicklung GCNF-Transkripte nachweisbar sind (62). Besonders hoch sind die Hybridisierungssignale im Neuroektoderm. Bemerkenswert ist dabei, daß eine besonders intensive Hybridisierung in der marginalen und ependymalen Schicht des Neuralrohrs zu beobachten ist (62). Die hohe und zeitlich eng begrenzte Expression im Neuroektoderm läßt auf eine mögliche Funktion von GCNF in der Ausbildung des neuronalen Phänotyps schließen. Darüber hinaus wird die außerordentlich wichtige Bedeutung von GCNF während der Embryonalentwicklung durch einen embryonal letalen GCNF-*knockout* bestätigt (68-70). In *Xenopus* führt sowohl eine GCNF-Überexpression als auch die Expression einer dominant-negativen GCNF-Variante zu einer gestörten Organogenese (71).

Neben des bisher beschriebenen Expressionsmusters von GCNF findet man eine hohe Expression in embryonalen Teratokarzinomzelllinien (72, 73). Humane NT2/D1 und murine P19 Zellen sind solche Teratokarzinomzellen und stellen ein wertvolles Modellsystem für Differenzierungsprozesse in Säugern dar. Durch eine Retinsäurebehandlung solcher Zelllinien ist eine Differenzierung von Zellen mit embryonalem Phänotyp in Zellen mit neuronalem Phänotyp zu beobachten (74, 75). Interessanterweise läßt sich sowohl in NT2/D1 als auch in P19 Zellen, ähnlich wie bei RAR α und RAR β , eine konzentrationsabhängige, transiente Hochregulation von GCNF durch eine Behandlung der Zellen mit all-trans-Retinsäure (ATRA) beobachten (72, 73).

Nur wenige Zielgene von GCNF konnten bislang identifiziert werden. Es konnte gezeigt werden, daß Oct4, der zu der Familie der POU-Domänen-Transkriptionsfaktoren zählt, ein Zielgen für GCNF darstellt und ein inverses Expressionsmuster in der Embryogenese aufweist (68, 76, 78). Oct4 spielt eine wesentliche Rolle in der Aufrechterhaltung der Pluripotenz von Stammzellen. Embryonale Stammzellen, embryonale Keimzellen, wie auch embryonale Karzinomzellen exprimieren Oct4. Fangen die Zellen an zu differenzieren, verschwindet die Oct4-Expression, so daß Oct4 als Marker für pluripotente Stammzellen angesehen werden kann (77, 78). Die Repression von Oct4 durch GCNF scheint eine initiale Rolle im Differenzierungsprozeß der Stammzellen zu spielen.

Die spezifische Expression in den Keimzellen im adulten Organismus, das Expressionsmuster im Embryo, der hohe Konservierungsgrad (über 98 % zwischen Mensch und Maus), der embryonal letale *Knockout*, sowie die transiente Hochregulation in den Zelllinien NT2/D1 und P19 während der retinsäureinduzierten Differenzierung sprechen für eine wichtige Funktion von GCNF in der Keimzellreifung und in der neuronalen Differenzierung in Säugern. Darüber hinaus ist aufgrund des Zusammenhanges zwischen GCNF und Oct4 anzunehmen, daß GCNF generell eine Rolle in Differenzierungsprozessen spielen könnte.

1.4 Ziel der Arbeit

Ziel der hier vorgelegten Arbeit ist es einen Beitrag zur Aufklärung der Regulationsmechanismen des nukleären Waisenrezeptors GCNF zu leisten. Für das Verständnis des besonderen GCNF-Expressionsmodells und der durch retinsäureinduzierten transienten Hochregulation in Teratokarzinomazellen ist eine Aufklärung der transkriptionellen Regulation von GCNF unabdingbar. Diese Notwendigkeit ergibt sich aus der Tatsache, daß der Transkription neben der posttranskriptionellen Modifikation, der mRNA-Stabilität und der Proteininstabilität eine Hauptrolle in der Regulation eines Gens und seines Proteins zukommt. Da der Promotor eines Gens den wichtigsten Faktor der transkriptionellen Regulation darstellt, sollte der für die GCNF-Genexpression verantwortliche Promotor lokalisiert und charakterisiert werden. Dabei galt es Zusammenhänge zwischen der transkriptionellen Regulation und dem Expressionsmodell von GCNF aufzudecken. Das Verständnis dieser Zusammenhänge könnte einen wesentlichen Beitrag zur Aufklärung von Funktion und Beeinflußbarkeit von GCNF leisten.

2. Material und Methoden

2.1 Puffer, Lösungen und Medien

| | |
|---------------------------------------|--|
| PBS | 137 mM NaCl 2,7 mM KCl 7,4 mM Na ₂ HPO ₄ 1,5 mM KH ₂ PO ₄ |
| TBE (5x) | 0,5 M Tris Base 0,5 M Borsäure 12,5 mM EDTA |
| TAE (50x) | 2 M Tris Base 5,71% Eisessig 50 mM EDTA |
| TBS (10x) | 200 mM Tris/HCl pH 7,5 5 M NaCl |
| TE | 20 mM Tris/HCl pH 7,5 1 mM EDTA |
| TEN | 40 mM Tris/HCl pH 7,5 1 mM EDTA 150 mM NaCl |
| Alkalische Phosphatase (AP) Puffer | 100 mM Tris Base 100 mM NaCl 5 mM MgCl ₂ |
| AP-Stop Puffer | 25 mM Tris/HCl pH 8 10 mM EDTA |

| | |
|---|--|
| CTAB | 5% CTAB (Hexadecyltrimethylammoniumbromid) 0,5 M NaCl |
| Ethidiumbromid x 10.000 | 10 mg/ml in 1 x TAE |
| Auftragspuffer x 5 (für Nukleinsäuren) | 40% Sucrose 0,25% Bromphenolblau 0,25% Xylene X in TE |
| STET | 8% Sucrose 0,1% Triton X -100 50 mM EDTA 50 mM Tris/HCl pH 8 |
| SOC Medium | 2% Bacto-tryptone 0,5% Bacto Hefe Extrakt 10 mM NaCl 2,5 mM KCl mit NaOH auf pH 7,0 einstellen - Autoklavieren abkühlen auf 60°C 10 mM MgCl ₂ 10 mM Glukose |
| Dyt Medium | 1,6% Bacto-tryptone 1% Bacto Hefe Extrakt 100 mM NaCl |
| LB Medium | 1% Bacto-tryptone 0,5% Bacto Hefe Extrakt 200 mM NaCl mit NaOH auf pH 7,5 einstellen |

| | |
|-------------|---|
| Y-broth | LB Medium 4 mM MgSO ₄ 5 mM KCl |
| Antibiotika | Ampicillin 200 µg/ml Kanamycin 50 µg/ml |
| TFB 1 | 10 mM CaCl ₂ 30 mM Kaliumacetat mit Essigsäure auf pH 5,8 einstellen 100 mM RbCl 50 mM MnCl ₂ 15% Glyzerin |
| TFB 2 | 10 mM MOPS 75 mM CaCl ₂ 10 mM RbCl 15% Glyzerin |
| 10 x MOPS | 200mMol MOPS 50 mMol NaAc 10 mMol EDTA mit NaOH auf pH 7 einstellen |
| MOPS-Mix | 27 µl 10 x MOPS 132 µl Formamidlösung 46,5 µl Formaldehyd |

2.2 Molekularbiologische Methoden

2.2.1 Herstellen von kompetenten Bakterien

Es wurde der Bakterienstamm *Escherichia coli* XL1 *blue* verwendet. Die Bakterien wurden nach Wachstum über Nacht auf einer LB-Platte ausgestrichen. Morgens wurden einzelne Kolonien mit Pipettenspitzen in 6 Reagenzgläser mit je 2 ml Y-broth angeimpft und 2 Stunden bei 37°C im Schüttler inkubiert. Anschließend wurden diese Vorkulturen in 500 ml Y-broth geschüttet und bis zu einer OD₆₀₀ von 0,3 - 0,35 wachsen gelassen. Dann wurde die Kultur auf zwei 50 ml Polypropylenröhrchen verteilt, kurz auf Eis gestellt und dann bei 4°C und 2.000 g pelletiert. Der Überstand wurde dekantiert, das Pellet in je 15 ml in TFB 1 resuspendiert und 60 – 90 Minuten auf Eis gestellt. Anschließend wurde erneut mit 2.000 g pelletiert, der Überstand dekantiert und nun das Pellet in je 2 ml TFB 2 resuspendiert. Die Bakterien wurden nun in 200 µl Aliquots aufgeteilt, sofort in Flüssigstickstoff schockgefroren und anschließend bei -80°C gelagert.

2.2.2 Transformation kompetenter Bakterien

Zu 50 µl auf Eis aufgetauter kompetenter Bakterien wurden 5µl eines Ligationsansatzes oder 0,5 µg einer DNS-Präparation hinzupipettiert und 30 min auf Eis inkubiert. Anschließend wurden die Bakterienansätze 5 min auf 37°C erwärmt. Danach wurden 950 µl SOC Medium zugegeben und 1h bei 37°C geschüttelt. Zwischen 50 µl und 1 ml des Ansatzes wurden anschließend auf einer Ampicillin-Agarplatte mit einer Pipette gleichmäßig ausgestrichen und über Nacht bei 37°C wachsen gelassen.

2.2.3 Minipräparation von Plasmid-DNS aus Bakterien

Einzelne Kolonien transformierter Bakterien wurden in 2,5 ml Medium mit entsprechendem Antibiotikumzusatz angeimpft und über Nacht bei 37°C geschüttelt. Die Bakterien wurden dann bei 2.400 g pelletiert, der Überstand abgesaugt und das Pellet in 200 µl STET mit 1 µg/ml Lysozym auf dem Schüttler resuspendiert. Anschließend wurde der Ansatz für 2 min auf 95°C erhitzt und

dann 10 min bei 16.000 g zentrifugiert. Das Sediment wurde nun mit einem Zahnstocher entfernt und verworfen. Dem Überstand wurden 10 µl 5%iger CTAB Lösung zugegeben, kurz geschüttelt und das Präzipitat bei 16.000 g pelletiert. Der Überstand wurde abgesaugt und das Pellet in 300 µl 1,2 M NaCl auf dem Schüttler gelöst. Dann wurden 750 µl Ethanol 100% zugegeben, der Ansatz kräftig geschüttelt und bei 10 min bei 16.000 g zentrifugiert. Der Überstand wurde abgesaugt, das Pellet nun in 1 ml 70%igem Ethanol gewaschen, 5 min bei 16.000 g zentrifugiert und der Überstand erneut verworfen.

Das DNS-Pellet wurde nun unter Vakuum im Eppendorf Konzentrador 5301 getrocknet und in 30 µl H₂O aufgenommen.

2.2.4 Maxipräparationen

Zur Maxipräparation von Plasmid-DNS wurde der Nucleobond AX Kit von Macherey und Nagel verwendet und nach den Angaben des Herstellers verfahren.

2.2.5 Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren

2 µl einer DNS-Präparation wurden in 400 µl TE verdünnt und im Photometer bei 260 nm/280 nm gegen eine nur mit TE gefüllte Referenzküvette gemessen. Der Quotient der Absorption bei 260 und 280 nm gibt die Reinheit der Probe wieder und muß zwischen 1,6 und 2,0 liegen. Die Konzentration der Präparation wird berechnet nach:

1 OD bei 260 nm entspricht 50 µg/ml DNS

40 µg/ml RNS

30 µg/ml Oligonukleotid

Konzentration (µg/ml) = A_{260nm} x D (Verdünnungsfaktor) x X µg/ml

D = 200

2.2.6 Restriktionsverdau von Nukleinsäuren

Bei den Reaktionsbedingungen wurde den Angaben des Herstellers des jeweiligen Enzyms gefolgt.

2.2.7 Dephosphorylierung von DNS-Enden

Ein 50 µl Verdauansatz wurde mit 1/10 Vol 3 M NaAc (5 µl) und 2 Vol 100% Ethanol (100 µl) gefällt und die DNS bei 10 min 16.000 g pelletiert. Das Pellet wurde nun in 1 Vol 70% Ethanol gewaschen und dann erneut 5% bei 16.000 g zentrifugiert. Nach absaugen des Überstandes und Trocknung wurde das Pellet in 45 µl H₂O aufgenommen, 5 µl AP-Puffer und 1µl Alkalischer Phosphatase (Roche) addiert und der Ansatz 1 Std. bei 37°C inkubiert. Anschließend wurden 2 µl EGTA 0,5 M hinzupipettiert und 20 min auf 65°C erhitzt, um die Alkalische Phosphatase zu inaktivieren. Nun wurde die DNS über eine Säule (Nucleospin Kit von Macherey und Nagel) aufgereinigt.

2.2.8 Auftrennung und Isolierung von DNS-Fragmenten

DNS-Fragmente wurden in 1 – 2%igen Agarosegelen bei 15 mV/cm in 1x Auftragspuffer und 1 x TAE als Laufpuffer aufgetrennt und anschließend in Ethidiumbromid in 1 x TAE gefärbt. Die gewünschten Banden wurden unter UV-Licht ausgeschnitten. Die Isolierung einzelner Fragmente aus Gelen erfolgte mittels des Nucleospin Kits der Firma Macherey und Nagel nach den Angaben des Herstellers.

2.2.9 Ligation von DNS Fragmenten in Plasmide

Ligationen wurden entweder mittels T4-Ligase (Roche) durchgeführt oder mit dem LigaFast System (Promega). Im ersteren Fall wurden Insert und Plasmid im Verhältnis 4:1 in 1 x Ligationpuffer mit 1/10 Vol T4-Ligase über Nacht bei 16°C inkubiert.

Bei Benutzung des LigaFast Systems wurden Insert und Plasmid im Verhältnis 3:1 eingesetzt und gemäß den Angaben des Herstellers bei Vorliegen von Überhängen 5 min und bei glatten Enden 15 min inkubiert. Anschließend erfolgte jeweils die Transformation.

2.2.10 Polymerase Kettenreaktion (PCR)

PCR wurde mit Taq-Platinum DNS-Polymerase (Invitrogene) oder Pfu Polymerase (Stratagene) ausgeführt nach folgendem Protokoll:

5 µl 10x Polymerase Puffer

1 µl dNTP-Mix je 10 µM

1 µl linearisiertes „*Template*“ (etwa 100 µg)

je 1 µl Vor- und Rück-Primer (je 10 µM)

1,5 µl 50 mM MgCl₂

2,5 U Polymerase

39 µl H₂O

Die PCR wurde ausgeführt in einem T-Gradientencycler von Biometra nach folgendem Schema:

- 1.) 94°C 2 min (Antikörper gibt Polymerase frei)
- 2.) 94°C 30 sec (1. Zyklusschritt-Denaturierung des Doppelstranges)
- 3.) X°C 30 sec (X= Annealing-Temperatur der Oligonukleotide)
- 4.) 72°C 1 min/1000 Basenpaaren des „*Templates*“ (Extension) –zurück zu Schritt 2
- 5.) 72°C 5 min (Auffüllen)
- 6.) 4°C

2.2.11 RNS-Isolierung

Für die Isolierung von Gesamt-RNS aus Zelllinien und aus Maus-Testis-Gewebe wurde der *QuickPrepTM Micro mRNA Purification Kit* von Amersham Pharmacia Biotech, der alle benutzten Reagentien enthält, verwendet.

Für die Extraktion aus Maus-Testis-Gewebe wurde 0,1 g Gewebe mit 0,4 ml Extraktionspuffer gemischt und mit einem Homogenisator für 1,5 ml-Röhrchen (Eppendorf) bis zum Entstehen einer einheitlichen Suspension homogenisiert. Anschließend wurde unter Zugabe von 0,8 ml Elutionspuffer gemischt und das Homogenat in ein steriles Tube überführt.

Für die Extraktion aus Zelllinien wurden die adhärenen Zellen nach Entfernen des Zellmediums mit einem Gummischaber von der Platte gelöst, in PBS

aufgenommen und in ein steriles Röhrchen überführt. Anschließend wurde kurz mit einer Tischzentrifuge pelletiert und der Überstand vorsichtig abgesaugt. Dem Pellet wurden 0,4 ml Extraktionspuffer zugegeben und das Röhrchen in einem Vortex-Mixer geschüttelt („gevortext“) bis eine homogene Suspension entstand. Nach Zugabe von 0,8 ml Elutionspuffer wurde erneut gevortext.

Insgesamt 1 ml der jeweiligen Suspensionen wurde schließlich in vorbereitete Oligo(dT)-Zellulose-haltige Röhrchen überführt und weiter nach den Angaben des Herstellers verarbeitet. Die Isolierung der RNS erfolgte unter RNase-freien Bedingungen.

2.2.12 RNase Schutzexperiment

2.2.12.1 Einführung und Prinzip der Methode

Das RNase-Schutzexperiment ist eine sensitive Methode zur Detektion und Quantifizierung von RNS-Spezies, vor allem wenn die gesuchte RNS in niedriger Kopienzahl vorliegt. Darüber hinaus kann man mit dieser Methode Intron-Exon-Grenzen sowie 5' und 3'-Enden kartieren. Dazu braucht man eine radioaktiv markierte RNS-Sonde, die komplementär zu Teilen der gesuchten RNS ist. Diese erhält man durch positionieren des 3'-Endes einer ausgewählten genomischen DNS-Sonde, die einen Abschnitt der bekannten cDNS enthält, in die Nachbarschaft eines Phagen-Polymerase-Promotors (T3, T7, Sp6) eines geeigneten Vektors. Die jeweilige Polymerase wird dann benutzt um den Gegenstrang (*Antisense*-RNS) durch *in vitro* Transkription zu generieren. Die markierte Sonde wird dann mit der Ziel-RNS inkubiert. Dabei hybridisieren komplementäre RNS-Moleküle miteinander. Durch Zusetzen von RNase, einem Enzym, das nur einzelsträngige RNS verdaut, werden unhybridisierte RNS-Moleküle verdaut. Die markierte Sonde, die mit der Ziel-RNS hybridisiert bleibt geschützt (Protektion) und kann nun auf einem Polyacrylamid-Gel durch Autoradiographie sichtbar gemacht werden. Durch Größenvergleich der markierten Sonde vor und nach RNase-Verdau kann man nun z.B. 5'-Enden kartieren.

2.2.12.2 Durchführung

Für das RNase-Schutzexperiment wurde der RPA III Kit von Ambion verwendet und nach folgendem Protokoll durchgeführt:

1. Die Plasmid-DNS wurde zunächst am 5'-Ende der cDNS linearisiert. Dabei sind nur solche Restriktionsenzyme zu verwenden, die einen 5'-Überhang oder ein glattes Ende produzieren.
2. Im nächsten Schritt erfolgte die Phenolisierung. Dabei wurden 100 µl DNS-Mix mit 200 µl TE und 1 Vol Phenol-Chloroform-Isoamylalkohol (PCI) gemischt und 5 min bei 13.000 g zentrifugiert. Der wässrige Überstand wurde in ein neues Tube überführt, erneut 1 Vol PCI zugegeben und erneut 5 min. bei 13.000 g zentrifugiert. Wiederum wurde der wässrige Überstand in ein neues Tube überführt und anschließend nach Zusatz von Chloroform-Isoamylalkohol 5 min. bei 13.000 g zentrifugiert und der Überstand in ein sauberes Tube überführt.
3. Für die anschließende Alkoholpräzipitation wurde dem wässrigen Überstand aus der Phenolisierung mit 1/10 Vol 3 M NaAc (pH 5,2) und 2 Vol reinem Ethanol gemischt und die ausgefallene DNS 15 min. bei 10.000 g pelletiert und der Überstand dekantiert. Das Pellet wurde mit 1 Vol 70% Ethanol gewaschen und kurz bei 13.000 g zentrifugiert und der Überstand vorsichtig abgesogen. Nun wurde dem Pellet 1 Vol reines Ethanol zugegeben und erneut kurz bei 13.000 g zentrifugiert und der Überstand vorsichtig abgesogen. Das Pellet wurde nun in 20 – 50 µl TE aufgenommen.
4. Transkription der RNS-Proben:
1 µl der gereinigten DNS (1µg/µl) wurde mit 7 µl RNase-freiem Wasser, 1 µl 10 mM ATP, 1 µl 10 mM CTP, 1 µl 10 mM GTP, 2 µl 10 x Transkriptionspuffer (Ambion Kit), 5 µl [$\alpha^{32}\text{P}$] UTP (12,5 µM) und 2 µl T3-, T7- oder Sp6-RNS-Polymerase (Ambion Kit) gemischt und nach kurzem zentrifugieren 1 h bei 37°C inkubiert. Zum Entfernen der DNS wurde 1 µl RNase-freie DNase I (2U/µl) zugegeben und nach kurzem Zentrifugieren 15 min bei 37°C inkubiert.
5. Gel-Aufreinigung:
Nach Zugabe von 22 µl Auftragspuffer (Ambion Kit) wurde 3 – 5 min. bei 85 – 95°C erhitzt und die Probe sofort auf Eis gekühlt. Die Probe wurde

schließlich bei 250 V auf einem 5 % Polyacrylamid 8 M Harnstoff Gel aufgetrennt bis die Lauffront aus dem Gel austrat. Das Gel wurde dann 10 – 15 min autoradiographiert (Kodak BioMax MR), dabei die genaue Position des Films auf dem Gel markiert und die entsprechenden Banden mit der gereinigten RNS mit Hilfe des Film aus dem Gel ausgeschnitten. Die ausgeschnittene Bande wurde in 200 – 350 µl vorgewärmten Elutionspuffer (Ambion Kit) aufgenommen, gevortext und über Nacht bei 37°C unter Schütteln inkubiert. Anschließend wurde die Radioaktivität von 1 µl im Beckman LS *Counter* gemessen (Cerenkov *counts*).

6. RNase-Schutz:

Die radioaktiv markierte RNS-Sonde (2×10^4 cpm) wurde mit 50 µg Ziel-RNS (aus Maus-Testis und P19-Zellen) und 50 µg Hefe-RNS versetzt. Anschließend wurde NH_4OAc (Ambion Kit) bis 5 M zutitriert und mit 2,5 Vol Ethanol 100% gemischt. Nun wurde nach 15 min Inkubation bei -20°C und 15 min bei 4°C mit 13.000 g zentrifugiert und der Überstand vorsichtig abgesaugt. Dann wurde 10 µl, auf 95°C vorgewärmter, HybSpeed-Hybridisierungspuffer (Ambion Kit) zugegeben und sofort 20 s gevortext, kurz bei 95°C denaturiert, erneut gevortext und anschließend 3 min wiederum bei 95°C denaturiert. Dann erfolgte nach schnellem Transfer in ein Heiz-Schüttelblock eine Inkubation für 10 min bei 68°C zum *annealen*. Nun wurden 100 µl des vorbereiteten RNase A/T1-Mix (RNase A/T1-Verdauungspuffer 1:100, beides aus Ambion Kit) zugegeben, gevortext, 15 min bei 37°C inkubiert, gevortext, 5 min bei 37°C inkubiert und erneut gevortext. Daraufhin erfolgte der Zusatz von 150 µl HybSpeed Inaktivierungs/Präzipitierungs-Mix (Ambion Kit) und nach kurzem vortexen 15 min bei -20°C inkubiert, dann 15 min bei 4°C mit 13.000 g zentrifugiert und der Überstand gründlich aber vorsichtig abpipettiert. Das Pellet wurde nun in 8 µl Auftragspuffer II (Ambion Kit) aufgenommen und mindestens 60 s gevortext, 5 min bei 95°C inkubiert, erneut gevortext und auf Eis gelagert. Anschließend wurden die Proben in ein 0,75 mm dickes und 12 x 15 cm großes 5% Polyacrylamid 8 M Harnstoff Gel aufgetragen und 1 h mit 250 V aufgetrennt. Das Gel wurde dann auf ein Abklatschblatt (Schleicher und Schuell) gelegt, die entsprechenden Taschen markiert, mit Frischhaltefolie abgedeckt, auf einem Gel-Trockner bei 80°C getrocknet und schließlich

autoradiographiert (Kodak BioMax MR) und anhand der Größenmarker ausgewertet.

2.2.13 5'-RACE

2.2.13.1 Einführung und Prinzip der Methode

5'-RACE steht für *Rapid Amplification of cDNA-Ends* und stellt eine PCR basierte Methode zur Klonierung von Volllänge-cDNS dar, wenn nur eine partielle cDNS bekannt ist. Voraussetzung dieser Methode ist das Vorhandensein einer qualitativ hochwertigen RNS, aus der durch eine reverse Transkription cDNS hergestellt wird. Eine so erhaltene spezielle cDNS, enthalten im *FirstChoiceTM RLM-RACE-Ready cDNA* Kit von Ambion, wurde als Matrize für den 5'-RACE verwendet. Diese Bank zeichnet sich durch eine spezielle Adapterligation aus, daher RLM-5'-RACE. RLM-5'-RACE steht für *RNA-Ligase-Mediated-5'-RACE*. Dieses Prinzip ist in Abbildung 2.1 dargestellt. Komplette mRNS zeichnet sich durch eine CAP-Struktur am 5'-Ende aus. Degradierete RNS, rRNS und tRNS besitzen ein 5'-Phosphat an dieser Stelle. In einem ersten Schritt erfolgt die Abspaltung dieses 5'-Phosphates mittels einer Alkalischen Phosphatase. Nach Abspaltung der CAP-Struktur der kompletten RNS, bleibt an dieser Stelle ein 5'-Phosphat übrig, so daß nun lediglich komplette mRNS ein 5'-Phosphat besitzt. Im nächsten Schritt erfolgt nun die Ligation eines Adapters mit einer bekannten Sequenz an die mRNS. Diese Ligation benötigt ein 5'-Phosphat, so daß durch eine anschließende reverse Transkription eine hochwertige cDNS entsteht. Diese kann für die genspezifische Amplifikation von 5'-Enden verwendet werden.

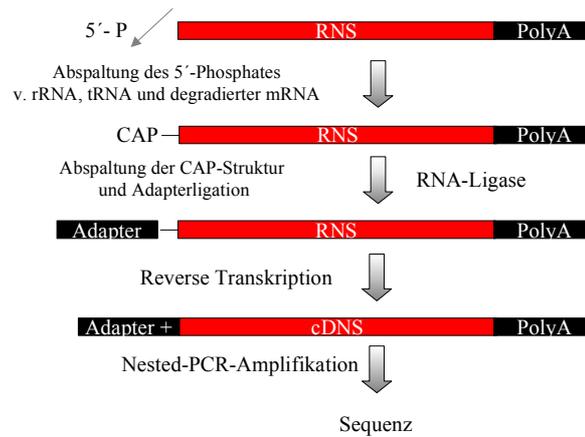


Abbildung 2.1: Schematische Darstellung des Prinzips der adapterligierten cDNS-Bank von Ambion.

2.2.13.2 Durchführung

Im ersten Schritt wurde eine PCR-Reaktion nach folgendem Schema durchgeführt. Die Reagentien und Primer, sofern nicht anders bezeichnet waren im Kit von Ambion enthalten.

PCR 1: 1 µl RACE-Ready cDNS

5 µl 10 x PCR Puffer

4 µl dNTP Mix (2,5 µM von jedem dNTP)

2 µl des genspezifischen Primers

2 µl 5'RACE Outer Primer

36 µl RNase-freies Wasser

1,25 U Taq-Polymerase

Zyklen wie folgt:

1. 94°C 3 min
2. 94°C 30 sec
3. 60°C 30 sec
4. 72°C 30 sec, zurück zu Schritt 2 (35 Zyklen)
5. 72°C 5 min
6. 4°C

PCR 2: 2 μ l von PCR 1
5 μ l 10 x PCR Puffer
4 μ l dNTP Mix (2,5 μ M von jedem dNTP)
2 μ l des genspezifischen inneren Primers
2 μ l 5'RACE Inner Primer
35 μ l RNase-freies Wasser
1,25 U Taq-Polymerase

Zyklen wie bei PCR 1.

Anschließend erfolgte die Klonierung der PCR-Produkte in den Vektor pGemTeasy (Promega) zur weiteren Sequenzierung.

2.2.14 Northern Blot

Für den Northern Blot wurden etwa gleiche Mengen der jeweiligen RNS-Suspension zunächst mit 15 μ l MOPS-Mix gemischt, 15 min im Wasserbad bei 65°C inkubiert und anschließend 5 min auf Eis abgekühlt. Nach Zugabe von 4 μ l eines Auftragspuffers wurde die RNS über ein Agarose-MOPS-Gel (Zusammensetzung: 73 ml H₂O, 10 ml 10 x MOPS, 1 g Agarose, 17 ml Formaldehyd) aufgetrennt. Als Laufpuffer wurde 1 x MOPS verwendet. Das Gel wurde nach dem Gellauf zweimalig für 15 min in 20 x SSC gewaschen. Parallel wurde der Blotaufbau vorbereitet. Als Blotmembran wurden Nylon-Filter der Firma Macherey und Nagel verwendet. Das Gel wurde direkt unter der Membran zwischen je 3 Abklatschblättern auf einer Glasplatte positioniert. Als Diffusionslösung diente 20 x SSC in Kontakt mit den Abklatschblättern in einem Glasbehälter unter der Glasplatte. Geblottet wurde über Nacht. Anschließend wurde der Blotaufbau vorsichtig abgebaut, die Membran zwischen 2 Abklatschblättern kurz getrocknet und bei 80°C 1 h weiter getrocknet. Im nächsten Schritt wurde die Membran mit Methyleneblau gefärbt. Hierzu wurde die Membran 5 min in 5% Essigsäure gewaschen und 10 min in 0,04 % Methyleneblau gefärbt. Anschließend wurde die Membran mehrfach mit H₂O gewässert. Die gefärbte Membran wurde fotografiert und anhand der nun sichtbaren 28-S-RNS und 18-S-RNS-Banden die Qualität überprüft.

Für die Herstellung der DNS-Sonde wurde der *Megaprime Labeling Kit* von Amersham Biosciences verwendet. 25 μ g DNS wurden mit 5 μ l randomisierter

Primer-Mischung auf 26 µl Gesamtmenge mit H₂O aufgefüllt, der Deckel des Röhrchens durchstoßen und 5 min bei 95 °C gekocht. Nach kurzem Runterzentrifugieren wurde 5 µl Reaktionspuffer, je 4 µl dGTP, dTTP, und dCTP, 5 µl [α^{32} P] dATP (3.000 Ci/mM) und 2 µl Klenow-Polymerase zugegeben, 10 min bei 37°C inkubiert und die gesamte Probe nach Zugabe von 50 µl TE auf eine Sephadex G50-Säule (Roche) gegeben. Die Sephadex G50-Säule wurde 5 min zentrifugiert und die durchgelaufene Probe in ein sauberes Tube überführt. Anschließend wurde die Radioaktivität von 1 µl im Beckman Counter gemessen (Cerenkov counts).

Für die anschließende Hybridisierung wurde die radioaktiv markierte Probe 5 min bei 95°C gekocht und 10 min auf Eis abgekühlt. Eingesetzt wurden insgesamt 500.000 cpm. Die Probe wurde nun mit DNS aus Heringssperma auf 500 µl aufgefüllt, erneut bei 95°C gekocht und nach Zugabe von 10 ml ExpressHybMix (Clontech) zusammen mit der Membran in ein Hybridisierungsröhrchen gegeben. Hybridisiert wurde über Nacht bei 65°C in einem Drehofen.

Anschließend wurde die Membran mehrfach bei 65°C in 2 x SSC, 0,1 % SDS und H₂O gewaschen, bis der Waschpuffer keine Radioaktivität mehr besaß. Die Membran wurde dann in Folie eingepackt und autoradiographiert (Kodak BioMax MR).

2.3 Zellkulturtechniken

2.3.1 Verwendete Zelllinien

Alle Zelllinien wurden wenn nicht anders aufgeführt in DMEM mit 10% FCS (Linaris) oder 10 % NCS (Biospa) und 100 IU/ml Penicillin (Gibco), 100 µg/ml Streptomycin (Gibco) bei 37°C und 5% CO₂ gehalten und alle 2-3 Tage passagiert. Folgende Zelllinien wurden verwendet:

CV-1 (ATCC CCL-70)

CV-1 ist eine aus Nieren vom grünen afrikanischen Affen gewonnene Zelllinie.

P19 (ATCC CRL-1825)

Die P19 Zelllinie ist eine Teratokarzinomazelllinie der Maus.

NIH-3T3 (ATCC CRL-1658)

NIH-3T3 Zellen sind eine Mäusefibroblastenzelllinie gewonnen aus NIH Mäuseembryos.

NT2/D1 (ATCC HTB-106)

Die humane NT2/D1 Zelllinie ist wie die murine P19-Zelllinie eine Teratokarzinomazelllinie. Diese Zellen wurden in Opti-MEM mit 10 % FCS (Linaris) und 100 IU/ml Penicillin (Gibco), 100 µg/ml Streptomycin (Gibco) bei 37 °C und 5 % CO₂ gehalten und alle 2-3 Tage passagiert.

PC-12 (ATCC CRL-1721)

Die PC-12-Zelllinie ist eine adrenerge Phäochromozytomzelllinie der Ratte und wurde in RPMI mit 15 % hitzeinaktiviertem Pferdeserum (Gibco), 5 % FCS (Linaris) und 100 IU/ml Penicillin (Gibco), 100 µg/ml Streptomycin (Gibco) bei 37 °C und 5 % CO₂ gehalten und alle 2-3 Tage passagiert. PC-12-Zellen wurden zur Induktion mit 1×10^{-6} M NGF (*Neural Growth Factor*) behandelt.

Neuro 2A (ATCC CCL-131)

Die Neuro 2A Zellen sind murine Neuroblastomazellen.

SH-Sy5y (ATCC CRL-2266)

SH-Sy5y ist eine humane Neuroblastomazelllinie.

PFSK (ATCC CRL-2060)

PFSK Zellen sind humane Tumorzellen eines primitiv, neuro-ektodermalen Tumors (PNET).

HT 22

HT-22 ist eine murine hippokampale Zelllinie.

NG 108 (ATCC HB-12317)

NG 108 ist eine murine Neuroblastomazelllinie.

SK-N-SH (ATCC HTB-11)

Diese humane Neuroblastomazelllinie ist aus Knochenmetastasen hervorgegangen.

BON (ATCC CRL-1251)

BON ist eine humane Zelllinie, die aus einem metastasiertem Karzinoid des Pankreas hervorgegangen ist.

C6 (ATCC CCL-107)

C6-Zellen sind aus einem durch N-Nitrosemethylnstoff induzierten Gliazelltumor der Ratte hervorgegangen.

T-47D (ATCC HTB-133)

Die humane T-47D-Zelllinie, die aus dem Pleuraerguß einer 54-jährigen Patientin mit invasivem, duktalem Mammakarzinom isoliert wurde, wurde unter den gleichen Bedingungen wie die PC-12 Zellen gezüchtet.

HeLa (ATCC CCL-2)

Bei dieser Zelllinie, die die erste humane Zelllinie darstellt, handelt es sich um epitheliale Zervixkarzinomzellen einer 31-jährigen Patientin.

HT-29 (ATCC HTB-38)

HT 29 ist eine humane Adenokarzinomzelllinie, hervorgegangen aus einem Grad II-Kolonkarzinom.

MCF 7 (ATCC HTB-22)

Die humane MCF 7-Zelllinie wurde aus dem Pleuraerguß einer Patientin mit einem Adenokarzinom der Mamma isoliert.

JEG3 (ATCC HTB-36)

JEG3 ist eine humane Zelllinie, hervorgegangen aus einem Trophoblasttumor der Plazenta.

2.3.2 Transfektion von Säugetierzellen durch Lipofektion

2.3.2.1 Einführung und Prinzip der Methode

Unter Transfektion versteht man den generellen Prozeß DNS in eukaryontische Zellen zu schleusen. Diese Methode ist essentiell für Analysen der Genfunktion und Genregulation. Zur Verfügung stehen verschiedene Methoden, wie z.B. die Kalzium-Phosphat-Kopräzipitation, die Elektroporation sowie die Nutzung von viralen Vektoren. Neben diesen Methoden gibt es die Lipofektions-Methode, bei der kationische Liposomen die Transfektion vermitteln. Dabei bilden die Liposomen Komplexe mit der DNS und schleusen unter Verschmelzung mit der Zellmembran die DNS in die Zelle. Diese Methode wurde zur Transfektion der Zellen verwendet.

2.3.2.2 Durchführung

Für die Transfektion von Säugetierzellen durch Lipofektion wurde Fugene-6 von der Firma Roche verwendet. Den Angaben des Herstellers folgend wurde stets 2 µl Fugene-6 pro 1 µg transfizierte DNS-Menge verwendet. Ein Vormix aus Fugene-6 und serumfreien DMEM wurde für 5 Minuten präinkubiert und dann langsam in ein Polystyrol-Röhrchen mit der DNS aufgeträufelt. Dieser Ansatz wurde 30 Minuten inkubiert bevor er auf die Zellen gegeben wurde.

Für Reporter-Gen-Assays wurden 6-Loch-Platten verwendet. Pro Loch (3,5 cm Durchmesser) wurden insgesamt 2 µg DNS eingesetzt, 1 µg Reporterplasmid und 1 µg β-Galaktosidaseexpressionsplasmid unter der Kontrolle eines konstitutiv aktiven ras-Promotors (79). Dieses diente der internen Kontrolle der Transfektionseffizienz und der Normierung. Im Falle der Kotransfektionen mit weiteren Expressionsvektoren wurden 0,5 µg Expressionsplasmid und 0,5 µg β-Galaktosidaseexpressionsplasmid eingesetzt. Für die Kontrollen wurde in diesem Fall das leere Expressionsplasmid pCMX in entsprechender Menge transfiziert und damit die DNS-Menge konstant gehalten. Wurde der Effekt von Retinsäurederivaten auf die Promotoraktivität untersucht, erfolgte der Zusatz von 2×10^{-7} M µl all-trans-Retinsäure oder 1×10^{-7} µl 9-cis-Retinsäure zu den Zellen. Nach 24 bis 48 Stunden wurden die Zellen der Luziferase-Messung zugeführt.

2.3.3 Luziferase-Messung

Die Aktivität eines Promotors kann man messen indem man in ein Reporterplasmid vor ein Gen, welches Luziferase kodiert, den zu untersuchenden Promotor, in diesem Fall die GCNF-Promotorkonstrukte, kloniert. Als Reporterplasmid wurde pGI-3-basic (Promega) verwendet. Der Vektor wurde für alle Ligationsschritte mit den zu untersuchenden Deletionskonstrukten mit *Bgl* II linearisiert und glatte Enden erzeugt. Luciferase ist ein Enzym, welches ATP-abhängig sein Substrat Luziferin umsetzt, wobei Licht abgegeben wird. Nach Transfektion des Luciferase Plasmids kann am Luminometer die enzymatische Aktivität der Luciferase bestimmt werden und damit die Aktivität des untersuchten Promotorkonstrukts. Für die Luziferase-Assays wurde der *Luciferase reporter gene assay, high sensitivity* von Roche verwendet. 15 - 48 Std. nach Transfektion wurden die Zellen zweimal mit kaltem PBS gewaschen und anschließend in 150 µl Lysispuffer für 15 Minuten lysiert. Nun wurde das Lysat in ein Eppendorf-Tube überführt. Partikuläre Zellreste wurden bei 16.000 g für 3 min bei Raumtemperatur pelletiert und der Überstand anschließend in zwei weiße 96-Loch-Platten jeweils 50 µl Zellextrakt pro Loch pipettiert. Einer der beiden Ansätze wurde für die β-Gal-Messung verwendet (s. 2.3.4). Zu den anderen Proben wurde im Luminometer (EG&G Berthold Microlumat LB96 P) automatisch in jedes Loch 100 µl Reagenz (Luziferin, ATP und MgCl₂) injiziert und sofort für 15 Sekunden die Lichtemission gemessen und über die Zeit integriert. Jedes Experiment wurde im Triplikate ausgeführt und mehrfach an getrennten Tagen wiederholt.

2.3.4 β-Galaktosidase (β-Gal) Messung

Die β-Gal-Bestimmung erfolgte parallel zu jedem Luziferase-Test und diente als Kontrolle der Transfektionseffizienz und der Zellzahl. Auf ihre Aktivität wurde normiert. Für die β-Gal-Messungen wurde der *β-Gal reporter gene assay, chemiluminescence* Kit der Firma Roche verwendet. Zu den Proben (s. 2.3.3) wurden 100 µl Substrat nach den Angaben des Herstellers injiziert und anschließend eine Stunde inkubiert. Nach Injektion von 50 µl Initiationsreagenz, erfolgte die Messung exakt wie in 2.3.3 beschrieben.

3. Ergebnisse

3.1 Die genomische 5'-Region des murinen GCNF

Die embryonale neuronale Expression und die Transkription in den Keimzellen sprechen für eine interessante Regulation des Waisenrezeptors GCNF. Ein Modellsystem für die Expression während der embryonalen Differenzierung sind die Teratokarzinomzelllinien NT2/D1 und P19, in denen die GCNF-Expression durch Retinsäure reguliert wird (72, 73).

Um die Regulation des murinen GCNF-Gens zu untersuchen, sollte zunächst die 5'-Region auf genomischer Ebene jenseits der bis dahin längsten bekannten cDNS isoliert und sequenziert werden. Dies ist die Voraussetzung um den Promotor zu identifizieren und zu charakterisieren. Die längste zum Zeitpunkt des Arbeitsbeginns isolierte cDNS besitzt eine GC-reiche 244 Basen lange 5'-untranslatierte Region (Genbank #U09563) (51). Bereits im Vorfeld dieser Arbeit erfolgte durch unsere Arbeitsgruppe die Isolierung erster genomischer Fragmente aus der 5'-Region des mGCNF-Gens. Hierzu wurde eine *nested*-PCR-Reaktion mit den Primern XR5-113R und XR5-R75b aus dem Bereich der bekannten cDNS-Sequenz (Abbildung 3.1) auf einer Adapter-ligierten genomischen Maus-Bank (GenomeWalker™ Kits, Clontech) gegen die Bankprimer durchgeführt. Das so erhaltene 1572 bp große Fragment, im Folgenden XR5-1572 genannt, wurde in den Vektor pBluescript II SK (pSK, Stratagene) *blunt-end* kloniert und sequenziert. Dieser Klon (pSK-XR5-1572) enthält eine interne *EcoRI*-Schnittstelle die mit dem 5'-Ende der cDNS übereinstimmt und eine einzige *Bam*HI-Schnittstelle die für die folgenden Klonierungen wichtig war. Um einen größeren Bereich der 5'-Region für die weitere Promotoranalyse zu erhalten wurde die Firma GenomeSystems beauftragt mit Hilfe der Primer XR5-screen-for und XR5-screen-rev die außerhalb der GC-reichen Region liegen (Abbildung. 3.1) einen Klon aus einer BAC-(*Bacterial Artificial Chromosome*) Bank (Maus ES-129/SvJ) zu isolieren. Es wurde ein etwa 200 kb großer BAC-Klon im Vektor pBeloBAC 11 isoliert, auf dem nun der gesuchte 5'-Bereich liegen mußte. Dieser Klon wurde nach einem *Bam*HI-Verdau im Southern Blot überprüft. Die *Bam*HI Fragmente wurden in den pSK-Vektor kloniert.

Durch das Ansequenzieren dieser Klone und die im 5'-Bereich gelegene *Bam*HI-Schnittstelle war es mir nun möglich ein, das bekannte 5'-Ende inklusive des

ersten translatierten Exons beinhaltendes, Fragment, welches bis zur Position -972, bezogen auf den Translationsstartpunkt, reicht zu identifizieren.

Dieses Fragment wurde mit den Restriktionsenzymen *Bam*HI und *Eco*RI verdaut und das so erhaltene 734 bp große Fragment, im Folgenden XR5-734 genannt, den pSK Vektor kloniert (pSK-XR5-734). Ein 3177 bp großes, 5' gelegenes und an XR5-734 direkt anschließendes Fragment, im Folgenden XR5-3177 genannt wurde mit Hilfe der im Vektor pSK vorhandenen T3 und T7 *Primersites* sowie internen Primern (-247-for, -550-rev, -966-for, -1032-rev, -1141-for, -2206-rev, -2586-for, -2740-for, -3084-rev, -3722-for) sequenziert. Hierbei erfolgten die Sequenzierungen immer in beide Richtungen. Die so gewonnenen überlappenden Einzelsequenzen wurden schließlich mit Hilfe einer Software zur Sequenzverarbeitung (Lasergene Module, DNA Star inc.) zu einer Sequenz zusammengeführt. Abbildung 3.1 zeigt die Sequenz und schematisch den sequenzierten Bereich der 5'-Region des murinen GCNF auf genomischer Ebene.

A)

-4142 **GGATC**CAGGA GCTTGTGTT CACGAAACT CCTAGGGACT CTTGAGTTGG AGAACCACTG
BamHI

-4082 GCCTAGCCAG AGATGACTGT ATTAACCTCT AGCTGACTTC AGTTAAAAAG TCATGTGTGC
-4022 TGTCAGTGTT TGTATAAAAT GAGTTTTTCT TTTTTTTTCT TTTTTTAAAG ATTTATCTAT
-3962 TTTATATATG TGACTACACT GTAGCTGTCC TCACACACAC CAGAAGAGGG CATPCAGATCC
-3902 CATTACAGAT GGTGTGTGAGC CACCATGTGG TTGCTGGGAA TTGAACTCAG GACCTCTGGA
-3842 AGAACAGCCA GTGCTCTTAA CTGCCGAGTC TTCTCTCTCT CTCCTCTCTCT CTCTCTCTCT
-3782 CTCCTCTCTCT CTCCTCTCTCT CTCCTTTTCT CTGAGACAGG GTTTCTCTGT GTAACAAATCC
-3722 TCGTTCCTGG CTGTTCTGGA ACTCATTCTA TAGACCAGGC TAGGCTCTAA TCTCACCCGAG
-3662 ATCCACCTGC CTCTGCCTCC TGACTGCTGA GATTGAAGGT GTGTGTCTAT ATGCACTGTT
-3602 TATAAGCAAG TTTCTGGAGT TCCTGCAGA GAAGTCAAGG CTTAGTATAA AACTAATTA
-3542 TTGGGCATGT TCTTCTGTAC ACAGACCAAG TCTGAAAGGA CACACAAGAC ACCAGCATCT
-3482 TACAGGCAAG AATTGAAGAA GAGCTTCATT AGCTACTTTC CTTTCCCTTTT TCATTTTTTTT
-3422 TTTTAAATTA TAGGTTTTGT AACATGCTTC CAATCTTTTC AAAATATAGA CAAAGTGTAC
-3362 TTAACAACAA TTCAACAAGG AACTCTCTTT CTTAGTCTTC TCATGGATGC AGGCAGCCTG
-3302 GCTGACTCTT TAAGGCAGGC CCTGCTAGAT AGAGCAAGGC AGAGACCACG GGTGGAGCTC
-3242 TGTGCCCTCT GGACAACATA TGGTGTCTC CGACAACATC CTATCACCAT GAATAACCCA
-3182 CAGCTCAAAT GAACCAAGTC CCTAAGGCCT TAGGACCTTG GTTTGTGTGG TTACTTCCAC
-3122 AGCTTCTCA CCTTAGCTGG CTAACCTATG CTAGACCACC CCACCTTTGGG TGTCTTCTAT
-3062 CTCAAAAATC CCATCACCCCT GCCCCCACCC CACTCCAACC CCAGCCCATC TGGCATACCT
-3002 AACAGTTCCT AACTATAGCA CTCATGCAAT TACTTGATTT ATGTCTACAT CATTCACTGA
-2942 AGGTAAGGA CTCCATGATG AGGCCATAC TTGACTTGTG TTTAACGTCT GCCTTAGACC
-2882 TCAGGACCTC AGGATGAGTC TCCTTCAGAC TAATCCTCAT CCTTAGATAT ATTCCCTTCG
-2822 ATATATTCTT TTCCATTCTT TCTGTCTTCC CTGTAATATC TGAGAGCCCT TTAATCCGTG
-2762 CTTAGTAAAC CTGTCTCTAC AACTGTAAAC TCAGAGCAGA GGGCACTTCT CAGGGTGTGT
-2702 AGAAAAATGT CAAGAAATTA GAAAAAATA AAAAAAAGAC CCAGTGTGGG TGCTGGACTG
-2642 TTAGTGGATG CCTATTTAGT GTGTACCACA TGCTAATCTAG CAGCAGAGGA GATAACCCGG
-2582 AGTGAGTAAA GGGATTGGCT GGTTTTGGCA AGGAGGGAGC TCAGAGCTGA AAGGAATCAA
-2522 GAGTTATTAC CAGGAGCTGA GGATGTGGTT GAACTCTCTCT CTGAGTTGAT GTGCAATCTT
-2462 CATCCACTTT TCAAACTCA GGCACAAGAT GTCTGCAGAG CCACTTGGCT TCCAGGGAA
-2402 GAGCATTCGG GGAAGAGGAC TCTTCTGCAC CAGGAGCCTG TGATTGAGGG GAACTCTGGC
-2342 TCTGGGAAGG CTATGCGATC CTGGCAGATT TCAGAAATCA GAGCTGAAGA AGGCTTCTCT
-2282 CCCACGACA CAAAGGACTC ATCTTATAT CCAGGGGCTT GCTGCAGAAC ACTGCTCCCT
-2222 GGCCTTGGGA AAGCTCAGAA CCCTTGTCAC AGACATAACC ACTTCAAGAT CATTCTTGG
-2162 GCGTGGAAAG ATGGCTCAGT GGTAAAGAGC ACTGACTGCT CTTCTGAGG TCCTGAGTTC
-2102 AATTCCAGC AACTGCATAG TGGCTCACAA CTATCTGTAA TGGGATCTGA TGCCTCTTCT
-2042 TGGTGTGTCT GAAGACAGCT ACAGTGATA AAGTATACTC ATATACATAA AATAAATAAA
-1982 TGAATCTTTT TTAATAAAAG ATCATTTCTT ACAGTCTACT TAGATAGGGC CATCTGGGAA
-1922 TACAGAGGGA CCCAGTTGTC CCTTGATGGG AGGTATAAGG AAGGTGCTAC TGAAGAAAAG
-1862 GATCTAGAAA GATGAGTTAA AGACTTTATA GAGGCATTTT GGCCTTCTGA TCCACTGAGT
-1802 ATATAACCGA CATCAACTTT TGTGCCACTT CATTTGTATG TGAGAGCACC AATATCAGAG
-1742 CTACCTCAAT GAACAGGTGT GGGAGCTTTA AACCACACAG CATTAGTGTG AATCTCTCAT
-1682 AACAGCTGCT GGCACAGACT AAGGATGGAC CAGGCCAATT AATATTGATA ATGGAAAGTG
-1622 CAGGAAGGCT TGGCAGAGCC TTCTCAATAG CAGGTAAGGG AAGAGGCATG GGAGCAACGT
-1562 GGGCAGGAAT CGGAACAGGT TAGATTTTCT AAGCCAAAGTA AAGACTTCTA ACAAATTAAG
-1502 TAAAGAATGA CTCACAAGAG CCAGAGGATT CCAGGGGCAC ATGGGGCAGA ATGAAGTGAC
-1442 AGAATGAAAC CGCTTCGATA CGGCCATTA GAGGAAAAGC CAGCAAAGCA CCAGAGTTCT
-1382 TTGATTTTATA GTAAGCTAGA TAGCATTTAA GTTCTAGGCT GAAACTTAAT AAGTCTTTCT
-1322 CTAAGGGAGG TGTGTGTGTT GTATAGTGTG TGTGTGTGTG TGTGTGTGTG TGTGTGCGCG
-1262 GGTGTGTGTG TGTGTGTGTG TGTGTGTGTG TGAGAGAGAG AGAGAGAGAG AGAGAGAGAG
-1202 AGAGAGAGAG AGAGAGAGAG AGAGAGAGAG AGAGAGAGAG AGAACCGCGC CCGGGCATTT
-1142 CTGAAAATCA CCACCACCC TAATCCTGAG AGCCCATGG CCGCGCGCCA CTTGGTGGCA
-1082 CCGGGAGGTG GGCCTTGGAG GAGGAAGGGG AGAAAATCCA GGATTTTATT TGGTGGGAAC
-1022 TTCTGTAAC TGAGGCGATA GCGTGTATGT GAGAGTTGGT CTCTTATCAC **TGGATCCGAT**
BamHI

-962 TCTTATTACA CCTCTCATTT TTGAGACAGG TATACTGAAC AGGAGTGGGA AGGGGAACAC
-902 TCCGGGAAAG GGACATTCTT AAAACAGAAC TCTTTAAGAC ACAAGGAGTC AGGGGTCTCA
-842 AGTTTTCTTT GGTGGCATCA GTGGAAGTGA TCTTAGTTTG TCCATCTGTT CTATGGCGAG
-782 TGTGCGGGGA ATGAAAGAGG AGGAAGAGAA ACTTTAATCT TTCCCGCCA CCCGGAGGTA
-722 AAGGACTTTT AAACACTTCT GAGTTGTATA GATTTCTATT GATTTCTATT GCATACGAAC

XR5-screen-for

-662 **GCAGTCACT** CCGGTAAAC TCGGGTCTTT TAATCTCTGG TCCAATTTGT CGCTCAG**CCC**
-602 **GGGAGGAAAG** CCCTCATGAG TACCTACACA CCCC GCCCCC TGGGGCCTTC CCCCACAGGG

SmaI

-542 CTGGGCTTGG TTGCACGTGC TCACCCGGTT CCCGGTGGAT ACGCTCTCTT GAAAGGCTC
-482 ATTTATTAGT TGGGAAATA GTTGAATCA TAGAGCACTA TGATCACGAA TAAGTTACAA
-422 TAGAGAGAAA ACTCTGACAT AGCCGTTTAT TATAATTAATA TATTAGAAAT TTTATTAGAG
-362 TTTGTAATAG TGATAGGTTT GGGTCTCTCC TACTTAGGTC TTCTGTCTTT TTTTCCATCA
-302 CCCCTTATT TGGTAGAGTC CCGTGTGGGC AGCCTCGTTG GAGGAGACTAC ATTTCC**CAGA**

XR5-screen-rev

-242 **ATTCTCTCACG** GGCATGTGCG TGGCAGCGGC GCGTGACGTC AGAGGAGGGA GCTGGCCAGT
EcoRI

-182 GCTGAGGGGG CGCGGCGCGG AGGGCGCGGG AGCCGGCGGG CTCAGGGGCC CAGAGAGTGC
-122 GCGGCGCGAG AGCCTGCGGG CCCCCTGACAG CCCCCTCCCC CCGTGGAAAG CAGGACGAC

XR5-R75b **XR5-113R**

-62 GACTACGAAG GCGCAAGTCA TGGCGGAGCA GCGAAGCCCG AGAGGGCCCT GAGCACCGCC
-2 GC**ATG**
+1



Abbildung 3.1: Die genomische 5'-Region des murinen GCNF A) Die Basenabfolge. Das Startkodon ist rot markiert und das A des Startkodons mit +1 numeriert. Für die Klonierungen wichtige Restriktionsschnittstellen und Primersequenzen sind unterstrichen und hervorgehoben. B) Schematische Darstellung der Sequenz. Die roten Linien kennzeichnen die reversen, die grünen Linien die *forward* Primer, mit Hilfe derer sequenziert wurde. Der translatierte Bereich des Exons ist rot markiert. Die *Eco*-RI-Schnittstelle (RI) markiert das 5'-Ende der bis dahin längsten isolierten cDNS.

Seit dem Beginn der hier vorliegenden Arbeit wurde die genomische Sequenz der 5'-Region des mGCNF des gleichen Mäusestammes veröffentlicht und ist unter dem Genbank Eintrag #AF390897 abrufbar. Ein Sequenzvergleich der eigenen Sequenz mit der aus der Datenbank zeigte diverse Unterschiede auf. Diese Unterschiede sind in Tabelle 3.1 dargestellt. Sie könnten unter anderem auf Polymorphismen beruhen, die innerhalb des Mäusestammes 129 vorkommen können. In erster Linie handelt es sich um sogenannte *Single-Nucleotide*-Polymorphismen (SNP). Acht solcher SNP konnten detektiert werden. Darüber hinaus zeigte die Sequenz aus der Datenbank unter anderem eine 7-bp-Deletion (5'-TTTTTTC-3') und eine Verschiebung eines in beiden Sequenzen identischen 30-bp-Motifs um 72 bp weiter stromaufwärts (Tabelle 3.1). Zum gegenwärtigen Zeitpunkt kann noch nicht endgültig beurteilt werden ob es sich bei diesen Unterschieden um Polymorphismen oder um Fehler in der Sequenzanalyse handelt.

Tabelle 3.1: Unterschiede zwischen der hier erstellten Sequenz und der Sequenz aus der Datenbank (#AF390897).

| Position | Sequenzunterschiede zum Eintrag in der Datenbank* |
|-----------------|--|
| - 3990 | 7-bp-Deletion (5'-TTTTTTTC-3') |
| - 3966 | C statt T |
| - 3810 | TCTTTTT statt CTC |
| - 3286 | G statt A |
| - 1979 | T statt A |
| - 1970 | T statt A |
| - 1345 | G statt A |
| - 1270 | C statt TGTG |
| - 1253 | Insertion CGT |
| - 1003 | CG statt AGC |
| - 942 | C statt T |
| - 939 | G statt A |
| - 717 | G statt A |
| - 588 | Insertion 5'-GGTCCC GGTGGATACGCCTCCTTGAAAG-3' |
| - 515 | Deletion 5'-GTTCCC GGTGGATACGCCTCCTTGAAAGG-3' |

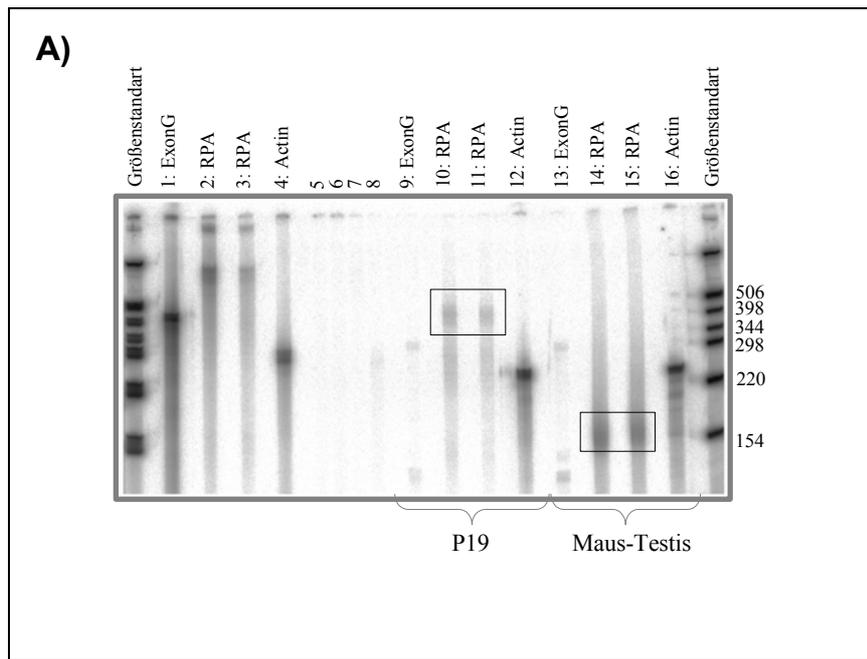
3.2 Bestimmung der Transkriptionsstartpunkte

3.2.1 RNase Schutzexperimente identifizieren einen Bereich mit mehreren Transkriptionsstartpunkten

Für die weitere Charakterisierung der genomischen 5'-Region des mGCNF sollten nun die Transkriptionsstartpunkte identifiziert werden. Als erste Methode zur Bestimmung der Transkriptionsstartpunkte wurde ein RNase Schutzexperiment durchgeführt. Dazu wurde eine zu dem 5'-Ende des mGCNF-Transkripts komplementäre genomische *antisense*-RNS-Sonde hergestellt. Hierzu wurde der Klon pSK-XR5-1572 als Matrize in einer mit den Primern RPA-for und RPA-rev (Abbildung 3.2) durchgeführten PCR eingesetzt. Das so erhaltene 601 bp große Fragment wurde in den Vektor pGemTeasy (Promega) kloniert. Als Positivkontrolle zur untersuchten RPA-Sonde dienten zum einen die im Ambion Kit enthaltene β -Actin-Sonde als ubiquitär exprimiertes Gen, wie auch eine GCNF-interne, 311 bp große, Kontrollsonde aus dem Bereich des Exon G (80, 81), im Folgenden XR-5-G genannt. Hierzu wurde in einer PCR-Reaktion mit den Primern XR5-G-for und XR5-G-rev das 311 bp große Fragment generiert und ebenfalls in pGemTeasy kloniert. Als Matrize für diese PCR-Reaktion diente eine Cosmid-1-Bank. Nachdem nun die Fragmente in den Vektor pGemTeasy kloniert waren, erfolgte nach Linearisierung des Vektors am 5'-Ende eine *in vitro* Transkription zur Generierung der radioaktiven *antisense*-RNS-Sonden (RPA-Sonde, Actin-Sonde und XR5-G). Die *antisense*-RNS-Sonden wurden dann mit, aus Maus-Testis und aus P19-Zellen isolierter, RNS hybridisiert und schließlich dem RNase-Verdau zugeführt. Beide Kontrollsonden mußten somit als Positivkontrolle nach dem RNase-Verdau mit den entsprechenden verkürzten Hybrid-Banden auftauchen. Die Reaktionsprodukte wurden über ein Polyacrylamid-Gel aufgetrennt und die Länge der geschützten Hybride anhand eines im Kit enthaltenen Größenstandarts ermittelt. Als Kontrolle des kompletten Verdau einzelsträngiger RNS wurde ein Ansatz ohne Zusatz von Testis- oder P19-RNS durchgeführt. Abbildung 3.2 zeigt das Ergebnis des beschriebenen RNase Schutzexperiments.

Im Fall von P19-RNS konnte mit der RPA-Sonde eindeutig eine breite geschützte Bande detektiert werden. Da eine etwas breitere Bande zum Vorschein kommt, ist anzunehmen, daß mehrere eng benachbarte Transkriptionsstartpunkte

vorliegen. Eine zusätzliche Erklärung könnte das Laufverhalten des geschützten Hybrides sein, da dieser Bereich stark GC-reich ist, daher einer Denaturierung schwerer zugänglich ist und somit Sekundärstrukturen ausbilden könnte. Durch Ausmessen der Höhe der Bande läßt sich eine Länge der geschützten Hybride der RPA-Sonde zwischen 360 und 450 bp bestimmen. Hieraus ergibt sich, daß zwischen den Positionen -200 und -290 und somit im Bereich der bereits erwähnten *EcoRI*-Schnittstelle an Position -244 ein oder mehrere Transkriptionsstartpunkte liegen könnten. Es kann aber nicht ausgeschlossen werden, daß in diesem Bereich gleichfalls eine Intron/Exon-Grenze für weiter 5' gelegene Transkriptionsstartpunkte vorliegt. Im Fall von Maus-Testis-RNS konnte keine eindeutige Bande in der zum geschützten Hybrid aus P19-RNS entsprechenden Größenordnung detektiert werden. Dagegen zeigte sich hier eine ebenfalls breite Bande mit einer Größe zwischen 150 und 160 bp. Diese Größe der geschützten Hybride der RPA-Sonde deckt sich in etwa mit der Region des Translationsstartpunkts (Position +1). Da ein Transkriptionsstartpunkt in unmittelbarer Nähe zum Translationsstartpunkt eher unwahrscheinlich ist, könnte hier eine Exon/Intron-Grenze vorliegen. Allerdings liegt in diesem Bereich kein klassischer konservierter Exon/Intron-Übergang vor, so daß das hier vorliegende Ergebnis nicht eindeutig zu interpretieren ist. In der Kontrollreaktion konnten keine geschützten Banden nachgewiesen werden und die beiden Positivkontrollen waren wie erwartet sowohl in P19- als auch in Maus-Testis-RNS in der entsprechenden Größen zu detektieren (Abbildung 3.2).

**B)**

```

-482 ATTATTAGTG TGGGAAATA GTTGAATCA TAGAGCACTA TGATCACGAA TAAGTTACAA
                                         RPA-for
-422 TAGAGAGAAA ACTCTGACAT AGCCGTTTAT TATATTAATA TATTAGAAA TTTATTAGAG
-362 TTTGTAATAG TGATAGGTTT GGGTCTCCC TACTTAGGTC TTCCTGTTT TTTCCATCA
-302 CCCCTTATT TGGTAGAGTC CCGTGTGGGC AGCCTCGTTG GGAGGACTAC ATTCCCAGA
-242 ATTCCTCACG GGCATGTGCG TGGCAGCGGC GCGTGACGTC AGAGGAGGGA GCTGGCCAGT
-182 GCTGAGGGGG CGCGGCGCG AGGGGCGCG AGCCGGGCGG CTCAGGGGCC CAGAGAGTGC
-122 GGC GGCCGAG AGCCTGCCG CCCCTGACAG CCCCTCCCC CCGTGAAGA CCAGGACGAC
-62 GACTACGAAG GCGCAAGTCA TGGCGGAGCA GCGAAGCCCG AGAGGGCCCT GAGCACCGCC
-2 GCCTGAGCG GGACGAACGG CCACCTAGCG GAGGGGAGG CGCGGGGGC TGGCGGGGT
58 TCCTGGAGCC GCCCGCCCG CTCCCTCCG CGCCGCGCAA CGGTGGGTAA GGGCCTTCT
118 GAGCCCGGC GGTGCCAAC CCCGGACCC CTTCTTCTC T
                                         RPA-rev

```

Abbildung 3.2: RNase Schutzexperiment **A)** Auf den Spuren 1 - 4 sind die nativen *in vitro* transkribierten *antisense*-RNS-Sonden aufgetragen. Die Spuren 5 - 8, in denen keine Banden sichtbar sind, zeigen den kompletten Verdau der Sonden ohne Zusatz von Ziel-RNS. Die Spuren 9 - 12 zeigen die geschützten Banden bei Zusatz von P19-RNS und die Spuren 13 - 16 die geschützten Banden bei Zusatz von Maus-Testis-RNS. Die Kontrolle der GCNF-Expression erfolgte durch eine interne Sonde aus dem Exon G (Spur 9 und 13). Die Actin-Kontrolle ist in den Spuren 12 und 16 sichtbar. **B)** Interpretation des RNase Schutzexperiments. Dargestellt ist der genomische 5'-Bereich inklusive des ersten translatierten Exons. Das Startkodon ist rot unterlegt. Die Primer RPA-for und RPA-rev für die Generierung der RPA-Sonde sind unterstrichen. Die aus der Größe der geschützten Banden abgeleiteten Areale, die für Transkriptionsstartpunkte und/oder Exon/Intron-Grenzen in Frage kommen, sind im Fall von P19-RNS rot und im Fall von Maus-Testis-RNS grün hervorgehoben.

3.2.2 Identifikation von Transkriptionsstartpunkten durch RLM-5'-RACE

Zur weiteren Charakterisierung des 5'-Endes und Erfassung weiterer möglicher Transkriptionsstartpunkte wurde die RLM-5'-RACE angewandt. Dabei wurde eine Adapter-ligierte cDNS-Bank aus Maus-Testis aus dem *FirstChoiceTM RACE-Ready cDNA Kit* von Ambion als Matrize verwendet (vgl. 2.2.12). Für die Amplifizierung des 5'-Endes der mGCNF-cDNS wurden die genspezifischen Primer, RACE-1 und RACE-2, entworfen (Abbildung 3.3). Die Gegenprimer für die *nested*-PCR-Reaktion stellten die im Ambion Kit enthaltenen Adapter-Primer dar. Die so generierten Banden wurden aus dem Agarosegel ausgeschnitten, gereinigt und in den Vektor pGemTeasy zur weiteren Sequenzierung kloniert. Die cDNS-Sequenzen wurden dann mit der genomischen Sequenz verglichen. Die Sequenzanalyse ergab interessanterweise drei weitere neue cDNS-Spezies mit zusätzlichen 137 bp (mGCNF-A), 159 bp (mGCNF-B1) und 134 bp (mGCNF-B2). Aus dieser Sequenzanalyse geht ferner hervor, daß alle Transkripte (mGCNF-A, mGCNF-B1 und B2) die identische 3'-Akzeptor-Seite an Position -286 benutzen. Die neu identifizierten Transkriptionsstartpunkte liegen an den Positionen -1684 (mGCNF-A), -1489 (mGCNF-B1) und -1464 (mGCNF-B2). Die Splice-Seite liegt im Fall von mGCNF-A bei -1591 und in Fall von mGCNF B1 und B2 bei -1373. Somit konnten zwei Introns in der 5'-Region des mGCNF identifiziert werden (Abbildung 3.3). Die so identifizierten Exon/Intron-Übergänge stellen klassische konservierte Übergänge dar (80).

Die Ergebnisse der RNase Schutzexperimente (vgl. 3.2.1) mit P19-Zellen sprechen für mindestens einen weiteren Transkriptionsstartpunkt im Bereich der *EcoRI*-Schnittstelle. Durch einen Vergleich der flankierenden Sequenzen der *EcoRI*-Schnittstelle mit einer Konsensussequenz für Transkriptionsstartpunkte konnte ein weiterer putativer Transkriptionsstartpunkt an Position -245 identifiziert werden (mGCNF-C1). Um diesen Startpunkt zu bestätigen, wurde ein weiterer RLM-5'-RACE durchgeführt. Hierzu wurde ein weiterer Primer (RACE-3) stromabwärts generiert und der RACE-2 als innerer Primer verwendet (Abbildung 3.3). Die Sequenzanalyse der so generierten Fragmente erbrachte das Vorliegen eines weiteren Transkriptionsstartpunktes an der Position -235 in Maus-Testis, im Folgenden mGCNF-C2 genannt (Abbildung 3.3), obwohl im RNase Schutzexperiment keine eindeutige Bande in diesem Bereich zu

detektieren war. Der Transkriptionsstartpunkt mGCNF-C1 dagegen konnte in diesem Versuchsansatz nicht bestätigt werden. Die Funktionalität dieses putativen Transkriptionsstartpunktes kann jedoch zum gegenwärtigen Zeitpunkt nicht ausgeschlossen werden, zumal die Ergebnisse der RNase Schutzexperimente und der RLM-5'-RACE zum Teil auf unterschiedlichen RNS-Quellen (P19-Zellen versus Maus-Testis) basieren. Es ist nicht unwahrscheinlich, daß in diesem Bereich gewebsspezifische Transkriptionsstartpunkte liegen. Leider war es im Rahmen dieser Arbeit nicht möglich eine qualitativ gleichwertige cDNS aus P19-Zellen für einen weiteren 5'-RACE zu generieren, so daß ein direkter Vergleich der 5'-Enden zwischen Maus-Testis und P19-Zellen nicht erfolgen konnte.

```

-1742 CTACCTCAAT GAACAGGTGT GGGAGCTTTA AACCACACAG CATTAGTGTC AATCTCTCAT mGCNF-A
-1682 AACAGCTGCT GGCACAGACT AAGGATGGAC CAGGCCAATT AATATTGATA ATGGAAAGTG
      Splice-Seite A
-1622 CAGGAAGGCT TGGCAGAGCC TTCTCAATAG CAGGTAAGGG AAGAGGCATG GGAGCAACGT
-1562 GGGCAGGAAT CGGAACAGGT TAGATTTTCAT AAGCCAAGTA AAGACTTCTA AACAAPTAAG
      mGCNF-B1 mGCNF-B2
-1502 TAAAGAATGA CTCAAGAG CCAGAGGATT CCAGGGGCAC ATGGGGCAGA ATGAAGTGAC
-1442 AGAATGAAAC CGCTTCGATA CGGCCCATTA GAGGAAAGCC CAGCAAAGCA CCAGAGTTCT
      Splice-Seite B
-1382 TTGATTTATA GTAAGCTAGA TAGCATTTAA GTTCTAGGCT GAAACTTAAT AAGTCTTTTC
-1322 CTAAGGGAGG TGTGTGTGTT GTATAGTGTG TGTGTGTGTG TGTGTGTGTG TGTGTGCGCG
-1262 GGTGTGTGTAG TGTGTGTGTG TGTGTGTGTG TGAGAGAGAG AGAGAGAGAG AGAGAGAGAG
-1202 AGAGAGAGAG AGAGAGAGAG AGAGAGAGAG AGAGAGAGAG AGAACGCGCG CGGGGCATTT
-1142 CTGAAAATCA CCACCACCCC TAATCCTGAG AGCCCCATGG CCGCGCGCCA CCTGGTGGCA
-1082 GCGGGAGGTG GGCCTTGAG GAGGAAGGGG AGAAAATCCA GGATTTTATT TGGTGGGAAC
-1022 TTCTGTAAAC TGAGGCGATA GCGTGTATGT GAGAGTTGGT CTCTTATCAC TGGATCCGAT
-962 TCTTATTACA CCTCTCATT TTGAGACAGG TATACTGAAC AGGAGTGGGA AGGGGAACAC
-902 TCCGGGAAAG GGACATTTCT AAAACAGAAC TCTTTAAGAC ACAAGGAGTC AGGGGTCTCA
-842 AGTTTTCTTT GTTGGCATCA GTGGAAGTGA TCTTAGTTTG FCCATCTGTT CTATGGGCAG
-782 GGTGCGGGGA ATGAAAGAGG AGGAAGAGAA ACTTTAATCT TTCCCGCCA CCCGGAGGTA
-722 AAGGGACTTT AACACTTCT CCGGAAAGCA GAGTTGTATA GATTCATTT GCATACGAAC
-662 GCAGTCACCT CGGGTAAAC TCGGGTCCTT TAATCTCTGG TCCAATTTGT CGCTCAGCCC
-602 GGGAGGAAAG CCTCATGAG TACCTACACA CCCCGCCCTC TGGGGCCTTC CCCACAGGG
-542 CTGGGCTTGG TTGCACGTGC TCACCCGGTT CCCGGTGGAT ACGCCTCCTT GGAAAGGCTC
-482 ATTATTAGTG TGGGAAATA GTTGAATCA TAGAGACTA TGATCAGAA TAAGTTACAA
-422 TAGAGAGAAA ACTCTGACAT AGCCGTTTAT TATATTAATA TATTAGAAAT TTTATTAGAG
-362 TTTGTAATAG TGATAGTTT GGGTTCTCCC TACTTAGGTC TTCCTGTTTT TTTTCCATCA
      mGCNF-C1
-302 CCCCTTTATT TGGTAGAGTC CCGTGTGGGC AGCCTCGTTG GGAGGACTAC ATTTCCAGA
      mGCNF-C2 RACE-1
-242 ATTCCTCAGC GGCATGTGCG TGGCAGCGGC GCGTGACGTC AGAGGAGGGA GCTGGCCAGT
      RACE-2 RACE-3
-182 GCTGAGGGGG CCGGGCGCGG AGGGGCGCGG AGCCGGGCGG CTCAGGGGCC CAGAGAGTGC
-122 GGGGCGGAG AGCCTGCCGG CCCCTGACAG CCCCCTCCC CCGTGAAGA CCAGGACGAC
-62 GACTACGAAG GCGCAAGTCA TGGCGGAGCA GCGAAGCCG AGAGGGCCCT GAGCACCGC
-2 GCATG

```

Abbildung 3.3: Exon/Intron-Struktur der 5'-Region des mGCNF. Die identifizierten Transkriptionsstartpunkte sind rot, Splice-Seiten grün, transkribierte Sequenzabschnitte hellblau und für die 5'RACE verwendeten Primer dunkelblau markiert und unterstrichen. Nicht farbig markierte Sequenzabschnitte entsprechen den beiden identifizierten Intron-Abschnitten.

Ein Vergleich der, die mGCNF-Transkriptionsstartpunkte flankierenden Sequenzen untereinander und mit der korrespondierenden Sequenz aus dem genomischen 5'-Bereich des humanen GCNF, sowie mit einer in der Literatur beschriebenen Konsensussequenz für Transkriptionsstartpunkte (82, 83) zeigt eine bestehende Homologie und spricht für die Funktionalität der ermittelten Transkriptionsstartpunkte. Für die Transkriptionsstartpunkte mGCNF-B1 und B2 und mGCNF-C2 konnten keine homologen Abschnitte in der humanen Sequenz gefunden werden (Abbildung 3.4).

| | |
|-----------|------------|
| mGCNF-A | CTCTCATAAC |
| hGCNF-A | CTCCAGATT |
| mGCNF-B1 | GACTACAAG |
| mGCNF-B2 | GGGGACATG |
| mGCNF-C1 | TTCCAGAAT |
| mGCNF-C2 | TCCTACGGG |
| hGCNF-C | CTTCAGCGT |
| Konsensus | NNYYCANTYY |
| | A |

Abbildung 3.4: Die ermittelten Transkriptionsstartpunkte im Vergleich.

Gezeigt ist ein Vergleich der ermittelten Transkriptionsstartpunkte mit den korrespondierenden humanen Sequenzen (hGCNF) und einer Konsensussequenz aus der Literatur (82). N = A, T, G oder C; Y = C oder T

Es gibt eine Reihe von Genen, bei denen mehrere eng benachbarte Transkriptionsstartpunkte innerhalb eines Gens vorkommen (84). Suzuki et al. (2001) konnten durch eine Kartierung von Transkriptionsstartpunkten von insgesamt 276 humanen Genen zeigen, daß diese Verteilung der Transkriptionsstartpunkte über einen Bereich von 61,7 bp im Mittel variieren kann. Interessanterweise kamen dabei entgegen der bis dahin gängigen Meinung alle vier Nukleotide als Transkriptionsstartpunkte in Frage. Am häufigsten fanden sich dabei das Adenin mit 47 % gefolgt vom Guanin mit 28 %, Cytosin mit 14 % und Thymin mit 12 % (84).

3.3 Nachweis des GCNF-Transkripts in P19-, NT2/D1- und JEG3-Zellen

Nachdem nun Erkenntnisse bezüglich der Lokalisation der Transkriptionsstartpunkte von mGCNF gewonnen werden konnten, sollte nun eine Untersuchung der GCNF-Expression in verschiedenen Zelllinien per Northern Blot erfolgen. Die Identifikation geeigneter Zelllinien ist eine Voraussetzung für die funktionelle Charakterisierung der Promotorregion durch Reporteranalysen. Als Matrize für die Herstellung der radioaktiv markierten DNS-Sonde diente der Klon pSK-XR5-19, der den gesamten kodierenden Bereich von mGCNF enthält. Erwartungsgemäß zeigte sich eine hohe GCNF-Expression in den Teratokarzinomzellen NT2/D1 und P19. Darüber hinaus konnte eine hohe Expression in der humanen Zelllinie JEG3 nachgewiesen werden (Abbildung 3.5). JEG3 stellt eine aus einem menschlichen Trophoblasttumor hervorgegangene Zelllinie dar. Somit konnte eine weitere Zelllinie für funktionelle Untersuchungen an GCNF identifiziert werden. Des Weiteren konnte eine schwache Expression in nahezu allen untersuchten Zelllinien festgestellt werden. So zeigte sich eine eindeutige Expression in geringen Mengen in den Neuroblastomzelllinien Neuro2A und NG108, wie auch in HT29-Zellen, die Adenokarzinomzellen eines Kolonkarzinoms darstellen. In PC12-Zellen zeigte sich gleichfalls eine schwache Expression. Diese Zellen sind adrenerge Phäochromozytomzellen, die sich durch eine Behandlung mit NGF in Zellen mit einem neuronalem Phänotyp differenzieren lassen. Da für GCNF eine Hochregulation im Rahmen der neuronalen Differenzierung am Beispiel der NT2/D1- und P19-Zellen gezeigt ist, sollte geklärt werden, ob in mit NGF behandelten PC12-Zellen ein ähnliches Phänomen zu beobachten ist. Ein solcher Effekt konnte zumindestens nach 24 stündiger NGF-Behandlung der Zellen nicht beobachtet werden (Abbildung 3.5).

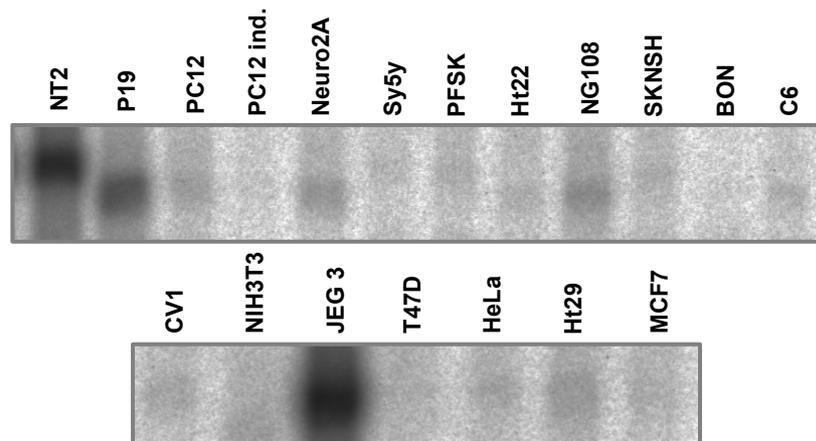


Abbildung 3.5: GCNF-Expression in verschiedenen Zelllinien. Als Matrize zur Herstellung der DNS-Sonde diente der Klon PSK-XR5-19. Äquivalente RNS-Mengen wurden aufgetragen und durch eine Methylenblau-Färbung kontrolliert. Gezeigt ist der Ausschnitt des Autoradiogramms mit den 7,5 kb großen GCNF-Banden. Weitere Banden waren nicht zu detektieren.

3.4 Funktionelle Charakterisierung des mGCNF-Promotors

Nach Identifizierung der Transkriptionsstartpunkte und geeigneter Zelllinien für Reporteranalysen, sollte im nächsten Schritt der sequenzierte Bereich hinsichtlich der Promotoraktivität untersucht werden. Hierbei wurden Promotoraktivitäten unterschiedlich langer Deletionskonstrukte, die alle als 3'-Ende die *EcoRI*-Schnittstelle und somit den Transkriptionsstartpunkt für mGCNF-C1 enthalten, untersucht. Gleichzeitig sollte die Retinsäureinduzierbarkeit der einzelnen Deletionskonstrukte untersucht werden. Auf diesem Weg sollte eine Erklärung für die bislang beobachtete transiente Hochregulation der GCNF-mRNS-Expression und GCNF-Proteinexpression in Retinsäure-behandelten NT2/D1- und P19-Zellen gefunden werden.

3.4.1 Die Deletionskonstrukte

Für die Reporteranalysen wurden die in Abbildung 3.6 gezeigten Deletionskonstrukte XR5-3911, XR5-1572 und XR5-734 in das Luziferase-Reporter-Plasmid pGI-3-basic (Promega) kloniert

Für die Herstellung von XR5-3911 wurde XR5-3177 mit *Bam*HI aus pSK-XR5-3177 geschnitten. Parallel wurde XR5-734 mit den Enzymen *Bam*HI und *Eco*RI aus pSK-XR5-734 isoliert und anschließend mit dem isolierten XR5-3177-

Fragment ligiert. Das 3911 bp große Ligationsprodukt, welches nun die gesamte sequenzierte genomische 5'-Region enthielt (vgl. 3.1), wurde anschließend in den *Bam*HI und *Eco*RI geschnittenem Vektor pSK kloniert und die richtige Orientierung überprüft. Anschließend wurde das gesamte Fragment in der richtigen Orientierung mit den Enzymen *Not* I und *Eco*RI ausgeschnitten und nach Auffüllen der Überhänge in pGL-3-basic kloniert. XR5-1572 wurde mit dem Enzym *Eco*RI aus pSK-XR5-1572 geschnitten, glatte Enden erzeugt und in pGl-3-basic kloniert. XR5-734 wurde mit den Enzymen *Bam*HI und *Eco*RI aus dem Vektor pSK-XR5-734 geschnitten und nach Erzeugung von glatten Enden in pGl-3-basic kloniert.

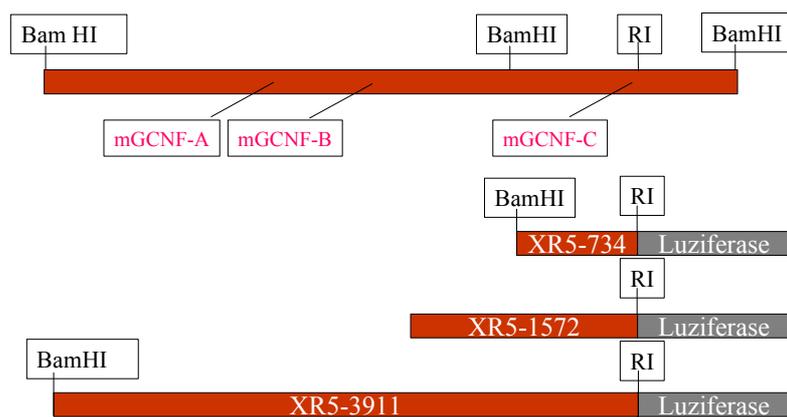


Abbildung 3.6: Die Deletionskonstrukte. Gezeigt sind die für den Luziferase-Assay verwendeten Deletionskonstrukte in Relation zur genomischen 5'-Region. Dargestellt sind die identifizierten Transkriptionsstartpunkte und natürlich vorkommende Restriktionsschnittstellen.

3.4.2 Promotoraktivität und Retinsäureinduzierbarkeit in P19-Zellen

Die Reporterdeletionskonstrukte wurden im nächsten Schritt nach der Methode der Lipofektion in P19-Zellen transfiziert und die Enzymaktivitäten gemessen. Da es nahe liegend erschien, für die bislang beobachtete Retinsäure-induzierte transiente Hochregulation von GCNF in Teratokarzinomazellen, die Ursache auf der Ebene der transkriptionellen Regulation zu suchen, wurde im selben Versuchsansatz der Einfluß von all-trans-Retinsäure (ATRA) auf die einzelnen Promotorkonstrukte untersucht. Hierzu wurde dem Zellmedium in entsprechenden Zeitabständen nach der Transfektion ATRA zugegeben, so daß Promotoraktivitäten in Abhängigkeit der Dauer der Retinsäurebehandlung von 0, 15, 24, 34 und 48 h verglichen werden konnten.

Es zeigte sich, daß allen drei untersuchten Promotorkonstrukten eine starke Promotoraktivität, gemessen in relativen Lichteinheiten (rlu), eigen war (Blaue Balken, Abbildung 3.7). Somit konnte davon ausgegangen werden, daß in dem untersuchten Bereich ein Promotor liegt, der in P19-Zellen aktiv ist und als Transkriptionsstartpunkt mGCNF-C benutzt. Ferner konnte die Retinsäureinduzierbarkeit in einer Hochregulation dieser Promotoraktivität durch eine Behandlung der Zellen mit ATRA gezeigt werden. Diese Hochregulation konnte bis zu 34 h nach Transfektion beobachtet werden. Anschließend, nach 48 h Retinsäurebehandlung, zeigte sich ein leichter Rückgang der Promotoraktivitäten (Abbildung 3.7). Dieses Ergebnis liefert eine mögliche Erklärung für die bislang beobachtete Retinsäure-induzierte transiente Hochregulation der GCNF-mRNS- und GCNF-Proteinexpression.

Als Negativkontrolle wurde der leere pGl-3-Vektor transfiziert, der keine eigene Promotoraktivität aufwies. Als Positivkontrolle der Retinsäureinduzierbarkeit diente der Thymidinkinase-Promoter, dem künstlich 3 Kopien eines Retinsäure-*Response-Elements* vorgeschaltet wurden (tk- β -RE). Die funktionierende Retinsäureinduzierbarkeit konnte anhand dieses Promotors, dessen schwache Aktivität durch ATRA deutlich gesteigert wurde, belegt werden. Als weitere Kontrolle wurde das XR5-1600-Fragment in *antisense*-Orientierung vor das Luziferase-Gen kloniert (XR5-*antisense*). Da ein Promotor per definitionem nur in 5'-3'-Richtung transaktiviert, durfte die *antisense*-Orientierung keine nennenswerte Aktivität im Luziferase-Assay zeigen. Nach Transfektion des XR5-

antisense-Konstruktes zeigte sich eine extrem schwache Aktivität, die im Vergleich zu den Konstrukten XR5-3911, XR5-1572 und XR5-734 zu vernachlässigen war. Eine Retinsäureinduktion konnte ebenfalls nicht beobachtet werden (Abbildung 3.7).

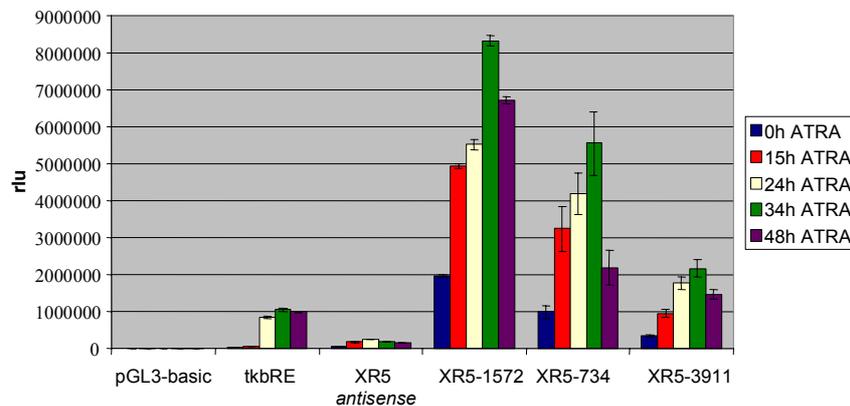


Abbildung 3.7: Aktivitäten der einzelnen Deletionskonstrukte im Luciferase-Reporter-Gen-Assay. Die Meßwerte sind in relativen Lichteinheiten (rlu) angegeben und repräsentieren Mittelwert +/- Standardabweichung des Mittels von einem im Triplet durchgeführtem Experiment.

3.4.3 Identifikation eines DR1-ähnlichen Elements

Da im Luciferase-Reportergen-Assay eine Retinsäureinduzierbarkeit der transfizierten Promotorkonstrukte gezeigt werden konnte, war es von großem Interesse eine Zielsequenz für Retinsäurerezeptoren innerhalb des Promotors zu identifizieren. Dazu wurde die gesamte Sequenz nach einer direkten Wiederholung der Sequenz AGGTCA (DR1, DR5) durchsucht, da sowohl DR1 als auch DR5 Zielsequenzen für Retinsäurerezeptoren und ihre Heterodimere darstellen. Die Suche erfolgte unter Zuhilfenahme der Software zur Sequenzverarbeitung (Lasergene Module, DNA Star inc.) mit der man bekannte Sequenzen, in diesem Fall AGGTCA als Halbseite eines DR-Elements, über eine Suchfunktion detektieren kann. Da auch Varianten der Sequenz AGGTCA in Frage kommen, wie mehrfach in der Literatur beschrieben (85) wurde die gesamte Sequenz gleichfalls nach solchen Varianten, wie z. B. GAGTCA, durchsucht.

Diese Suche erbrachte schließlich ein DR1-ähnliches Element an der Position -857, bezogen auf den Translationsstartpunkt, mit der Sequenz GAGTCA GGGTCT (Abbildung 3.8).

```

-902 TCCGGGAAAG GGACATTCTT AAAACAGAAC TCTTTAAGAC ACAAGGAGTC AGGGGTCTCA
                                     DR1-ähnliches Element
-842 AGTTTTCTTT GGTGGCATCA GTGGAAGTGA TCTTAGTTTG TCCATCTGTT CTATGGGCAG
-782 GGTGCGGGGA ATGAAAGAGG AGGAAGAGAA ACTTTAATCT TTCCC GCCCA CCCGGAGGTA
-722 AAGGGACTTT AAACACTTCT CCGGAAAGCA GAGTTGTATA GATTCTATTT GCATACGAAC
-662 GCAGTCACCT CGGGTTAAAC TCGGGTCCTT TAATCTCTGG TCCAATTTGT CGCTCAGCCC
-602 GGGAGGAAAG CCCTCATGAG TACCTACACA CCCC GCCCC TGGGGCCTTC CCCACAGGG
-542 CTGGGCTTGG TTGCACGTGC TCACCCGGTT CCCGGTGGAT ACGCCTCCTT GGAAAGGCTC
-482 ATTATTAGTG TGGGGAAATA GTTGAATCA TAGAGCACTA TGATCAGAA TAAGTTACAA
-422 TAGAGAGAAA ACTCTGACAT AGCCGTTTAT TATATTAATA TATTAGAAAT TTTATTAGAG
-362 TTTGTAATAG TGATAGGTTT GGGTTCTCCC TACTTAGGTC TTCCTGTTTT TTTCCATCA
                                     mGCNF-C1
-302 CCCCTTTATT TGGTAGAGTC CCGTGTGGGC AGCCTCGTTG GGAGGACTAC ATTTCCCAGA
                                     mGCNF-C2
-242 ATTCCCTCAGG GGCATGTGCG TGGCAGCGGC GCGTGACGTC AGAGGAGGGA GCTGGCCAGT
-182 GCTGAGGGGG CGCGGCGCGG AGGGCGCGG AGCCGGGCGG CTCAGGGGCC CAGAGAGTGC
-122 GGCGGGCCGAG AGCCTGCCGG CCCCCTCCCC CCGTGGAAAG CCAGGACGAC
-62 GACTACGAAG GCGCAAGTCA TGGCGGAGCA GCGAAGCCCG AGAGGGCCCT GAGCACC GCC
-2 GCATG

```

Abbildung 3.8: Identifikation eines DR1-ähnlichen Elements. Die Lage des identifizierten DR1-ähnlichen Elements (blau markiert) im proximalen Promotor in Bezug zum Translationsstartpunkt (rot unterlegtes ATG) ist dargestellt. Die Transkriptionsstartpunkte mGCNF-C1 und C2 sind rot markiert.

3.4.4 Das proximale Promotorfragment XR5-367 ist durch 9-cis-Retinsäure, aber nicht durch ATRA induzierbar

Da das identifizierte DR1-ähnliche Element für die Retinsäureinduzierbarkeit verantwortlich sein könnte, sollte im nächsten Schritt die Retinsäureinduzierbarkeit eines kürzeren, dieses Element nicht mehr beinhaltenden Deletionskonstruktes untersucht werden. Zu diesem Zweck wurde über eine natürlich vorkommende *Sma* I-Schnittstelle ein 367 großes Fragment generiert und mit den Enzymen *Eco*RI und *Sma* I aus pSK-XR5-734 ausgeschnitten und nach Erzeugung glatter Enden in pGI-3-basic kloniert (Abbildung 3.9 A). Dieses Konstrukt (XR5-367) wurde parallel mit den drei induzierbaren Promotorkonstrukten in P19-Zellen transfiziert. Die P19-Zellen wurden 24 h und 48 h mit ATRA behandelt. Zusätzlich wurde der Effekt einer 24-stündigen Behandlung der Zellen mit 9-cis-Retinsäure untersucht. Im Gegensatz zu den Promotorkonstrukten XR5-3911, XR5-1572 und XR5-734 zeigte sich bei dem kürzeren Promotorkonstrukt XR5-367 nach 24 h ATRA-Behandlung der P19-Zellen keine Aktivitätsänderung. Daneben zeigte sich, daß unter einer 24-stündigen Behandlung der P19-Zellen mit 9-cis-Retinsäure alle vier untersuchten

Promotorkonstrukte induzierbar waren. Allerdings war die Aktivitätssteigerung durch 9-cis-Retinsäure bei XR5-367 deutlich weniger ausgeprägt als bei den anderen drei Promotorkonstrukten (Abbildung 3.9 B). Dieses Ergebnis spricht für eine Rolle des DR-1-ähnlichen Elements in der ATRA abhängigen Retinsäureinduzierbarkeit des mGCNF-Promotors. Die weitere Induzierbarkeit des XR5-367 durch 9-cis-Retinsäure spricht dafür, daß weitere Faktoren in diesem Zusammenhang eine Rolle spielen könnten.

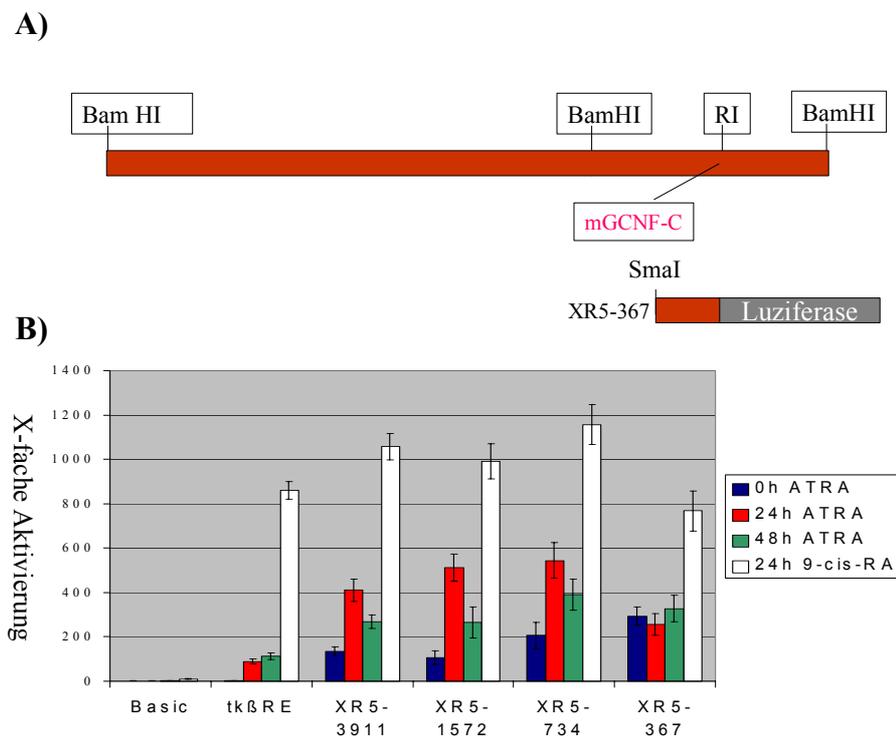


Abbildung 3.9: Aktivitäten der einzelnen Deletionskonstrukte im Luziferase-Reportergen-Assay. A) Schematische Darstellung von pG13-XR5-367. B) ATRA und 9-cis-Retinsäure Effekt auf die Deletionskonstrukte. Die pG13-basic Aktivität wurde gleich 1 gesetzt und alle anderen Werte in Bezug dazu als x-fache Aktivierung angegeben.

3.4.5 Promotoraktivität und Retinsäureinduzierbarkeit in NT2/D1-Zellen

Um Hinweise auf eine Retinsäure-induzierbare Promotoraktivität in einem humanen System zu erlangen, wurden die in das Reporterplasmid pGl-3 klonierten Promotorkonstrukte XR5-3911, XR5-1572 und XR5-734 in humane NT2/D1-Zellen transfiziert. Auf die Retinsäureinduzierbarkeit hin wurde lediglich XR5-3911 überprüft. Die Promotoraktivitäten aller drei Konstrukte konnten auch in dieser Zelllinie bestätigt werden. XR5-3911 zeigt, wie in der Maus-P19-Zelllinie eine Aktivitätssteigerung nach 24-stündiger ATRA-Behandlung der Zellen (Abbildung 3.10). Somit konnte belegt werden, daß auch in der humanen Zelllinie NT2/D1 die untersuchten Promotorkonstrukte aktiv sind und zumindestens in Bezug auf die gesamte Länge (XR5-3911) durch ATRA induzierbar sind.

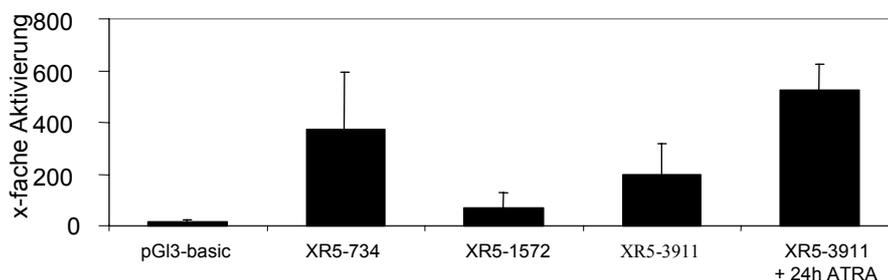


Abbildung 3.10: Promotoraktivitäten in der humanen Zelllinie NT2/D1. Die pGl3-basic Aktivität wurde gleich 10 gesetzt und alle anderen Werte in Bezug dazu als x-fache Aktivierung angegeben und repräsentieren Mittelwert +/- Standardabweichung des Mittels von einem im Triplet durchgeführten Experiment.

3.5 Identifizierung regulatoriver Elemente innerhalb des mGCNF-Promotors

Im Hinblick auf die funktionelle Charakterisierung der identifizierten Promotorregion wurde nach potentiellen Bindungsstellen für Transkriptionsfaktoren, die an der Regulation der mGCNF-Expression beteiligt sein könnten, gesucht. Hierzu wurde das Programm MatInspector verwendet (86). Dieses Programm ermöglicht es durch direkten Sequenzvergleich mit der Datenbank Transfac (Braunschweig), Konsensussequenzen potentieller Bindungsstellen für verschiedenen Transkriptionsfaktoren auf der untersuchten Sequenz zu lokalisieren. Die Suchkriterien wurden sehr stringent gewählt. Dabei sollte die *Core-similarity* 100% und die *Matrix-Similarity* mindestens 90% im Vergleich zu den jeweiligen idealen Konsensussequenzen für Bindungsstellen betragen.

Anhand der Transkriptionsstartpunkte und Splice-Seiten kann die untersuchte genomische 5'-Region des mGCNF-Gens in drei potentielle Promotorareale eingeteilt werden, die möglicherweise gewebsspezifisch die Transkription regulieren. Der stromaufwärts des Transkriptionsstartpunktes mGCNF-A gelegene Bereich wird im folgenden als Promotorregion A, der Bereich zwischen der Splice-Seite A und mGCNF-B1 bzw. B2 als Promotorregion B und der Bereich zwischen der Splice-Seite B und mGCNF-C1 bzw. C2 als Promotorregion C bezeichnet. Es konnten innerhalb der drei Promotorareale diverse Konsensussequenzen potentiell relevanter Transkriptionsfaktoren nachgewiesen werden (Abbildung 3.11). Als Kern-Promotorelemente konnte eine putative TATA-Box an Position -1803 innerhalb des Promotorareals A und eine CCAAT-Box an Position -1648 identifiziert werden. Diese CCAAT-Box ist innerhalb des transkribierten Bereiches von mGCNF-A lokalisiert und funktionell dem Promotorareal B zuzuordnen. Es ist anzunehmen, daß diese CCAAT-Box nur im Fall der Inaktivität der Promotorregion A eine Funktion übernimmt. Weitere Kern-Promotorelemente konnten nicht identifiziert werden, so daß im Fall des Promotorareals C von einem Promotor ohne TATA-Box und CCAAT-Box ausgegangen werden muß (Abbildung 3.11).

Darüber hinaus konnten 5 Konsensussequenzen für Bindungsstellen des Transkriptionsfaktors AP-1 identifiziert werden. Davon sind je eine (Position -2130 und -1495) im Promotorareal A und B und drei (Position -1446, -855 und

-659) im Promotorareal C lokalisiert. AP-1 ist ein Heterodimer der Protoonkogene *c-fos* und *c-jun*, dessen Aktivität durch Proteinkinase C induziert wird, in vielen neuronalen und nicht-neuronalen Zelllinien nachgewiesen werden kann und das DNA-Bindungsmotiv 5'-TGAGTCA-3' erkennt (87, 88).

AP-4 ist ein mit AP-1 verwandter, ubiquitär exprimierter Transkriptionsfaktor, der an die Erkennungssequenz 5'-CAGCTG-3' bindet (87, 89). Es konnten drei potentielle Bindungselemente für AP-4 an den Positionen -2602 und -2507 innerhalb des Promotorareals A und an Position -1680 innerhalb des Promotorareals B lokalisiert werden.

Drei potentielle Bindungsstellen konnten für den Transkriptionsfaktor AP-2 identifiziert werden, die alle im Promotorareal C lokalisiert sind (Position -1152, -1110 und -552). AP-2 ist während der embryonalen Entwicklung in der Neuralleiste und ihren Hauptabkömmlingen, wie z. B. peripheres Nervensystem, epidermale, urogenitale und faziale Gewebe, exprimiert und durch Retinsäure induzierbar (90-94). AP-2 bindet an die Sequenz 5'-GCCNNNGGC-3' und reguliert so eine Reihe von Zielgenen (95, 96).

Die Sox-Proteine (SRY-related HMG box) stellen eine Gruppe von Transkriptionsfaktoren dar, die in einer Reihe von Entwicklungsprozessen, wie z. B. Geschlechtsdeterminierung, neurale Induktion und Skelettformierung, wichtige Funktionen übernehmen (97). Das Kern-DNS-Bindungselement der Familie besteht aus der Basenabfolge 5'-(A/T)(A/T)CAA(A/T)-3', wobei einzelne Familienmitglieder auch Varianten dieser Sequenz erkennen können. Eine Rolle für die Sequenz- und Genspezifität der einzelnen Familienmitglieder scheint den beiden jeweiligen das Kernelement flankierenden Nukleotiden zuzukommen (98-101). SRY ist auf dem Y-Chromosom lokalisiert und gilt als Hauptmitglied der Familie. SRY spielt eine wesentliche Rolle in der Geschlechtsdeterminierung des Mannes und bindet bevorzugt an die Sequenz 5'-(T/A)(T/A)ACAATAG-3' (101). Sox-5 ist vorwiegend in runden post-meiotischen Spermatozyten exprimiert und scheint eine wichtige Rolle während der Spermatogenese zu spielen (99, 102). Sox-5 erkennt das gleiche Bindungselement wie SRY (101). Je ein solches Bindungselement konnte in den Promotorarealen B und C an den Positionen -1511 und -426 identifiziert werden.

Innerhalb des Promotorareals C konnten zwei potentielle Bindungselemente für den Transkriptionsfaktor Sp1 an den Positionen -738 und -569 identifiziert

werden. Sp1 ist das Hauptmitglied einer wachsenden Familie von Zink-Finger-Proteinen und ist der erste beschriebene Transkriptionsfaktor für die RNS-Polymerase II in Säugetieren (103, 104). Bindungsstellen für Sp1 konnten bisher in über tausend Promotoren identifiziert werden. Die Bindung erfolgt an eine GC-Box mit der Sequenz 5'-GGGGCGGGG-3', wobei gleichfalls eine Bindung an Varianten dieser Sequenz erfolgen kann, so daß die bevorzugte Bindungssequenz wie folgt dargestellt werden kann 5'-N(G/A)GGCGN(G/A)N-3' (104, 105).

Insgesamt vier potentielle Bindungsstellen konnten für den Transkriptionsfaktor GATA-1 identifiziert werden. Davon zwei an den Positionen -2592 und -1940 innerhalb des Promotorareals A und zwei an den Positionen -1364 und -351 innerhalb des Promotorareals C. GATA-1 bindet an das DNS-Bindungsselement 5'-(A/T)GATA(A/G)-3' und ist stark exprimiert in hämatopoetischen Zellen, aber auch im adulten Testis (106, 107).

PU.1 gehört zur ETS-Familie der DNS-bindenden Proteine und ist ein Aktivator der Transkription (108, 109). Die DNS-Bindung erfolgt an eine Purin-reiche Sequenz mit der Kernsequenz 5'-GGAA-3', die *PU-box* genannt wird (109, 110). Die PU.1-Expression ist ausschließlich auf hämatopoetische Zellreihen begrenzt und spielt dort unter anderem eine essentielle Rolle in der Myelopoese (109, 111-113). Es konnten drei potentielle *PU-box* Motive innerhalb des Promotorareals C an den Positionen -763, -600 und -241 identifiziert werden. Interessanterweise konnte durch Nerlov et al. eine Protein-Protein-Interaktion zwischen den Transkriptionsfaktoren GATA-1 und PU.1 gezeigt werden, mit dem Resultat der Repression der PU.1-induzierten myelopoetischen Expression. Diese negative regulatorische Interaktion zweier aktivierender Transkriptionsfaktoren scheint eine wesentliche Rolle in der Hämatopoese zu spielen (114).

USF-1 ist ein an Myc-regulierte *E-box*-Elemente mit der Kernsequenz 5'-CACGTG-3' bindender Transkriptionsfaktor und ein Aktivator der Transkription Myc-regulierter Gene (115-117). Bisher identifizierte Zielgene von USF-1, wie z. B. p53 (118) und Cyclin B1 (119), spielen eine Rolle in der Regulation der Proliferation und des Zellzyklus. Ein Bindungselement für USF-1 konnte an Position -529 im Promotorareal C identifiziert werden.

An Position -560 im Promotorareal C konnte ein potentielles Bindungselement für den Transkriptionsfaktor NF-kappaB identifiziert werden. Hierbei handelt es sich um ein DNS-bindendes und die Transkription aktivierendes Protein, dessen

Zielgene in erster Linie in immunologische, inflammatorische und Akut-Phase Prozesse, involviert sind (120, 121). Das DNS-Bindungselement besteht in der Regel aus einem Dekamer mit der Sequenz 5'-GGGRNNYYCC-3' (122). Lediglich die ersten drei und die beiden letzten Nukleotide des Dekamers sind konserviert. Daher ergibt sich eine Reihe unterschiedlicher Bindungselemente für NF-kappaB. So konnte z. B. gezeigt werden, daß Sp1 gleichfalls an bestimmte Bindungselemente für NF-kappaB binden kann und so um die Bindung mit NF-kappaB konkuriert (123).

An Position -250 innerhalb des Promotorareals C und überlappend mit dem Transkriptionsstartpunkt mGCNF-C1 konnte ein potientes DNS-Bindungselement für Stat1 identifiziert werden. Stat1 gehört zu einer Familie von Transkriptionsfaktoren, die eine Schlüsselposition in der Interferon-(IFN) Signalkaskade einnehmen. Die DNS-Bindung erfolgt an ein sogenanntes GAS-Element (124, 125). GAS steht für *gamma activated sequence*, wobei die initiale Induzierbarkeit entsprechender Promotoren durch IFN-gamma für die Namensgebung verantwortlich ist. Das GAS-Element besteht aus der Konsensussequenz 5'- TTNCNNNAA-3' (124). Stat1 bindet entweder als Homodimer oder als Heterodimer mit Stat2, einem weiteren Mitglied der Familie, an ein solches GAS-Element. Stat1-abhängige Genregulation kann entweder aktivierend oder reprimierend sein (126).

Interessanterweise konnte ein ideales *cAMP-response* Element (CRE) an Position -209 in der 5' untranslatierten Region stromabwärts des Transkriptionsstartpunktes mGCNF-C2 identifiziert werden. Der Transkriptionsfaktor CREB bindet als Dimer an CRE, bestehend aus der konservierten pallindromischen Sequenz 5'-TGACGTCA-3', und aktiviert so *cAMP*-abhängige Gene (127, 128). Eine Reihe von Genen, deren Promotoren CRE-Elemente besitzen konnten identifiziert werden (129). Das Spektrum der Funktionsbereiche, in denen CREB somit involviert zu sein scheint ist sehr breit und schließt unter anderem die Spermatogenese, Zellzyklusregulation, Differenzierung ein (129). Es gibt Hinweise, daß CREB in allen Stadien der Spermatogenese eine Rolle spielt (130). Insbesondere diese Rolle während der Spermatogenese könnte in Zusammenhang mit der GCNF-Expression im adulten Testis stehen. Darüber hinaus scheint die Lokalisation des CRE-Elements in der 5' untranslatierten Region stromabwärts der Transkriptionsstartpunkte nicht

ungewöhnlich zu sein. So sind z. B. funktionelle CRE-Elemente unter anderem in der 5' untranslatierten Region des MHC Klasse II Trans Aktivators (CIITA) beschrieben und für die B-Zell-spezifische Expression verantwortlich (131).

Im Rahmen der Suche nach weiteren Erkennungssequenzen für nukleäre Rezeptoren, konnten zwei Halbseiten für Steroidhormonrezeptoren identifiziert werden. Eine Halbseite ist im Promotorareal A an Position -2337 und eine weitere im Promotoreal C an Position -796 lokalisiert. Ideale Erkennungssequenzen für Steroidhormonrezeptoren, bestehend aus der pallindromischen Sequenz 5'-AGAACANNNTGTTCT-3' konnten nicht identifiziert werden. Allerdings gibt es Hinweise in der Literatur auf einen Effekt von Steroidhormonrezeptoren auf Promotoren, die keine ideale pallindromische Erkennungssequenz, sondern nur wiederholt Halbseiten besitzen. So ist eine DNS-Bindung vom Glucocorticoid Rezeptor an den MMTV-Promotor, der insgesamt vier voneinander distante Halbseiten mit der Sequenz 5'-TGTTCT-3' besitzt, gezeigt (132-134). Darüber hinaus ist für den Glucocorticoid Rezeptor die Möglichkeit der Genregulation ohne direkte DNS-Bindung gezeigt. Dieser Effekt beruht auf einer direkten Protein-Protein Interaktion mit anderen Transkriptionsfaktoren, der sogenannten *cross-talk*-Funktion (135). So sind im Fall des Glucocorticoid Rezeptors Interaktionen mit AP-1 (135, 136), GATA-1 (137), CREB (138), PU.1 (139) und NF-kappaB (140) beschrieben.

Somit konnten eine Reihe von potentiellen Bindungsstellen für diverse Transkriptionsfaktoren innerhalb der drei Promotorareale identifiziert werden. Neben einer Reihe von ubiquitär vorkommenden oder weit verbreiteten Transkriptionsfaktoren, wie Sp1, AP-1, AP-4, USF-1, CREB und Stat1 konnten Transkriptionsfaktoren identifiziert werden, die z. T. hochspezifische und mit der GCNF-Expression zum Teil ganz oder partiell übereinstimmende Expressionsmuster aufweisen. Dazu gehören GATA-1, Sox-5, SRY und AP-2, denen möglicherweise eine Rolle in der gewebsspezifischen GCNF-Expression zukommt. Daneben konnten Transkriptionsfaktoren identifiziert werden, die eine wesentliche Rolle in der Hämatopoese spielen, wie z. B. GATA-1, PU.1 aber auch CREB. Da GCNF im hämatopoetischen System bislang noch nicht untersucht ist, ergeben sich somit neue Aspekte und Ansatzpunkte für weitere Untersuchungen an GCNF.

-2642 TTAGTGGATG CCTATTTAGT GTGTACCACA TGCTAACTAG CAGCAGAGGA GATAACCGGG
AP-4 Gatal

-2582 AGTGAGTAAA GGGATTGGCT GGTTTTGGCA AGGAGGGAGC TCAGAGCTGA AAGGAATCAA
-2522 GAGTTATTAC CAGGAGCTGA GGATGTGGTT GAACTCCTCT CTGAGTTGAT GTGCAATCTT
AP-4

-2462 CATCCACTTT TCAAACCTCA GGCACAAGAT GTCTGCAGAG CCACTTGGCT TTCCAGGGAA
-2402 GAGCATTCCG GGAAGAGGAC TCTTCTGCAC CAGGAGCCTG TGATTGAGGG GAACTCTGGC
-2342 TCTGGGAAGG CTATGCGATC CTGGCACATT TCAGAATCCA GAGCTGAAGA AGGCTTTCTT
-2282 CCCCACGACA CAAAGGACTC ATCTTATATT CCAGGGGCT GCTGCAGAAC ACTGCTCCCT
GR-Halbseite

-2222 GGCCTTGGGA AAGCTCAGAA CCCTTGTC AAACATAACC ACTTCAAGAT CATTTCCTGG
-2162 GGCTGGAAAG ATGGCTCAGT GGTAAAGAGC ACTGACTGCT CTTCTGAGG TCCTGAGTTC
AP-1

-2102 AATTCACAGC AACTGCATAG TGCTCACAA CTATCTGTAA TGGGATCTGA TGCCCTCTTC
-2042 TGGTGTGTCT GAAGACAGCT ACAGTGTATA AAGTATACTC ATATACATAA AATAAATAAA
-1982 TGAATCTTTT TTAATAAAAG ATCATTCTT ACAGTCTACT TAGATAGGGC CATCTGGGAA
GATA1

-1922 TACAGAGGGA CCCAGTTGTC CCTTGATGGG AGGTATAAGG AAGGTGCTAC TGAAGAAAAG
-1862 GATCTAGAAA GATGAGTTAA AGACTTTATA GAGGCATTTT GGCTTTCTGA TCCACTGAGT
-1802 ATATAACCGA CATCAACTTT TGTGCCACTT CATTGTATG TGAGAGCACC AATATCAGAG
TATA-Box

-1742 CTACCTCAAT GAACAGGTGT GGGAGCTTTA AACCACACAG CATTAGTGTC AATCTCTCAT
mGCNF-A

-1682 AACAGCTGCT GGCACAGACT AAGGATGGAC CAGGCCAAT AATATTGATA ATGGAAAGTG
AP-4 CAAT-Box

-1622 CAGGAAGGCT TGGCAGAGCC TTCTCAATAG CAGGTAAGGG AAGAGGCATG GGAGCAACGT
Splice-Seite A

-1562 GGGCAGGAAT CGGAACAGGT TAGATTTTAT AAGCCAAGTA AAGACTTCTA AACAATTAAG
SOX5/SRY

-1502 TAAAGAATGA CTCACAAGAG CCAGAGGATT CCAGGGGCAC ATGGGGCAGA ATGAAGTGAC
AP-1 mGCNF-B1 mGCNF-B2 AP-1

-1442 AGAATGAAAC CGCTTCGATA CGGCCCATTA GAGGAAAGCC CAGCAAAGCA CCAGAGTTCT
-1382 TTGATTTATA GTAAGCTAGA TACCATTTAA GTTCTAGGCT GAAACTTAAT AAGTCTTTTC
Splice-Seite B GATA1

-1322 CTAAGGGAGG TGTGTGTGTT GTATAGTGTG TGTGTGTGTG TGTGTGTGTG TGTGTGCGCG
-1262 GTTGTGTGTAG TGTGTGTGTG TGTGTGTGTG TGAGAGAGAG AGAGAGAGAG AGAGAGAGAG
-1202 AGAGAGAGAG AGAGAGAGAG AGAGAGAGAG AGAGAGAGAG AGAACGCGCG CGGGGCATTT
AP-2

-1142 CTGAAAATCA CCACCACCC TAATCCTGAG AGCCCCATGG CCGCGCGCCA CCTGGTGGCA
AP-2

-1082 CCGGGAGGTG GGCCTTGAG GAGGAAGGG AGAAAAATCCA GGATTTTATT TGGTGGGAAC
-1022 TTCTGTAAAC TGAGGCGATA GCGTGTATGT GAGAGTTGGT CTCTTATCAC TGGATCCGAT
-962 TCTTATTACA CCTCTCATTT TTGAGACAGG TATACTGAAC AGGAGTGGGA AGGGGAACAC
-902 TCCGGGAAAG GGACATTTCT AAAACAGAAC TCTTTAAGAC ACAAGGAGTC AGGGGTCTCA
AP-1/DR-1 (RXR/RAR)

-842 AGTTTTCTTT GGTGGCATCA GTGGAAGTGA TCTTAGTTTG TCCATCTGTT CTATGGGCAG
GR-Halbseite

-782 GGTGCGGGGA ATGAAAGAGG AGGAAGAGAA ACTTTAATCT TTCCCGCCA CCCGGAGGTA
Pu-Box/PU.1 SP-1

-722 AAGGGACTTT AAACACTTCT CCGGAAAGCA GAGTTGTATA GATTCTATTT GCATACGAAC
-662 GCAGTACCT CGGGTTAAAC TCGGGTCCTT TAATCTCTGG TCCAATTTGT CGCTCAGCCC
AP-1

-602 GGGAGGAAAG CCCTCATGAG TACCTACACA CCCGCCCC TGGGGCCTTC CCCCACAGGG
Pu-Box/PU.1 SP-1 NF-kappaB AP-2

-542 CTGGGCTTGG TTGCACGTGC TCACCCGGTT CCGGTTGGAT ACGCCTCCTT GGAAAGGCTC
USF1

-482 ATTATTAGTG TGGGAAATA GTTGAATCA TAGAGCACTA TGATCAGGAA TAAGTTTACAA
SOX5/SRY

-422 TAGAGAGAAA ACTCTGACAT AGCCGTTTAT TATATTAATA TATTAGAAAT TTTATTAGAG
-362 TTTGTAATAG TGATAGGTTT GGGTTCTCCC TACTTAGGTC TTCCTGTTTT TTTTCCATCA
GATA-1

-302 CCCCTTTATT TGGTAGAGTC CCGTGTGGGC AGCCTCGTTG GGAGGACTAC ATTTCCCAGA
STAT1 mGCNF-C2

-242 ATTCTCACG GGCATGTGCG TGGCAGCGC CGTGACGTC AGAGGAGGA GCTGGCCAGT
PU.1 mGCNF-C2 CREB/c-jun

-182 GCTGAGGGGG CGCGGCGCGG AGGGGCGCGG AGCCGGGCGG CTCAGGGGCC CAGAGAGTGC
-122 GCGGCGCGAG AGCCTGCCGG CCCTGACAG CCCCCTCCC CCGTGAAGA CCAGGACGAC
-62 GACTACGAAG GCGCAAGTCA TGGCGGAGCA GCGAAGCCG AGAGGGCCCT GAGCACCGCC
-2 GCATG

Abbildung 3.11: Bindungsstellen ausgesuchter Transkriptionsfaktoren. Transkribierte Bereiche sind blau markiert, das Startkodon rot unterlegt. Als Bezugspunkt für alle Positionsangaben dient der Translationsstartpunkt. Die Transkriptionsstartpunkte sind rot und die Splice-Seiten hellgrün markiert. Die Konsensussequenzen der stromaufwärts gelegenen putativen Bindungsstellen für verschiedenen Transkriptionsfaktoren sind unterstrichen und grün markiert. Bindungsstellen im Bereich transkribierter Bereiche sind lediglich unterstrichen. Fett herausgestellt sind die Kernbindungselemente.

3.6 Sequenzvergleich 5'-Region mGCNF versus hGCNF

Der Grad der Konservierung bestimmter DNS-Abschnitte zwischen verschiedenen Spezies ermöglicht eine Aussage hinsichtlich der Relevanz eines Gens. Daher wurde nun die genomische Sequenz der 5'-Region des mGCNF mit der korrespondierenden humanen Sequenz (hGCNF) verglichen. Verwendet wurde hierzu die im Internet frei verfügbare Software BioEdit (<http://www.mbio.ncsu.edu/BioEdit/bioedit.html>). In Anbetracht der Tatsache, daß das Gen für GCNF in Mensch und Maus mit über 98% Homologie stark konserviert ist (58) war auch hier eine hohe Homologie zu erwarten. Zu bedenken gilt jedoch, daß untranslatierte Bereiche generell einer größeren Variabilität unterliegen. Daher wurden in erster Linie die Sequenzabschnitte verglichen, denen eine regulative Funktion zukommt. Die untersuchten Abschnitte enthalten jeweils die Transkriptionsstartpunkte und Bereiche mit einer hohen Dichte an potentiellen Bindungsstellen für Transkriptionsfaktoren. Der Bereich zwischen den Positionen -857 und -235 zeigt eine Homologie von 73% (Abbildung 3.12). Dieser Abschnitt enthält das Promotorareal C, welches reich an potentiellen Bindungsstellen für Transkriptionsfaktoren ist. Der Vergleich der weiter stromaufwärts gelegenen Abschnitte zeigte lediglich eine Homologie um 50%. Der hohe Konservierungsgrad des proximalen Abschnittes spricht für eine wichtige regulatorische Funktion in diesem Bereich. Die Angaben in der Literatur über den Konservierungsgrad von Promotorregionen ist sehr variabel, schwankt jedoch zwischen 50 und 70%. Dieses Ergebnis spricht zusätzlich zu den bisherigen Resultaten für die Funktionalität dieses Bereiches hinsichtlich einer Promotorfunktion.

| | | | | | | | | | |
|-------|-----|----------------|----------------|-----------------|-------------------|------------------|------------------|-----------------|-----------------|
| Maus | 1 | GAGTCACGGG | TCTCAAGTTT | TCTTTGGTGG | CATCAATGGG | AGTGAATTA | GTTTGTCCAT | CTGTTCTATG | GGCAGGGTGC |
| Human | 1 | G...A..A.. | C..AGG..C.. |AA..A.. | ..CC..A...C | CCG..G..... |C..... |C..... | |
| Maus | 81 | GGCGATTGAA | AGAGCAGGAA | GAGAAACTTT | AACTTTTCC | GCCCACCCGG | AGGTAARCGG | ACTTTAARCA | CTTCTCCGGA |
| Human | 78 | ..AA.....G.. |G..G.. |A...A.. |G..... |AA..T.. |G...A.. |C..... | |
| Maus | 161 | AAGCAGACTT | GTATATATTC | TATTTGCATA | CGAACGCAGT | CACCTCGCCT | TAAACTC | GGTCCTTATTC | TCTGGTCCAA |
| Human | 158 | ..A.....T.. |T..... |C..... |A..... |A..... |C..... |C..... | |
| Maus | 241 | TTTGTCCCTC | AGCCCGGGA | GAAACCCCTA | ATGAGTACCT | AACACCCCGG | CCCCCGGGG | CTTCCCCA | CAGGGCTGGG |
| Human | 238 |C..G.. |GGCA..G.. |AG..G..... |G..... |T..AG..... |T..A..... |CC..G.. | |
| Maus | 321 | TTTCTTGCA | CGTGCTCACC | CGGTTCCGG | TGATATCC | TCCTTGGAAA | GGCTCATTAT | TAGTGTGGGG | AAATGTTGG |
| Human | 316 |C..... |C..... |C..G..TC | GC...C..A.. |C...A..... |G...G..G.. |G...G..G.. |GCT..CGA.. |
| Maus | 401 | AATCATACAG | CCTATGATC | ACCAATAGT | TACATAGAG | AGAAACTCT | GACATACCG | TTATATAT | TATATATTA |
| Human | 396 | ..C..T...G.. | A...T..... | ..G..T...A.. | C.....CA...C.. | ..GG..C..G.. | ..AG...T...C... | ..C...C...C.. | --G..C...C.. |
| Maus | 481 | GAAATTTTAT | TAGAGTTTGT | AATATGATA | GTTTGGGTT | CCCCTAETT | AGGTTTCCCT | GTTTTTTTTC | CATCACCCT |
| Human | 474 | A..CGC...G.. | C..TG...CT.. | G...T...C.. | ..AC...TA..C.. | T.....T...C.. | ..A...T...T.. | A..CCC..CC..T.. | ..--..... |
| Maus | 561 | TATTTGCTA | GATCCCTG | TGGCTACCT | CGTTGGGAGG | ACTAATTTT | CCAGATTTCC | TCA | |
| Human | 552 | ..C..C.....G.. | CG...G-.C.. |C..G..... |C..A..C..... |C...AC..T.. |CG..G..C..G | | |

Abbildung 3.12: Vergleich des Promotorareals C zwischen Maus und Mensch. Gezeigt ist Bereich zwischen den Positionen -857 bis -235, bezogen auf den Translationsstartpunkt. Homologe Sequenzabschnitte sind umrahmt. Identische Nukleotide sind in der humanen Sequenz als Punkte dargestellt. Die Position -857 entspricht der Lage des DR1-ähnlichen Elements und ist hier mit 1 numeriert. Die Position -235 entspricht dem Transkriptionsstartpunkt mGCNF-C2. Die Homologie beträgt in diesem Bereich 73%.

3.7 Der Einfluß diverser Transkriptionsfaktoren auf die basale Promotoraktivität

Im nächsten Schritt sollten nun, nachdem diverse potentielle Bindungsstellen für Transkriptionsfaktoren identifiziert werden konnten, einige dieser Transkriptionsfaktoren hinsichtlich ihrer Funktionalität untersucht werden. Hierzu wurden Expressionsplasmide der entsprechenden Transkriptionsfaktoren in einem Versuchsansatz mit dem Luziferase-Reporter-Plasmid-Konstrukt pGL-3-XR5-3911 in P19-Zellen kotransfiziert, um einen eventuellen Einfluß auf die Transaktivierung beobachten zu können. Untersucht wurde der Effekt der Transkriptionsfaktoren Sp1, PU.1, Sox-5, GATA-1, AP-2 β und des Glucocorticoid Rezeptors. Die Expressionsplasmide wurden im Fall von Sp1, GATA-1, Sox-5 und PU.1 von PD. Dr. Ingolf Bach, ZMNH freundlicherweise zur Verfügung gestellt. Das Promotorkonstrukt XR5-3911 wurde für diesen Zweck ausgesucht, da es sich hierbei um den gesamten sequenzierten und analysierten Bereich handelt und so sämtliche lokalisierten regulativen Elemente enthalten sind. Für die Bestimmung der Basisaktivität ohne Einfluß von Transkriptionsfaktoren wurde XR5-3911 mit dem leeren CAT-Expressionvektor (CAT) kotransfiziert. So konnte die transfizierte Gesamt-DNS-Menge konstant gehalten werden, um Mengen-bedingte Aktivitätsunterschiede zu vermeiden.

Wie bereits gezeigt werden konnte, verfügt pGL-3-XR5-3911 über eine hohe basale Promotoraktivität. Die Transkriptionsfaktoren Sp1, Sox-5, PU.1 und der Glucocorticoid Rezeptor bewirkten eine weitere Aktivierung dieser basalen Aktivität. Dabei konnte für Sox-5 der stärkste Effekt beobachtet werden. Sox-5 führte zu einer fast 5-fachen Aktivitätssteigerung der basalen Promotoraktivität. Im Fall von Sp1 konnte gleichfalls eine deutliche Aktivitätssteigerung um den Faktor 2,5 gezeigt werden. PU.1 und der Glucocorticoid Rezeptor führten dagegen lediglich zu einer geringen Steigerung der basalen Promotoraktivität um den Faktor 2. GATA-1 und AP-2 β zeigten keinen wesentlichen Effekt auf die basale Promotoraktivität (Abbildung 3.13). Für eine Bestätigung der funktionellen Relevanz und eine eindeutige Interpretation dieser Ergebnisse sind weitere Untersuchungen notwendig, die im Rahmen dieser Arbeit nicht durchgeführt wurden. Möglichkeiten hierzu sind z. B. Untersuchungen zur *in vitro* und *in vivo* DNS-Bindung der einzelnen Transkriptionsfaktoren an die identifizierten Bindungselemente, Kotransfektionen mit entsprechenden Deletionskonstrukten

und Mutationsanalysen der einzelnen DNS-Bindungs-elemente in Reporter-genuntersuchungen.

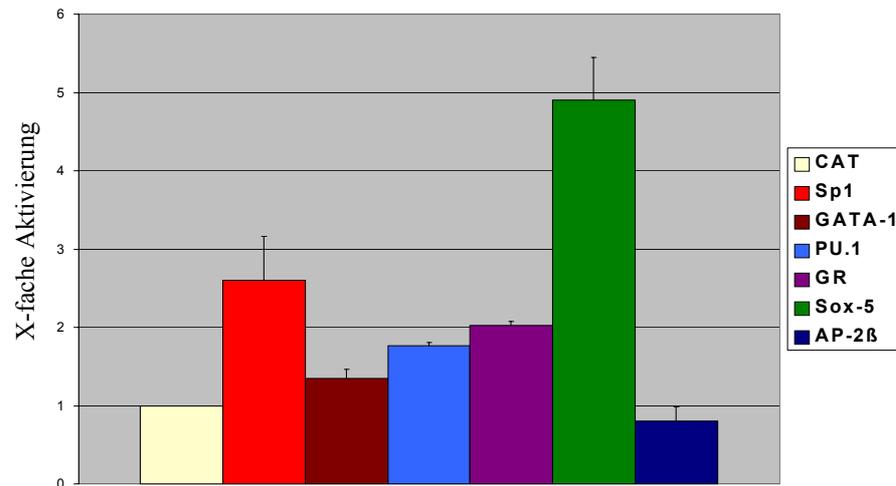


Abbildung 3.13: Einfluß verschiedener Transkriptionsfaktoren auf die basale Promotoraktivität in P19- Zellen. pGI-3-XR5-3911 wurde mit diversen Expressionsplasmiden kotransfiziert, nach 24 h lysiert und die Luziferaseaktivität bestimmt. Die Werte sind auf die interne β -Gal-Kontrolle normiert, die basale Aktivität von pGI-3-XR5-3911 gleich 1 gesetzt und der Einfluß der verschiedenen Transkriptionsfaktoren als x-fache Aktivierung gegenüber der basalen Aktivität angegeben.

4. Diskussion

In der hier vorliegenden Arbeit ist es gelungen, molekulare Mechanismen der Regulation der GCNF-Expression, durch die Identifikation und Charakterisierung des zugehörigen Promotors, aufzudecken. Es konnten insgesamt fünf potentielle Transkriptionsstartpunkte identifiziert werden, von denen zwei (mGCNF-C1 und C2) nahe einer *EcoRI*-Schnittstelle an Position -244, bezogen auf den Translationsstartpunkt, lokalisiert sind. Diese *EcoRI*-Schnittstelle markierte zum Zeitpunkt des Beginns der vorliegenden Arbeit das 5'-Ende der längsten bekannten cDNS für mGCNF. Durch eine modifizierte 5'-RACE, unter Anwendung einer Adapter-ligierten cDNS-Bank, ist es gelungen, drei weitere neue cDNS-Spezies mit zusätzlichen 137, 159 und 134 Nukleotiden aus Maus-Testis zu isolieren und auf diesem Wege die Transkriptionsstartpunkte mGCNF-A, mGCNF-B1, mGCNF-B2 und mGCNF-C2 zu lokalisieren. Ferner ist im Fall von P19-Zellen aufgrund der breiten Bande im RNase Schutzexperiment anzunehmen, daß zwischen den Positionen -200 und -290 weitere Transkriptionsstartpunkte eine Rolle spielen. Unterstützt wird diese Überlegung durch eine Arbeit von Suzuki et al. (2001), die zeigen konnten, daß eine Vielzahl von eng benachbarten Transkriptionsstartpunkten für ein Gen in Frage kommen (84).

In einem Northern Blot, in dem multiple Zelllinien untersucht wurden, konnte das GCNF-Transkript in großen Mengen in den embryonalen Teratokarzinomazellen P19 und NT2/D1, sowie in der aus einem humanen Trophoblasttumor hervorgegangenen Zelllinie JEG3 nachgewiesen werden. Diese drei Zelllinien kamen somit als Modellsysteme für die funktionelle Untersuchung des putativen Promotorareals in Frage. Anschließende Reporteranalysen konnten eine hohe Promotoraktivität der Region stromaufwärts des Transkriptionsstartpunktes mGCNF-C1 in P19- und NT2/D1-Zellen zeigen. Eine Untersuchung der Promotoraktivität in JEG3-Zellen war aufgrund der zu niedrigen Transfektionseffizienz, die erreicht wurde, nicht möglich.

Somit konnte erstmalig der in P19- und NT2/D1-Zellen für die GCNF-Expression verantwortliche Promotor lokalisiert werden und eine Variabilität des GCNF-Transkripts im 5' untranslatierten Bereich gezeigt werden. Diese Variabilität bietet bereits einen ersten Erklärungsansatz für die bislang

beobachtete räumlich und zeitlich streng regulierte GCNF-Expression. Da alle drei neuen cDNS-Spezies aus Maus-Testis isoliert wurden, ist anzunehmen, daß in Testis alle hier identifizierten Transkriptionsstartpunkte funktionell aktiv sind. Die diesbezügliche Situation in Teratokarzinomazellen ist dagegen im Detail noch ungeklärt.

GCNF, erstmals 1994 aufgrund seiner Ähnlichkeit mit Retinsäurerezeptoren entdeckt (50), wird beim sich entwickelnden Embryo von Tag 6.5 bis 10.5 vor allem im Neuroektoderm exprimiert (62). Im adulten Organismus findet man eine hohe Expression in den Spermatozyten und runden Spermatischen im Hoden, in den Ovarien und in der Plazenta (50, 53, 56, 64, 65, 67). Dieses Expressionsmuster deutet auf eine wesentliche Rolle im Rahmen von Differenzierungsprozessen hin. Diese These wird durch weitere Beobachtungen unterstrichen:

- 1) Es konnte gezeigt werden, daß sowohl eine Überexpression, als auch die Expression einer dominant-negativen GCNF-Variante in *Xenopus* zu einer gestörten Organogenese führt (71).
- 2) Der GCNF-*knockout* ist embryonal letal (68-70)
- 3) GCNF erfährt eine retinsäureinduzierte transiente Hochregulation in embryonalen Teratokarzinomzelllinien, die ein wertvolles Modellsystem für Differenzierungsprozesse in Säugern darstellen (72, 73).
- 4) GCNF spielt eine Rolle in der Spermatogenese (50, 51, 55, 65-67).
- 5) Unter Anwendung einer Cre/loxP-Strategie konnte eine oozytenspezifische *knockout*-Maus generiert werden, die eine ausgeprägte Hypofertilität zur Folge hat (141, 142).
- 6) Oct4, ein Stammzellmarker, ist ein Zielgen von GCNF und wird durch diesen reprimiert (68, 76, 78).

Die wahrscheinliche Rolle von GCNF in Differenzierungsprozessen und insbesondere die Tatsache, daß die GCNF-Expression eine Retinsäure-induzierte transiente Hochregulation erfährt, stellen die Grundlage für die Frage nach der transkriptionellen Beeinflußbarkeit des GCNF-Promotors durch Retinsäurederivate. In der Tat konnte eine deutliche transiente Steigerung der basalen Promotoraktivität durch ATRA und 9-cis-Retinsäure gezeigt werden. Durch die Anwendung von Deletionskonstrukten konnte der durch ATRA

induzierte Effekt auf einen Bereich zwischen den Positionen -971 und -605 eingegrenzt werden. Ein klassisches DR5 Retinsäure-Response-Element (RARE) konnte in diesem Bereich, wie auch in der übrigen Sequenz, nicht identifiziert werden. Allerdings konnte ein DR1-ähnliches Element in diesem Bereich identifiziert werden. DR1-Elemente sind gleichfalls in der Lage ATRA induzierte Genexpression durch RAR-Heterodimere zu vermitteln. Im Gegensatz zu ATRA konnten durch 9-cis-Retinsäure alle Deletionskonstrukte induziert werden, so daß hier mit den verwendeten Deletionskonstrukten keine Eingrenzung der Induzierbarkeit möglich war. Interessanterweise zeigte sich aber eine deutlich geringere Induktion durch 9-cis-Retinsäure im Fall des kleinsten Promotorkonstrukts. Diese Beobachtung unterstreicht die Funktionalität des identifizierten DR-1-ähnlichen Elements. Für einen weiteren Nachweis hierfür war es nun notwendig eine Bindung von Retinsäurerezeptoren nachzuweisen. Eine Möglichkeit Protein-DNS-Interaktionen nachzuweisen bietet der *electrophoretic mobility shift assay* (EMSA). Eine DNS-Bindung von RAR α und RXR α im EMSA konnte jedoch nicht gezeigt werden (Ergebnisse in der vorliegenden Arbeit nicht gezeigt, da die entsprechenden Versuche freundlicherweise von Dr. Moritz Hentschke durchgeführt wurden). Dies alleine schließt jedoch die Funktionalität dieses DR1-Elements nicht aus, zumal verschiedene Isoformen für RAR bekannt sind und davon nur eine untersucht wurde. Letztendlich bleibt die Frage der Funktionalität dieses DR1-Elements zum gegenwärtigen Zeitpunkt ungeklärt. Eine Sequenzanalyse hinsichtlich weiterer potentieller Bindungsstellen für Transkriptionsfaktoren ergab zusätzliche Erklärungsmöglichkeiten für die Retinsäureinduzierbarkeit des identifizierten Promotors und die unterschiedlichen Beobachtungen bezüglich des ATRA- und 9-cis-Retinsäure-Effekts auf die einzelnen Deletionskonstrukte.

Mit Hilfe des Programms MatInspector (86) konnten diverse potentielle Bindungsstellen für Transkriptionsfaktoren identifiziert werden. Unter anderem konnten auf diesem Wege zwei putative Bindungsstellen für Sp1 an den Positionen -738 und -569 und insgesamt fünf putative Bindungsstellen für den Transkriptionsfaktor AP-1 stromaufwärts des kleinsten Deletionskonstruktes lokalisiert werden. Somit sind Bindungsstellen für Sp1 in allen Deletionskonstrukten vorhanden, wogegen keine Bindungsstellen für AP-1 im kleinsten Deletionskonstrukt vorliegen. Beide Transkriptionsfaktoren sind als

mögliche Mitspieler für die durch Retinsäurederivate regulierte Genexpression bekannt. Für ATRA und 9-cis-Retinsäure ist eine aktivierende Wirkung auf die Genexpression durch eine Verstärkung der Sp1-Bindung an sein Bindungselement in bestimmten Promotoren bekannt (143, 144). Ferner ist bekannt, daß nukleäre Rezeptoren durch eine Interaktion mit AP-1 die Genexpression sowohl im positivem, wie auch im negativem Sinne beeinflussen können (145). Hao et al. (2003) ist es erst kürzlich gelungen molekulare Zusammenhänge für beide Interaktionen aufzudecken (146). Anhand des Folsäurerezeptor-Promotors, der Bindungsstellen für Sp1 und AP-1 besitzt, konnten sie eine direkte Protein-Protein-Interaktion zwischen allen drei Isoformen von RAR mit Sp1 und eine damit einhergehende Aktivierung der Genexpression im Fall von RAR α zeigen. Eine Interaktion von Sp1 mit RAR β und γ dagegen resultierte in einer Repression der Genexpression. Neben diesem Retinsäure-induziertem Effekt konnten sie eine Aktivierung der Genexpression über eine Verminderung der nukleären Protein-Bindung an ein AP-1-Bindungselement, welches im Fall des Folsäurerezeptor-Promotors ein Repressor-Element darstellt, nachweisen. Dabei konnte gezeigt werden, daß dieser Effekt nicht auf eine direkte ATRA-RAR-Interaktion zurückzuführen ist, sondern hierbei zellulär vermittelte Signale eine Rolle spielen (146). Überträgt man diese Resultate auf den hier identifizierten GCNF-Promotor, so erscheint es möglich, daß ähnliche Interaktionen eine Rolle in der Retinsäureinduzierbarkeit spielen könnten. Da in allen Deletionskonstrukten mindestens ein potentielles Bindungselement für Sp1 vorhanden ist, könnte die durch 9-cis-Retinsäure induzierte Zunahme der basalen Promotoraktivität Sp1-vermittelt sein. Die Tatsache, daß dem kleinsten Deletionskonstrukt ein Bindungselement für AP-1 fehlt, könnte eine mögliche Erklärung für die fehlende Induzierbarkeit dieses Konstruktes sein. Sofern die im GCNF-Promotor vorkommenden potentiellen Bindungsstellen für AP-1 funktionell relevant sind und darüber hinaus eine Repressor-Funktion haben, ist eine synergistische ATRA-induzierbare Aktivierung zusammen mit den Sp1-Bindungselementen denkbar. Nimmt man ferner an, daß die einzelnen RAR-Isoformen, wie im Fall des Folsäurerezeptor-Promotors, einen gegensätzlichen Effekt auf die Promotoraktivität ausüben, so könnte das Zusammenspiel der Bindungselemente für AP-1 und Sp1 die transiente Hochregulation der GCNF-Expression erklären. In einer Kotransfektion des Volllänge-Promotorkonstruktes mit einem Sp1-

Expressionsplasmid in P19-Zellen, die bekannterweise Retinsäurerezeptoren exprimieren, eine weitere Steigerung der basalen Promotoraktivität gezeigt werden konnte. Dies ist ein erster Hinweis für die Funktionalität der hier identifizierten Sp1-Bindungsstellen. Ein weiterer Baustein der Retinsäureinduzierbarkeit des mGCNF-Promotors könnte der Transkriptionsfaktor AP-2 darstellen. AP-2 ist ähnlich wie GCNF im Neuralrohr exprimiert und durch Retinsäure induzierbar (90-94). Es konnten diverse potentielle Bindungsstellen für AP-2 in allen Deletionskonstrukten identifiziert werden. Die Retinsäureinduzierbarkeit von AP-2 könnte somit eine Rolle in der durch Retinsäure bedingten transienten Hochregulation von GCNF spielen, obgleich in einer Kotransfektion kein Effekt von AP-2 β auf die basale Promotoraktivität festzustellen war. Da jedoch weitere Isoformen von AP-2 bekannt sind, welche nicht untersucht wurden, ist somit die Funktionalität der AP-2-Bindungselemente im mGCNF-Promotor nicht ausgeschlossen. Diese hier vorgeschlagenen Erklärungsansätze für die Retinsäureinduzierbarkeit des GCNF-Promotors sind zum gegenwärtigen Zeitpunkt rein hypothetisch und müßten durch weitere molekular- und zellbiologische Experimente bestätigt werden.

Anhand der identifizierten Transkriptionsstartpunkte konnte eine Einteilung der genomischen 5'-Region von mGCNF in drei Promotorareale (A, B, C) erfolgen. Die Suche nach potentiellen Bindungsstellen für Transkriptionsfaktoren zeigte eine hohe Dichte an putativen Bindungsstellen in dem in Teratokarzinomazellen aktiven Promotorareal C. Eine klassische TATA-Box konnte in diesem Bereich nicht lokalisiert werden. Es gibt zahlreiche in der Literatur bekannte Promotoren, denen eine TATA-Box fehlt. Unter anderem können Promotoren, denen eine TATA-Box fehlt, synergistisch durch den Transkriptionsfaktor Sp1 und Transkriptionsfaktoren der ETS-Familie aktiviert werden (147-149). Neben der bereits erwähnten Sp1-Bindungsstelle an Position -569, findet sich, ebenfalls im Promotorareal C gelegen, ein aus einem GGAA-Motif bestehendes ETS-Bindungselement an Position -600. Das Zusammenspiel dieser beiden Bindungselemente, die beide im Promotorareal C lokalisiert sind und in allen untersuchten Deletionskonstrukten vorkommen, könnte die hohe basale Aktivität des mGCNF-Promotors in Teratokarzinomazellen bedingen. Eine TATA-ähnliche Sequenz konnte stromaufwärts des Transkriptionsstartpunktes mGCNF-A

identifiziert werden. Dieser TATA-Box könnte bei funktioneller Relevanz eine Funktion in der Promotoraktivierung in Testis zukommen.

Interessanterweise fanden sich bei der Sequenzanalyse weitere Bindungsstellen für SRY und SOX5, die beide ein ähnliches Expressionsmuster wie GCNF aufweisen und eine Rolle in der Geschlechtsdeterminierung (SRY) und Spermatogenese (SOX5) spielen (99, 101, 102). In einer Kotransfektion und anschließender Reporteranalyse konnte eine fast fünffache Aktivierung der basalen Promotoraktivität durch SOX5 gezeigt werden. Diese Beobachtung spricht für die funktionelle Relevanz der identifizierten Bindungselemente für SOX5 und deckt sich mit der Rolle von GCNF während der Spermatogenese und der Geschlechtsdeterminierung.

Die Identifikation und Charakterisierung eines genspezifischen Promotors ist essentiell für das Verständnis der Regulation der Genexpression. Darüber hinaus liefern Erkenntnisse über die Regulation eines Gens weitere wertvolle Informationen. So können z. B. anhand der Zusammensetzung der Transkriptionsfaktoren, die einen bestimmten Promotor regulieren, Rückschlüsse auf Expressionsmuster, Beteiligung an Signalkaskaden und Funktion des zugehörigen Gens geschlossen werden. In der hier vorliegenden Arbeit konnte der mGCNF-Promotor identifiziert und charakterisiert werden. Die hier gewonnenen Erkenntnisse geben einen Einblick in die komplexe Regulation des GCNF-Gens. Es bleibt abzuwarten ob und wie diese Erkenntnisse in Zukunft dazu beitragen können, die Funktion von GCNF weiter aufzuklären.

5. Zusammenfassung

Im Rahmen dieser Arbeit wurde der für die GCNF-Expression verantwortliche Promotor identifiziert und charakterisiert. Es konnten insgesamt fünf Transkriptionsstartpunkte und drei neue cDNS-Spezies durch 5' RACE und RNase-Schutzexperimente identifiziert werden. Die Zelllinien P19, NT2/D1 und JEG3 wurden durch einen Northern Blot mit Nachweis hoher Mengen des GCNF-Transkripts als mögliche Modellsysteme für funktionelle Untersuchungen des GCNF-Promotors identifiziert. Durch Reporteranalysen, unter Anwendung von verschiedenen langen Deletionskonstrukten, ist es gelungen eine starke Promotoraktivität in den Teratokarzinomazellen P19 und NT2/D1 für die als Promotor identifizierte genomische Region nachzuweisen. Ferner konnte im Rahmen dieser Reporteranalysen eine transiente Hochregulation der basalen Promotoraktivität durch ATRA und 9-cis-Retinsäure gezeigt werden. 9-cis-Retinsäure, Ligand für RXR, war in der Lage die basale Promotoraktivität aller untersuchten Deletionskonstrukte zu steigern. Dagegen zeigte sich keine derartige Induktion durch ATRA, Ligand für RAR, im Fall des kleinsten Deletionskonstruktes. Somit konnte ein genomischer Bereich eingegrenzt werden, der für die bislang beobachtete ATRA-induzierte transiente Hochregulation des GCNF-Transkripts und -Proteins mit verantwortlich zu sein scheint. In diesem Bereich konnte ein DR1-ähnliches Element lokalisiert werden, dessen Rolle in der ATRA-Induktion zum gegenwärtigen Zeitpunkt nicht eindeutig geklärt ist. Durch Software-gestützte Sequenzanalysen ist es schließlich gelungen ergänzende molekulare Erklärungsansätze für die komplexe Retinsäureinduktion zu entwerfen. So scheinen die Transkriptionsfaktoren Sp1, AP-1 und AP-2, für die diverse Bindungsstellen innerhalb des mGCNF-Promotors lokalisiert werden konnten, synergistische Bausteine der beobachteten Retinsäureinduzierbarkeit von GCNF zu sein. Weitere molekular- und zellbiologische Untersuchungen sind notwendig um diese Hypothesen zu belegen und weitere Regulationsmechanismen der GCNF-Expression aufzudecken.

6. Literaturverzeichnis

1. Baltimore, D. Our genome unveiled. *Nature*, 409: 814-816, 2001.
2. Ruvkun, G. and Hobert, O. The taxonomy of developmental control in *Caenorhabditis elegans*. *Science*, 282: 2033-2041, 1998.
3. Adams, M. D. et al. The genome sequence of *Drosophila melanogaster*. *Science*, 287: 2185-2195, 2000.
4. Levine, M. and Tjian, R. Transcription regulation and animal diversity. *Nature*, 424: 147-151, 2003.
5. Lander, E. S. et al. Initial sequencing and analysis of the human genome. *Nature*, 409: 860-921, 2001.
6. Aoyagi, N. and Wassarman, D. A. Genes encoding *Drosophila melanogaster* RNA polymerase II general transcription factors: diversity in TFIIA and TFIID components contributes to gene-specific transcriptional regulation. *J Cell Biol*, 150: F45-50, 2000.
7. Emery, J. G., Ohlstein, E. H., and Jaye, M. Therapeutic modulation of transcription factor activity. *Trends Pharmacol Sci*, 22: 233-240, 2001.
8. Latchman, D. S. Transcription-factor mutations and disease. *N Engl J Med*, 334: 28-33, 1996.
9. Kastner, P., Mark, M., and Chambon, P. Nonsteroid nuclear receptors: what are genetic studies telling us about their role in real life? *Cell*, 83: 859-869, 1995.
10. Papavassiliou, A. G. Molecular medicine. Transcription factors. *N Engl J Med*, 332: 45-47, 1995.
11. Pabo, C. O. and Sauer, R. T. Transcription factors: structural families and principles of DNA recognition. *Annu Rev Biochem*, 61: 1053-1095, 1992.
12. Karamouzis, M. V., Gorgoulis, V. G., and Papavassiliou, A. G. Transcription factors and neoplasia: vistas in novel drug design. *Clin Cancer Res*, 8: 949-961, 2002.
13. Lemon, B. and Tjian, R. Orchestrated response: a symphony of transcription factors for gene control. *Genes Dev*, 14: 2551-2569, 2000.
14. Roth, S. Y., Denu, J. M., and Allis, C. D. Histone acetyltransferases. *Annu Rev Biochem*, 70: 81-120, 2001.

15. Tsukiyama, T. The in vivo functions of ATP-dependent chromatin-remodelling factors. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 3: 422-429, 2002.
16. Featherstone, M. Coactivators in transcription initiation: here are your orders. *Curr Opin Genet Dev*, 12: 149-155, 2002.
17. Papavassiliou, A. G. Transcription-factor-modulating agents: precision and selectivity in drug design. *Mol Med Today*, 4: 358-366, 1998.
18. Orphanides, G., Lagrange, T., and Reinberg, D. The general transcription factors of RNA polymerase II. *Genes Dev*, 10: 2657-2683, 1996.
19. McKnight, R. A., Spencer, M., Wall, R. J., and Hennighausen, L. Severe position effects imposed on a 1 kb mouse whey acidic protein gene promoter are overcome by heterologous matrix attachment regions. *Mol Reprod Dev*, 44: 179-184, 1996.
20. Woychik, N. A. and Hampsey, M. The RNA polymerase II machinery: structure illuminates function. *Cell*, 108: 453-463, 2002.
21. Naar, A. M., Lemon, B. D., and Tjian, R. Transcriptional coactivator complexes. *Annu Rev Biochem*, 70: 475-501, 2001.
22. Evans, R. M. The steroid and thyroid hormone receptor superfamily. *Science*, 240: 889-895, 1988.
23. Mangelsdorf, D. J., Thummel, C., Beato, M., Herrlich, P., Schutz, G., Umesono, K., Blumberg, B., Kastner, P., Mark, M., Chambon, P., and et al. The nuclear receptor superfamily: the second decade. *Cell*, 83: 835-839, 1995.
24. Blumberg, B. and Evans, R. M. Orphan nuclear receptors--new ligands and new possibilities. *Genes Dev*, 12: 3149-3155, 1998.
25. McKenna, N. J. and O'Malley, B. W. Combinatorial control of gene expression by nuclear receptors and coregulators. *Cell*, 108: 465-474, 2002.
26. Schrader, W. T., Coty, W. A., Smith, R. G., and Malley, B. W. Purification and properties of progesterone receptors from chick oviduct. *Ann N Y Acad Sci*, 286: 64-80, 1977.
27. Giguere, V. Orphan nuclear receptors: from gene to function. *Endocr Rev*, 20: 689-725, 1999.
28. Kliewer, S. A., Lehmann, J. M., Milburn, M. V., and Willson, T. M. The PPARs and PXR: nuclear xenobiotic receptors that define novel

- hormone signaling pathways. *Recent Prog Horm Res*, *54*: 345-367; discussion 367-348, 1999.
29. Lees, J. A., Fawell, S. E., and Parker, M. G. Identification of constitutive and steroid-dependent transactivation domains in the mouse oestrogen receptor. *J Steroid Biochem*, *34*: 33-39, 1989.
 30. Tora, L., White, J., Brou, C., Tasset, D., Webster, N., Scheer, E., and Chambon, P. The human estrogen receptor has two independent nonacidic transcriptional activation functions. *Cell*, *59*: 477-487, 1989.
 31. Nagpal, S., Zelent, A., and Chambon, P. RAR-beta 4, a retinoic acid receptor isoform is generated from RAR-beta 2 by alternative splicing and usage of a CUG initiator codon. *Proc Natl Acad Sci U S A*, *89*: 2718-2722, 1992.
 32. Zelent, A., Mendelsohn, C., Kastner, P., Krust, A., Garnier, J. M., Ruffenach, F., Leroy, P., and Chambon, P. Differentially expressed isoforms of the mouse retinoic acid receptor beta generated by usage of two promoters and alternative splicing. *Embo J*, *10*: 71-81, 1991.
 33. Aranda, A. and Pascual, A. Nuclear hormone receptors and gene expression. *Physiol Rev*, *81*: 1269-1304, 2001.
 34. Bunone, G., Briand, P. A., Miksicek, R. J., and Picard, D. Activation of the unliganded estrogen receptor by EGF involves the MAP kinase pathway and direct phosphorylation. *Embo J*, *15*: 2174-2183, 1996.
 35. Giguere, V., Tini, M., Flock, G., Ong, E., Evans, R. M., and Otulakowski, G. Isoform-specific amino-terminal domains dictate DNA-binding properties of ROR alpha, a novel family of orphan hormone nuclear receptors. *Genes Dev*, *8*: 538-553, 1994.
 36. McBroom, L. D., Flock, G., and Giguere, V. The nonconserved hinge region and distinct amino-terminal domains of the ROR alpha orphan nuclear receptor isoforms are required for proper DNA bending and ROR alpha-DNA interactions. *Mol Cell Biol*, *15*: 796-808, 1995.
 37. Nagpal, S., Saunders, M., Kastner, P., Durand, B., Nakshatri, H., and Chambon, P. Promoter context- and response element-dependent specificity of the transcriptional activation and modulating functions of retinoic acid receptors. *Cell*, *70*: 1007-1019, 1992.

38. Khorasanizadeh, S. and Rastinejad, F. Nuclear-receptor interactions on DNA-response elements. *Trends Biochem Sci*, 26: 384-390, 2001.
39. Renaud, J. P. and Moras, D. Structural studies on nuclear receptors. *Cell Mol Life Sci*, 57: 1748-1769, 2000.
40. A unified nomenclature system for the nuclear receptor superfamily. *Cell*, 97: 161-163, 1999.
41. Laudet, V. Evolution of the nuclear receptor superfamily: early diversification from an ancestral orphan receptor. *J Mol Endocrinol*, 19: 207-226, 1997.
42. Mangelsdorf, D. J. and Evans, R. M. The RXR heterodimers and orphan receptors. *Cell*, 83: 841-850, 1995.
43. Glass, C. K. and Rosenfeld, M. G. The coregulator exchange in transcriptional functions of nuclear receptors. *Genes Dev*, 14: 121-141, 2000.
44. McKenna, N. J., Xu, J., Nawaz, Z., Tsai, S. Y., Tsai, M. J., and O'Malley, B. W. Nuclear receptor coactivators: multiple enzymes, multiple complexes, multiple functions. *J Steroid Biochem Mol Biol*, 69: 3-12, 1999.
45. McKenna, N. J., Lanz, R. B., and O'Malley, B. W. Nuclear receptor coregulators: cellular and molecular biology. *Endocr Rev*, 20: 321-344, 1999.
46. Moras, D. and Gronemeyer, H. The nuclear receptor ligand-binding domain: structure and function. *Curr Opin Cell Biol*, 10: 384-391, 1998.
47. Weatherman, R. V., Fletterick, R. J., and Scanlan, T. S. Nuclear-receptor ligands and ligand-binding domains. *Annu Rev Biochem*, 68: 559-581, 1999.
48. Baretino, D., Vivanco Ruiz, M. M., and Stunnenberg, H. G. Characterization of the ligand-dependent transactivation domain of thyroid hormone receptor. *Embo J*, 13: 3039-3049, 1994.
49. Danielian, P. S., White, R., Lees, J. A., and Parker, M. G. Identification of a conserved region required for hormone dependent transcriptional activation by steroid hormone receptors. *Embo J*, 11: 1025-1033, 1992.

50. Chen, F., Cooney, A. J., Wang, Y., Law, S. W., and O'Malley, B. W. Cloning of a novel orphan receptor (GCNF) expressed during germ cell development. *Mol Endocrinol*, 8: 1434-1444, 1994.
51. Hirose, T., O'Brien, D. A., and Jetten, A. M. RTR: a new member of the nuclear receptor superfamily that is highly expressed in murine testis. *Gene*, 152: 247-251, 1995.
52. Bauer, U. M., Schneider-Hirsch, S., Reinhardt, S., Pauly, T., Maus, A., Wang, F., Heiermann, R., Rentrop, M., and Maelicke, A. Neuronal cell nuclear factor--a nuclear receptor possibly involved in the control of neurogenesis and neuronal differentiation. *Eur J Biochem*, 249: 826-837, 1997.
53. Joos, T. O., David, R., and Dreyer, C. xGCNF, a nuclear orphan receptor is expressed during neurulation in *Xenopus laevis*. *Mech Dev*, 60: 45-57, 1996.
54. Braat, A. K., Zandbergen, M. A., De Vries, E., Van Der Burg, B., Bogerd, J., and Goos, H. J. Cloning and expression of the zebrafish germ cell nuclear factor. *Mol Reprod Dev*, 53: 369-375, 1999.
55. Agoulnik, I. Y., Cho, Y., Niederberger, C., Kieback, D. G., and Cooney, A. J. Cloning, expression analysis and chromosomal localization of the human nuclear receptor gene GCNF. *FEBS Lett*, 424: 73-78, 1998.
56. Susens, U. and Borgmeyer, U. Characterization of the human germ cell nuclear factor gene. *Biochim Biophys Acta*, 1309: 179-182, 1996.
57. Lei, W., Hirose, T., Zhang, L. X., Adachi, H., Spinella, M. J., Dmitrovsky, E., and Jetten, A. M. Cloning of the human orphan receptor germ cell nuclear factor/retinoid receptor-related testis-associated receptor and its differential regulation during embryonal carcinoma cell differentiation. *J Mol Endocrinol*, 18: 167-176, 1997.
58. Greschik, H. and Schule, R. Germ cell nuclear factor: an orphan receptor with unexpected properties. *J Mol Med*, 76: 800-810, 1998.
59. Greschik, H., Wurtz, J. M., Hublitz, P., Kohler, F., Moras, D., and Schule, R. Characterization of the DNA-binding and dimerization properties of the nuclear orphan receptor germ cell nuclear factor. *Mol Cell Biol*, 19: 690-703, 1999.

60. Yan, Z. and Jetten, A. M. Characterization of the repressor function of the nuclear orphan receptor retinoid receptor-related testis-associated receptor/germ cell nuclear factor. *J Biol Chem*, 275: 35077-35085, 2000.
61. Cooney, A. J., Hummelke, G. C., Herman, T., Chen, F., and Jackson, K. J. Germ cell nuclear factor is a response element-specific repressor of transcription. *Biochem Biophys Res Commun*, 245: 94-100, 1998.
62. Susens, U., Aguiluz, J. B., Evans, R. M., and Borgmeyer, U. The germ cell nuclear factor mGCNF is expressed in the developing nervous system. *Dev Neurosci*, 19: 410-420, 1997.
63. Borgmeyer, U. Dimeric binding of the mouse germ cell nuclear factor. *Eur J Biochem*, 244: 120-127, 1997.
64. Bauer, U. M., Schneider-Hirsch, S., Reinhardt, S., Benavente, R., and Maelicke, A. The murine nuclear orphan receptor GCNF is expressed in the XY body of primary spermatocytes. *FEBS Lett*, 439: 208-214, 1998.
65. Yang, G., Zhang, Y. L., Buchold, G. M., Jetten, A. M., and O'Brien, D. A. Analysis of germ cell nuclear factor transcripts and protein expression during spermatogenesis. *Biol Reprod*, 68: 1620-1630, 2003.
66. Zhang, Y. L., Akmal, K. M., Tsuruta, J. K., Shang, Q., Hirose, T., Jetten, A. M., Kim, K. H., and O'Brien, D. A. Expression of germ cell nuclear factor (GCNF/RTR) during spermatogenesis. *Mol Reprod Dev*, 50: 93-102, 1998.
67. Katz, D., Niederberger, C., Slaughter, G. R., and Cooney, A. J. Characterization of germ cell-specific expression of the orphan nuclear receptor, germ cell nuclear factor. *Endocrinology*, 138: 4364-4372, 1997.
68. Lan, Z. J., Chung, A. C., Xu, X., DeMayo, F. J., and Cooney, A. J. The embryonic function of germ cell nuclear factor is dependent on the DNA binding domain. *J Biol Chem*, 277: 50660-50667, 2002.
69. Cooney, A. J., Lee, C. T., Lin, S. C., Tsai, S. Y., and Tsai, M. J. Physiological function of the orphans GCNF and COUP-TF. *Trends Endocrinol Metab*, 12: 247-251, 2001.
70. Chung, A. C., Katz, D., Pereira, F. A., Jackson, K. J., DeMayo, F. J., Cooney, A. J., and O'Malley, B. W. Loss of orphan receptor germ cell nuclear factor function results in ectopic development of the tail bud and a novel posterior truncation. *Mol Cell Biol*, 21: 663-677, 2001.

71. David, R., Joos, T. O., and Dreyer, C. Anteroposterior patterning and organogenesis of *Xenopus laevis* require a correct dose of germ cell nuclear factor (xGCNF). *Mech Dev*, 79: 137-152, 1998.
72. Schmitz, T. P., Susens, U., and Borgmeyer, U. DNA binding, protein interaction and differential expression of the human germ cell nuclear factor. *Biochim Biophys Acta*, 1446: 173-180, 1999.
73. Heinzer, C., Susens, U., Schmitz, T. P., and Borgmeyer, U. Retinoids induce differential expression and DNA binding of the mouse germ cell nuclear factor in P19 embryonal carcinoma cells. *Biol Chem*, 379: 349-359, 1998.
74. Andrews, P. W. Retinoic acid induces neuronal differentiation of a cloned human embryonal carcinoma cell line in vitro. *Dev Biol*, 103: 285-293, 1984.
75. Jones-Villeneuve, E. M., Rudnicki, M. A., Harris, J. F., and McBurney, M. W. Retinoic acid-induced neural differentiation of embryonal carcinoma cells. *Mol Cell Biol*, 3: 2271-2279, 1983.
76. Fuhrmann, G., Chung, A. C., Jackson, K. J., Hummelke, G., Baniahmad, A., Sutter, J., Sylvester, I., Scholer, H. R., and Cooney, A. J. Mouse germline restriction of Oct4 expression by germ cell nuclear factor. *Dev Cell*, 1: 377-387, 2001.
77. Pesce, M., Wang, X., Wolgemuth, D. J., and Scholer, H. Differential expression of the Oct-4 transcription factor during mouse germ cell differentiation. *Mech Dev*, 71: 89-98, 1998.
78. Donovan, P. J. High Oct-ane fuel powers the stem cell. *Nat Genet*, 29: 246-247, 2001.
79. Umesono, K. and Evans, R. M. Determinants of target gene specificity for steroid/thyroid hormone receptors. *Cell*, 57: 1139-1146, 1989.
80. Susens, U. and Borgmeyer, U. Genomic structure of the gene for mouse germ-cell nuclear factor (GCNF). II. Comparison with the genomic structure of the human GCNF gene. *Genome Biol*, 2: RESEARCH0017, 2001.
81. Susens, U. and Borgmeyer, U. Genomic structure of the gene for mouse germ cell nuclear factor (GCNF). *Genome Biol*, 1: RESEARCH0006, 2000.

82. Quon, D. V., Delgadillo, M. G., Khachi, A., Smale, S. T., and Johnson, P. J. Similarity between a ubiquitous promoter element in an ancient eukaryote and mammalian initiator elements. *Proc Natl Acad Sci U S A*, *91*: 4579-4583, 1994.
83. 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*: 2583-2592, 2002.
84. 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*: 388-393, 2001.
85. Kanbe, E., Abe, A., Towatari, M., Kawabe, T., Saito, H., and Emi, N. DR1-like element in human topoisomerase IIalpha gene involved in enhancement of etoposide-induced apoptosis by PPARgamma ligand. *Exp Hematol*, *31*: 300-308, 2003.
86. Quandt, K., Frech, K., Karas, H., Wingender, E., and Werner, T. MatInd and MatInspector: new fast and versatile tools for detection of consensus matches in nucleotide sequence data. *Nucleic Acids Res*, *23*: 4878-4884, 1995.
87. Mermod, N., Williams, T. J., and Tjian, R. Enhancer binding factors AP-4 and AP-1 act in concert to activate SV40 late transcription in vitro. *Nature*, *332*: 557-561, 1988.
88. Naranjo, J. R., Mellstrom, B., Achaval, M., and Sassone-Corsi, P. Molecular pathways of pain: Fos/Jun-mediated activation of a noncanonical AP-1 site in the prodynorphin gene. *Neuron*, *6*: 607-617, 1991.
89. Hu, Y. F., Luscher, B., Admon, A., Mermod, N., and Tjian, R. Transcription factor AP-4 contains multiple dimerization domains that regulate dimer specificity. *Genes Dev*, *4*: 1741-1752, 1990.
90. Mitchell, P. J., Timmons, P. M., Hebert, J. M., Rigby, P. W., and Tjian, R. Transcription factor AP-2 is expressed in neural crest cell lineages during mouse embryogenesis. *Genes Dev*, *5*: 105-119, 1991.

91. Chazaud, C., Oulad-Abdelghani, M., Bouillet, P., Decimo, D., Chambon, P., and Dolle, P. AP-2.2, a novel gene related to AP-2, is expressed in the forebrain, limbs and face during mouse embryogenesis. *Mech Dev*, 54: 83-94, 1996.
92. Oulad-Abdelghani, M., Bouillet, P., Chazaud, C., Dolle, P., and Chambon, P. AP-2.2: a novel AP-2-related transcription factor induced by retinoic acid during differentiation of P19 embryonal carcinoma cells. *Exp Cell Res*, 225: 338-347, 1996.
93. Moser, M., Ruschoff, J., and Buettner, R. Comparative analysis of AP-2 alpha and AP-2 beta gene expression during murine embryogenesis. *Dev Dyn*, 208: 115-124, 1997.
94. Luscher, B., Mitchell, P. J., Williams, T., and Tjian, R. Regulation of transcription factor AP-2 by the morphogen retinoic acid and by second messengers. *Genes Dev*, 3: 1507-1517, 1989.
95. Williams, T. and Tjian, R. Analysis of the DNA-binding and activation properties of the human transcription factor AP-2. *Genes Dev*, 5: 670-682, 1991.
96. Boshier, J. M., Totty, N. F., Hsuan, J. J., Williams, T., and Hurst, H. C. A family of AP-2 proteins regulates c-erbB-2 expression in mammary carcinoma. *Oncogene*, 13: 1701-1707, 1996.
97. Pevny, L. H. and Lovell-Badge, R. Sox genes find their feet. *Curr Opin Genet Dev*, 7: 338-344, 1997.
98. Harley, V. R., Lovell-Badge, R., and Goodfellow, P. N. Definition of a consensus DNA binding site for SRY. *Nucleic Acids Res*, 22: 1500-1501, 1994.
99. Denny, P., Swift, S., Connor, F., and Ashworth, A. An SRY-related gene expressed during spermatogenesis in the mouse encodes a sequence-specific DNA-binding protein. *Embo J*, 11: 3705-3712, 1992.
100. Kanai, Y., Kanai-Azuma, M., Noce, T., Saido, T. C., Shiroishi, T., Hayashi, Y., and Yazaki, K. Identification of two Sox17 messenger RNA isoforms, with and without the high mobility group box region, and their differential expression in mouse spermatogenesis. *J Cell Biol*, 133: 667-681, 1996.

101. Mertin, S., McDowall, S. G., and Harley, V. R. The DNA-binding specificity of SOX9 and other SOX proteins. *Nucleic Acids Res*, 27: 1359-1364, 1999.
102. Wunderle, V. M., Critcher, R., Ashworth, A., and Goodfellow, P. N. Cloning and characterization of SOX5, a new member of the human SOX gene family. *Genomics*, 36: 354-358, 1996.
103. Briggs, M. R., Kadonaga, J. T., Bell, S. P., and Tjian, R. Purification and biochemical characterization of the promoter-specific transcription factor, Sp1. *Science*, 234: 47-52, 1986.
104. Kadonaga, J. T., Carner, K. R., Masiarz, F. R., and Tjian, R. Isolation of cDNA encoding transcription factor Sp1 and functional analysis of the DNA binding domain. *Cell*, 51: 1079-1090, 1987.
105. Thiesen, H. J. and Bach, C. Target Detection Assay (TDA): a versatile procedure to determine DNA binding sites as demonstrated on SP1 protein. *Nucleic Acids Res*, 18: 3203-3209, 1990.
106. Ko, L. J. and Engel, J. D. DNA-binding specificities of the GATA transcription factor family. *Mol Cell Biol*, 13: 4011-4022, 1993.
107. Simon, M. C. Gotta have GATA. *Nat Genet*, 11: 9-11, 1995.
108. Goebel, M. K. The PU.1 transcription factor is the product of the putative oncogene Spi-1. *Cell*, 61: 1165-1166, 1990.
109. Klemsz, M. J., McKercher, S. R., Celada, A., Van Beveren, C., and Maki, R. A. The macrophage and B cell-specific transcription factor PU.1 is related to the ets oncogene. *Cell*, 61: 113-124, 1990.
110. Moreau-Gachelin, F. Spi-1/PU.1: an oncogene of the Ets family. *Biochim Biophys Acta*, 1198: 149-163, 1994.
111. Scott, E. W., Simon, M. C., Anastasi, J., and Singh, H. Requirement of transcription factor PU.1 in the development of multiple hematopoietic lineages. *Science*, 265: 1573-1577, 1994.
112. McKercher, S. R., Torbett, B. E., Anderson, K. L., Henkel, G. W., Vestal, D. J., Baribault, H., Klemsz, M., Feeney, A. J., Wu, G. E., Paige, C. J., and Maki, R. A. Targeted disruption of the PU.1 gene results in multiple hematopoietic abnormalities. *Embo J*, 15: 5647-5658, 1996.
113. Hromas, R., Orazi, A., Neiman, R. S., Maki, R., Van Beveran, C., Moore, J., and Klemsz, M. Hematopoietic lineage- and stage-restricted

- expression of the ETS oncogene family member PU.1. *Blood*, *82*: 2998-3004, 1993.
114. Nerlov, C., Querfurth, E., Kulesa, H., and Graf, T. GATA-1 interacts with the myeloid PU.1 transcription factor and represses PU.1-dependent transcription. *Blood*, *95*: 2543-2551, 2000.
115. Boyd, K. E., Wells, J., Gutman, J., Bartley, S. M., and Farnham, P. J. c-Myc target gene specificity is determined by a post-DNA binding mechanism. *Proc Natl Acad Sci U S A*, *95*: 13887-13892, 1998.
116. Sirito, M., Lin, Q., Deng, J. M., Behringer, R. R., and Sawadogo, M. Overlapping roles and asymmetrical cross-regulation of the USF proteins in mice. *Proc Natl Acad Sci U S A*, *95*: 3758-3763, 1998.
117. Kiermaier, A., Gawn, J. M., Desbarats, L., Saffrich, R., Ansorge, W., Farrell, P. J., Eilers, M., and Packham, G. DNA binding of USF is required for specific E-box dependent gene activation in vivo. *Oncogene*, *18*: 7200-7211, 1999.
118. Reisman, D. and Rotter, V. The helix-loop-helix containing transcription factor USF binds to and transactivates the promoter of the p53 tumor suppressor gene. *Nucleic Acids Res*, *21*: 345-350, 1993.
119. Cogswell, J. P., Godlevski, M. M., Bonham, M., Bisi, J., and Babiss, L. Upstream stimulatory factor regulates expression of the cell cycle-dependent cyclin B1 gene promoter. *Mol Cell Biol*, *15*: 2782-2790, 1995.
120. Kawakami, K., Scheidereit, C., and Roeder, R. G. Identification and purification of a human immunoglobulin-enhancer-binding protein (NF-kappa B) that activates transcription from a human immunodeficiency virus type 1 promoter in vitro. *Proc Natl Acad Sci U S A*, *85*: 4700-4704, 1988.
121. Baeuerle, P. A. and Baltimore, D. NF-kappa B: ten years after. *Cell*, *87*: 13-20, 1996.
122. Zabel, U., Schreck, R., and Baeuerle, P. A. DNA binding of purified transcription factor NF-kappa B. Affinity, specificity, Zn²⁺ dependence, and differential half-site recognition. *J Biol Chem*, *266*: 252-260, 1991.
123. Hirano, F., Tanaka, H., Hirano, Y., Hiramoto, M., Handa, H., Makino, I., and Scheidereit, C. Functional interference of Sp1 and NF-kappaB through the same DNA binding site. *Mol Cell Biol*, *18*: 1266-1274, 1998.

124. Darnell, J. E., Jr., Kerr, I. M., and Stark, G. R. Jak-STAT pathways and transcriptional activation in response to IFNs and other extracellular signaling proteins. *Science*, *264*: 1415-1421, 1994.
125. Schindler, C. and Darnell, J. E., Jr. Transcriptional responses to polypeptide ligands: the JAK-STAT pathway. *Annu Rev Biochem*, *64*: 621-651, 1995.
126. Ramana, C. V., Chatterjee-Kishore, M., Nguyen, H., and Stark, G. R. Complex roles of Stat1 in regulating gene expression. *Oncogene*, *19*: 2619-2627, 2000.
127. Montminy, M. R., Sevarino, K. A., Wagner, J. A., Mandel, G., and Goodman, R. H. Identification of a cyclic-AMP-responsive element within the rat somatostatin gene. *Proc Natl Acad Sci U S A*, *83*: 6682-6686, 1986.
128. Comb, M., Birnberg, N. C., Seasholtz, A., Herbert, E., and Goodman, H. M. A cyclic AMP- and phorbol ester-inducible DNA element. *Nature*, *323*: 353-356, 1986.
129. Mayr, B. M., Canettieri, G., and Montminy, M. R. Distinct effects of cAMP and mitogenic signals on CREB-binding protein recruitment impart specificity to target gene activation via CREB. *Proc Natl Acad Sci U S A*, *98*: 10936-10941, 2001.
130. Don, J. and Stelzer, G. The expanding family of CREB/CREM transcription factors that are involved with spermatogenesis. *Mol Cell Endocrinol*, *187*: 115-124, 2002.
131. van der Stoep, N., Quinten, E., and van den Elsen, P. J. Transcriptional regulation of the MHC class II trans-activator (CIITA) promoter III: identification of a novel regulatory region in the 5'-untranslated region and an important role for cAMP-responsive element binding protein 1 and activating transcription factor-1 in CIITA-promoter III transcriptional activation in B lymphocytes. *J Immunol*, *169*: 5061-5071, 2002.
132. Ringold, G. M., Yamamoto, K. R., Bishop, J. M., and Varmus, H. E. Glucocorticoid-stimulated accumulation of mouse mammary tumor virus RNA: increased rate of synthesis of viral RNA. *Proc Natl Acad Sci U S A*, *74*: 2879-2883, 1977.

133. Payvar, F., DeFranco, D., Firestone, G. L., Edgar, B., Wrangle, O., Okret, S., Gustafsson, J. A., and Yamamoto, K. R. Sequence-specific binding of glucocorticoid receptor to MTV DNA at sites within and upstream of the transcribed region. *Cell*, *35*: 381-392, 1983.
134. Perlmann, T., Eriksson, P., and Wrangle, O. Quantitative analysis of the glucocorticoid receptor-DNA interaction at the mouse mammary tumor virus glucocorticoid response element. *J Biol Chem*, *265*: 17222-17229, 1990.
135. Herrlich, P. Cross-talk between glucocorticoid receptor and AP-1. *Oncogene*, *20*: 2465-2475, 2001.
136. Jonat, C., Rahmsdorf, H. J., Park, K. K., Cato, A. C., Gebel, S., Ponta, H., and Herrlich, P. Antitumor promotion and antiinflammation: down-modulation of AP-1 (Fos/Jun) activity by glucocorticoid hormone. *Cell*, *62*: 1189-1204, 1990.
137. Chang, T. J., Scher, B. M., Waxman, S., and Scher, W. Inhibition of mouse GATA-1 function by the glucocorticoid receptor: possible mechanism of steroid inhibition of erythroleukemia cell differentiation. *Mol Endocrinol*, *7*: 528-542, 1993.
138. Akerblom, I. E., Slater, E. P., Beato, M., Baxter, J. D., and Mellon, P. L. Negative regulation by glucocorticoids through interference with a cAMP responsive enhancer. *Science*, *241*: 350-353, 1988.
139. Gauthier, J. M., Bourachot, B., Doucas, V., Yaniv, M., and Moreau-Gachelin, F. Functional interference between the Spi-1/PU.1 oncoprotein and steroid hormone or vitamin receptors. *Embo J*, *12*: 5089-5096, 1993.
140. Ray, A. and Prefontaine, K. E. Physical association and functional antagonism between the p65 subunit of transcription factor NF-kappa B and the glucocorticoid receptor. *Proc Natl Acad Sci U S A*, *91*: 752-756, 1994.
141. Lan, Z. J., Gu, P., Xu, X., Jackson, K. J., DeMayo, F. J., O'Malley, B. W., and Cooney, A. J. GCNF-dependent repression of BMP-15 and GDF-9 mediates gamete regulation of female fertility. *Embo J*, *22*: 4070-4081, 2003.
142. Lan, Z. J., Xu, X., and Cooney, A. J. Generation of a germ cell nuclear factor conditional allele in mice. *Genesis*, *37*: 172-179, 2003.

143. Suzuki, Y., Shimada, J., Shudo, K., Matsumura, M., Crippa, M. P., and Kojima, S. Physical interaction between retinoic acid receptor and Sp1: mechanism for induction of urokinase by retinoic acid. *Blood*, *93*: 4264-4276, 1999.
144. Shimada, J., Suzuki, Y., Kim, S. J., Wang, P. C., Matsumura, M., and Kojima, S. Transactivation via RAR/RXR-Sp1 interaction: characterization of binding between Sp1 and GC box motif. *Mol Endocrinol*, *15*: 1677-1692, 2001.
145. Pfahl, M. Nuclear receptor/AP-1 interaction. *Endocr Rev*, *14*: 651-658, 1993.
146. Hao, H., Qi, H., and Ratnam, M. Modulation of the folate receptor type beta gene by coordinate actions of retinoic acid receptors at activator Sp1/ets and repressor AP-1 sites. *Blood*, *101*: 4551-4560, 2003.
147. Gegonne, A., Bosselut, R., Bailly, R. A., and Ghysdael, J. Synergistic activation of the HTLV1 LTR Ets-responsive region by transcription factors Ets1 and Sp1. *Embo J*, *12*: 1169-1178, 1993.
148. Chen, H. M., Pahl, H. L., Scheibe, R. J., Zhang, D. E., and Tenen, D. G. The Sp1 transcription factor binds the CD11b promoter specifically in myeloid cells in vivo and is essential for myeloid-specific promoter activity. *J Biol Chem*, *268*: 8230-8239, 1993.
149. Dittmer, J., Gegonne, A., Gitlin, S. D., Ghysdael, J., and Brady, J. N. Regulation of parathyroid hormone-related protein (PTHrP) gene expression. Sp1 binds through an inverted CACCC motif and regulates promoter activity in cooperation with Ets1. *J Biol Chem*, *269*: 21428-21434, 1994.

7 Anhang

7.1 Abkürzungen

| | |
|-------|---|
| AF | Aktivierungsfunktion |
| AP | Alkalische Phosphatase |
| APS | Ammoniumpersulfat |
| ATRA | all-trans-Retinsäure |
| BAC | <i>Bacterial Artificial Chromosome</i> |
| β-Gal | β-Galaktosidase |
| bp | Basenpaare |
| BSA | Bovines Serumalbumin |
| CMV | Cytomegalievirus |
| CTE | <i>C-terminal Extension</i> |
| DBD | DNS-Bindungsdomäne |
| DMEM | <i>Dulbecco`s Modified Eagle`s Medium</i> |
| DNS | Desoxyribonukleinsäure |
| DR | <i>Direct Repeat</i> |
| DTT | 1.4-Dithiothreitol |
| EDTA | Ethylendinitrilotetraessigsäure |
| EMSA | <i>Electrophoretic Mobility Shift Assay</i> |
| FCS | <i>Fetal Calf Serum</i> |
| GCNF | <i>Germ Cell Nuclear Factor</i> |
| GTF | Generelle Transkriptionsfaktoren |
| hGCNF | <i>Humaner Germ Cell Nuclear Factor</i> |
| kb | Kilobasen |
| kDa | Kilodalton |
| LBD | Ligandenbindungsdomäne |
| mGCNF | <i>Muriner Germ Cell Nuclear Factor</i> |
| MOPS | 3-(N-Morpholino)-Propansulfat |
| mRNS | <i>Messenger Ribonukleinsäure</i> |
| NCS | <i>Newborn Calf Serum</i> |
| NGF | <i>Neural Growth Factor</i> |
| OD | Optische Dichte |

| | |
|--------|---|
| PCR | <i>Polymerase Chain Reaction</i> |
| POL II | RNS-Polymerase II |
| RACE | <i>Rapid Amplification of cDNA Ends</i> |
| RAR | <i>Retinoic Acid Receptor</i> |
| RARE | <i>Retinsäure-Response-Element</i> |
| RE | <i>Response Element</i> |
| RLM | <i>RNA-ligase mediated</i> |
| rlu | <i>relative light units</i> |
| RNS | Ribonukleinsäure |
| RPA | <i>RNase protection Assay</i> |
| RXR | <i>Retinoid-X-Receptor</i> |
| SDS | <i>Sodium Dodecyl Sulfat</i> |
| SNP | <i>Single-Nucleotide-Polymorphismen</i> |
| SOX | <i>SRY-related HMG box</i> |
| STET | Sucrose-Triton-EDTA-Tris Puffer |
| STF | Sequenzspezifische Transkriptionsfaktoren |
| TAF | TBP-assoziierte-Faktoren |
| TBE | Tris-Borsäure-EDTA Puffer |
| TBP | TATA-Box bindendes Protein |
| Tris | Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan |

7.2 Verwendete Oligonukleotide

XR5-113R

TCT TCC ACG GGG GGA GGG GGC TGT CA

XR5-R75b

AGA GAG TGC GGC GGC CGA GAG CCT GC

XR5-screen-for

GTA TAG ATT CTA TTT GCA TAC GAA C

XR5-screen-rev

TCT GGG AAA TGT AGT CCT CCC AAC GAG

-247-for

CCA GAA TTC CTC ACG GGC ATG TGC GTG GC

-550-rev

GAG CAC GTG CAA CCA AGC CCA GCC CTG TGG

-966-for

CGA TTC TTA TTA CAC CTC TCA TTT TTG AGA C

-1032-rev

AAT AAA ATC CTG GAT TTT CTC CCC TTC CTC

-1141-for

TGA AAA TCA CCA CCA CCC CTA ATC CTG AGA G

-2206-rev

TGA AGT GGT TAT GAC TTT GAC AAG GGT TCT

-2586-for

CGG GAG TGA GTA AAG GGA TTG GCT GGT TTT G

-2740-for

CTG TAA ACT CAG AGC AGA GGG CAC TTC TCA GG

-3084-rev

TGA GAT AGA AAG CAC CCA AAG TGG GGG

-3722-for

TCG TTC CTG GCT GTT CTG GAA CTC ATT C

RPA-for

TGA TCA CGA ATA AGT TAC AAT AG

RPA-rev

AGA GAA AGA GGG GGT CGC G

RACE-1

CGT GAG GAA TTC TGG GAA ATG TAG T

RACE-2

ACG CGC CGC TGC CAC GCA CAT

RACE-3

CTG GCC AGC TCC CTC CTC TGA C

7.3 Danksagung

Mein Dank gilt:

Prof. Dr. Chica Schaller für die Bereitstellung des Arbeitsplatzes in ihrem Institut.

PD Dr. Uwe Borgmeyer, meinem Betreuer und Doktorvater, der mir mit einer enormen Geduld, die schier unerschöpflich schien, das wissenschaftliche Arbeiten beigebracht hat.

Ute Süsens, bei der ich eine ganze Menge gelernt habe, die mir stets bei methodischen Fragestellungen zur Seite stand, und die nicht selten für mich die Sachen fand, die ich suchte.

PD Dr. Irm Hermans-Borgmeyer für ihre ausdauernde seelische und tatkräftige Unterstützung bei den RNase Schutzexperimenten und für den unendlichen Vorrat an guten Ideen.

PD Dr. Sabine Hoffmeister-Ullerich, der die guten Ideen gleichfalls nie ausgingen und die zusammen mit PD Dr. Irm Hermans-Borgmeyer stets hilfs- und diskussionsbereit war.

PD Dr. Ingolf Bach für die Bereitstellung der Sp1-, GATA-1-, Sox-5- und PU.1-Expressionsplasmide.

Dr. Meriem Rezgaoui, Dr. Susanne Hellebrand, Dr. Julia Lintzel, Dr. Till Schmitz, Dr. Jan Lewerenz, Frank Leypold, Dr. Björn Riedel, Dr. Moritz Hentschke, die alle, bis auf Frank, vor mir promovierten, und mit denen es zu jedem Zeitpunkt eine große Freude war zusammenzuarbeiten.

Lâle Paula und Viviane für die Bereicherung meines Lebens.

Eine bessere Betreuung und Arbeitsatmosphäre hätte ich mir nicht vorstellen können.

7.4 Lebenslauf

Name: Eray Gökkurt
Geburtsdatum: 29.12.1973
Geburtsort: Flensburg
Adresse: Gottschedstr. 9, 22301 Hamburg

Schulausbildung

1980 - 1984 Grundschole Ramsharde in Flensburg
 1984 - 1986 Augusta-Viktoria-Gymnasium in Flensburg
 1986 - 1987 Antalya-Kolleg in Antalya, Türkei
 1987 - 1993 Margaretha-Rothe-Gymnasium in Hamburg
 06/1993 Abitur

Studium

04/1994 – 10/2001 Medizinstudium an der Universität Hamburg

Promotion

seit 10/2001 Charakterisierung der murinen Germ Cell Nuclear Factor (GCNF)-Promotors“
 Institut für Entwicklungsneurobiologie
 Zentrum für molekulare Neurobiologie Hamburg
 Stipendiat des Graduiertenkollegs „Neurale Signaltransduktion und deren pathologischen Störungen“

Berufliche Tätigkeit

01/2002 – 06/2003 Tätig als Arzt im Praktikum in der Klinik und Poliklinik für Innere Medizin, II. Medizinische Klinik, Abteilung für Hämatologie und Onkologie, UKE, Hamburg
 (Direktor: Prof. Dr. D.K. Hossfeld)

seit 07/2003 Wissenschaftlicher Mitarbeiter in der Klinik und Poliklinik für Innere Medizin, II. Medizinische Klinik, Abteilung für Hämatologie und Onkologie, UKE, Hamburg
 (Direktor: Prof. Dr. D.K. Hossfeld)

E. Gökkurt

Hamburg, 13.01.2004

7.5 Publikationen

J. Stoehlmacher, E. Goekkurt, H. J. Lenz. (2003). Pharmacogenetic aspects in treatment of colorectal cancer - an update. *Pharmacogenomics*. Nov;4(6):767-77.

Poster und Abstracts

E. Goekkurt, U. Suesens, M. Hentschke, I. Hermans-Borgmeyer, U. Borgmeyer. Characterization of the mouse germ cell nuclear factor gene promoter. Abstract No 1054. *Onkologie Suppl.* (2003)

G. Schilling, E. Goekkurt, P. Schafhausen, M. Werner, D. K. Hossfeld. (2003) Extramedullary relapse of chronic myelogenous leukemia after related allogeneic hematopoietic stem cell transplantation, diagnosed by interphase fluorescence in situ hybridization on paraffin-embedded tumor material. Abstract No: 660. *Onkologie Suppl.* (2003)

S. Hegewisch-Becker, A. Corovic, E. Jaeger, E. Goekkurt, J. Panse, A. Nierhaus, D. K. Hossfeld. Whole body hyperthermia (WBH, 41.8 C) combined with carboplatin and etoposide in advanced biliary tract cancer. Abstract No: 1247 *Proc. Am. Soc. Clin. Oncol.* (2003)

7.6 Erklärung nach §4 der Promotionsordnung

Ich versichere ausdrücklich, daß die Arbeit selbständig und ohne fremde Hilfe verfaßt, andere als die von mir angegebenen Quellen und Hilfsmittel nicht benutzt und die aus den benutzten Werken wörtlich oder inhaltlich entnommenen Stellen einzeln nach Ausgabe (Auflage und Jahr des Erscheinens), Band und Seite des benutzten Werkes kenntlich gemacht wurden.

Ferner versichere ich, daß die Dissertation bisher nicht einem Fachvertreter einer anderen Hochschule zur Überprüfung vorgelegt oder ich mich anderweitig um eine Zulassung zur Promotion beworben habe.

Eray Gökkurt