

Aus dem Zentrum für Innere Medizin der Philipps-Universität Marburg
Abteilung Gastroenterologie und Endokrinologie

Eingereicht über das Institut für Veterinärpathologie
der Justus-Liebig-Universität Gießen

**Transkriptionelle Regulation des
Wachstumsfaktors Gastrin beim Kleinzelligen-
und Nichtkleinzelligen Bronchialkarzinom**

INAUGURAL-DISSERTATION

zur Erlangung des Doktorgrades
beim Fachbereich Veterinärmedizin
der Justus-Liebig-Universität Gießen

Eingereicht von Renate Zippert aus Marburg an der Lahn

Gießen 2000

Aus dem Zentrum für Innere Medizin der Philipps-Universität Marburg

Abteilung Gastroenterologie und Endokrinologie

Leiter: Prof. Dr. med. R. Arnold

Betreuerin: PD. Dr. med. B. Simon

Eingereicht über das Institut für Veterinärpathologie

der Justus-Liebig-Universität Gießen

Betreuer: Prof. Dr. Dr. hc. E. Weiss

**Transkriptionelle Regulation des
Wachstumsfaktors Gastrin beim Kleinzelligen-
und Nichtkleinzelligen Bronchialkarzinom**

INAUGURAL-DISSERTATION

zur Erlangung des Doktorgrades

beim Fachbereich Veterinärmedizin

der Justus-Liebig-Universität Gießen

Eingereicht von Renate Zippert aus Marburg an der Lahn

Gießen 2000

Mit Genehmigung des Fachbereiches Veterinärmedizin
der Justus-Liebig-Universität Gießen

Dekan: _____ Prof. Dr. Reinacher _____

1. Berichterstatter: _____ PD. Dr. B. Simon _____

2. Berichterstatter: _____ Prof. Dr. Dr. hc. Weiss _____

Tag der mündlichen Prüfung: 15. November 2000 _____

Für meine Eltern,
die mir mein Studium ermöglicht
und mich jederzeit unterstützt haben

Gefördert durch ein Promotionsstipendium
des Evangelischen Studienwerks e.V. Villigst, Schwerte

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung.....	1
1.1	Entstehung und Klassifikation des Bronchialkarzinoms	1
1.1.1	Kleinzellige Bronchialkarzinome (SCLC)	1
1.1.2	Nicht-kleinzellige Bronchialkarzinome (NSCLC)	2
1.2	Expression des Peptidhormons Gastrin	3
1.2.1	Strukturanalyse des Gastringens.....	4
1.3	Regulation der Genexpression in Eukaryoten	5
1.3.1	Promotorstrukturen.....	5
1.3.2	Transkriptionsfaktoren.....	7
1.3.3	Die Familie der Sp-Transkriptionsfaktoren.....	8
1.4	Aufgabenstellung	10
2	Material und Methoden	11
2.1	Geräte	11
2.1.1	Labor.....	11
2.1.2	Zellkultur	11
2.2	Chemikalien, Enzyme und Verbrauchsmaterialien	12
2.2.1	Chemikalien.....	12
2.2.2	Bakterienkultur	13
2.2.3	Zellkultur	13
2.2.4	Restriktionsendonukleasen und modifizierende Enzyme.....	14
2.2.5	Radioaktive Verbindungen	14
2.2.6	Verbrauchsmaterialien.....	14
2.3	Bakterienstämme.....	15
2.4	Zelllinien	15
2.5	Oligonukleotide	15
2.6	DNA-Konstrukte.....	16
2.7	Sicherheitsvorkehrungen und Abfallbeseitigung	17

2.8	Molekularbiologische Standardverfahren.....	17
2.8.1	Spaltung von DNA mit Restriktionsendonukleasen.....	18
2.8.2	Entfernen von Proteinen aus DNA-Lösungen.....	18
2.8.3	Fällen und Waschen von DNA.....	18
2.8.4	Quantifizierung von DNA.....	19
2.8.5	Quantifizierung von Proteinen.....	19
2.8.6	Elektrophoretische Trennung von DNA.....	19
2.8.6.1	Agarosegele.....	19
2.8.6.2	Acrylamidgele.....	20
2.8.6.3	Isolierung von DNA-Fragmenten aus Gelen.....	20
2.8.7	Präparation von Plasmid-DNA.....	20
2.8.7.1	Herstellung kompetenter Bakterienzellen.....	20
2.8.7.2	Transformation von E. coli mit Plasmiden.....	21
2.8.7.3	Analytische Lysate.....	21
2.8.7.4	Präparative Plasmidgewinnung.....	22
2.8.8	Herstellung radioaktiv markierter Oligonukleotidsonden.....	22
2.8.8.1	5'-Endmarkierung.....	22
2.8.8.2	Hybridisierung einzelsträngiger Oligonukleotide.....	22
2.8.8.3	Abtrennung freier Nukleotide.....	23
2.9	Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR).....	23
2.10	Sequenzierung, modifiziert nach Maxam-Gilbert.....	24
2.11	Herstellung von Kernextrakten.....	25
2.11.1	Kernextrakt-Präparation nach Dignam.....	25
2.11.2	Kernextrakt-Präparation nach Schreiber.....	26
2.12	Analyse von DNA-Protein-Interaktionen.....	27
2.12.1	Gelretardations-Experimente (Bandshifts).....	27
2.12.2	Gelretardations-Experimente mit Antikörpern (Supershifts).....	28
2.12.3	DNaseI-Footprinting.....	29
2.13	Zellkultur.....	30
2.13.1	Zelllinien und Kultivierung.....	30
2.13.2	Einfrieren und Auftauen von Zellen.....	31
2.13.3	Transiente Transfektion.....	31
2.13.3.1	Calcium-Phosphat-Methode.....	32

2.13.4	Bestimmung der Luciferase-Aktivität	32
2.13.5	Bestimmung der β -Galaktosidase-Aktivität	33
3	Ergebnisse.....	34
3.1	Der humane Gastrinpromotor	34
3.2	Zelltypspezifische Expression des hugas Luc 1300-Reporter- Genkonstruktes	34
3.3	Lokalisation <i>cis</i> -regulatorischer Elemente durch Deletions- analysen.....	36
3.3.1	Deletionsanalysen in der NSCLC-Zelllinie EPLC-32M1	36
3.3.2	Deletionsanalysen in der SCLC-Zelllinie NCI-H69	39
3.3.3	Zelltypspezifische Aktivität von 5'-Deletionskonstrukten des Gastrinpromotors	41
3.3.3.1	Vergleich der NSCLC-Zelllinien 32M1 und der Meso- theliom-Zelllinie MSTO-211H.....	41
3.3.3.2	Vergleich der SCLC-Zelllinie H69 mit der Mesotheliom- Zelllinie MSTO-211H	41
3.4	Serumstimulation von EPLC-32M1-Zellen.....	44
3.5	Charakterisierung <i>cis</i> -regulatorischer Elemente durch DNA- Protein-Interaktionen	45
3.5.1	Dnase-Protektionsversuche	47
3.5.2	Gelretardations-Experimente (Bandshifts).....	50
3.5.2.1	Bindungsaktivität bakteriell exprimierter Sp-Proteine und H69-Kernextrakte an das cRE-Element des Gastrin- promotors.....	50
3.5.2.2	Bindungsaktivität von bakteriell exprimierten Sp-Proteinen und RIN38A-Kernextrakten an das gERE- und CACCC- Element des Gastrinpromotors	52
3.5.2.3	Zelltypspezifische Bindung an das cRE-, gERE- und CACCC-Element.....	52
3.5.2.4	Spezifische Bindung an die huCACC WT- und CACC mt- Sequenz in SCLC-, NSCLC- und Mesotheliom-Zellen	55

3.5.2.5	DNA-Protein-Komplexe weisen die gleiche Bindungsspezifität an das CACCC-, cRE und gERE-Element des Gastrinpromotors auf.....	58
3.5.2.6	Bindungsspezifität von RIN38A-Kernextrakten an das gERE- Element.....	61
3.5.2.7	Bindungsspezifität von Kernextrakten der NSCLC-Zelllinie 32M1 an das gERE- Element.....	64
3.5.3	Gelretardations-Experimente mit polyklonalen Antikörpern (Supershifts).....	67
3.5.3.1	Sp-Proteine sind an der Bildung von DNA-Protein-Komplexen am CACCC-Element bei Ratteninsulinoma-, SCLC- und NSCLC-Zellen beteiligt	67
3.5.3.2	Sp-Proteine sind an der Bildung von DNA-Protein-Komplexen am cRE-Element bei NSCLC-Zellen beteiligt.....	72
3.5.3.3	Sp-Proteine sind an der Bildung von DNA-Protein-Komplexen am gERE-Element beteiligt	74
4	Diskussion	76
4.1	Regulation der Gastrinexpression.....	76
4.2	Zelltypspezifität der Gastrinpromotor-Expression in Lungentumor-Zellen	77
4.3	<i>Cis</i> -regulatorische Elemente des Gastrinpromotors in SCLC- und NSCLC-Zellen.....	78
4.3.1	Die proximale CACCC-Box ist ein negatives <i>cis</i> -regulatorisches Element.....	79
4.3.2	Das cRE-Element ist ein positives <i>cis</i> -regulatorisches Element.....	80
4.3.3	Das gERE-Element ist ein positives <i>cis</i> -regulatorisches Element.....	81
4.4	Der Einfluß von Wachstumsfaktoren auf die Expression des Gastrinpromotors.....	82

5	Zusammenfassung	84
6	Summary.....	85
7	Literaturverzeichnis	86
8	Anhang.....	99
8.1	Abkürzungen.....	99
8.2	Danksagung	101

1 Einleitung

Krebs steht in den Industrienationen nach Herz-Kreislaufkrankungen an zweiter Stelle der Todesursachen. Lungenkrebs zählt dabei zu der am häufigsten diagnostizierten Krebsform beim Menschen. Als Hauptursache mit ca. 90 % wird das Zigarettenrauchen angesehen, welches durch kanzerogene Inhaltsstoffe zur chronischen Entzündung der Bronchien mit Verlust des Flimmerepithels und Ersatz durch Plattenepithel führt und so prädisponierend für eine tumoröse Entartung wirkt.

1.1 Entstehung und Klassifikation des Bronchialkarzinoms

Bei einem vereinfachten Modell der Krebsentstehung unterscheidet man mehrere Phasen: Die Initiation (Karzinogenexposition bis hin zur DNA-Schädigung), die Promotion (Exposition von nicht DNA-schädigenden Substanzen, die jedoch die maligne Zelltransformation unterstützen) und schließlich die Progression (stufenweise Malignisierung transformierter Zellen). Für die Tumorentstehung sind dabei die Inaktivierung tumorsupprimierender Genprodukte oder aber die Aktivierung von Proteinen, die in Wachstum und Differenzierung eingreifen, verantwortlich (Lorenz, 1994). Zum Verständnis regulativer Prozesse ist daher die Untersuchung der malignen Transformation auf DNA-Ebene an Tumorzellen von großer Bedeutung. Bronchialkarzinome lassen sich aufgrund ihrer histologischen Merkmale in zwei große Gruppen unterteilen, die kleinzelligen (SCLC) und nicht-kleinzelligen (NSCLC) Tumoren, wobei Mischformen auftreten können. Bei den nichtkleinzelligen Karzinomen unterscheidet man zwischen Adenokarzinomen (ADC), Plattenepithelkarzinomen (SCC) und großzelligen, undifferenzierten Karzinomen (LCC) (Müller et al., 1995), kleinzellige Karzinome werden nicht weiter differenziert.

1.1.1 Kleinzellige Bronchialkarzinome (SCLC)

SCLC werden bei etwa 25 % aller Primärtumoren der Lunge diagnostiziert (Carney et al., 1985). Die Bezeichnung leitet sich vom histologischen Bild eines durchschnittlichen kleinen Zellkerns von 5,1µm und der Gesamtzelle von ca. 6,6 µm ab (Müller und Theile, 1994). Kleinzellige Bronchialkarzinome zeichnen sich durch schnelles und aggressives

Wachstum aus, die Tumoren treten zur Zeit der Diagnose meist schon disseminiert auf und sind somit chirurgisch nicht mehr zu entfernen. Weiterhin zeigen sie eine hohe Sensibilität gegenüber zytotoxischen Chemotherapeutika (Aoyagi et al., 1995), die Prognose ist jedoch sehr schlecht und weniger als 10 % aller Patienten zeigen eine vollständige klinische Heilung (Carney et al., 1985). Zytogenetisch weisen 100 % aller SCLC-Zelllinien eine interstitielle Deletion des Chromosoms 3p auf, vor allem der Abschnitte 3p14-23 und 3p25 (Lorenz, 1994; Johnson und Kelley, 1995). Neben anderen Deletionen oder Translokationen kommen eine Herabsetzung oder ein Fehlen der Expression von mRNA des Retinoblastom(Rb)-Tumorsuppressorgens bei 55 % aller SCLC vor, und ein Fehlen des Proteins konnte in 80 % der Tumoren und Zelllinien gezeigt werden (Lorenz, 1994; Johnson und Kelley, 1995; Roth, 1995). Dieses für die Regulation des Zellzyklus wichtige Tumorsuppressorgen fehlt also bei diesen Tumoren. SCLCs und abgeleitete Zelllinien werden außerdem durch die Sezernierung neuroendokriner Marker wie L-Dopa-Decarboxylase (DDC), Chromogranin A und neuronspezifischer Enolase (NSE) charakterisiert und exprimieren neben der neuronalen Form der Kreatinkinase (CK-BB) zum Teil bis zu zehn unterschiedliche Wachstumsfaktoren wie ACTH, Kalzitinin, Neuromedin B, Gastrin-releasing-Peptid (GRP), IGF-I (insulin-like growth factor), Gastrin, Neurotensin u.a. Viele dieser Faktoren besitzen mitogene Eigenschaften und binden an zelleigene Rezeptoren, wodurch die Zellen para- bzw. autokrin das Tumorstadium stimulieren können (Moody et al., 1981; Sethi et al., 1992; Lorenz, 1994; Carbone, 1997). Das GRP-System gehört dabei zu den am besten untersuchten: GRP weist große Homologien zum amphibischen Bombesin auf, und die Bindung an seinen Rezeptor löst bei SCLCs eine Tumorphiliferation aus (Carney et al., 1987; Thomas et al., 1992). GRP wird von nahezu allen SCLC und bis zu 20 % der NSCLC gebildet und spielt vermutlich mit Bombesin-ähnlichen Peptiden als autokriner Wachstumsfaktor eine Rolle bei der Genese und Entwicklung des kleinzelligen Bronchialkarzinoms, da Antikörper gegen beide das Wachstum von SCLCs *in vivo und in vitro* hemmen (Thomas et al., 1992; Moody und Cuttitta, 1993; Moody et al., 1995).

1.1.2 Nicht-kleinzellige Bronchialkarzinome (NSCLC)

Unter NSCLCs werden alle bösartigen Epithel-Tumoren der Lunge zusammengefaßt, die nicht SCLCs sind (WHO, 1982), eine Ausnahme bilden die Karzinoide, die den

Bronchialadenomen zugeordnet werden und etwa 1-2 % aller Lungentumoren ausmachen. Sie haben nur ein geringes metastasierendes Potential bei geringer Wachstumsrate. Ihre gut untersuchten neuroendokrinen Eigenschaften sind ebenfalls ein Grund, sie nicht zu den NSCLCs zu zählen (Gould et al., 1983). Insgesamt liegt die Häufigkeit von nicht-kleinzelligen Bronchialkarzinomen bei ca. 70 % aller Lungentumoren, wobei die Plattenepithelkarzinome mit 31-45 % den größten Teil ausmachen (Minna et al., 1985; Müller et al., 1995). Die Zuordnung zu den Untergruppen orientiert sich an der histologischen Differenzierung der Tumoren, z.B. plattenepithelialen oder drüsigen Strukturen. Die durchschnittliche Kerngröße liegt bei etwa 9 µm, die der Gesamtzelle bei 14 µm (Müller et al., 1995). Das Wachstum und der Differenzierungsgrad von NSCLCs sind auch innerhalb der Untergruppen sehr vielfältig. Zytogenetisch liegt bei 50 % aller NSCLCs ebenfalls eine Deletion des Chromosoms 3p vor (Lorenz, 1994), und 20 % zeigen eine gestörte Expression von Retinoblastom-Produkten. Punktmutationen des Tumorsuppressorgens p53 kommen bei 42 % aller NSCLCs und bei 100 % aller SCLCs vor (Chiba et al., 1990; D'Amico et al., 1992; Mulshine et al., 1993). Im Gegensatz zu den SCLCs ist die Sezernierung von Hormonen und Wachstumsfaktoren bei den NSCLCs gering bis fehlend (Gazdar, 1986; Bepler et al., 1988; Aoyagi et al., 1995), Rezeptoren für den epidermalen Wachstumsfaktor EGF treten dagegen vermehrt auf (Veale et al., 1987). Bei Adenokarzinomzelllinien konnte durch Antikörper-Experimente das Wachstum gehemmt werden (Imanish et al., 1989), so daß auch bei nicht-kleinzelligen Bronchialkarzinomen autokrine Wachstumsschleifen vermutet werden.

1.2 Expression des Peptidhormons Gastrin

Bereits 1905 wurde Gastrin als stimulierender Faktor für die Magensäuresekretion in Extrakten aus antraler Mukosa entdeckt. Bis in die siebziger Jahre galten die antroduodenalen G-Zellen als einziger Produktionsort des Peptids, und erst durch verbesserte immunochemische Techniken, Peptidaufreinigung, Sequenzierung und andere Untersuchungsmethoden änderte sich das biologische und pathologische Bild des Gastrins während der letzten Jahrzehnte. So erwies sich weniger die Regulation der Magensäuresekretion als seine trophische Funktion, d.h. die Wachstumsregulation der Mukosazellen, als Hauptaufgabe des Gastrins (Rehfeld und Hilsted, 1992).

Außerdem zeigten sich eine geringere Expression und Synthese von Gastrin in verschiedenen extraantralen Geweben, u.a. den TG-Zellen des Dünndarms (Larsson und Rehfeld, 1979), den endokrinen Zellen des Pankreas (Bardram et al., 1990) und der Bronchialmukosa (Rehfeld et al., 1989). Die Aufgabe einer Gastrin-Sekretion in diesen Organen scheint einerseits eine para- oder autokrine Wachstumsregulation zu sein, andererseits könnte sie eine umfassendere fetale Synthese widerspiegeln (Rehfeld und Hilsted, 1992).

Für das Verständnis der Wachstumsregulation von Tumoren viel weitreichender war jedoch die Entdeckung, daß Gastrinpeptide in vielen Arten von Tumoren exprimiert werden, z.B. in Gehirntumoren (Bardram et al., 1985 und 1987; Rehfeld et al., 1990), in endokrinen Pankreastumoren (Tillotson et al., 1994), Kolonkarzinomen (Finley et al., 1993) und allen Formen von Bronchialkarzinomen (Rehfeld et al., 1989; Dowlati et al., 1996) und sie dort durch die lokale (autokrine) Sekretion das Wachstum der Tumorzellen mit Gastrinrezeptoren stimulieren. Gastrin produzierende Tumore, assoziiert mit dem Zollinger-Ellison-Syndrom, wurden auch im Duodenum, selten im Antrum oder den Ovarien gefunden (Rehfeld und Hilsted, 1992).

1.2.1 Strukturanalyse des Gastringens

Eine Untersuchung der entwicklungs-, zellspezifischen und physiologischen Regulation des humanen und Ratten-Gastringens wurde durch die Klonierung der 5'-flankierenden Sequenzen möglich (Ito et al., 1984; Wiborg et al., 1984; Fuller et al., 1987). Alle molekularen Formen von Gastrin lassen sich dabei von einem einzelnen Gen ableiten. Das humane Gastringen ist auf Chromosom 17 lokalisiert und umfaßt etwa 4,1 kb mit drei Exons: das für keinen funktionalen Teil kodierende Exon 1 sowie Exon 2 und 3, die für den Preprogastrin-Vorläufer kodieren, aus dem nach mehreren enzymatischen Schritten das bioaktive Gastrin freigesetzt wird (Abb.1).

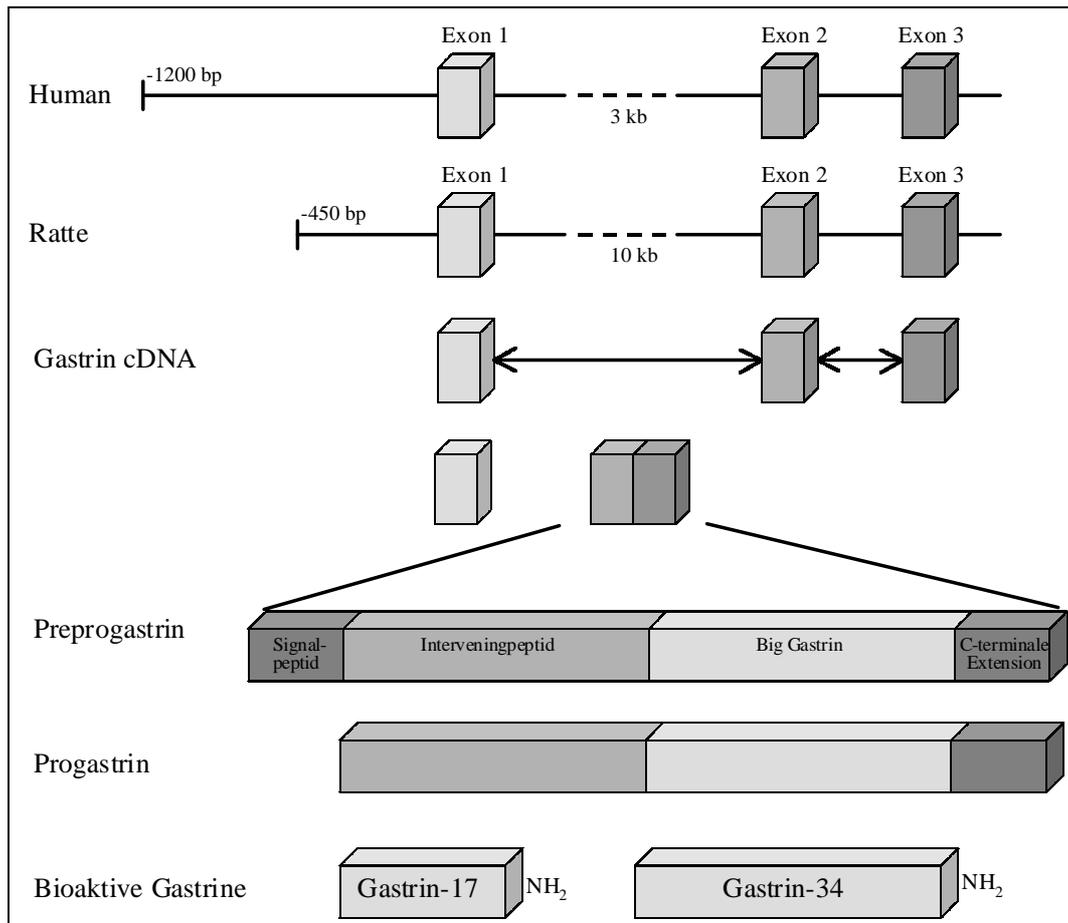


Abb.1: Schematische Darstellung der Struktur des humanen und Ratten-Gastringens sowie des Gastrinprocessing.

1.3 Regulation der Genexpression in Eukaryoten

1.3.1 Promotorstrukturen

Die Steuerung der Genaktivität von höheren Organismen erfordert sehr komplexe Regulationsmechanismen, da immer nur die Expression eines Teils des Genoms zur Herstellung und Aufrechterhaltung einer Zell- oder Organfunktion notwendig ist. Der erste Schritt, die Übertragung von DNA-Information auf mRNA (Transkription) ist hierbei als Startelement von besonderer Bedeutung für die Genregulation. Weitere Kontrollstufen sind z.B. die DNA-Methylierung, Gen-Amplifikation, posttranskriptionelle mRNA-Modifikationen, die Umsetzung der von der mRNA übernommenen Information in die

Proteinbiosynthese (Translation) und posttranslationale Proteinmodifikationen (Wingender, 1993). Die für die Steuerung einer korrekten Transkription verantwortliche Region eines von RNA-Polymerase II regulierten Gens liegt bei Eukaryoten zum größten Teil in der 5'-Richtung direkt vor dem Gen, dem 5'-flankierenden Bereich. Einen darin enthaltenen DNA-Bereich, von dem aus die Transkription gesteuert wird, bezeichnet man als Promotor. Durch den Vergleich der Nukleotidsequenzen vieler verschiedener Promotorregionen zeigte sich, daß bestimmte Sequenzmotive in dieser Region immer wieder nachzuweisen sind, z.B. die TATA-Box, die oft etwa 30 bp in 5'-Richtung vor dem Transkriptionsstart liegt (Maniatis et al., 1987; Smale, 1994) und an die ein stabiler Multiproteinkomplex, TFIID, bindet (Dymlacht et al., 1991; Weinzierl et al., 1993). Die TATA-Box und die Transkriptionsstartstelle, die Cap-site, stellen den Grundpromotor einiger Gene dar (Goodwin et al., 1990) und bilden mit anderen basalen Transkriptionsfaktoren einen stabilen Präinitiationskomplex mit der RNA-Polymerase II (Saltzmann und Weinmann, 1989; Hori und Carey, 1994). Die Aktivität dieses Grundpromotors kann durch weitere Bindungssequenzen, die stromaufwärts gelegen sein können, gesteigert werden, wie die CCAAT-Box (McKnight und Tjian, 1986) und die Sp1-Box („specificity protein 1“), eine GC-reiche Sequenz, die in vielen Genen mit oder ohne TATA-Box gefunden wird (Dyner und Tjian, 1985). Alle diese Elemente sind essentiell für eine effiziente Transkription und werden als UPEs („upstream promoter elements“) bezeichnet. Neben diesem konstitutiven Promotorbereich kann man funktionell noch regulative Kontrollabschnitte unterscheiden, die mit den UPEs verflochten sind, aber auch stromauf- oder abwärts vom Promotorbereich gelegen sein können. Inzwischen konnten viele dieser *cis*-regulatorischen, d.h. spezifische Erkennungssequenzen für DNA-bindende Proteine enthaltende, Elemente identifiziert werden, die signalabhängig durch Hormone, Wachstumsfaktoren u.a. die Promotoraktivität gewebe- oder zelltypspezifisch in verstärkender (Aktivator, Enhancer) (Voss et al., 1986; Dynan, 1989) oder hemmender (Silencer) (Brand et al., 1985; Shore und Nasmyth, 1987) Weise beeinflussen. So können auch DNA-Abschnitte, die stromaufwärts, stromabwärts oder innerhalb einer Transkriptionseinheit liegen, zum Teil über große Distanzen die Genexpression beeinflussen.

1.3.2 Transkriptionsfaktoren

Die beschriebenen DNA-Elemente sind Voraussetzung für die Expression und transkriptionelle Regulation eines Gens, sie erlangen aber erst im Zusammenwirken mit Transkriptionsfaktoren, die an diese *cis*-regulatorischen Bereiche binden, *in vivo* Bedeutung. Die Bindungsdomänen dieser Proteine weisen trotz unterschiedlicher Sequenzen strukturelle Ähnlichkeiten auf, da sie sich dem Aufbau der DNA-Doppelhelix anpassen, aber auch ihre spezifische Bindungssequenz erkennen müssen. So kann ein Teil der DNA-bindenden Proteine gemäß ihrer Struktur in Familien unterteilt werden (Schleif, 1988; Krajewska, 1992; Pabo und Sauer, 1992).

Helix-Turn-Helix (HTH):

Das erste bekannte DNA-Bindungsmotiv besteht aus einer 60 Aminosäuren (AS) langen Homöodomäne, bei der zwei α -Helices über ein β -Faltblatt miteinander verbunden sind und so das Helix-Knick-Helix-Motiv bilden. Die zweite Helix liegt dabei über der ersten und bildet die Erkennungshelix für basenspezifische Kontakte (Schleif, 1988).

Leucin-Zipper:

Die Gruppe dieser Transkriptionsfaktoren kann nur als Dimer an die DNA binden (Vinson et al., 1989). Die Proteine zeigen dabei eine zweiteilige Struktur, einen etwa 30 AS langen Abschnitt mit positiver Nettoladung, der an die DNA bindet und einen direkt angrenzenden α -helikalen Bereich, der alle sieben AS ein Leucin aufweist. Über die Bildung einer schraubenförmigen (nicht wie ursprünglich angenommen nach Reißverschluß-*zipper*-Prinzip) Windung der beiden parallelen Helices erfolgt ein Konformationswechsel der basischen Region, der so ebenfalls eine α -helikale Struktur annimmt und mit der sauren DNA binden kann (Johnson und McKnight, 1989).

Helix-Loop-Helix (HLH):

Hier liegen im Gegensatz zum HTH-Motiv zwei α -Helices vor, bei denen sich alle geladenen AS auf einer Seite befinden und durch eine nicht-helikale Schleife (loop) getrennt werden (Murre et al., 1989). Die Transkriptionsfaktoren ähneln der Familie der Leucin-Zipper, da sie ebenfalls nur als Dimere und über eine positiv geladene Domäne an die DNA binden (Davis et al., 1990).

Zink-Finger:

Bei den Zink-Finger-Transkriptionsfaktoren handelt es sich um wiederholte Motive, in denen zwei Cystein- und zwei Histidin-Reste (C₂-H₂) sich zu einer dreidimensionalen Struktur um ein koordinierendes Zinkion falten (Evans und Hollenberg, 1988). Die

Schlaufen der Zink-Finger bestehen aus 12 AS mit mehreren basischen Resten und gehen den Kontakt mit der DNA ein. Die Bindung ist dabei von dem Zusammenspiel mehrerer benachbarter Zink-Finger abhängig, so daß immer mehrere Kopien des C₂-H₂-Motivs innerhalb eines Transkriptionsfaktors vorkommen (Parraga et al., 1988). Der Transkriptionsfaktor Sp1 gehört zu dieser Familie (Kadonaga et al., 1987). Neben diesen vier Familien (Abb.2) gibt es noch weitere Transkriptionsfaktoren, die nicht in Familien eingeteilt werden können, so daß bei der sequenzspezifischen DNA-Bindung noch viele Fragen geklärt werden müssen.

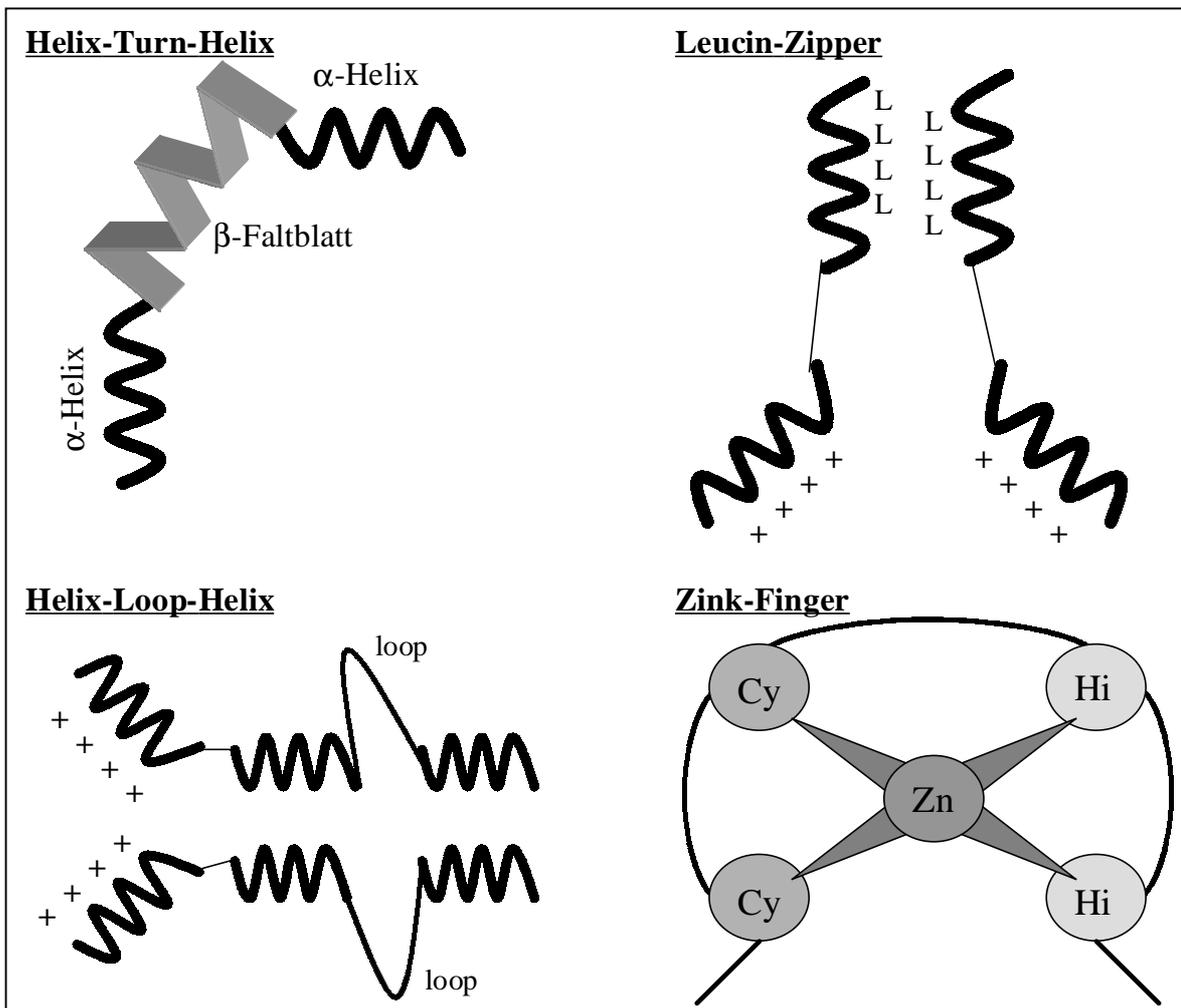


Abb.2: DNA-Bindungsmotive

1.3.3 Die Familie der Sp-Transkriptionsfaktoren

Der ubiquitäre Transkriptionsfaktor Sp1 spielt bei der Aktivierung vieler eukaryotischer und viraler Promotoren eine Rolle. Er gehört zu den Zinkfingerproteinen, die für ihre korrekte Funktion die Anwesenheit von Zink benötigen und wurde aus HeLa-Zellen isoliert (Dyran und Tjian, 1983; Briggs et al., 1986). Aus dem Vergleich des „frühen“ Promotors des SV40-Virus und anderen RNA-Polymerase II-abhängigen Promotoren wurde die Sequenz der Kernbindungsstelle CCGCCC, bzw. GGGCGG hergeleitet, da die Aktivierung des Gens durch Sp1 unabhängig von der DNA-Orientierung ist (Dyran und Tjian, 1983; Gidoni et al., 1985; Wildeman, 1988). Auch Gene, deren Promotor keine TATA-Box enthält, weisen Bindungsstellen für Sp1 auf (Azizkhan et al., 1993; Lu et al., 1994). Weitere Untersuchungen und die Klonierung der cDNA für Sp1 (Kadonaga et al., 1987) zeigten, daß die DNA-bindende Domäne des Proteins drei tandemartig sich wiederholende Zinkfinger-Motive aufweist. In der Zwischenzeit wurden andere Mitglieder der Sp1-Familie identifiziert, die an GC- oder GT-Boxen (GGGTGTGGC) binden können, wie Sp2, Sp3 und Sp4 (Hagen et al., 1992; Kingsley und Winoto, 1992; Hagen et al., 1995). Sp3 und Sp4 weisen dabei signifikante Homologien zu Sp1 auf, so daß sie auch Bindung an ähnliche DNA-Elemente zeigen (Hagen et al., 1994). Sp2 wird wie Sp1 und Sp3 ubiquitär exprimiert, wobei die Bindung an GC- und GT-Boxen durch eine geringere Homologie zu erklären ist (Kingsley und Winoto, 1992). Eine Rolle in der Transkriptionsregulierung konnte für Sp2 noch nicht nachgewiesen werden. Sp1 ist bisher nur als aktivierender Faktor bekannt (Birnbaum et al., 1995; Kumar et al., 1995; Bigger et al., 1996), wogegen Sp3 zum einen als Faktor, der die Sp1-vermittelte Aktivierung durch Konkurrenz um die Bindungsstelle unterdrückt (Majello et al., 1994 und 1995; Hagen et al., 1995; Kumar und Butler, 1997), zum anderen ebenfalls als aktivierender Faktor beschrieben wird (Liang et al., 1996; Bigger et al., 1997; Netzker et al., 1997). Dies läßt vermuten, daß die Funktion von Sp3 von Umfeld, Kofaktoren oder Zelltyp abhängig ist (Suske, 1999). Der aktivierende Transkriptionsfaktor Sp4 kommt nicht ubiquitär vor und kann im Gegensatz zu Sp1 nicht synergistisch durch angrenzende Bindungsstellen wirken (Hagen et al., 1995). Die Untersuchung dieser Transkriptionsfaktoren in bezug auf ihr Vorkommen in Tumoren und ihre Rolle bei deren Wachstumsregulation ist daher ein wichtiger Schritt zur Klärung der Tumorgenese.

1.4 Aufgabenstellung

Ziel der vorliegenden Arbeit war es, die molekularen Mechanismen der Expression von Gastrin in kleinzelligen (SCLC) und nicht-kleinzelligen (NSCLC) Bronchialkarzinomzellen zu untersuchen. Dazu erfolgten funktionelle und strukturelle Untersuchungen der Gastrinpromotorregion in Bronchialkarzinomzelllinien, um zelltypspezifische *cis*-regulatorische Regionen zu identifizieren. DNA-Bindungsstudien sollten Aufschluß über die dort bindenden Proteine liefern und über einen Vergleich mit bekannten Transkriptionsfaktoren diese identifizieren. Die so ermittelten Bronchialkarzinom-spezifischen Regulationsmechanismen des Gastringens sollen zum besseren Verständnis der molekularen Regulationsmechanismen führen und so die Grundlage zur Entwicklung neuer gentherapeutischer Ansätze unter Verwendung des Gastrinpromotors zum Targeting von Effektormolekülen bilden.

2 Material und Methoden

2.1 Geräte

2.1.1 Labor

Bakterienbrutschrank BE400	Memmert, Schwalbach
Bakterieninkubator Certomat R	Braun, Melsungen
Dounce Homogenizator 15 und 50 ml	Braun, Melsungen
Geltrockner Unigeldryer	UniEquip, Martinsried
Kühlfalle Uni Cryo MC 2L-60.0C	UniEquip, Martinsried
Luminometer Lumat LB 9501/16	Berthold, Wildbach
Pistill Typ B	Roth, Karlsruhe
Spektralphotometer Uvikon 860	Kontron, Eching
Thermocycler Techne	Progene, Wertheim
Ultrazentrifuge L8-70M	Beckmann, München
Vakuumentrifuge Uni Vapo 100 H	UniEquip, Martinsried
Zentrifugen: Biofuge 13, Sepatech	Heraeus, Hanau
J2-21	Beckmann, München

2.1.2 Zellkultur

Inkubator BB16	Heraeus, Hanau
Mikroskop Olympus IX 50	Olympus, Hamburg
Neubauer-Zählkammer	Schreck, Hofheim
Sterile Werkbank Lamin Air HLB 2448	Heraeus, Hanau
Zentrifuge Labofuge GL	Heraeus, Hanau

2.2 Chemikalien, Enzyme, Verbrauchsmaterialien

2.2.1 Chemikalien

Agarose für DNA-Elektrophorese	Sigma, Deisenhofen
Ameisensäure	Serva, Heidelberg
APS	BioRad, München
Biorad Reagenz	BioRad, München
Borsäure	Merck, Darmstadt
Bromphenolblau/Xylencyanol-Lösung	Sigma, Deisenhofen
BSA	Sigma, Deisenhofen
Chloroform	Merck, Darmstadt
DMS	Fluka, Neu-Ulm
DNA-Längenstandards III und VIII	Boehringer, Mannheim
dNTPs	Pharmacia, Freiburg
DTT	Sigma, Deisenhofen
EDTA	Roth, Karlsruhe
Ethidiumbromid	Roth, Karlsruhe
Glycerin	Sigma, Deisenhofen
Harnstoff	Roth, Karlsruhe
HCl	Merck, Darmstadt
HEPES	Sigma, Deisenhofen
Hydrazin	Serva, Heidelberg
Isoamylalkohol	Merck, Darmstadt
Kaninchen-Präimmunsrum	Dako, Hamburg
KCl	Merck, Darmstadt
KOH	Merck, Darmstadt
Methanol	Riedel de Häen, Seelze
MgCl ₂ /6H ₂ O	Merck, Darmstadt
NaOH	Merck, Darmstadt
Natriumcacodylat	Sigma, Deisenhofen
Nonidet P40	Fluka, Neu-Ulm
Phenol	Roth, Karlsruhe
Piperidin	Fluka, Neu-Ulm

PMSF	Sigma, Deisenhofen
Poly (dA/dT)	Sigma, Deisenhofen
Poly (dI/dC)	Sigma, Deisenhofen
Polyklonale Antikörper gegen Sp1, Sp3 und Sp4	Guntram Suske, IMT, Marburg
Protein Assay	BioRad, München
rotiphorese®Gel 30	Roth, Karlsruhe
SDS	Serva, Heidelberg
Sigmacote	Sigma, Deisenhofen
Sp1 (human) [2 fpu/μl]	Promega, Madison/USA
Spermidin	Sigma, Deisenhofen
TEMED	Sigma, Deisenhofen
Tris-Base	Sigma, Deisenhofen
t-RNA aus Hefe	Sigma, Deisenhofen
ZnCl ₂	Sigma, Deisenhofen

Alle nicht näher bezeichneten Chemikalien wurden von den Firmen Merck, Darmstadt; Riedel de Häen, Seelze; Roth, Karlsruhe und Sigma, Deisenhofen in p.a. Qualität bezogen.

2.2.2 Bakterienkultur

Trypton	Difco, Detroit/USA
Ampicillin	Sigma, Deisenhofen
Hefeextrakt	Difco, Detroit/USA
NaCl	Roth, Karlsruhe
Petrischalen	Greiner, Frickenhausen

2.2.3 Zellkultur

DMSO	Merck, Darmstadt
Fötale Kälberserum (FCS)	PAA, Linz/Österreich
Galacto-Light-Plus™	Tropix, Bedford/USA
Gewebekulturflaschen	Greiner, Frickenhausen

Luciferase Assay System	Promega, Madison/USA
Penicillin-Streptomycin (10000 µg/ml)	Gibco, Eggenstein
Petrischalen für Gewebekultur	Greiner, Frickenhausen
Reporter Lysis Puffer 5x	Promega, Madison/USA
RPMI 1640-und DMEM -Medium	PAA, Linz/Österreich
Trypsin-EDTA	Gibco, Eggenstein

2.2.4 Restriktionsendonukleasen und modifizierende Enzyme

DNaseI	[7,5 U/µl]	Boehringer, Mannheim
DNaseI (1 U/µl), RQ1 RNase free		Promega, Madison/USA
Klenow-Fragment der DNA-Polymerase I	[2 U/µl]	MBI, Vilnius/Litauen
Pwo DNA Polymerase	[5 U/µl]	Boehringer, Mannheim
Restriktionsendonukleasen		MBI, Vilnius/Litauen Boehringer, Mannheim Pharmacia, Freiburg New England Biolabs, Schwalbach
T4-Polynukleotidkinase	[10 U/µl]	Boehringer, Mannheim

2.2.5 Radioaktive Verbindungen

[γ - ³² P] ATP (5000 Ci/mmol, 10 mCi/ml)	Amersham, Braunschweig
-------------------------------------------------------------	------------------------

2.2.6 Verbrauchsmaterialien

Filter	Schleicher & Schuell, Dassel
Glaswolle	Koobe, Marburg
Meßröhrchen für Lumat	Sarstedt, Nümbrecht
Nicksäulen (Nick columns, Sephadex G-50)	Pharmacia, Freiburg
Nucleobond®AX Kit PC 500	Macherey-Nagel, Düren

NucTrap® Probe Purification Columns	Stratagene, Heidelberg
QIAprep Spin Miniprep	Qiagen, Hilden
Reaktionsgefäße 0,5 ml	Perkin Elmer, Foster City/USA
Reaktionsgefäße 1,5 und 2 ml	Eppendorf, Hamburg
Röntgenfilme Kodak X-Omat AR	Kodak, Stuttgart
Spectra Por Dialyse-Schläuche MWCO: 3,500	Roth, Karlsruhe
Whatman 3 mm Filterpapier	Herolab, St. Leon
Zentrifugenröhrchen	Beckmann, München

2.3 Bakterienstämme

E. coli DH5 α (Hanahan, 1983)

2.4 Zelllinien

Ratteninsulinoma-Zellen RIN38A (Philippe, J. et al., 1988)

Humane Nicht-kleinzellige Bronchialkarzinom-Zellen (NSCLC) EPLC-32M1 (Bepler et al., 1988).

Humane Mesotheliom-Zellen MSTO-211H (Bepler et al., 1988)

Humane Kleinzellige Bronchialkarzinom-Zellen (SCLC) NCI-H69 (Carney et al., 1985)

Humane Pankreaskarzinoid-Zellen BON-I (Evers et al., 1991)

2.5 Oligonukleotide

huCACC WT ⁻¹¹⁵ 5'-GATCCCTGTGCCCCACCCATTA-3'⁻⁹⁸

huCACC mt ⁻¹¹⁵ 5'-GATCCCTGTGCCCCACCACATTA-3'⁻⁹⁸

huCACC dmt ⁻¹¹⁵ 5'-GATCCCTGTGCCACACCACATTA-3'⁻⁹⁸

gERE WT	⁻⁶⁸ 5'-GTAG <u>GGG</u> CGGGGTGGGGGA-3' ⁻⁵³
gERE M4	⁻⁶⁸ 5'-GTA <u>TT</u> GGCGGGGTGG <u>TTTT</u> A-3' ⁻⁵³
gERE M5	⁻⁶⁸ 5'-GTAG <u>GGC</u> CGGGGTGGGGGA-3' ⁻⁵³
gERE M6	⁻⁶⁸ 5'-GTAGGGGCGGGG <u>CGGG</u> CGA-3' ⁻⁵³
cRE	⁻¹⁴⁵ 5'- <u>TG</u> AAAGGGCGGGGCAGGGT <u>G</u> -3' ⁻¹²⁶
AP1	⁻¹⁶⁸ 5'- <u>CT</u> GGATGACTGACAC-3' ⁻¹⁵⁰
hugas -193 forward	⁻¹⁹³ 5'- <u>AA</u> CTCCCCTATCCTT <u>CCC</u> -3' ⁻¹⁷⁶
hugas +60 reverse	⁺⁶⁰ 5'-CTGCAGAGCTGGGAGGT <u>G</u> -3' ⁺⁴⁴

(Die hochgestellten Zahlen geben die Position der unterstrichenen Base im Gastrinpromotor an, Mutationen sind fettgedruckt.)

2.6 DNA-Konstrukte

Folgende Konstrukte wurden, wenn nicht anders erwähnt, von Babette Simon hergestellt und zur Verfügung überlassen. Alle Konstrukte wurden restriktionsenzymatisch und durch Sequenzierung der relevanten Bereiche kontrolliert.

pGL2-Control Vektor: (Promega, Madison/USA)

pGL2-Basic Vektor: (Promega, Madison/USA)

pSV-β-Galaktosidase-Kontroll Vektor:
(Promega, Madison/USA)

hugas 2kb pst-/pGEM1: 1300 bp großes Fragment des humanen Gastringens, das mit Hilfe von EcoRI-PSTI-5' aus pGEM-1 geschnitten wurde (Wang et al., 1992).

hugas Luc -1300: Das 1300er Gastrinreportergenkonstrukt wurde durch Subklonierung des EcoRI-PstI geschnittenen Fragments des humanen Gastringens in den promotorlosen Expressionsvektor pGL2-Basic hergestellt (Simon et al., 1997).

hugas Luc -1145, -1035, -935, -835, -710, -600, -510, -400, -190, -148, -119, -82, -79, -68 und -40:

Diese Deletionskonstrukte wurden über Polymerasekettenreaktion (PCR) mit hugas Luc -1300 als Template hergestellt und die Bindungsenden mit einem Restriktionsverdau vor der Ligation in den pGL2-Basic Vektor erzeugt.

Die zur bakteriellen Expression notwendigen Konstrukte von Sp1, Sp3 und Sp4 wurden freundlicherweise von Dr. G. Suske, IMT, Marburg zur Verfügung gestellt.

2.7 Sicherheitsvorkehrungen und Abfallbeseitigung

Arbeiten an genetischem Material wurden gemäß dem „Gesetz zur Regelung von Fragen der Gentechnik“ nur in zugelassenen Räumen der Sicherheitsstufe 1 durchgeführt. Der Umgang mit radioaktiven Substanzen erfolgte entsprechend den gesetzlichen Bestimmungen. Mit stärkeren β -Strahlern wurde nur hinter Plexiglasabschirmung gearbeitet. Zum Schutz gegen Kontamination von Haut und Kleidung wurden Einweghandschuhe und Laborkittel getragen. Die individuelle Strahlenbelastung wurde mit einer Dosimeterplakette gemessen. Infektiöses Material wurde nach Autoklavieren oder Desinfektion entsorgt. Radioaktiver Abfall sowie Lösungsmittelreste und giftige Feststoffe wurden getrennt in entsprechenden Behältern gesammelt und der vorgeschriebenen Beseitigung zugeführt.

2.8 Molekularbiologische Standardverfahren

Alle Arbeitsschritte wurden, falls nicht anders erwähnt, bei 4⁰C durchgeführt. Verwendete Medien, Puffer und Lösungen wurden mit bidestilliertem Wasser angesetzt und autoklaviert, bzw. sterilfiltriert. Ihre Zusammensetzung sowie die Durchführung von Standardverfahren der Molekularbiologie, sofern sie nicht näher beschrieben werden, sind dem Methodenbuch „Molecular cloning, a laboratory manual“ (Sambrook, J. et al., 1989) zu entnehmen.

2.8.1 Spaltung von DNA mit Restriktionsendonukleasen

Alle Spaltungen mit Restriktionsendonukleasen wurden in den vom Hersteller empfohlenen Puffern durchgeführt. Die zehnfach konzentrierten, bei -20°C gelagerten Puffer wurden kurz vor Gebrauch aufgetaut, 10 U des betreffenden Restriktionsenzym pro μg zu schneidender Plasmid-DNA und BSA in einer Endkonzentration von $0,1 \mu\text{g}/\mu\text{l}$ hinzugegeben. Das Gesamtvolumen des Ansatzes wurde so gewählt, daß die zugegebene Enzymlösung mindestens 1:10 verdünnt wurde. Die Vollständigkeit der Spaltung wurde anhand eines Aliquots gelelektrophoretisch überprüft. Gegebenenfalls konnten die Spaltung durch Zugabe von EDTA, pH 8 (Endkonzentration 10 mM) gestoppt und die Proteine durch Phenol/Chloroformextraktion und Ethanol-Fällung entfernt werden.

2.8.2 Entfernen von Proteinen aus DNA-Lösungen

Um aus DNA-Lösungen Proteine zu entfernen, wurde der Ansatz mit dem gleichen Volumen PCI (Phenol/Chloroform/Isoamylalkohol, 24:24:1) versetzt, kurz geschüttelt und zur Phasentrennung 5 min bei 13.000 UpM zentrifugiert. Die wäßrige obere Phase wurde vorsichtig in ein neues Reaktionsgefäß überführt und anschließend gefällt.

2.8.3 Fällen und Waschen von DNA

Zur Aufreinigung nach einer PCI-Extraktion, Beendigung enzymatischer Reaktionen, sowie zwecks Konzentrierung von DNA und Elimination von Salzen und anderen unerwünschten Reaktionsprodukten wurden Ethanol(EtOH)-Fällungen durchgeführt. Dem Ansatz wurde zum Präzipitieren der DNA 1/10 Volumen 3M NaOAc (pH 5,4) und 2,5 Volumen EtOH (100%) zugegeben, der Ansatz vorsichtig gemischt und für 20 bis 25 min auf Eis oder alternativ über Nacht bei -20°C inkubiert. Nach der Fällung wurde die Probe 10 min bei 13.000 UpM zentrifugiert und der Überstand verworfen. Als zusätzliche Reinigung wurde 70%iger EtOH hinzupipettiert und nochmals 10 min zentrifugiert. Der Überstand wurde wiederum verworfen und das Pellet kurz luftgetrocknet, bevor es in einem für die nachfolgenden Versuche geeigneten Puffer aufgenommen wurde.

2.8.4 Quantifizierung von DNA

DNA-Lösungen wurden im Photometer bei 260 nm in einer Quarzküvette quantifiziert. Die Konzentration der Lösung wurde so gewählt, daß die optische Dichte (OD) zwischen 0,1 und 1 lag. Es wurden die folgenden Näherungen verwendet:

Doppelsträngige DNA: $1 \text{ OD}_{260} = 50 \mu\text{g/ml}$

RNA oder einzelsträngige DNA: $1 \text{ OD}_{260} = 40 \mu\text{g/ml}$

Oligonukleotide: $1 \text{ OD}_{260} = 33 \mu\text{g/ml}$

Der Reinheitsgrad der DNA ergibt sich aus dem Quotienten OD_{260} und OD_{280} , er sollte optimal einen Wert von 1,8 bis 2 ergeben.

2.8.5 Quantifizierung von Proteinen

Die photometrische Bestimmung von Proteinen erfolgte nach Bradford (Bradford, 1976). Das Biorad Reagenz wurde 1:5 verdünnt und je 1 ml zu 1 bis 10 μl der zu bestimmenden Probe, bzw. zu 1 bis 12 μg eines BSA-Proteinstandards gegeben und die Lösung bei 595 nm im Photometer gemessen. Die Proteinkonzentration der Probe wurde aufgrund der Eichgeraden des BSA-Standards berechnet.

2.8.6 Elektrophoretische Trennung von DNA-Fragmenten

2.8.6.1 Agarosegele

Eine Trennung von DNA-Fragmenten im Agarosegel wurde sowohl für analytische Zwecke als auch für präparative DNA-Isolierungen in 0,5x TBE-Puffer durchgeführt. Die Agarose wurde in einer Konzentration von 0,8 bis 2 % in 0,5x TBE aufgekocht, mit 0,5 $\mu\text{g/ml}$ Ethidiumbromid (Etbr) versetzt und nach dem Abkühlen auf ca. 60°C in eine Horizontalkammer mit eingesetztem Kamm gegossen.

TBE (1x): 90 mM Tris/HCl pH 8,3, 90 mM Borsäure, 2 mM EDTA

2.8.6.2 Acrylamidgele

Für die Auftrennung von DNA-Fragmenten unter 300 bp Länge wurden vertikale 4 bis 8%ige (PAA-) Polyacrylamidgele mit 0,5x (Gelretardations-Experimente) bzw. 1x (Sequenzgele) TBE als Laufpuffer verwendet. Zur Herstellung der PAA-Gele wurden fertige Vorratslösungen (Roth) verwendet, die mit Aqua bidest. verdünnt und mit einer dem Laufpuffer entsprechenden Konzentration von TBE versetzt wurden. Die Polymerisation wurde mit APS und TEMED initiiert. Denaturierenden Gelen wurde 7 M Harnstoff zugegeben.

2.8.6.3 Isolierung von DNA-Fragmenten aus Gelen

Zur Isolierung radioaktiver DNA-Fragmente aus Agarosegelen wurde das Gel in Plastikfolie eingeschlagen und nach fünfminütiger Autoradiographie des Gels das Fragment mit Hilfe des entwickelten Films detektiert und ausgeschnitten. Das isolierte Gelstück wurde zerkleinert in ein mit Glaswolle präpariertes, am Boden durchlöcheretes Reaktionsgefäß gegeben und für zwei Stunden bei -20°C inkubiert. Nach dem Auftauen wurde das Reaktionsgefäß in ein neues gestellt und für 5 min bei 13.000 UpM zentrifugiert. Das gewonnene Eluat wurde Phenol/Chloroform-extrahiert, präzipitiert und gewaschen.

2.8.7 Präparation von Plasmid-DNA

2.8.7.1 Herstellung kompetenter Bakterienzellen

Die Herstellung kompetenter E. coli-Stämme DH5 α wurde nach der Methode von Morrison, 1975, durchgeführt. Dabei wurde ein Aliquot des Stammes auf einer Agarplatte ohne Antibiotika ausgestrichen, über Nacht bei 37°C inkubiert, davon eine Einzelkolonie gepickt und wiederum über Nacht in 10 ml LB-Medium inkubiert. 5 ml von diesem Ansatz wurden in 200 ml LB-Medium überführt und bei 37°C bis zu einer OD_{550} von etwa 0,5 bei 200 UpM geschüttelt. Der Ansatz wurde dann für 3 min auf Eis geschwenkt und

anschließend 5 min bei 5000 UpM zentrifugiert. Das Pellet wurde vorsichtig mit 50 ml eiskaltem 0,1 M MgCl₂ resuspendiert und in gleicher Weise zentrifugiert. Es erfolgte eine Resuspendierung in 50 ml eiskaltem 0,1 M CaCl₂. Daraufhin wurden die Zellen 20 min auf Eis inkubiert. Nach einem weiteren Zentrifugationsschritt wurde das Pellet in 9 ml 0,1 M CaCl₂ und 1,3 ml 14%igem Glycerol aufgenommen, in Reaktionsgefäße aliquotiert, in Flüssig-N₂ schockgefroren und bei -80°C gelagert.

LB-Medium (1 Liter): 5 g NaCl, 5 g Hefeextrakt, 10 g Trypton

2.8.7.2 Transformation von E. coli mit Plasmiden

Die Transformation der E. coli Stämme DH5α mit Plasmiden wurde nach der Methode von Bergen, 1987, durchgeführt. Dabei wurde der Ligationsansatz (ca. 100 bis 200 ng Plasmid-DNA in 5 µl, zuzüglich 45 µl 0,1 M Tris/HCl, pH 7,5) mit 200 µl kompetenten Bakterien versetzt und 30 min auf Eis inkubiert. Es erfolgte ein Hitzeschock von 2 bis 3 min bei 42°C und Abkühlung von 1 min auf Eis. Nach Zugabe von 1 ml LB-Medium inkubierte der Ansatz für 15 bis 30 min bei 37°C. Anschließend wurden aufsteigende Mengen (z.B. 10, 50 und 100 µl) auf LB_{amp}-Platten (LB-Medium mit Ampicillin in einer Konzentration von 100 µg/ml) ausplattiert. Nach Inkubation über Nacht bei 37°C konnten die sichtbaren Kolonien für Minilysate verwendet werden. Die erzielte Transformationseffizienz betrug zwischen 1x 10⁶ bis 10⁸ Kolonien pro µg DNA.

2.8.7.3 Analytische Lysate

Zur Analyse von transformierter DNA im Restriktionsverdau wurden einzelne Kolonien gepickt und „Übernacht“-Kulturen in 10 ml LB_{amp} angesetzt. Die Hälfte des Ansatzes wurde bei 5000 UpM zentrifugiert und anschließend Minilysate mit Hilfe des QIAprep Spin Miniprep Kits nach Angaben des Herstellers angefertigt. Im Falle eines positiven Restriktionsverdaus konnte die andere Hälfte des Ansatzes für die präparative Plasmidgewinnung verwendet werden.

2.8.7.4 Präparative Plasmidgewinnung

Zur präparativen Plasmidgewinnung wurde ein Aliquot einer „Übernacht“-Kultur in 200 ml Lb_{amp} überimpft und bei 200 UpM üN. inkubiert. Das durch Zentrifugation bei 5000 UpM über 20 min gewonnene Pellet wurde mit Hilfe des Plasmid-Präparationskits Nucleobond®AX Kit PC 500 bei Raumtemperatur aufgearbeitet. Das gewonnene DNA-Pellet wurde in 200 μ l TE-Puffer, pH 8, aufgenommen und restriktionsenzymatisch kontrolliert.

TE-Puffer (1x): 10 mM Tris/HCl, 1 mM EDTA

2.8.8 Herstellung radioaktiv markierter Oligonukleotidsonden

2.8.8.1 5'-Endmarkierung

Zur Phosphorylierung der 5'-Enden von Oligonukleotiden mit $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]$ ATP wurden zu 200 ng Einzelstrang-DNA 5 μ l 10x-Kinasepuffer, 5 μ l $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]$ ATP, 2 μ l T4-Polynukleotidkinase und Aqua bidest. pipettiert, um einen Reaktionsansatz von 50 μ l zu erhalten, der zunächst 30 min bei 37°C und dann 10 min bei 65°C (Denaturierung der Kinase) inkubiert wurde. Daraufhin erfolgte ggf. die Hybridisierung der Einzelstrang-DNA.

Kinasepuffer(10x), pH 8,2: 500 mM Tris/HCl, 100 mM MgCl_2 , 1 mM EDTA, 50 mM Dithiothreitol, 1 mM Spermidin

2.8.8.2 Hybridisierung einzelsträngiger Oligonukleotide

Zur Herstellung von doppelsträngiger DNA wurde der 5'-endmarkierten Einzelstrang-DNA der 3,5fache Überschuß der Gegenstrang-DNA hinzugefügt und der Ansatz im Heizblock auf 80°C inkubiert. Nach Ablauf von 10 min wurde der Heizblock ausgestellt und der Ansatz so langsam auf Raumtemperatur abgekühlt, um eine möglichst vollständige Verschmelzung der Einzelstränge zu Doppelsträngen zu erreichen. Die danach noch

vorhandenen einzelsträngigen Überhänge („sticky ends“) wurden unter Verwendung von dNTPs und des Klenow-Fragments durch 20 minütige Inkubation bei Raumtemperatur aufgefüllt. Anschließend erfolgte die Abtrennung freier Nukleotide über entsprechende Säulen (s.u.).

2.8.8.3 Abtrennung freier Nukleotide

Um einen Ansatz nach einer Markierungsreaktion von nicht eingebauten Nukleotiden zu befreien, wurde er bei Raumtemperatur über eine Nucltrap®Probe Purification Column („Push Columns“) aufgereinigt. Die Säule wurde mit 70 µl STE-Puffer äquilibriert, der Markierungsansatz mit Aqua bidest. auf 70 µl aufgefüllt, auf die Säule aufgetragen und zweimal mit 70 µl STE-Puffer oder Aqua bidest. eluiert. Das Endvolumen betrug 120 bis 140 µl mit einer Aktivität von ca. 250.000-500.000 cpm/µl. Falls die markierte DNA anschließend für eine PCR eingesetzt werden sollte, empfiehlt sich alternativ eine Aufreinigung über Nick-columns, da bei Aufreinigung über „Push Columns“ eine Hemmung der Amplifikation beobachtet wurde. Die Säule wurde dabei mit 3 ml Aqua bidest. äquilibriert, der Markierungsansatz auf 100 µl mit Aqua bidest. aufgefüllt, aufgetragen und mit 2x 400 µl Aqua bidest. eluiert, wobei das erste Eluat verworfen wurde. Das zweite Eluat wurde in der Speed vac auf eine Menge von 80 µl verdampft, die eine Aktivität von 10.000 bis 25.000 cpm/µl aufwies.

STE-Puffer (1x), pH 8: 0,1 M NaCl, 10 mM Tris/HCl, 1 mM EDTA

2.9 Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR)

Um ein einseitig markiertes, ca. 250 bp großes DNA-Fragment für Sequenzierungen nach Maxam-Gilbert und DNaseI-Footprint-Reaktionen zu erhalten, wurde eine PCR mit dem 5'-endmarkierten Primer 1 (hugas -193 forward), dem nicht markierten Primer 2 (hugas +60 reverse) und dem Template hugas 2kb pst-/pGem1 durchgeführt. Der Amplifikationsansatz wurde nach folgendem Pipettierschema bei Raumtemperatur durchgeführt:

Mastermix 1:	dNTPs (2,5 mM jeweils)	8 µl (final=200 µM)
	Primer 1	150 ng
	Primer 2	150 ng
	Template	100 ng
Mastermix 2:	10x PCR Puffer	10 µl
	Pwo-DNA-Polymerase	2,5 U
	Aqua bidest.	ad 100 µl (Mastermix 1+2)

Nach dem Zusammenpipettieren wurde der PCR-Ansatz mit Mineralöl überschichtet und die DNA folgendermaßen amplifiziert: 1x 94⁰C für 3 min, 30x 94⁰C/56⁰C/72⁰C für je 1 min und 1x 72⁰C für 10 min.

10x PCR-Puffer: 100 mM Tris/HCl, pH 8,85, 250 mM KCl, 50 mM (NH₄)₂SO₄, 20 mM MgSO₄

2.10 Sequenzierung, modifiziert nach Maxam-Gilbert (Maxam und Gilbert, 1980)

Um eine genaue Lage von Proteinbindungsstellen bei Footprintreaktionen zu erhalten, war die Herstellung einer Sequenzleiter, die nach der Maxam-Gilbert-Methode hergestellt wurde, notwendig. Da die Gastrinpromotorsequenz des über PCR gewonnenen 250 bp großen Teilstücks bekannt ist, waren lediglich eine G- und G/A-Modifizierung und Spaltung durchzuführen. Die Reaktionen setzen sich aus einem basenmodifizierenden Schritt (durch DMS, Hydrazin und Ameisensäure) sowie einem diese Modifikation spaltenden Schritt (durch Piperidin) zusammen. So kommt es pro DNA-Molekül im Durchschnitt zu einer Spaltung, und die auf diese Weise entstandene DNA-Population weist ein einheitlich markiertes und unterschiedlich basenspezifisch gespaltene Enden auf. Die basenspezifischen Modifikationsreaktionen wurden nach folgendem Protokoll bei Raumtemperatur durchgeführt:

Reaktion	DNA	Reagenz	Reaktionszeit	Stopplösung
G	10 µl DNA (10 bis 20.000 cpm), 200 µl DMS-	1 µl DMS	4 min	50 µl DMS- Stopplösung, 750 µl EtOH

	Reaktionspuffer			(100 %)
G/A	10 µl DNA (10 bis 20.000 cpm)	25 µl HCOOH	5 min	200 µl Hydrazin- Stopplösung, 750 µl EtOH (100 %)

Nach Zugabe der Stopplösungen wurden die Proben 10 min bei 13.000 UpM zentrifugiert, der Überstand verworfen und das Pellet in 200 µl Aqua bidest. resuspendiert und gefällt. Das gewonnene Pellet wurde in 70 µl 10 %igem Piperidin (frisch hergestellt) aufgenommen und für 30 min bei 90°C inkubiert. Es folgten eine weitere Fällung und eine anschließende Waschung der DNA. Das getrocknete Pellet wurde in 3 bis 6 µl Formamid-Ladepuffer resuspendiert und vor dem Laden des Sequenzgels (8%iges, denaturierendes PAA-Gel, 1x TBE) bei 90°C 3 min denaturiert und auf Eis abgekühlt.

DMS-Reaktionspuffer: 50 mM Natrium-cacodylat, pH 8, 1 mM EDTA

DMS-Stopplösung: 1,5 M NaOAc, pH 7, 100 µg/ml Hefe-RNA,
1 M β-Mercaptoethanol

Hydrazin-Stopplösung: 0,3 M NaOAc, pH 7, 0,1 M EDTA, 25 µg/ml Hefe-RNA

Formamid-Ladepuffer: 0,1 M NaOH: Formamid (1:2), 0,1 % Xylencyanol, 0,1 %
Bromphenolblau

2.11 Herstellung von Kernextrakten

2.11.1 Kernextrakt-Präparation nach Dignam (Dignam et al., 1983)

Die auf diese Weise hergestellten Extrakte konnten sowohl für Gelretardations-Experimente als auch für DNaseI-Footprint-Reaktionen verwendet werden.

Die geernteten, dreimal mit eiskaltem 1x PBS gewaschenen, bei 1500 UpM für 5 min pelletierten Zellen wurden in 5-fachem Zellvolumen Puffer A resuspendiert, auf Eis 10 min inkubiert, anschließend bei 2000 UpM für 10 min zentrifugiert und der Überstand verworfen. Die aufgeschwollenen Zellen wurden nun in 2-fachem Zellvolumen Puffer A aufgenommen und im Dounce Homogenizator durch 10 Auf- und Abbewegungen mit Pistill B lysiert. Die Kerne wurden daraufhin bei 2000 UpM in dickwandigen

Zentrifugenröhrchen für 10 min pelletiert, der Überstand vorsichtig abgesaugt und die Zentrifugation für weitere 30 min bei 10.500 UpM fortgesetzt. Das Kernpellet wurde dann in 1-fachem Pelletvolumen Puffer C resuspendiert, im Dounce Homogenizator durch 10 Auf- und Abbewegungen mit Pistill B lysiert und die Kerne unter leichtem Schwenken 30 min extrahiert. Nach 40-minütiger Zentrifugation bei 10.500 UpM in dickwandigen Zentrifugenröhrchen wurde der proteinhaltige Überstand 2x gegen Puffer D200 für 15 min und 3x gegen Puffer D100 für jeweils 15, 30 und 90 min dialysiert. Anschließend wurden die gewonnenen Kernproteine in vorgekühlte Reaktionsgefäße aliquotiert, in Flüssig-N₂ schockgefroren und bei -80⁰C gelagert.

PBS (1x), pH 7,4 (1 Liter):	8 g NaCl, 0,2 g KCl, 1,44 g Na ₂ HPO ₄ , 0,24 g KH ₂ PO ₄
Puffer A:	10 mM Tris/HCl pH 7,9, 1,5 mM MgCl ₂ , 10 mM KCl, 0,5 mM DTT*
Puffer C:	20 mM HEPES/Na, pH 7,9, 0,5 M NaCl, 1,5 mM MgCl ₂ , 0,2 mM EDTA, 0,2 mM PMSF*, 2 mM DTT*, 25 % Glycerol (V/V)
Puffer D200:	20 mM HEPES/Na, pH 7,9, 12,5 mM MgCl ₂ , 0,2 mM EDTA, 2 mM DTT*, 0,25 mM PMSF*, 17 % Glycerol (V/V), 200 mM KCl
Puffer D100:	wie Puffer D200, jedoch KCl 100 mM

* DTT- und PMSF-Stocklösungen wurden bei -20⁰C gelagert und direkt vor Gebrauch den Puffern zugegeben.

2.11.2 Kernextrakt-Präparation nach Schreiber (Schreiber et al., 1989)

Die auf diese Weise hergestellten Extrakte konnten für Gelretardations-Experimente verwendet werden.

Die Zellen wurden wie unter 2.11.1 geerntet, pelletiert und anschließend in 400 µl Puffer A resuspendiert. Zum Schwellen wurde die Suspension für 15 min auf Eis inkubiert, zur Lysis 25 µl Nonidet P-40-Lösung hinzupipettiert und der Ansatz 10 sec geschüttelt. Das Homogenat wurde dann für 30 sec in einer Minifuge zentrifugiert. Der zytoplasmatische Überstand wurde verworfen, das Pellet in 50 µl Puffer C gelöst und für 15 min bei 4⁰C geschüttelt. Der Kernextrakt wurde daraufhin bei 13.000 UpM für 5 min zentrifugiert, der

Überstand abgenommen, in vorgekühlte Reaktionsgefäße aliquotiert, in Flüssig-N₂ schockgefroren und bei -80°C gelagert.

Puffer A: 10 mM HEPES, pH 7,9, 10 mM KCl, 0,1 mM EDTA, 0,1 mM EGTA, 1 mM DTT*, 0,5 mM PMSF*

Puffer C: 20 mM HEPES, pH 7,9, 0,4 M NaCl, 1 mM EDTA, 1 mM EGTA, 1 mM DTT*, 1 mM PMSF*

*frisch dazugeben

2.12 Analyse von DNA-Protein-Interaktionen

2.12.1 Gelretardations-Experimente (Bandshifts)

Zum Nachweis von DNA-Protein-Interaktionen wurden radioaktiv markierte doppelsträngige Oligonukleotide mit verschiedenen Kernextrakten sowie unspezifischer Kompetitor-DNA (hier poly dI/dC) inkubiert und über Gelelektrophorese aufgetrennt. An Proteine gebundene DNA wandert dabei langsamer als freie DNA und erscheint als Bande, deren Lage durch Größe, Ladung und Struktur des Bindungskomplexes bestimmt wird. Die Bindungsspezifität der Proteine wurde durch Kompetition der Komplexbildung durch Zugabe von nicht markierten doppelsträngigen Oligonukleotiden im Überschuß überprüft.

5 bis 20 µg Kernextrakt nach Dignam (Dignam et al., 1983) oder Schreiber (Schreiber et al., 1989) wurden auf Eis aufgetaut und so in Bindungspuffer pipettiert, daß bei einem Endvolumen von 20 µl folgende Konzentrationen vorlagen: 10 mM Tris/HCl*, 5 mM MgCl₂*, 1 mM EDTA*, 1 mM DTT*, 75 mM KCl, 10 % Glycerol, 2 µg poly dI/dC, 1 mM Spermidine, ggf. 0,5 bis 2 mM ZnCl₂ und Kompetitor-DNA (50 bis 1000facher Überschuß). Dieser Ansatz wurde 10 min auf Eis inkubiert und anschließend das markierte Oligonukleotid hinzugegeben (10 bis 30.000 cpm pro Ansatz) und nochmals 10 bis 20 min auf Eis inkubiert. Danach wurden die Proben mit je 3 µl Ladepuffer auf ein inzwischen bei 30 mA vorgelaufenes 4%iges PAA-Gel (0,5x TBE) aufgetragen und ca. 2 Stunden bei 4°C aufgetrennt (Bromphenolblau am unteren Ende des Gels). Anschließend wurde das Gel getrocknet und autoradiographiert.

*Bindungspuffer (5x):	50 mM Tris/HCl, pH 7,9, 25 mM MgCl ₂ , 5 mM EDTA, 5 mM DTT
Stocklösungen:	750 mM KCl, 50 % Glycerol, poly dI/dC 2 µg/µl, 20 mM Spermidine, 20 mM ZnCl ₂
Ladepuffer:	1,6 % Bromphenolblau, 40 % Glycerol, 0,5x TBE

2.12.2 Gelretardations-Experimente mit Antikörpern (Supershifts)

Zum genauen Nachweis, um welche Protein-DNA-Komplexe es sich bei den Bandshifts handelt, wurden bei ähnlichem Versuchsaufbau zusätzlich polyklonale Antikörper mitinkubiert. Es standen polyklonale Antikörper gegen die Zinkfingerproteine Sp1, Sp3 und Sp4 (Hagen et al., 1992) zur Verfügung (Dr. G. Suske, IMT, Marburg). Durch die zusätzliche Bindung der Antikörper an die Protein-DNA-Komplexe verändert sich die Wanderungsgeschwindigkeit und somit die Bandenhöhe. Als Vergleich wurde Kaninchen-Präimmunserum eingesetzt.

5 bis 20 µg Kernextrakt nach Dignam (Dignam et al., 1983) oder Schreiber (Schreiber et al., 1989) wurden auf Eis aufgetaut und so in Supershift-Bindungspuffer pipettiert, daß bei einem Endvolumen von 20 µl folgende Konzentrationen vorlagen: *12,5 mM HEPES pH 7,5, *6,25 mM MgCl₂, *9 % Glycerol, *5 µM ZnSO₄, 1 µg poly dI/dC, 0,5 µg BSA, 0,5 mM ZnCl₂ und ggf. Kompetitor-DNA. Nach Inkubation auf Eis für 10 min, Zugabe des radioaktiven Oligonukleotids (10 bis 30.000 cpm pro Ansatz) und weiterer Inkubation auf Eis für 10 min wurden je 1 µl der polyklonalen Antikörper bzw. Kaninchen-Präimmunserum hinzupipettiert und nochmals für 10 min auf Eis inkubiert. Die Gelelektrophorese erfolgte wie bei den Bandshifts.

*Supershift-Bindungspuffer (5x): 62,5 mM HEPES, pH 7,5, 31,25 mM MgCl₂, 45 % Glycerol, 25 µM ZnSO₄

Stocklösungen: poly dI/dC 2 µg/µl, BSA 1 µg/µl, 20 mM ZnCl₂

2.12.3 DNaseI-Footprinting

Die DNaseI-Footprint-Technik ermöglicht die genauere Aufklärung über die Kontaktregion eines sequenzspezifisch bindenden Proteins auf DNA-Ebene. Hierbei wird ein einseitig endmarkiertes DNA-Fragment einem partiellen Verdau durch DNaseI ausgesetzt, so daß im Durchschnitt jedes DNA-Molekül nur einmal geschnitten wird. Bei anschließender PAA-Gelelektrophorese stellt sich so eine Leiter aller möglichen Spaltprodukte dar. Werden vor der DNaseI-Behandlung spezifisch bindende Proteine mit der DNA inkubiert, so verhindert die Proteinbindung an dieser Stelle den DNaseI-Verdau, und es kommt zum Fehlen von Banden. Eine parallel verlaufende Sequenzreaktion desselben DNA-Fragments ermöglicht die genaue Zuordnung der Kontaktregion.

1.) 80 bis 150 µg Roeder-Kernextrakte (parallel zur Kontrolle BSA in gleicher Konzentration) wurden mit 2,5 µg poly dI/dC und 1x Bindungspuffer in einem Gesamtvolumen von 25 µl gemischt, das einseitig endmarkierte DNA-Fragment (10 bis 30.000 cpm) hinzupipettiert und bei Raumtemperatur 25 min inkubiert. 1 bis 20 U DNaseI (Boehringer), ggf. verdünnt in 10 mM Tris/HCl, pH 8, wurden mit einem vorbereitetem Gemisch von 10 µl 100 mM MgCl₂ und 5 µl poly dA/dT 1 min vor Ablauf der Bindungsreaktion zur optimalen Aktivitätsentfaltung der DNaseI inkubiert. Danach wurden beide Ansätze zusammengegeben und der Verdau nach exakt 40 sec durch Zugabe von 50 µl Stopplösung beendet.

2.) 1 bis 6 fpu Sp1-Protein (Promega) wurden mit 25 µl Sp1-Bindungspuffer und Aqua bidest. in einem Gesamtvolumen von 50 µl gemischt und das DNA-Fragment hinzugegeben und 25 min bei Raumtemperatur inkubiert. Nach Ablauf der Zeit wurden 50 µl Ca²⁺/Mg²⁺-Lösung hinzugefügt, 1 min bei Raumtemperatur inkubiert und 3 µl DNase-Verdünnung hinzugegeben. Die DNase-Verdünnung wurde durch Mischen von 0,5 µl DNaseI (Promega) in 10 µl eiskalter 10 mM Tris/HCl frisch hergestellt. Der Verdau wurde nach 1 min mit 90 µl Stopplösung beendet.

Die Produkte aus 1 und 2 wurden einer Phenol-Chloroform-Extraktion unterzogen, gefällt und gewaschen, das getrocknete Pellet wurde in 3 bis 6 µl Formamid-Ladepuffer resuspendiert und vor dem Laden des Sequenzgels (8%iges, denaturierendes PAA-Gel) bei 90°C 3 min denaturiert und auf Eis abgekühlt.

Bindungspuffer (1x):	12,5 mM HEPES, pH 7,5, 6,25 mM MgCl ₂ , 9 % Glycerol, 5 μM ZnSO ₄
Stopplösung:	200 mM NaCl, 30 mM EDTA, 1 % SDS, 100 μg/ml Hefe- RNA
Sp1-Bindungspuffer:	50 mM Tris/HCl pH 8, 100 mM KCl, 12,5 mM MgCl ₂ , 1 mM EDTA, 20 % Glycerol, 1 mM DTT
Ca ²⁺ /Mg ²⁺ -Lösung:	5 mM CaCl ₂ , 10 mM MgCl ₂

2.13 Zellkultur

2.13.1 Zelllinien und Kultivierung

Alle Arbeiten mit eukaryonten Zellen erfolgten an einem sterilen Arbeitsplatz der Sicherheitsstufe S1.

Die Ratteninsulinoma-Zellen RIN38A (Philippe et al., 1988) stammen von einem pluripotenten Inselzelltumor ab und exprimieren bioaktives Gastrin (Wang et al., 1990). Die Zelllinie wurde in DMEM-Medium (High Glucose) mit 10 % FCS und 100 μg/ml Penicillin-Streptomycin kultiviert.

Das Gastrinogen wird in allen Klassen von bronchogenen Karzinomen exprimiert (Rehfeld et al., 1989). Die NSCLC-Zellen 32M1 (Bepler et al., 1988) und MSTO-211H (Bepler et al., 1988) sowie die SCLC-Zellen H69 (Carney et al., 1985) wurden in RPMI 1640-Medium mit 10 % FCS und 100 μg/ml Penicillin-Streptomycin kultiviert. Die H69-Zellen wachsen in Suspension.

Für Transfektionen wurden möglichst Zellen mit niedriger Passagenummer verwendet, die Transfektion erfolgte in DMEM-Medium mit 10 % FCS und 100 μg/ml Penicillin-Streptomycin.

Die beschriebenen Zellen wurden routinemäßig in Gewebekulturflaschen (600 ml) kultiviert. Die Kultur erfolgte in wassergesättigter Atmosphäre bei 37⁰C unter Begasung mit 5 % CO₂ und 95 % Luft in einem Brutschrank. Die Passagierung erfolgte zweimal wöchentlich. Hierzu wurde das Medium in den Flaschen unter der Werkbank abgesaugt und die konfluenten Zellen mit 6 ml Trypsin-EDTA-Lösung vom Boden gelöst. Nach

vollständigem Ablösen wurde durch Zugabe von Medium das Trypsin inaktiviert, mit Hilfe der Neubauer-Zählkammer die Zellzahl/ml Medium ermittelt, um anschließend die Zellen in gewünschter Dichte in Flaschen oder auf Petrischalen für Gewebekultur auszusäen. Da H69-Zellen in Suspension wachsen, wurde hier durch Schrägstellung der Flaschen eine Sedation erreicht, so daß das alte Medium vorsichtig abgesaugt werden konnte, eine Trypsinierung war nicht nötig.

2.13.2 Einfrieren und Auftauen von Zellen

Zellen, die nicht für Experimente benötigt wurden, wurden eingefroren und in Flüssig-N₂ gelagert. Hierzu wurden die Zellen mit 1x PBS gewaschen, geerntet und für 5 min bei 1500 UpM zentrifugiert. Das Pellet wurde vorsichtig in Medium mit 10 % DMSO resuspendiert, in Kryogefäße aliquotiert und für zwei Stunden bei -80°C gefroren, bevor sie in Flüssig-N₂ gelagert wurden. Das Auftauen erfolgte möglichst schnell im warmen Wasserbad, anschließend wurden die Zellen in wenig Medium für 5 min bei 1500 UpM zentrifugiert, das Pellet in neuem Medium resuspendiert und in eine vorbereitete Gewebekulturflasche überführt. Am nächsten Tag wurde nochmals das Medium gewechselt, um ein optimales Anwachsen zu erreichen.

2.13.3 Transiente Transfektion

Das Einführen von DNA in eukaryonte Zellen wird als Transfektion bezeichnet. Bei der transienten Transfektion soll es dabei zu einer vorübergehenden Expression des fremden Gens kommen. Der Nachweis der Genexpression nach der Transfektion kann dabei mit Hilfe des Luciferase-Reportergens (pGL2-Basic) erfolgen, das hinter die Gastrinpromotorsequenzen (Simon et al., 1997) kloniert wurde. Unterschiede der Transfektionseffizienz wurden durch Kotransfektion mit dem Kontrollplasmid pSV-β-Gal., welches Galaktosidase exprimiert, kontrolliert und normalisiert. Als Negativkontrolle diente das promotorlose Luciferaseplasmid pGL2-Basic. Als Positivkontrolle diente der Vektor pGL2-Control, der ein hinter den SV40-Promotor geschaltetes Luciferasegen enthält und so zur Kontrolle der Transfektionseffizienz dient.

2.13.3.1 Calcium-Phosphat-Methode (Wigler et al., 1979)

Bei den Zelllinien H69, 32M1 und MSTO-211H führte die Calcium-Phosphat-Methode zu einer guten Transfektionseffizienz. Die Zellen wurden so auf 30 mm-Schalen ausgesät, daß sie am nächsten Tag zu 50 bis 70 % konfluent waren. Zwei Stunden vor der Transfektion wurde das Medium gewechselt. Je Schale wurden 5 µg Plasmid-DNA und 2 µg pSV-β-Gal.-Plasmid in 250 µl CaCl₂-Lösung in einem Röhrchen gemischt und über „Bubbeln“ (Luftzufuhr über eine Glaspipette) langsam in ein zweites Röhrchen mit 250 µl 2x HBS überführt. Dieser Ansatz wurde 30 bis 40 min bei Raumtemperatur inkubiert und das so entstandene feine Präzipitat auf die inzwischen mit DMEM-Medium versehenen Schalen gegeben. Nach 18 bis 24 h wurde den Zellen wieder ihr eigenes Medium zugeführt, weitere 24 h später wurden die Zellen zweimal mit PBS gewaschen und anschließend in 1 ml PBS geerntet und die Luciferase- und β-Galaktosidase-Aktivität bestimmt.

Calciumchlorid-Lösung (sterilfiltriert): 250 mM CaCl₂
HBS (2x), pH 7,05 (sterilfiltriert): 50 mM HEPES, 10 mM KCl, 12 mM Dextrose, 280 mM NaCl, 1,5 mM Na₂HPO₄

2.13.4 Bestimmung der Luciferase-Aktivität

Die in 1 ml 1x PBS geernteten Zellen wurden in ein Reaktionsgefäß überführt und für 3 min bei 13.000 UpM zentrifugiert. Das Pellet wurde in 100 µl Reporter Lysis Puffer (Promega, 1:5 in Aqua bidest. verdünnt) gelöst und zweimal in Flüssig-N₂ schockgefroren. Nach der so provozierten Zellysis wurde der Ansatz nochmals zentrifugiert und der Überstand (Cytosol) in ein neues Reaktionsgefäß überführt. 1 bis 5 µl des Überstandes wurden für die Messung am Luminometer in Meßröhrchen pipettiert, wobei im Gerät je 100 µl Luciferase Assay Substrate injiziert wurden. Der Leerwert betrug etwa 100 Light-Units und wurde automatisch von den Meßwerten abgezogen.

2.13.5 Bestimmung der β -Galaktosidase-Aktivität

Als interner Standard wurde das pSV- β -Gal.-Plasmid kotransfiziert. Zur Hitzeinaktivierung der zelleigenen β -Galaktosidase wurde der Überstand aus der Bestimmung der Luciferase-Aktivität für 50 min bei 48⁰C inkubiert. Anschließend wurden zur Bestimmung der β -Galaktosidase-Aktivität 66,6 μ l Reaktionspuffer (Tropix: Galacton-PlusTM Substrate, 1:100 mit Galacto-LightTM Reaction Buffer Diluent verdünnt) im Abstand von 20 sec zu 1 bis 5 μ l des Überstandes pipettiert und für 60 min bei Raumtemperatur inkubiert. Die Messung am Luminometer erfolgte im gleichen Zeitabstand, als Reagenz wurde Light Emission Accelerator vom Gerät injiziert. Der Leerwert betrug etwa 100 Light-Units und wurde automatisch von den Meßwerten abgezogen.

3 Ergebnisse

3.1 Der humane Gastrinpromotor

Durch die Klonierung der 5'-flankierenden Sequenzen des Gastringens war bereits die Identifizierung *cis*-regulatorischer Bereiche des Promotors in einigen Organsystemen möglich. Welche Bereiche eine Rolle bei der Aktivierung in Bronchialkarzinomzellen spielen, ist jedoch weitgehend unbekannt. Voruntersuchungen haben auf eine Regulation des Promotors durch Sp1 mit Bindung an eine CACCC-Box hingewiesen. Zur Identifizierung lag das 1300 bp große Reporterengenkonstrukt des Gastrinpromotors hugas Luc -1300 mit Deletionskonstrukten vor, die in den promotorlosen Expressionsvektor pGL2-Basic subkloniert wurden (Simon et al., 1997) und so in Bronchialkarzinom-Zelllinien transfiziert werden konnten. Zur Übersicht ist ein Teil des Gastrinpromotors mit dem ersten nichtkodierenden Exon, dem bekannten Haupttranskriptionsstartpunkt und einigen potentiellen Bindungsstellen sowie den bereits vorliegenden Deletionskonstrukten in Abbildung 3 dargestellt.

3.2 Zelltypspezifische Expression des hugas Luc 1300-Reporterengenkonstruktes

Um die zelltypspezifische Aktivität des Gastringens in verschiedenen Lungentumorzellen zu untersuchen und relevante *cis*-regulatorische Elemente zu identifizieren, wurde das Gastrinreportergenkonstrukt der 5'-flankierenden DNA hugas Luc -1300 in die drei Zelllinien 32M1 (NSCLC), H69 (SCLC) und MSTO-211H (Mesotheliom) transient transfiziert. Nach Inkubation der Zellen über 24 Stunden wurde die Luciferaseaktivität als Ausdruck der Promotoraktivität in relativen Lichteinheiten (RLU) gemessen. Die Vektoren pGL2-Basic (Negativkontrolle) und pGL2-Control (Positivkontrolle) wurden parallel transfiziert, die Kotransfektion des β -Galaktosidase-Vektors diente zur Standardisierung der Transfektionseffizienz. Die so erhaltenen Werte wurden in Relation zu pGL2-Control ausgedrückt (Abb.4). In der Mesotheliom-Zelllinie MSTO-211H zeigte der Gastrinpromotor keine oder nur geringe Aktivität, während die Gastrinpromotoraktivität in

```

ACCCAAGGGG ATCAAACCTCT CCCAGAAAAG GTGGGGGCCC AATGACGCAT -1300
GAACAGGAGC AAAATCTCTG CTCTCAACAG TGGAAAAGTA AAAAACACCC -1250
TACGGCTCAT TACATCTGGT CAAACCATGT GGAGGCAGCA GTTTATCAAA -1200
TAAGTCAACA AGGTACCATT TTGTTTTCTG GTCCATCTTT GGCAAATGCT -1150
TTAGTCTGTT TGCTAACCAT TTGAAGGTAT ATTTTGATAC TGAAAAGTTG -1100
TTGGCTGGGC ATGGTGGCTC ACGTCTGTAA TCCCAGAAGT TTGGCAGACT -1050
AAGCTGGGCC GATCATGAGG TCAGGAGTTC GAGACCAGCC CGCCCAACAC -1000
GATGAAACCC CATCTCTACT AAAAATACAA AAAATTAGCC AGGCGTGGGG -950
GCGTGCGCTG TAATCCAGC TACTAGGGAG GTTGAGGCAG AAGAATCGCT -900
TGAACCCAGG AGGCGGAGGT TCCAGTGAGC CGAGATCACA CCACTGCACT -850
CCTGCACTCC AGCCTGGTGA CAGAACTAGA CTTTGTCTCA AAAAAAAAAA -800
AAAGTTGTTA TGCAGATTAC TAGTCCCCTT TGAAAGCAAA ATGAAGGAGG -750
CTTCAAAGGC AGGACCCTCC AGGAATTGGT TCTGCATAGG GGGTTTGCAA -700
GTGGTGGTGC ATGGGCAGCT GACCTAGAAG ACACGGGGCA GCTACAAGCC -650
AAACCCAGCC CAGCACAGAG GGCCTAAGGA CAAGAAGGCA CAAGGGTGT -600
CATGGTAGGG GGAGGGTGAA AGGACTTCAG AGGTGACCAG GATGTGAGCC -550
ACTAGAAGGA GAGAACAGGG CCATCAGCCC ACAACCCATT GCTCCTGGTA -500
ACACGTTATG TTTGCAGAGT CCAGTGGAGG GGACGGGGAA TCAATACATC -450
ACCCCACATT CACACGCTTG CCAAACATCA GTGGATGGCG AAATCCACTT -400
TCCCTGAATC TAAGCCCATC GGTTCACTCC CTCACCTACC ACCACCCACA -350
AAGGTCCCTA TGTAGTTCGA GAGATAAGTG CCGAGGCCTC TGACCCCCAG -300
GATATGGTGG GAAGCATTGC TCCTGACCCA GGGAGCTTGG TTCCTGCCCC -250
TCAGGTACAG CTGGAGAGCT GCCGCCACCC CGCTCCAGCC CCTCACCATG -200
AAGGTCAACT CCCCTATCCT TCCCCACAT CCTGGATGAC TGACTGACAC -150
TAAATGAAAG G GCGGGGCAG GGTCATGGGC TGTACCTGTG CCCCACCCCA -100
TTCCTCTCGC CTGGACTCAT ATGGCAGGGT AGGGGCGGGG TGGGGGGACA -50
GTTGGGAGGG ACCTTGAGGG CTTTATAAGG CAGGCCTGGA GCATCAAGCA 0
GAGCAGAGAC CTGAGAGGCA CCAGGCCCAG CCGTGGCACC ACACACCTCC 50
CAGCTCTGCA ----- 60

```

Abb.3: Sequenz der 5'flankierenden DNA des humanen Gastringens. Das nichtkodierende Exon 1 ist mittelgrau unterlegt, der Haupttranskriptionsstartpunkt wird durch den Pfeil dargestellt. Bekannte Sequenzmotive als Bindungsstellen für Sp1 sind hellgrau, die CACCC-Box dunkelgrau und die TATAA-Box weiß unterlegt. Der Beginn der Deletionskonstrukte (hugas Luc) ist jeweils mit einem Punktpfeil gekennzeichnet.

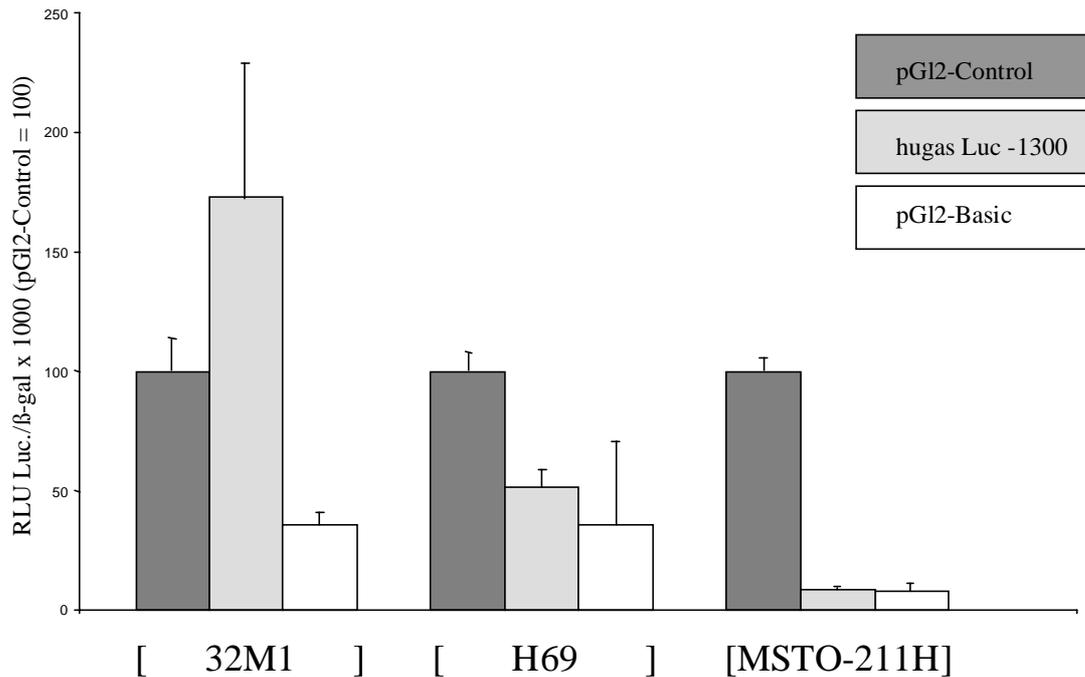


Abb. 4: Zelltypspezifische Aktivität der 5'flankierenden DNA des Gastrinpromotors in 32M1-Zellen (NSCLC), H69-Zellen (SCLC) und MSTO-211H-Zellen (Mesotheliom). Nach transients Transfektion wurden die Luciferasewerte ($n \geq 3$) des Gastrinpromotor-Reportergenkonstruktes hugasLuc -1300, des Expressionsvektors pGI2-Control und von pGI2-Basic (Hintergrund-Luciferaseaktivität) normalisiert durch Kotransfektion mit RSV β Gal und relativ zu den Werten von pGI2-Control (=100 %) dargestellt. Die Werte sind in relativen Lichteinheiten (RLU) angegeben.

der NSCLC-Zelllinie 32M1 am höchsten war, mäßig in der SCLC-Zelllinie H69. Dies zeigt, daß die 1,3 kb 5'flankierende DNA des Gastrinpromotors eine zelltypspezifische Expression in diesen Lungentumor-Zelllinien aufweist.

3.3 Lokalisation *cis*-regulatorischer Elemente durch Deletionsanalysen

3.3.1 Deletionsanalysen in der NSCLC-Zelllinie EPLC-32M1

Nach Analyse der Aktivität der 1,3 kb 5'flankierenden DNA des Gastringens wurden Deletionskonstrukte des Gastrinreportergenkonstruktes hugas Luc -1300 hergestellt, um

relevante *cis*-regulatorische Elemente zu identifizieren. Die Deletionskonstrukte hugas Luc -1300, hugas Luc -1145, hugas Luc -1035, hugas Luc -935, hugas Luc -835, hugas Luc -710, hugas Luc -600, hugas Luc -510, hugas Luc -400, hugas Luc -190, hugas Luc -148, hugas Luc -119, hugas Luc -82, hugas Luc -79, hugas Luc -68 und hugas Luc -40 wurden in die 32M1-Zellen transient transfiziert ($n \geq 3$) und die transkriptionelle Aktivität durch die Bestimmung der Luciferaseaktivität erfaßt. Das Plasmid pGl2-Basic diente dabei als Negativ-, pGl2-Control als Positivkontrolle (Abb.5). Einen Abfall in der Aktivität zeigten die Deletionen von Nukleotid (Nt) -1300 nach Nt -1145, von Nt -1145 nach Nt -1035 und von Nt -710 nach Nt -600. Die Deletion von Nt -835 nach Nt -710 zeigte eine Reduktion von ca. 55 %. Der Abfall der Aktivität weist auf positiv *cis*-regulatorische Elemente im Deletionsbereich hin. Eine sehr starke Reduktion der Aktivität um ca. 80 % erfolgte durch die Deletionen von Nt -400 nach Nt -190 und von Nt -148 nach Nt -119, sowie bei Deletion von Nt -68 nach Nt -40 mit einer Reduktion um ca. 90 %), so daß hier ebenfalls ein Ausfall positiver *cis*-regulatorischer Elemente anzunehmen ist. Einen geringeren Abfall der Promotoraktivität zeigte die Deletion von Nt -82 nach Nt -79. Im Gegensatz dazu wiesen die Deletionen von Nt -1035 nach Nt -935 und Nt -935 nach Nt -835 einen Anstieg der Promotoraktivität auf, letztere zeigte eine Steigerung um ca. 200 %. Die Deletion von Nt -600 nach Nt -510 bewirkte ebenso einen Anstieg, was auf das Vorhandensein von negativ *cis*-regulatorischen Elementen in diesen Bereichen hinweist. Einen sehr deutlichen Anstieg der Promotoraktivität zeigten die Deletionen von Nt -510 nach Nt -400 mit einer Steigerung auf fast den dreifachen Wert und von Nt -190 nach Nt -148 um mehr als das vierfache, so daß sich hier ebenso relevante negativ *cis*-regulatorische Elemente befinden können. Weitere geringe Steigerungen der Promotoraktivität finden sich bei den Deletionen von Nt -119 nach Nt -82 und von Nt -79 nach Nt -68. Ein Vergleich der bekannten Sequenz der 5'flankierenden DNA des Gastringens und der Bereiche mit einem starken Anstieg oder Reduktion der Promotoraktivität mit möglichen Protein-Bindungsstellen ergab bei einer Konzentration auf den näher zum Haupttranskriptionsstartpunkt gelegenen Bereich folgende mögliche Protein-Bindungsstellen: Als negativ wirkendes *cis*-regulatorisches Element eine CACCC-Box im Bereich zwischen Nt -119 und Nt -82, als positiv *cis*-regulatorische Elemente zwei Sp1-Bindungsstellen von Nt -148 nach Nt -119 und Nt -68 nach Nt -40, der am stärksten aktivierenden Region. Drei weitere CACCC-Boxen liegen auch im deutlich regulierten Bereich von Nt -510 nach Nt -400 und von Nt -400 nach Nt -190.

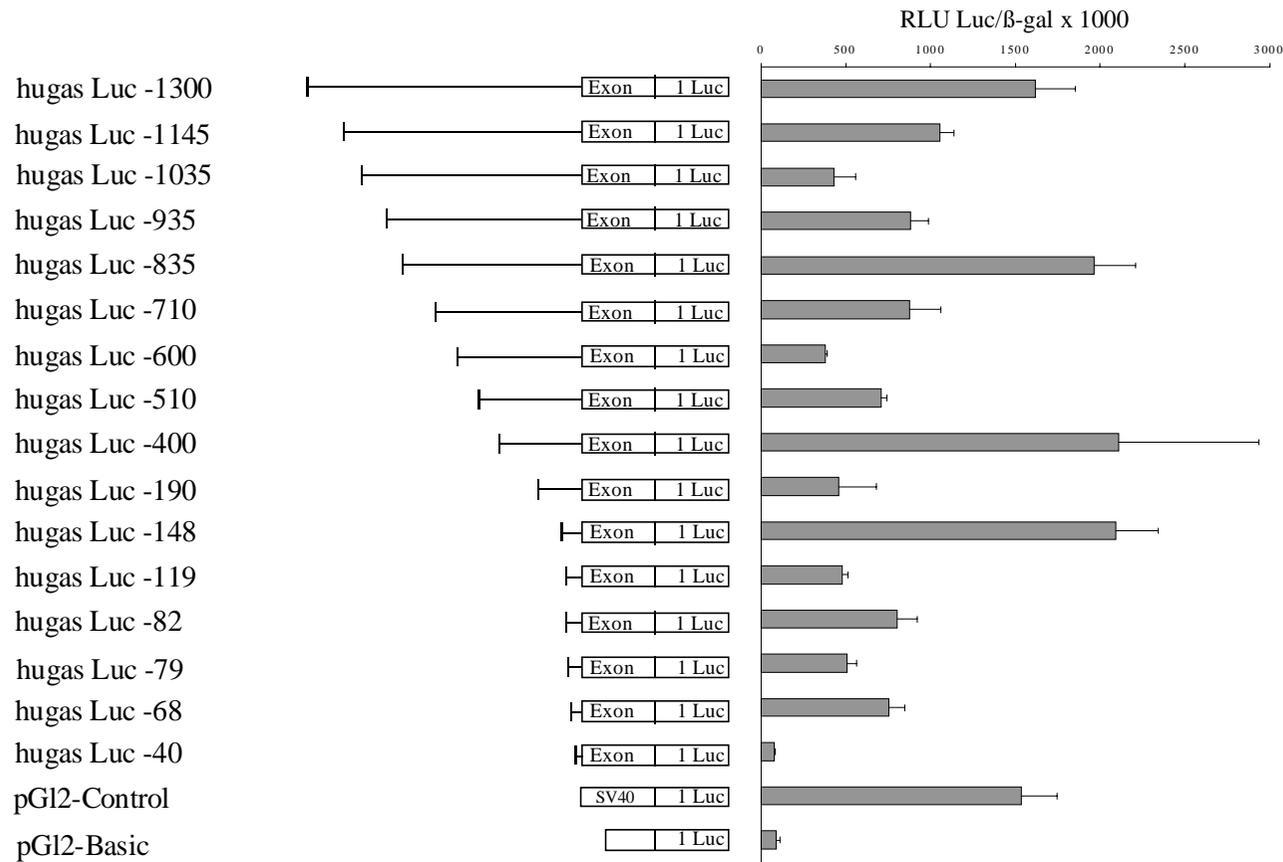


Abb.5: Promotoraktivität der 5'-Deletionskonstrukte in der NSCLC-Zelllinie 32M1. Im linken Teil sind die Benennung und schematisch die Struktur der einzelnen Gastrinreportergenkonstrukte dargestellt, der rechte Teil zeigt die Ergebnisse der Messung der Luciferaseaktivität als Ausdruck der Promotoraktivität der betreffenden Gastrinreportergenkonstrukte. Die Luciferasewerte wurden anhand der β -Galaktosidase-Expression normalisiert und in relativen Lichteinheiten (RLU) angegeben.

3.3.2 Deletionsanalysen in der SCLC-Zelllinie NCI-H69

Da die zelltypspezifische Aktivierung des Reportergenkonstruktes *hugas Luc* –1300-Konstruktes bereits Unterschiede zwischen SCLC- und NSCLC-Zelllinien zeigte, wurden die verschiedenen Deletionskonstrukte in gleicher Weise in die SCLC-Zelllinie H69 transient transfiziert, um auch hier genauer *cis*-regulatorische Bereiche lokalisieren zu können (Abb.6). Die Deletionen von Nt –1300 nach Nt –1145 und von Nt –1145 nach Nt –1035 zeigten eine ähnliche Reduktion der Promotoraktivität, einen im Verhältnis geringeren Abfall die von Nt –835 nach Nt –710, von Nt –710 nach Nt –610, von Nt –148 nach Nt –119 und von Nt –68 nach Nt –40, wogegen die Reduktion der Aktivität um ca. 70 % durch Deletion von Nt –82 nach Nt –79 sehr viel deutlicher ausfiel als in 32M1-Zellen, was hier ebenfalls auf den Ausfall positiv *cis*-regulatorischer Elemente hinweist. Einen stärkeren Anstieg der Aktivität zeigten die H69-Zellen im Vergleich bei den Deletionen von Nt –1035 nach Nt –935 und von Nt –119 nach Nt –82. Dagegen wies sich der Anstieg bei den Deletionen von Nt –935 nach Nt –835, von Nt –600 nach Nt –510 und Nt –79 nach Nt –68 als etwas schwächer aus, der Anstieg der Aktivität durch Deletion von Nt –190 nach Nt –148 war dagegen deutlich geringer im Verhältnis zu den 32M1-Zellen, so daß hier ein Ausfall negativ *cis*-regulatorischer Elemente anzunehmen ist. Im Gegensatz zu diesen Bereichen mit insgesamt ähnlicher Regulierung zeigten die Deletionen von Nt –510 nach Nt –400 und Nt –400 nach Nt –190 umgekehrte Reaktionen, so fiel die Promotoraktivität von Nt –510 nach Nt –400, wogegen sie von Nt –400 nach Nt –190 anstieg. Dies zeigt einen tumorzellspezifischen Unterschied zwischen der SCLC-Zelllinie H69 und der NSCLC-Zelllinie 32M1. Der Vergleich der bekannten Sequenz der 5'flankierenden DNA des Gastringens mit Bereichen starker Regulierung in H69-Zellen nahe dem Transkriptionsstart weist darauf hin, daß die oben identifizierten DNA-Sequenzen eine Rolle in der Regulierung des Gastrinpromotors in Lungenkarzinomzellen spielen.

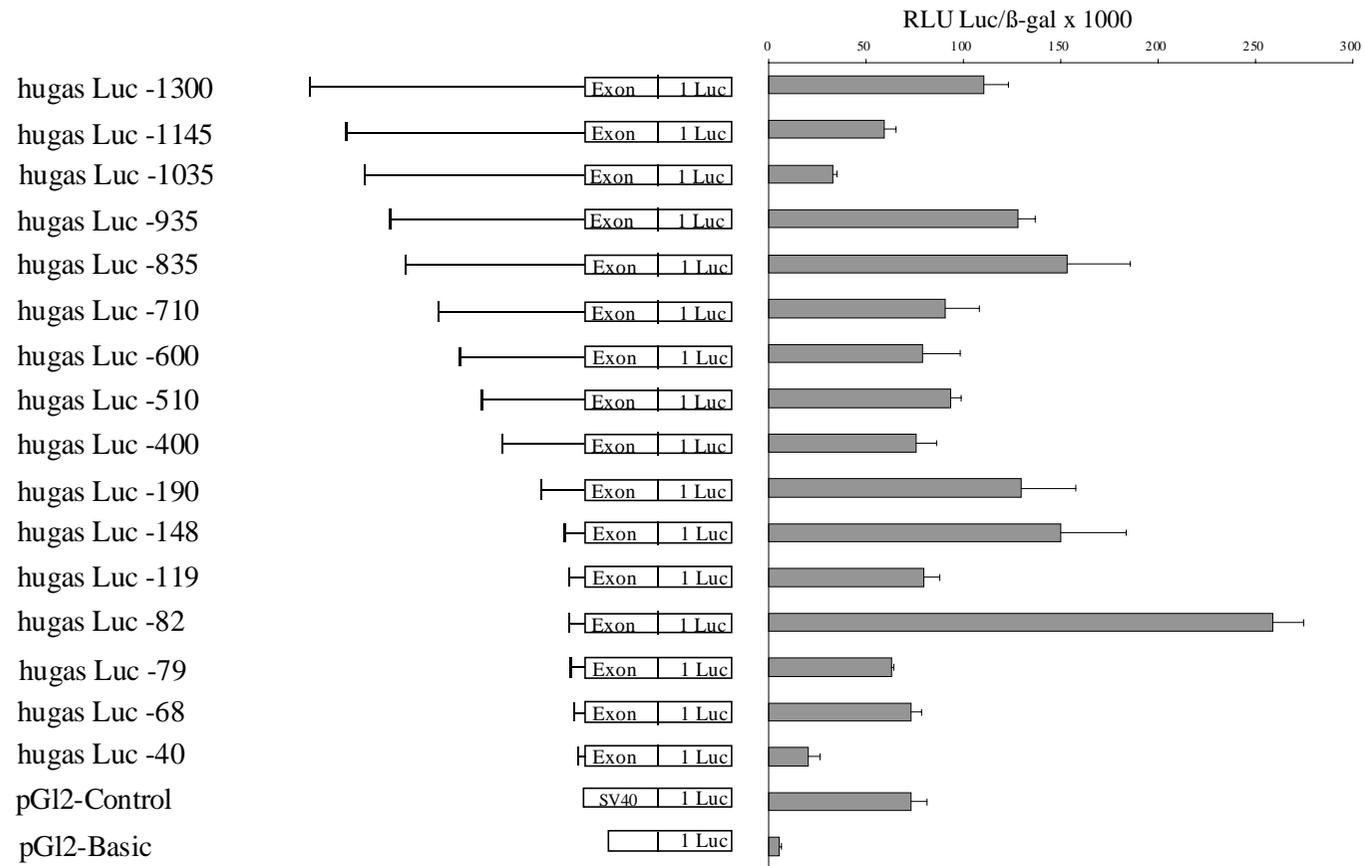


Abb.6: Promotoraktivität der 5'-Deletionskonstrukte in der SCLC Zelllinie H69. Im linken Teil sind die Benennung und schematisch die Struktur der einzelnen Gastrinreportergenkonstrukte dargestellt, der rechte Teil zeigt die Ergebnisse der Messung der Luciferaseaktivität als Ausdruck der Promotoraktivität der betreffenden Konstrukte. Die Luciferasewerte wurden wie in Abb. 5 berechnet und in relativen Lichteinheiten (RLU) angegeben.

3.3.3 Zelltypspezifische Aktivität von 5'-Deletionskonstrukten des Gastrinpromotors

3.3.3.1 Vergleich der NSCLC-Zelllinie 32M1 und der Mesotheliom-Zelllinie MSTO-211H

Zur Unterscheidung zelltypspezifischer *cis*-regulatorischer Sequenzen wurden zeitgleich die NSCLC-Zelllinie 32M1 und die Mesotheliom-Zelllinie MSTO-211H transient mit den Deletionskonstrukten des Gastrinreportergenkonstruktes *hugas Luc -1300* transfiziert (Abb.7). Die Luciferasewerte wurden durch Kotransfektion mit β -Galaktosidase normalisiert. Die sehr geringe Promotoraktivität der verschiedenen Deletionskonstrukte in der Mesotheliom-Zelllinie MSTO-211H bestätigte die vorherigen Ergebnisse bei der Transfektion des Reportergenkonstruktes *hugas Luc -1300*. Die Deletion von Nt -600 nach Nt -510 bewirkte hierbei keine so deutliche Aktivierung in den MSTO-211H-Zellen, der Abfall bei Deletion von Nt -68 nach Nt -40 war dagegen noch stärker als in den 32M1-Zellen. Diese Ergebnisse weisen auf das Vorliegen tumorzellspezifischer *cis*-regulatorischer Elemente in diesen Sequenzen hin. Eine umgekehrte Regulation der Promotoraktivität kam im Vergleich zwischen MSTO-211H- und 32M1-Zellen bei folgenden Deletionen vor: Bei Deletion von Nt -1035 nach Nt -935 und von Nt -190 nach Nt -148 lag bei den MSTO-211H-Zellen eine Reduktion der Aktivität im Gegensatz zu den 32M1-Zellen vor, dagegen steigerte sie sich bei Deletion von Nt -400 nach Nt -190, was auf das Vorliegen zelltypspezifischer *cis*-regulatorischer Elemente in diesen Deletionsbereichen hinweist.

3.3.3.2 Vergleich der SCLC-Zelllinie H69 mit der Mesotheliom-Zelllinie MSTO-211H

Die SCLC-Zelllinie H69 und die Mesotheliom-Zelllinie MSTO-211H wurden wie unter 3.3.3.1 transient transfiziert (Abb.8). Wie erwartet war bei der Transfektion die Promotoraktivität in den MSTO-211H-Zellen sehr gering. Beim Vergleich der Regulierung der Aktivität fielen in den MSTO-211H-Zellen bei Deletion von Nt -935 nach Nt -835 eine Reduktion, bei Deletion von Nt -710 nach Nt -600 ein Anstieg im Gegensatz zu den H69-Zellen auf. Dies weist auf zelltypspezifische *cis*-regulatorische Elemente in diesen Sequenzbereichen hin. Bei den übrigen Deletionen zeigte sich die Regulation im Vergleich der Zelllinien ähnlich, die zum Teil geringen Werte müssen jedoch vorsichtig beurteilt wer-

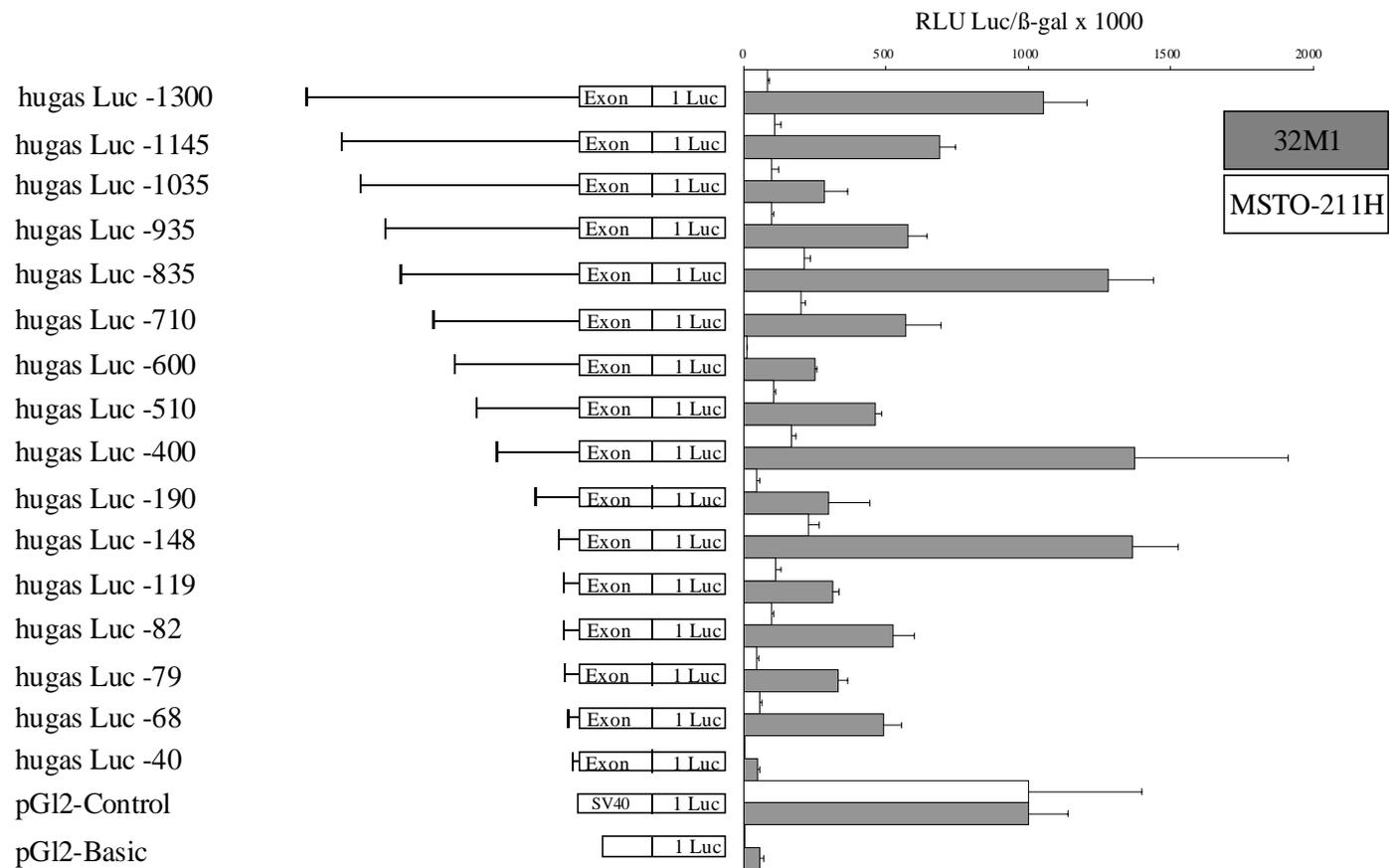


Abb.7: Promotoraktivität der 5'-Deletionskonstrukte in der NSCLC-Zelllinie 32M1 und der Mesotheliom-Zelllinie MSTO-211H. Im linken Teil sind die Benennung und schematisch die Struktur der einzelnen Gastrinreportergenkonstrukte dargestellt, der rechte Teil zeigt die Ergebnisse der Messung der Luciferaseaktivität als Ausdruck der Promotoraktivität der betreffenden Konstrukte im Vergleich der beiden Zelllinien. Die Werte sind wie in Abb.5 berechnet und relativ zu pG12-Control (=1000) in relativen Lichteinheiten (RLU) angegeben.

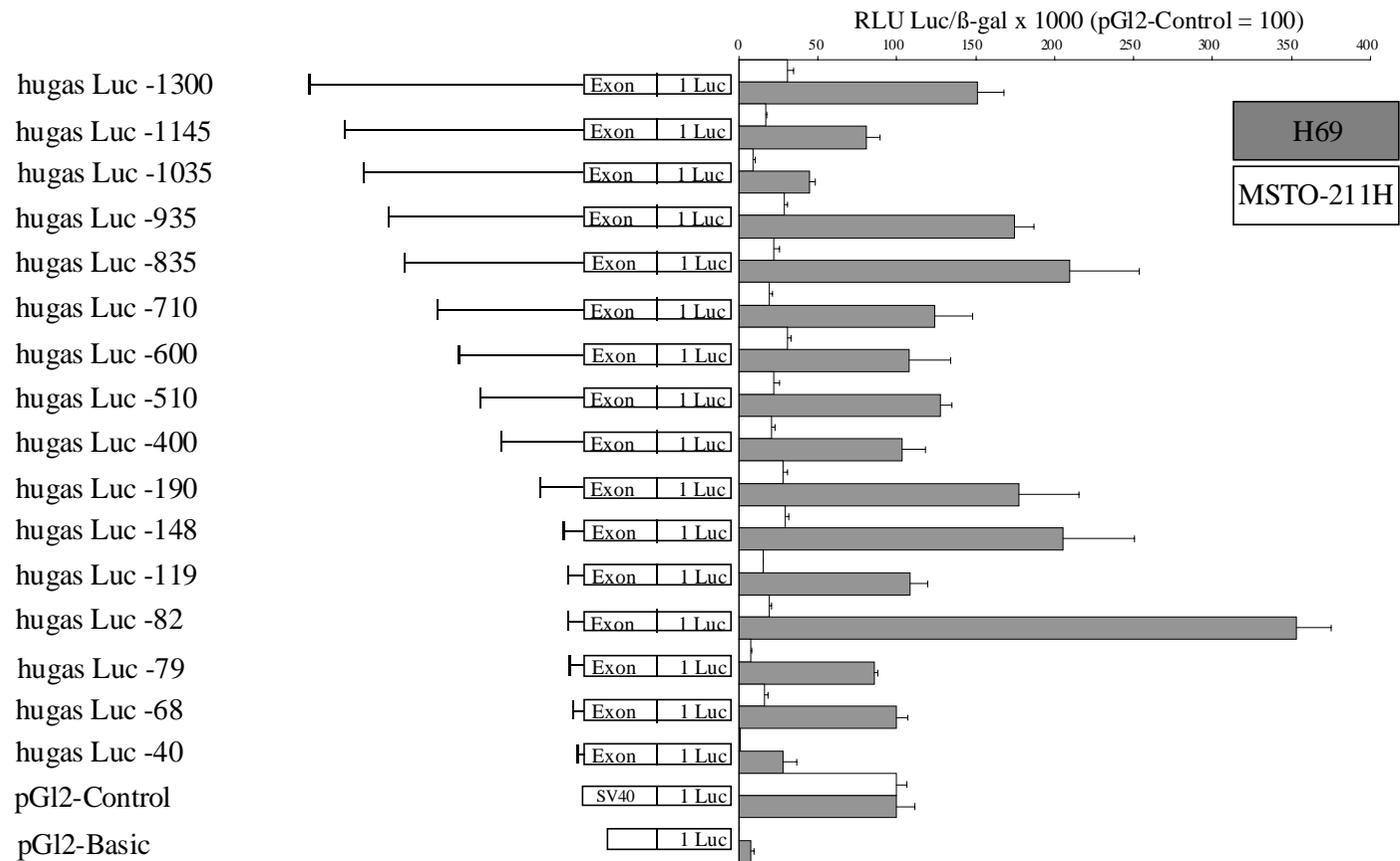


Abb.8: Promotoraktivität der 5'-Deletionskonstrukte in der SCLC-Zelllinie H69 und der Mesotheliom-Zelllinie MSTO-211H. Im linken Teil sind die Benennung und schematisch die Struktur der einzelnen Gastrinreportergenkonstrukte dargestellt, der rechte Teil zeigt die Ergebnisse der Messung der Luciferaseaktivität als Ausdruck der Promotoraktivität der betreffenden Gastrinreportergenkonstrukte. Die Werte sind wie in Abb.7 berechnet und relativ zu pGI2-Control (=100) in relativen Lichteinheiten RLU angegeben.

den. Der Anstieg der Aktivität bei Deletion von Nt -119 nach Nt -82 fiel in den MSTO-211H-Zellen nicht so deutlich aus. Wird die Regulation der Promotoraktivität in den Zelllinien 32M1, H69 und MSTO-211H verglichen, weisen die unterschiedlichen Reaktionen durch Deletionen von Nt -510 nach Nt -400 und Nt -400 nach Nt -190 auf das Vorliegen zelltypspezifischer *cis*-regulatorischer Elemente hin. Die weiteren Deletionen ab Nt -190 bewirken in allen drei Zelllinien eine vergleichbare Veränderung der Promotoraktivität, so daß hier tumorzellspezifische *cis*-regulatorische Elemente vorliegen können.

3.4 Serumstimulation von EPLC-32M1-Zellen

Um den Einfluß der im fötalen Kälberserum (FCS) enthaltenen Wachstumsfaktoren auf die verwendeten Zelllinien zu überprüfen, wurden beispielhaft 32M1-Zellen mit aufsteigender Konzentration FCS und dem Gastrinreportergenkonstrukt *hugas Luc -1300* sowie den Deletionskonstrukten *hugas Luc -68* und *hugas Luc -40* transient transfiziert (Abb.9). Interessanterweise war zu beobachten, daß bei fehlender oder 0,1%iger FCS-Zugabe die Promotoraktivität des Deletionskonstruktes *hugas Luc -40* höher lag als bei 1%iger oder 10%iger FCS-Konzentration. Diese Beobachtung könnte auf den Gastrinpromotor hemmende Faktoren im Serum hinweisen. Bei dem Deletionskonstrukt *hugas Luc -68* blieb die Aktivität bei allen FCS-Konzentrationen nahezu gleich, die Aktivität des Gastrinreportergenkonstruktes *hugas Luc -1300* stieg bei der Erhöhung der FCS-Konzentration von 0,1 % auf 1 % sprunghaft an, so daß ein positiver Einfluß von Serumfaktoren auf die Aktivität der 5'flankierenden DNA des Gastringens zwischen Nt -68 und Nt -1300 in diesen Zellen anzunehmen ist.

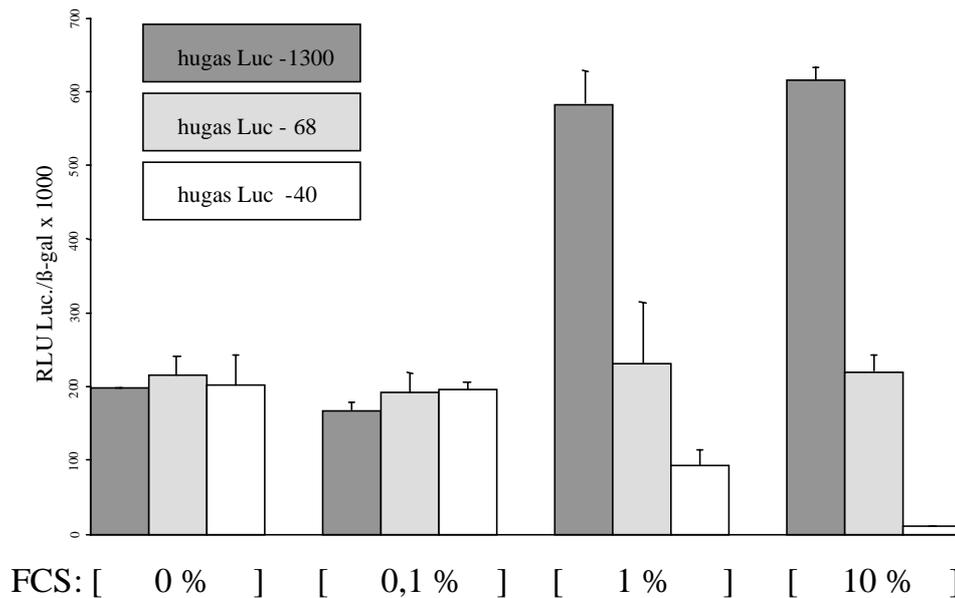


Abb. 9: Stimulation der 5′flankierenden DNA des Gastringens in der NSCLC-Zelllinie 32M1. Die Reporterergenkonstrukte hugas Luc –1300, hugas Luc –68 und hugas Luc –40 wurden transient in 32M1-Zellen transfiziert. Ansteigende Serumkonzentration hat kaum Einfluß auf die Promotoraktivität des Deletionskonstruktes hugas Luc –68. Das Deletionskonstrukt hugas Luc –40 zeigt eine höhere Aktivität bei niedriger FCS-Konzentration, während die Aktivität des Gastrinreportergenkonstruktes hugas Luc –1300 mit Erhöhung der Serumkonzentration sprunghaft ansteigt. Die Werte sind in relativen Lichteinheiten (RLU) angegeben.

3.5 Charakterisierung *cis*-regulatorischer Elemente durch DNA-Protein-Interaktionen

Die Charakterisierung der Deletionskonstrukte der 5′flankierenden DNA des Gastrinpromotors in der SCLC-Zelllinie H69 und der NSCLC-Zelllinie 32M1 weist auf mehrere *cis*-regulatorische Elemente in der Nähe des Haupttranskriptionsstartpunktes hin. Die Sequenzanalyse dieser Region zeigte zwei potentielle Sp1-Bindungsstellen mit einer GGCGG-Sequenz im Bereich von Nt –139 bis Nt –135 und von Nt –66 bis Nt –62 sowie eine CACCC-Box von Nt –106 bis Nt –102. Es wurde daher untersucht, ob Sp1 in diesem Bereich des Gastrinpromotors bindet. Der Nachweis der Sp1-Bindung an die Gastrinpromotorsequenz erfolgte durch DNase-Protektionsversuche und Gelretardations-

Experimente mit und ohne Antikörperzusatz. Zur Übersicht ist die Sequenz der untersuchten DNA-Region mit den Bindungsstellen, den Primern für die DNase Protektionsversuche und den Oligonukleotiden für die Gelretardations-Experimente in Abbildung 10 dargestellt. Bei den Oligonukleotiden handelt es sich um bereits bekannte DNA-Fragmente: Das *cAMP response element* cRE (Hocker et al., 1998, Andrisani, 1999) von Nt -145 bis Nt -126, das *EGF response element* gERE (Merchant et al., 1995) von Nt -68 bis Nt -53 und die CACCC-Box (Simon et al., 1997) von Nt-115 bis Nt -98. Als Negativkontrolle diente das nicht Sp1-bindende AP1 (*activator protein 1*) von Nt -150 bis Nt -168 (Banks et al., 1998).

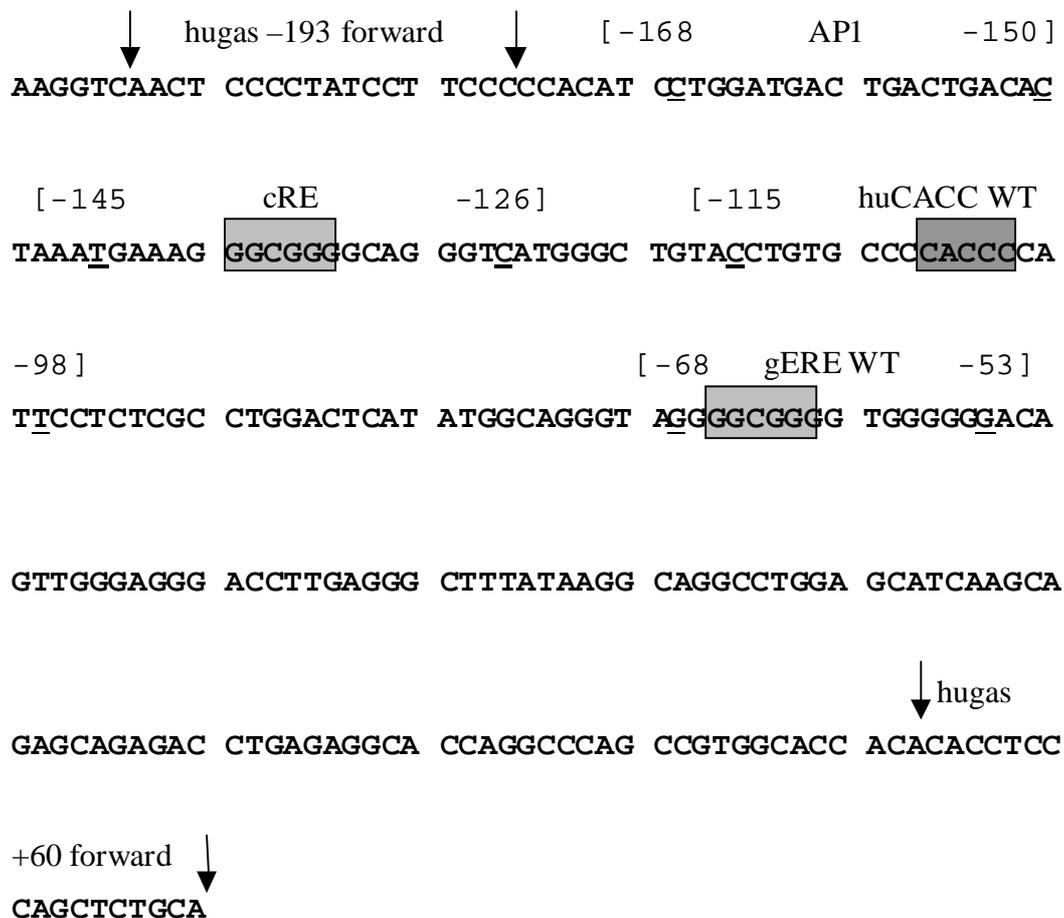


Abb. 10: Sequenz des Gastrinpromotors proximal zum Haupttranskriptionsstartpunkt. Die potentiellen Sp1-Bindungsstellen sind hellgrau, die CACCC-Box dunkelgrau unterlegt. Über der Sequenz sind die für die Gelretardationsexperimente verwendeten Sequenzen als Oligonukleotide in Eckklammern mit Positionsnummern gekennzeichnet und die Primer (Pfeile) für die DNase-Protektionsversuche eingetragen.

3.5.1 DNase-Protektionsversuche

Um eine Bindung von Sp1 an den Gastrinpromotor nachzuweisen, wurden DNase-Protektionsversuche (DNase-Footprinting) durchgeführt. Dazu wurde ein Fragment des Gastrinpromotors von Nt -193 bis Nt +60 eingesetzt, das über radioaktive Markierung nur eines Primers und anschließende PCR gewonnen wurde und so nur an einem Ende radioaktiv markiert wurde. Um eine genaue Zuordnung der protektierten Bereiche zu ermöglichen, wurde ein Teil der markierten DNA chemisch sequenziert (Spaltung nach Maxam und Gilbert). Der DNase-Protektionsversuch erfolgte mittels der Bindung von Proteinen an die markierte DNA durch Inkubation mit rekombinantem Sp1 (2 bis 6 fpu) und mit Zellkernextrakten aus H69- oder 32M1-Zellen (80 bis 150 µg Protein). Nach einer anschließenden partiellen DNase-Spaltung wurden die DNA-Fragmente zusammen mit dem Sequenzierungsansatz auf einem denaturierenden 8 %-igen PAA-Gel aufgetrennt, BSA diente als Negativkontrolle zum Vergleich. Bindet das zugesetzte Protein, so ist dieser Abschnitt der DNA vor der Spaltung durch die DNase geschützt. Die Autoradiographie des DNase-Footprinting (Abb. 11) zeigte an dem Fragment des Gastrinpromotors einen deutlichen Schutz bei der Bindung mit rekombinantem Sp1-Protein an zwei Bereichen, zum einen die bekannte GGGCGG-Sequenz von Nt -66 bis Nt -62, zum anderen die CACCC-Box von Nt -106 bis Nt -102, was bereits in Inselzelltumorzellen gezeigt werden konnte (Simon et al., 1997). Die Ergebnisse bei der Protektion durch die Zellkernextrakte der SCLC-Zelllinie H69 waren insgesamt schwächer als die Protektion durch rekombinantes Sp1, zeigten aber an den gleichen DNA-Sequenzen Schutz vor der DNase-Spaltung. Ursache ist vermutlich die geringere Konzentration von Sp1 im Kernextrakt. Ein entsprechendes DNase-Footprinting mit Zellkernextrakten der NSCLC-Zelllinie 32M1 (Abb. 12) zeigte ebenfalls Protektion der CACCC-Box von Nt -106 bis Nt -102 und der vorhandenen Sp1-Sequenz von Nt -66 bis Nt -62. Diese Untersuchungen weisen darauf hin, daß sowohl in der SCLC-Zelllinie H69 als auch der NSCLC-Zelllinie 32M1 Sp1 am Gastrinpromotor bindet und zwar an der GGGCGG-Sequenz von Nt -66 bis Nt -62 und der CACCC-Box von Nt -106 bis Nt -102 und an der Regulation des Gastrinpromotors beteiligt ist.

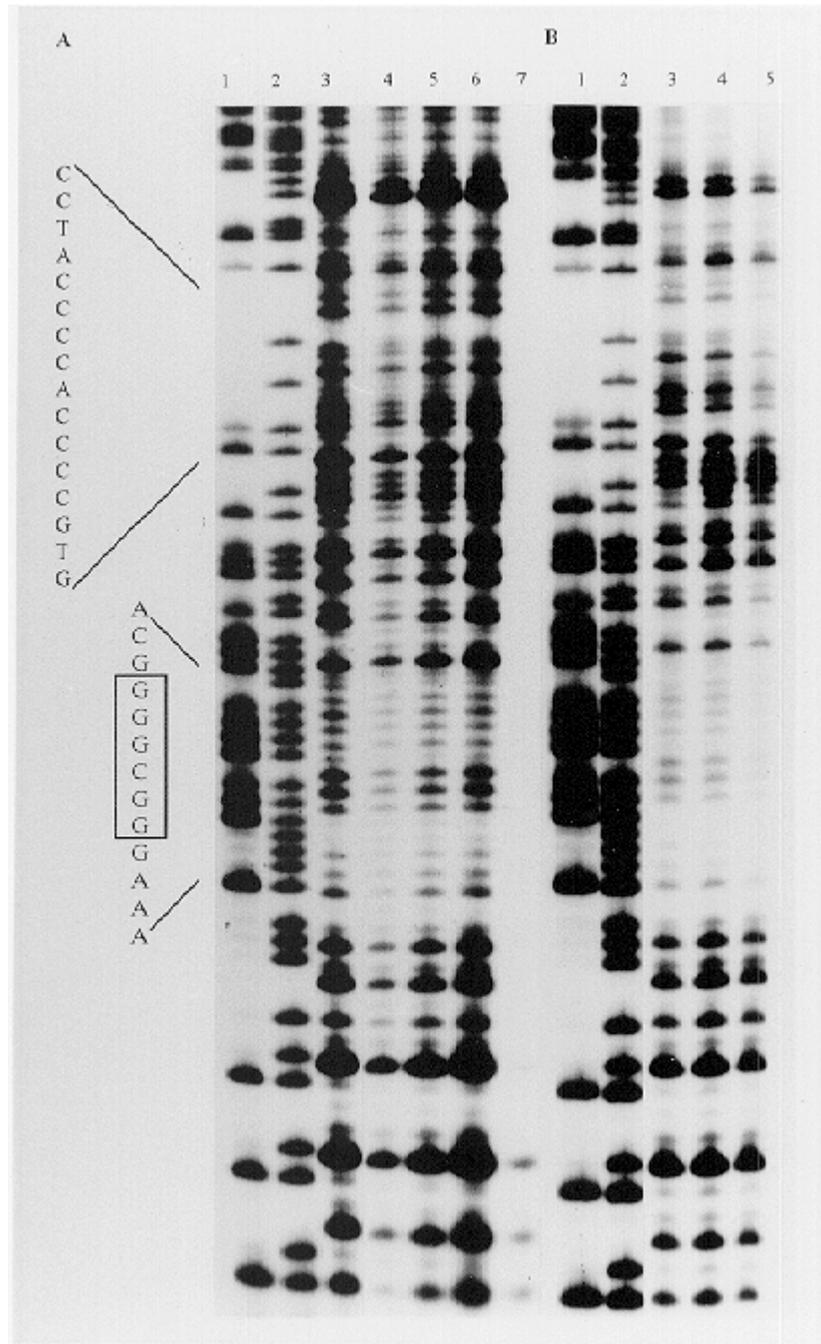


Abb. 11: DNase-Footprinting, Teil A mit H69-Kernextrakten, Teil B mit rekombinantem Sp1-Protein, zum direkten Vergleich ist jeweils in Bande 1 (G) und 2 (G+A) die Sequenzreaktion dargestellt. Die Spuren A3, A7 (höchste DNase-Konzentration) und B3 sind Kontrollen, die mit BSA durchgeführt wurden und keine Protektion zeigen. Die DNA-Fragmente wurden in Teil A mit H69-Kernextrakten bei steigender DNase-Konzentration inkubiert (Spuren 4, 5 und 6), in Teil B mit steigender Sp1-Konzentration (Spuren 4 und 5). Die Sequenz der geschützten Bereiche ist an der Seite angegeben, die Sp1-Bindungsstelle ist umrahmt.

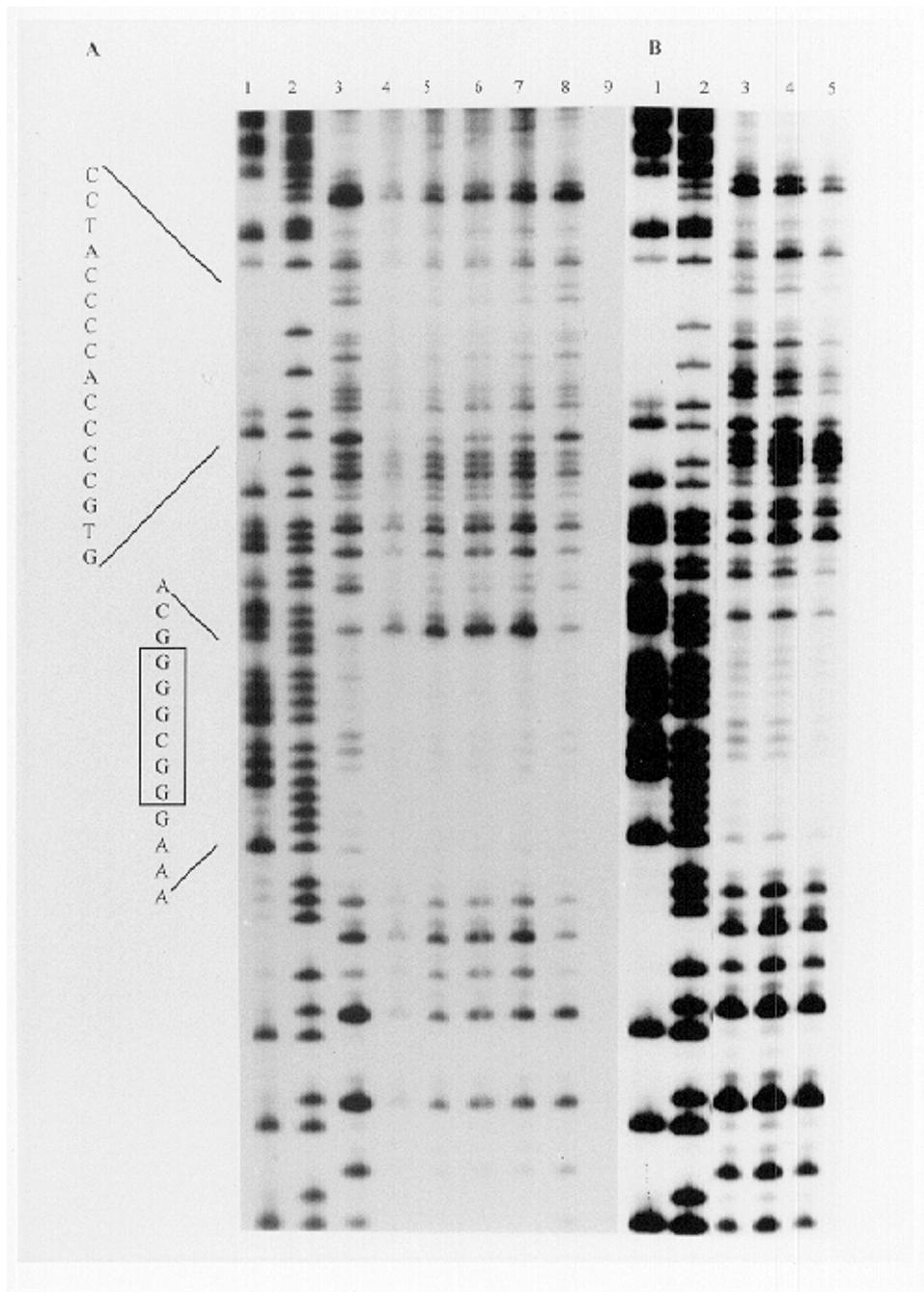


Abb. 12: DNase-Footprinting, Teil A mit 32M1-Kernextrakten, Teil B mit rekombinantem Sp1-Protein, zum direkten Vergleich ist jeweils in Bande 1 (G) und 2 (G+A) die Sequenzreaktion dargestellt. Die Banden A3, A9 (höchste DNase-Konzentration) und B3 sind Kontrollen, die mit BSA durchgeführt wurden und keine Protektion zeigen. Die DNA-Fragmente wurden in Teil A mit 32M1-Kernextrakten (in Spur 8 noch einmal mit H69-Kernextrakt) bei steigender DNase-Konzentration (Spuren 4, 5 und 6) und höherer Kernextrakt-Konzentration (Spur 7) inkubiert, in Teil B mit steigender Sp1-Konzentration (Spuren 4 und 5). Die Sequenz der geschützten Bereiche ist an der Seite angegeben, die Sp1-Bindungsstelle ist umrahmt.

3.5.2 Gelretardations-Experimente (Bandshifts)

Zur weiteren Charakterisierung der Bindung von Proteinen an die untersuchten *cis*-regulatorischen Sequenzen im Gastrinpromotor wurden Gelretardations-Experimente durchgeführt. Die DNase-Protektionsversuche wiesen auf eine Beteiligung von Proteinen aus der Sp-Familie hin, so daß Versuche mit drei DNA-Fragmenten durchgeführt wurden, die eine Sp1-Bindungsstelle enthielten: Das *cAMP response element* cRE (Hocker et al., 1998, Andrisani, 1999) von Nt -145 bis Nt -126, von den Ergebnissen der DNase-Protektionsversuche ausgehend das *EGF response element* gERE (Merchant et al., 1995) von Nt -68 bis Nt -53 und die CACCC-Box (Simon et al., 1997) von Nt -115 bis Nt -98 (Abb.10). Dazu wurden die Oligonukleotide am 5'-Ende radioaktiv markiert, hybridisiert und mit den verschiedenen Zellkernextrakten oder bakteriell exprimierten Sp-Extrakten inkubiert. Zum Vergleich wurde u.a. auch die Ratteninsulinoma-Zelllinie RIN38A herangezogen. Die Spezifität der Protein-DNA-Bindung wurde durch Wettbewerbsversuche gezeigt.

3.5.2.1 Bindungsaktivität bakteriell exprimierter Sp-Proteine und H69-Kernextrakte an das cRE-Element des Gastrinpromotors

Zum Nachweis von DNA-Protein-Komplexen wurde das markierte cRE-Element mit bakteriell exprimierten Sp-Proteinen (Abb. 13, Spuren 3, 4 und 5) oder Kernextrakten der SCLC-Zelllinie H69 (Abb. 13, Spuren 2 und 6 bis 10) inkubiert. Dies führte bei Inkubation mit bakteriell exprimiertem Sp1 zur Ausbildung zweier retardierter Banden, der Doppelbande C1, und einer weniger retardiert wandernden prominenten Bande C2. Die Inkubation mit Sp3 zeigte ausschließlich den DNA-Protein-Komplex C2. Sp4 zeigte die Banden C1 und C2 wie Sp1 in schwächerer Ausprägung. Der direkte Vergleich bei Inkubation mit H69-Kernextrakten zeigte die gleichen retardierten DNA-Protein-Komplexe. Die C1-Bande trat bei H69-Extrakten ebenfalls sehr deutlich hervor, C2 schwächer. Zusätzlich waren zwei weitere DNA-Protein-Komplexe - C3 und C4 - zu sehen. Die Konzentration von Zinkchlorid hatte dagegen keinen signifikanten Einfluß auf die Bindungsaktivität der in den H69-Kernextrakten enthaltenen Proteine an das cRE-Element (Abb. 13, Spuren 6 bis 10). Diese Ergebnisse zeigen, daß Sp1, Sp3 und Sp4 an das cRE-Element binden. Es konnte gezeigt werden, daß H69-Kernextrakte Bindungsaktivität an das cRE-Element aufweisen und die gebildeten DNA-Protein-Komplexe ein

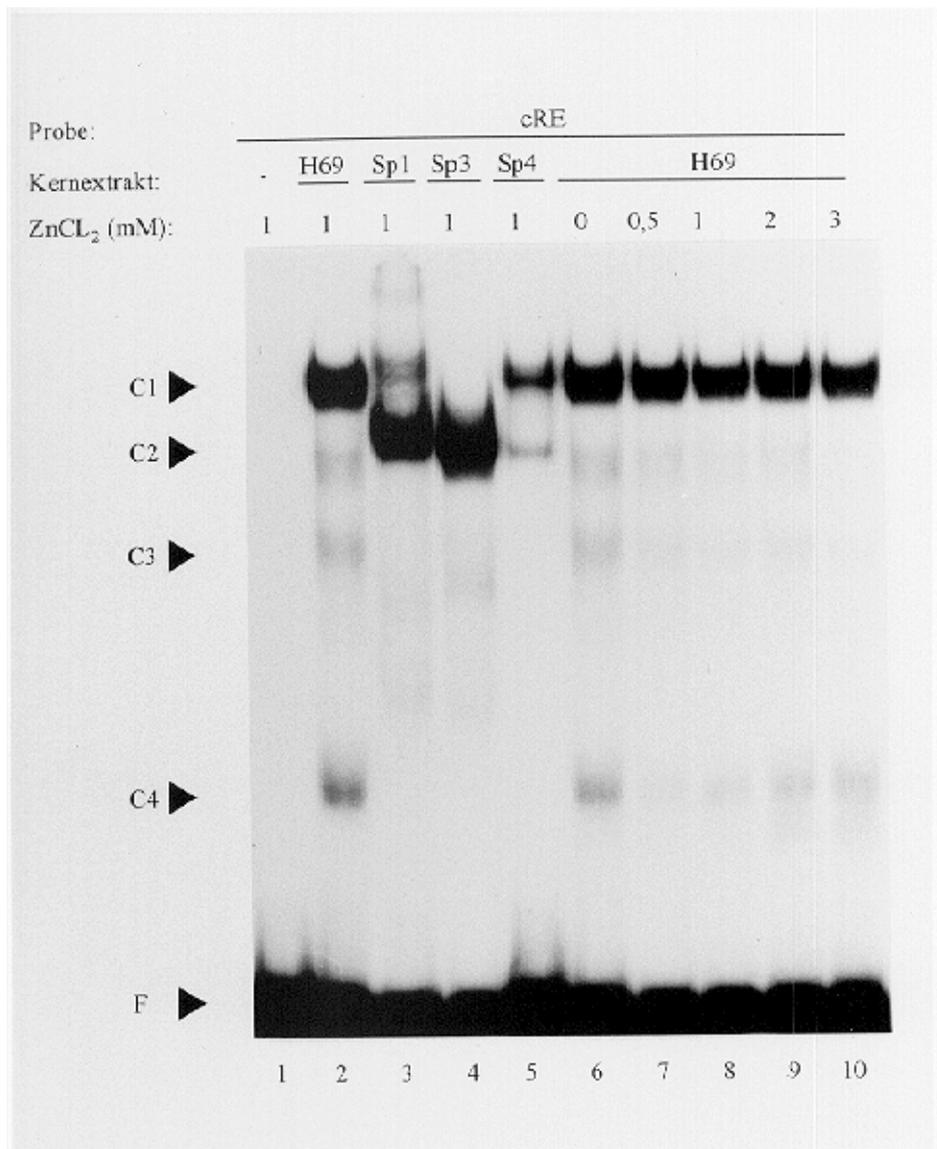


Abb. 13: Gelretardations-Experiment mit dem cRE-Element des Gastrinpromotors und bakteriell exprimierten Sp-Proteinen (Spuren 3 bis 5) oder Kernextrakten der SCLC-Zelllinie H69 (Spur 2). Die Abhängigkeit der H69-Kernextrakt-DNA-Bindung von Zinkchlorid wurde in den Spuren 6 bis 10 untersucht (0 bis 3 mM ZnCl₂). F zeigt die markierte frei wandernde Probe, die Zusätze sind über dem Gel angegeben. Pfeile (▶) auf der linken Seite geben die Positionen der retardierten Protein-DNA-Komplexe mit einem C an.

ähnliches Migrationsmuster wie bakteriell exprimiertes Sp1 und sehr schwach wie Sp3 zeigen.

3.5.2.2 Bindungsaktivität von bakteriell exprimierten Sp-Proteinen und RIN38A-Kernextrakten an das gERE- und CACCC-Element des Gastrinpromotors

Die Inkubation von Kernextrakten der Ratteninsulinoma-Zelllinie RIN38A mit dem markierten CACCC-Element des humanen Gastrinpromotors (Abb. 14, Spur 2) führte zur Ausbildung des bereits von den Kernextrakten der SCLC-Zelllinie H69 bekannten Bandenmusters, wobei ober- und unterhalb von C3 jeweils eine zusätzliche, bisher nicht näher charakterisierte Bande auftrat (Leerpfeil). Die bakteriell exprimierten Sp-Proteine Sp1, Sp3 und Sp4 (Spuren 3 bis 5 und 8 bis 10) zeigten ebenfalls das unter 3.5.2.1 beschriebene Bandenmuster gleichermaßen bei Bindung an das CACCC- und gERE-Element des Gastrinpromotors. Die Inkubation mit RIN38A-Kernextrakten (Spur 7) ergab beim gERE-Element ähnlich wie bei Inkubation von H69-Extrakten an das cRE-Element eine zusätzliche schwache Bande C4, so daß hier zusätzlich bindende Faktoren vorliegen können, die nicht an das CACCC-Element binden. Somit konnte gezeigt werden, daß Sp1, Sp3 und Sp4 an das CACCC- und gERE-Element binden. RIN38A-Kernextrakte zeigen Bindungsaktivität an diese beiden Elemente, wobei DNA-Proteinkomplexe gebildet werden, die in der Retardierung mit Sp1 und schwach mit Sp3 vergleichbar sind.

3.5.2.3 Zelltypspezifische Bindung an das cRE-, gERE- und CACCC-Element

Zum Vergleich der Bindungsaktivität verschiedener Zelllinien an das cRE-Element (Abb.15, Spuren 1 bis 6), das gERE-Element (Abb. 15, Spuren 7 bis 12) und das nicht mutierte CACCC WT-Element (Abb. 16, Spuren 1 bis 6) wurden Kernextrakte der Zelllinien H69 (SCLC), 32M1 (NSCLC), MSTO-211H (Mesotheliom), RIN38A (Ratteninsulinoma) und BON-I (Pankreaskarzinoid) mit den markierten Elementen des Gastrinpromotors inkubiert. Bei allen Extrakten waren deutlich die Protein-DNA-Komplexe C1 und C2 zu erkennen, wobei sich C1 sehr prominent darstellte. Wie in den vorherigen Analysen war beim cRE- und gERE-Element eine zum Teil sehr schwache, wenig retardierte Bande C4 zu sehen, die mit dem CACCC-Element nicht entstand. Der dazwischenliegende Komplex C3 kam bei allen Extrakten vor, allerdings in unterschiedlicher Stärke. Die MSTO-211H- und RIN38A- Extrakte wiesen beim CACCC-

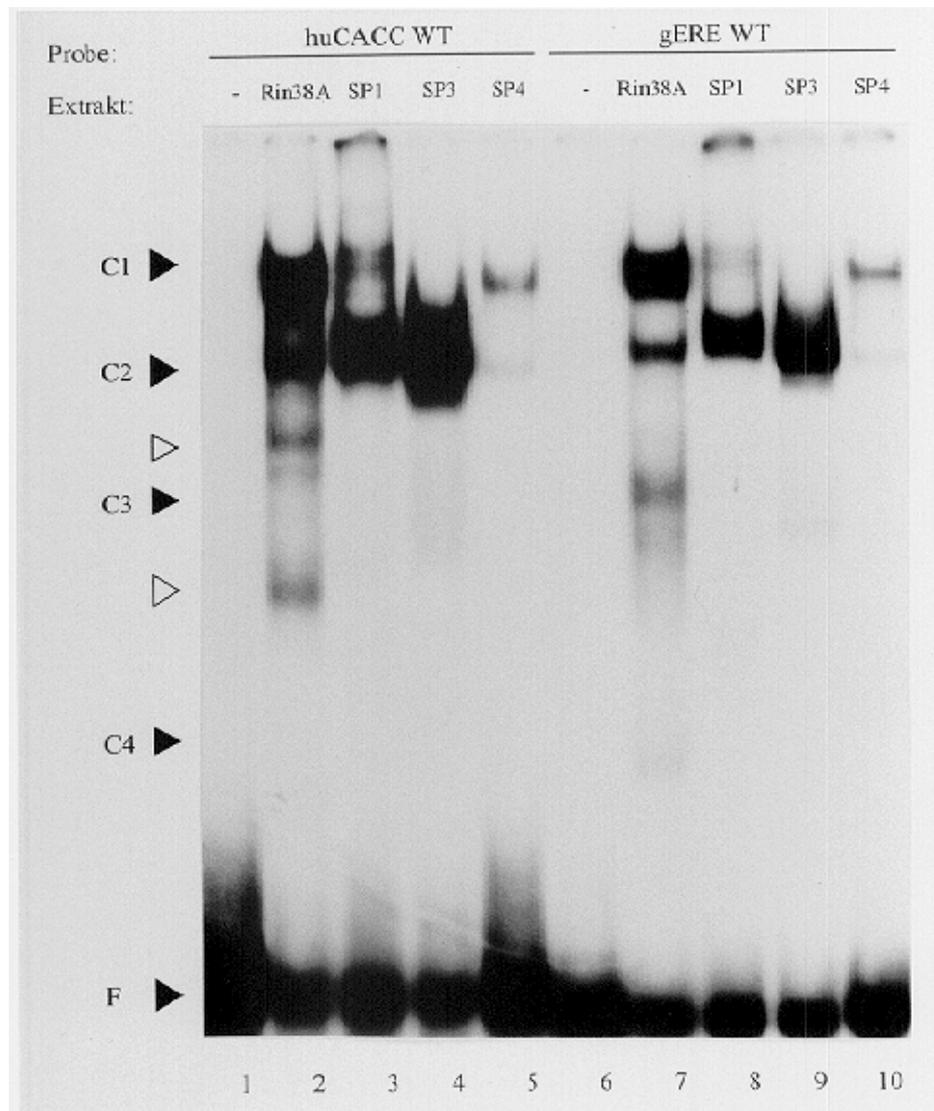


Abb. 14: Gelretardations-Experiment mit dem CACCC- und gERE-Element des Gastrinpromotors und bakteriell exprimierter Sp-Proteinen oder Kernextrakten der Ratteninsulinoma-Zelllinie RIN38A. F zeigt die markierte frei wandernde Probe, die Zusätze sind über dem Gel angegeben. Pfeile (▶) auf der linken Seite geben die Positionen der retardierten Protein-DNA-Komplexe mit einem C an. Bisher nicht näher charakterisierte Komplexe sind mit einem Leerpfeil (▷) versehen.

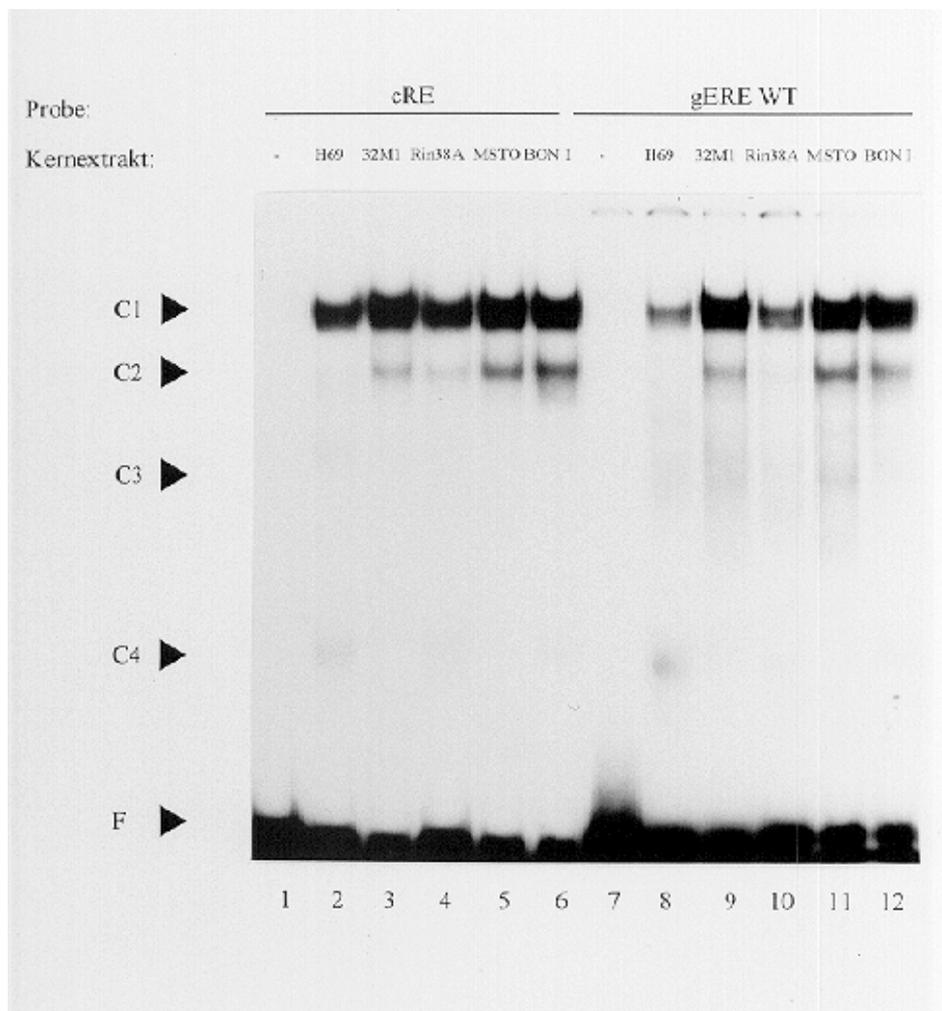


Abb. 15: Gelretardations-Experiment zur Analyse zelltypspezifischer Bindungsfaktoren mit dem cRE- (Spuren 1 bis 6) und gERE-Element (Spuren 7 bis 12) und Kernextrakten der Zelllinien H69, 32M1, RIN38A, MSTO-211H (MSTO) und BON-I. F zeigt die markierte frei wandernde Probe, die Zusätze sind über dem Gel angegeben. Pfeile (►) auf der linken Seite geben die Positionen der retardierten Protein-DNA-Komplexe mit einem C an.

Element eine weitere, bisher nicht näher charakterisierte Bande auf (Leerpfeil). Um eine spezifische Bindung an das CACCC-Element (GATCCTGTGCCCCACCCCATTA) nachzuweisen, wurden die Kernextrakte der unterschiedlichen Zelllinien zunächst mit einer mutierten CACCC mt-Sequenz (GATCCTGTGCCCCACCCACATTA) inkubiert (Abb. 16, Spuren 7 bis 12). Die bei Inkubation mit nicht mutierten Sequenzen sehr prominenten Komplexe waren bei Inkubation mit der mutierten Variante deutlich schwächer (RIN38A, MSTO-211H, BON-I) oder kaum nachweisbar (32M1 und H69). Diese Untersuchungen zeigen, daß sich in den verschiedenen Zelllinien die DNA-Protein-Komplexe C1 und C2 bilden, die mit dem Migrationsverhalten von Sp1 und Sp3 vergleichbar sind. Ein weiterer, bisher nicht charakterisierter Komplex C3 ist ebenfalls in allen Zelllinien zu beobachten. Der DNA-Protein-Komplex C4 ist lediglich am cRE- und gERE-Element nachzuweisen. Kernextrakte von MSTO-211H- und RIN38A-Zellen zeigten im Unterschied zu den anderen Zelllinien einen weiteren, nicht näher charakterisierten DNA-Protein-Komplex (Leerpfeil). Die Spezifität der Bindung konnte am CACCC WT-Element gezeigt werden, hier schwächte bereits die Mutation einer Base (CACCC mt) die Bildung der beschriebenen DNA-Protein-Komplexe in allen Zelllinien deutlich.

3.5.2.4 Spezifische Bindung an die huCACC WT- und huCACC mt- Sequenz in SCLC-, NSCLC- und Mesotheliom-Zellen

Um die Bindungsspezifität an das CACCC-Element zu analysieren, wurden Gelretardations-Experimente mit huCACC WT (GATCCTGTGCCCCACCCCATTA) und der punktmutierten huCACC mt-Sequenz (GATCCTGTGCCCCACCCACATTA) durchgeführt (Abb. 17). Die DNA-Protein-Komplexe C1 und C3 traten bei Inkubation von Kernextrakten der SCLC-Zelllinie H69 mit der huCACC WT-Sequenz deutlich hervor, C2 stellte sich etwas schwächer dar. Bei Zugabe der nicht markierten WT-Sequenz in 500-fachem Überschuß wurde die Komplexbildung kompetitiv verhindert, wobei die Zugabe der huCACC mt-Sequenz keine Komplexveränderung verursachte. Zum Vergleich wurde die markierte huCACC mt-Sequenz mit den Kernextrakten inkubiert und zeigte nur einen sehr schwachen C1- und C3-Komplex, C2 war nicht zu sehen. Die durchgeführte Konkurrenz mit nicht markierter huCACC mt-Sequenz verhinderte die C1- und C3-Komplexbildung komplett. Bei der Durchführung eines Gelretardations-Experimentes mit der markierten CACCC WT-Sequenz und Kernextrakten der NSCLC-Zelllinien 32M1 und

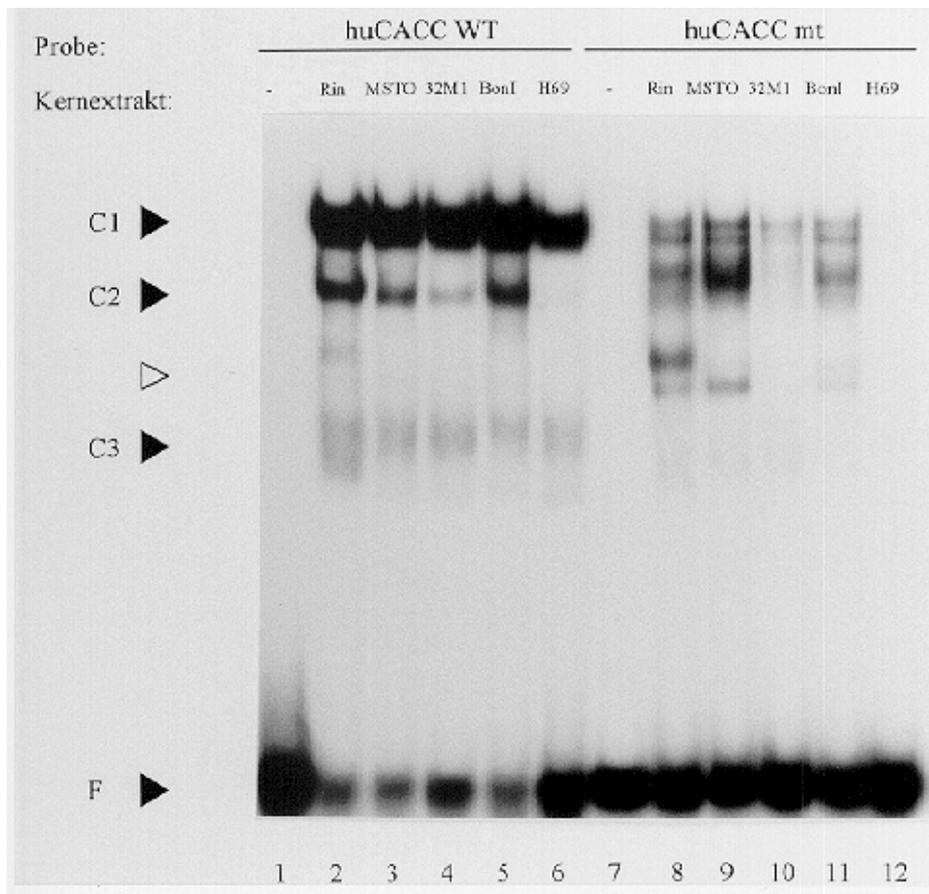


Abb. 16: Gelretardations-Experiment mit huCACC WT (Spuren 1 bis 6) und dem mutierten Element huCACC mt (Spuren 7 bis 12). Zur Analyse einer spezifischen Bindung wurden die Kernextrakte der Zelllinien H69, 32M1, RIN38A, MSTO-211H (MSTO) und Bon-I zum Vergleich des Migrationsverhaltens verwendet. F zeigt die markierte frei wandernde Probe, die Zusätze sind über dem Gel angegeben. Pfeile (►) auf der linken Seite geben die Positionen der retardierten Protein-DNA-Komplexe mit einem C an.

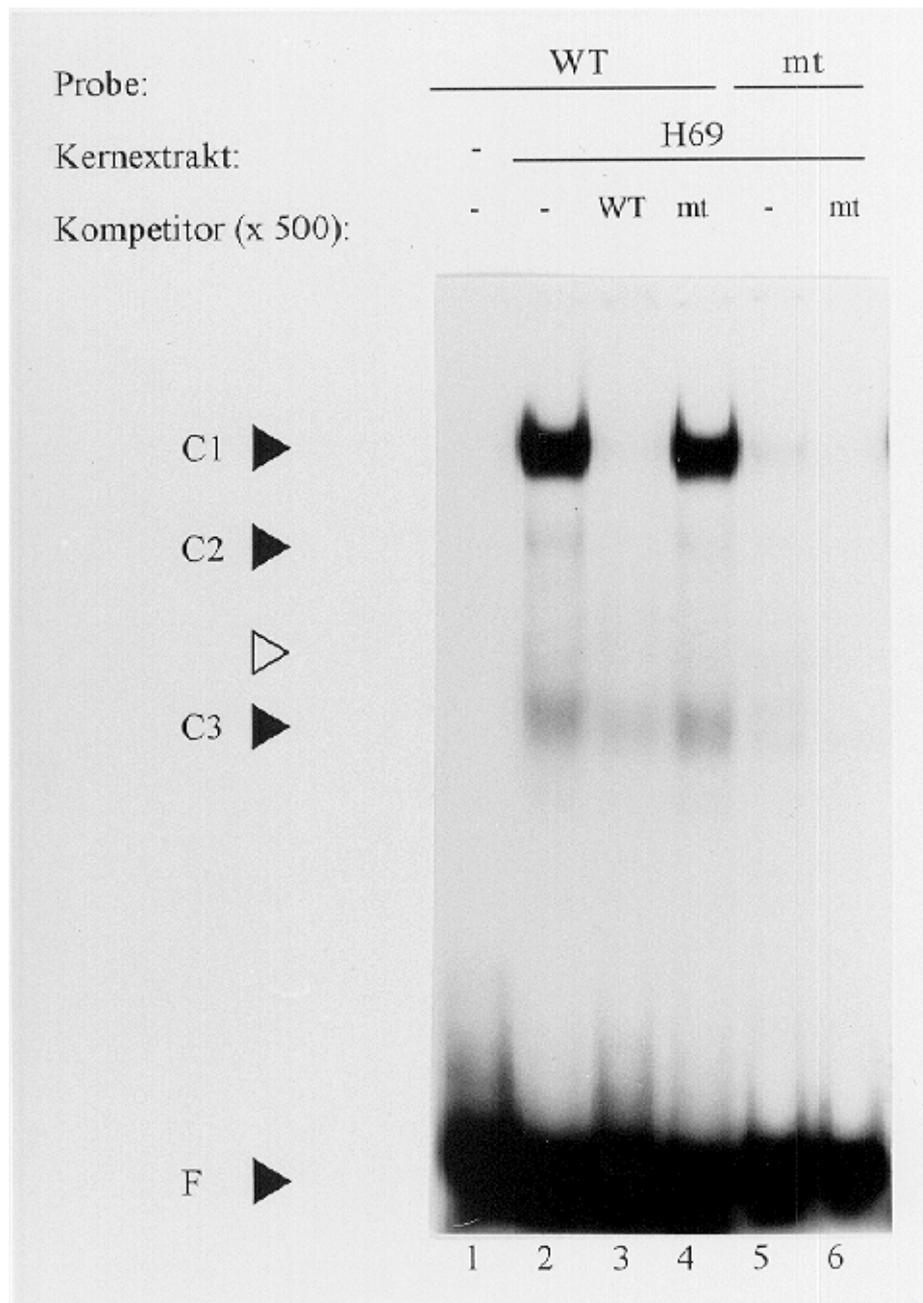


Abb. 17: Gelretardations-Experiment mit der huCACC WT-Sequenz (Spuren 1 bis 4) GATCCTGTGCCCCACCCATTA und der huCACC mt-Sequenz (Spuren 5 und 6) GATCCTGTGCCCCACCAACATTA und H69-Kernextrakten. F zeigt die markierte frei wandernde Probe, die Zusätze sind über dem Gel angegeben. Pfeile (▶) auf der linken Seite geben die Positionen der retardierten Protein-DNA-Komplexe mit einem C an. Der nicht näher beschriebene Komplex ist mit einem Leerpfeil (▷) gekennzeichnet. Kompetition von huCACC WT wurde mit 500-fachem Überschuß von nicht markiertem huCACC WT (Spur 3) bzw. mit huCACC mt (Spur 4) durchgeführt. huCACC mt wurde mit nicht markiertem huCACC mt in 500-fachem Überschuß kompetitiert (Spur 6).

der Mesotheliom-Zelllinie MSTO-211H und Konkurrenz mit nicht markierter huCACC WT- und huCACC mt-Sequenz im 500- bzw. 1000-fachem Überschuß (Abb. 18) konnte die gleiche Bindungsspezifität beobachtet werden. Bei 1000-fachem Überschuß war lediglich eine leichte Abschwächung der Komplexstärke zu beobachten, so daß eine minimale Bindungsmöglichkeit an die huCACC mt-Sequenz bestehen könnte. Eine weitere, bisher nicht näher charakterisierte Komplexbildung (Leerpfeil) wurde durch Konkurrenz ebenfalls verhindert und scheint daher spezifisch zu sein. Daraus folgt, daß die Bindungsaktivität der SCLC-Zelllinie H69, der NSCLC-Zelllinie 32M1 und der Mesotheliom-Zelllinie MSTO-211H an das CACCC-Element spezifisch ist und bereits durch Mutation einer Base fast völlig aufgehoben wird.

3.5.2.5 DNA-Protein-Komplexe weisen die gleiche Bindungsspezifität an das CACCC-, cRE- und gERE-Element des Gastrinpromotors auf

Zum Nachweis der Bindungsspezifität wurden beispielhaft Kernextrakte der NSCLC-Zelllinie 32M1 und die damit gebildeten DNA-Protein-Komplexe am huCACC-Element untersucht und Konkurrenz mit Wildtyp-Sequenzen der verschiedenen Elemente bzw. Mutationsvarianten durchgeführt (Abb. 19). Die Bildung der Komplexe C1, C2 und C3 wurde durch Zugabe der nicht markierten huCACC WT-Sequenz (GATCCTGTGCCCCACCCCATTA), des cRE- (TGAAAGGGCGGGGCAGGGTG) und gERE WT-Elementes (GTAGGGGCGGGGTGGGGGGA) fast völlig verhindert. Zur genaueren Differenzierung der Bindungssequenzen wurden Konkurrenzen mit Mutationsvarianten durchgeführt, die mutierten Basen sind unterstrichen. Die Konkurrenz mit nicht markierter huCACC mt-Sequenz (GATCCTGTGCCCCACCACATTA) bewirkte nur eine leichte Abschwächung der Komplexe C1, C2 und C3, die mit zweifach mutierter huCACC dmt-Sequenz (GATCCTGTGCCAACCACATTA) konnte die Komplexbildung ebenfalls nicht verhindern. Konkurrenz mit Mutationsvarianten des gERE-Elementes (Merchant et al., 1995) bewirkte eine geringere Abschwächung der Komplexbildung im Vergleich zur Konkurrenz mit der gERE WT-Sequenz bei gERE M4 mit Mutation der 5'- und 3'-Domäne bei Erhalt des GGCGGG-Elementes (GTATIGGCGGGGTGGTTTTA) und gERE M5 mit einer Punktmutation innerhalb des GGCGGG-Elementes (GTAGGGCCGGGGTGGGGGGA). Die Konkurrenz mit der gERE M6-Sequenz mit Mutationen der 3'-Domäne unter Bildung eines zweiten GGCGGG-Elementes

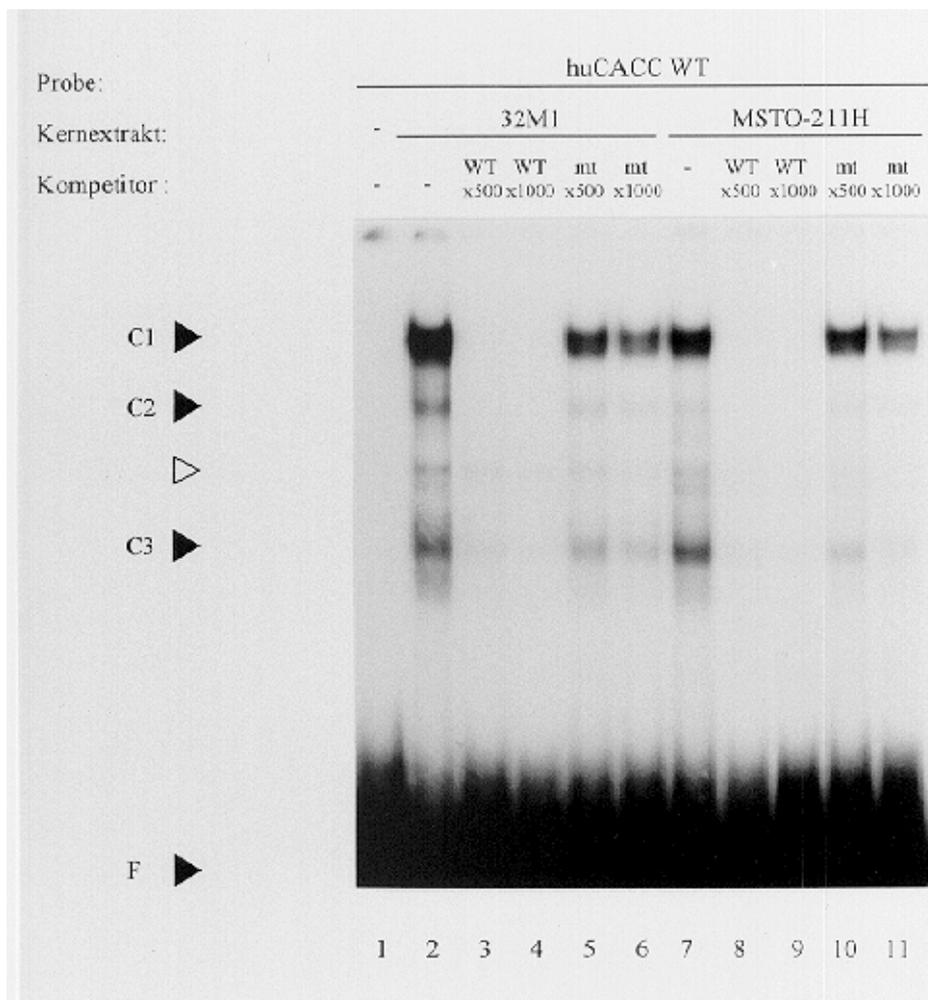


Abb. 18: Gelretardations-Experiment zur Bindungsspezifität von Kernextrakten der NSCLC-Zelllinien 32M1 (Spuren 2 bis 6) und der Mesotheliom-Zelllinie MSTO-211H (Spuren 7 bis 11) an die huCACC WT-Sequenz (GATCCTGTGCCCCACCCCATTA). F zeigt die markierte frei wandernde Probe, die Zusätze sind über dem Gel angegeben. Pfeile (►) auf der linken Seite geben die Positionen der retardierten Protein-DNA-Komplexe mit einem C an. Der nicht näher beschriebene Komplex ist mit einem Leerpfeil (◄) gekennzeichnet. Kompetition wurde mit x-fachem Überschuß nicht markierter huCACC WT-Sequenz (Spuren 3 und 4, bzw. 8 und 9) oder huCACC mt-Sequenz (GATCCTGTGCCCC ACCACATTA) (Spuren 5 und 6 bzw. 10 und 11) durchgeführt.

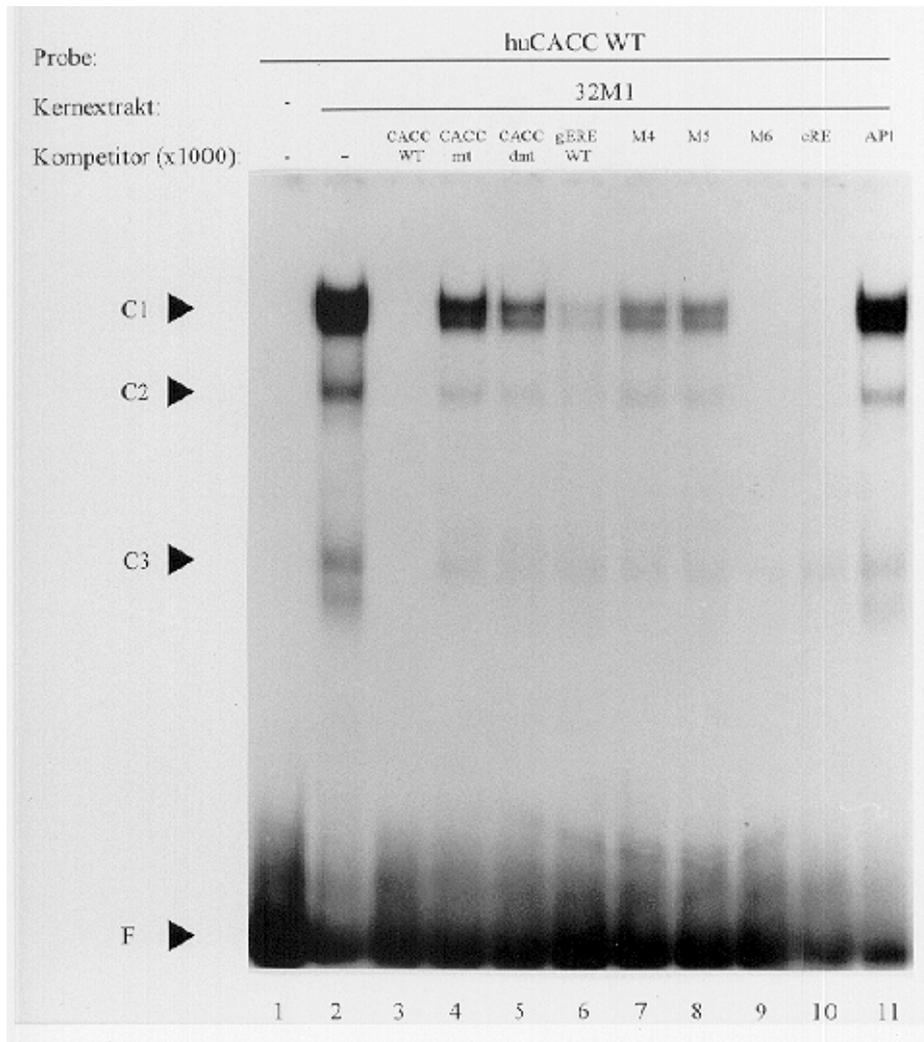


Abb. 19: Gelretardations-Experiment mit dem huCACC WT-Element und Kernextrakten der NSCLC-Zelllinie 32M1. F zeigt die markierte frei wandernde Probe, die Zusätze sind über dem Gel angegeben. Pfeile (▶) auf der linken Seite geben die Positionen der retardierten Protein-DNA-Komplexe mit einem C an. Zusätzlich wurde von Spur 3 bis 11 die jeweils angegebene nicht markierte Kompetitor-DNA in 1000-fachem Überschuß hinzugegeben.

(GTAGGGGCGGGGCGGGGCGA) verhinderte die Komplexbildung von C1, C2 und C3 dagegen noch deutlicher als bei der gERE-WT- Sequenz. Die Konkurrenz mit der bindenden AP1-Sequenz (CTGGATGACTGACAC) zeigte wie erwartet keine Beeinträchtigung der Komplexe. Diese Untersuchungen zeigen, daß es sich bei den gebildeten DNA-Protein-Komplexen C1, C2 und C3 um eine spezifische Bindung handelt und diese Komplexe die gleiche Bindungsspezifität an das CACCC-, cRE- und gERE-Element des Gastrinpromotors zeigen. Am CACCC-Element bewirkt bereits die Mutation einer Base eine deutliche Herabsetzung der Bindungsaktivität (s.o.), ebenso eine Doppelmutation. Mutationen der Basen in unmittelbarer Nähe oder innerhalb der GGCGGG-Sequenz führten im gERE-Element ebenfalls zu einer Herabsetzung der Bindungsaktivität, wogegen die Mutation mit Bildung eines zweiten GGCGGG-Elementes sie verstärkte.

3.5.2.6 Bindungsspezifität von RIN38A-Kernextrakten an das gERE-Element

Um die Bindungsspezifität von Kernextrakten der Ratteninsulinoma-Zelllinie RIN38A an das markierte gERE-Element (GTAGGGGCGGGGTGGGGGGA) zu überprüfen, wurden die Kernextrakte unter Zusatz von Kompetitor-DNA-Sequenzen inkubiert (Abb. 20). Ohne Kompetitor zeigten sich wie erwartet die DNA-Protein-Komplexe C1, C2 und C3. Die Konkurrenz mit der nicht markierten cRE-Sequenz im 500- bzw. 750-fachen Überschuß führte zur Aufhebung der Komplexbildung C1 und zur Abschwächung der Komplexe C2 und C3, was auf ein Vorliegen von Proteinen mit gleicher Bindungsspezifität in Kernextrakten dieser Zelllinie hindeutet. Die Konkurrenz mit der nicht bindenden AP1-Sequenz zeigte keine Abschwächung der Komplexbildungen, bei Konzentrationserhöhung verstärkten sich dagegen die Komplexe, was auf eine Bindung mit anderen, die Komplexbildung von C1, C2 und C3 behindernden Faktoren deuten könnte. Zur genaueren Differenzierung wurden Gelretardations-Experimente mit den Mutationen des gERE-Elementes (s.o.), gERE M4 (GTATIGGCGGGGTGGTTTTA), M5 (GTAGGGCCGGGGTGGGGGGA) und M6 (GTAGGGGCGGGGCGGGGCGA) durchgeführt (Abb. 21, Spuren 1 bis 6). Bei der Inkubation von RIN38A-Kernextrakten mit dem markierten gERE-Element ließen sich die Komplexe C1, C2 und C3, der sich hier als Doppelbande darstellte, und der bei diesem Element zusätzlich vorhandene Komplex C4 nachweisen. Bei 1000-facher Konkurrenz mit nicht markierter Wildtyp-DNA wurden die Komplexe C3 und C4 aufgehoben, C1 und C2 stark abgeschwächt, so daß bei allen

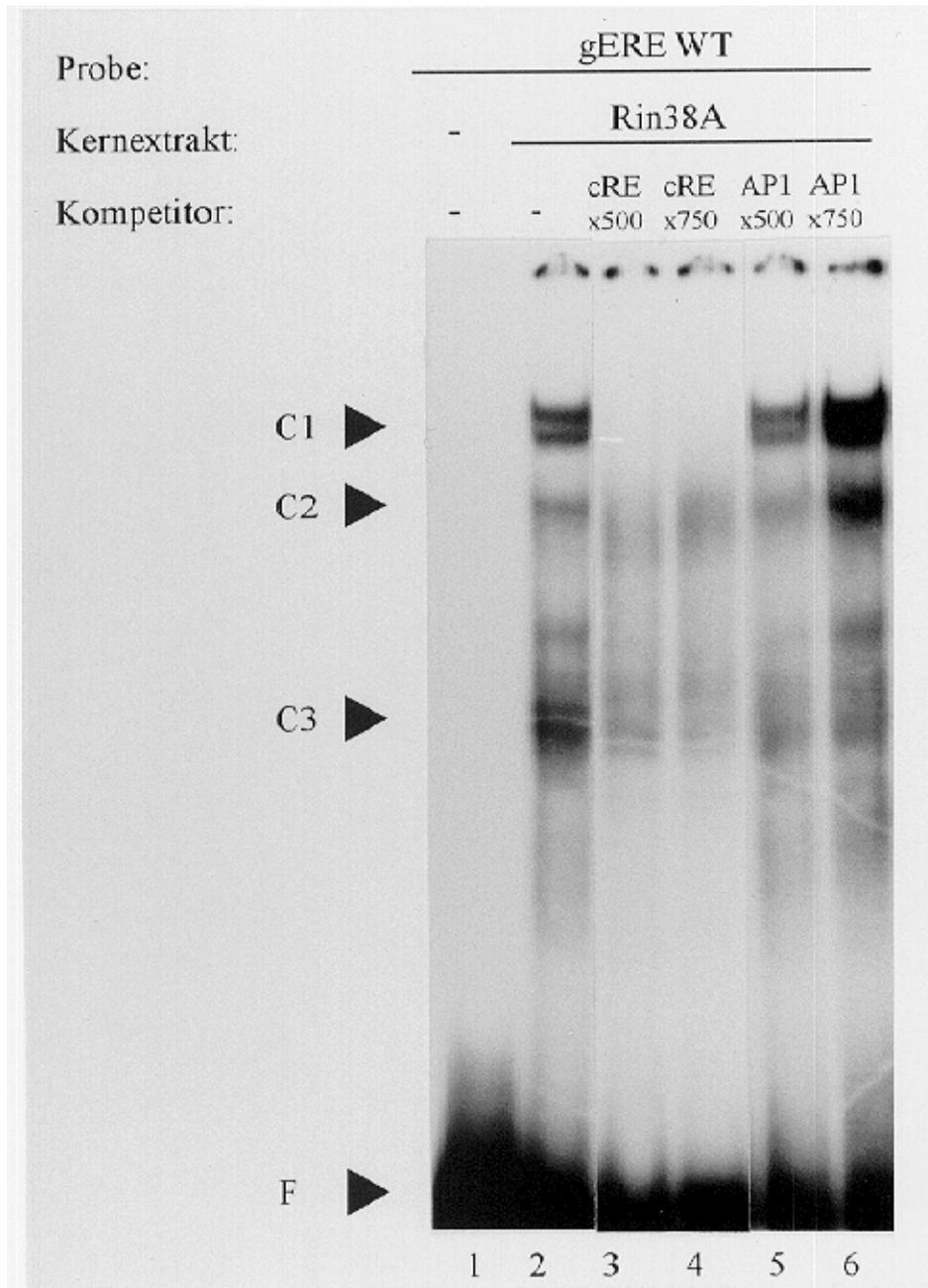


Abb. 20: Gelretardations-Experiment mit dem gERE WT- Element und Kernextrakten der Ratteninsulinoma-Zelllinie RIN38A. F zeigt die markierte frei wandernde Probe, die Zusätze sind über dem Gel angegeben. Pfeile (▶) auf der linken Seite geben die Positionen der retardierten Protein-DNA-Komplexe mit einem C an. Zusätzlich werden im x-fachen Überschuß die nicht markierte cRE-Sequenz (Spuren 3 und 4) bzw. die AP1-Sequenz (Spuren 5 und 6) hinzugegeben.

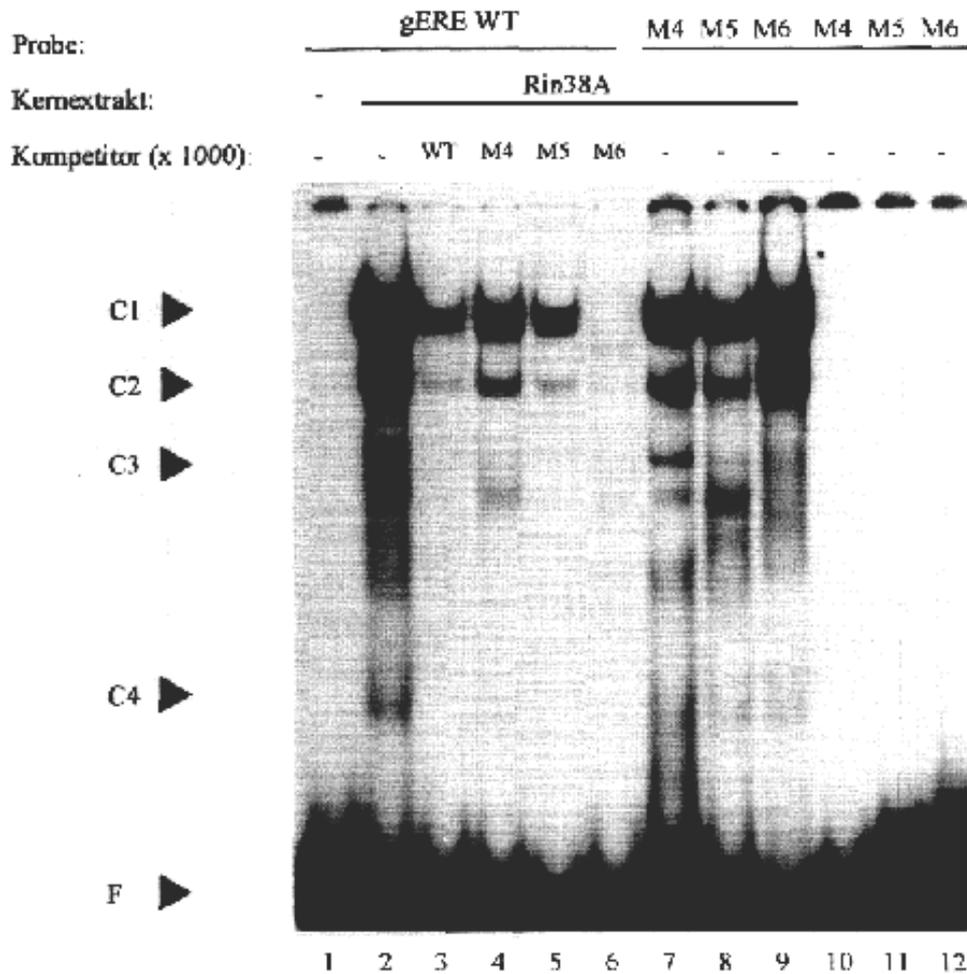


Abb. 21: Gelretardations-Experiment mit dem gERE WT- Element (Spuren 1 bis 6) und den Mutationsvarianten gERE M4, M5 und M6 (Spuren 7 bis 12) und Kernextrakten der Ratteninsulinoma-Zelllinie RIN38A. Pfeile (▶) auf der linken Seite geben die Positionen der retardierten Protein-DNA-Komplexe mit einem C an. Zusätzlich wurde von Spur 3 bis 6 nicht markierte Kompetitor-DNA in 1000-fachem Überschuß hinzugegeben.

Komplexen eine spezifische Bindung nachzuweisen ist. Die Zugabe der nicht markierten Mutationsvariante gERE M4 führte zum Verschwinden des C4-Komplexes, die Komplexbildung von C1 bis C3 wurden weniger deutlich verhindert. Dies deutet auf eine Verminderung der Bindungsfähigkeit durch Mutationen in unmittelbarer Nähe des GGCGGG-Elementes. Die Konkurrenz mit der Mutationsvariante gERE M5 zeigte wie bei Verwendung der Wildtyp-DNA eine Aufhebung der Komplexe C3 und C4, C1 und C2 traten etwas deutlicher hervor, diese Mutation verminderte trotz Veränderung des GGCGGG-Elementes die Bindungsfähigkeit nur gering. Die Mutationen bei der Variante gERE M6 mit Bildung eines zweiten GGCGGG-Elementes schienen dagegen die Bindungsfähigkeit noch zu erhöhen, da bei gleicher Konkurrent-Konzentration alle Komplexe aufgehoben wurden. Zum Vergleich wurden die markierten Mutationsvarianten bei Inkubation mit den Kernextrakten gezeigt (Abb. 21, Spuren 7 bis 12). Die Stärke der Bindung stimmt dabei mit den Ergebnissen der Konkurrenzversuche überein. Daraus folgt, daß die von RIN38A- Kernextrakten gebildeten DNA-Protein-Komplexe C1 bis C4 Bindungsspezifität an das gERE-Element des Gastrinpromotors zeigen und Mutationen in Nähe oder innerhalb des enthaltenen GGCGGG-Elementes die Bindungsaktivität negativ beeinflussen. Die Mutation mit Bildung eines zweiten GGCGGG-Elementes verstärkt dagegen die Bindungsaktivität.

3.5.2.7 Bindungsspezifität von Kernextrakten der NSCLC-Zelllinie 32M1 an das gERE-Element

Im folgenden wurde die Bindungsspezifität von Kernextrakten der NSCLC-Zelllinie 32M1 an das gERE-Element überprüft (Abb. 22, Spuren 1 bis 6). Die Inkubation von gERE WT mit den Extrakten zeigte die bekannten Komplexe C1 bis C4. Die Konkurrenz mit nicht markierter DNA führte bei gERE Wt und gERE M5 zu einer vergleichbaren vollständigen Aufhebung des C4-Komplexes und einer Abschwächung der Komplexe C1 und C2. Der vorher sehr prominente C3-Komplex zeigte jetzt eine stärkere obere Bande und schwache untere Bande. Die Konkurrenz mit gERE M4 verursachte eine weniger deutliche Verhinderung der Komplexbildung, diese Mutation hat also einen stärkeren negativen Einfluß auf die Bindungsfähigkeit der Komplexe. Mit gERE M6 als Konkurrent blieb nur der obere Teil der C3-Bande sichtbar, die Verhinderung der Komplexbildung zeigte sich durch diese Mutation mit Bildung eines zweiten GGCGGG-Elementes stärker als bei Konkurrenz mit der gERE WT-Sequenz. Die Inkubation der Kernextrakte mit den

markierten Mutationsvarianten (Abb. 22, Spuren 7 bis 12) bestätigte diese Ergebnisse. Daraus folgt, daß die vom Migrationsmuster vergleichbaren DNA-Protein-Komplexe C1 bis C4, die sowohl von Kernextrakten der Ratteninsulinoma-Zelllinie RIN 38A als auch der NSCLC-Zelllinie 32M1 gebildet werden, Bindungsspezifität an das gERE-Element des Gastrinpromotors zeigen. Mutationen in der Nähe oder innerhalb des enthaltenen GGCGGG-Elementes verändern die Bindungsaktivität zum Teil sehr deutlich.

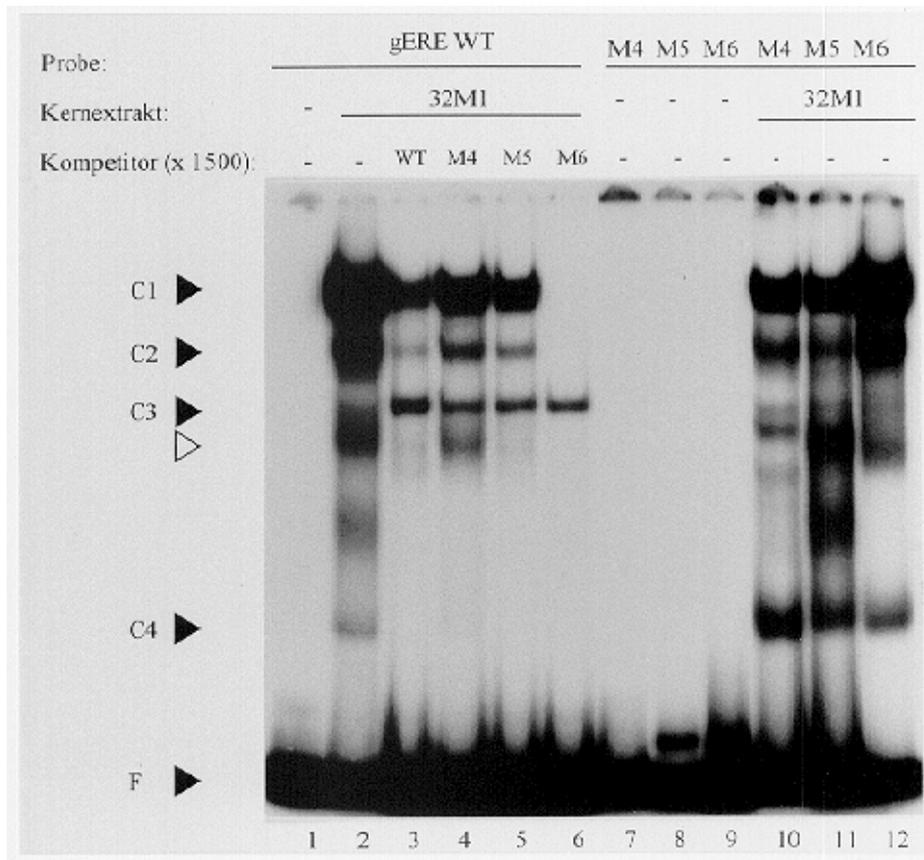


Abb. 22: Gelretardations-Experiment mit dem gERE WT- Element (Spuren 1 bis 6) und den Mutationsvarianten gERE M4, M5 und M6 (Spuren 7 bis 12) und Kernextrakten der NSCLC-Zelllinie 32M1. Pfeile (►) auf der linken Seite geben die Positionen der retardierten Protein-DNA-Komplexe mit einem C an. Zusätzlich wurde von Spur 3 bis 6 nicht markierte Kompetitor-DNA in 1500-fachem Überschuß hinzugegeben.

3.5.3 Gelretardations-Experimente mit polyklonalen Antikörpern (Supershifts)

Die bisherigen Untersuchungen konnten eine spezifische Bindungsaktivität in Lungenkarzinomzellen an *cis*-regulatorische Elemente des Gastrinpromotors identifizieren. Aufgrund der Sequenzanalyse der DNA-Elemente und dem Vergleich des Migrationsverhaltens von aufgereinigten Sp-Proteinen konnte vermutet werden, daß es sich bei den an diese Elemente bindenden Kernproteinen um Sp-Proteine handelt. Es wurden daher Gelretardations-Experimente mit polyklonalen Antikörpern gegen Sp1, Sp3 und Sp4 durchgeführt.

3.5.3.1 Sp-Proteine sind an der Bildung von DNA-Protein-Komplexen am CACCC-Element bei Ratteninsulinoma-, SCLC- und NSCLC-Zellen beteiligt.

Die huCACC WT- Sequenz wurde zunächst mit Kernextrakten der Zelllinien 32M1, RIN38A und bakteriell exprimierten Sp-Proteinen inkubiert (Abb. 23). Die polyklonalen Antikörper wurden wie über dem Gel angegeben hinzupipettiert. Bei der Bindung von Extrakten der Zelllinie 32M1 und Zugabe von Sp1-Antiserum (Spur 3) zeigte der obere Teil der Doppelbande vom C1-Komplex (siehe 3.5.2) ein deutlich retardiertes Wandern als Antikörper-Protein-DNA-Komplex (SS-Pfeil rechte Seite). Dies weist auf Sp1 als Hauptbestandteil von C1 hin. Durch den Supershift stellte sich C1 auch deutlicher als Doppelbande dar, so daß mindestens ein weiteres Protein zur Komplexbildung führen muß. Ein vergleichbares Ergebnis wurde bei Inkubation mit Extrakten von RIN38A-Zellen und Sp1-Antiserum erzielt (Spur 12), die Zugabe von Präimmenserum als Negativkontrolle zeigte keinen Supershift (Spur 11). Im mittleren Teil des Gels wurden die bakteriell exprimierten Sp-Proteine jeweils mit den zugehörigen Antikörpern inkubiert. Sp1 zeigte dabei kaum Komplexbildung (Spur 3), bei Zugabe von Sp1-Antiserum trat jedoch auf der gleichen Höhe wie bei den Kernextrakten ein Supershift auf (Spur 4). Sp3 zeigte deutlich einen Komplex C2 (Spur 5), bei Zugabe von Sp3-Antiserum einen stark verzögert laufenden Komplex auf der gleichen Höhe wie der Sp1-Supershift (Spur 6). Die Inkubation mit Sp4-Protein ergab keinen DNA-Protein-Komplex (Spur 7), mit Sp4-Antiserum erschien ebenfalls schwach ein retardiert wandernder Komplex (Spur 8). Die bei Bindung mit Kernextrakten beider Zelllinien gebildeten Komplexe C3 und C4 zeigten keine Beeinflussung durch die Antikörper.

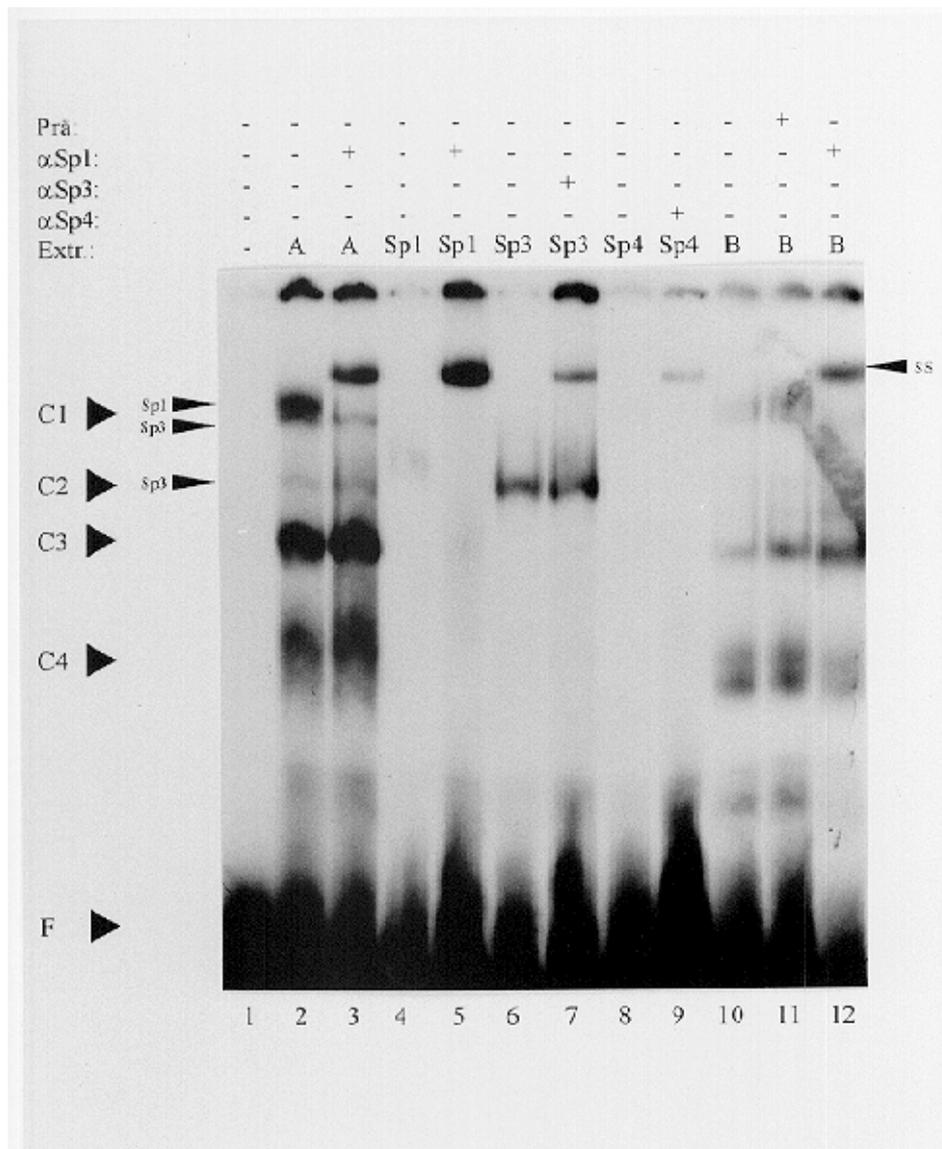


Abb. 23: Supershift-Experiment mit dem huCACC WT-Element. Die Zusätze zu der freien Probe (F) für die einzelnen Bindungsreaktionen sind über dem Gel angegeben (Extrakt A= 32M1, B= RIN38A, Spuren 4 bis 9 bakteriell exprimierte Sp-Proteine). Die gebildeten Komplexe (C1 bis C4) werden auf der linken Seite (▶) dargestellt, ebenso die durch die Addition von Antikörpern (α Sp1, α Sp3 und α Sp4) beeinflussten Komplexe (▶). Die verzögert laufenden Antikörper-Protein-DNA-Komplexe sind auf der rechten Seite gekennzeichnet (◀SS). Als Negativkontrolle diente Präimmunserum (Prä).

Um die Spezifität des Antikörper-Komplexes nachzuweisen, wurde ein Supershift-Experiment mit Sp1- und Sp3- Antisera mit Konkurrenz beispielhaft mit Kernextrakten von RIN38A-Zellen durchgeführt (Abb. 24). Dazu wurden die Reaktionsansätze wie über dem Gel angegeben zur freien Probe (F) pipettiert, als Negativkontrolle diente Präimmunsereum (Spuren 2 und 4). Die Zugabe von Sp1- und Sp3-Antiserum (Spur 5) ließ die Doppelbande des C1-Komplexes und C2 schwächer erscheinen und führte zur Ausbildung eines sehr prominenten Antikörper-Protein-DNA-Komplexes (SS-Pfeil rechts). Wurde zu diesem Reaktionsgemisch zusätzlich nicht markierte Konkurrenz-DNA in 500-fachem Überschuß gegeben, ergab sich bei Konkurrenz mit der huCACC WT-Sequenz (Spur 6) eine deutliche, bei Konkurrenz mit der huCACC mt-Sequenz (Spur 7) eine leichtere Abschwächung des Supershift-Komplexes, die Banden C1 bis C3 wurden jeweils aufgehoben. Dagegen führte die Zugabe der nicht bindenden AP1-Sequenz zu keiner Veränderung der genannten Komplexe. Diese Untersuchungen zeigen, daß Sp1 und Sp3 aus Kernextrakten der NSCLC-Zelllinie 32M1 und der Ratteninsulinoma-Zelllinie RIN38A an der Bildung der identifizierten DNA-Protein-Komplexe C1 und C2 am CACCC-Element des Gastrinpromotors beteiligt sind und die Bildung der Sp1/Sp3-Antikörper-Komplexe spezifisch ist. Um einen Nachweis für die spezifische Bindung von Sp-Proteinen an das CACCC-Element des Gastrinpromotors bei SCLC-Zellen zu führen, wurde ein Supershift-Experiment mit Extrakten der Zelllinie H69 durchgeführt (Abb. 25). Dazu wurden die Reaktionsansätze wie über dem Gel angegeben zur freien Probe (F) pipettiert, als Negativkontrolle diente Präimmunsereum (Spuren 2 und 4). Der C2-Komplex war bei diesen Zellen schwächer ausgebildet, C3 und der nicht näher bezeichnete Komplex laufen enger beieinander. Die Zugabe von Sp1-Antiserum (Spur 5) führte wie erwartet zu einer Abschwächung des prominenten C1-Komplexes und zur Bildung eines Supershift-Komplexes (rechter SS-Pfeil), die Zugabe von Sp3-Antiserum (Spur 6) zeigte ein ähnliches Bild bei leichter Aufhebung des C1-Komplexes. Die Zugabe von Sp4-Antiserum (Spur 7) führte zu keinem Supershift, der C1-Komplex erschien schwächer. Die Kombination von Sp1- und Sp3-Antiserum (Spur 8) führte zur Aufhebung des unteren Teils der C1-Doppelbande und zu einem verstärkten Supershift-Komplex. Um eine spezifische Bildung dieses Komplexes nachzuweisen, wurde nicht markierte Konkurrenz-DNA in 500-fachem Überschuß hinzugegeben. Die Konkurrenz mit der huCACC WT-Sequenz führte zur Abschwächung, bzw. Aufhebung aller genannten Komplexe, bei Konkurrenz mit der huCACC mt-Sequenz sind diese weniger stark, bei Zugabe der AP1-Sequenz zeigte sich dagegen keine Aufhebung von Komplexen. So konnte ebenfalls gezeigt werden, daß Sp1

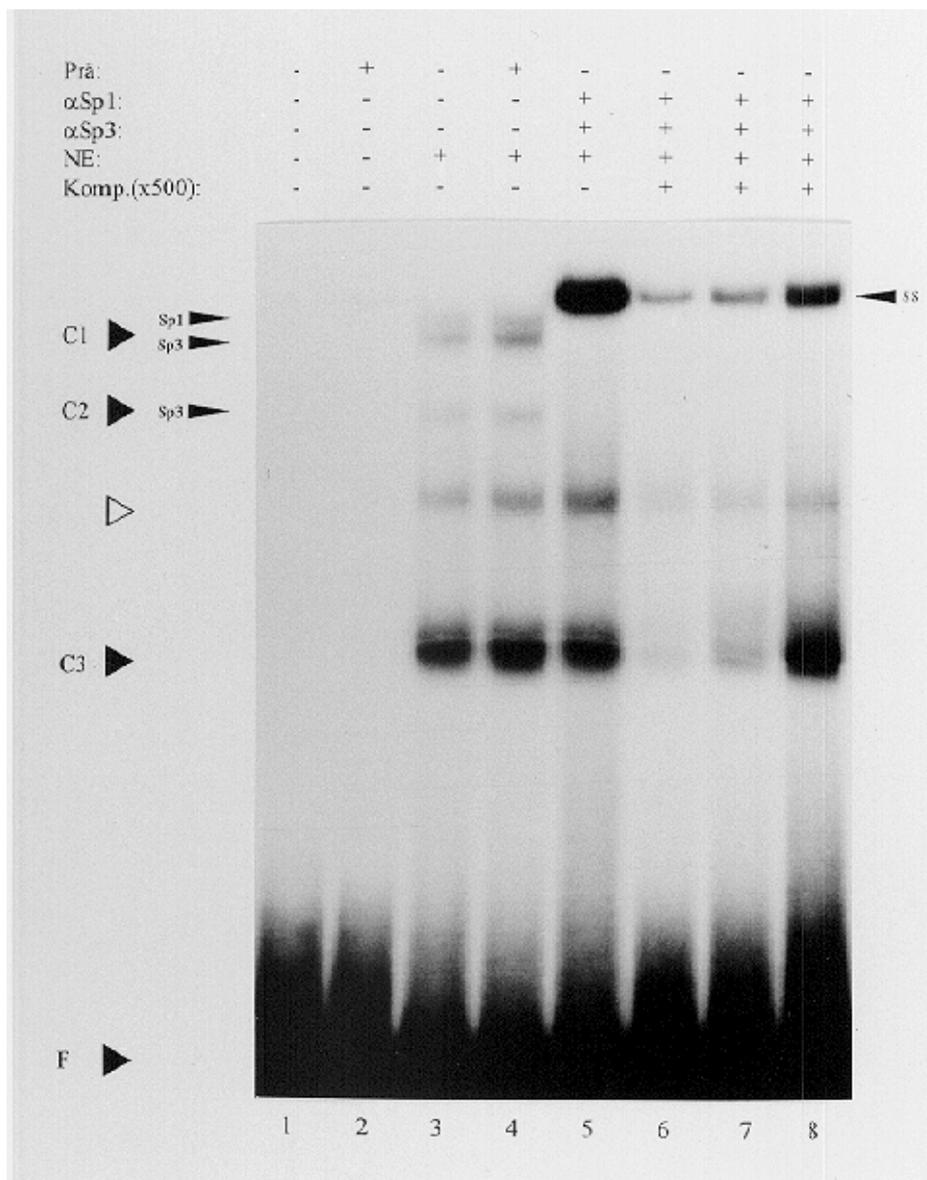


Abb. 24: Supershift-Experiment mit dem huCACC WT-Element und RIN38A-Kernextrakten (NE=nuclear extract). Die Zusätze zu der freien Probe (F) sind wie in Abbildung 23 angegeben. Die gebildeten Komplexe (C1 bis C3) werden auf der linken Seite (▶) dargestellt, ebenso die durch die Addition von Antikörpern (α Sp1, α Sp3 und α Sp4) beeinflussten Komplexe (►). Die verzögert laufenden Antikörper-Protein-DNA-Komplexe sind auf der rechten Seite gekennzeichnet (◀ SS). Als Negativkontrolle diente Präimmunsrum (Prä). Ein weiterer Komplex ist mit einem Leerpfeil (▷) gekennzeichnet. Bei dem in 500-fachem Überschuß zugegebenen Kompetitor handelt es sich um huCACC WT (Spur 6), huCACC mt (Spur 7) und AP1 (Spur 8).

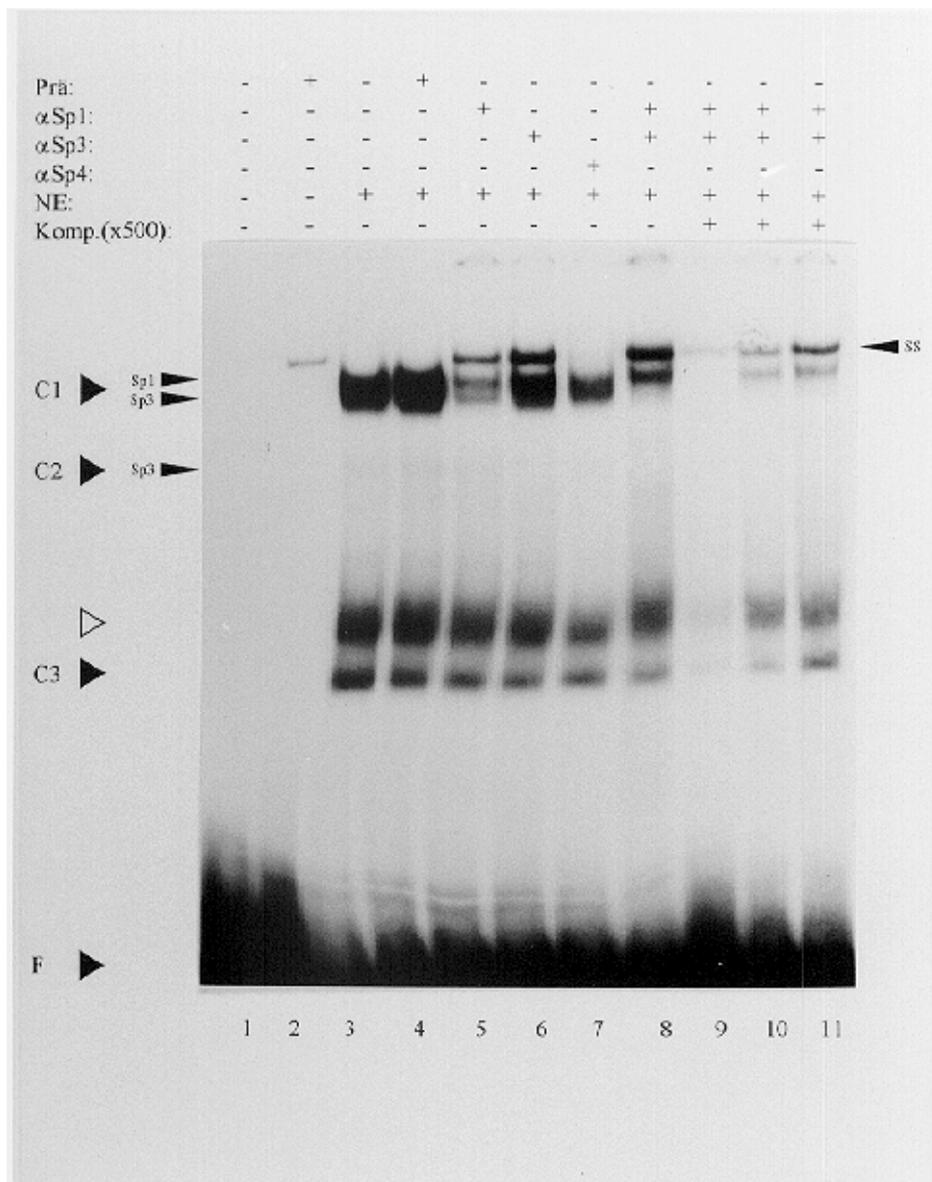


Abb. 25: Supershift-Experiment mit dem huCACC WT-Element und Kernextrakten (NE) von H69-Zellen. Die Zusätze zu der freien Probe (F) sind wie in Abbildung 23 über dem Gel angegeben. Die gebildeten Komplexe (C1 bis C3) werden auf der linken Seite (▶) dargestellt, ebenso die durch die Addition von Antikörpern (α Sp1, α Sp3 und α Sp4) beeinflussten Komplexe (◀). Die verzögert laufenden Antikörper-Protein-DNA-Komplexe sind auf der rechten Seite gekennzeichnet (◀SS). Als Negativkontrolle diente Präimmunsereum (Prä). Ein weiterer Komplex ist mit einem Leerpfeil (▷) gekennzeichnet. Bei dem in 500-fachen Überschuß zugegebenen Kompetitor handelt es sich um huCACC WT (Spur 9), huCACC mt (Spur 10) und AP1 (Spur 11).

und Sp3 aus Kernextrakten der SCLC-Zelllinie H69 an der Bildung der identifizierten DNA-Protein-Komplexe C1 und C2 am CACCC-Element des Gastrinpromotors beteiligt sind und die Bildung der Sp1/Sp3-Antikörper-Komplexe spezifisch ist. Der im Supershift bei bakteriell exprimiertem Sp4 nachgewiesene Antikörper-DNA-Protein-Komplex konnte bei keiner der Zelllinien nachgewiesen werden.

3.5.3.2 Sp-Proteine sind an der Bildung von DNA-Protein-Komplexen am cRE-Element bei NSCLC-Zellen beteiligt.

Zur Identifizierung der bindenden Faktoren am cRE-Element des Gastrinpromotors wurden weitere Supershift-Experimente durchgeführt. Durch Wettbewerbsversuche bei den Gelretardations-Experimenten wurde bereits nachgewiesen, daß die Bindungsspezifität an das cRE-Element der des CACCC-Elementes vergleichbar ist. Beispielfähig am Bindungsverhalten der NSCLC-Zellen 32M1 sollte auch die Bindung von Sp4 näher untersucht werden (Abb. 26). Als Negativkontrolle diente Präimmunsereum (Spuren 3 und 4). Die polyklonalen Antikörper wurden wie über dem Gel angegeben hinzupipettiert. Bei der Bindung von Extrakten der Zelllinie 32M1 und Zugabe von Sp1-Antiserum (Spur 5) zeigte der obere Teil der Doppelbande vom C1-Komplex (siehe 3.5.2) ein deutlich retardiertes Wandern als Antikörper-Protein-DNA-Komplex (SS-Pfeil rechte Seite). Dies weist auch hier auf Sp1 als Hauptbestandteil von C1 hin. Durch den Supershift stellte sich C1 auch deutlicher als Doppelbande dar. Die Inkubation mit Sp3-Antiserum (Spur 6) führte zu einem deutlichen Supershift-Komplex bei gleichzeitiger Abschwächung von C2. Sp4-Antiserum (Spur 7) bildete dagegen keinen Supershift. Bei der Kombination von Sp1- und Sp3-Antiserum werden C1 und C2 aufgehoben und ein sehr prominenter Supershift-Komplex gebildet. Der untere Teil des C1-Komplexes könnte durch Bindung mit Sp3 zustande kommen. Kombinationen mit Sp4-Antiserum (mit Sp1-Antiserum in Spur 9, mit Sp3-Antiserum in Spur 10, mit Sp1- und Sp3-Antiserum in Spur 11) zeigten keine Veränderung im Vergleich zum Bild ohne Sp4. Diese Ergebnisse verdeutlichen, daß Sp1 und Sp3 aus Kernextrakten der NSCLC-Zelllinie 32M1 an der Bildung der identifizierten DNA-Protein-Komplexe C1 und C2 am cRE-Element des Gastrinpromotors beteiligt sind. Durch den Vergleich des Migrationsmusters von H69-Kernextrakten bei Gelretardationsexperimenten kann von einer vergleichbaren spezifischen Bindung in dieser Zelllinie ausgegangen werden. Eine Beteiligung von Sp4-Proteinen an der DNA-Protein-Komplexbildung konnte nicht nachgewiesen werden.

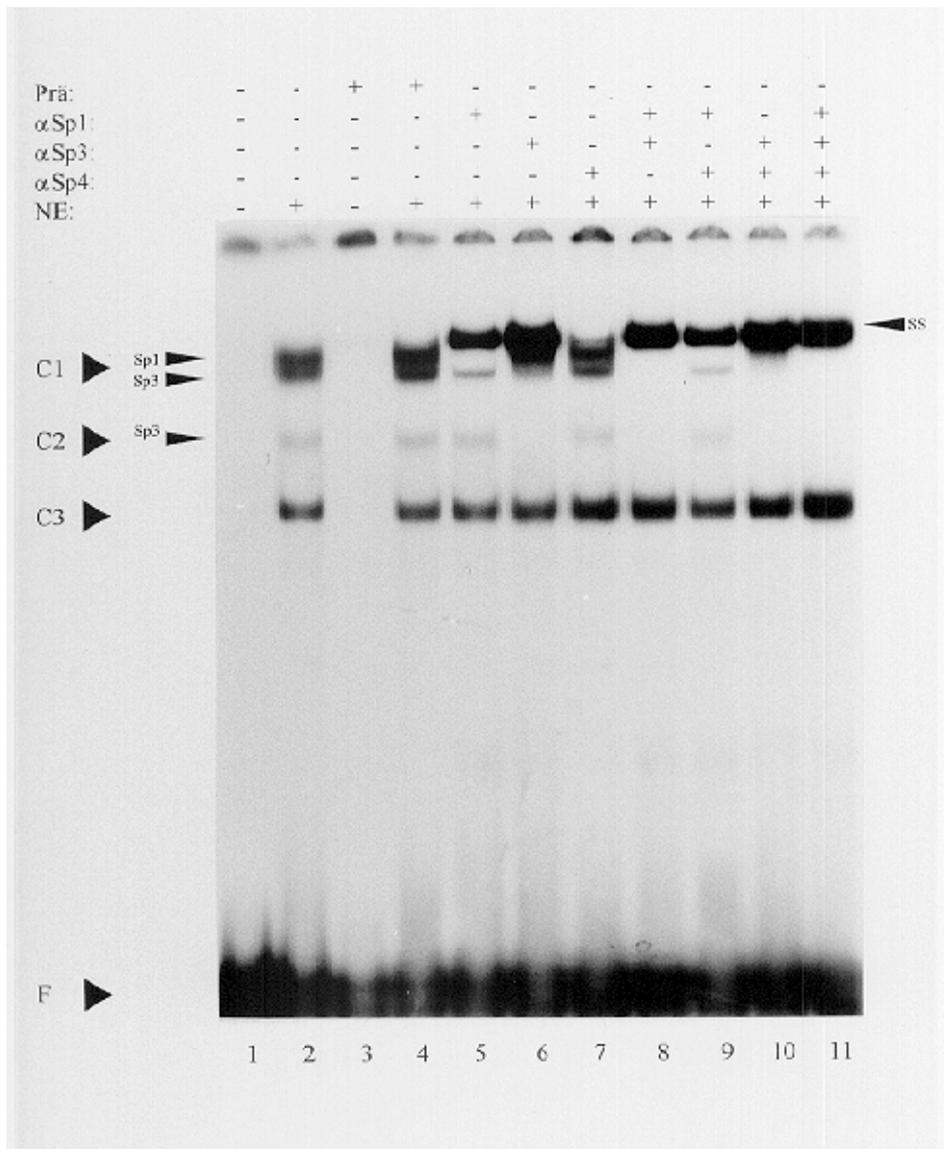


Abb. 26: Supershift-Experiment mit dem cRE-Element und 32M1-Kernextrakten (NE). Die Zusätze zu der freien Probe (F) sind wie in Abbildung 23 über dem Gel angegeben. Die gebildeten Komplexe (C1 bis C3) werden auf der linken Seite (\blacktriangleright) dargestellt, ebenso die durch die Addition von Antikörpern (α Sp1, α Sp3 und α Sp4) beeinflussten Komplexe (\blacktriangleright). Die verzögert laufenden Antikörper-Protein-DNA-Komplexe sind auf der rechten Seite gekennzeichnet (\blacktriangleleft SS). Als Negativkontrolle diente Präimmunserum (Prä).

3.5.3.3 Sp-Proteine sind an der Bildung von DNA-Protein-Komplexen am gERE-Element beteiligt.

Die Bindung von Sp-Proteinen wurde auch am gERE-Element des Gastrinpromotors beispielhaft mit RIN38A-Kernextrakten untersucht. Zu diesem Zweck wurde ein Supershift-Experiment wie unter 3.5.3.2 mit der gERE WT-Sequenz als markierter Probe durchgeführt (Abb. 27). Auch hierbei zeigte sich, daß die DNA-Protein-Komplexe C1 und C2 durch Bindung von Sp1- und Sp3-Proteinen zustande kommen. Die Komplexe C3 und C4 wurden durch Zugabe von Sp-Antikörpern nicht beeinflusst. Es ist davon auszugehen, daß es sich um weitere, hier nicht näher charakterisierte DNA-Bindungsproteine handelt, die an der Regulation des Gastringens durch Bindung an das CACCC-, cRE- und gERE-Element beteiligt sind. Es konnte gezeigt werden, daß Sp1- und Sp3-Proteine aus Kernextrakten der SCLC-Zelllinie H69, der NSCLC-Zelllinie 32M1 und der Ratteninsulinoma-Zelllinie RIN38A an der DNA-Protein-Komplexbildung am CACCC-cRE- und gERE-Element des Gastrinpromotors beteiligt sind und Bindungsspezifität aufweisen. Eine Bindung von Sp4-Proteinen konnte in keinem Fall nachgewiesen werden.

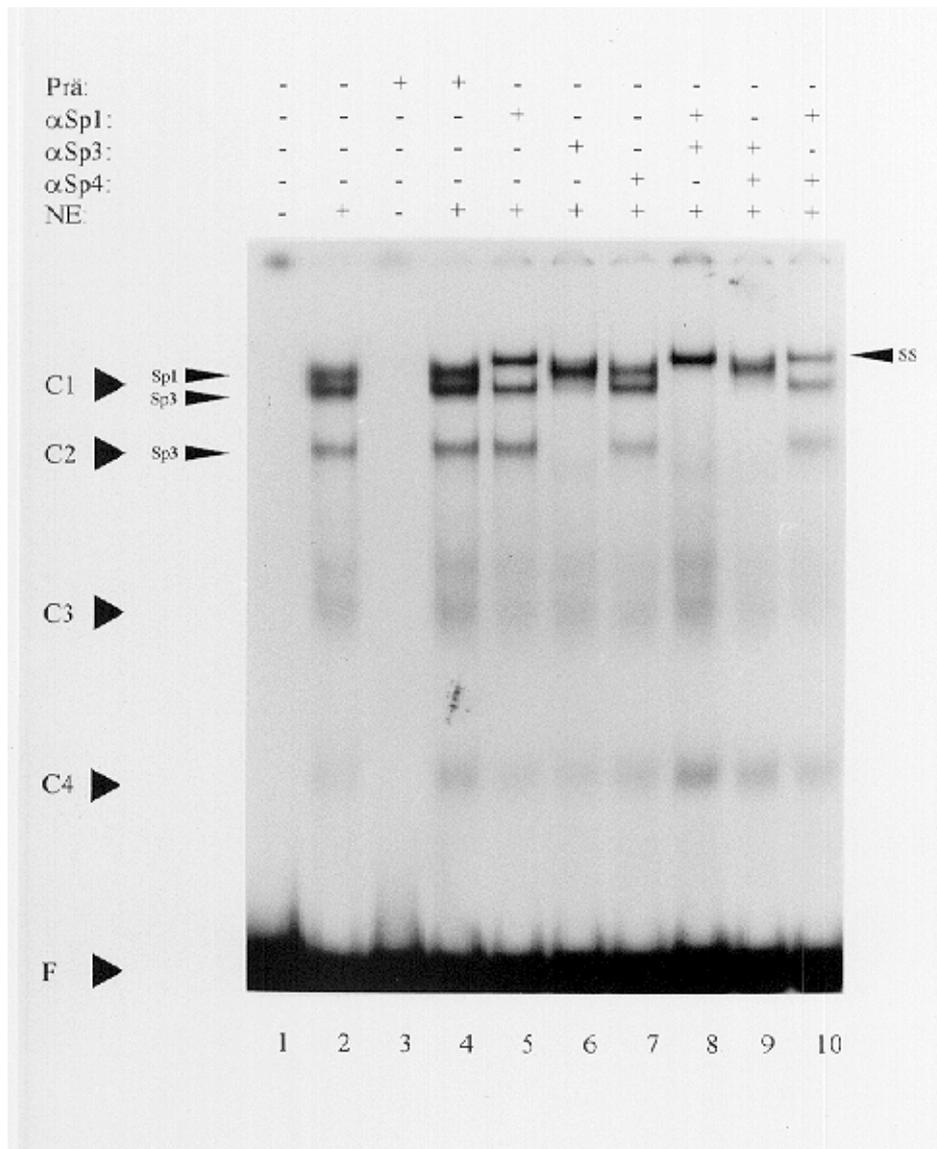


Abb. 27: Supershift-Experiment mit dem gERE-Element und RIN38A-Kernextrakten (NE). Die Zusätze zu der freien Probe (F) sind wie in Abbildung 23 über dem Gel angegeben. Die gebildeten Komplexe (C1 bis C3) werden auf der linken Seite (\blacktriangleright) dargestellt, ebenso die durch die Addition von Antikörpern (α Sp1, α Sp3 und α Sp4) beeinflussten Komplexe (\blacktriangleright). Die verzögert laufenden Antikörper-Protein-DNA-Komplexe sind auf der rechten Seite gekennzeichnet (\blacktriangleleft SS). Als Negativkontrolle diente Präimmunsersum (Prä).

4 Diskussion

4.1 Regulation der Gastrinexpression

Im Unterschied zu Lungentumorzellen wurde die transkriptionelle Regulation des Gastringens bereits in verschiedenen Tumorzell-Systemen charakterisiert. In Ratten-Insulinoma-Zellen wurden *cis*-regulatorische Sequenzen zwischen Nt -109 und Nt -75 des humanen Gastrinpromotors nachgewiesen, die Inselzell-spezifische Aktivatoren und nicht-spezifische Repressoren binden (Wang und Brand, 1990 und 1992). Ein weiteres *cis*-regulatorisches Element von Nt -163 bis Nt -140 mit einem GC- und AT- reichen Element wurde identifiziert, an das Sp1 und ein Gastrin AT- Faktor Bindungsspezifität aufweisen. In Ratteninsulinoma-Zellen blockierte dieser AT-Faktor die Sp1-Bindung und so dessen Gastrinpromotor-aktivierende Funktion (Chung et al., 1995). Ebenfalls für Ratteninsulinoma-Zellen (RIN38A) wurde eine Regulierung des Ratten- Gastrinpromotors durch eine RAP1-Sequenz von Nt -112 bis Nt -86 als positives *cis*-regulatorisches Element gezeigt (Simon et al., 1994). Die RAP1-Sequenz des Ratten-Gastrinpromotors entspricht dabei dem CACCC-Element des humanen Gastrinpromotors, wobei die RAP1-Bindungsaktivität in Inselzellen den Zinkfingerproteinen Sp1 und Sp3 entspricht. Die durch Sp1 und Sp3 vermittelte Gastrinpromotoraktivität ist dabei von einer intakten RAP1-Sequenz abhängig (Simon et al., 1997). Die Hypophysen-Zelllinie GH₄ als Rezeptor für Peptidregulatoren stellt ebenfalls ein Modell für die Gastringen-Transkription dar. Die Stimulation der Gastrinpromotoraktivität durch EGF (*epidermal growth factor*) war in dieser Zelllinie von einem *cis*-regulatorischen Element der 5'-flankierenden DNA zwischen Nt -82 und Nt -40 abhängig, welches Sp1 und AP2 binden kann (Godley und Brand, 1989). EGF reguliert hier durch das gERE-Element (gastrin EGF response element) von Nt -68 bis Nt -53, an das Sp1, gERP1 (*gERE binding protein*) und gERP2 binden, die Gastringen-Transkription. Von Nt -82 bis Nt -68 konnte ein E-Box-Motiv, an das Helix-Loop-Helix Transkriptionsfaktoren binden, nachgewiesen werden, das in Inselzellen die basale Transkription aktiviert, nicht aber in GH₄-Zellen. Die Funktion dieser E-Box-Sequenz scheint daher vom Zelltyp abzuhängen (Bachwich et al., 1992; Merchant et al., 1995). Kernextrakte der von EGF-stimulierten humanen Magenadenokarzinom-Zelllinie AGS enthalten Sp1, ein zweites Zinkfingerprotein ZBP-89, gERP1 und gERP2, die am gERE- Element des Gastrinpromotors binden und die Gastrinexpression in AGS-Zellen

stimulieren (Ford et al., 1997). In der AGS-Zelllinie ist auch gezeigt worden, daß drei GC/GT-Boxen zwischen Nt -140 und Nt -134 (Teil des cRE-Elementes), Nt -108 und Nt -102 (Teil des CACCC-Elementes) und Nt -67 und Nt -61 (Teil des gERE-Elementes) für die Sp1- und Sp3- vermittelte Gastringen-Transkription verantwortlich sind (Hansen et al., 1999). In Drosophila-Zellen wird der Gastrinpromotor hauptsächlich durch die distale GC-Box (cRE) aktiviert. Der Regulationseffekt von Sp3 war Zelllinien-abhängig: In Drosophila-Zellen fand mit Sp1 eine synergistische Aktivierung des Gastrinpromotors statt, in AGS-Zellen supprimierte Sp3 die Gastrinpromotoraktivität. Beide Effekte waren von der C-terminalen Domäne des Sp3-Proteins abhängig. Dies zeigt, daß die Kombination der GC/GT-Boxen und die Beziehung zwischen Sp1 und Sp3 wichtig für die Gastringenexpression sind (Hansen et al., 1999). Die Mehrheit humaner Kolonkarzinome exprimiert das Gastringen. Gastrin-Rezeptor-Antagonisten und Gastrin-Antikörper verursachen zum Teil einen antiproliferativen Effekt in Kolonkarzinom-Zelllinien (Hoosein et al., 1988), und Untersuchungen über Gastrin als autokrinen Wachstumsfaktor konnten in diesen Tumorzelllinien bestätigt werden (Mauss et al., 1994, Singh et al., 1996). Eine meßbare Suppression der Gastringen-Expression von *trans*-aktiven Peptiden wie Somatostatin (Karnik et al., 1989) konnte nachgewiesen werden. Gastrimmune, ein Immunogen, welches Formen des Gastrin-17 neutralisieren kann, verhinderte *in vivo* das Wachstum des primären kolorektalen Tumors und die Lungenmetastasen (Watson et al., 1999). Über die transkriptionelle Regulation der Gastrinpromotor-Aktivierung in Kolonkarzinomen ist dagegen wenig bekannt (Finley et al., 1993).

4.2 Zelltypspezifität der Gastrinpromotor-Expression in Lungentumorzellen

In der vorliegenden Arbeit wurde die zelltypspezifische Aktivierung des Gastrinpromotors in Lungentumor-Zellen mittels transienter Transfektion in der SCLC-Zelllinie H69, der NSCLC-Zelllinie EPLC-32M1 und der Mesotheliom-Zelllinie MSTO-211H charakterisiert. Unterschiedliche Deletionsmutanten des Gastrinpromotors wurden in ein Reportergenkonstrukt kloniert, dessen transkriptionelle Aktivität über die Expression von Luciferase identifiziert werden konnte. Von den drei untersuchten Zelllinien exprimieren nur die NSCLC-Zelllinie 32M1 (Plattenepithelkarzinom) und die SCLC-Zelllinie H69 den

Gastrinpromotor, die Mesotheliom-Zelllinie MSTO-211H kaum. Beim Vergleich zwischen MSTO-211H-Zellen und 32M1-Zellen verlief die Regulierung tendenzmäßig ähnlich, lediglich bei Deletion von Nt -1035 nach Nt -935 und von Nt -190 nach Nt -148 kam es bei den 32M1-Zellen zur Steigerung, bei den MSTO-211H-Zellen zu einer Reduzierung der Promotoraktivität. Bei Deletion von Nt -400 nach Nt -190 verhielt es sich umgekehrt. Beim Vergleich zwischen MSTO-211H-Zellen und H69-Zellen fiel eine Umkehr der Regulierung im Bereich der Deletionen von Nt -935 nach Nt -835 (Steigerung der Aktivität bei H69-Zellen) und Nt -710 nach Nt -600 (Steigerung bei MSTO-211H-Zellen) auf. Die Unterschiede in der Promotorregulierung weisen auf zelltypspezifische *cis*-regulatorische Bereiche hin. Im Bereich der Deletionen ab Nt -190 zeigen alle drei Zelllinien tendenziell die gleiche Regulierung, allerdings in sehr unterschiedlich starker Ausprägung. Das dort gelegene CACCC-Motiv als negativ *cis*-regulatorisches und die zwei möglichen Sp1-Bindungsstellen als positive *cis*-regulatorische Elemente könnten so für eine tumorspezifische Regulierung des Gastrinpromotors in Bronchialkarzinomen verantwortlich sein. Das cRE-, CACCC- und gERE-Element sind bereits in AGS-Zellen als für die durch Sp1 und Sp3 vermittelte Gastringen-Transkription untersucht worden (Hansen et al., 1999).

4.3 *Cis*-regulatorische Elemente des Gastrinpromotors in SCLC- und NSCLC-Zellen

Die Transfektionsexperimente mit Deletionskonstrukten des Gastrinpromotors wiesen in der NSCLC-Zelllinie 32M1 auf vergleichsweise starke positiv *cis*-regulatorische Elemente in den Bereichen der Deletionen von Nt -835 nach Nt -710, Nt -400 nach Nt -190, Nt -148 nach Nt -119 und Nt -68 nach Nt -48 hin. In den Bereichen von Nt -935 nach Nt -835, Nt -510 nach Nt -400 und Nt -190 nach Nt -148 ließen die Ergebnisse starke negativ *cis*-regulatorische Elemente vermuten. Die Deletion von Nt -119 nach Nt -82 bewirkte eine leichte Aktivierung. Der Vergleich mit der Promotorsequenz ergab in diesem proximal zum Haupttranskriptionstartpunkt gelegenen Bereich eine CACCC-Box (Nt -102 bis Nt -106) und zwei mögliche Sp1-Bindungsstellen in den Bereichen starker Aktivierung, ein *cAMP response element* (cRE, Nt -145 nach Nt -126) und ein *EGF response element* (gERE, Nt -68 nach Nt -53). Beim direkten Vergleich der Ergebnisse der Transfektionsexperimente der SCLC-Zelllinie H69 mit der NSCLC-Zelllinie 32M1

zeigte sich die Regulierung des Gastrinpromotors bis auf die umgekehrten Regulierungen bei Deletion von Nt -510 nach Nt -400 (sinkende Promotoraktivität in H69-Zellen) und von Nt -400 nach Nt -190 (ansteigende Promotoraktivität in H69-Zellen) insgesamt ähnlich. Zelltypspezifisch vorhandene *cis*-regulatorische Elemente könnten die Ursache für diese Unterschiede sein. Auffallend war in den H69-Zellen eine Reduzierung der Promotoraktivität bei Deletion von Nt -82 nach Nt -79, wo durch Wegfall von drei Basen ein Abfall um 75 % festzustellen war.

4.3.1 Die proximale CACCC-Box ist ein negatives *cis*-regulatorisches Element

DNase-Protektionsversuche mit einem entsprechenden Promotorfragment zeigten bei vorheriger Inkubation mit rekombinantem Sp1 oder nukleären Extrakten aus 32M1-Zellen einen deutlich geschützten Bereich um die CACCC-Box. Es ist gezeigt worden, daß Sp1-Proteine auch an Sequenzen wie CACCC binden können (Kang et al., 1996; Simon et al., 1994). Zur Identifizierung der Bindungsaktivität wurden Gelretardationsexperimente mit einem die CACCC-Box enthaltenden Oligonukleotid (Position von Nt -115 bis Nt -98) durchgeführt. Dabei zeigten sich mehrere verzögert im Gel laufende Banden, die im Vergleich mit bakteriell exprimierten Sp-Proteinen und RIN38A-Zellen (Simon et al., 1997) ähnliche Komplexe bildeten. Diese Bindung wies sich durch Wettbewerbsversuche als spezifisch aus. Um eine genauere Differenzierung der bindenden Sp-Proteine zu ermöglichen, wurden Antiseren gegen Sp1, Sp3 und Sp4 für einen immunologischen Nachweis in den DNA-Protein-Komplexen benutzt. Bei Zugabe der Antikörper gegen Sp1 und Sp3 verringerte sich die Laufgeschwindigkeit der Komplexe im Gel weiter. So konnte nachgewiesen werden, daß die obere Bande des prominenten C1- Komplexes eine Sp1-DNA-Bindung zeigt, die untere Bande von C1 und der C2-Komplex eine Sp3-DNA-Bindung. Die Identifizierung von zwei Sp3-Komplexen ist damit vereinbar, daß Sp3 in verschiedenen Polypeptidgrößen in Abhängigkeit des Translationsstartes vorkommen kann (Müller et al., 1992). Es handelt sich bei der unteren Bande des C1-Komplexes und C3 um mindestens zwei Polypeptide ähnlichen Molekulargewichtes mit den antigenen Eigenschaften von Sp3. Eine dem Bandenmuster des bakteriell exprimierten Sp4 entsprechende Bindung war nicht nachzuweisen. Neben den Sp1- und Sp3-Proteinkomplexen konnte mindestens ein weiterer DNA-Proteinkomplex C3 nachgewiesen werden, so daß anzunehmen ist, daß bisher noch nicht identifizierte DNA-

Bindungsproteine an der transkriptionellen Regulierung des Gastrinpromotors beteiligt sind. Über Sp1 wurde bisher nur als Aktivator berichtet, Sp3 dagegen kann auch als Repressor wirken. Untersuchungen am Uteroglobulin- und c-myc-Promotor haben außerdem gezeigt, daß Sp1 und Sp3 oppositionelle transkriptionelle Aktivität durch Bindung an das gleiche *cis*-regulatorische Element aufweisen (Hagen et al., 1992), und andere Veröffentlichungen zeigen, daß die positive oder negative Wirkung von Sp3 von der Anzahl der funktionellen Sp1-Bindungsstellen abhängig sein kann (Birnbaum et al., 1995; Majello et al., 1997). Möglicherweise spielt das Verhältnis der *cis*-regulatorischen Elemente und die Beziehung von Sp1 zu Sp3 eine Rolle bei der transkriptionellen Regulierung wie in AGS-Zellen (Hansen et al., 1999). Neuere Untersuchungen an Ratteninsulinoma-Zellen (RIN38A-Zelllinie) haben außerdem ein neues Zinkfingerprotein RIN ZF identifiziert, das an die CACCC-Box von Gastrin bindet und die bei Ratteninsulinoma-Zellen aktivierende Eigenschaft von dort bindendem Sp1 zu regulieren scheint (Tillotson, 1999). DNase-Protektionsversuche in der SCLC-Zelllinie H69 ergaben die gleichen etwas schwächer geschützten Bereiche bei Inkubation mit H69-Kernextrakten wie bei vorheriger Inkubation mit rekombinantem Sp1. Die im Anschluß durchgeführten Gelretardationsexperimente ergaben das gleiche Bandenmuster mit Nachweis von Sp1- und Sp3-DNA-Komplexen wie bei der NSCLC-Zelllinie. Die C2-Bande (Sp3-DNA-Komplex) fiel im Vergleich als schwächer bis hin zu kaum sichtbar auf. Da bei den funktionellen Untersuchungen der Wegfall der negativ *cis*-regulatorischen CACCC-Box eine sehr viel stärkere Aktivierung des Gastrinpromotors zur Folge hatte, ist in Erwägung zu ziehen, daß das Mengenverhältnis von Sp1 zu Sp3 einen zelltypspezifischen Unterschied bei der Gastrinregulation von SCLC- und NSCLC-Zellen ausmacht. So konnte gezeigt werden, daß in SCLC- und NSCLC-Zellen die CACCC-Box des Gastrinpromotors ein negativ *cis*-regulatorisches Element ist, an das Sp1- und Sp3-Proteine Bindungsspezifität zeigen. Eine Bindung von Sp4 konnte nicht nachgewiesen werden.

4.3.2 Das cRE-Element ist ein positives *cis*-regulatorisches Element.

Bei den Transfektionsexperimenten mit der NSCLC-Zelllinie 32M1 und der SCLC-Zelllinie H69 konnte bei Deletion von Nt -148 bis Nt -119 eine starke Aktivierung des Gastrinpromotors festgestellt werden. Die Sequenzanalyse zeigte in diesem Bereich ein *cAMP response element* (cRE, Hocker et al., 1998). Die DNase-Protektionsversuche mit 32M1-Zellen zeigten an dieser Position wie bei der CACCC-Box bei vorheriger Inkubation

mit rekombinantem Sp1 oder nukleären Extrakten aus 32M1-Zellen einen deutlich geschützten Bereich. Die Gelretardationsexperimente zeigten wie bei der CACCC-Box eine spezifische Bindung von mindestens vier DNA-Protein-Komplexen. Die wie unter 4.1.1 durchgeführten Experimente ergaben in gleicher Weise das Vorhandensein von Sp1- und Sp3-DNA-Komplexen. Bei dem zusätzlich vorhandenen Komplex C4 kann es sich um einen weiteren bindenden Transkriptionsfaktor handeln. Gleichmaßen durchgeführte DNase-Protektionsversuche und Gelretardationsexperimente zeigten die Beteiligung von Sp1- und Sp3-DNA-Komplexen am cRE-Element auch in der SCLC-Zelllinie H69. Die aktivierende Wirkung dieses Elementes fiel im Vergleich zu den 32M1-Zellen geringer aus. Auch hier zeigte sich der schneller wandernde Sp3-Komplex (C2) insgesamt schwächer. Versuche mit aufsteigender Zinkchlorid-Konzentration ergaben bei dem prominenten C1-Komplex (Sp1/Sp3) keine Verstärkung der Bindung, obwohl es sich um zinkabhängige Proteine handelt, eine hohe Proteinkonzentration der Kernextrakte könnte diese Tatsache erklären. Die Komplexe C2 bis C4 schienen dagegen sogar bei Fehlen von Zinkionen leicht verstärkt zu sein, die abgeschwächte Konkurrenz zinkabhängiger Faktoren könnte als Ursache dafür in Frage kommen. Eine Bindung von Sp4 konnte auch hier nicht nachgewiesen werden. Es konnte gezeigt werden, daß durch die spezifische Bindung von Sp1- und Sp3-Proteinen an das positiv *cis*-regulatorische cRE-Element in NSCLC- und SCLC-Zellen der Gastrinpromotor aktiviert wird. Da Sp3 auch als aktivierender Faktor beschrieben wird (Liang et al., 1996; Bigger et al., 1997; Netzker et al., 1997) ist dieses Ergebnis mit dem oben gewonnenen durchaus vereinbar.

4.3.3 Das gERE-Element ist ein positives *cis*-regulatorisches Element.

Wie beim cRE-Element wurde für das gERE-Element (Merchant et al., 1995) eine aktivierende Rolle in SCLC- und NSCLC-Zellen nachgewiesen. Da die Bindung von Sp1 an dieses Element des Gastrinpromotors bereits in GH₄-Zellen nachgewiesen wurde (Godley et al., 1989; Merchant et al., 1995), wurde auf einen zusätzlichen DNase-Protektionsversuch verzichtet und lediglich die Gelretardationsexperimente durchgeführt. Sie zeigten ebenfalls spezifische Bindung von mindestens vier Protein-DNA-Komplexen, C1 und C2 wurden wiederum als Sp1- und Sp3-DNA-Komplexe ausgewiesen. Experimente mit Mutationen in den jeweiligen Bindungsdomänen zeigten, daß der wahrscheinlich dem C4-Komplex des cRE-Elementes entsprechende Komplex sowohl bei

Erhalt als auch bei Mutation des GGCGGG-Elementes erhalten blieb und eine spezifische Bindung vorlag. Die Mutation der 5' und 3'-Domäne bei Erhalt der GGCGGG-Box hatte eine Schwächung der Bindung des Sp1- und Sp3-DNA-Komplexes zur Folge, eine Basenmutation innerhalb der Box brachte eine ebenfalls nur geringe Schwächung. Die Mutation der 3'-Domäne mit Bildung einer zweiten GGCGGG-Box führte zu einer deutlichen Bindungsverstärkung. Bei den bei GH₄-Zellen als *gastrin EGF response proteins* (gERP1 und gERP2) beschriebenen Komplexen (Merchant et al., 1995) könnte es sich bei dem C4-Komplex um gERP1 handeln, welcher durch Sp-Antisera nicht retardiert wurde. Eine dem gERP2-DNA-Komplex entsprechende Bindung und eine Beteiligung von Sp4 konnte nicht nachgewiesen werden. Diese Ergebnisse lassen sich auf die mit H69-Zellen gewonnenen übertragen. Die Bildung von Sp1- und Sp3-DNA-Komplexen und weiteren Transkriptionsfaktoren (gERP1 ?) führte in dieser SCLC-Zelllinie zu einer Aktivierung des Gastrinpromotors, die im Verhältnis zu der in der NSCLC-Zelllinie geringer ausfiel. Durch diese Untersuchungen konnte nachgewiesen werden, daß in SCLC- und NSCLC-Zellen das gERE-Element ein positiv *cis*-regulatorisches Element des Gastrinpromotors ist, an das Sp1- und Sp3-Proteine spezifisch binden.

4.4 Der Einfluß von Wachstumsfaktoren auf die Expression des Gastrinpromotors

Durch Serumstimulation des hugas Luc -1300-Reportergenkonstruktes und der Deletionsmutanten hugas Luc -40 und hugas Luc -68, die beispielhaft in 32M1-Zellen untersucht wurden, konnte außerdem ein Einfluß der möglicherweise im fötalen Kälberserum enthaltenen Wachstumsfaktoren auf die Aktivität der 5'-flankierenden DNA zwischen Nt -1300 und Nt -68 nachgewiesen werden. Weiterführende Stimulationsversuche mit Wachstumsfaktoren wie EGF, GRP u.a. könnten zu einer genaueren Differenzierung ihres Einflusses auf die Gastringen-Transkription in Bronchialkarzinom-Zelllinien führen. Die Stimulation des Wachstums von SCLC-Zellen durch zahlreiche Neuropeptide (z.B. Bradykinin, Cholezystokinin, Neurotensin und Bombesin) (Sethi et al., 1992), sowie die Hemmung durch Antikörper gegen das Gastrin-releasing-Peptid (GRP) *in vivo* und *in vitro* (Koppan et al., 1998) konnten bereits nachgewiesen werden. Einige der bekannten Wachstumsfaktoren werden derzeit bereits als Tumormarker bei SCLC-Zellen (Aoyagi et al., 1995; Tsuchiyama et al., 1997; Johnson and Kelley, 1998) verwendet.

Mit den vorliegenden Daten konnte nun erstmals eine für Bronchialkarzinome relevante Regulierung des Gastringens nachgewiesen werden. So vermittelte (neben weiteren, bislang unbekanntenen Transkriptionsfaktoren) die spezifische Bindung von Sp1- und Sp3-Proteinen an das CACCC-Element im Gastrinpromotor eine negative, hingegen die Bindung von Sp1- und Sp3-Proteinen und möglicherweise auch gERP1 an das cRE- und gERE-Element eine positive transkriptionelle Regulation des Gastrinpromotors in SCLC- und NSCLC-Zellen (Abb. 28).

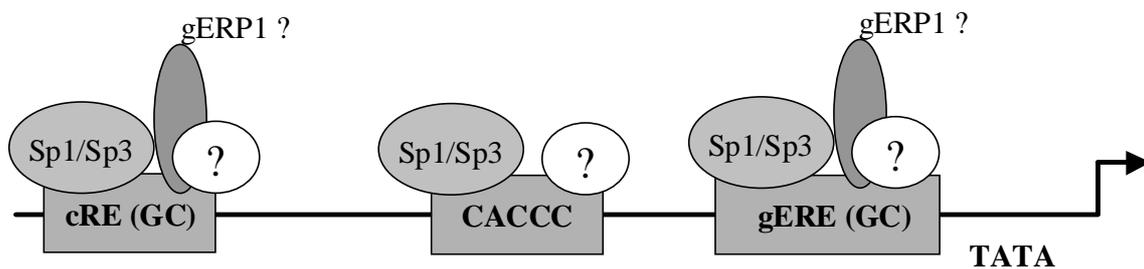


Abb. 28: Schematische Darstellung der in Bronchialkarzinom-Zellen nachgewiesenen relevanten *cis*-regulatorischen Elemente und der im Gastrinpromotor identifizierten bindenden Transkriptionsfaktoren.

5 Zusammenfassung

Die transkriptionelle Regulation der Expression von Gastrin in SCLC- und NSCLC-Zellen war bisher nicht untersucht worden. Die Klonierung der 5'-flankierenden Sequenzen des Gastringens und die Herstellung von Gastrinpromotor-Reportergenkonstrukten ermöglichte eine vergleichende funktionelle Untersuchung der Gastrinpromotor-Aktivität in der SCLC-Zelllinie H69, der NSCLC-Zelllinie 32M1 und der Mesotheliom-Zelllinie MSTO-211H. Die vorliegenden Untersuchungen konnten so eine zelltypspezifische Aktivität des Gastrinpromotors in Lungentumorzellen nachweisen. In der MSTO-211H-Zelllinie erwies sich der Gastrinpromotor als praktisch inaktiv. Für die NSCLC-Zelllinie EPLC-32M1 und die SCLC-Zelllinie H69 erwiesen sich drei Bereiche nahe des Haupttranskriptions-Startpunktes als relevante *cis*-regulatorische Regionen: eine negativ *cis*-regulatorische Sequenz um das CACCC-Element (Nt -106 bis Nt -102), eine positiv *cis*-regulatorische Sequenz um das cRE-Element (Nt -148 bis Nt -119) und das gERE-Element (Nt -68 bis Nt -53). Dnase-Protektionsversuche zeigten im Sequenzbereich des CACCC- und des gERE-Elementes die *in vitro* Bindung von rekombinantem Sp1 wie auch von nukleären Proteinen aus 32M1- und H69- Kernextrakten. Gelretardationsexperimente mit entsprechenden Oligonukleotiden konnten die spezifische Bindung von Sp1- und Sp3-Proteinen an das cRE-, CACCC- und gERE-Element des Gastrinpromotors nachweisen. Die Gelretardationsexperimente gaben darüber hinaus Hinweise auf mindestens einen weiteren bisher nicht identifizierten Proteinfaktor, der in Lungentumorzellen an das CACCC-Element bindet, sowie auf zwei weitere Bindungsaktivitäten an das cRE- und gERE-Element, wobei es sich bei einem dieser beiden Faktoren möglicherweise um den bereits in GH₄-Zellen beschriebenen Transkriptionsfaktor (gERP1) handeln könnte.

6 Summary

Transcriptional regulation of gastrin expression in SCLC- and NSCLC-cells has not been described yet. Recently, the 5'-flanking sequences of the gastrin gene were cloned. A comparative functional examination of gastrin promoter activity in the SCLC cell line H69, the NSCLC cell line 32M1 and the mesothelioma cell line MSTO-211H was possible by creating gastrin promoter-reporter gene constructs. The present study has identified a cell-specific activity of the gastrin promoter in lung cancer cells. However, in the MSTO-211H cell line only a minimal gastrin promoter activity was detected. In the NSCLC cell line EPLC-32M1 and the SCLC cell line H69, three regions near the main transcription start site were identified as important *cis*-regulatory sequences: The negative *cis*-regulatory sequence around the CACCC element (Nt -106 bis Nt -102), the positive *cis*-regulatory sequence around the cRE element (Nt -148 bis Nt -119) and the gERE element (Nt -68 bis Nt -53). DNase I protection experiments revealed *in vitro* the binding of recombinant Sp1 and nuclear proteins of 32M1 and H69 cell extracts around the sequences of CACCC element and the gERE site. Electrophoretic mobility shift assays with corresponding oligonucleotides demonstrated the specific binding of Sp1 and Sp3 proteins to the cRE, CACCC and gERE elements of the gastrin promoter. Additionally, the assays indicated the presence of at least another up to now not identified protein factor, that binds in lung cancer cells to the CACCC element and of two further binding activities to the cRE element and the gERE site, respectively. Possibly, one of these factors could be the transcription factor gERP1, which has already been identified in GH₄ cells.

7 Literaturverzeichnis

Andrisani, O.M. (1999). CREB-mediated transcriptional control. *Crit. Rev. Eukaryot. Gene Expr.* 9 (1): 19-32.

Aoyagi, K., Miyake, Y., Urakami, K., Kashiwakuma, T., Hasegawa, A., Kodama, T., Yamaguchi, K. (1995). Enzyme immunoassay of immunoreactive progastrin-releasing peptide (31-98) as tumor marker for small-cell lung carcinoma: development and evaluation. *Clin. Chem.* 41/4: 537-543.

Azizkhan, J.C., Jensen, D.E., Pierce, A.J., Wade, M. (1993). Transcription from TATA-less promoters: dihydrofolate reductase as a model. *Crit. Rev. Eukaryot. Gene Expr.* 3: 229-254.

Bachwich, D., Merchant, J., Brand, S.J.(1992). Identification of a cis- regulatory element mediating somatostatin inhibition of epidermal growth factor-stimulated gastrin gene transcription. *Mol. Endocrinol.* 6: 1175-1184.

Banks, E.B., Crish, F.F., Welter, J.F., Eckert, R.L. (1998). Characterization of human involucrin promoter distal regulatory region transcriptional activator elements- a role for Sp1 and AP1 binding sites. *Biochem. J.* 331: 61-68.

Bardram, L., Hilsted, L., Rehfeld, J.F. (1985). Cholecystokinin, gastrin and their precursors in pheochromocytomas. *Acta Endocrinol. (Copenhagen)* 120: 303-309.

Bardram, L., Hilsted, L., Rehfeld, J.F. (1987). Gastrin in pituitary tumours. *Acta Endocrinol. (Copenhagen)* 115: 419-422.

Bardram, L., Hilsted, L., Rehfeld, J.F. (1990). Progastrin expression in mammalian pancreas. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 87: 298-302.

Bepler, G., Koehler, A., Kiefer, P., Havemann, K., Beisenherz, K., Jaques, G., Gropp, C., Haeder, M. (1988). Characterization of the state of differentiation of six newly established human non-small-cell lung cancer cell lines. *Differentiation* 37: 158-171.

Bigger, C.B., Casanova, E.A., Gardner, P.D. (1996). Transcriptional regulation of neuronal nicotinic acetylcholine receptor genes. *J. Biol. Chem.* 271: 32842- 32848.

Bigger, C.B., Melnikova, I., Gardner, P.D. (1997). Sp1 and Sp3 regulate expression of the neuronal nicotinic acetylcholine receptor β 4 subunit gene. *J. Biol. Chem.* 272: 25976-25982.

Birnbaum, M.J., van Wijnen, A.J., Odgren, P.R., Last, T.J., Suske, G., Stein, G.S., Stein, J.L. (1995). Sp1 trans-activation of cell cycle regulated promoters is selectively repressed by Sp3. *Biochemistry* 34: 16503-16508.

Bradford, M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of protein utilizing the principle of protein dye binding. *Anal. Biochem.* 72: 248-254.

Brand, A.H., Breeden, L., Abraham, J., Sternglanz, R., Nasmyth, K. (1985). Characterization of a „silencer“ in yeast: A DNA sequence with properties opposite to those of a transcriptional enhancer. *Cell* 41: 41-48.

Briggs, M.R., Kadonaga, J.T., Bell, S.P., Tjian, R. (1986). Purification and biochemical characterization of the promoter-specific transcription factor, Sp1. *Science* 234: 47-52.

Carbone, D.P. (1997). The biology of lung cancer. *Seminars in Oncology* 24: 388-401.

Carney, D.N., Gazdar, A.F., Bepler, G., Guccion, J.G., Marangos, P.J., Moody, T.W., Zweig, M.H., Minna, J.D. (1985). Establishment and identification of small cell lung cancer cell lines having classic and variant features. *Cancer Res.* 45: 2913-2923.

Carney, D.N., Bunn, P.A., Gazdar, A.F., Pagan, J.A., Minna, J.D. (1987). Selective stimulation of small cell lung cancer clonal growth by bombesin and gastrin releasing peptide. *Cancer Res.* 47: 821-825.

Chiba, I., Takahashi, T., Nau, M.M. et al. (1990). Mutations in the p53 gene are frequent in primary, resected non-small-cell lung cancer. *Oncogene* 5: 1603-1610.

Chung, D.C., Brand, S.J., Tillotson, L.G. (1995). Mutually exclusive interactions between factors binding to adjacent Sp1 and AT-rich elements regulate gastrin gene transcription in insulinoma cells. *J. Biol. Chem.* 270: 8829-8836.

D'Amico, D., Carbone, D., Mitsudomi, T., et al. (1992). High frequency of somatically acquired p53 mutations in small-cell lung cancer cell lines and tumors. *Oncogen* 7: 339-346.

Davis, R.L., Cheng, P.F., Lassar, A.B., Weitraub, H. (1990). The MyoD DNA binding domain contains a recognition code for muscle-specific gene activation. *Cell* 60: 733-746.

Dignam, J.D., Lebovitz, R.M., Roeder, R.G. (1983). Accurate transcription initiation by RNA polymerase II in a soluble extract from isolated mammalian nuclei. *Nucl. Acids Res.* 11: 1475-1489.

Dowlati, A., Bury, T., Corhay, J-L., Weber, T., Lamproye, A., Mendes, P., Radermecker, M. (1996). Gastrin levels in serum and bronchoalveolar lavage fluid of patients with lung cancer: comparison with patients with chronic obstructive pulmonary disease. *Thorax* 51: 1270-1272.

Dynan, W.S. (1989). Modularity in promoters and enhancers. *Cell* 58: 1-4.

Dynan, W.S., Tjian, R. (1983). The promoter-specific transcription factor Sp1 binds to upstream sequences in the SV40 early promoter. *Cell* 35: 79-87.

Dynan, W.S., Tjian, R. (1985). Control of eukaryotic messenger RNA synthesis by sequence-specific DNA-binding proteins. *Nature* 316: 774-778.

Dynlacht, B.D., Hoey, T., Tjian, R. (1991). Isolation of coactivators associated with the TATA-binding protein that mediate transcriptional activation. *Cell* 66: 563-576.

Evans, R.M., Hollenberg, S.M. (1988). Zinc fingers: guilt by association. *Cell* 52: 1-3.

Evers, B.M., Townsend, C.M. Jr., Upp, J.R., Allen, E., Hurlbut, S.C., Kim, S.W., Rajaraman, S., Singh, P., Reubi, J.C., Thompson, J.C. (1991). Establishment and characterization of a human carcinoid in nude mice and effect of various agents on tumor growth. *Gastroenterology* 101 (2): 303-311.

Finley, G.G., Koski, R.A., Melhem, M.F., Pipas, J.M., Meisler, A.I. (1993). Expression of the gastrin gene in the normal human colon and colorectal adenocarcinoma. *Cancer Res.* 53: 2919-2926.

Ford, M.G., Del Valle, J., Soroka, C.J., Merchant, J.L. (1997). EGF receptor activation stimulates endogenous gastrin gene expression in canine G cells and human gastric cell cultures. *J. Clin. Invest.* 99: 2762-2771.

Fuller, P.J., Stone, D.L., Brand, S.J. (1987). Molecular cloning and sequencing of a rat preprogastrin complementary deoxyribonucleic acid. *Mol. Endocrinol.* 1: 306-311.

Gazdar, A.F. (1986). Advances in the biology of non-small cell lung cancer. *Chest* 89 (Suppl.): 277-283.

Gidoni, D., Kadonaga, J.T., Barrera-Saldana, H., Takahashi, K., Chambon, P., Tjian, R. (1985). Bidirectional SV40 transcription mediated by tandem Sp1 binding interactions. *Science* 230: 511-517.

Godley, J.M., Brand, S.J. (1989). Regulation of the gastrin promoter by epidermal growth factor and neuropeptides. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 86: 3036-3040.

Goodwin, G.H., Partington, G.A., Perkins, N.D. (1990). Sequence specific DNA binding proteins involved in gene transcription. In: Chromosomes: Eukaryotic, Prokaryotic and Viral (Adolph, K.W., ed.). Boca Raton, Florida: CRC Press Vol.1: 31-85.

Gould, V.E., Linnoila, R.I., Memoli, V.A., Warren, W.H. (1983). Neuroendocrine cells and neuroendocrine neoplasms of the lung. *Pathol. Annu.* 18: 287-330.

Hagen, G., Müller, S., Beato, M., Suske, G. (1992). Cloning by recognition site screening of two novel GT box binding proteins: a family of Sp1 related genes. *Nucleic Acids Res.* 20: 5519-5525.

Hagen, G., Müller, S., Beato, M., Suske, G. (1994). Sp1-mediated transcriptional activation is repressed by Sp3. *EMBO J.* 13: 3843-3851.

Hagen, G., Dennig, J., Preiß, A., Beato, M., Suske, G. (1995). Functional analyses of the transcription factor Sp4 reveal properties distinct from Sp1 and Sp3. *J. Biol. Chem.* 270: 1-6.

Hanahan, D. (1983). Studies on transformation of *Escherichia coli* with plasmids. *J. Mol. Biol.* 166: 557-580.

Hansen, T.O., Bundgaard, J.R., Nielsen, F.C., Rehfeld, J.F. (1999). Composite action of three GC/GT boxes in the proximal promoter region is important for gastrin gene transcription. *Mol. Cell. Endocrinol.* 155: 1-8.

Hocker, M., Raychowdhury, R., Plath, T., Wu, H., O'Connor, D. T., Wiedenmann, B., Rosewicz, S., Wang, T.C. (1998). Sp1 and CREB mediate gastrin-dependent regulation of chromogranin A promoter activity in gastric carcinoma cells. *J. Biol. Chem.* 273 (51): 34000-34007.

Hori, R., Carey, M. (1994). The role of activators in assembly of RNA polymerase II transcription complexes. *Curr. Opin. Genet. Dev.* 4: 236-244.

Hoosein, N.M., Kiener, P.A., Curry, R.C., Rovati, L.C., McGilbra, D.K., Brattain, M.G. (1988). Antiproliferative effects of gastrin receptor antagonists and antibodies to gastrin on human colon carcinoma cell lines. *Cancer Res.* 48: 7179-7183.

Imanishi, K., Yamagushi, K., Kuranami, M., Kyo, E., Hozumi, T., Abe, K. (1989). Inhibition of growth of human lung adenocarcinoma cell lines by anti-transforming growth factor alpha monoclonal antibody. *J. Natl. Cancer Inst.* 81: 220-223.

Ito, R., Sato, K., Helmer, T., Jay, G., Agarwald, K. (1984). Structural analysis of the gene encoding human gastrin: the large intron contains an Alu sequence. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 81: 4662-4666.

Johnson, B.E., Kelley, M.J. (1995). Biology of small lung cancer. *Lung cancer (Suppl. 3)*: 5-16.

Johnson, B.E., Kelley, M.J. (1998). Autocrine growth factors and neuroendocrine markers in the development of small-cell lung cancer. *Oncology* 12 (Suppl.): 11-14.

Johnson, P.F., McKnight, S.L. (1989). Eukaryotic transcriptional regulatory proteins. *Ann. Rev. Biochem.* 58: 799-838.

Kadonaga, J.T., Carner, K.R., Masiarz, F.R., Tjian, R. (1987). Isolation of cDNA encoding the transcription factor Sp1 and functional analysis of the DNA binding domain. *Cell* 51: 1079-1090.

Kang, S.-H., Brown, D.A., Kitajima, I., Xu, X., Heidenreich, O., Gryaznov, S., Nerenberg, M. (1996). Binding and functional effects of transcriptional factor Sp1 on the murine interleukin-6 promoter. *J. Biol. Chem.* 271: 7330-7335.

Karnik, P.S., Monahan, S.J., Wolfe, M.M. (1989). Inhibition of gastrin gene expression by somatostatin. *J. Clin. Invest.* 83: 367-372.

Kingsley, C., Winoto, A. (1992). Cloning of GT box-binding proteins: a novel Sp1 multigene family regulating T-cell receptor gene expression. *Mol. Cell. Biol.* 12: 4251-4261.

Koppan, M., Halmos, G., Arencibia J.M., Lamharzi, N., Schally, A.V. (1998). Bombesin/gastrin-releasing peptide antagonists RC-3095 and RC-3940-II inhibit tumor growth and decrease the levels and mRNA expression of epidermal growth factor receptors in H-69 small cell lung carcinoma. *Cancer* 83: 1335-1343.

Krajewska, W. M. (1992). Regulation of transcription in eukaryotes by DNA-binding proteins. *Int. J. Biochem.* 24: 1885-1898.

Kumar, A.P., Mar, P.K., Zhao, B., Montgomery, R.L., Kang, D.C., Butler, A.P. (1995). Regulation of rat ornithine decarboxylase promoter activity by binding of transcription factor Sp1. *J. Biol. Chem.* 270: 4341-4348.

Kumar, A.P., Butler, A.P. (1997). Transcription factor Sp3 antagonizes activation of the ornithine decarboxylase promoter by Sp1. *Nucleic Acids Res.* 25: 2012-2019.

Larsson, L.I., Rehfeld, J.F. (1979). A peptide resembling the COOH-terminal tetrapeptide amide of gastrin from a new gastrointestinal cell type. *Nature (London)* 277: 575-578.

Liang, Y., Robinson, D.F., Dennig, J., Suske, G., Fahl, W.E. (1996). Transcriptional regulation of the SIS/PDGF-B gene in human osteosarcoma cells by the Sp family of transcription factors. *J. Biol. Chem.* 271: 11792-11797.

Lorenz, J. (1994). Neue zellbiologische Erkenntnisse zur Entstehung des Bronchialkarzinoms. *Internist* 35: 692-699.

Lu, J., Lee, W., Jiang, C., Keller, E.B. (1994). Start site selection by Sp1 in the TATA-less human Ha-ras promoter. *J. Biol. Chem.* 269: 5391-5402.

Majello, B., De Luca, P., Hagen, G., Suske, G., Lania, L. (1994). Different members of the Sp1 multigene family exert opposite transcriptional regulation of the long terminal repeat of HIV-1. *Nucleic Acids Res.* 22: 4914-4921.

Majello, B., De Luca, P., Suske, G., Lania, L. (1995). Differential transcriptional regulation of c-myc promoter through the same DNA binding sites targeted by Sp1-like protein. *Oncogene* 10: 1841-1848.

Majello, B., De Luca, P., Lania, L. (1997). Sp3 is a bifunctional transcription regulator with modular independent activation and repression domains. *J. Biol. Chem.* 272: 4021-4026.

Maniatis, T., Goodbourn, S., Fischer J.A. (1987). Regulation of inducible and tissue-specific gene expression. *Science* 236: 1237-1245.

Maxam, A.M., Gilbert, W. (1980). Sequencing end-labeled DNA with base-specific chemical cleavages. *Methods Enzymol.* 65: 499-560.

Mauss, S., Niederau, C., Hengels, K.J. (1994). Effects of gastrin, proglumide, loxiglumide and L-365, 260 on growth of human colon carcinoma cells. *Anticancer Res.* 14: 215-220.

McKnight, S., Tjian, R. (1986). Transcriptional selectivity of viral genes in mammalian cells. *Cell* 46: 795-805.

Merchant, J.L., Shiotani, A., Mortensen, E.R., Shumaker, D.K., Abraczinskas, D.R. (1995). Epidermal growth factor stimulation of the human gastrin promoter requires Sp1. *J. Biol. Chem.* 270: 6314-6319.

Meyers großes Taschenlexikon (1992): in 24 Bänden / hrsg. und bearbeitet von Meyers Taschenlexikonredaktion Mannheim. ISBN 3-411-11004-X (4. Auflage).

Minna, J.D., Higgins G.A., Glatstein, E.J. (1985). Cancer of the lung. In: Devita VT. Hellman, D., Rosenberg, S.A. (eds). Principles and practice of oncology. 2nd edition. Lippincott, Philadelphia, pp: 507-598.

Moody, T.W., Pert, C.B., Gazdar, A.F., Carney, D.N., Minna, J.D. (1981). High levels of intracellular bombesin characterize human small cell lung carcinoma. *Science* 214: 1246-1248.

Moody, T.W., Cuttitta, F. (1993). Growth factor and peptide receptors in small cell lung cancer. *Life Sciences* 52: 1161-1173.

Moody, T.W., Venugopal, R., Zia, F., Patierno, S., Leban, J.J., McDermed, J. (1995). A GRP receptor antagonist which inhibits small cell lung cancer growth. *Life Sciences* 56: 521-529.

Müller, K.M., Junker, K., Wiethage, T. (1995). Nichtkleinzellige Bronchialkarzinome. *Onkologie* 1: 429-440.

Müller, K.M., Theile A. (1994). Lung tumors. Pathologic-anatomic diagnosis. *Internist* 35: 710-723.

Mulshine, J.L., Treston, A.M., Brown, P.H., Birrer, M.J., Shaw, G.L. (1993). Initiators and promoters of lung cancer. *Chest*, 103/1 (Suppl.): 4-11.

Murre, C., McCaw, P.S., Baltimore, D. (1989). A new DNA binding and dimerization motif in immunoglobulin enhancer binding, daughterless, MyoD, and myc proteins. *Cell* 56: 777-783.

Netzker, R., Weigert, C., Brand, K. (1997). Role of the stimulatory proteins Sp1 and Sp3 in the regulation of transcription of the rat pyruvate kinase M gene. *Eur. J. Biochem.* 245: 174-181.

Pabo, C.O., Sauer, R.T. (1992). Transcription factor: structural families and principles of DNA recognition. *Annu. Rev. Biochem.* 61: 1053-1095.

Parraga, G., Horvath, S.J., Eisen, A., Taylor, W.E., Hood, L., Young, E.T., Klevit, R.E. (1988). Zinc dependent structure of a single-finger domain of yeast ADRI. *Science* 241: 1489-1492.

Philippe, J., Drucker, D., Knepel, W., Jepeal, L., Habener, J. (1988). Alpha cell specific expression of the glucagon gene is conferred to the glucagon promoter by interaction of DNA binding proteins. *Mol. Cell. Biol.* 8: 4877-4888.

Rehfeld, J.F., Bardram, L., Hilsted, L. (1989). Gastrin in human bronchogenic carcinomas: constant expression but variable processing of progastrin. *Cancer Res.* 49: 2840-2843.

Rehfeld, J.F., Hilsted, L. (1992). Gastrin and cancer. *Advances in Clinical Chemistry* 29: 239-262.

Rehfeld, J.F., van Solinge, W.W., Tos, M., Thomsen, J. (1990). Gastrin, cholecystokinin and their precursors in acoustic neuromas. *Brain Res.* 530: 235-238.

Roth, J.A. (1995). Molecular events in lung cancer. *Lung cancer* 12 (Suppl. 2): 3-15.

Saltzman, A.G., Weinmann, R. (1989). Promoter specificity and modulation of RNA polymerase II transcription. *FASEB J.* 3: 1723-1733.

Sambrook, J., Fritsch, E.F., Maniatis, T. (1989). *Molecular cloning, a laboratory manual.* Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York.

Schleif, R. (1988). DNA binding by proteins. *Science* 241: 1182-1187.

Schreiber, E., Matthias, P., Müller, M.M., Schaffner, W. (1989). Rapid detection of octamer binding proteins with „mini-extracts“ prepared from a small number of cells. *Nucl. Acids Res.* 17: 6419.

Sethi, T., Langdon, S., Smyth, J., Rozengurt, E. (1992). Growth of small cell lung cancer cells: stimulation by multiple neuropeptides and inhibition by broad spectrum antagonists in vitro and in vivo. *Cancer Res. (Suppl.)* 52: 2737-2742.

Shore, D., Nasmyth, K. (1987). Purification and cloning of a DNA binding protein from yeast that binds to both silencer and activator elements. *Cell* 51: 721-732.

Simon, B., Tillotson, L., Brand, S.J. (1994). Activation of gastrin gene transcription in islet cells by a RAP1-like cis-acting promoter element. *FEBS Lett.* 351: 340-344.

Simon, B., Wattler, F., Merchant, J.L., Münch, K., Schütze, H-J., Suske, G., Arnold, R. (1997). RAP1-like binding activity in islet cells corresponds to members of the Sp1 family of transcription factors. *FEBS Lett.* 411: 383-388.

Singh, P., Owlia, A., Varro, A., Dai, B., Rajaraman, S., Wood, T. (1996). Gastrin gene expression is required for the proliferation and tumorigenicity of human colon cancer cells. *Cancer Res.* 56: 4111-4115.

Smale, S.T. (1994). In *Transcription: mechanisms and regulation* (Conaway and Conaway, eds.) 36-81. Raven Press, New York.

Suske, G. (1999). The Sp-family of transcription factors. *Gene* 238: 291-300.

Thomas, F., Arvelo, F., Antoine, E., Jacrot, M., Poupon, M.F. (1992). Antitumoral activity of bombesin analogues on small cell lung cancer xenografts: relationship with bombesin receptor expression. *Cancer Res.* 52: 4872-4877.

Tillotson, G.L. (1999). RIN ZF, a novel zinc finger gene, encodes proteins that bind to the CACC element of the gastrin promoter. *J. Biol. Chem.* 274: 8123-8128.

Tillotson, G.L., Wang, C.T., Brand, S.J. (1994). Activation of gastrin transcription in pancreatic insulinoma cells by a CACC promoter element and a 70-kDa sequence-specific DNA-binding protein. *J. Biol. Chem.* 269: 2234-2240.

Tsuchiyama, T., Kawahara, M., Naka, N., Yamamoto, S., Nakao, M., Kamimori, T., Okada, T., Atagi, S., Ogawara, M., Furuse, K. (1997). Correlation between the tumor marker Pro-GRP and prognosis in patients with small-cell lung cancer (Article in Japanese). *Nihon Kyobu Shikkan Gakkai Zasshi* 35: 616-621.

Veale, D., Ashcroft, T., Marsh, C., Gibson, G.J., Harris, A.L. (1987). Epidermal growth factor receptors in non-small cell lung cancer. *Br. J. Cancer* 55: 513-516.

Vinson, C.R., Sigler, P.B., McKnight, S.L. (1989). Scissors-grip model for DNA recognition by a family of leucine zipper proteins. *Science* 246: 911-916.

Voss, S.D., Schlokot, U., Gruss, P. (1986). The role of enhancers in the regulation of cell-type-specific transcriptional control. *TIBS* 11: 287-289.

Wang, T.C., Brand, S.J. (1992). Function and regulation of gastrin in transgenic mice: a review. *Yale. J. Biol. Med.* 65: 705-713; Discussion 737-740.

Wang, T.C., Brand, S.J. (1990). Islet cell-specific regulatory domain in the gastrin promoter contains adjacent positive and negative DNA elements. *J. Biol. Chem.* 265: 8908-8914.

Watson, S.A., Michaeli, D., Morris, T.M., Clarke, P., Varro, A., Griffin, N., Smith, A., Justin, T., Hardcastle, J.D. (1999). Antibodies raised by gastrin immune inhibit the spontaneous metastasis of a human colorectal tumour, AP5LV. *Eur. J. Cancer* 35: 1286-1291.

Weinzierl, R.O.J., Dynlacht, B.D., Tijan, R. (1993). Largest subunit of *Drosophila* transcription factor IID directs assembly of a complex containing TBP and a coactivator. *Nature* 362: 511-517.

WHO (World Health Organization) (1982). The World Health Organization histological typing of lung tumours. *Am. J. Clin. Pathol.* 77: 123-136.

Wiborg, O.L., Berglund, L., Boel, E. et.al. (1984). Structure of the human gastrin gene. Proc. Natl. Acad. Sci. 81: 1067-1069.

Wigler, M., Sweet, R., Sim, G.K., Wold, B., Pellicer, A., Lacy, E., Maniatis, T., Silverstein, S., Axel, R. (1979). Transformation of mammalian cells with genes from procaryotes and eukaryotes. Cell 16: 777-785.

Wildeman, A.G. (1988). Regulation of SV40 early gene expression. Biochem. Cell. Biol. 66: 567-577.

Wingender, E. (1993). Gene regulation in eukaryotes. VCH Verlagsgesellschaft, Weinheim.

8 Anhang

8.1 Abkürzungen

A	Adenosin
ACTH	Adrenokortikotropes Hormon
APS	Ammoniumpersulfat
AS	Aminosäure
ATP	Adenosintriphosphat
bp	Basenpaare
BSA	Bovines Serumalbumin
C	Cytosin
cAMP	cyclo-Adenosinmonophosphat
CKBB	creatin kinase brain isozym (neuronale Kreatinkinase)
cpm	Zählereignisse pro Minute (Counts per minute)
DDC	L-Dopa-Decarboxylase
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle's Medium
DMS	Dimethylsulfat
DMSO	Dimethylsulfoxid
dmt	doppelt mutiert
DNA	Desoxyribonukleinsäure (engl.)
dNTP	Desoxynukleotidtriphosphat
DTT	Dithiothreitol
E.coli	Escherichia coli
EDTA	Ethylendiaminetetraessigsäure
Etbr	Ethidiumbromid
EtOH	Ethanol
FCS	engl.: Fötales Kälberserum
fpu	footprinting unit
G	Guanin
GRP	gastrin releasing peptide
HCOOH	Ameisensäure
HCl	Salzsäure
HEPES	4-(2-Hydroxyethyl)-1-Piperazinethan-Sulfonsäure

hu	human
kb	Kilobasen
KCl	Kaliumchlorid
KOH	Kaliumhydroxid
Luc.	Luciferase
MgCl ₂	Magnesiumchlorid
M	Mutante
mt	mutiert
NaCl	Natriumchlorid
NaOAc	Natriumacetat
NaOH	Natriumhydroxid
NSCLC	non small cell lung cancer = nicht kleinzelliger Lungenkrebs
NSE	neuronspezifische Enolase
Nt	Nukleotid
OD	Optische Dichte
P	Phosphor
PAA	Polyacrylamid
PCI	Phenol/Chloroform/Isoamylalkohol
PCR	Polymerasekettenreaktion (Polymerase chain reaction)
PMSF	Phenylmethylsulfonylfluorid
Poly dA/dT	Poly(=mehrfach)-Desoxyadenosin/Desoxytyrosin
Poly dI/dC	Poly-Desoxyinosin/Desoxycytosin
RLU	relative light units (hier relative Luciferase-Einheiten)
RPMI	Roswell Park Memorial Institute
SCLC	small cell lung cancer = kleinzelliger Lungenkrebs
SDS	Natriumdodecylsulfat
T	Tyrosin
TEMED	N,N,N',N',-Tetramethylethylendiamin
t-RNA	Transfer-Ribonukleinsäure
U	Internationale Einheit enzymatischer Aktivität (Unit)
UpM	Umdrehungen pro Minute
WT	Wildtyp

8.2 Danksagung

Herrn Prof. Dr. R. Arnold möchte ich für die Bereitstellung des Themas und das Überlassen des Laborplatzes danken.

Herrn Prof. Dr. Dr. hc. Eugen Weiss möchte ich ganz besonders für die Betreuung innerhalb des Veterinärmedizinischen Fachbereichs danken.

Für die kontinuierliche hervorragende Betreuung während dieser Arbeit, die intensive Ausbildung auf dem Gebiet der Molekularbiologie und die Vermittlung wissenschaftlichen Denkens möchte ich vor allem Frau PD. Dr. B. Simon danken. Aber auch die Unterstützung ihrer gesamten Arbeitsgruppe mit Dr. H. Herrmann, Dr. F. Wattler, Katharina Elsässer und Karin Münch war für diese Arbeit sehr wichtig.

Bei Frau PD. Dr. Lankat-Buttgereit, Frau Dr. Anja Wimmel und Herrn PD. Dr. Buttgereit möchte ich mich für die vielen Minuten der „schnellen Hilfe und Motivation“ zwischendurch bedanken, ebenso für das schnelle und kritische Korrekturlesen dieser Dissertation.

Die finanzielle Unterstützung habe ich in erster Linie dem Evangelischen Studienwerk e.V. Villigst zu verdanken, welches mir vier Semester Förderung durch ein Promotionsstipendium zukommen ließ und so die Freiheit für die intensive Beschäftigung mit dem Thema meiner Arbeit schuf.

Mein großer Dank gilt meinen Eltern Ruth und Christian Zippert, die mich bei meinem Studium und der Promotion jederzeit unterstützt haben.

Für das Verständnis, den Erfahrungsaustausch und die moralische Unterstützung möchte ich meiner Mutter Ruth Zippert, meiner Schwester Katharina Zippert und Herrn Ulf Vogler danken.