

Aus dem Institut für Molekularbiologie und Tumorforschung
der Philipps-Universität Marburg.

Geschäftsführender Direktor: Prof. Dr. Rolf Müller

Arbeitsgruppe: Prof. Dr. Guntram Suske

Identifizierung potentieller Zielgene des Transkriptionsfaktors Sp3 *in vitro* und *in vivo*

INAUGURAL-DISSERTATION

zur

Erlangung des Doktorgrades der gesamten Medizin

dem Fachbereich Humanmedizin der Philipps-Universität Marburg

vorgelegt von

Gabriele Schmidt

geb. Eckhoff

aus Bremen

Marburg, 2004

Angenommen vom Fachbereich Humanmedizin
der Philipps-Universität Marburg am 21. Oktober 2004

Gedruckt mit Genehmigung des Fachbereichs

Dekan: Prof. Dr. med. Bernhard Maisch

Referent: Prof. Dr. Guntram Suske

Korreferent: PD Dr. Harald Rieder

INHALTSVERZEICHNIS

	Seite
1 EINLEITUNG	1
1.1 Die eukaryontische Transkription und ihre Regulation	1
1.1.1 Basale Transkriptionsfaktoren	2
1.1.2 Regulatorische Transkriptionsfaktoren	3
1.2 Aufbau von Transkriptionsfaktoren	3
1.2.1 Die DNA-Bindungsdomäne	3
1.2.2 Die Transaktivierungsdomäne	5
1.2.3 Die inhibitorische Domäne und repressorische Mechanismen	6
1.3 Die Familie der Sp-Faktoren	7
1.3.1 Der Transkriptionsfaktor Sp1	9
1.3.2 Der Transkriptionsfaktor Sp2	9
1.3.3 Der Transkriptionsfaktor Sp4	9
1.3.4 Der Transkriptionsfaktor Sp3	10
1.4 Sp-defiziente-Mäuse	12
1.4.1 Sp1-defiziente Mäuse	12
1.4.2 Sp4-defiziente Mäuse	12
1.4.3 Sp3-defiziente Mäuse	13
1.5 Fibroblastenzellen aus Mausembryonen	14
1.6 Preadipozytenfaktor-1	15
1.7 Zielsetzung der Arbeit	16
2 MATERIAL UND METHODEN	17
2.1 Sicherheitsmaßnahmen	17
2.2 Verwendete Chemikalien	17
2.3 Kommerzielle Chemikalienzusammenstellungen	19
2.4 Radioaktive Verbindungen	19
2.5 Oligonukleotide	19
2.6 Enzyme	21
2.7 Sonden für Northern und Southern Blots	21
2.8 Zelllinien	21
2.9 Standardverfahren der Molekularbiologie	22
2.10 Molekularbiologische Methoden	22
2.10.1 Arbeiten mit RNA	22

2.10.1.1 Herstellung von DEPC-H ₂ O.....	22
2.10.1.2 Isolierung von RNA aus Zellen und Geweben.....	23
2.10.1.3 Entfernen von DNA aus RNA Proben.....	25
2.10.1.4 Agarose-Formaldehyd Gelelektrophorese.....	26
2.10.1.5 Bestimmung der RNA-Konzentration.....	29
2.10.1.6 Reverse Transkriptase-Polymerase Kettenreaktion.....	30
2.10.1.7 Northern Blot Analyse.....	33
2.10.1.8 Ein Oligonukleotid gegen die 18S-RNA als Hybridisierungsprobe.....	37
2.10.2 Arbeiten mit DNA.....	39
2.10.2.1 Transformation zur Vermehrung von Plasmid-DNA.....	39
2.10.2.2 Herstellung von Mini-Lysat DNA.....	40
2.10.2.3 Schneiden eines Plasmids zur Gewinnung von DNA.....	41
2.10.2.4 Agarose Gelelektrophorese.....	41
2.10.2.5 Präparation von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen.....	43
2.10.2.6 Bestimmung der DNA-Konzentration.....	44
2.10.2.7 Radioaktive Markierung von DNA.....	44
2.10.2.8 Southern Blot Analyse.....	45
2.10.3 „Atlas cDNA Expression Array“.....	46
2.11 Zellbiologische Methoden.....	49
2.11.1 Arbeiten in der Zellkultur.....	49
2.11.1.1 Auftauen von Zellen.....	49
2.11.1.2 Passagieren von Zellen.....	49
2.11.1.3 Einfrieren von Zellen.....	50
2.11.2 Umgang mit 3T3L1-Fibroblastenzellen.....	50
2.11.2.1 Differenzierung von 3T3L1-Fibroblastenzellen zu Adipozyten.....	51
2.11.2.2 Überprüfung der Differenzierung zu Adipozyten.....	52
3 ERGEBNISSE.....	54
3.1 Vergleich der Genexpression in Sp3-defizienten und Wildtyp-Maus Fibroblastenzellen.....	54
3.1.1 Expression der GFR, Integrin β , Zyxin und Kollagenase IV mRNA in Sp3-defizienten und Wildtyp-Fibroblastenzellen.....	54
3.1.2 Identifizierung potentieller Zielgene des Transkriptionsfaktors Sp3 in Fibroblastenzellen unter Verwendung eines kommerziell erhältlichen cDNA-Arrays.....	60
3.1.2.1 Untersuchung der Expression von Ubiquitin und HSP 84 mRNA in Sp3-defizienten und Wildtyp-Fibroblastenzellen mittels RT-PCR.....	64

3.1.2.2 Kollagenase IV, Ubiquitin und STAT3 sind potentielle Zielgene des Transkriptionsfaktors Sp3	66
3.2 Pref-1, ein potentielles Zielgen von Sp3	68
3.2.1 Expression der Pref-1 mRNA in Sp3-defizienten, Sp3-heterozygoten und Wildtyp-Fibroblastenzellen	68
3.2.2 Versuch der Differenzierung von Sp3-defizienten und Wildtyp-Fibroblastenzellen zu Adipozyten	72
3.3 Vergleich der Genexpression in Sp3-defizienter und Wildtyp-Mauslunge	75
3.3.1 Expression lungenspezifischer Gene in Sp3-defizienter und Wildtyp-Mauslunge	75
3.3.2 p21-mRNA-Expression in Sp3-defizienter, Sp3-heterozygoter und Wildtyp-Mauslunge	80
4 DISKUSSION	83
4.1 Potentielle Zielgene des Transkriptionsfaktors Sp3 in Fibroblastenzellen	84
4.1.1 Nachweis von potentiellen Zielgenen in Fibroblastenzellen	84
4.1.2 Preadipozytenfaktor-1	87
4.1.3 In MEFs untersuchte Gene auf einen Blick	89
4.2 Nachweis von potentiellen Zielgenen in der embryonalen Mauslunge	89
4.2.1 In Mauslungen untersuchte Gene auf einen Blick	91
4.3 Ausblick	92
5 ZUSAMMENFASSUNG	93
6 LITERATURVERZEICHNIS	95
7 ANHANG	104
Abkürzungsverzeichnis	104
Verzeichnis der akademischen Lehrer	106
Veröffentlichungen	107
Danksagung	108

Meinen Eltern
Meinem Mann

1 EINLEITUNG

1.1 Die eukaryontische Transkription und ihre Regulation

Alle Zellen des eukaryontischen Organismus besitzen die gleiche Erbinformation in Form von DNA, die unter anderem die genetische Information für den Zusammenbau aller im Körper benötigten Proteine enthält. Da jede Zelle eine spezifische Aufgabe im Organismus übernimmt, werden auch nur die Proteine exprimiert, die zur Erfüllung dieser Aufgabe benötigt werden. Man spricht von differentieller Genexpression.

Eine Regulation der Genexpression auf dem Weg von der DNA über die RNA bis zum fertigen Protein ist an verschiedenen Stellen möglich. Unterschiedliche Ansatzpunkte sind z.B. Genamplifikation, Rekombination von Genloci, Chromatinstruktur, DNA-Methylierung, Transkription, posttranskriptionelle mRNA-Modifikationen, Translation und posttranslationale Proteinmodifikationen (Wingender, 1993). Für die vorliegende Arbeit ist die Regulation der Transkription von besonderem Interesse.

Die eukaryontische Transkription läuft mit Hilfe der folgenden drei Enzyme ab:

- 1) RNA-Polymerase I: transkribiert die Gene für drei rRNAs (28S-, 18S-, 5,8S-RNA).
- 2) RNA-Polymerase II: transkribiert die Gene, die für Proteine kodieren.
- 3) RNA-Polymerase III: transkribiert die Gene für die 5S-RNA, für tRNAs und weitere „kleine“ RNA-Arten.

Die Expression eukaryontischer Gene durch die RNA-Polymerase II wird durch Promotoren reguliert, die aus einem Core-Promotor und stromaufwärts liegenden regulatorischen Sequenzen bestehen. Der Core-Promotor enthält eine TATA-Box, ungefähr 30 bp stromaufwärts des Transkriptionsstartpunktes und/oder eine Initiatorregion direkt am Startpunkt (Mitchell und Tjian, 1989; Krajewska, 1992). Die Konsensussequenz für die TATA-Box lautet TATAa/tAat (Breathnach und Chambon, 1981), die für den Initiator YYANt/aYY, wobei Y für ein Pyrimidin und N für ein beliebiges Nukleotid steht (Smale und Baltimore, 1989). Regulatorische Sequenzen sind Enhancer und Silencer. Enhancer sind DNA-Abschnitte, die unabhängig von ihrer Lage zum Transkriptionsstartpunkt, 5' oder 3' gelegen und auch aus größeren Entfernungen, bis zu mehreren Kilobasenpaaren, die Transkription aktivieren können

(Voss *et al.*, 1986; Dynan, 1989). Solche DNA-Abschnitte, die die Transkription reprimieren, werden Silencer genannt (Baniahmad *et al.*, 1990; Brand *et al.*, 1985; Levine und Manley, 1989).

DNA-Elemente, die in Promotoren vorkommen, werden von bestimmten Transkriptionsfaktoren gebunden. Die Ausstattung einer Zelle an verschiedenen Transkriptionsfaktoren entscheidet somit über die Expression der einzelnen Gene. Die Proteine, die an solche DNA-Elemente binden, werden in zwei Gruppen eingeteilt. Man unterscheidet die basalen Transkriptionsfaktoren (Roeder, 1991; Goodrich und Tjian, 1994), die die Transkription über ihre Bindung an den Core-Promotor regulieren, von den regulatorischen Transkriptionsfaktoren (Lewin, 1990; Krajewska, 1992), die an die regulatorischen Sequenzen (Enhancer und Silencer) der DNA binden.

1.1.1 Basale Transkriptionsfaktoren

Der aus verschiedenen basalen Transkriptionsfaktoren bestehende Präinitiationskomplex (Abbildung 1.1) (Lewin, 1990; Roeder, 1991) reicht *in vitro* aus, um die Transkription zu stimulieren. Für eine Stimulation *in vivo* hingegen, werden zusätzlich die regulatorischen Transkriptionsfaktoren benötigt (Wingender, 1988).

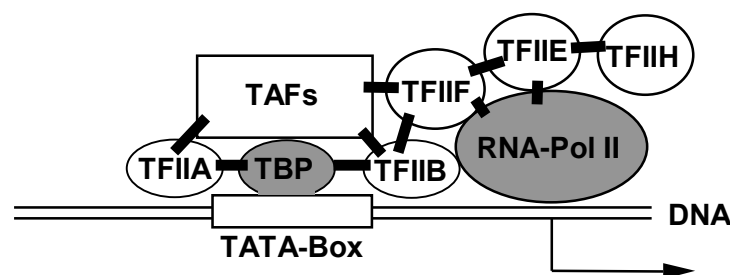


Abb. 1.1: Der basale Transkriptionskomplex (nach Roeder, 1996)

Schematische Struktur des Präinitiationskomplexes. TBP (TATA-Box binding protein), das in einem Komplex mit den TAFs (TATA-Box associated factor) vorliegt, die RNA-Polymerase II (RNA-Pol II) und die übrigen basalen Transkriptionsfaktoren sind dargestellt. Protein-Protein-Interaktionen sind durch Balken, der Transkriptionsstartpunkt ist durch einen Pfeil gekennzeichnet.

1.1.2 Regulatorische Transkriptionsfaktoren

Erst die Bindung von Transkriptionsfaktoren an die Enhancer- und Silencer-Sequenzen auf der DNA leitet die Transkriptionsinitiation *in vivo* ein. Der Mechanismus der Regulation wurde noch nicht vollständig geklärt. Für viele Transkriptionsfaktoren wurden Protein-Protein-Interaktionen mit dem Präinitiationskomplex nachgewiesen, so daß sich folgende Modelle anbieten: Einerseits könnten spezifische Transkriptionsfaktoren den Präinitiationskomplex an den Core-Promotor rekrutieren, andererseits könnten die Protein-Protein-Interaktionen zwischen den basalen und den regulatorischen Transkriptionsfaktoren zu einer Konformitätsänderung im Präinitiationskomplex führen, was die Initiation der Transkription einleiten würde (Kornberg, 1996; Roeder, 1996).

Die Wirkung vieler Transkriptionsfaktoren wird über sogenannte Cofaktoren vermittelt, die selbst nicht an die DNA binden, aber in der Lage sind zwischen Transkriptionsfaktoren und Promotor zu vermitteln. Sie können sowohl aktivierend als auch reprimierend wirken.

Die Transkriptionsfaktoren können zudem auch selber über Proteinmodifikationen reguliert werden. Wie z.B. durch Glycosylierungen (Jackson *et al.*, 1990), Phosphorylierungen (Sorger *et al.*, 1987; Jackson *et al.*, 1990) oder Acetylierungen. Diese Modifikationen sind oftmals das Ergebnis eines Signaltransduktionsweges, der durch Wachstumsfaktoren oder Hormone vermittelt wird (Karin und Hunter, 1995).

1.2 Aufbau von Transkriptionsfaktoren

Transkriptionsfaktoren vermitteln zwischen der zu transkribierenden DNA und der basalen Transkriptionsmaschinerie. Um ihrer Aufgabe gerecht zu werden, benötigen diese Proteine mindestens zwei Bindungsdomänen. Eine für die sequenzspezifische DNA-Bindung (DNA-Bindungsdomäne) und eine weitere, die die Aktivierung der Transkription zuläßt (Transaktivierungsdomäne) (Mitchell und Tjian, 1989).

1.2.1 Die DNA-Bindungsdomäne

Es werden verschiedene DNA-Bindungsdomänen unterschieden, mit Hilfe derer die Transkriptionsfaktoren in der Lage sind spezifische DNA-Sequenzen zu erkennen und zu binden.

bZIP-Motiv (basischer Leucin Zipper) (Landschulz, 1988):

Proteine, die das bZIP-Motiv tragen, kommen stets als Dimere vor. Die Dimerisierung zweier Transkriptionsfaktoren wird durch eine α -helikale Struktur erreicht, die im Abstand von je sieben Aminosäuren ein Leucin aufweist (Leucin-coiled-coil- α -Helix). Die Bindung des Proteins an die DNA erfolgt durch eine etwa 30 Aminosäuren lange basische Struktur (hohe Zahl an Lysin- und Arginin-Resten) vor der Leucin-coiled-coil- α -Helix-Struktur.

Beispiel: Homodimer Jun/Jun oder Heterodimer Fos/Jun (Fos und Jun sind Untereinheiten des Transkriptionsfaktors AP1).

bHLH-Motiv (basische Helix-Loop-Helix) (Krajewska, 1992):

Auch die Faktoren mit einer bHLH-Domäne sind aus zwei Proteinen zusammengesetzt. Sie bestehen aus zwei α -Helices, die über eine Nicht-Helix-Schleife (loop) miteinander verbunden sind. Während dieser Teil des Transkriptionsfaktors für die Dimerisierung der Untereinheiten zuständig ist, sorgt eine Sequenz basischer Aminosäuren vor dem Helix-Loop-Helix-Motiv für die Bindung an die DNA.

Beispiel: Homodimer MyoD/MyoD oder Heterodimer MyoD/E12 (Transkriptionsfaktoren für die Differenzierung von undifferenzierten Fibroblastenzellen zu Muskelzellen).

bHLH-ZIP-Motiv (basischer Helix-Loop-Helix-Leucin-Zipper):

Die bHLH-ZIP-Domäne besteht aus zwei α -helikalen Bereichen: Der 25 Aminosäuren umfassende N-terminale Bereich setzt sich aus einer basischen Region und einer α -Helix zusammen. Der C-terminale Teil, der 43 Aminosäuren umfaßt, besteht aus der zweiten α -Helix und einem Leucin-Zipper. Auch in diesem Motiv dient der Leucin-Zipper der Dimerisierung der Proteinuntereinheiten, während die basischen Bereiche der α -Helices beider Untereinheiten in der großen Furche an die DNA binden.

Beispiel: Heterodimer Myc/Max (Proteine, die unter anderem bei der Zellproliferation eine Rolle spielen).

Helix-Turn-Helix-Motiv (Krajewska, 1992):

Diese DNA-Bindungsdomäne besteht aus drei α -Helices. Helix 1 und Helix 2 verlaufen antiparallel. Die dritte Helix, die senkrecht auf den beiden anderen steht, wird als Erkennungshelix bezeichnet, da sie die DNA erkennt und in der großen Furche bindet. Weitere spezifische Bindungen mit der DNA gehen von den Aminosäuren des N-Terminus aus. Die drei Helices sind über β -Kehren (β -turns) (Kissinger, 1990) miteinander verbunden.

Beispiel: Homöodomänenproteine (wichtig für die Organisation der Körpersegmente während der Embryonalentwicklung).

Zink-Finger-Motiv (Miller *et al.*, 1985):

Transkriptionsfaktoren mit einem Zink-Finger-Motiv lassen sich durch die das Zinkion bindenden Aminosäuren in zwei Gruppen unterteilen.

Bei der ersten Gruppe (Cys₂/His₂; Miller *et al.*, 1985) wird die Zinkfingerdomäne durch die Bindung des Zinkatoms an zwei Cysteine und zwei Histidine gebildet, bei der zweiten Gruppe (Cys₂/Cys₂; Freedmann *et al.*, 1988) über die Bindung an vier Cysteine.

Vertreter des Cys₂/His₂-Typs sind z.B. die Sp-Faktoren sowie der Transkriptionsfaktor TFIIIA. Strukturell handelt es sich bei dieser DNA-Bindungsdomäne um hintereinandergeschaltete, ähnliche Sequenzen von etwa 30 Aminosäuren. Diesen Sequenzen ist gemeinsam, daß sie alle im N-terminalen Bereich zwei benachbarte Cystein-Reste tragen und im C-terminalen Bereich zwei Histidin-Reste. Diese Reste binden gemeinsam mit ihren Seitenketten ein Zinkion. Die dazwischen liegenden Abschnitte stülpen sich aus und es entstehen Zinkfinger.

Als Beispiel für den Cys₂/Cys₂-Typ sind die Steroidhormonrezeptoren zu nennen. Bei diesem Typ handelt es sich um die Folge von zwei Zinkfingern, wobei das Zinkion von vier Cystein-Resten gebunden wird. In diesem Fall kommt es zur Faltung einer kompakten Strukturdomäne. Zwei senkrecht aufeinander stehende α -Helices erkennen die DNA-Bindestelle und binden an ihre Bausteine in der großen Furche.

1.2.2 Die Transaktivierungsdomäne

Die Transaktivierungsdomäne der Transkriptionsfaktoren tritt in Wechselwirkung mit der basalen Transkriptionsmaschinerie. Dies geschieht entweder über die direkte Bindung an den Präinitiationskomplex oder indirekt mit Hilfe zwischengeschalteter Adaptoren oder Coaktivatoren (Berger *et al.*, 1990; Pugh und Tjian, 1990; Lin *et al.*, 1991). In der Literatur sind verschiedene Aktivierungsdomänen beschrieben, die nach der Art ihrer Aminosäuren benannt wurden.

So gibt es Bindestellen, die durch eine Anhäufung saurer Aminosäuren gekennzeichnet sind, wie sie beispielsweise in einem Aktivator des Herpesvirus, VP16 gefunden wurden (Sadowski *et al.*, 1988). Eine weitere Gruppe bilden die prolinreichen Domänen, die in den Faktoren Oct-2 und c-Jun (Mitchell und Tjian, 1989) vorkommen. Glutaminreiche Transaktivierungsdomänen sind charakteristisch für das Protein Sp1 (Courey und Tjian, 1988).

1.2.3 Die inhibitorische Domäne und repressorische Mechanismen

Neben der DNA-Bindungsdomäne und der Transaktivierungsdomäne besitzen manche Transkriptionsfaktoren sogenannte inhibitorische Domänen. Hierbei handelt es sich um Aminosäureabschnitte, die in der Lage sind die Transkription zu reprimieren. Diese Transkriptionsfaktoren werden als Repressoren bezeichnet. Mit Hilfe der inhibitorischen Domäne können Gene schnell abgeschaltet werden. Dies geschieht entweder über direkte Bindung des Repressors an die DNA oder über zwischengeschaltete Elemente, die als Corepressoren bezeichnet werden.

Es können drei Mechanismen der Repression unterschieden werden (Hanna-Rose und Hansen, 1996; Johnson, 1995):

1) **Kompetition mit einem Transaktivator um dieselbe DNA Bindungsstelle**

Bei diesem Mechanismus haben ein aktiver und ein inaktiver Transkriptionsfaktor dieselbe DNA-Bindungsstelle. Bindet der inaktive Faktor, so kann der aktive keine Wechselwirkung mit der DNA eingehen und die Transkription kann nicht ablaufen. Ein Beispiel hierfür ist die Bindung des Homodimers Max/Max an die DNA. Dieses Protein besitzt keine Transaktivierungsdomäne, besetzt aber die DNA-Sequenz, an die auch das aktivierende Heterodimer Myc/Max binden würde.

2) **Interaktion mit einem Transaktivator**

Als Beispiel sollen der Glucocorticoidrezeptor und der Transkriptionsfaktor AP1 dienen. Beide Faktoren wirken im allgemeinen aktivierend. Durch eine Interaktion des Hormonrezeptors mit AP1, kommt es, bei gleichzeitiger Bindung an den Promotor, zu einer Maskierung der AP1-Aktivierungsdomäne.

Der Glucocorticoidrezeptor und AP1 können sowohl als Aktivatoren als auch als Repressoren agieren. Eine Eigenschaft, die viele Transkriptionsfaktoren auszeichnet.

3) **Interaktion mit der basalen Transkriptionsmaschinerie**

Dieser als aktive Repression bezeichnete Mechanismus beruht auf einer Interaktion des Transkriptionsfaktors mit der basalen Transkriptionsmaschinerie. Dabei inhibiert der Repressor spezifisch bestimmte Transaktivierungswege.

Beispielhaft kann der *Drosophila*-Transkriptionsfaktor *Krüppel* angeführt werden, der als Dimer mit einer Untereinheit von TFIIE interagiert und die Transkription reprimiert, während monomeres *Krüppel* über eine Interaktion mit TFIIIB die Transkription aktiviert (Sauer *et al.*, 1995).

Weiterhin kennt man spezifische Domänen in Transkriptionsfaktoren, die die Repression vermitteln können.

So gibt es alaninreiche Abschnitte, wie z.B. im N-terminalen Bereich von *Krüppel*, prolinreiche Domänen oder eine Gruppe, die viele geladene Aminosäuren enthält, wie die KRAB-Domäne (*Krüppel-associated box*) eines *Krüppel*-verwandten Zinkfingerproteins (Bellefroid *et al.*, 1991; Margolin *et al.*, 1994). Abschließend sind als Beispiele der Thyroidhormon- und der Retinsäurerezeptor zu nennen, deren inhibitorische Domänen vornehmlich hydrophob, zum Teil aber auch hydrophil sind (Banahmed *et al.*, 1992).

1.3 Die Familie der Sp-Faktoren

Die vorliegende Arbeit beschäftigt sich mit dem Transkriptionsfaktor Sp3 (benannt nach dem Schema der Aufreinigung über eine Sephacryl- und eine Phosphocellulose-Säule; in der Literatur auch: Specificity protein). Dieses Protein ist ein Mitglied der Familie der Sp-Faktoren, zu denen neben Sp3 noch Sp1, Sp2 und Sp4 zählen (Hagen *et al.*, 1992; Kingsley und Winoto, 1992; Suske, 1999). Die Proteine dieser Familie zeigen große Homologien in ihren Struktureigenschaften (Abbildung 1.2).

Alle vier Faktoren tragen am C-terminalen Abschnitt ihre DNA-Bindungsdomäne, bestehend aus drei Zinkfinger-Motiven vom Cys₂/His₂-Typ, denen einige geladene Aminosäuren vorausgehen. Diese Region ist hochkonserviert. Die Transkriptionsfaktoren Sp1, Sp3 und Sp4 zeigen hier bis zu 90% identische Aminosäuren, Sp2 nur ca. 70%. N-terminal liegen zwei glutaminreiche Regionen, A und B, denen serin-/threoninreiche Abschnitte vorgeschaltet sind. Die Ausnahme bilden Sp2 und Sp3. Sp2 enthält nur eine glutaminreiche Region und die Struktur von Sp3 weist vor der ersten glutaminreichen Region keine serin-/threoninreichen Abschnitte auf (Abbildung 1.2). Der Bereich zwischen den Zinkfingern und dem glutaminreichen Abschnitt wird als Region C bezeichnet, der am C-Terminus gelegene Bereich als Region D.

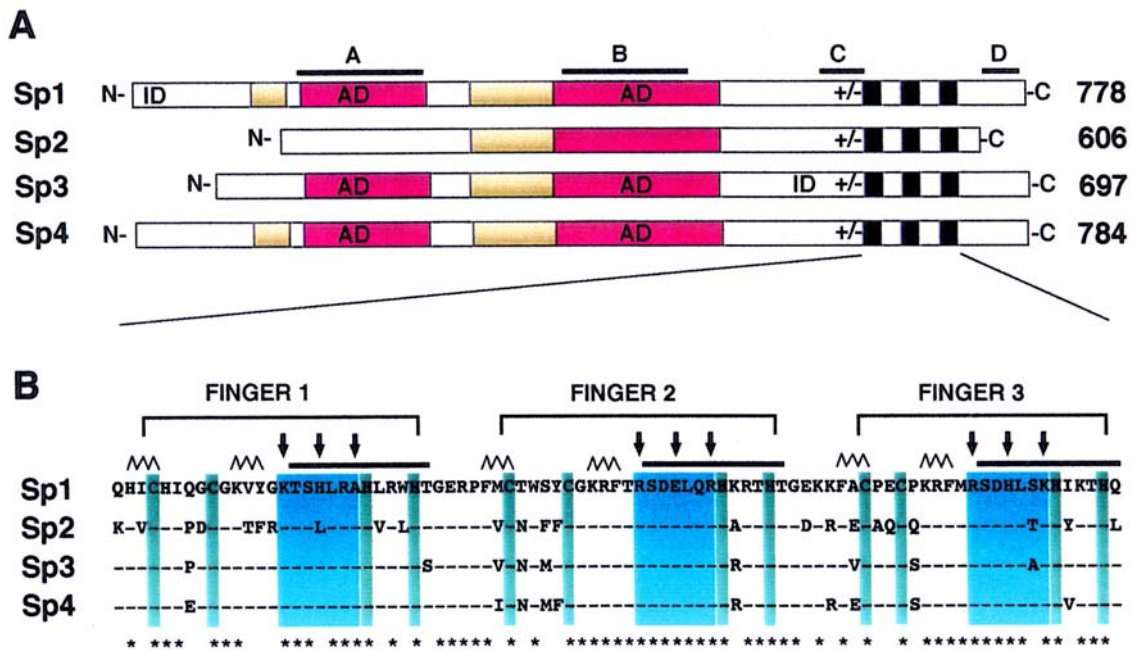


Abb. 1.2 A und B: Struktur der Transkriptionsfaktoren Sp1, Sp2, Sp3 und Sp4 (nach Suske, 1999)

A: Schematische Darstellung der vier Mitglieder der Familie der Sp-Faktoren.

Auf der rechten Seite ist die Länge der einzelnen Faktoren in Aminosäuren angegeben. Von dem Transkriptionsfaktor Sp3 ist die lange Form nach Kingsley und Winoto (1992) dargestellt. Die farbigen Regionen kennzeichnen die Proteinabschnitte, die reich an Glutamin (rot) und Serin/Threonin (gelb) sind. Der Bereich des ersten Zinkfingers (+/-) ist reich an geladenen Aminosäuren. Die schwarzen Balken kennzeichnen die Zinkfinger.

Die Linien über der Darstellung von Sp1 zeigen die Länge der vier Regionen (A, B, C und D), die zu den transkriptionellen Eigenschaften von Sp1 beitragen (Courey und Tjian, 1988). Des weiteren sind bekannte Aktivierungsdomänen (AD) und inhibitorische Domänen (ID) dargestellt.

B: Proteinsequenz der Zink-Finger-Domänen.

Die Sterne unter den Sequenzen zeigen die Sequenzidentität auf. Die Cysteine und Histidine, die Zinkionen binden, sind grün unterlegt, während die Regionen, die an die DNA binden, blau unterlegt sind. Die Pfeile deuten auf die Aminosäuren, die für die spezifische Erkennung bestimmter Basen der DNA zuständig sind (nach Pavletich und Pabo, 1991; Fairall *et al.*, 1993). Die schwarzen Linien und die Zick-Zack-Linien kennzeichnen α -Helices und β -Faltblatt-Strukturen.

Den einzelnen Abschnitten können bestimmte Funktionen zugeordnet werden: Die Regionen A und B bilden Transaktivierungsdomänen (Courey und Tjian, 1988; Kadonaga *et al.*, 1988), wobei für Sp1 nachgewiesen werden konnte, daß die hydrophoben Aminosäuren in der glutaminreichen Region für die Aktivierung zuständig sind (Gill *et al.*, 1994). In der Region C wurden für Sp1 ebenfalls schwache Transaktivierungseigenschaften nachgewiesen (Courey und Tjian, 1988). Die Region D scheint für die synergistische Wirkung von Sp1 von Bedeutung zu sein (Pascal und Tjian, 1991).

Die Konsensussequenz für die DNA-Bindungsdomäne lautet (Briggs *et al.*, 1986):

5'-G/TG/AGGCGG/TG/AG/AC/T-3'

Diese Sequenz wird als **GC-Box** bezeichnet. Die Sp-Faktoren binden, mit Ausnahme von Sp2, an diese DNA-Bindungsdomäne. Sp2 bindet auf Grund einer Strukturveränderung im ersten Zinkfinger nicht an die GC-Box, sondern an ein GT-reiches Element im T-Zell-Antigen-Rezeptor α (Kingsley und Winoto, 1992). GC- und GT-Boxen finden sich in vielen Promotoren. Die Sp-Faktoren sind hiermit von großer Bedeutung für das Verständnis der Transkriptionsregulation.

1.3.1 Der Transkriptionsfaktor Sp1

Sp1 war der zuerst identifizierte GC-Box-bindende Transkriptionsfaktor. Er wurde 1987 kloniert und aus HeLa-Zellen isoliert (Kadonaga *et al.*, 1987). Das humane Sp1-Gen ist auf dem Chromosom 12q13 lokalisiert (Matera und Ward, 1993). Die Expression von Sp1 ist ubiquitär. Es konnte gezeigt werden, daß dieser Faktor an die GC-Box des viralen SV40 Promotors bindet und dort die Transkription aktiviert.

Darüber hinaus wurde für den Transkriptionsfaktor am N-terminalen Ende eine inhibitorische Domäne beschrieben (Murata *et al.*, 1994).

Sp1 kann sowohl glycosyliert (Jackson und Tjian, 1988) als auch phosphoryliert (Jackson *et al.*, 1990) sein. Diese posttranslationalen Proteinmodifikationen verändern die Bindungseigenschaften des Transkriptionsfaktors.

1.3.2 Der Transkriptionsfaktor Sp2

Das Gen für Sp2 liegt auf dem Chromosom 17q21.3-q22 (Schohy *et al.*, 1998). Über die Funktion des Proteins ist bisher wenig bekannt. Die Existenz einer potentiellen glutaminreichen Transaktivierungsdomäne kann auf eine Funktion als Aktivator schließen lassen. Ein mögliches Zielgen könnte der T-Zell-Antigen-Rezeptor α (TCR α = T-cell antigen receptor) darstellen, da sich Sp2 *in vitro* an die GT-Box des TCR α -Promotors bindet (Kingsley und Winoto, 1992).

1.3.3 Der Transkriptionsfaktor Sp4

Sp4 unterscheidet sich in seinem Expressionsmuster von Sp1 und Sp3. Während Sp1 und Sp3 ubiquitär exprimiert werden, beschränkt sich die Expression von Sp4 vorwiegend auf neuronale Zellen des Gehirns (Hagen *et al.*, 1992; Supp *et al.*, 1996),

auf epitheliales Gewebe, auf Zähne und Hoden während der Entwicklung (Philipsen *et al.*, 1999) sowie auf das gesamte Mauserz (persönliche Mitteilung Peter Bouwmann). Das Gen für diesen Transkriptionsfaktor ist auf dem Chromosom 7q21.3-q22 lokalisiert (Kalff-Suske *et al.*, 1995). Seine Transaktivierungsdomäne besteht wie auch bei Sp1 aus den N-terminal gelegenen glutaminreichen Regionen. Allerdings zeigt Sp4 andere funktionelle Eigenschaften als Sp1 und Sp3 und weist im Gegensatz zu Sp1 keinen Synergismus auf.

1.3.4 Der Transkriptionsfaktor Sp3

Ein weiteres Mitglied der Sp-Faktoren Familie ist Sp3. Das menschliche Gen für diesen Transkriptionsfaktor liegt auf dem Chromosom 2q21 (Kalff-Suske *et al.*, 1996). Sp3 wird ubiquitär exprimiert (Hagen *et al.*, 1992).

Im Immunoblot sind drei Formen des Transkriptionsfaktors nachweisbar. Sie haben Molekulargewichte von 97 kDa, 60 kDa und 58 kDa (Hagen *et al.*, 1994). Das Leseraster der cDNA des 97 kDa Proteins ist zum 5'-Ende hin offen. Ein Fehlen der 5' nichttranslatierten Sequenzen kann ausgeschlossen werden, da eine *in vitro* Translation der mRNA der 97 kDa Form von Sp3 ein Translationsprodukt von ungefähr 100 kDa hervorbringt (Kingsley und Winoto, 1992). Es ist daher anzunehmen, daß der das Protein kodierende Anteil der cDNA vollständig ist und ein anderes Startcodon besitzt als das übliche ATG-Triplett. Möglicherweise wird dieses andere Triplett von der an der Position 134 der cDNA gelegenen Basensequenz ATT gebildet (Kingsley und Winoto, 1992). Die beiden kurzen Sp3-Formen beginnen mit den zwei ersten AUG-Codons (Kennett *et al.*, 1997).

Sp3 agiert sowohl als transkriptioneller Aktivator (Liang *et al.*, 1996; Zhao und Chang, 1997) als auch als Repressor (Majello *et al.*, 1994; Hagen *et al.*, 1994; Dennig *et al.*, 1996).

Als Transaktivierungsdomänen fungieren, wie bei Sp1, die beiden N-terminal gelegenen glutaminreichen Regionen. Als weitere funktionelle Domäne existiert ein 79 Aminosäuren langer Abschnitt zwischen den beiden Aktivierungsdomänen und den Zinkfingern, der weder für Sp1 noch für Sp4 nachgewiesen werden konnte (Abbildung 1.3). Dieser Bereich stellt die inhibitorische Domäne dar und ist in der Lage die Transaktivierung durch die beiden glutaminreichen Aktivierungsdomänen zu reprimieren. Für die Funktion der inhibitorischen Domäne ist eine 13 Aminosäurenreste lange, stark geladene Sequenz von großer Bedeutung, insbesondere eine Aminosäure: das Lysin (persönliche Mitteilung Harald Braun). Über die Mechanismen der

Wirkungsweise der inhibitorischen Domäne ist wenig bekannt. Ihre volle Wirkung entfaltet sie allerdings nur bei Promotoren mit mehreren Bindungsstellen. Besitzt der Promotor nur eine Bindungsstelle für Sp3, so wird die Aktivierung durch den Transkriptionsfaktor nur sehr schwach inhibiert. Sp3 aktiviert daher Promotoren mit nur einer Bindungsstelle vergleichbar stark wie Sp1.

Bei gleichzeitiger Expression von Sp1 und Sp3 konkurrieren beide Faktoren um dieselbe Bindungsstelle, wodurch die von Sp1 vermittelte Aktivierung stark gemindert wird (Dennig *et al.*, 1996).

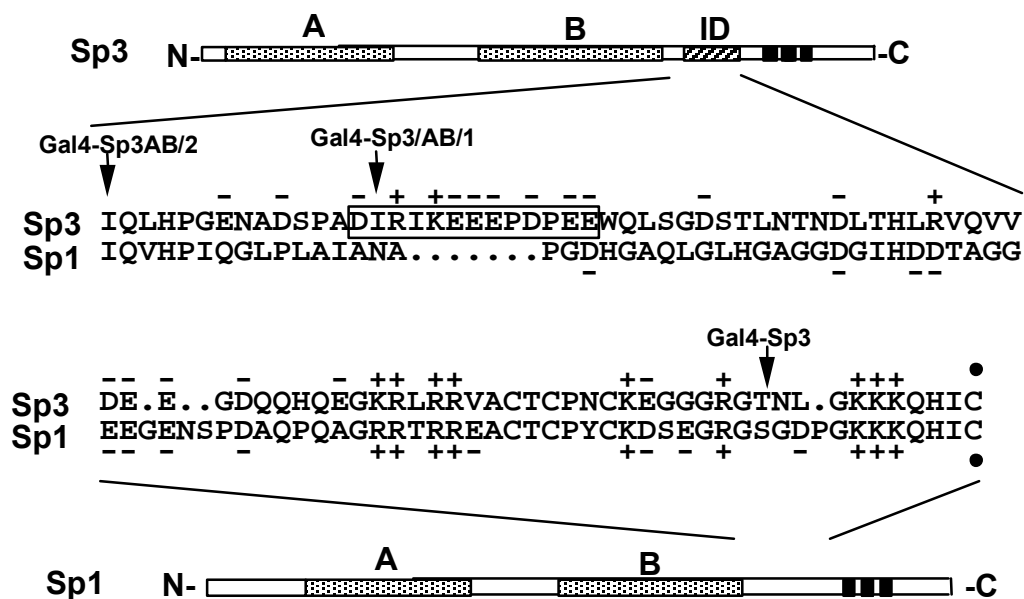


Abb. 1.3: Die inhibitorische Domäne von Sp3

Die Abbildung zeigt einen Vergleich der Aminosäuren 405 bis 484 von Sp3 mit den Aminosäuren 540 bis 627 von Sp1. In beiden Proteinen entspricht dieser Bereich der Region zwischen der glutaminreichen Domäne B und dem ersten Cystein des ersten Zinkfingers. Der Abschnitt der Sp3-Sequenz, der aus 13 vornehmlich geladenen Aminosäuren besteht, ist eingerahmt. Ein Punkt markiert das erste Cystein der Zinkfinger der DNA-Bindungsdomänen von Sp1 und Sp3.

1.4 Sp-defiziente Mäuse

Mäuse, bei denen ein bestimmtes Gen ausgeschaltet wurde, werden als Knockout-Mäuse bezeichnet. Diese Tiere werden durch Injektion von genetisch veränderten embryonalen Stammzellen in Blastozysten und anschließender Implantation in eine scheinchwangere Maus hergestellt.

1.4.1 Sp1-defiziente Mäuse

Sp1-knockout Mäuse (Marin *et al.*, 1997) zeigen eine verlangsamte Embryonalentwicklung und sterben spätestens am Tag 11 nach der Befruchtung. Bisher wurden nur zwei Gene entdeckt, die *in vivo* in Sp1-defizienten Tieren im Vergleich zum Wildtyp unterschiedlich exprimiert werden und den Phänotyp der Mäuse erklären könnten. Die Expression des Haushaltsgens Thymidinkinase ist in Sp1-defizienten Tieren schwach, die Expression des Methyl-CpG bindenden Proteins MeCP2 stark verringert (Marin *et al.*, 1997). MeCP2 ist vermutlich für die Aufrechterhaltung der Differenzierung in Zellen nötig. Es wird daher angenommen, daß Sp1 durch die Regulation der MeCP2-Expression bei der Regulation der Zelldifferenzierung eine Rolle spielt (Marin *et al.*, 1997).

1.4.2 Sp4-defiziente Mäuse

Für Sp4-knockout Mäuse konnte kein einheitlicher Phänotyp beobachtet werden. Zwei Drittel der homozygoten Tiere sterben kurz nach der Geburt. Ein Drittel überlebt. Diese Mäuse sind allerdings wesentlich kleiner und leichter als der entsprechende Wildtyp (persönliche Mitteilung Prof. Dr. Guntram Suske) und zeigen kein normales Reproduktionsverhalten (Supp *et al.*, 1996), obwohl die Reproduktionsorgane (Philipsen *et al.*, 1999) sowie Riechorgane und Hypothalamus (Supp *et al.*, 1996), die ebenfalls eine Rolle bei dem Fortpflanzungsverhalten spielen, voll ausgebildet sind.

1.4.3 Sp3-defiziente Mäuse

Das Sp3 Knockout-Konstrukt wurde in den Labors von Prof. Dr. Guntram Suske am Institut für Molekularbiologie und Tumorforschung der Philipps-Universität Marburg hergestellt. Das verwendete Knockout-Konstrukt ist promotorlos. Das für die zwei Aktivierungsdomänen kodierende Exon wurde durch ein IRES-lacZ-neo-Fusionsgen ausgetauscht (Abbildung 1.4). Die Expression von Sp3 ist nicht mehr möglich.

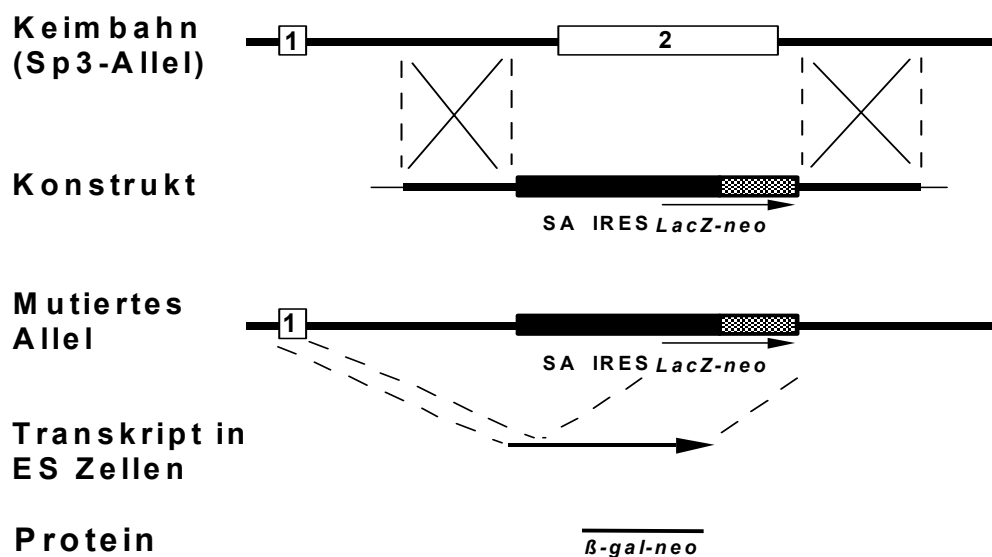


Abb. 1.4: Knockout-Strategie für das Sp3-Gen in der Maus

Im Sp3 Knockout-Konstrukt ist Exon 2 (trägt die Sequenzabschnitte für die glutaminreichen Aktivierungsdomänen) des Sp3-Gens durch ein β -Galaktosidase-Neomycin-Fusionsgen (LacZ-neo) ersetzt. Um die Expression des LacZ-neo-Gens durch den Sp3-Promotor zu gewährleisten, wurde zusätzlich eine Interne Ribosomen Eintrittsstelle (IRES) und eine Spleißakzeptor-Stelle (SA) eingebracht. Durch die Spleißakzeptor-Stelle wird eine mRNA mit dem LacZ-neo Transkript gebildet. Die Interne Ribosomen Eintrittsstelle ermöglicht die Translation der LacZ-neo mRNA. In der Abbildung sind außerdem das entstehende Transkript und Protein gezeigt.

Die Sp3-defizienten Tiere sterben innerhalb von 30 Minuten nach der Geburt. Sie sind in der Embryonalentwicklung gegenüber den Wildtyp-Tieren zurückgeblieben und deutlich kleiner (Abbildung 1.5). Es gibt Hinweise auf eine Retardierung einzelner Organe, wie z.B. der Zähne. In histologischen Schnitten konnte gezeigt werden, daß die Zahnentwicklung in Sp3-defizienten Mäusen nicht so weit fortgeschritten ist wie bei den vergleichbaren Wildtyp-Tieren. Bei neugeborenen Mäusen konnte eine Atembewegung beobachtet werden, die jedoch nicht dazu führte, daß die Lungen der Tiere ventiliert wurden. Bei histologischen Untersuchungen konnte in der Lunge von

Wildtyp-Mäusen ein weites Alveolarlumen beobachtet werden, während das Lumen in Lungen von Sp3-defizienten Mäusen eng war und das Septum zwischen den Alveolen verdickt erschien (persönliche Mitteilung Prof. Dr. G. Suske und Heike Göllner).

Es kann noch nicht sicher gesagt werden, ob es sich bei der Entwicklung der Sp3-defizienten Mäuse um eine Retardierung oder um einen echten Entwicklungsdefekt handelt.

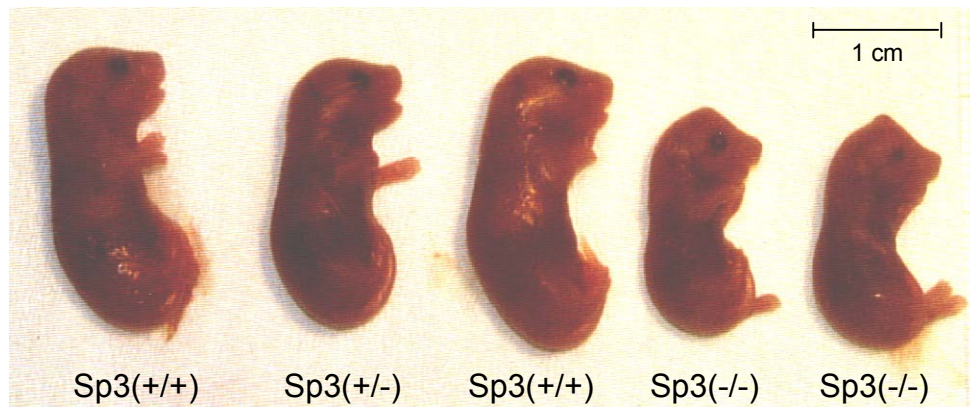


Abb. 1.5: Vergleich von Sp3-defizienten, Sp3-heterozygoten und Wildtyp-Maus-Embryonen (Tag E 18.5).

1.5 Fibroblastenzellen aus Mausembryonen (mouse embryonic fibroblasts = MEFs)

Für die Arbeit in der Zellkultur wurde ein Zellkultursystem verwendet, das im Rahmen der Diplomarbeit von Heike Göllner am Institut für Molekularbiologie und Tumorforschung der Philipps-Universität Marburg etabliert worden war. Hierbei handelt es sich um Fibroblastenzellen aus Mausembryonen (MEFs). Diese Zellen sind leicht in Kultur zu halten und weisen einen einheitlichen Differenzierungsgrad auf.

Die Fibroblastenzellen wurden aus Sp3-defizienten, Sp3-heterozygoten und Wildtyp-Mausembryonen (Tag E13.5) isoliert und über längere Zeit kultiviert. Es wurde davon ausgegangen, daß die Zellen nach über vier Monaten stetigen Wachstums immortalisiert waren. Das bedeutet, daß diese Zellen Mutationen entwickelt haben, die es ihnen ermöglichen, den Vorgang der Apoptose zu umgehen. Hiermit stand für die vorliegende Arbeit ein Zellkultursystem zur Verfügung, welches einfach und stabil zu handhaben ist.

1.6 Preadipozytenfaktor-1 (Pref-1)

Preadipozytenfaktor-1 (Pref-1) ist auf Grund seiner großen Ähnlichkeit zum Drosophila-Protein Delta auch unter dem Namen Delta-ähnliches Protein (dlk = delta-like protein) bekannt (Laborda *et al.*, 1993). Dieses 7,3 kb lange Transmembranprotein enthält fünf Exons und vier Introns und besteht aus 383 Aminosäuren (Smas *et al.*, 1994). Es gehört zur Familie der EGF-ähnlichen Proteine (EGF = epidermal growth factor = Epidermale Wachstumsfaktoren) und trägt sechs EGF-ähnliche Wiederholungen (Smas *et al.*, 1993). Die mRNA von Pref-1 ist ab dem Tag E8.5 bis zum Tag E18.5 in Mausembryonen in verschiedenen Geweben nachweisbar. So z.B. in der Hirnanhangsdrüse, in mesenchymalen Regionen der Wirbel, in der Zunge, der Lunge und der Leber (Smas *et al.*, 1993). Im adulten Gewebe ist Pref-1 mittels Northern Blot Analyse nur in der Nebenniere nachweisbar, nicht aber im Fett, Darm, Magen, Gehirn, Muskel, Herz, Hoden, in der Niere, der Lunge, der Milz und der Leber (Smas *et al.*, 1996).

In 3T3L1-Preadipozyten ist Pref-1 reichlich vorhanden, während es in Adipozyten völlig fehlt. Eine kontinuierliche Expression des Proteins oder seine Zugabe *in vitro* verhindert die Adipogenese. Es konnte festgestellt werden, daß Pref-1 in der Lage ist die Expression von C/EBP α (CCAAT-enhancer binding protein α) und PPAR γ (peroxisome proliferator activated receptor γ), zwei für die Adipozytendifferenzierung wichtige Proteine, zu unterdrücken (Smas *et al.*, 1999).

In Sp3-defizienten differenzierten embryonalen Stammzellen wird Pref-1 deutlich stärker exprimiert als in Wildtyp differenzierten embryonalen Stammzellen (Diplomarbeit Heike Göllner 08/98) und kann deshalb als potentielles Zielgen von Sp3 bezeichnet werden.

1.7 Zielsetzung der Arbeit

Ziel der Arbeit war es, die Expression verschiedener Gene in Sp3-defizienten und Wildtyp-Mäusen zu untersuchen, um potentielle Zielgene des Transkriptionsfaktors Sp3 beschreiben zu können.

Der Phänotyp der Sp3-defizienten Mäuse deutet auf Veränderungen in der Lunge hin. Auf Grund dieser Beobachtung sollte die Expression von Lungenproteinen *in vivo* in Sp3(-/-)-Mäusen mit der in Sp3(+/+)-Mäusen verglichen werden, um mögliche Erklärungen für den beschriebenen Phänotyp (Abschnitt 1.4.3) zu erhalten.

In einem Versuch mit Sp3-defizienten und Wildtyp-embryonalen Maus-Stammzellen konnte ein potentielles Zielgen von Sp3 identifiziert werden: Preadipozytenfaktor-1 (Pref-1). Im Rahmen dieser Arbeit sollte überprüft werden, ob die Expression der Pref-1 mRNA in einem weiteren Zellsystem, in Maus-Fibroblastenzellen, auch von der Anwesenheit des Transkriptionsfaktors Sp3 abhängig ist.

Pref-1 spielt eine Rolle bei der Adipozytendifferenzierung. Es sollte deshalb getestet werden, ob sich Sp3-defiziente und Wildtyp-Fibroblastenzellen gleichermaßen zu Adipozyten differenzieren lassen.

2 MATERIAL UND METHODEN

2.1 Sicherheitsmaßnahmen

Die gentechnischen Arbeiten erfolgten nach den Richtlinien des Gentechnikgesetzes vom 10.07.1990. Biologisch kontaminierte Materialien und Lösungen wurden getrennt gesammelt und autoklaviert. Arbeiten mit radioaktiven Substanzen und deren Entsorgung erfolgten entsprechend der Strahlenschutzverordnung.

2.2 Verwendete Chemikalien

Agarose zur DNA-Gelelektrophorese	Roth, Karlsruhe
Ammoniumacetat	Merck, Darmstadt
Borsäure	Merck, Darmstadt
Bovine Serum Albumin (BSA)	Sigma, München
Bromphenolblau	Merck, Darmstadt
Chloroform	Merck, Darmstadt
Desoxyribonuclease I Puffer (DNase I Puffer)	Gibco, Karlsruhe
Dexamethason	Schering, Berlin
Diethylpyrocarbonat (DEPC)	Sigma, München
DMEM Glutamax	Gibco, Karlsruhe
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Sigma, München
Ethanol	Riedl-de Haën, Seelze
Ethidiumbromid	Roth, Karlsruhe
Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA)	Roth, Karlsruhe
Ficoll Typ 400	Pharmacia Biotech, Camebridge
Formaldehyd	Merck, Darmstadt
Formamid	Merck, Darmstadt

Fötale Kälberserum (FCS)	Gibco, Karlsruhe
Glucose	Sigma, München
Glycerin	Merck, Darmstadt
HAM's F10	Gibco, Karlsruhe
HAM's F12	Gibco, Karlsruhe
Hämalaun	Merck, Darmstadt
Heringsperma-DNA (HSP)	Boehringer, Mannheim
Hydroxyquinolin	Sigma, München
3-Isobutyl-1-Methylxanthin (IBMX)	Sigma, München
Insulin	Gibco, Karlsruhe
Isopropanol	Merck, Darmstadt
Kaliumchlorid (KCl)	Merck, Darmstadt
Kaliumdihydrogenphosphat (KH_2PO_4)	Merck, Darmstadt
Magnesium (Mg (II))	Merck, Darmstadt
Magnesiumchlorid (Mg_2Cl)	Roth, Karlsruhe
Morpholinopropanesulfonic acid (MOPS)	Sigma, München
Natriumacetat (NaAc)	Riedl-de Haën, Seelze
Natriumchlorid (NaCl)	Merck, Darmstadt
Natriumcitrat (NaCitrat)	Merck, Darmstadt
Natriumdihydrogenphosphat ($\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$)	Merck, Darmstadt
Natriumdodecylsulfat (SDS)	Serva, Heidelberg
Natriumphosphat (NaPO_4)	Merck, Darmstadt
Natronlauge (NaOH)	Merck, Darmstadt
Öl-Rot-O	Sigma, München
Penicillin/ Streptomycin (100fach)	Gibco, Karlsruhe
Peptone	Gibco, Karlsruhe
Phenol, gesättigt	Sigma, München
Polyvenylpyrrolidon	Merck, Darmstadt

β-Mercaptoethanol	Sigma, München
Tris/HCl	Merck, Darmstadt
Xylen Cyanol	Sigma, München
Yeast	Gibco, Karlsruhe

2.3 Kommerzielle Chemikalienzusammenstellungen

- „Access RT-PCR System Kit“ (Promega, Madison)
- „Atlas™ Pure Total RNA Isolation Kit“ (Clontech, Heidelberg)
- „Megaprime DNA labelling system“ (Amersham, Braunschweig)
- „Nucleobond® AX“ (Macherey-Nagel, Düren)
- „RNeasy Mini Kit“ (Qiagen, Hilden)
- „QIAquick Gel Extraktion Kit“ (Qiagen, Hilden)
- „T4 Polynukleotidkinase“ (10 u/μl) (Gibco, Karlsruhe)

2.4 Radioaktive Verbindungen

[α- ³² P] dCTP (3000 Ci/mmol)	Amersham, Braunschweig
[α- ³² P] dATP (3000 Ci/mmol)	Amersham, Braunschweig
[γ- ³² P] dATP (5000 Ci/mmol)	Amersham, Braunschweig

2.5 Oligonukleotide

Alle in dieser Arbeit verwendeten Oligonukleotide sind einzelsträngige DNA-Sequenzen und wurden vom Labor Dr. M. Krause (Marburg) synthetisiert.

Oligonukleotid gegen die 18S-RNA:

5'-ACGGTATCTGATCGTCTTCGAACC-3'

Primer für Kontrollgene:

HPRT I	5'-CACAGGACTAGAACACCTGC-3' und
HPRT II	5'-GCTGGTGAAAAGGACCTCT-3'

Primer für Sp3 regulierte Gene:

Pref-1 I	5'-ACAGCACCTATGGGGCTGAAT-3' und
Pref-1 II	5'-TGGCAGTCCTTTCCAGAGAA-3'
Elastin I	5'-GTGTTGGTCTTCCAGGTGTA-3' und
Elastin II	5'-ACTCCATAGGGCAATTTCCC-3'
GFR I	5'-TCGGGTCGAGCTTTCTTGTA-3' und
GFR II	5'-TATCACTGCACAGCAAACCC-3'
HSP 84 I	5'-TGGTTGTGATCACGAAGCAC-3' und
HSP 84 II	5'-CTTCCTCTGCCTCATCATCA-3'
Integrin β I	5'-TTGGGAGGCACTGTGAATGT-3' und
Integrin β II	5'-CACTGCCAGTGTAATTGGGA-3'
Kollagenase IV I	5'-TCACTTTCCTGGGCAACAAG-3' und
Kollagenase IV II	5'-CTGGATCCCCTTGATGTCAT-3'
p21 I	5'-TGTCCAATCCTGGTGATGTC-3' und
p21 II	5'-AGAGGAAGTACTGGGCCTCTT-3'
Ubiquitin I	5'-ATCTTCGTGAAGACCCTGAC-3' und
Ubiquitin II	5'-CTTCACGAAGATCTGCATGC-3'
Surfactant Protein D I	5'-AAAGGAGAGAATGGCTCTGC-3' und
Surfactant Protein D II	5'-TGTAGATCCTTGCATGCCAG-3'
Zyxin I	5'-CCCCCGGAAGACTTTCCTTT-3' und
Zyxin II	5'-TGAAGGGATCGTTCTTGGTC-3'

Die Oligonukleotide wurden nach der Phosphatdiester Methode (Letsinger *et al.*, 1976) mit einem Applied Biosystems-DNA-Synthesizer 380 A im Labor von Dr. M. Krause (Marburg) synthetisiert. Nach Abspaltung der N-Acyl- und Tritylschutzgruppen lagen sie in konzentrierter Ammoniaklösung vor (32%). Nachdem die Oligonukleotide lyophilisiert worden waren, wurden sie in 200 μ l 10/1 TE Puffer (pH 8,0) gelöst. Die DNA wurde durch Zugabe von 20 μ l 1 M NaCl und 500 μ l Ethanol präzipitiert, 30 Minuten bei 13.000 UpM zentrifugiert, der Überstand verworfen, die DNA zweimal mit 700 μ l 70% Ethanol gewaschen, getrocknet und in 200 μ l 10/1 TE Puffer (pH 8,0) gelöst. Die Konzentration der DNA wurde anschließend photometrisch bestimmt.

Material:

- 10/1 TE Puffer

	<u>Endkonzentration</u>	<u>100 ml</u>
1 M Tris/ HCl, pH 8,0 (Merck, Darmstadt)	10 mM	1 ml
0,5 M EDTA (Roth, Karlsruhe)	1 mM	200 µl
Mit H ₂ O auf 100 ml auffüllen.		

- Natriumchlorid (Merck, Darmstadt)
- Ethanol (Riedl-de Haën, Seelze)

2.6 Enzyme

DNase I (Gibco, Karlsruhe)

Hind III (10 u/µl) (Boehringer, Mannheim)

Eco RI (10 u/µl) (Boehringer, Mannheim)

Xho I (10 u/µl) (Boehringer, Mannheim)

RNase A (50 u/mg) (Boehringer, Mannheim)

T4-Kinase (Gibco, Karlsruhe)

2.7 Sonden für Northern und Southern Blots

Maus SPC: 793 bp mit Eco RI/Eco RI aus PBS-KS II (SP-C) geschnitten

Maus SPB: 1550 bp mit Eco RI/Xho I aus PBS-SK II (SP-B) geschnitten

Maus SPA: 1351 bp mit Hind III/Hind III aus PGEM 3Z (SP-A) geschnitten

LKLF: 1551 bp mit Bam HI/Eco RI aus pPac (LKLF) geschnitten

TTF-1: 1400 bp mit Bam HI/Eco RI aus pPac (TTF-1) geschnitten

Human p21 (WAF1): ~2100 bp mit Xho I/Hind III aus pX WAF1 geschnitten

2.8 Zelllinien

Wildtyp-Mausfibroblasten aus Mausembryonen Tag E13.5*

Sp3-defiziente Mausfibroblasten aus Mausembryonen Tag E13.5*

Sp3-heterozygote Mausfibroblasten aus Mausembryonen Tag E13.5*

3T3L1-Zellen (American Type Culture Collection) (Bezogen von Dirk Eick, München)

* Herstellung der Fibroblastenzelllinien aus Mausembryonen siehe Diplomarbeit von Heike Göllner (Marburg 08/98).

2.9 Standardverfahren der Molekularbiologie

Verwendete Puffer, Medien und Lösungen wurden mit bidestilliertem Wasser angesetzt und vor Gebrauch autoklaviert oder steril filtriert. Ihre Zusammensetzung kann, sofern nicht anders angegeben, den Methodenbüchern „Molecular Cloning, A Laboratory Manual“ (Sambrook *et al.*, 1989), bzw. „Current Protocols in Molecular Biology“ (Ausubel *et al.*, 1987) entnommen werden.

2.10 Molekularbiologische Methoden

2.10.1 Arbeiten mit RNA

RNA kann durch Ribonukleasen (RNasen) abgebaut werden. Diese Enzyme sind besonders stabil und aktiv. Sie zu deaktivieren fordert extreme Bedingungen, wie z.B. die Behandlung von Puffern mit Diethylpyrocarbonat (DEPC). Deshalb wurde für Versuche mit RNA ausschließlich mit DEPC behandeltes Wasser verwendet.

Da RNasen im Schweiß vorkommen, wurden im Umgang mit RNA Handschuhe getragen. Glasgefäße wurden mit konzentrierter Salzsäure vorbehandelt, anschließend mit 2 M Natronlauge und zuletzt mit DEPC-H₂O ausgespült. Pipettenspitzen, Chemikalien und Reaktionsgefäße waren für Versuche mit RNA reserviert.

2.10.1.1 Herstellung von DEPC-H₂O

Zur Herstellung von DEPC-H₂O wurde 1 ml DEPC mit 9 ml Ethanol gut gemischt, auf 1000 ml H₂O gegeben und unter ständigem Rühren bei 37°C über Nacht inkubiert. Abschließend wurde die Lösung autoklaviert.

Material:

- DEPC (Sigma, München)
- Ethanol (Riedl-de Haën, Seelze)

2.10.1.2 Isolierung von RNA aus Zellen und Geweben

Die Isolierung von RNA aus Zellen erfolgte mit zwei unterschiedlichen Methoden. Als Ausgangsmaterial dienten in allen Versuchen Maus-Fibroblastenzelllinien aus Embryonen Tag E13.5.

Die Isolierung von RNA aus Geweben wurde nur mit der ersten Methode durchgeführt. Für diese Isolierung diente Mauslungengewebe von Embryonen (Tag E18.5).

1) Isolierung von RNA aus Zellen und Geweben mit dem „RNeasy Mini Kit“ der Firma Qiagen, Hilden

Die Zellen mußten aus den Kulturschalen geerntet werden. Hierzu wurde das Medium abgesaugt und die Zellen zweimal mit 1×PBS gewaschen. Anschließend wurden 2 ml RLT Lyse-Puffer auf eine 600 ml Zellkulturflasche gegeben. Es ist wichtig, das PBS ganz aus der Flasche zu entfernen damit der Lyse-Puffer wirken kann. Mit einem Zellschaber wurden die Zellen vom Boden der Flasche gelöst, in sechs Reaktionsgefäße überführt und mit Hilfe einer Insulinspritze homogenisiert.

Für die Isolierung von RNA aus der Mauslunge wurde die gesamte Lunge in 1000 µl RLT Puffer aufgenommen. Zur RNA Extraktion wurde ein Viertel (250 µl) entnommen und zu 350 µl RLT Puffer gegeben. Durch mehrmaliges Aufziehen auf eine Insulinspritze wurde das Gewebe gründlich homogenisiert, für drei Minuten bei 13.000 UpM zentrifugiert, anschließend der Überstand zur weiteren Verwendung abpipettiert und erneut für drei Minuten bei 13.000 UpM zentrifugiert.

Ab diesem Schritt werden beide Versuchsansätze gleich behandelt. Nach Zugabe von einem Volumenteil (VT) 70%igem Ethanol, welches die spezifische Bindung der RNA an die Säulenmembran gewährleistet, wurden etwa 600 µl der Lösung über die „RNeasy Mini Spin Column“ gegeben. Es folgte eine Zentrifugation über 15 Sekunden bei 10.000 UpM. Verunreinigungen wurden mittels Zugabe von 700 µl RW1 Puffer pro Säule und Zentrifugation über 15 Sekunden bei 10.000 UpM von der Membran entfernt. Demselben Zweck dienten zwei weitere Waschschrte mit jeweils 500 µl RPE Puffer pro Säule und anschließender Zentrifugation über 15 Sekunden bei 10.000 UpM bzw. im zweiten Schritt zwei Minuten bei 13.000 UpM. Die RNA wurde mit 45 µl RNase-freiem Wasser eluiert und ihre Konzentration photometrisch bestimmt.

Material:

- „RNeasy Mini Kit“ von der Firma Qiagen, Hilden
 - RNeasy Mini Spin Columns
 - RLT Puffer*
 - RW1 Puffer
 - RPE Puffer**
 - RNase-freies H₂O

Die Zusammensetzung der Puffer wurde von der Firma Qiagen nicht angegeben.

* Muß direkt vor dem Gebrauch mit β -Mercaptoethanol (Sigma, München) versetzt werden (10 μ l β -ME pro 1 ml RLT Puffer).

** Der RPE Puffer liegt in konzentrierter Form vor und muß vor dem ersten Gebrauch mit 4 VT Ethanol (Riedl-de Haën, Seelze) versetzt werden.

- 1xPBS:

	<u>1000 ml</u>
NaCl (Merck, Darmstadt)	8,00 g
KCl (Merck, Darmstadt)	0,20 g
NaH ₂ PO ₄ •7H ₂ O (Merck, Darmstadt)	1,15 g
KH ₂ PO ₄ (Merck, Darmstadt)	0,20 g

In einem Liter bidestilliertem autoklavierten Wasser lösen. Der pH-Wert sollte dann 7,4 betragen.

- Ethanol (Riedl-de Haën, Seelze)
- Insulinspritze
- Zellschaber

2) Mit „Atlas™ Pure Total RNA Isolation Kit“ von der Firma Clontech, Heidelberg

Ausgangsmenge und Bezugspunkt für alle folgenden Volumina ist eine Zellzahl von ca. 2×10^7 Zellen.

Zum Ernten der Zellen wurde das Medium aus der Kulturflasche abgesaugt, die Zellen zweimal mit 1xPBS gewaschen, das 1xPBS gründlich entfernt und 3 ml Lyse-Puffer hinzugegeben. Nach dem Entfernen der Zellen mittels Zellschaber und dem Überführen in ein Falcon-Röhrchen wurden die Zellen durch mehrmaliges Aufziehen auf eine Insulinspritze homogenisiert, geschüttelt und 10 Minuten auf Eis inkubiert. Anschließend folgte erneutes Schütteln und Zentrifugieren für 20 Minuten bei 4.000 UpM, um die Zelltrümmer zu entfernen. Zum Überstand wurden 6 ml gesättigtes Phenol gegeben, eine Minute geschüttelt, fünf Minuten auf Eis inkubiert und die Lösung mit 1,8 ml Chloroform gut gemischt. Zur Trennung der wäßrigen Phase von der Interphase (Proteine) und der Phenol/Chloroform-Phase wurde die Lösung fünf Minuten auf Eis inkubiert und für 30 Minuten bei 4.000 UpM

zentrifugiert. Nach Abnahme der wäßrigen Phase erfolgte eine weitere Phenol/Chloroform-Extraktion mit 4,8 ml Phenol, 1,8 ml Chloroform und einer Zentrifugation von 60 Minuten bei 4.000 UpM. Nachfolgend wurden 6 ml Isopropanol zur wäßrigen Phase gegeben, die Lösung 10 Minuten auf Eis inkubiert, für 30 Minuten bei 4.000 UpM zentrifugiert und der Überstand mit 3 ml 80%igem Ethanol vermischt. Zur Gewinnung der RNA wurde 30 Minuten bei 4.000 UpM zentrifugiert und der Überstand abpipettiert. Nachdem das RNA-Pellet an der Luft getrocknet war, wurde die RNA in 400 µl RNase-freiem H₂O gelöst und ihre Konzentration photometrisch bestimmt.

Material:

- „AtlasTM Pure Total RNA Isolation Kit“ von der Firma Clontech, Heidelberg
 - Denaturierungslösung
 - Puffer für gesättigtes Phenol
 - RNase-freies H₂O
 - 2 M NaOAc (pH 4,5)
 - DNase I (1unit/µl)
 - 10×DNase I Puffer
- Gesättigtes Phenol (Sigma, München) 100 g
 - Das gesättigte Phenol wurde angetaut, mit den 65 ml Puffer gemischt und bei 30°C gelöst. Anschließend wurden zur besseren Haltbarkeit 0,2% (330 µl) β-Mercaptoethanol (Sigma, München) und 0,1% (165 µg) Hydroxyquinolin (Sigma, München) hinzugegeben.
- Chloroform (Merck, Darmstadt)
- Isopropanol (Merck, Darmstadt)

2.10.1.3 Entfernen von DNA aus RNA Proben

Das Entfernen von DNA ist wichtig für RNA Proben, die in Methoden Verwendung finden, welche einen hohen Reinheitsgrad der RNA verlangen, wie z.B. die RT-PCR (Reverse Transkriptase-Polymerase Kettenreaktion). Bei der RT-PCR kann schon durch kleinste Mengen an DNA, diese selbst und nicht die RNA amplifiziert werden. Mit dem Enzym DNase I (Desoxyribonuklease I) wird die DNA zerstört.

Jeweils 1 µg RNA wurde mit 1 µl DNase I Puffer und 1 µl DNase I in einem Volumen von 10 µl für 15 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Das Enzym wurde anschließend durch Zugabe von 1 µl 25 mM EDTA und Erhitzen auf 65°C für 10 Minuten inaktiviert.

Material:

- DNase I, Amplification Grade (Gibco, Karlsruhe)
- DNase I Puffer, 10fach Konzentrat (Gibco, Karlsruhe)
 - 200 mM Tris/HCl (pH 8,4)
 - 20 mM MgCl₂
 - 500 mM KCl
- 0,5 M EDTA

	<u>1000 ml</u>
EDTA•2 H ₂ O (Roth, Karlsruhe)	186,1 g

Mit H₂O unter Rühren auf 1 Liter auffüllen und den pH-Wert von 8,0 mit NaOH einstellen.
- DEPC-H₂O

2.10.1.4 Agarose-Formaldehyd Gelelektrophorese

Die Agarose-Formaldehyd Gelelektrophorese diente als Methode zur Überprüfung der RNA-Qualität oder auch als Grundlage für einen Northern Blot.

Gießen des Gels:

1,8 g Agarose wurden in 144 ml DEPC-H₂O zum Schmelzen gebracht. Nach dem Abkühlen der Lösung auf ca. 60°C wurden unter dem Abzug unter ständigem Rühren 20 ml 10×MOPS Puffer und 36 ml Formaldehyd (37%) hinzugegeben. Die gesamte Lösung wurde in einen mit DEPC-H₂O ausgespülten Gelschlitten gegeben. Die Elektrophoresekammer wurde soweit mit 1×MOPS Laufpuffer gefüllt, daß das polymerisierte Gel gerade bedeckt war.

Probenaufbereitung:

Die gewünschte Menge RNA wurde in 3,3 µl H₂O gelöst und folgende Reagenzien zugegeben:

<u>Gesamtvolumen</u>	<u>11,7 µl</u>
Formamid	7,5 µl
10×MOPS (1×)	1,5 µl
Formaldehyd (37%)	2,7 µl

Die Probe wurde gut gemischt und nach der Inkubation von 10 Minuten bei 55°C sofort auf Eis abgekühlt. Anschließend wurden 3 µl 6×Auftragspuffer (¹/₆ des Gesamtvolumens) hinzugegeben und die Probe auf das Gel aufgetragen.

Als Größenstandard diente ein Gemisch aus RNA-Fragmenten folgender Größen: 0,24 kb, 1,35 kb, 2,37 kb, 4,40 kb, 7,46 kb und 9,49 kb. Dieser Standard wurde von der Firma Gibco, Karlsruhe bezogen („RNA Ladder 0,24-9,5 kb“). Folgender Ansatz wurde pipettiert:

<u>Gesamtvolumen</u>	<u>19,9 µl</u>
Größenstandard	4,3 µl
Formamid	10 µl
10×MOPS (1×)	2 µl
Formaldehyd (37%)	3,6 µl

Mit dem Größenstandardgemisch wurde genauso verfahren wie mit der RNA Probe, doch anstelle von 3 µl wurden 4 µl 6×Auftragspuffer ($\frac{1}{6}$ des Gesamtvolumens) hinzugegeben.

Gellauf:

Die Proben liefen bei 75 Volt in das Gel ein. Danach wurde soviel Laufpuffer abgenommen, daß das Gel gerade nicht mehr bedeckt war. Mittels 3 mm Gel-Blotting-Papier wurde eine „Brücke“ konstruiert und das Gel luftblasenfrei mit Haushaltsfolie bedeckt, damit das Formaldehyd nicht verdampfen konnte (Abbildung 2.1). Von diesem Zeitpunkt an liefen die Proben bei 115 Volt weiter. Der Laufpuffer wurde von einer Kammerseite in die andere umgefüllt, sobald die pH-Werte der Kammern eine pH-Einheit auseinander lagen. Der Gellauf wurde beendet wenn der Farbstoff Bromphenol-Blau aus dem Auftragspuffer etwa die Hälfte des Gels durchlaufen hatte.

Sollte das Gel zum Transfer der RNA auf eine Nylonmembran weiterverwendet werden, so wurde es nicht angefärbt (weiterer Verlauf wie „Northern Blot Analyse“, Abschnitt 2.10.1.7).

Zur Überprüfung der RNA-Qualität mußte das Gel hingegen gefärbt werden. Dies geschah mit einer 0,1 M Ammoniumacetat Lösung (pH 8,0), die mit 5% Ethidiumbromid versetzt worden war und in der das Gel 30 Minuten geschwenkt wurde. Damit die Banden sichtbar wurden, mußte der Rest des Gels wieder entfärbt werden. Dazu wurde das Gel über Nacht unter ständigem Schwenken in 0,1 M Ammoniumacetat (pH 8,0) Lösung inkubiert. Am folgenden Tag konnte das Gel photographiert werden.

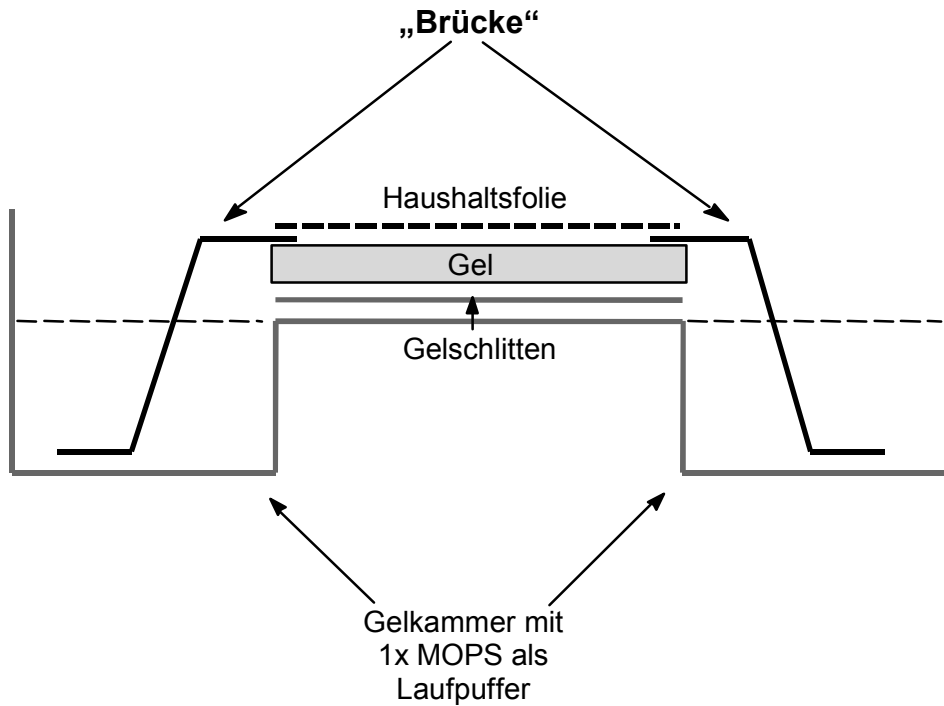


Abb. 2.1: Aufbau der Elektrophoresekammer für den Gellauf

Nachdem die Proben in das Gel eingelaufen waren wurde soviel Laufpuffer abgenommen, daß das Gel gerade nicht mehr bedeckt war. Der Puffer wurde über eine mit 3 mm „Gel-Blotting-Papier“ konstruierte „Brücke“ durch das Gel transportiert.

Material:

- Agarose (Roth, Karlsruhe)
- „RNA Ladder 0,24 kb- 9,5 kb“ (Gibco, Karlsruhe)
- DEPC-H₂O
- Formamid (Merck, Darmstadt)
- Formaldehyd (Merck, Darmstadt)
- 10xMOPS

	<u>250 ml</u>
MOPS (Sigma, München)	23,12 g
NaAc (Riedl-de Haën, Seelze)	2,05 g
EDTA (Roth, Karlsruhe)	0,93 g
Mit DEPC-H ₂ O auf 250 ml auffüllen und pH 7,0 mit Essigsäure einstellen.	

- 6xAuftragspuffer

	<u>Endkonzentration</u>	<u>50 ml</u>
Glycerin (Merck, Darmstadt)	30%	17 ml
Xylen Cyanol (Sigma, München)	0,25%	~125 mg
Bromphenolblau (Merck, Darmstadt)	0,25%	~125 mg
Mit 10/1 TE auf 50 ml auffüllen.		

- 10 M Ammoniumacetat (pH 8,0)

	<u>1000 ml</u>
Ammoniumacetat (Merck, Darmstadt)	770 g
Mit H ₂ O auf 1 Liter auffüllen.	
- 0,1 M Ammoniumacetat + Ethidiumbromid (Endkonzentration von 0,5 mg/l)

	<u>200 ml</u>
0,1 M Ammoniumacetat (pH 8,0)	200 ml
Ethidiumbromid 10 mg/ml (Roth, Karlsruhe)	10 µl

2.10.1.5 Bestimmung der RNA-Konzentration

Zur Bestimmung der RNA-Konzentration, verwendet man ein Photometer. Dieses Gerät mißt die Absorption von UV-Licht durch die Nukleinsäuren bei einer Wellenlänge von 260 nm. Bei dieser Wellenlänge weisen die aromatischen Reste der Basen ein Absorptionsmaximum auf. Mit dem Photometer können nicht nur die RNA Mengen bzw. molaren Konzentrationen bestimmt werden, sondern auch die anderer Ribonukleinsäuren. Für diesen Fall existieren verschiedene Umrechnungsfaktoren.

$$E_{260} \rightarrow 1 = 50 \mu\text{g/ml für doppelsträngige DNA}$$

$$E_{260} \rightarrow 1 = 40 \mu\text{g/ml für einzelsträngige DNA oder RNA}$$

$$E_{260} \rightarrow 1 = 20 \mu\text{g/ml für Oligonukleotide}$$

Exakte Konzentrationsbestimmungen erhält man nur bei Absorptionswerten von 0,1 bis 0,8 bei 260 nm.

Die gleichzeitige Messung der Absorption bei 280 nm gibt einen Anhaltspunkt über die Reinheit der Nukleinsäuren. Bei dieser Wellenlänge haben die Reste der aromatischen Aminosäuren (Histidin, Phenylalanin, Tryptophan, Tyrosin) ein Absorptionsmaximum. Der Quotient aus E_{260}/E_{280} sollte im Bereich von 1,7 bis 1,8 liegen, um eine gute Qualität der Nukleinsäuren gewährleisten zu können.

Material:

- Photometer (Pharmacia Biotech, Camebridge)

2.10.1.6 Reverse Transkriptase-Polymerase Kettenreaktion (RT-PCR)

Die reverse Transkription und die Polymerase Kettenreaktion wurden mittels „Access RT-PCR Systems“ von der Firma Promega, Madison durchgeführt. Die Technik dieses Systems machte es möglich, die unterschiedlich starke Expression spezieller Gene zu bestimmen oder cDNA zu vermehren, ohne eine Genbibliothek anzulegen. So war es z.B. möglich, die Expressionsraten verschiedener Gene in Wildtyp-Mäusen mit denen in Sp3-knockout Mäusen zu vergleichen oder eine DNA-Sonde als Hybridisierungsprobe herzustellen.

Als Ausgangsmaterial für die RT-PCR diente Gesamt-RNA. Die Reverse Transkriptase für die Erststrang-cDNA-Synthese stammt aus dem Avian Myeloblastosis Virus (AMV). Die thermostabile *Tfi* DNA Polymerase für die Zweitstrang-cDNA-Synthese und die DNA Amplifikation aus dem Bakterium *Thermus flavus*.

Alle Reaktionsschritte können in einem Reaktionsgefäß ablaufen, so daß die Wahrscheinlichkeit der Kontamination, beispielsweise mit Plasmid-DNA, stark verringert wird.

Um die Expressionsraten vergleichen zu können, wurden im annähernd linearen Bereich der PCR Amplifikationen (ca. Zyklus 18-27) Aliquots der Proben entnommen, auf einem Agarosegel aufgetrennt und sichtbar gemacht. Über den Vergleich der Bandenintensitäten des untersuchten Gens in Wildtyp- und in Knockout-Mäusen konnte eine erste Einschätzung der möglicherweise unterschiedlichen Genexpression gemacht werden.

Für die durchgeführten Versuche wurde folgendes Pipettierschema verwendet:

	<u>Endvolumen</u>	<u>50 µl</u>
DEPC-H ₂ O		auf 50 µl
5×Reaktionspuffer	1×	10 µl
dNTP Mix (10 mM je dNTP)	0,2 mM	1 µl
5´Primer	1 µM	50 pmol*
3´Primer	1 µM	50 pmol*
25 mM MgSO ₄	1 mM	2 µl
AMV Reverse Transkriptase (5u/µl)	0,1 u/µl	1 µl
<i>Tfi</i> DNA Polymerase (5u/µl)	0,1 u/µl	1 µl
Gesamt-RNA		1 µg

* 50 pmol = 16,3 ng × b; b = Anzahl der Basenpaare des Primers.

Um Pipettierfehler zu vermeiden, wurde ein Prämix aus DEPC-H₂O, 5×Reaktionspuffer, dNTP Mix, RNA Probe und 25 mM MgSO₄ angefertigt und die entsprechende Menge auf die 5'Primer und 3'Primer pipettiert. Die verwendete Gesamt-RNA wurde zuvor mit DNase I behandelt, um eine Verunreinigung mit DNA auszuschließen, die möglicherweise amplifiziert werden könnte.

Die Primer wurden so ausgewählt, daß sie 20 bp bzw. 21 bp lang waren. Der Anteil an Adenin/Thymin Nukleotiden entsprach etwa dem an Cytosin/Guanin, und die zu amplifizierende Gensequenz war zwischen 200 bp und 300 bp lang. Um unterscheiden zu können, ob es sich bei dem Amplifikationsprodukt um genomische DNA oder cDNA handelt, wurden die Primer, wenn möglich so gewählt, daß sie sich an zwei Exons anlagerten zwischen denen sich ein Intron befindet. Das Produkt einer Amplifikation genomischer DNA wäre wesentlich größer gewesen, als das einer cDNA. Ein weiterer Vorteil ist, daß kleine Fragmente eher amplifiziert werden als große.

Weitere Optimierung konnte durch die Variation der Magnesiumsulfatkonzentration und der Temperatur während der Primeranlagerung erreicht werden. So verringert eine Erhöhung der Temperatur unspezifische Bindungen der Primer an die Gensequenz und führt zu einem spezifischeren PCR Produkt. Die im Pipettierschema angegebene Magnesiumsulfatkonzentration und die nachfolgende Temperatur haben sich bewährt.

Vor Zugabe der Enzyme wurde das Primer-Puffer-Gemisch für 10 Minuten auf 95°C erhitzt, um Sekundärstrukturen der RNA aufzuheben. Die Zugabe der Enzyme durfte erst nach dem Erhitzen vorgenommen werden, da die AMV Reverse Transkriptase nicht hitzebeständig ist. Anschließend wurden die Proben mit ca. 50 µl RNase-freiem Mineralöl überschichtet und die Reaktion in der PCR-Maschine gestartet.

Gleichzeitig wurden immer eine Positivkontrolle (aus dem Kit) und eine Negativkontrolle (Probe mit H₂O anstelle von RNA) mit amplifiziert.

Die Temperaturen und Reaktionszeiten können folgendem Schaubild entnommen werden.

Erststrang-cDNA-Synthese

Ein Zyklus:

48°C	45 Minuten	Reverse Transkription
------	------------	-----------------------

Ein Zyklus:

94°C	2 Minuten	AMV RT wird inaktiviert
------	-----------	-------------------------

Zweitstrang-cDNA-Synthese und PCR Amplifikation

Variable Zyklenzahl (aber nicht höher als 40):

94°C	30 Sekunden	Denaturierung
52°C	30 Sekunden	Annealing (Primeranlagerung)
72°C	30 Sekunden	Amplifikation

Ein Zyklus:

68°C	7 Minuten	Beenden der letzten Amplifikation
------	-----------	-----------------------------------

Ein Zyklus:

4°C		Beenden der PCR Reaktion
-----	--	--------------------------

Material:

- „Access RT-PCR System Kit“ von der Firma Promega, Madison
 - AMV Reverse Transkriptase (5u/μl)
 - Tfi* DNA Polymerase (5u/μl)
 - AMV/ *Tfi* 5×Reaktionspuffer
 - MgSO₄ (25 mM)
 - dNTP Mix (10 mM je dATP, dCTP, dGTP, dTTP)
 - Positiv Kontroll-RNA (1,25 attomole/μl)
 - 5′Kontrollprimer (15 μM)
 - 3′Kontrollprimer (15 μM)
 - H₂O

2.10.1.7 Northern Blot Analyse

Mittels Northern Blot Analyse konnte die unterschiedliche Expression bestimmter Gene in Knockout- und Wildtyp-Materialien quantitativ verglichen werden. Hierzu wurde die RNA aus dem Gel der Agarose-Formaldehyd Gelelektrophorese auf eine Nylonmembran übertragen, mit einer radioaktiv markierten DNA-Sonde hybridisiert und mit dem Phosphor-Imager ausgewertet. Um das Formaldehyd zu entfernen, wurde das Gel nach dem Gellauf unter dem Wasserhahn abgespült und anschließend zurechtgeschnitten.

1) Zu färbender Teil:

Dieser Teil des Gels diente als Qualitätskontrolle. Hier wurden der Größenstandard und eine RNA Probe aufgetragen (Abbildung 2.2).

2) Teil des Gels, aus dem die RNA auf eine Nylonmembran transferiert wurde:

Auf diesen Teil wurden nur RNA Proben aufgetragen, die auf die Nylonmembran übertragen werden sollten und später als Hybridisierungsgrundlage für die DNA-Sonden dienten (Abbildung 2.3).

Zu 1):

Das zu färbende Gelstück wurde 30 Minuten in einer Lösung aus 0,1 M Ammoniumacetat + 5% Ethidiumbromid geschwenkt, so daß das gesamte Gelstück rot angefärbt war. Das Gel wurde über Nacht in 0,1 M Ammoniumacetat (pH 8,0) entfärbt und dann mit einem Lineal zusammen photographiert. Der RNA-Größenstandard enthielt RNA-Fragmente von 0,24 kb, 1,35 kb, 2,37 kb, 4,4 kb, 7,46 kb und 9,49 kb Länge. Anhand der 18S- und 28S-RNA-Banden der Probe konnte eine Aussage über die Qualität der RNA gemacht werden. Die Intensität der 28S-RNA-Bande sollte etwa zweimal so stark sein wie die Intensität der 18S-RNA-Bande. Ist dies nicht der Fall, liegt vermutlich ein Abbau der RNA vor.

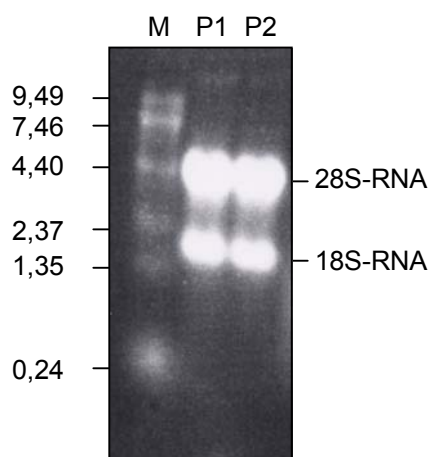


Abb. 2.2: Kontrolle der RNA-Qualität

M: Größenstandard; P1: RNA-Probe Nr.1; P2: RNA-Probe Nr.2.

Die 28S- und die 18S-RNA sind rechts gekennzeichnet. Es ist zu erkennen, daß die Signalintensität für die 28S-RNA zweimal so stark ist wie die für die 18S-RNA. Links sind die im Größenstandard enthaltenen RNA-Fragmente dargestellt.

Zu 2):

Bei dem Gelstück, aus dem die RNA auf eine Nylonmembran transferiert werden sollte, wurde als Orientierungshilfe die rechte obere Ecke abgeschnitten und das Gel 30 Minuten in 20×SSC geschwenkt. In eine große mit 10×SSC (bei Southern Blot 20×SSC) gefüllte Wanne wurde ein umgedrehter Gelschlitten luftblasenfrei mit Gel-Blotting-Papier bedeckt. Darauf wurde das Gel mit den Taschen nach unten gelegt. Auf das Gel wurden nacheinander luftblasenfrei eine positiv geladene Nylonmembran, zwei „Gel-Blotting-Papiere“ und eine ca. 10 cm hohe Schicht Zellstoff gebracht, so daß die RNA Proben über Nacht durch Diffusion auf die Membran übertragen wurden. Die Apparatur wurde mit einem Gewicht beschwert. Damit der 10×SSC Puffer nicht an dem Gel vorbeigesogen werden konnte, wurde das Gel seitlich mit Haushaltsfolie abgedichtet. Die Zellstoffschicht wurde nach einigen Stunden ausgewechselt.

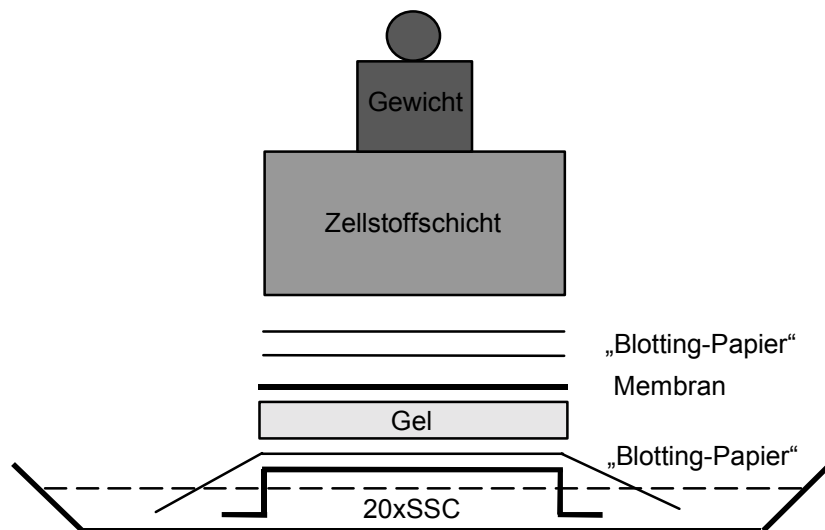


Abb. 2.3: Northern/Southern Blot-Apparatur

Am folgenden Tag wurde die Apparatur abgebaut und die RNA mit 0,3 Joule/cm² UV-Strahlung mittels Biometra Crosslinker auf der Membran fixiert. Bevor die Membran hybridisiert werden konnte, mußte sie mindestens zwei Stunden mit 10 ml Prähybridisierungslösung im Hybridisierungsofen („Mini hybridisation oven“, Biometra) bei 42°C inkubiert werden. Anschließend folgte die Hybridisierung bei 42°C nach Austausch der Prähybridisierungslösung gegen 6 ml Hybridisierungslösung und Zugabe von denaturierter radioaktiv markierter DNA-Sonde (Abschnitt 2.10.2.7) mit einer Endkonzentration von 1-2×10⁶ cpm/ml über Nacht.

Vor dem Anfertigen eines Autoradiogramms wurde die Membran gewaschen, um die unspezifischen Bindungen der radioaktiv markierten Sonde an dieser zu lösen. Die Stringenz der Waschschriffe steigt mit zunehmender Temperatur und abnehmender Salzkonzentration. Als Anhaltspunkt kann folgendes Schema verwendet werden.

2× 5 Minuten bei Raumtemperatur mit 2×SSC; 0,1% SDS Waschlösung
 1× 30 Minuten bei 50°C mit 2×SSC; 0,1% SDS Waschlösung
 1× 60 Minuten bei 65°C mit 0,1×SSC; 0,1% SDS Waschlösung

Anschließend wurde die Membran in Haushaltsfolie eingeschlagen und exponiert. Entweder als Autoradiogramm bei -80°C, um eine unveränderbare Hardcopy zu erhalten oder mit Hilfe der Imaging Plate für den Phosphor-Imager, um die Genexpression quantitativ auswerten zu können.

Um die Membran mit einer weiteren DNA-Sonde hybridisieren zu können, wurde die wie oben beschrieben hybridisierte Sonde, abgewaschen. Zu diesem Zweck wurde eine 0,1%ige SDS-Lösung aufgekocht, zu der Membran in eine Hybridisierungsflasche gegeben, für eine Stunde bei 80°C inkubiert und langsam auf Raumtemperatur abgekühlt. Um sicherzustellen, daß sich die alte DNA-Sonde nicht mehr auf der Membran befindet, wurde über Nacht ein Röntgenfilm aufgelegt und ein Autoradiogramm angefertigt. Konnte die Sonde noch detektiert werden, wurde der Waschvorgang wiederholt.

Material:

- Nylonmembran Hybond™-N (Amersham, Braunschweig)
- 0,1 M Ammoniumacetat (pH 8,0) (Abschnitt 2.10.1.4)
- 0,1 M Ammoniumacetat + Ethidiumbromid (Abschnitt 2.10.1.4)
- „RNA Ladder 0,24 kb- 9,5 kb“ (Gibco, Karlsruhe)
- Radioaktiv markierte DNA-Sonde
- Gel-Blotting-Papier (Schleicher & Schuell, Dassel)
- Zellstoff
- Haushaltsfolie
- 20×SSC

	<u>Endkonzentration</u>	<u>1000 ml</u>
NaCl (Merck, Darmstadt)	3 M	175,3 g
Natriumcitrat (Merck, Darmstadt)	0,3 M	88,2 g

Mit H₂O auf 1 Liter auffüllen und mit Zitronensäure einen pH-Wert von 7,0 einstellen.

- Prähybridisierungslösung:

	<u>Endkonzentration</u>	<u>10 ml</u>
Formamid (Merck, Darmstadt)	50%	5 ml
20×SSC	5×	2,5 ml
50×Denhardts	5×	1 ml
Denaturierte Heringsperma-DNA (10 mg/ml) (Boehringer, Mannheim)	0,25 mg/ml	250 µl
1 M Natriumphosphat, pH 6,4 (Merck, Darmstadt)	50 mM	500 µl
Frisch filtrierte SDS-Lösung (10%ig) (Serva, Heidelberg)	0,1%	100 µl
H ₂ O	auf 10 ml	650 µl

- Hybridisierungslösung:

	<u>Endkonzentration</u>	<u>6 ml</u>
Formamid (Merck, Darmstadt)	50%	3 ml
20×SSC	4×	1,2 ml
50×Denhardts	2,5×	300 µl
Denaturierte Heringsperma-DNA (10 mg/ml) (Boehringer, Mannheim)	0,1 mg/ml	60 µl
1 M Natriumphosphat, pH 6,4 (Merck, Darmstadt)	20 mM	120 µl
Frisch filtrierte SDS-Lösung (10%ig) (Serva, Heidelberg)	0,1%	60 µl
H ₂ O	auf 6 ml	15 µl

- 50×Denhardts:

	<u>500 ml</u>
Ficoll Typ 400 (Pharmacia Biotech, Camebridge)	5 g
Polyvenylpyrrolidon (Merck, Darmstadt)	5 g
Bovine Serum Albumin (Sigma, München)	5 g
Mit H ₂ O auf 500 ml auffüllen.	

- 2×SSC; 0,1% SDS Waschlösung:

	<u>Endkonzentration</u>	<u>100 ml</u>
20×SSC	2×	10 ml
Frisch filtrierte SDS-Lösung (10%ig) (Serva, Heidelberg)	0,1%	1 ml
H ₂ O	auf 100 ml	89 ml

- 0,1×SSC; 0,1% SDS Waschlösung:

	<u>Endkonzentration</u>	<u>100 ml</u>
20×SSC	0,1×	0,5 ml
Frisch filtrierte SDS-Lösung (10%ig) (Serva, Heidelberg)	0,1%	1 ml
H ₂ O	auf 100 ml	98,5 ml

- 10% SDS:

	<u>Endkonzentration</u>	<u>20 ml</u>
SDS (Serva, Heidelberg)	10%	2 g
H ₂ O	auf 20 ml	

Zum Lösen auf 68°C erhitzen und pH 7,2 mit Salzsäure einstellen.

2.10.1.8 Ein Oligonukleotid gegen die 18S-RNA als Hybridisierungsprobe

Die Expression der 18S-RNA ist in allen Zellen vergleichbar und kann daher als Kontrolle für den Northern Blot verwendet werden.

Die von DNA-Sonden gereinigte Membran wurde mit einem radioaktiv markierten Oligonukleotid hybridisiert, das an die 18S-RNA bindet (18S-Oligo). Mit Hilfe der Gleichmäßigkeit der Bandenintensität konnte eine Aussage über die pipettierten RNA-Mengen auf dem Gel gemacht werden.

Für die radioaktive Markierung wurde folgender Ansatz pipettiert:

	<u>50 µl</u>
18S-Oligo	50 ng
5×Reaktionspuffer (Gibco, Karlsruhe)	10 µl
T4-Kinase (Gibco, Karlsruhe)	1 µl
[γ- ³² P] dATP (5000 Ci/mmol) (Amersham, Braunschweig)	4 µl
DEPC-H ₂ O	auf 50 µl

Die Probe wurde für 30 Minuten bei 37°C inkubiert, wobei nach 15 Minuten noch einmal 1 µl T4-Kinase hinzupipettiert wurden. Zur Reinigung der Sonde von freien Nukleotiden wurde der Ansatz über ein Molekularsieb gegeben. Anschließend erfolgte die Messung der Radioaktivität, wie in Abschnitt 2.10.2.7 beschrieben. Die spezifische Aktivität sollte ca. 1×10^8 cpm/µg betragen.

Die Membran wurde mit 20 ml Prähybridisierungslösung bei 42°C für mindestens zwei Stunden im Hybridisierungsofen („Mini hybridisation oven“, Biometra) inkubiert. Für die Hybridisierung bei gleichbleibender Temperatur für mindestens drei Stunden wurden 5 ml Prähybridisierungslösung entnommen und 5×10^5 cpm radioaktiv markiertes 18S-Oligo hinzugegeben. Anschließend wurde die Membran nach folgendem Schema gewaschen:

- 1× 5 Minuten bei Raumtemperatur mit 2×SSC; 0,1% SDS Waschlösung
- 1× 10 Minuten bei 65°C mit 2×SSC; 0,1% SDS Waschlösung
- 2× 10 Minuten bei 65°C mit 0,5×SSC; 0,1% SDS Waschlösung

Es wurde ein Autoradiogramm angefertigt und die relative Radioaktivität mit dem Phosphor-Imager gemessen.

Material:

- 5×Reaktionspuffer (Gibco, Karlsruhe)
- T4-Kinase (Gibco, Karlsruhe)
- [γ - 32 P] dATP (5000 Ci/mmol) (Amersham, Braunschweig)
- Molekularsieb: “Probe QuantTM G-50 Micro Column“ (Amersham, Braunschweig)
- Prähybridisierungslösung

	<u>Endkonzentration</u>	<u>20 ml</u>
Formamid (Merck, Darmstadt)	35%	7 ml
20×SSC	4×	4 ml
50×Denhardts	5×	2 ml
Denaturierte Heringsperma-DNA (10mg/ml) (Boehringer, Mannheim)	0,25 mg/ml	500 μ l
1 M Natriumphosphat, pH 6,4 (Merck, Darmstadt)	50 mM	1 ml
Frisch filtrierte SDS-Lösung (10%ig) (Serva, Heidelberg)	0,5%	1 ml
H ₂ O	auf 20 ml	4,5 ml

2.10.2 Arbeiten mit DNA

2.10.2.1 Transformation zur Vermehrung von Plasmid-DNA

Die zu vermehrende Plasmid-DNA wurde in ein Wirtsbakterium eingeschleust, unabhängig vom Genom dieses Bakteriums repliziert und anschließend wieder isoliert. Bei der Arbeit mit Bakterien-Zellen ist es wichtig, auf Sterilität zu achten. Aus diesem Grund wurden alle verwendeten Behältnisse vor dem Gebrauch über einer Flamme sterilisiert.

Von der zu vermehrenden Plasmid-DNA wurden 100 ng mit 200 µl kompetenten DH5α-Zellen (ein Stamm des Bakteriums *E.coli*) gemischt und 30 Minuten auf Eis inkubiert. Zur besseren Aufnahme der DNA in das Bakterium folgte eine Hitzeschockbehandlung. Zu diesem Zweck wurde die Probe genau 45 Sekunden in 42°C warmes Wasser gehalten und danach für zwei Minuten auf Eis abgekühlt. Anschließend wurden die Zellen für 30 bis 60 Minuten in 800 µl SOC-Medium bei 37°C geschüttelt. Nach kurzer Zentrifugation wurden 800 µl vom Überstand verworfen, die Zellen in den verbleibenden 200 µl resuspendiert und mit einem Glasspatel auf eine mit Ampicillin beimpfte Agarplatte gegeben. Die Bakterien-Zellen wuchsen über Nacht im Inkubationsschrank bei 37°C.

Am folgenden Tag wurden Klone, die mit Hilfe eines Zahnstochers von der Agarplatte gepickt worden waren, in mit Ampicillin versetztem LB Medium (0,1% Ampicillin) über Nacht bei 37°C inkubiert.

Die Isolierung der Plasmid-DNA aus den Bakterien wird im folgenden Kapitel beschrieben (Abschnitt 2.10.2.2 und 2.10.2.3).

Material:

- Plasmid-DNA
- Kompetente DH5α-Zellen
- SOB Medium:

	<u>500 ml</u>
Select Peptone (Gibco, Karlsruhe)	10 g
Select Yeast Extract (Gibco, Karlsruhe)	2,5 g
NaCl (Merck, Darmstadt)	0,292 g
KCl (Merck, Darmstadt)	0,093 g
Mit H ₂ O auf 500 ml auffüllen und pH 7,0 mit 5 N NaOH einstellen.	

- SOC Medium:

	<u>10,3 ml</u>
SOB	10 ml
Mg ²⁺ (Merck, Darmstadt)	100 µl
Glucose (Merck, Darmstadt)	200 µl
- LB Medium (Luria-Bertani Medium):

	<u>1000 ml</u>
Select Peptone (Gibco, Karlsruhe)	10 g
Select Yeast Extract (Gibco, Karlsruhe)	5 g
NaCl (Merck, Darmstadt)	10 g
Mit H ₂ O auf 1 Liter auffüllen.	

2.10.2.2 Herstellung von Mini-Lysat DNA

Zur Isolierung von Plasmid-DNA aus einer Über-Nacht-Kultur (LB-Medium + Ampicillin + Bakterienklon) wurden Puffer und Lösungen aus dem „Nucleobond® AX Kit“ von der Firma Macherey-Nagel, Düren verwendet.

Um die Zellwände der Bakterienzellen zu zerstören, wurde die Bakterienkultur in 100 µl S1 Puffer resuspendiert und anschließend für fünf Minuten in 100 µl S2 Puffer bei Raumtemperatur inkubiert. Die chromosomale DNA wurde in 100 µl S3 Puffer gelöst, fünf Minuten auf Eis inkubiert und zehn Minuten bei 13.000 UpM zentrifugiert. Nachfolgend wurde die Plasmid-DNA aus dem Überstand mit dem 1,5fachen Volumen Isopropanol gefällt, eine Stunde bei -20°C inkubiert, 30 Minuten bei 13.000 UpM zentrifugiert und zweimal mit 350 µl 75%igem Ethanol gewaschen. Nach dem Trocknen in einer Vakuum-Zentrifuge wurde die DNA in 50 µl 10/1 TE Puffer resuspendiert und zum Schutz vor RNA-Verunreinigungen mit 1 µl RNase versetzt.

Material:

- „Nucleobond® AX Kit“ (Macherey-Nagel, Düren)

<u>S1 Puffer:</u>	<u>Endkonzentration</u>
Tris/HCl	50 mM
EDTA	10 mM
RNase, pH 8,0	100 µg (A/ml)
<u>S2 Puffer:</u>	
NaOH	200 mM
SDS	1%

S3 Puffer:

KAc, pH 5,1

2,8 M

- Isopropanol (Merck, Darmstadt)
- Ethanol (Riedl-de Haën, Seelze)
- RNase (10 ng/µl) (Boehringer, Mannheim)

2.10.2.3 Schneiden eines Plasmids zur Gewinnung von DNA

Das Insert wurde mit Hilfe von Restriktionsendonukleasen aus dem Plasmid herausgetrennt. Hierzu wurden 2 µg der Mini-Lysat DNA mit dem/den entsprechendem/n Restriktionsenzym/en, Puffer und BSA (1 mg/ml), beides 10fach konzentriert und Wasser in einem 100 µl-Ansatz für zwei Stunden bei 37°C inkubiert. Der Puffer wurde individuell auf das Restriktionsenzym abgestimmt.

Nach der Inkubation wurde zur Kontrolle ein Agarosegel laufen gelassen, auf dem geschnittenes mit ungeschnittenem Plasmid verglichen wurden. Mit Hilfe dieses Gels konnte festgestellt werden, ob das Plasmid korrekt geschnitten worden war. Zur Extraktion der DNA wurde die gesamte Probe auf ein präparatives Gel aufgetragen.

Material:

- Plasmid-DNA
- Puffer (Boehringer, Mannheim)
- Enzyme (Boehringer, Mannheim)
- BSA (1 mg/ml) (Sigma, München)

2.10.2.4 Agarose Gelelektrophorese

Die Agarose Gelelektrophorese dient der Auftrennung von DNA-Fragmenten und macht sie sichtbar. So ist es beispielsweise möglich, mittels dieser Technik DNA-Konzentrationen zu bestimmen oder DNA aus dem Gel zu extrahieren.

Für die vorliegende Arbeit wurden Gele verschiedener Größen und Konzentrationen gegossen. Während zur Auftrennung kleinerer DNA-Fragmente hochprozentige Gele verwendet wurden, kamen für größere Fragmente nur niedrigprozentige zum Einsatz. Die Konzentration der Agarose betrug zwischen 1% und 1,8%.

Die Agarose wurde in 1×TBE Elektrodenpuffer aufgeköcht, nach dem Abkühlen auf ca. 60°C mit 1 µg/100ml Ethidiumbromid versetzt und gegossen. Bei den Proben handelte es sich meist um 0,05 µg bis 2,0 µg DNA in einem 6 µl Ansatz mit 6×Auftragspuffer versetzt, die in die Geltaschen appliziert wurden. Als Größenstandard diente im Bereich von 75 bp bis 500 bp das Plasmid pBR322 mit Hinf I geschnitten und im Bereich von 0,2 kb bis 5 kb Lambda-DNA mit Eco RI/Hind III geschnitten. Die Gelelektrophorese erfolgte bei Spannungen zwischen 10 V und 70 V. Die DNA-Banden wurden mittels Transilluminator bei einer Wellenlänge von 306 nm sichtbar gemacht. Die Gele konnten photographiert und das Bild ausgedruckt werden.

Material:

- Agarose (Roth, Karlsruhe)
- Ethidiumbromid 10 mg/ml (Roth, Karlsruhe)
- Lambda-Größenstandard (100 ng/µl) mit Eco RI/Hind III geschnitten
- pBR322-Größenstandard (100 ng/µl) mit Hinf I geschnitten
- 1×TBE Elektrodenpuffer:

	<u>Endkonzentration</u>	<u>1000 ml</u>
Tris (Merck, Darmstadt), pH 10	90 mM	10,9 g
Borsäure (Merck, Darmstadt)	65 mM	4,0 g
EDTA (Roth, Karlsruhe), pH 4,5	2,5 mM	0,9 g

Mit H₂O auf 1 Liter auffüllen. Der pH-Wert sollte dann 8,3 betragen.
- 6×Auftragspuffer:

	<u>Endkonzentration</u>	<u>50 ml</u>
Glycerin (Merck, Darmstadt)	30%	17 ml
Xylen Cyanol (Sigma, München)	0,25%	~125 mg
Bromphenolblau (Merck, Darmstadt)	0,25%	~125 mg

Mit 10/1 TE auf 50 ml auffüllen.
- 1% Agarosegel:

	<u>100 ml</u>
Agarose (Roth, Karlsruhe)	1 g
1×TBE Elektrodenpuffer	100 ml
Ethidiumbromid 10 mg/ml (Roth, Karlsruhe)	1 µl

2.10.2.5 Präparation von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen

Die Extraktion von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen wurde mit dem „QIAquik Gel Extraktion Kit“ von der Firma Qiagen, Hilden durchgeführt. Mit dieser Methode können DNA-Fragmente von 70 bp bis 10 kb Größe isoliert werden. Die DNA wird aus dem Gel geschmolzen und in der Anwesenheit hoher Salzkonzentrationen an eine Kieselgel-Membran gebunden, während Verunreinigungen die Säule passieren und durch Waschschriffe entfernt werden. Mit niedrigen Salzkonzentrationen und entsprechenden pH-Werten lassen sich die DNA-Moleküle wieder von der Membran lösen.

Das zu entfernende DNA-Stück wurde im Gel mittels einer UV-Handlampe sichtbar gemacht (langwelliger UV-Bereich, damit die DNA nicht beschädigt wird) und herausgeschnitten. Anschließend wurde es gewogen und mit drei Volumenteilen (VT) (100 mg ~ 100 µl) QG Puffer zum Schmelzen der Agarose für 10 Minuten bei 50°C inkubiert und mehrmals geschüttelt. Um eine bessere DNA-Ausbeute bei DNA-Fragmenten kleiner 500 bp und größer 4 kb zu erreichen, wurde ein VT Isopropanol hinzugegeben, nachdem sich das Gelstück vollständig gelöst hatte. Die Probe wurde nach dem Mischen auf eine Kieselgel-Membran pipettiert und nach einer Inkubationszeit von zwei Minuten bei Raumtemperatur eine Minute bei 13.000 UpM zentrifugiert. Um Verunreinigungen wie beispielsweise Salz zu entfernen, wurden 750 µl PE Puffer über die Säule gegeben, drei Minuten bei Raumtemperatur inkubiert und anschließend eine Minute bei 13.000 UpM zentrifugiert. Die Ethanolreste aus dem PE Puffer wurden durch erneutes einminütiges Zentrifugieren entfernt. Die Elution erfolgte mit 30-50 µl 2/02 TE Puffer. Zur Bestimmung der DNA-Konzentration wurden 2-4 µl des Eluats in einem Agarosegel aufgetrennt und durch Bandenvergleich mit einer bekannten Menge an Größenstandard bestimmt.

Material:

- „QIAquik Gel Extraktion Kit“ von der Firma Qiagen, Hilden
 - QIAquik Spin Columns
 - QG Puffer*
 - PE Puffer*

Die Zusammensetzung der Puffer wurde von der Firma Qiagen nicht angegeben.

* Der PE Puffer liegt in konzentrierter Form vor und muß vor dem ersten Gebrauch mit 4 VT Ethanol (Riedl-de Haën, Seelze) versetzt werden.

- Isopropanol (Merck, Darmstadt)

- 10/1 TE Puffer:

	<u>Endkonzentration</u>	<u>100 ml</u>
1M Tris/ HCl, pH 8,0 (Merck, Darmstadt)	10 mM	1 ml
0,5 M EDTA (Roth, Karlsruhe)	1 mM	200 µl
Mit H ₂ O auf 100 ml auffüllen.		
- 2/02 TE Puffer:

	<u>Endkonzentration</u>	<u>100 ml</u>
10/1 TE Puffer, pH 8,0	20%	20 ml
H ₂ O	80%	80 ml

2.10.2.6 Bestimmung der DNA-Konzentration

Zur Bestimmung der DNA-Konzentration gibt es mehrere Möglichkeiten. Ist die DNA-Konzentration der Probe groß genug, so kann die DNA-Menge mit Hilfe des in Abschnitt 2.11.1.5 beschriebenen Photometers bestimmt werden.

Ist die DNA-Konzentration hingegen zu gering um sie photometrisch zu messen, wird ein Aliquot der Probe entnommen und zur Bestimmung der Konzentration mit einem entsprechenden Größenstandard im Agarosegel laufen gelassen. Die Konzentration des Größenstandards muß bekannt sein, so daß über den Vergleich der Bandenintensität auch die Konzentration der DNA abgeschätzt werden kann.

Material:

- Photometer (Pharmacia Biotech, Camebridge)
- Agarosegel (Abschnitt 2.10.2.4)
- Größenstandard (Abschnitt 2.10.2.4)

2.10.2.7 Radioaktive Markierung von DNA

Radioaktive Markierungen wurden mit Hilfe des Kits „Megaprime DNA labelling system“ von der Firma Amersham, Braunschweig durchgeführt. Die radioaktiv markierten DNA-Sonden dienten als Hybridisierungsproben.

Es wurden ungefähr 20 ng der zu markierenden DNA mit 5 µl Primer versetzt und mit 10/1 TE auf 14 µl aufgefüllt. Die Probe wurde bei 95°C denaturiert, auf Eis gestellt, kurz anzentrifugiert und wieder auf Eis gegeben. Nach Zugabe von 5 µl Puffer und 2 µl Klenow-Enzym (1u/µl) wurden 4 µl [α -³²P] dCTP (3000 Ci/mmol) hinzupipettiert, dann 15 Minuten bei 37°C und 60 bis 90 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Abschließend wurde das Enzym durch Zugabe von 1 µl 0,5 M EDTA inaktiviert.

Um die freien Nukleotide von der DNA zu trennen, wurde die Probe nach dem Auffüllen mit 10/1 TE auf 50 µl über einem Molekularsieb gereinigt.

Zur Bestimmung der spezifischen Radioaktivität (cpm/µg) wurde von der markierten Probe ein Aliquot von 1 µl entnommen und dessen Cerenkow-Strahlung im Szintillationsphotospektrometer gemessen. Angestrebt wurde eine spezifische Aktivität von mindestens 8×10^8 cpm/µg DNA.

Material:

- „Megaprime DNA labelling system“ (Amersham, Braunschweig)
 - Primer solution
 - Puffer (dATP, dTTP, dGTP in Tris/HCl, β-Mercaptoethanol und MgCl₂)
 - Klenow-Enzym (1 u/µl)
- [α-³²P] dCTP (3000 Ci/mmol) (Amersham, Braunschweig)
- Molekularsieb: „Probe Quant™ G-50 Micro Columns“ (Amersham, Braunschweig)
- 0,5 M EDTA (Abschnitt 2.10.1.3)
- 10/1 TE (Abschnitt 2.10.2.5)
- Szintillationsphotospektrometer

2.10.2.8 Southern Blot Analyse

Um die unterschiedliche Expression bestimmter Gene quantitativ auswerten zu können, wurden die durch RT-PCR amplifizierten DNA-Fragmente auf Agarosegele aufgebracht und auf eine Nylonmembran transferiert, die mit radioaktiven Proben hybridisiert und abschließend mit dem Phosphor-Imager ausgewertet wurde. Der Aufbau des Versuches, die Prähybridisierung und Hybridisierung, die Waschschriffe und die Auswertung mittels Phosphor-Imager erfolgten wie unter „Northern Blot Analyse“ (Abschnitt 2.10.1.7) beschrieben.

Material:

Wie „Northern Blot Analyse“ (Abschnitt 2.10.1.7)

2.10.3 „Atlas cDNA Expression Array“

Dieses von der Firma Clontech, Heidelberg entwickelte System ermöglicht einen direkten Vergleich der Expressionsmuster von bis zu 588 verschiedenen Genen in unterschiedlichen Zellen.

Auf einer positiv geladenen Nylonmembran waren 588 verschiedene Maus cDNAs aufgebracht. Darunter befanden sich neun Haushaltsgene, die in allen Zellen relativ konstant exprimiert werden sollten sowie beispielsweise Phagen-DNA als Negativkontrolle. Jedes cDNA-Fragment ist 200 bp bis 600 bp lang und wurde von einem mRNA-Abschnitt amplifiziert, dem homologe Sequenzen, wie z.B. der Poly-A-Schwanz, fehlen.

Als Ausgangsmaterial diente Gesamt-RNA, die, wie in Abschnitt 2.10.1.2 (nach Clontech) beschrieben, aus Maus-Fibroblastenzelllinien gewonnen wurde.

Die Probe wurde, wie in Abschnitt 2.10.1.3 erläutert, von DNA-Verunreinigungen befreit. Um eine Hybridisierungsprobe zu erhalten, wurde die Gesamt-RNA in Gegenwart radioaktiver Nukleotide revers transkribiert.

Folgender Ansatz wurde als Mastermix pipettiert:

	<u>1fach</u>
5×Reaktionspuffer	2 µl
10×dNTP Mix	1 µl
[α - ³² P]dATP (3000 Ci/mmol; ganz frisch)	3,5 µl
DTT (100 mM)	0,5 µl
MMLV Reverse Transkriptase (50 u/µl)	1 µl

Zu 5 µg RNA (in 2 µl DEPC-H₂O gelöst) wurde 1 µl 10×CDS Primer Mix (Mischung aus spezifischen Primern für jedes Gen auf dem Array) gegeben. Die Probe wurde zwei Minuten bei 70°C inkubiert, weitere zwei Minuten bei 50°C, anschließend mit 8 µl des Mastermixes versetzt und für 25 Minuten erneut bei 50°C inkubiert. Gestoppt wurde die Reaktion durch Zugabe von 1 µl 10×Terminationsmix.

Durch Säulenchromatographie über eine Chroma Spin-200 DEPC-H₂O Säule wurden die freien Nukleotide und kleinen DNA-Fragmente von der markierten Probe abgetrennt. Dazu wurden die Säulen etwa eine Stunde vor dem Gebrauch aus dem Kühlschrank genommen, aufgeschüttelt und verwendet wenn sich das Säulenmaterial abgesetzt hatte. Die Kappen wurden entfernt, so daß nach dem Herauslaufen der Flüssigkeit die radioaktiv markierte cDNA-Probe vorsichtig auf die Membran pipettiert werden konnte. Die Säulen wurden mit 290 µl deionisiertem H₂O gespült bevor die

Box 2:

ExpressHyb Hybridisierungslösung
 Chroma Spin-200 DEPC-H₂O Columns

Box 3:

2 Atlas cDNA Expression Array Membranen

• Prähybridisierungslösung:

	<u>Endkonzentration</u>
ExpressHyb Hybridisierungslösung	5 ml (71°C)
Denaturierte Heringsperma-DNA (10 mg/ml)	150 µl

• 10×Denaturierungslösung:

	<u>Endkonzentration</u>
NaOH (Merck, Darmstadt)	1M
EDTA (Roth, Karlsruhe)	10 mM

• 2×Neutralisationslösung:

	<u>Endkonzentration</u>
NaH ₂ PO ₄ •1H ₂ O (Merck, Darmstadt)	27,6 g
Mit H ₂ O auf 200 ml auffüllen und pH 7,0 mit 10 N NaOH einstellen.	

• 20×SSC:

	<u>Endkonzentration</u>	<u>1000 ml</u>
NaCl (Merck, Darmstadt)	3 M	175,3 g
Na ₃ Citrat•2H ₂ O (Merck, Darmstadt)	0,3 M	88,2 g
Mit H ₂ O auf 1 Liter auffüllen und pH 7,0 mit Zitronensäure einstellen.		

• Waschlösung I:

	<u>Endkonzentration</u>	<u>100 ml</u>
20×SSC	2×	10 ml
Frisch filtrierte SDS-Lösung (10%)	1%	1 ml
H ₂ O	auf 100 ml	89 ml

• Waschlösung II:

	<u>Endkonzentration</u>	<u>100 ml</u>
20×SSC	0,1×	500 µl
Frisch filtrierte SDS-Lösung (10%)	0,5%	5 ml
H ₂ O	auf 100 ml	94,5 ml

- [α-³²P]dATP (3000 Ci/mmol) (Amersham, Braunschweig)
- Denaturierte Heringsperma DNA (10 mg/ml) (Boehringer, Mannheim)
- Kodak BioMax MR Film

2.11 Zellbiologische Methoden

2.11.1 Arbeiten in der Zellkultur

Zellkulturarbeiten wurden unter einer Sicherheitswerkbank unter sterilen Bedingungen durchgeführt. Die Lösungen wurden ausschließlich für die Zellkultur verwendet. Sofern sie anzusetzen waren, geschah dies mit bidestilliertem autoklavierten Wasser. Die benutzten Glaswaren wurden separat gereinigt, um eine Verunreinigung mit Detergenzien zu vermeiden. Zellen wurden im Inkubationsschrank bei 37°C in mit Wasser gesättigter Atmosphäre und unter 5% CO₂-Begasung kultiviert.

2.11.1.1 Auftauen von Zellen

Die Zellen wurden bei -195°C im Stickstofftank aufbewahrt. Zur Kultivierung wurden diese in ein mit Medium gefülltes Reaktionsgefäß überführt und für fünf Minuten bei 1.000 UpM zentrifugiert. Nach Entnahme des Überstandes wurden die Zellen in der entsprechenden Menge frischen Mediums (z.B. 12 ml für eine 75 cm² Kulturflasche) resuspendiert und im Inkubationsschrank inkubiert.

Material:

- Fibroblastenmedium:

	<u>Endkonzentration</u>	<u>450 ml</u>
DMEM Glutamax*	44,4%	200 ml
HAM's F10*	44,4%	200 ml
FCS*	10,0%	45 ml
Penicillin/Streptomycin (100×)*	1,0%	5 ml

* (Gibco, Karlsruhe)

Das Fibroblastenmedium wird bei 4°C aufbewahrt und ist so mehrere Monate haltbar.

2.11.1.2 Passagieren von Zellen

Zu passagierende Zellen wurden nach dem Absaugen des Mediums zweimal mit 1×PBS gewaschen und anschließend in einer Trypsin-EDTA-Lösung inkubiert. Die Zellen wurden durch leichtes Anschlagen der Kulturflasche an die Tischkante vom Boden abgelöst, in frisches Medium aufgenommen und in der gewünschten Verdünnung auf neue Kulturflaschen verteilt.

Material:

- 1×PBS:

	<u>1000 ml</u>
NaCl (Merck, Darmstadt)	8,00 g
KCl (Merck, Darmstadt)	0,20 g
NaH ₂ PO ₄ •7H ₂ O (Merck, Darmstadt)	1,15 g
KH ₂ PO ₄ (Merck, Darmstadt)	0,20 g

In einem Liter bidestilliertem autoklavierten Wasser lösen. Der pH-Wert sollte dann 7,4 betragen.

- Trypsin-EDTA-Lösung (Gibco, Karlsruhe)
- Fibroblastenmedium (Abschnitt 2.11.1.1)

2.11.1.3 Einfrieren von Zellen

Zellen wurden trypsinisiert und nach Zugabe von 8 ml Fibroblastenmedium in einem Reaktionsgefäß für fünf Minuten bei 1.000 UpM zentrifugiert. Der Überstand wurde abgesaugt, die Zellen in einem Gemisch aus 1350 µl Medium und 150 µl DMSO (Endkonzentration von 10%) aufgenommen und in vorgekühlte Kryoröhrchen (Gibco, Karlsruhe) gegeben. Zum langsameren Abkühlen wurden die Röhrchen in Styropor verpackt und bei -80°C eingefroren. Erst am folgenden Tag wurden die Zellen in den Stickstofftank (-195°C) überführt.

Material:

- 1×PBS (Abschnitt 2.11.1.2)
- Trypsin-EDTA-Lösung (Abschnitt 2.11.1.2)
- Fibroblastenmedium (Abschnitt 2.11.1.1)
- DMSO (Sigma, München)

2.11.2 Umgang mit 3T3L1-Fibroblastenzellen

Das Auftauen, Passagieren und Einfrieren der Zellen erfolgte methodisch wie in den Abschnitten 2.11.1.1 bis 2.11.1.3 beschrieben. Die Zusammensetzung des Mediums unterschied sich jedoch von der des Fibroblastenmediums.

Material:• 3T3L1-Zuchtmedium (Medium I):

	<u>Endkonzentration</u>	<u>500 ml</u>
DMEM Glutamax*	88%	440 ml
FCS*	10%	50 ml
Penicillin/Streptomycin (100×)*	1%	5 ml
Glutamin*	2 mM	5 ml

* (Gibco, Karlsruhe)

Das Medium wird bei 4°C aufbewahrt und ist so mehrere Monate haltbar.

2.11.2.1 Differenzierung von 3T3L1-Fibroblastenzellen zu Adipozyten

Bei der Differenzierung von 3T3L1-Zellen müssen einige Besonderheiten beachtet werden, damit die Adipogenese stattfinden kann:

- 1) Die Differenzierung sollte in Falcon-Primaria Schalen erfolgen.
- 2) Die Zellen, die zur Differenzierung verwendet werden, sollten sich in einer möglichst geringen Passagenzahl befinden.
- 3) Es muß bei der Zucht darauf geachtet werden, daß sich die Zellen nicht berühren.

Zur Differenzierung wurden die 3T3L1-Zellen konfluent gezüchtet. Drei Tage nach Erreichen der Konfluenz wurden die Zellen für vier Tage in Medium II inkubiert, wobei dieses am zweiten Tag erneuert wurde. Anschließend wurden die Zellen für weitere vier Tage in Medium III gehalten. Die Differenzierung hat nun stattgefunden.

Material:• Medium II:

	<u>Endkonzentration</u>	<u>200 ml</u>
DMEM Glutamax*	67,5%	135 ml
HAM's F12*	22,5%	45 ml
FCS*	10%	20 ml
Insulin (4mg/ml)*	10 µg/ml	0,5 ml
3-Isobutyl-1-Methylxanthin (IBMX) (113mM) (Sigma, München)	0,5 mM	880 µl
(250 mg IBMX in 7 ml Ethanol auf 37°C erwärmen und mit 3 ml H ₂ O versetzen.)		
Dexamethason (10 ⁻² M) (Schering, Berlin)	1 µM	20 µl

* (Gibco, Karlsruhe)

- Medium III:

	<u>Endkonzentration</u>	<u>200 ml</u>
DMEM Glutamax*	67,5%	135 ml
HAM's F12*	22,5%	45 ml
FCS*	10%	20 ml
Insulin (4mg/ml)*	10 µg/ml	0,5 ml

* (Gibco, Karlsruhe)

- Falcon-Primaria Kulturschalen (75cm²) (Becton Dickensen, Franklin Lakes, USA)

2.11.2.2 Überprüfung der Differenzierung zu Adipozyten

Um zu überprüfen, ob die Zellen zu Adipozyten differenziert waren, wurden sie mit Öl-Rot-O angefärbt. Dieser Farbstoff läßt Lipide rot erscheinen. Anschließend wurden die Zellkerne mit Hämalaun gebläut, so daß eine Aussage über das Verhältnis der differenzierten Zellen (rot = Lipide) zu der Gesamtzellzahl (blau = Zellkerne) möglich war.

Formolfixieren der Zellen

Nachdem das Medium aus der Kulturflasche abgesaugt worden war, wurden die Zellen zweimal mit 1×PBS gewaschen und mit 3,7% Formaldehyd bedeckt. Nach einer Inkubationszeit von 20 Minuten wurde das Formaldehyd abgesaugt und die Zellen erneut zweimal mit 1×PBS gewaschen.

Öl-Rot-O Färbung

Die Zellen wurden mit destilliertem Wasser abgespült, fünf Minuten in 60%igem Iso-propanol inkubiert und anschließend zehn Minuten in frisch filtrierter Färbelösung (Öl-Rot-O) gefärbt. Es folgte eine kurze Inkubation in 60%igem Isopropanol. Abschließend wurden die Zellen mit destilliertem Wasser abgespült.

Kernfärbung mit Hämalaun

Die Kernfärbung begann mit einer drei- bis fünfminütigen Inkubation der Zellen in Hämalaun, bevor sie fünf bis zehn Minuten in Leitungswasser gebläut wurden.

Material:

- Stammlösung Öl-Rot-O:
0,5 g Öl-Rot-O gelöst in 100 ml 99%igem Isopropanol
- Gebrauchslösung Öl-Rot-O:

	<u>Endkonzentration</u>	<u>20 ml</u>
Stammlösung	60%	12 ml
Destilliertes H ₂ O	40%	8 ml

Die Lösung muß vor dem Gebrauch 24 Stunden gestanden haben.

- Formaldehyd (3,7%) (Merck, Darmstadt)
- Isopropanol (Merck, Darmstadt)
- 1×PBS (Abschnitt 2.11.1.2)
- Öl-Rot-O (Sigma, München)
- Hämalan (Merck, Darmstadt)

3 ERGEBNISSE

3.1 Vergleich der Genexpression in Sp3-defizienten und Wildtyp-Maus-Fibroblastenzellen

3.1.1 Expression der GFR (Growth factor receptor), Integrin β , Zyxin und Kollagenase IV mRNA in Sp3-defizienten und Wildtyp-Fibroblastenzellen

Die Fragestellung, die sich aus der Zielsetzung dieser Arbeit ergibt, ist folgende: Die Expression welcher Gene ist von der Anwesenheit von Sp3 abhängig?

Im Rahmen der Diplomarbeit von Heike Göllner (08/98) wurde am Institut für Molekularbiologie und Tumorforschung der Philipps-Universität Marburg die Expression zahlreicher Gene in differenzierten Wildtyp- mit der in differenzierten Sp3-defizienten embryonalen Stammzellen unter Verwendung eines kommerziell erhältlichen cDNA-Arrays verglichen. Hierbei wurden unter anderem die folgenden vier Gene ermittelt, die in differenzierten Sp3-defizienten embryonalen Stammzellen stärker exprimiert werden als in differenzierten Wildtyp-embryonalen Stammzellen.

1) **GFR (Growth factor receptor; auch: Tyrosin Kinase Rezeptor):** (mRNA: 2065 Nukleotide)

Dieses Gen ist an zellulären Wechselwirkungen beteiligt, die die Proliferation und Differenzierung von verschiedenen Zelltypen fördern (Larsson-Blomberg *et al.*, 1994).

Auf der Membran des cDNA-Arrays konnte für die Hybridisierung mit cDNA aus Sp3-defizienten Zellen ein 3,3fach stärkeres Signal ermittelt werden als für die Hybridisierung mit cDNA aus Wildtyp-Zellen.

2) **Integrin β :** (mRNA: 3597 Nukleotide)

Beta 1 Integrine sind Zell-Oberflächen-Rezeptoren, die Wechselwirkungen zwischen Zellen oder zwischen Zelle und Matrix vermitteln (Fassler *et al.*, 1995).

Die Integrin β mRNA wird in differenzierten Sp3-defizienten embryonalen Stammzellen etwa 3fach stärker exprimiert als in differenzierten Wildtyp-embryonalen Stammzellen.

3) Kollagenase IV: (mRNA: 2800 Nukleotide)

Bei diesem Enzym handelt es sich um ein Matrixprotein, welches bei der Umwandlung extrazellulärer Matrixkomponenten während der Entwicklung eine Rolle spielt (Qin *et al.*, 1998).

Bei der Kollagenase IV ergab sich ebenfalls ein 3fach stärkeres Signal für die Hybridisierung mit cDNA aus Sp3-defizienten Zellen, verglichen mit der Hybridisierung mit cDNA aus Wildtyp-Zellen.

4) Zyxin: (mRNA: 2056 Nukleotide)

Dieses Gen kodiert für ein Phosphoprotein, das unter anderem für den Aufbau der Zellkontakte eine große Rolle spielt (Nix *et al.*, 1997).

Auf der Membran des cDNA-Arrays zeigt sich für die Hybridisierung mit cDNA aus Sp3-defizienten Stammzellen ein 2,5fach stärkeres Signal als für die Hybridisierung mit cDNA aus Wildtyp-Stammzellen.

In der vorliegenden Arbeit sollte die mRNA Expression der oben beschriebenen Gene in einem weiteren Zellkultursystem untersucht werden. Hierbei handelte es sich um Fibroblastenzelllinien (MEFs = mouse embyronic fibroblasts), die aus Sp3 (-/-)-, Sp3 (+/-)- und Wildtyp-Mausembryonen (Tag E13.5) etabliert worden waren.

Aus den Fibroblastenzellen konnte Gesamt-RNA in verschiedenen Stadien (subkonfluent und konfluent) extrahiert werden (Abschnitt 2.10.1.2). Im subkonfluenten Zustand der Zellen (Zellen berühren sich in der Kulturschale nicht) werden andere Gene exprimiert als im konfluenten Zustand (Zellrasen ist dicht und der Boden der Kulturschale nicht mehr zu sehen) (Abbildung 3.1). In den verschiedenen Stadien wurde auch eine voneinander abweichende Morphologie der subkonfluent gewachsenen und der konfluent gewachsenen Zellen festgestellt.

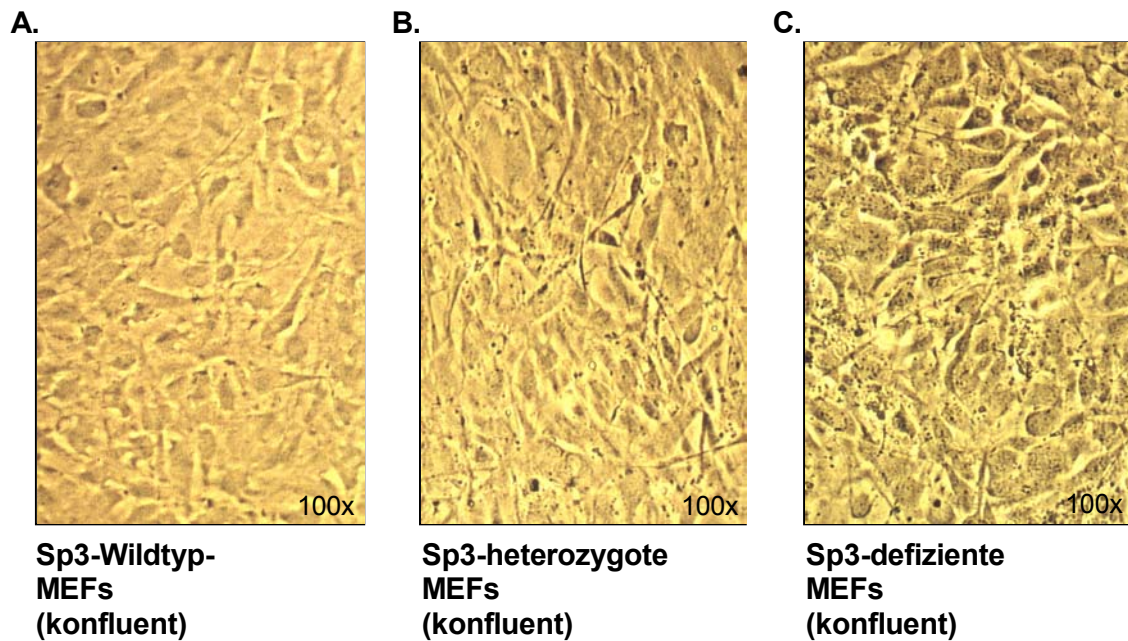


Abb. 3.1 A-C: Konfluent gewachsene Maus-Fibroblastenzellen in Kultur.

Die Photos wurden mit 100facher Vergrößerung angefertigt.

Beide Feststellungen gaben Anlaß dazu, für einen Northern Blot zur Untersuchung der Expression von GFR, Integrin β , Kollagenase IV und Zyxin mRNA sechs unterschiedliche RNA-Quellen zu wählen. Es wurde sowohl Gesamt-RNA verwendet, die aus subkonfluent gewachsenen Sp3-defizienten, Sp3-heterozygoten und Wildtyp-Zellen gewonnen wurde als auch Gesamt-RNA aus konfluent gewachsenen Sp3(-/-), Sp3(+/-) und Wildtyp-Zellen (Abbildung 3.1).

Die Gesamt-RNA wurde in einem Agarose-Formaldehydgel aufgetrennt (Abschnitt 2.10.1.4), auf eine Nylonmembran transferiert und diese mit radioaktiv markierten cDNA-Sonden (Abschnitt 2.10.2.7) der Gene GFR, Integrin β , Kollagenase IV und Zyxin hybridisiert (cDNAs wurden mittels RT-PCR hergestellt (Abschnitt 2.10.1.6)). Anschließend wurde ein Autoradiogramm angefertigt, auf dem die untersuchten Gene als Signale zu erkennen waren (Abbildung 3.2). Vor der Auswertung des Versuches mußte kontrolliert werden ob die auf das Gel aufgetragenen RNA-Mengen gleich waren, um unterschiedliche Bandenintensitäten nicht falsch zu interpretieren. Hierzu wurden die Membranen nach der Hybridisierung mit den genspezifischen Sonden mit einem radioaktiv markierten Oligonukleotid hybridisiert, das an die 18S-RNA bindet (Abschnitt 2.10.1.8). Da die Expression der 18S-RNA in allen Zellen vergleichbar ist, kann bei gleich starkem Signal davon ausgegangen werden, daß die auf das Gel aufgetragenen RNA-Mengen gleich groß waren.

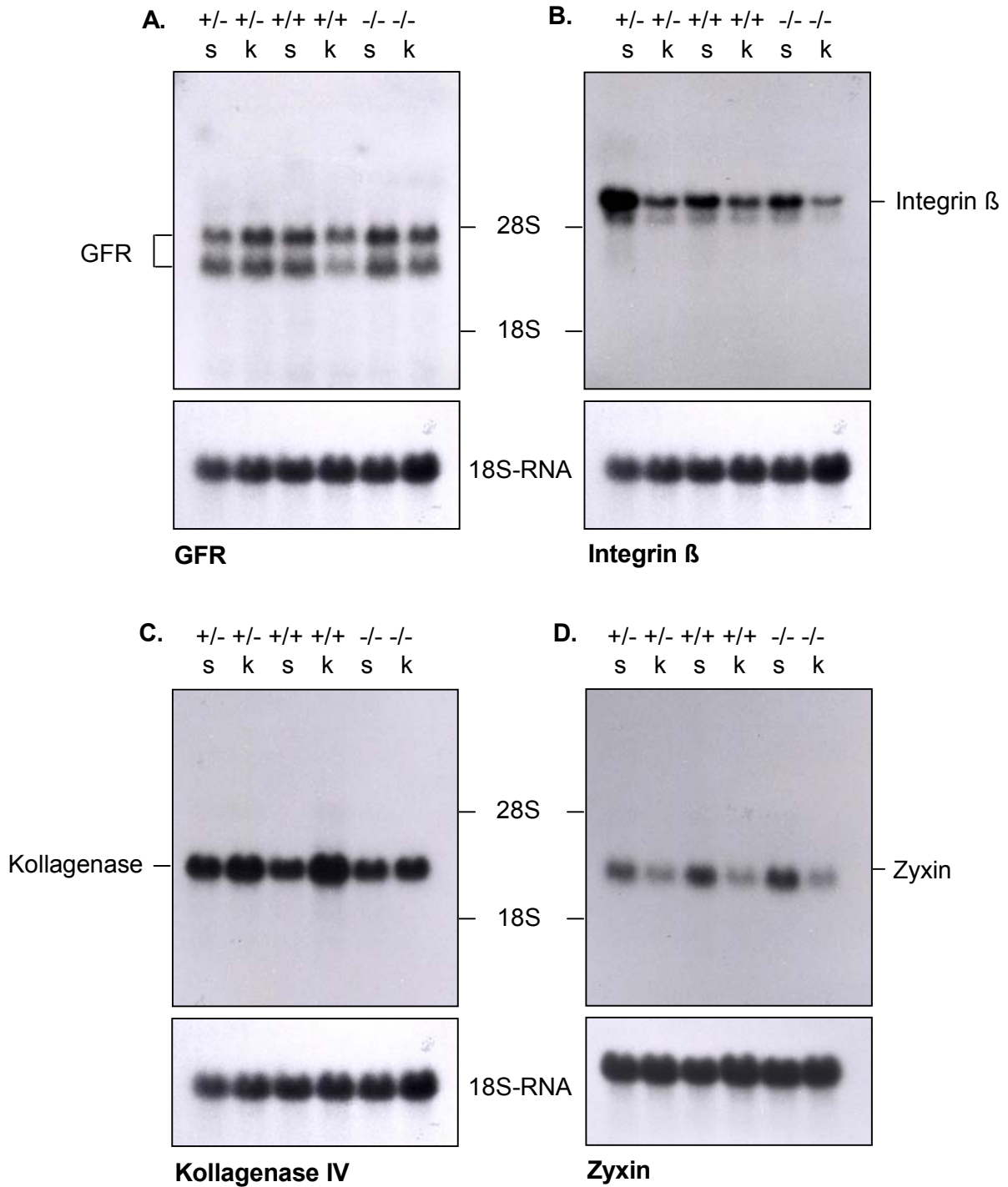


Abb. 3.2 A-D: Northern Blot mit GFR, Integrin β , Kollagenase IV bzw. Zyxin cDNA als Hybridisierungsproben

+/-: RNA aus Sp3-heterozygoten Fibroblastenzellen; +/+ : RNA aus Wildtyp-Fibroblastenzellen; -/-: RNA aus Sp3-defizienten Fibroblastenzellen; s: subkonfluent; k: konfluent.
 Es wurden je 10 μ g der aus Maus-Fibroblastenzellen gewonnenen Gesamt-RNA für den Northern Blot eingesetzt. Zur Hybridisierung wurden $1,5 \times 10^6$ cpm/ml Hybridisierungslösung der mittels RT-PCR hergestellten und radioaktiv markierten cDNA-Sonden GFR, Integrin β , Kollagenase IV und Zyxin eingesetzt (spezifische Aktivität von 2×10^9 cpm/ μ g). Als Bezugspunkt für die verwendeten RNA-Mengen diente die Hybridisierung mit 5×10^5 cpm/15 ml Hybridisierungslösung einer Oligonukleotid-Sonde gegen die 18S-RNA, die jeweils unter den einzelnen Autoradiogrammen dargestellt ist.

Der Abbildung 3.2 ist zu entnehmen, daß die GFR, Integrin β , Kollagenase IV und Zyxin mRNA in den drei verwendeten Zelllinien sowohl unter konfluenten als auch unter subkonfluenten Bedingungen der Zellen nachweisbar ist, und daß die auf das Gel aufgetragenen RNA-Mengen gleich groß waren. Es können keine auffallenden Unterschiede in der Expression der GFR, Integrin β und Zyxin mRNA in Sp3-defizienten, Sp3-heterozygoten und Wildtyp-Fibroblastenzellen festgestellt werden. Kollagenase IV mRNA scheint in konfluenten Sp3-defizienten Fibroblastenzellen schwächer exprimiert zu sein als in konfluenten Wildtyp-Zellen. Weitere Unterschiede im Expressionsniveau können nur zwischen konfluenten und subkonfluenten Zellen beobachtet werden (besonders deutlich in Abbildung 3.2 D). Sie sind unabhängig von der An- bzw. Abwesenheit von Sp3.

Um eine quantitative Aussage über die Signale auf den Membranen machen zu können, wurden diese mit dem Phosphor-Imager ausgewertet. Die Tabelle 3.2 zeigt die ermittelten Werte, die für die gemessene relative Radioaktivität stehen. Von diesen Werten wurde ein Hintergrundsignal abgezogen, das für jede Exposition einzeln ermittelt wurde. Von der mit GFR cDNA hybridisierten Membran wurde ein Wert von 30 subtrahiert, von der mit Integrin β cDNA hybridisierten Membran ein Wert von 70, von der mit Kollagenase IV cDNA hybridisierten Membran ein Wert von 100 und von der mit Zyxin cDNA hybridisierten Membran wurde ein Wert von 65 abgezogen. Die Expression der 18S-RNA sollte in allen Zelllinien gleich stark sein. Um das zu überprüfen, wurden die mit dem Phosphor-Imager ermittelten Daten (Tabelle 3.2) dieser Oligonukleotid-Signale in Sp3-defizienten Fibroblastenzellen und in Wildtyp-Fibroblastenzellen ins Verhältnis zueinander gesetzt. Die Werte für die Intensitäten der Signale für die GFR, Integrin β , Kollagenase IV und Zyxin mRNA mußten um das errechnete Verhältnis (z.B.: Membran I RNA aus konfluent gewachsenen Fibroblastenzellen: 1,2) korrigiert werden (Tabelle 3.2).

Der Tabelle 3.1 kann entnommen werden, daß die GFR und die Integrin β mRNA Expression in subkonfluent (GFR) bzw. konfluent (Integrin β) gewachsenen Sp3-defizienten Fibroblastenzellen, verglichen mit Wildtyp- und Sp3-heterozygoten Fibroblastenzellen, geringfügig erhöht ist (1,6 bzw. 1,5fach). Dieses Ergebnis könnte eine Regulation der Gene durch Sp3 bedeuten. Wobei nicht ausgeschlossen werden kann, daß es sich bei so geringen Unterschieden um natürliche Schwankungen in der Expression der Gene in den einzelnen Fibroblastenzelllinien handelt. Die Kollagenase IV mRNA hingegen, wird in Sp3-defizienten konfluenten Fibroblastenzellen verglichen mit Wildtyp- bzw. Sp3-heterozygoten konfluenten Fibroblastenzellen deutlich (3fach)

vermindert exprimiert. Die Expression der Zyxin mRNA bleibt unbeeinflusst von der Abwesenheit des Transkriptionsfaktors Sp3.

Name des Gens/ Stadium der Zelle	Intensität des Wildtyp- Fibroblasten- zell- signals	Intensität des Sp3- defizienten Fibroblasten- zell- signals	Verhältnis des Sp3- defizienten zum Wildtyp- Fibroblasten- zell- signal	Angleich an die 18S- RNA- Werte*
GFR (subkonfluent)	106	185	1,8	1,6 (1,1)
GFR (konfluent) Membran I	97	147	1,5	1,3 (1,2)
Integrin β (subkonfluent)	1890	1980	1,0	0,9 (1,1)
Integrin β (konfluent) Membran I	1263	714	1,8	1,5 (1,2)
Kollagenase IV (subkonfluent)	2366	2308	1,0	0,9 (1,1)
Kollagenase IV (konfluent) Membran I	6097	2651	0,4	0,3 (1,2)
Zyxin (subkonfluent)	1678	1754	1,0	1,0 (1,1)
Zyxin (konfluent) Membran II	827	779	0,9	1,0 (0,9)

Tab. 3.1: Phosphor-Imager-Auswertung der Northern Blot-Signale von GFR, Integrin β, Kollagenase IV und Zyxin mRNA in Sp3-defizienten und Wildtyp-Fibroblastenzellen

Die in der Tabelle aufgelisteten Werte stehen für die mit dem Phosphor-Imager ermittelte relative Radioaktivität.

* Die ermittelten Intensitäten der 18S-RNA-Signale in Sp3-defizienten und Wildtyp-Fibroblastenzellen werden ins Verhältnis zueinander gesetzt (letzte Spalte Wert in Klammern) und mit den Werten für das Verhältnis vom Sp3-defizienten zum Wildtyp-Fibroblastenzell-Signal verrechnet (fett gedruckt).

Membran/ Stadium der Zelle	Intensität des Wildtyp- Fibroblastenzell- signals	Intensität des Sp3-defizienten Fibroblastenzell- signals	Verhältnis des Sp3-defizienten zum Wildtyp- Fibroblastenzell- signal
Membran I (subkonfluent)	1952	2173	1,1
Membran I (konfluent)	1998	2458	1,2
Membran II (subkonfluent)	4726	5210	1,1
Membran II (konfluent)	5143	4829	0,9

Tab. 3.2: Phosphor-Imager-Auswertung der 18S-RNA-Signale

Die in der Tabelle aufgelisteten Werte stehen für die mit dem Phosphor-Imager ermittelte relative Radioaktivität.

Als Bezugspunkt für die eingesetzten RNA-Mengen im Northern Blot dient die 18S-RNA, von der man annehmen kann, daß sie in allen Zellen gleich stark exprimiert wird und nicht von der Anwesenheit von Sp3 abhängig ist.

3.1.2 Identifizierung potentieller Zielgene des Transkriptionsfaktors Sp3 in Fibroblastenzellen unter Verwendung eines kommerziell erhältlichen cDNA-Arrays

Im vorangegangenen Abschnitt 3.1.1 konnte gezeigt werden, daß das Kollagenase IV-Gen ein potentielles Zielgen des Transkriptionsfaktors Sp3 darstellt. Es ist anzunehmen, daß dies nicht das einzige Gen ist, dessen Expression von der Anwesenheit von Sp3 beeinflusst wird. Deshalb wurde eine große Anzahl von Genen mit einem kommerziell erhältlichen „Atlas Mouse cDNA Expression Array“ der Firma Clontech, Heidelberg untersucht.

Bei diesem cDNA-Array sind 588 verschiedene Maus cDNAs von 200 bp bis 600 bp Länge auf eine positiv geladene Nylonmembran aufgebracht (Abbildung 3.3). Darunter befinden sich neun Haushaltsgene (Abbildung 3.3 im Feld G), die als Positivkontrollen dienen sollten, da sie in allen Zellen exprimiert werden. Hierbei handelt es sich um Ubiquitin (G5), Phospholipase A2b (G6), Hypoxanthin Phosphoribosyl Transferase (G7), Glycerinaldehyd 3-Phosphat Dehydrogenase (G12), Myosin 1 (G13), Ornithin Decarboxylase (G14), β -Aktin (G19), Calcium bindendes Protein Cab45 (G20) und das ribosomale Protein S29 (G21). Als Negativkontrollen (Abbildung 3.3 im Feld G) dienen drei verschiedene DNA-Fragmente aus prokaryontischen Organismen: M13 mp18(+) Strang DNA (G2, G9, G16), λ -DNA (G3, G10, G17) und pUC18 (G1, G8, G15).

Als Ausgangsmaterial für die Hybridisierung der Array-Membranen diene Gesamt-RNA, die wie unter Abschnitt 2.10.1.2 beschrieben aus Sp3-defizienten und Wildtyp-Maus-Fibroblastenzellen extrahiert worden war. Die von DNA-Verunreinigungen befreite RNA (Abschnitt 2.10.1.3) wurde in cDNA umgeschrieben (Abschnitt 2.10.3), mit ^{32}P (α ^{32}P dATP) radioaktiv markiert (Abschnitt 2.10.3) und als Hybridisierungsprobe verwendet (Abbildung 3.4 A und B).

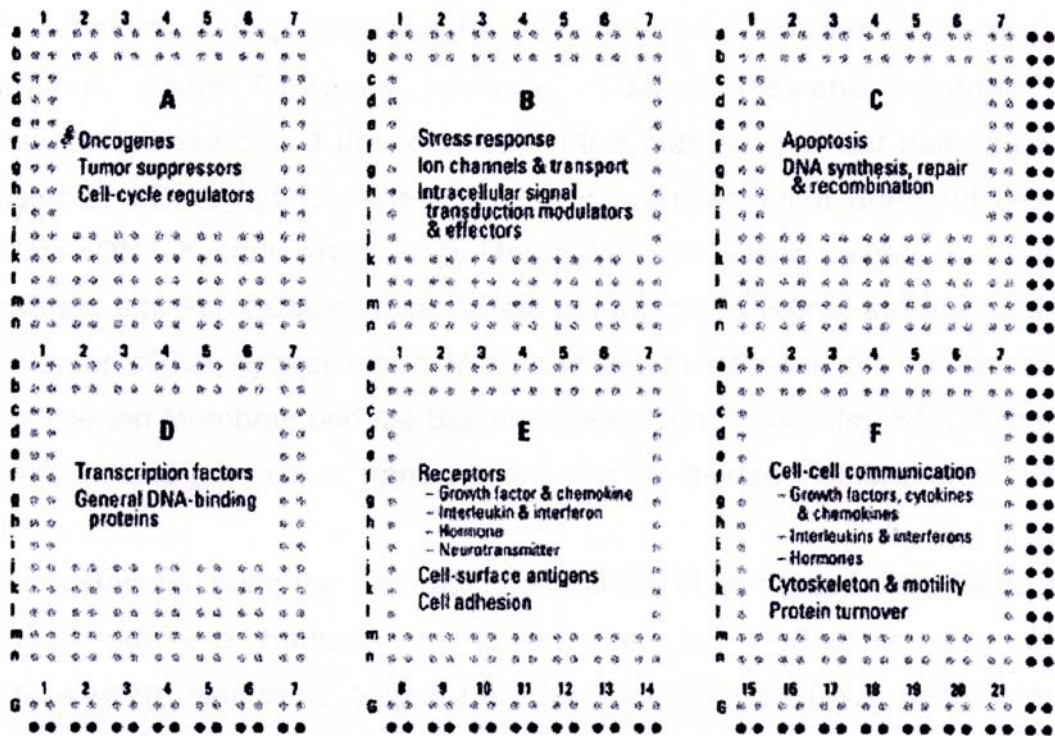


Abb. 3.3: Lage der Gene auf dem „Atlas Mouse cDNA Expression Array“ (Clontech, Heidelberg)

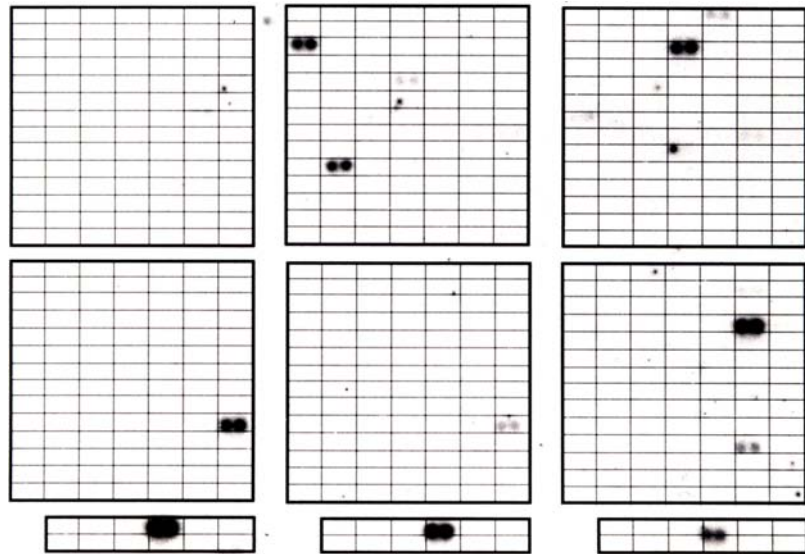
Im **Feld A** sind Onkogene, Tumorsuppressorgene und Zellzyklusregulatorgene aufgetragen. **Feld B** enthält Stressgene, Ionenkanalgene, Transportergene, Intrazelluläre Signalmodulator und -effektorgene. Im **Feld C** sind Apoptosegene, DNA-Synthese-, Reparatur- und Rekombinationsgene fixiert. Das **Feld D** zeigt Gene von Transkriptionsfaktoren und allgemeinen DNA-bindenden Proteinen. Im **Feld E** sind Rezeptorgene, Zelloberflächenantigengene und Zelladhäsionsgene aufgetragen. Im **Feld F** befinden sich verschiedene Zell-Zell-Kommunikationsgene. Neun Haushaltsgene dienen als Bezugspunkt für die verwendete mRNA-Menge (**mit G bezeichnete Felder**), während verschiedene Plasmid- und Bakteriophagen-DNAs als Negativkontrollen (**mit G bezeichnete Felder**) verwendet werden können, um die Spezifität der Hybridisierung zu überprüfen. Jedes PCR-amplifizierte cDNA-Fragment ist 200-600 bp lang und zweimal auf die Membran aufgetragen (je 10 ng). Eine vollständige Liste der auf die Membran aufgetragenen Gene kann im Internet unter folgender Adresse eingesehen werden: <http://www.clontech.com/archive/JAN98UPD/Atlaslist.html>.

Auf den Autoradiogrammen ergaben insgesamt 24 von 588 Genen ein Signal. Die Expression von elf Genen (Prothymosin α , Zyxin, Butyrat Reaktionsfaktor 1, Egr-1 Zinkfinger regulierendes Protein, Integrin β , Neuroleukin, Nexin 1 Protease, Serin Protease Inhibitor, TIMP-2 Gewebe Inhibitor der Metalloproteinase-2 und ribosomales Protein S29) ist nur auf dem mit Sp3-defizienter cDNA hybridisierten Array nachweisbar, nicht aber auf der mit Wildtyp-cDNA hybridisierten Array-Membran. Zehn Gene zeigen ein deutlich stärkeres, ein Gen (Kollagenase IV) ein schwächeres Signal auf der mit Sp3-defizienter cDNA hybridisierten Membran gegenüber der mit Wildtyp-cDNA hybridisierten Membran und die Signale zweier Gene (Ubiquitin, STAT3 = signal transducer and activator of transcription) sind auf beiden Membranen ungefähr gleich.

Aus der Beschreibung der Autoradiogramme geht hervor, daß viele Gene eine deutlich stärkere Signalintensität auf der mit Sp3-defizienter cDNA hybridisierten Membran gegenüber der mit Wildtyp-cDNA hybridisierten Membran zeigen. Im Gegensatz dazu ist die Expression der Kollagenase IV mRNA beispielsweise auf dem mit Sp3-defizienter cDNA hybridisierten Array schwächer als auf dem Array, für dessen Hybridisierung Wildtyp-cDNA verwendet wurde.

Und das Signal für das Ubiquitin-Gen (eines der Haushaltsgene) ist auf beiden Membranen gleich stark, während die Signale für die anderen Haushaltsgene auf der mit Sp3-defizienter cDNA hybridisierten Membran deutlich stärker sind als auf der mit Wildtyp-cDNA hybridisierten Membran. Es ist nicht möglich, die Haushaltsgene als Anhaltspunkt für die Auswertung des Versuches zu wählen, da sie in Sp3-defizienten und in Wildtyp-Maus-Fibroblastenzellen nicht alle gleich stark exprimiert werden (Abbildung 3.4, Feld G). Bei der Auswertung dieses Versuches kommt es also zu Schwierigkeiten bezüglich der Wahl eines Bezugspunktes für die erhaltenen Ergebnisse.

A. Sp3-defiziente Fibroblastenzellen



B. Wildtyp-Fibroblastenzellen

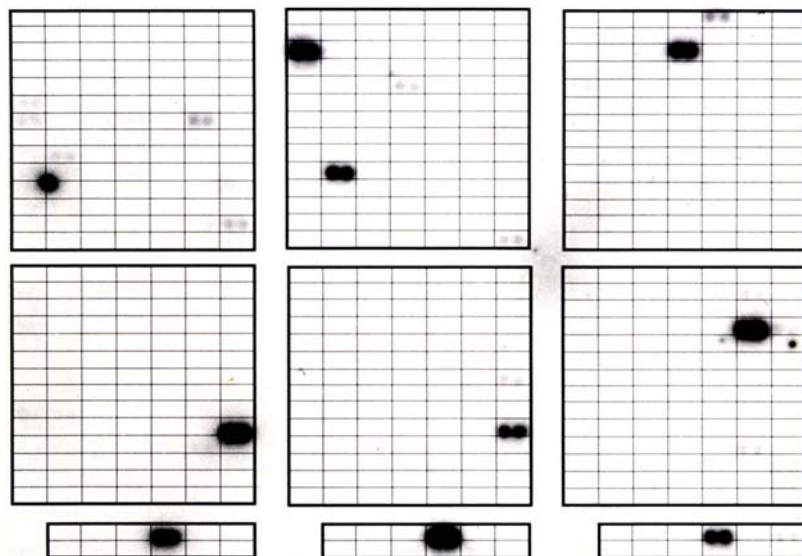


Abb. 3.4 A und B: Autoradiogramm des cDNA-Arrays (Clontech, Heidelberg) nach der Hybridisierung mit ^{32}P -markierter cDNA

Für die radioaktive Markierung der Sonden wurden 5 μg Gesamt-RNA aus Sp3-defizienten (B) bzw. Wildtyp-Fibroblastenzellen (A) verwendet, die mittels reverser Transkription in cDNA umgeschrieben wurden. Von der radioaktiv markierten cDNA wurden 2×10^6 cpm/ml Hybridisierungslösung eingesetzt.

Um zu klären, wie das Ergebnis des cDNA-Array-Versuches interpretiert werden muß, wurde die mRNA Expression von zwei auf dem cDNA-Array detektierbaren Genen (Ubiquitin und HSP 84) exemplarisch mit einer weiteren Methode, der RT-PCR, untersucht.

3.1.2.1 Untersuchung der Expression von Ubiquitin und HSP 84 mRNA in Sp3-defizienten und Wildtyp-Fibroblastenzellen mittels RT-PCR

Bei den zwei exemplarisch ausgewählten Genen, deren Expression mittels RT-PCR überprüft werden sollte, handelte es sich um das Ubiquitin- und das HSP 84-Gen (heat shock protein 84 kDa). Das Ubiquitin-Gen zeigte auf den beiden Array-Membranen kaum einen Unterschied in der Signalintensität, während das HSP 84-Gen auf dem mit Sp3-defizienter cDNA hybridisierten Array ein deutlich stärkeres Signal zeigte als auf der mit Wildtyp-cDNA hybridisierten Membran.

Für die reverse Transkriptase-Polymerase Kettenreaktion (RT-PCR) wurde die gleiche mit DNase I behandelte Gesamt-RNA aus Maus-Fibroblastenzellen verwendet wie für den cDNA-Array. Die Primer wurden so gewählt, daß für HSP 84 bzw. Ubiquitin charakteristische Sequenzen von 270 bp (HSP 84) bzw. 240 bp (Ubiquitin) amplifiziert wurden. Als Bezugspunkt für die eingesetzten RNA-Mengen diente die gleichzeitige Untersuchung der HPRT (Hypoxanthin Phosphoribosyl Transferase) mRNA Expression. Von diesem Gen ist aus vorangegangenen Versuchen bekannt, daß es in Sp3(-/-)-Fibroblastenzellen vergleichbar exprimiert wird wie in Wildtyp-Fibroblastenzellen (persönliche Mitteilung Prof. Dr. Guntram Suske; Abschnitt 3.3.1).

Aus den Reaktionsansätzen wurden Aliquots von je 3 µl pro Ansatz nach 18, 20, 22, 25, 27, 30 und 35 Zyklen entnommen, die cDNA in einem 1,8%igen Agarosegel aufgetrennt und photographiert (Abbildung 3.5). Die RT-PCR-Reaktion ist mit zunehmenden Zykluszahlen immer mehr abgesättigt. Aus diesem Grund ist eine Entnahme von Aliquots in Zykluszahlen höher als 35 nicht sinnvoll.

Im Widerspruch zu anderen Versuchen mit dem HPRT-Gen als Bezugspunkt für die verwendeten cDNA-Mengen (Abschnitt 3.2.1) scheint die HPRT mRNA in Sp3-defizienten Fibroblastenzellen stärker exprimiert zu werden als in Wildtyp-Fibroblastenzellen. Unterschiedlich große Mengen eingesetzter Gesamt-RNA zu Beginn des Versuches konnten durch eine exakte RNA-Konzentrationsbestimmung und durch die Verwendung eines RNA-Mastermixes ausgeschlossen werden. Ein Qualitätsverlust der RNA durch eine DNase I-Behandlung konnte bereits bei anderen Experimenten festgestellt werden (persönliche Mitteilung Heike Göllner) und ist auch in diesem Fall vorstellbar. Möglicherweise wurde die Qualität der verwendeten RNA unterschiedlich stark verändert und ist somit Ursache für das Ergebnis.

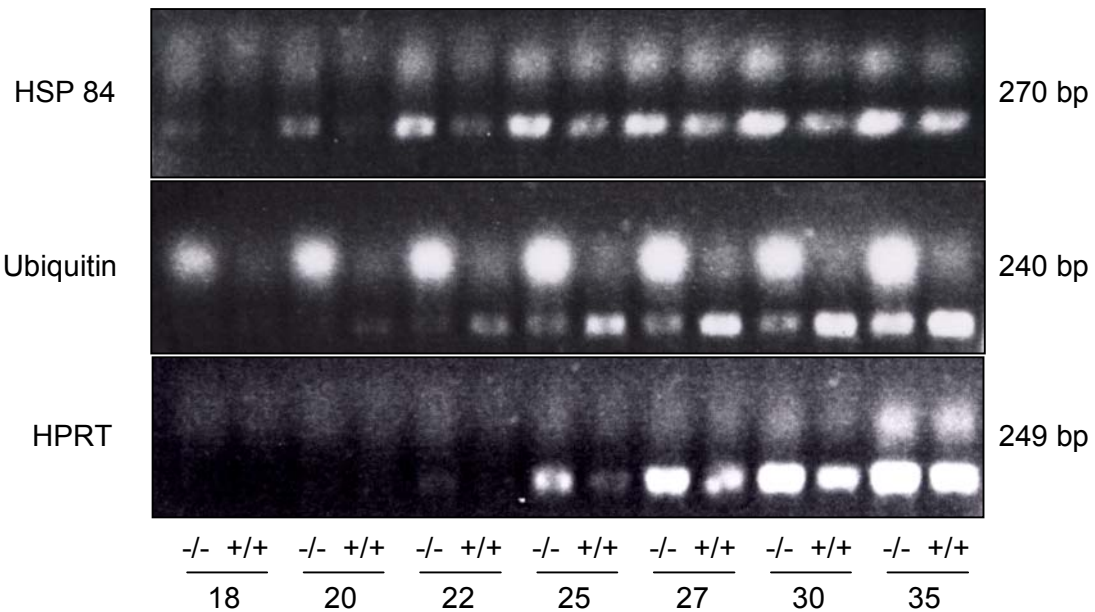


Abb. 3.5: RT-PCR mit Primern aus der Ubiquitin, HSP 84 und HPRT mRNA-Sequenz

-/-: Gesamt-RNA aus Sp3-defizienten Fibroblastenzellen; +/+ : Gesamt-RNA aus Wildtyp-Fibroblastenzellen; 18, 20, ..., 35: Anzahl der Zyklen.

Aus allen Reaktionsansätzen wurde nach 18, 20, 22, 25, 27, 30 und 35 Zyklen ein Aliquot von je 3 µl entnommen, in einem 1,8%igen Agarosegel aufgetrennt und nach dem Färben mit Ethidiumbromid photographiert.

Es kann davon ausgegangen werden, daß das Expressionsniveau der HPRT mRNA, trotz verschieden starker Signale in diesem speziellen Experiment, in Sp3-defizienter und Wildtyp-Fibroblasten-RNA identisch ist, während die Sp3-defiziente cDNA auf Grund ihres Qualitätsunterschiedes aber besser amplifiziert wurde als die Wildtyp-cDNA.

Das Ergebnis der RT-PCR, für die Primer gegen das HSP 84-Gen verwendet wurden, zeigt eine ähnliche Verteilung der Bandenintensitäten wie die RT-PCR mit Primern gegen das HPRT-Gen. Unterschiede in der Signalintensität zwischen der Bande der amplifizierten Sp3-defizienten cDNA und der Bande der amplifizierten Wildtyp-cDNA beruhen demnach nicht auf Expressionsunterschieden, sondern auf qualitativ voneinander abweichenden RNA-Proben.

Für die RT-PCR-Reaktion mit Primern gegen das Haushaltsgen Ubiquitin ergab sich ein reverses Ergebnis. Dieser Versuch wurde parallel zu beiden anderen und mit der gleichen Gesamt-RNA-Präparation durchgeführt. Auf Grund der Qualitätsunterschiede der verwendeten RNA wurde davon ausgegangen, daß die Wildtyp-cDNA schlechter amplifiziert wird als die Sp3-defiziente cDNA. Trotzdem war die Intensität der Ubiquitin-spezifischen Bande aus der amplifizierten Wildtyp-cDNA deutlich stärker als die aus der amplifizierten Sp3-defizienten cDNA.

Als Ergebnis der RT-PCR in Bezug auf ihre Kontrollfunktion des cDNA-Arrays läßt sich feststellen, daß ein Angleich der mittels Phosphor-Imagers ermittelten Werte für die Signale auf der mit Sp3-defizienter cDNA hybridisierten Membran an die Signale der mit Wildtyp-cDNA hybridisierten Membran nötig ist. Wie mit Hilfe der RT-PCR gezeigt werden konnte, spiegelt der auf dem cDNA-Array zu sehende Unterschied in der Signalintensität für die HSP 84 mRNA keinen Expressionsunterschied wider. Für die Ubiquitin mRNA hingegen schien die Expression auf beiden Membranen annähernd gleich zu sein. Mittels RT-PCR konnte aber gezeigt werden, daß die Ubiquitin mRNA in Wildtyp-Fibroblastenzellen stärker exprimiert wird als in Sp3-defizienten Fibroblastenzellen.

Bei einem Angleich der mit dem Phosphor-Imager ermittelten Werte des mit Sp3-defizienter cDNA hybridisierten Arrays an die Werte des mit Wildtyp-cDNA hybridisierten Arrays um den Faktor 2,6 (Tabelle 3.3) zeigten sich die mittels RT-PCR erzeugten Ergebnisse, so daß der ganze Versuch auf der Basis der zwei RT-PCR-Kontrollen (HSP 84 und Ubiquitin) ausgewertet werden konnte.

3.1.2.2 Kollagenase IV, Ubiquitin und STAT3 sind potentielle Zielgene des Transkriptionsfaktors Sp3

Um eine quantitative Aussage über die unterschiedliche Expression der Gene auf dem cDNA-Array machen zu können, wurden die Membranen mit dem Phosphor-Imager ausgewertet (Tabelle 3.3). Von den Werten für die Bandenintensität (gemessene relative Radioaktivität) wurde ein Hintergrundsignal abgezogen. Dies betrug für die Membran, die mit cDNA aus Sp3-defizienten Maus-Fibroblastenzellen hybridisiert wurde 97 und für die Membran, die mit cDNA aus Wildtyp-Maus-Fibroblastenzellen hybridisiert wurde 65. Des weiteren erfolgte der Angleich der Werte des mit Sp3-defizienter cDNA hybridisierten Arrays an die Werte des mit Wildtyp-cDNA hybridisierten Arrays um den Faktor 2,6, der sich aus der RT-PCR ergeben hatte (Abschnitt 3.2.2.1).

Insgesamt waren nur 24 der 588 Gene detektierbar. Da die cDNA-Array-Membran vor diesem Versuch bereits für andere Hybridisierungen verwendet wurde, hatte sie möglicherweise an Sensitivität verloren. Des weiteren wurde dieser Versuch nicht mit Poly(A)⁺-RNA, sondern mit Gesamt-RNA durchgeführt. Gesamt-RNA ist stabiler, läßt sich leichter und mit einer höheren Ausbeute aus den Fibroblastenzellen gewinnen, ist aber bei der Hybridisierung weniger sensitiv. Bei der Verwendung von Poly(A)⁺-RNA und einer frischen Membran wären vermutlich mehr Gene detektierbar gewesen.

Name des Gens/ Lage auf dem cDNA-Array	Intensität des Wildtyp- Fibroblasten- zellsignals (WT)	Intensität des Sp3- defizienten Fibroblasten- zellsignals (Sp3(-/-))	Verhältnis des Sp3- defizienten zum Wildtyp- Fibroblasten- zellsignal	Um den Faktor 2,6 korrigierte Werte Sp3(-/-)/ (WTx2,6)
Cyclin D2 (G1/S-specific) (A6g)	56,27	138,04	2,5	0,9
HSP 84 (Heat shock 84kD protein) (B1c)	283,18	740,56	2,6	1,0
Cf2r (coagulation factor II (trombin) receptor) (B2j)	211,30	497,76	2,4	0,9
STAT3 (signal trans- ducer and activator of transcription) (B4e)	65,10	83,74	1,3	0,5 (2fach)
Nm23-M2 (nucleoside diphosphate kinase B) (C4c)	302,62	722,19	2,4	0,9
TDAG51 (couple TCR signaling to Fas expression) (C5a)	66,37	186,01	2,8	1,0
YB1 (DNA binding protein) (D7j)	316,58	1020,68	3,2	1,2
Laminin receptor 1 (E7j)	112,69	403,69	3,6	1,4
Non-muscle myosin light chain 3 (F6b)	41,49	60,45	1,5	0,6
Vimentin (F6d)	469,53	1285,14	2,7	1,0
Collagenase type IV (F6k)	128,40	59,49	0,5	0,2 (5fach)
Ubiquitin (G5)	666,92	572,40	0,9	0,3 (3fach)
Glyceraldehyde 3-phos- phate dehydrogenase (G12)	514,76	1319,11	2,6	1,0
β-actin (G19)	244,44	468,96	1,9	0,7

Tab. 3.3: Phosphor-Imager-Auswertung der Signale, die auf den mit Sp3-defizienter und Wildtyp-cDNA hybridisierten Array-Membranen detektierbar sind

Die in der Tabelle aufgelisteten Werte stehen für die mit dem Phosphor-Imager ermittelte relative Radioaktivität. Von den angegebenen Werten wurde bereits das für jede Membran einzeln ermittelte Hintergrundsignal abgezogen. In der rechten Spalte sind die um den Faktor 2,6 korrigierten Werte für das Verhältnis des Sp3-defizienten zum Wildtyp-Fibroblastenzellsignal angegeben.

Auf dem mit Sp3-defizienter cDNA hybridisierten cDNA-Array konnten 24 Gene mittels Phosphor-Imager ermittelt werden, davon vier Haushaltsgene. Auf der mit Wildtyp-cDNA hybridisierten Membran waren nur 14 Signale detektierbar, darunter drei Haushaltsgene. Diese 14 Signale waren Teil der Signale auf dem mit Sp3-defizienter cDNA hybridisierten Array, so daß die Expression dieser Gene miteinander verglichen werden konnte (Tabelle 3.3).

Elf Gene erzeugten auf der mit Sp3-defizienter cDNA hybridisierten Membran ein Signal und waren auf der mit Wildtyp-cDNA hybridisierten Membran nicht nachzuweisen (Abschnitt 3.2.2). Auf Grund des RT-PCR-Versuches, der zur Überprüfung der cDNA-Array-Ergebnisse durchgeführt wurde, kann angenommen werden, daß für die Hybridisierung der Array-Membranen weniger Wildtyp-cDNA als Sp3-defiziente cDNA verwendet wurde. Das könnte dazu geführt haben, daß die Signale dieser elf Gene auf dem Wildtyp-Array unterhalb der Nachweisgrenze liegen.

Zehn Gene ergaben auf dem mit Sp3-defizienter cDNA hybridisierten Array und dem mit Wildtyp-cDNA hybridisierten Array Signale vergleichbarer Intensität, während drei der 24 detektierbaren Gene in Sp3-defizienten Maus-Fibroblastenzellen um den Faktor zwei (STAT3 = signal transducer and activator of transcription), fünf (Kollagenase IV) bzw. drei (Ubiquitin) verringert exprimiert wurden.

3.2 Pref-1, ein potentiell Zielgen von Sp3

3.2.1 Expression der Pref-1 mRNA in Sp3-defizienten, Sp3-heterozygoten und Wildtyp-Fibroblastenzellen

Wie bereits in der Einleitung (Abschnitt 1.6) erläutert, stellt Pref-1 ein potentiell Zielgen des Transkriptionsfaktors Sp3 dar.

In der Literatur ist beschrieben, daß Pref-1 (Preadipozytenfaktor-1) die Differenzierung von Preadipozyten zu Adipozyten verhindert (Smas *et al.*, 1993). Weiterhin wird angenommen, daß Pref-1 in der Nebennierenrinde wichtig für die Differenzierung der Zellen der drei Nebennierenrindenzonen (Halder *et al.*, 1998) und im Pankreas für die Differenzierung der insulinproduzierenden B-Zellen ist (Carlsson *et al.*, 1997).

Auf den Membranen des cDNA-Arrays, der in Abschnitt 3.1.2 beschrieben ist und mit Gesamt-RNA aus Fibroblastenzelllinien durchgeführt wurde, ist Pref-1 nicht detektierbar. Vermutlich liegt die exprimierte mRNA-Menge unterhalb der Nachweisgrenze.

Die Expression der Pref-1 mRNA sollte in Fibroblastenzelllinien mit einer weiteren, sensitiveren Methode, der RT-PCR, untersucht werden. Hierzu wurde Gesamt-RNA aus Sp3-defizienten, Sp3-heterozygoten und aus Wildtyp-Maus-Fibroblastenzellen (Tag E13.5, sowohl subkonfluent als auch konfluent gewachsen) isoliert (Abschnitt 2.10.1.2). Zur Amplifikation der mRNA wurden spezifische Primer gegen das Pref-1-Gen eingesetzt, so daß als Produkt der RT-PCR ein 325 bp langes Gen-Fragment entstand. Parallel zu diesem Ansatz wurde die Expression von HPRT mRNA in den zu vergleichenden Zellen untersucht und als Bezugspunkt für die eingesetzten RNA-Mengen verwendet. Nach 18, 20, 22, 25, 27, 30, 35 und 40 Zyklen wurde ein Aliquot von je 3 µl pro Reaktionsansatz entnommen, die cDNA in einem 1,8%igen Agarosegel (Abschnitt 2.10.2.4) aufgetrennt und photographiert (Abbildung 3.6).

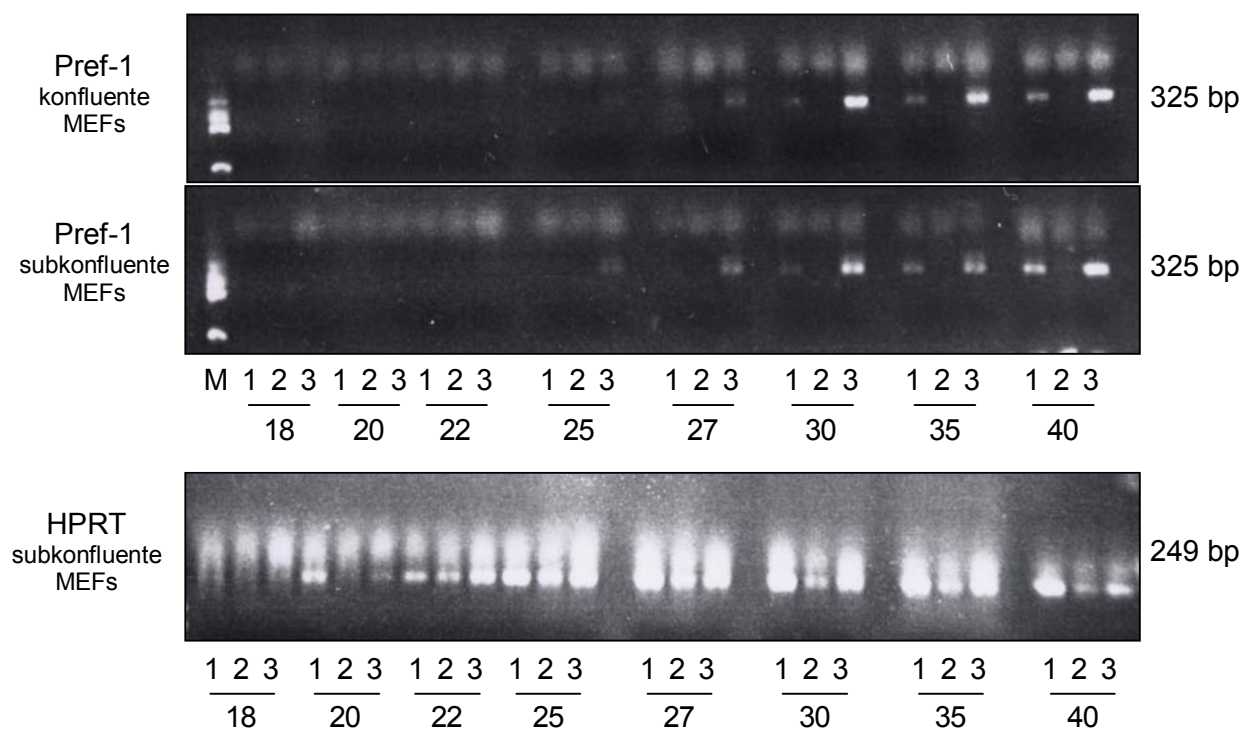


Abb. 3.6: RT-PCR zum Vergleich der Genexpression von Pref-1 mRNA in Sp3-defizienten und Wildtyp-Fibroblastenzellen

1: Gesamt-RNA aus Wildtyp-Fibroblastenzellen; 2: Gesamt-RNA aus Sp3-heterozygoten Fibroblastenzellen; 3: Gesamt-RNA aus Sp3-defizienten Fibroblastenzellen; 18, 20, ..., 40: Anzahl der Zyklen.

Aus allen Ansätzen wurde nach 18, 20, 22, 25, 27, 30, 35 und 40 Zyklen ein Aliquot von je 3 µl entnommen, in einem 1,8%igen Agarosegel aufgetrennt und nach dem Färben mit Ethidiumbromid photographiert.

HPRT dient als Bezugspunkt für die aufgetragenen cDNA-Mengen in diesem Versuch.

Da die Expression der hier untersuchten mRNAs in den subkonfluent gewachsenen Zellen annähernd identisch mit der in den konfluent gewachsenen Fibroblastenzellen ist, wird im Folgenden darauf verzichtet in der Darstellung der Ergebnisse auf die unterschiedlichen Zellstadien einzugehen.

Die Expression der Pref-1 mRNA wird in Sp3-defizienten Fibroblastenzellen bereits im Zyklus 25 sichtbar, während sie in Wildtyp-Zellen erst ab Zyklus 30 beobachtet werden kann. In Sp3-heterozygoten Fibroblastenzellen scheint die Pref-1 mRNA gar nicht exprimiert zu werden. Die HPRT-Kontroll mRNA Expression in Sp3-defizienten und Wildtyp-Fibroblastenzellen ist im Zyklus 20 erstmals erkennbar, in Sp3-heterozygoten Zellen erst in Zyklus 22. Während das Expressionsniveau der HPRT mRNA in Sp3(-/-)- und in Sp3(+/-)-Fibroblastenzellen in allen Zyklen vergleichbar ist, ist dieses in Sp3(+/-)-Zellen geringer. Das 325 bp große Fragment der Pref-1 cDNA ist in den Zyklen 25 bis 40 für die Sp3-defizienten Fibroblastenzellen deutlich stärker ausgeprägt als für die Wildtyp-Zellen. Die Pref-1 mRNA scheint in Sp3-heterozygoten Fibroblastenzellen nicht exprimiert zu werden.

Um eine quantitative Aussage über die Pref-1 mRNA Expression machen zu können, wurde die cDNA auf eine positiv geladene Nylonmembran transferiert (Southern Blot, Abschnitt 2.10.2.8) und mit der entsprechenden radioaktiv markierten Sonde (Pref-1 bzw. HPRT) hybridisiert. Abschließend wurde ein Autoradiogramm angefertigt (Abbildung 3.7).

Die ersten Signale sind auf dem Autoradiogramm bereits ab Zyklus 20 sichtbar und deutlich stärker als auf dem Photo des Gellaufs (vergleiche Abbildung 3.6 mit 3.7). Das Ergebnis aus der RT-PCR konnte mit dem Southern Blot verstärkt werden. Da die HPRT mRNA in Sp3-defizienten Fibroblastenzellen genauso stark exprimiert wird wie in Sp3-heterozygoten und Wildtyp-Fibroblastenzellen, kann das schwächere Signal in Spur 2 mit einer Ungenauigkeit des RNA-Auftrages auf das Gel begründet werden. Daher ist nicht sicher, ob die Pref-1 mRNA in Sp3-heterozygoten Fibroblastenzellen nicht exprimiert wird oder ihre Expression unterhalb der Nachweisgrenze liegt. Es kann aber festgestellt werden, daß die Expression des Pref-1-Gens in Sp3-defizienten Fibroblastenzellen stärker ist als in Sp3-heterozygoten und Wildtyp-Fibroblastenzellen.

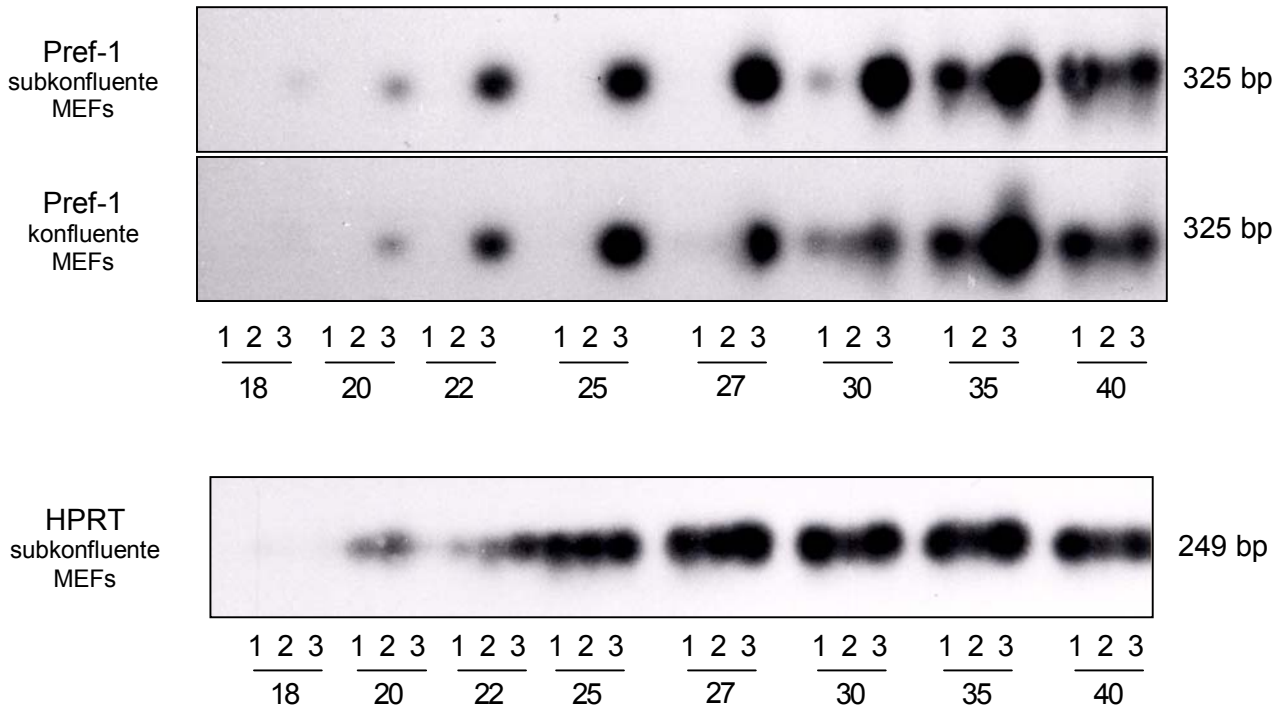


Abb. 3.7: RT-PCR zum Vergleich der Genexpression von Pref-1 in Sp3-defizienten und Wildtyp-Fibroblastenzellen

1: Gesamt-RNA aus Wildtyp-Fibroblastenzellen; 2: Gesamt-RNA aus Sp3-heterozygoten Fibroblastenzellen; 3: Gesamt-RNA aus Sp3-defizienten Fibroblastenzellen; 18, 20,..., 40: Anzahl der Zyklen.

Die cDNA aus dem oben beschriebenen Gel (Abbildung 3.6) wurde über Nacht auf eine positiv geladene Nylonmembran übertragen, die dann mit einer radioaktiv markierten cDNA-Sonde (Pref-1 bzw. HPRT) hybridisiert wurde.

Die Pref-1 mRNA Expression ist in Sp3-defizienten Fibroblastenzellen gegenüber Wildtyp-Fibroblastenzellen deutlich höher. Diese Unterschiede im Expressionsniveau der Pref-1 mRNA in Fibroblastenzellen konnten mit Hilfe eines Northern Blots bestätigt werden (persönliche Mitteilung Heike Göllner). Die Anwesenheit des Transkriptionsfaktors Sp3 scheint die Expression der Pref-1 mRNA zu reprimieren.

3.2.2 Versuch der Differenzierung von Sp3-defizienten und Wildtyp-Fibroblastenzellen zu Adipozyten

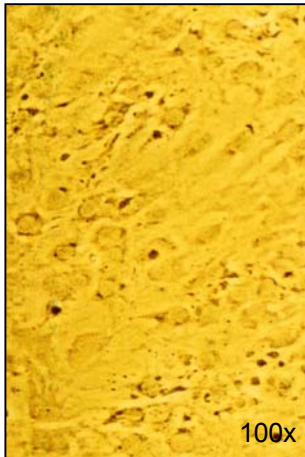
Sowohl im Northern Blot als auch in der RT-PCR konnte gezeigt werden, daß die Expression der Pref-1 mRNA in Sp3-defizienten Fibroblastenzellen verglichen mit Wildtyp-Fibroblastenzellen erhöht ist. Was bewirkt diese Erhöhung funktionell in Fibroblastenzellen?

Während der Differenzierung von Preadipozyten zu Adipozyten verringert sich die Expression der Pref-1 mRNA in den Fibroblastenzellen. In ausgereiften Adipozyten wird das Protein gar nicht mehr hergestellt. Eine dauerhafte Expression von Pref-1 oder die Zugabe *in vitro* verhindert die Adipogenese (Smas *et al.*, 1999).

Im folgenden Versuch sollte getestet werden, ob sich Sp3-defiziente und Wildtyp-Fibroblastenzellen in Kultur zu Adipozyten differenzieren lassen. Zur Kontrolle wurde eine weitere Zelllinie herangezogen, die in der Literatur als differenzierungsfähig (zu Adipozyten) beschrieben wird (Reichert *et al.*, 1998; Mackall *et al.*, 1976). Hierbei handelte es sich um die 3T3L1-Fibroblastenzellen.

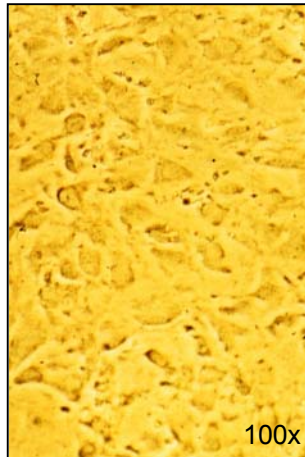
Die drei verschiedenen Zelllinien wurden in Primaria Zellkulturflaschen der Firma Falcon in ihrem jeweiligen Zuchtmedium kultiviert (siehe Abschnitt 2.11.1.1 und 2.11.2) bis sie konfluent gewachsen waren. Zu diesem Zeitpunkt wurden die Sp3-defizienten und die Wildtyp-Fibroblastenzellen auf das Zuchtmedium der 3T3L1-Zellen umgestellt und während der folgenden drei Tage in diesem Medium belassen. Anschließend wurden die Zellen für vier Tage mit einem Mix aus Dexamethason, Isobutyl-Methylxanthin und Insulin in einem Medium aus DMEM und HAM's F12 inkubiert und für weitere vier Tage in DMEM und HAM's F12 mit Insulin (Abschnitt 2.11.2.1). Die Fibroblastenzellen sollten nun zu Adipozyten differenziert sein. Um das zu überprüfen, wurden die Zellen in der Kulturflasche formolfixiert, die für Adipozyten charakteristischen Lipidtröpfchen mit Öl-Rot-O rot und die Zellkerne aller Zellen mit Hämalaun blau gefärbt (Abschnitt 2.11.2.2). So war es möglich, eine Aussage über das Verhältnis der differenzierten Zellen (rot) zu der Gesamtzellzahl (blau) zu machen. Die Ergebnisse dieses Versuches sind in der Abbildung 3.8 dargestellt.

A.



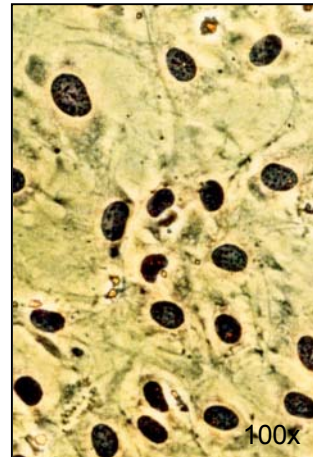
Wildtyp-MEFs:
Ein Tag nach der Kofluenz;
erster Tag im Zuchtmedium

B.



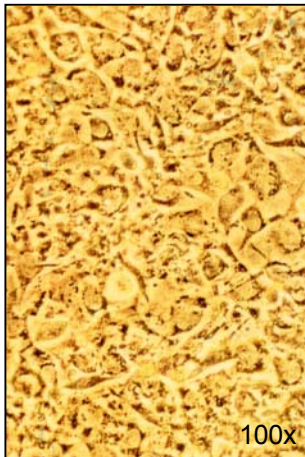
Wildtyp-MEFs:
Vierter Tag im Medium mit
Insulin

C.



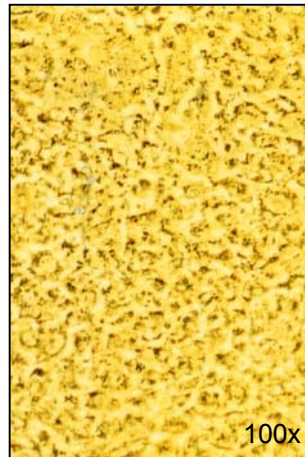
Wildtyp-MEFs:
Nach dem Anfärben mit Öl-
Rot-O und Hämalaun

D.



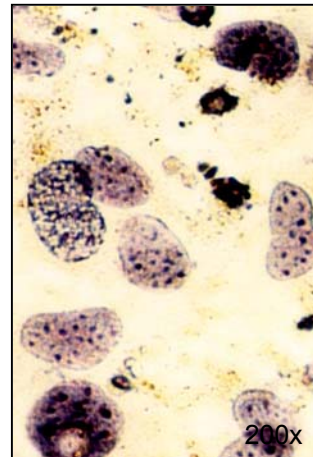
Sp3-defiziente MEFs:
Ein Tag nach der Kofluenz;
erster Tag im Zuchtmedium

E.



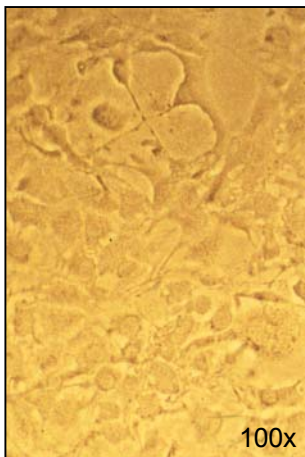
Sp3-defiziente MEFs:
Vierter Tag im Medium mit
Insulin

F.



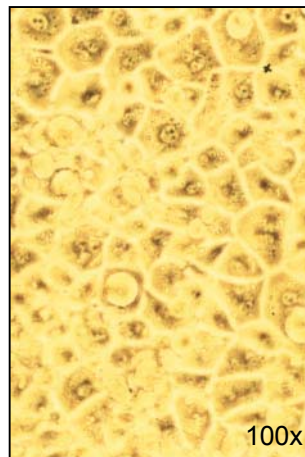
Sp3-defiziente MEFs:
Nach dem Anfärben mit Öl-
Rot-O und Hämalaun

G.



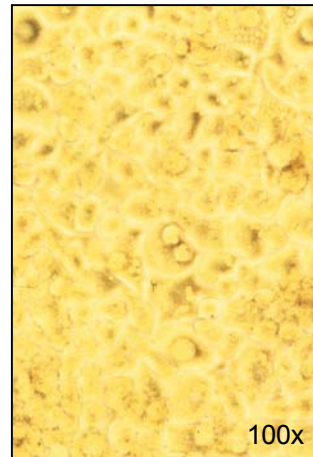
3T3L1-Fibroblastenzellen:
Ein Tag nach der Konfluenz

H.



3T3L1-Fibroblastenzellen:
Zweiter Tag im Medium mit
Insulin

I.



3T3L1-Fibroblastenzellen:
Vierter Tag im Medium mit
Insulin

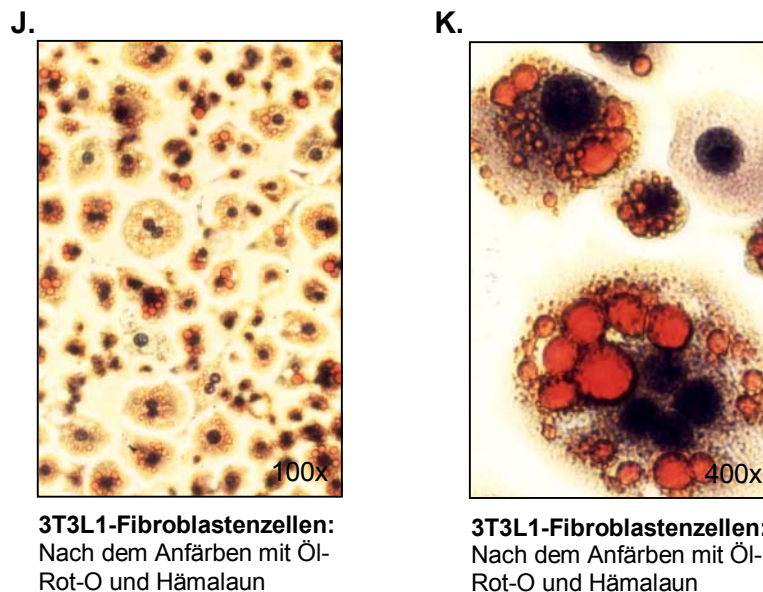


Abb. 3.8 A-K: Differenzierung von Sp3-defizienten und Wildtyp-Maus-Fibroblastenzellen zu Adipozyten

Zur Differenzierung wurden die Zellen konfluent gezüchtet. Drei Tage nach Erreichen der Konfluenz wurden die Fibroblastenzellen für vier Tage mit einem Mix aus Dexamethason, Isobutyl-Methylxanthin und Insulin in einem Medium aus DMEM und HAM's F12 inkubiert, wobei dieses am zweiten Tag erneuert wurde. Anschließend wurden die Zellen für weitere vier Tage in Medium aus DMEM und HAM's F12 mit Insulin versetzt gehalten.

A-E; G-J: Aufgenommen bei einer 100fachen Vergrößerung.

F: Aufgenommen bei einer 200fachen Vergrößerung.

K: Aufgenommen bei einer 400fachen Vergrößerung.

Die Sp3-defizienten und Wildtyp-Fibroblastenzellen veränderten sich im Laufe der gesamten Versuchszeit nicht, während im Zellrasen der 3T3L1-Zellen schon nach wenigen Tagen Fetttropfchen sichtbar wurden (Abbildung 3.8 H). Nach der Behandlung mit Öl-Rot-O und Hämalaun waren die Sp3(-/-)- und die Sp3(+/-)-Zellen komplett blau gefärbt, es war keine Rotfärbung erkennbar. In den 3T3L1-Zellen färbten sich die Zellkerne blau und die sich im Zytoplasma befindlichen Lipidtropfen rot. Insgesamt wurden ungefähr 90% der 3T3L1-Zellen zu Adipozyten differenziert.

In den Sp3-defizienten Fibroblastenzellen wird das die Differenzierung verhindernde Protein Pref-1 verstärkt exprimiert. Die Wildtyp-Fibroblastenzellen hingegen exprimieren Pref-1 nur in sehr geringen Mengen. Mit diesem Versuch konnte gezeigt werden, daß die Adipogenese weder in Sp3-defizienten noch in Wildtyp-Fibroblastenzellen abgelaufen ist. Die Differenzierung der Kontrollzellen (3T3L1-Zellen) zu Adipozyten erfolgte problemlos.

Die Differenzierung der verwendeten Fibroblastenzellen zu Adipozyten ist unabhängig von der An- bzw. Abwesenheit von Pref-1 nicht möglich.

3.3 Vergleich der Genexpression in Sp3-defizienter und Wildtyp-Mauslunge

3.3.1 Expression lungenspezifischer Gene in Sp3-defizienter und Wildtyp-Mauslunge

Sp3-defiziente Mäuse sterben innerhalb von 30 Minuten nach der Geburt (persönliche Mitteilung Prof. Dr. Guntram Suske). Die Sp3(-/-)-Embryonen sind deutlich kleiner als ihre Wildtyp-Geschwister. Histologische Untersuchungen geben Hinweise auf eine generell verlangsamte Entwicklung und Differenzierung aller Gewebe (persönliche Mitteilung Peter Bouwmann) und auf eine Veränderung des Alveolarepithels, welches mehrschichtig zu sein scheint (persönliche Mitteilung Prof. Dr. Guntram Suske). Bei Beobachtungen der neugeborenen Maus-Embryonen machte es den Anschein, als versuchten die Tiere zu atmen. Es gelangte allerdings keine Luft in die Lungen (persönliche Mitteilung Prof. Dr. Guntram Suske).

Auf Grund dieser Feststellungen sollte in den weiteren Versuchen die Expression der mRNA verschiedener Gene in der Lunge untersucht werden. Die Versuche zielten speziell auf Lungenproteine und Proteine ab, die für die Lungenentwicklung, -funktion und den Aufbau der Lunge von Bedeutung sind.

Surfactant Proteine:

Surfactant ist ein Protein-Phospholipidfilm, der die gesamte Oberfläche der Lungenalveolen bedeckt und vor allem von Alveolarepithelzellen Typ II sezerniert wird. Die Hauptaufgabe der Surfactant-Proteine besteht in der Herabsetzung der Oberflächenspannung der Lungenalveolen (Hermans *et al.*, 1998). Dadurch wird ein Kollaps der Alveolen verhindert.

1) Surfactant Protein A (SP-A): (mRNA: 3000, 1700, 900 Nukleotide)

Das hydrophile 28 bis 36 kDa Protein stellt 50% aller Surfactant Proteine und bildet hochmolekulare 18mere mit einer Masse von 650 kDa. Die drei verschiedenen mRNA-Transkripte sind vermutlich die Folge unterschiedlicher Polyadenylierungen oder alternativer Spleißvorgänge (Korfhagen *et al.*, 1992). Surfactant Protein A dient der Stabilisierung der Phospholipidmembran, der Spannungsreduktion der Lunge bei der Ausatmung und es reguliert die Surfactant-Konzentration (Hermans *et al.*, 1998). Die Expression des Surfactant Proteins A beginnt am Tag E15 und steigt bis zur Geburt stark an (Korfhagen *et al.*, 1992).

2) Surfactant Protein B (SP-B): (mRNA: 1600 Nukleotide)

Hierbei handelt es sich um ein hydrophobes Protein mit einer Masse von ca. 5 bis 8 kDa, welches Dimere mit einer Masse von 15 bis 18 kDa bildet. Surfactant Protein B scheint ein Schlüsselprotein in der Organisation der Lamellenkörperchen zu sein, über die der Surfactant ausgeschleust wird. Des weiteren dienen auch diese Proteine der Spannungsreduktion in den Alveolen. SP-B-defiziente Mäuse zeigen eine deutliche Atemverschlechterung (Hermans *et al.*, 1998). Die SP-B mRNA kann schon ab Tag E15 in kleinen Mengen nachgewiesen werden und steigt zwischen Tag E16 und E17 merklich an (D'Amore-Bruno *et al.*, 1992).

3) Surfactant Protein C (SP-C): (mRNA: 800 Nukleotide)

SP-C ist ein niedermolekulares, hydrophobes Protein. Die Expression der SP-C mRNA beginnt etwa am Tag E15 und steigt in der späten Entwicklung stark an (Glasser *et al.*, 1990).

4) Surfactant Protein D (SP-D): (mRNA: 1250 Nukleotide)

SP-D ist hydrophil bei einem Molekulargewicht von 42 kDa. Das Protein bildet hochmolekulare 12mere mit einer Masse von 600 kDa. Die funktionellen Eigenschaften dieses Proteins sind noch nicht ganz klar. Es scheint aber, als spiele SP-D keine Rolle bei den oberflächenaktiven Eigenschaften des Surfactant-Komplexes (Hermans *et al.*, 1998). SP-D-defiziente Mäuse sind lebensfähig, zeigen aber eine Veränderung in der Expression der Surfactant-Proteine A, B und C. Das läßt auf eine Funktion von SP-D in der Surfactant-Lipid-Homöostase schließen (Korfhagen *et al.*, 1998).

Weitere lungenspezifische Proteine:**5) UG (Uteroglobin)/CCSP (Clara cell secretory protein)/CC10 (Clara cell 10 kDa protein):** (mRNA: 496 Nukleotide)

Uteroglobin, ein sekretorisches Protein, wird in der Lunge in den Clara-Zellen exprimiert (Aumüller *et al.*, 1995).

6) LKLF (Lung Krüppel-like-factor): (mRNA: 1538 Nukleotide)

LKLF ist ein in der Lunge stark exprimierter Transkriptionsfaktor. Die Expression des Gens ist ab Tag E9.5 auch im Gefäßendothel nachweisbar (Kuo¹ *et al.*, 1997). LKLF-defiziente Tiere sterben zwischen Tag E12.5 und E14.5 an inneren Blutungen auf Grund einer defekten Blutgefäßmorphologie (Wani *et al.*, 1998; Kuo¹ *et al.*, 1997). Über die Bedeutung von LKLF für die Entwicklung der Lunge ist noch nichts bekannt. Kürzlich wurde aber eine Sp1-Bindungstelle im LKLF-Promotor beschrieben (Schrack *et al.*, 1999). Es ist möglich, daß auch Sp3 an diese Stelle bindet und so Einfluß auf die LKLF mRNA Expression nimmt.

7) TTF1 (Thyroid transcription factor-1): (mRNA: 3517 Nukleotide)

Dieser Transkriptionsfaktor wird in der Schilddrüse und in der Lunge (Clara-Zellen) exprimiert. In der Lunge besteht seine Funktion in der Regulation der Expression der Surfactant Proteine A, B, C und CCSP (Yan *et al.*, 1997).

8) Elastin: (mRNA: 2650 Nukleotide)

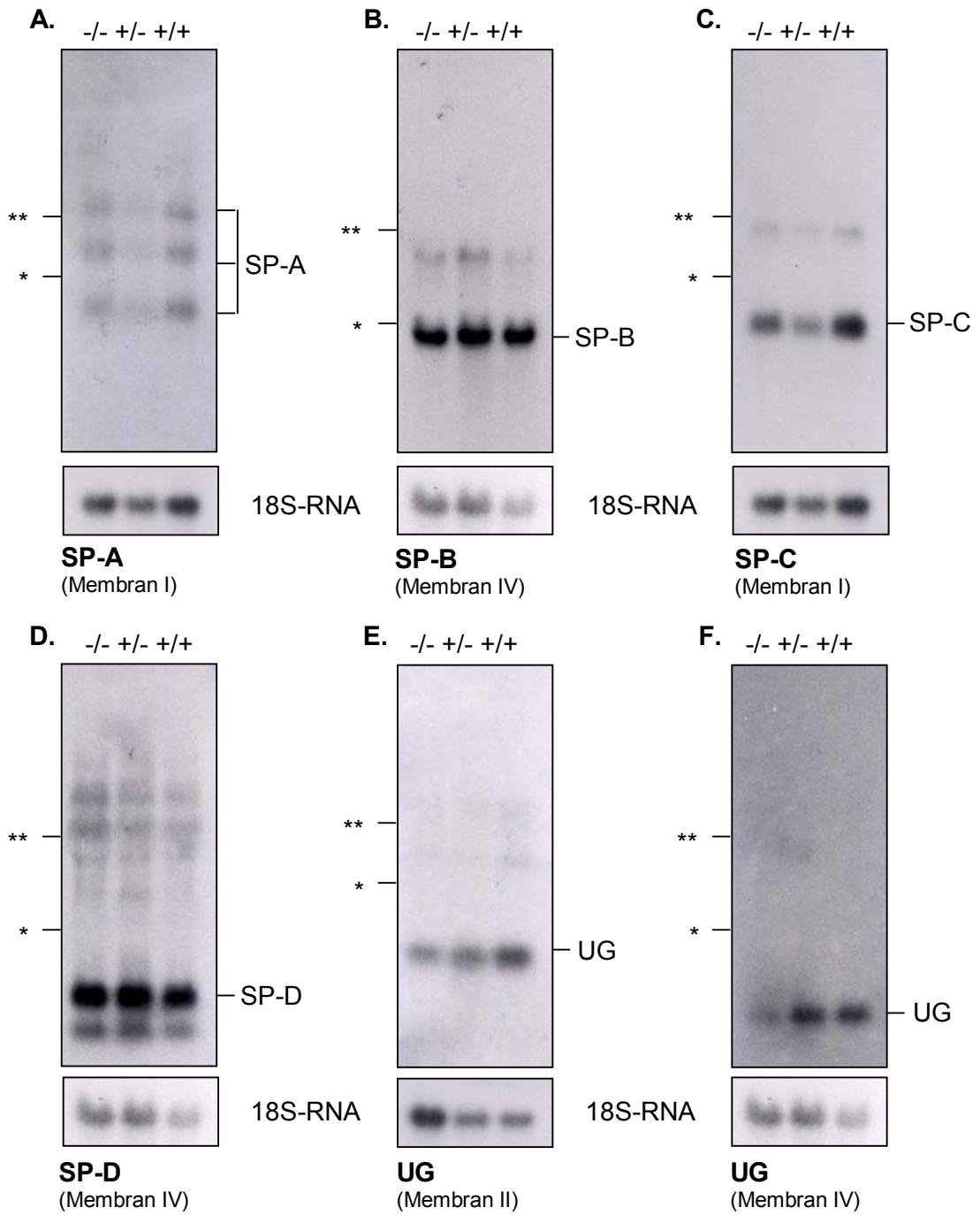
Der Vergrößerung des Thoraxraumes (Einatmung) stehen elastische Kräfte entgegen, die sich zum einen aus elastischen Kräften des Lungengewebes (elastische Fasern) und der Thoraxwand und zum anderen aus Oberflächenspannungen in den Alveolen an der Grenzfläche zwischen Luft und Flüssigkeitsfilm (Surfactant) zusammensetzen (Junqueira/Carneiro, Springer-Verlag, 1996).

Elastin ist ein Protein der elastischen Fasern. Diese kommen überall dort vor, wo die Elastizität für die Funktion der Gewebe von besonderer Bedeutung ist. Beispielsweise in Arterien vom elastischen Typ. In der Lunge wird Elastin von Fibroblasten exprimiert (Junqueira/Carneiro, Springer-Verlag).

Für den Northern Blot wurde Gesamt-RNA aus Mausgewebe von Tag E18.5 Embryonen isoliert. Es wurden insgesamt vier Membranen angefertigt (Membran I - IV). RNA für die Membranen I und II wurde aus Mauslunge/-herz gewonnen und RNA für die Membranen III und IV aus der Mauslunge.

Die Gesamt-RNA wurde, wie in Abschnitt 2.10.1.2 beschrieben, aus dem Gewebe isoliert, in einem Agarose-Formaldehydgel aufgetrennt (Abschnitt 2.10.1.4) und auf eine positiv geladene Nylonmembran übertragen (Abschnitt 2.10.1.7). Als Sonden dienten sowohl aus Plasmiden gewonnene cDNA-Fragmente (SP-A, SP-B, SP-C, UG, LKLF und TTF-1) (Abschnitt 2.10.2.3) als auch mittels RT-PCR (Abschnitt 2.10.1.6) hergestellte cDNA-Fragmente (SP-D und Elastin).

Die vier verschiedenen Membranen wurden mit den radioaktiv markierten Sonden (Abschnitt 2.10.2.7) hybridisiert (Abbildung 3.9 A-I). Um zu kontrollieren, ob die RNA in gleichen Mengen auf das Agarose-Formaldehydgel aufgetragen wurde, wurden die Membranen nach den spezifischen Hybridisierungen mit einem radioaktiv markierten Oligonukleotid hybridisiert, das an die 18S-RNA (18S-Kontrollmembran) bindet (Abschnitt 2.10.1.8).



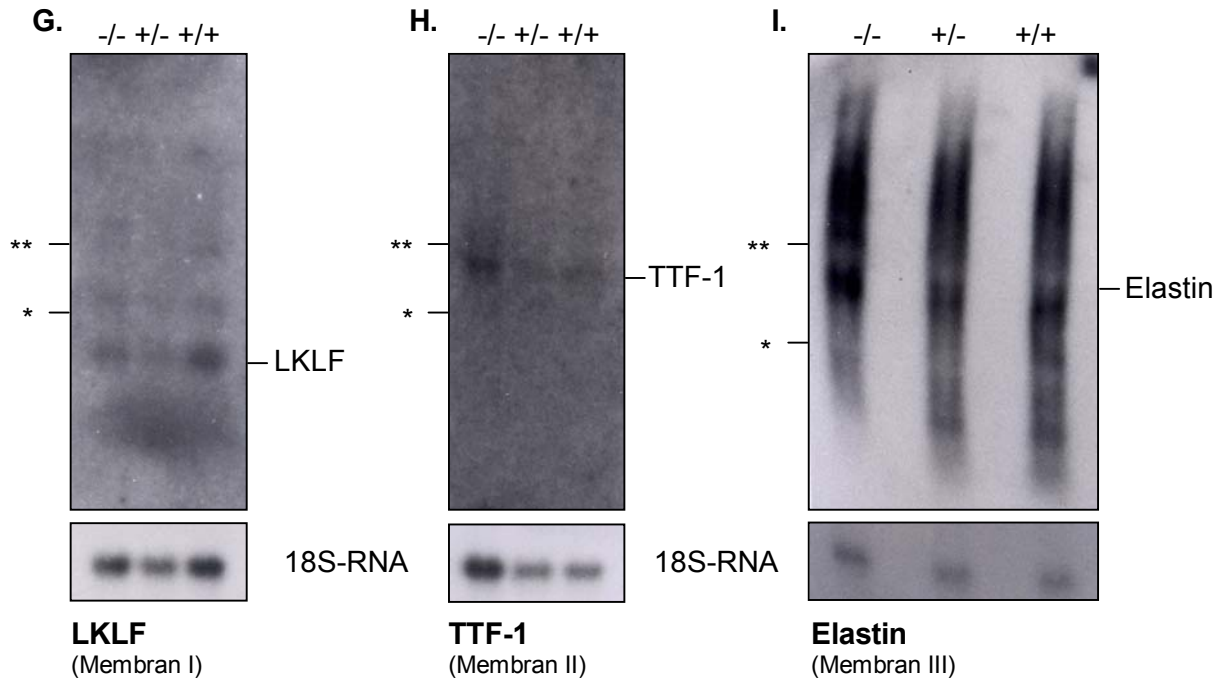


Abb. 3.9 A-I: Northern Blots mit SP-A, SP-B, SP-C, SP-D, Elastin, UG, LKLF und TTF-1 cDNA-Fragmenten als Hybridisierungsproben

+/-: RNA aus Sp3-heterozygoten Mäusen; +/+ : RNA aus Wildtyp-Sp3-Mäusen; -/-: RNA aus Sp3-defizienten Mäusen.

Die Positionen der 28S-RNA (**) und der 18S-RNA (*) sind eingezeichnet.

A, C, E, G, H: Es wurden je 5 µg der aus Mauslungen/-herzgewebe am Tag E18.5 gewonnen Gesamt-RNA für den Northern Blot eingesetzt.

B, D, F: Für diese Northern Blots wurden je 9 µg Gesamt-RNA aus Mauslungengewebe Tag E18.5 verwendet.

I: Als Ausgangsmaterial für diesen Blot dienten je 6 µg Gesamt-RNA aus Mauslungengewebe Tag E18.5.

Zur Hybridisierung wurden $1,5 \times 10^6$ cpm/ml Hybridisierungslösung der mittels RT-PCR hergestellten (D+E) oder aus Plasmiden isolierten (A-C+H) radioaktiv markierten cDNA-Sonden (spezifische Aktivität von 2×10^9 cpm/µg) verwendet. Als Kontrolle für die eingesetzten RNA-Mengen diente die Hybridisierung mit 5×10^5 cpm/15 ml Hybridisierungslösung einer Oligonukleotid-Sonde gegen die 18S-RNA, die jeweils unter den einzelnen Autoradiogrammen dargestellt ist.

Zur Auswertung des Versuches werden die Expressionsniveaus, die sich durch die Hybridisierung der Membranen mit der radioaktiv markierten cDNA der jeweiligen Gene ergeben, mit dem Expressionsniveau verglichen, das durch die Hybridisierung mit dem Oligonukleotid gegen die 18S-RNA entsteht. Sind diese identisch, liegt kein Unterschied in der Expression der mRNA vor. Dies ist für die mRNA Expression von SP-A, SP-B, SP-C und SP-D der Fall. Alle vier Transkripte werden in Sp3-defizienten, Sp3-heterozygoten und Wildtyp-Mauslungen gleich und von der Abwesenheit des Transkriptionsfaktors Sp3 unabhängig exprimiert (Abbildung 3.9 A-D).

Bei der Untersuchung weiterer lungenspezifischer Proteine konnte ein Unterschied in der Uteroglobin mRNA Expression festgestellt werden (Abbildung 3.9 E und F). In Sp3-

defizienter Mauslunge wird die Uteroglobin mRNA deutlich schwächer exprimiert als in der Sp3-heterozygoten und der Wildtyp-Mauslunge. Dieser Befund konnte mit zwei unabhängig voneinander durchgeführten Northern Blots und unterschiedlichen RNA-Präparationen gezeigt werden. Die Auswertung mit dem Phosphor-Imager ergab ein 2fach schwächeres Signal für die Expression der Uteroglobin mRNA in Sp3-defizienter Mauslunge gegenüber der Expression in der Wildtyp-Mauslunge.

Die mRNAs der Transkriptionsfaktoren LKLF (Lung Krüppel-like-factor) und TTF-1 (Thyroid-transcription factor-1) sowie die des Proteins Elastin werden unabhängig von der An- bzw. Abwesenheit des Transkriptionsfaktors Sp3 exprimiert. Wie ein Vergleich mit der 18S-Kontrollmembran zeigt, beruhen die auf den Membranen sichtbaren Schwankungen der Signalintensitäten alle auf ungleichmäßig aufgetragenen Gesamt-RNA-Proben (Abbildung 3.9 G-I).

Aus diesem Versuch wird deutlich, daß die SP-A-, SP-B-, SP-C-, SP-D-, LKLF-, TTF-1- und Elastin-Gene durch das Fehlen des Transkriptionsfaktors Sp3 in ihrer Expression nicht beeinflusst werden. Das Uteroglobin-Gen wird in der Sp3-defizienten Mauslunge etwa 2fach vermindert exprimiert.

3.3.2 p21 mRNA Expression in Sp3-defizienter, Sp3-heterozygoter und Wildtyp-Mauslunge

Das Protein p21 ist ein Cyclin-abhängiger Kinase Inhibitor (CKI = cyclin-dependent kinase inhibitor). Es gehört neben p27 und p57 zur p21^{CIP1/WAF1}-Familie. Die Cyclin-abhängigen Kinasen (Cdk = cyclin-dependent kinase) bilden eine Enzymfamilie, deren Mitglieder den Fortlauf des Zellzyklusses garantieren, während die Mitglieder der p21^{CIP1/WAF1}-Familie die Überleitung der Zellen von der G₁-Phase in die S-Phase inhibieren. Zusammen mit einem weiteren Inhibitor, p57, reguliert p21 so die Differenzierung der Skelettmuskulatur und der Lungenalveolen (Zhang *et al.*, 1999). Des weiteren ist im p21 Promotor eine etwa 10 bp lange GC-reiche Sequenz bekannt, an die die Transkriptionsfaktoren Sp1 und Sp3 binden (Datto *et al.*, 1995; Billon *et al.*, 1999). Es ist vorstellbar, daß Sp3 über die Bindung an die GC-reiche Sequenz die p21 mRNA Expression reguliert und somit Einfluß auf die Differenzierung der Skelettmuskulatur und der Lungenalveolen hat. Aus diesem Grund wurde untersucht, ob die Expression des p21-Gens von der An- bzw. Abwesenheit des Transkriptionsfaktors Sp3 beeinflusst wird.

p21 mRNA war weder in Fibroblastenzellen noch in der Mauslunge mittels Northern Blot nachweisbar. Die Expression der p21 mRNA in Sp3-defizienter, Sp3-heterozygoter und in Wildtyp-Mauslunge wurde daher mit einer sensitiveren Methode, der RT-PCR, untersucht.

Mit spezifischen Primern gegen eine Sequenz aus dem p21-Gen wurde mit Gesamt-RNA aus Sp3(-/-), Sp3(+/-) und Sp3(+/+)-Mauslungen eine RT-PCR durchgeführt. Die RNA wurde am Tag E18.5 wie in Abschnitt 2.10.1.2 beschrieben aus dem Lungengewebe isoliert, von DNA-Verunreinigungen befreit (Abschnitt 2.10.1.3), revers transkribiert (Abschnitt 2.10.1.6.) und die cDNA-Fragmente anschließend amplifiziert. Es wurden Aliquots von je 3 µl nach Zyklus 20, 22, 25, 27, 30 und 35 entnommen, in einem 1,8%igen Agarosegel aufgetrennt (Abbildung 3.10) und die cDNA über Nacht auf eine positiv geladene Nylonmembran transferiert. Die Membran wurde anschließend mit radioaktiv markierter p21 cDNA hybridisiert (Abbildung 3.11).

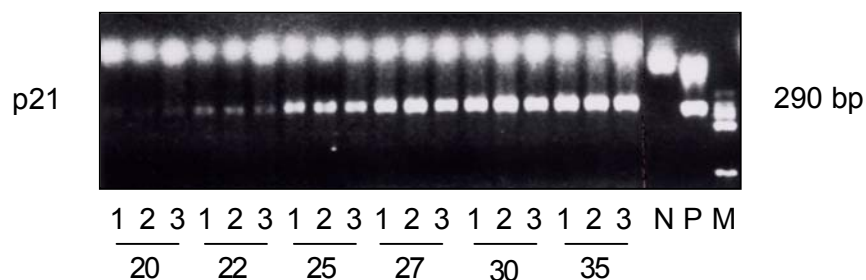


Abb. 3.10: RT-PCR mit p21-spezifischen Oligonukleotiden und Lungen-RNA aus Sp3-defizienten, Sp3-heterozygoten und Wildtyp-Mausembryonen

1: Gesamt-RNA aus Sp3-defizienter Mauslunge; 2: Gesamt-RNA aus Sp3-heterozygoter Mauslunge; 3: Gesamt-RNA aus Wildtyp-Mauslunge.

Negativkontrolle (N): Ansatz mit Wasser an Stelle der RNA; Positivkontrolle für die RT-PCR (P): RNA und Primer aus dem „Access RT-PCR System Kit“ (Promega, Madison); Größenstandard (M): pBR322-Plasmid geschnitten mit Hinf I.

Aus allen Reaktionsansätzen wurde nach 20, 22, 25, 27, 30 und 35 Zyklen ein Aliquot von je 3 µl entnommen, in einem 1,8%igen Agarosegel aufgetrennt und nach dem Färben mit Ethidiumbromid fotografiert.

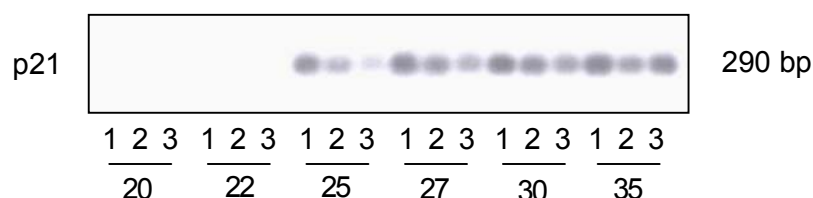


Abb. 3.11: Southern Blot mit p21-spezifischen Oligonukleotiden und Lungen-RNA aus Sp3-defizienten, Sp3-heterozygoten und Wildtyp-Mausembryonen

1: Gesamt-RNA aus Sp3-defizienter Mauslunge; 2: Gesamt-RNA aus Sp3-heterozygoter Mauslunge; 3: Gesamt-RNA aus Wildtyp-Mauslunge; 20, 22,..., 35: Anzahl der Zyklen.

Die cDNA aus dem in Abbildung 3.10 dargestellten Gel wurde über Nacht auf eine positiv geladene Nylonmembran übertragen und mit einer radioaktiv markierten p21-cDNA-Sonde hybridisiert.

p21 mRNA ist mittels RT-PCR in der Mauslunge nachweisbar. Ihre Expression kann in dem Gel (Abbildung 3.10) bereits in Zyklus 20 nachgewiesen werden, auf dem Autoradiogramm (Abbildung 3.11) erst in Zyklus 22. Bei längerer Exposition des Röntgenfilmes waren Signale zwar schon ab Zyklus 20 sichtbar, die Signale der höheren Zyklenzahlen aber sehr gestreut und dunkel, so daß auf die Darstellung eines solchen Autoradiogrammes verzichtet wurde.

Auf der Photographie des Gels scheint die Expression der p21 mRNA in den drei verschiedenen Mauslungen gleich stark zu sein. Das Autoradiogramm deutet aber auf eine stärkere Expression in Sp3-defizienter Mauslunge als in Sp3-hetereozygoter- und Wildtyp-Lunge hin. Die quantitative Auswertung bestätigt diesen Eindruck (Tabelle 3.4).

Zyklenzahl	Intensität der p21-Bande in Sp3 (-/-)-Mauslunge	Intensität der p21-Bande in Sp3 (+/-)-Mauslunge	Intensität der p21-Bande in Sp3 (+/+)-Mauslunge	Verhältnis der Sp3 (-/-)- zur Sp3 (+/+)-Mauslungen-Bande
20	80,06	73,28	81,73	1,0
22	168,43	148,52	180,15	0,9
25	1231,21	1049,39	826,70	1,5
27	1462,78	1236,93	1100,92	1,3
30	1420,09	1235,89	1186,53	1,2
35	1597,26	1184,61	1437,53	1,1

Tab. 3.4: Phosphor-Imager-Auswertung des Southern Blots

Die in der Tabelle aufgelisteten Werte stehen für die mit dem Phosphor-Imager ermittelte relative Radioaktivität.

Von den ermittelten Werten wurde ein Hintergrundsignal von 55 abgezogen und anschließend das Verhältnis der Expression der p21 mRNA in Sp3-defizienter Mauslunge zur Expression der p21 mRNA in Wildtyp-Mauslunge errechnet (Spalte ganz rechts). Dieses Verhältnis ist für alle Zyklen $1 \pm 0,5$.

Die Phosphor-Imager-Auswertung zeigt, daß die p21 mRNA Expression in Sp3-defizienter Mauslunge bis zu 1,5fach stärker ist als in Sp3-heterozygoter und Wildtyp-Mauslunge. Ein so geringer Unterschied im Expressionsniveau kann seine Ursache möglicherweise in Schwankungen der Genexpression in den einzelnen Mauslungen haben. Um das ausschließen zu können, müßte das Ergebnis des Versuches mit anderen Mauslungen überprüft werden.

4 DISKUSSION

Ziel der Arbeit war es, Gene zu finden, die von dem Transkriptionsfaktor Sp3 *in vitro* und *in vivo* in ihrer Expression beeinflusst werden. Als Ausgangsmaterial standen Sp3-defiziente, Sp3-heterozygote und Wildtyp-Fibroblastenzellen zur Verfügung sowie Sp3-defiziente, Sp3-heterozygote und Wildtyp-Mauslungen aus Tag E18.5 Embryonen. Die Expression von verschiedenen Genen in den oben genannten Zellen und der Mauslung wurde mit unterschiedlichen Methoden untersucht.

Northern Blots wurden mit Gesamt-RNA aus Fibroblastenzellen und aus der Mauslung hergestellt. Die Signale, die auf den Membranen durch die Hybridisierung mit cDNA verschiedener Gene entstanden, gaben Aufschluß über das relative Expressionsniveau der mRNA dieser Gene in Sp3-defizienten und Wildtyp-Geweben/Zellen. Unterschiede in der Expression können Folge einer Transkriptionsregulation durch Sp3 sein. Damit die Signale auf den Membranen miteinander verglichen werden konnten, mußte gewährleistet sein, daß die Mengen der aufgetragenen Gesamt-RNA gleich groß waren. Um das zu überprüfen, wurde als Hybridisierungsprobe ein Oligonukleotid gegen die 18S-RNA verwendet. Die mRNAs von Genen, die in den verwendeten Geweben/Zellen nur sehr schwach exprimiert werden, wurden mittels reverser Transkriptase-Polymerase Kettenreaktion (RT-PCR), einer sensitiveren Methode als dem Northern Blot, untersucht.

Die Ergebnisse der RT-PCR lassen aber lediglich eine semiquantitative Aussage über die Expression der getesteten mRNAs zu. Die PCR-Reaktion ist ab einem bestimmten Zyklus gesättigt und Unterschiede im Expressionsniveau sind nicht mehr sichtbar. Der PCR-Reaktion wurden Proben nach unterschiedlichen Zyklenzahlen entnommen (18, 20, 22, 25, 27, 30, 35, 40), um das Expressionsniveau der mRNAs bis zur Sättigung zu beobachten und damit eine annähernd genaue Aussage über dieses tätigen zu können. Mit zunehmender Zyklenzahl und damit Sättigung nimmt der Signalunterschied ab.

Um ein möglichst großes Spektrum von Genen nach potentiellen Sp3-Zielgenen durchsuchen zu können, wurde eine weitere Methode herangezogen. Als Grundlage diente eine 588 Maus-cDNA-Fragmente enthaltene Nylonmembran (cDNA-Array) von der Firma Clontech, die mit cDNA aus Sp3-defizienten und Wildtyp-Fibroblastenzellen hybridisiert wurde. Über den Vergleich der Signalintensität auf der mit cDNA aus Sp3(-/-)-Fibroblastenzellen hybridisierten Membran mit der Signalstärke auf der mit cDNA aus Sp3(+/-)-Fibroblastenzellen hybridisierten Membran kann eine Aussage

über die Expression verschiedener Gene gemacht werden. Unterschiedlich starke Signale auf dem cDNA-Array können aber nicht nur durch unterschiedlich starke Expression der Gene verursacht werden, sondern auch durch ungleiche Mengen immobilisierter cDNA oder durch unterschiedliche Qualität der zur reversen Transkription verwendeten Gesamt-RNA. Um die Ergebnisse des cDNA-Arrays zu überprüfen, wurde die Expression der mRNA einiger Gene mittels RT-PCR in Sp3-defizienten Fibroblastenzellen und Wildtyp-Fibroblastenzellen untersucht.

4.1 Potentielle Zielgene des Transkriptionsfaktors Sp3 in Fibroblastenzellen (MEFs)

4.1.1 Nachweis von potentiellen Sp3-Zielgenen in Fibroblastenzellen (MEFs)

Die Grundlage für die Untersuchungen potentieller Sp3-Zielgene bildete ein cDNA-Array, der im Rahmen einer Diplomarbeit am Institut für Molekularbiologie und Tumorforschung der Philipps-Universität Marburg von Heike Göllner (08/98) durchgeführt wurde. Bei diesem Experiment wurde die Expression der mRNA verschiedener Gene in differenzierten Sp3-defizienten embryonalen Maus-Stammzellen mit der in differenzierten Wildtyp-embryonalen Maus-Stammzellen verglichen. Fünf der so entdeckten potentiellen Sp3-Zielgene wurden für die vorliegende Arbeit ausgewählt, um deren Expression mit einer weiteren Methode und in einem anderen Zellkultursystem zu untersuchen. Es handelte sich hierbei um GFR (Growth factor receptor), Zyxin, Integrin β , Kollagenase IV und Pref-1 (Preadipozytenfaktor-1). Diese Gene werden alle in differenzierten Sp3-defizienten embryonalen Stammzellen stärker exprimiert als in differenzierten Wildtyp-embryonalen Stammzellen.

Zur Untersuchung der Gene mittels Northern Blot (für GFR, Zyxin, Integrin β , Kollagenase IV) bzw. RT-PCR (für Pref-1) wurde Gesamt-RNA aus Sp3-defizienten, Sp3-heterozygoten und Wildtyp-Fibroblastenzellen aus Tag E13.5 Maus-Embryonen verwendet.

Als Ergebnis des Northern Blots ergaben sich vergleichbare Expressionsniveaus für die **Zyxin** mRNA in Sp3-defizienten, Sp3-heterozygoten und Wildtyp-Fibroblastenzellen.

Die Expression von **GFR** und **Integrin β** mRNA ist in Sp3-defizienten Fibroblastenzellen gegenüber Sp3-heterozygoten und Wildtyp-Fibroblastenzellen leicht

erhöht. Da der Unterschied in den Expressionsniveaus sehr gering ist, muß dieses Ergebnis nicht zwangsläufig eine Transkriptionsregulation der Gene bedeuten. Es ist denkbar, daß es sich bei diesem Ergebnis um individuelle Schwankungen der Genexpression in den einzelnen Fibroblastenzelllinien handelt. Der Versuch sollte mit anderen Zelllinien wiederholt werden.

Die mRNA des Enzyms **Kollagenase IV** hingegen wird in Sp3-defizienten Fibroblastenzellen schwächer exprimiert als in Wildtyp-Fibroblastenzellen. Dieses Ergebnis wurde von einem mit Sp3-defizienten und Wildtyp-Fibroblastenzellen angefertigten cDNA-Array zusätzlich verstärkt. Das Kollagenase IV-Gen weist keine TATA-Box auf, besitzt aber N-terminal zwei GC-Boxen (Huhtala *et al.*, 1990) und damit potentielle Bindungsstellen für den Transkriptionsfaktor Sp3. Eine Regulation der Kollagenase IV mRNA Expression durch Sp3 ist also vorstellbar.

Die **Pref-1** mRNA Expression, die in Sp3-defizienten Fibroblastenzellen mit der in Sp3-heterozygoten und Wildtyp-Fibroblastenzellen mittels RT-PCR verglichen wurde, ist in Sp3-defizienten Fibroblastenzellen gegenüber Sp3-heterozygoten und Wildtyp-Fibroblastenzellen deutlich erhöht (Abschnitt 4.1.2).

Die voneinander abweichenden Expressionsniveaus der GFR, Integrin β , Zyxin und Kollagenase IV mRNA, die sich aus den cDNA-Arrays mit embryonalen Maus-Stammzellen und den Northern Blots mit embryonalen Maus-Fibroblastenzellen ergeben, könnten durch den Gebrauch der zwei unterschiedlichen Zellkultursysteme begründet werden.

Die Differenzierung der embryonalen Maus-Stammzellen im Rahmen der oben angeführten Diplomarbeit von Heike Göllner (08/98) lief unspezifisch und ungerichtet ab. Es wurde davon ausgegangen, daß sich Sp3-defiziente und Wildtyp-embryonale Stammzellen unter gleichen Bedingungen zu einem ähnlichen Gemisch aus unterschiedlichen Zelltypen differenzieren. Möglicherweise sind einige der gefundenen Expressionsunterschiede der Gene in Sp3-defizienten und Wildtyp-embryonalen Stammzellen aber auch auf unterschiedliche Zelltypen zurückzuführen.

Die verwendeten Maus-Fibroblastenzellen hingegen zeigten einen vergleichbaren Differenzierungsgrad, sind aber immortalisiert. Das bedeutet, daß sie Mutationen entwickelt haben, die es ihnen ermöglichen den Vorgang der Apoptose zu umgehen. Darüber hinaus kann es zu Mutationen gekommen sein, die das Expressionsmuster unabhängig vom Fehlen des Transkriptionsfaktors Sp3 verändern. In diesem Fall sind zwar Sp3-defiziente und Wildtyp-Fibroblastenzellen vergleichbar, die Expression einzelner Gene in den Fibroblastenzellen kann sich aber vor und nach dem

Immortalisieren unterscheiden. Es bleibt zu untersuchen, wie die beschriebenen Gene *in vivo* exprimiert werden.

Es stellte sich die Frage, ob weitere Gene *in vitro* gefunden werden können, die durch das Fehlen von Sp3 beeinflusst werden.

Um dieser Frage nachzugehen, wurde mit Hilfe einer kommerziell erhältlichen cDNA-Array-Membran die Expression der mRNA verschiedener Gene in Sp3-defizienten Fibroblastenzellen mit der in Wildtyp-Fibroblastenzellen verglichen.

Über den Vergleich der Signale auf der mit cDNA aus Sp3-defizienten Fibroblastenzellen hybridisierten Membran, mit denen auf der mit cDNA aus Wildtyp-Fibroblastenzellen hybridisierten Membran, kann eine Aussage über die Expressionsniveaus der untersuchten mRNAs gemacht werden. Mögliche Unterschiede in der Expression der mRNA eines Gens können Folge einer Regulation seiner Transkription durch Sp3 sein. Beim Vergleich der Array-Membranen kann es jedoch zu Problemen kommen, da ein Unterschied in der Signalstärke nicht zwangsläufig gleichbedeutend sein muß mit einem Unterschied in der Expression einer mRNA. Mögliche Ursachen sind weiterhin ungleiche Mengen immobilisierter cDNA oder Unterschiede in der Qualität der zur reversen Transkription verwendeten Gesamt-RNA. Wie in Abschnitt 3.1.2 beschrieben, dienen die auf den cDNA-Array aufgetragenen Haushaltsgene als Positivkontrollen und als Bezugspunkt für die eingesetzten RNA-Mengen, da sie relativ konstant in verschiedenen Zellen, in unterschiedlichen Entwicklungsstadien und bei verschiedenen Krankheiten exprimiert werden (Clontech, Atlas™ cDNA Expression Arrays User Manual, 1999).

Es zeigte sich jedoch, daß die Ubiquitin mRNA in Sp3-defizienten Fibroblastenzellen deutlich schwächer exprimiert wird als in Wildtyp-Fibroblastenzellen und sich aus diesem Grund nicht als Bezugspunkt für die Auswertung des Versuches eignete. Um dennoch eine Aussage über die Expressionsniveaus der detektierten mRNAs machen zu können, wurde die mRNA Expression von zwei Genen (Ubiquitin und HSP 84) exemplarisch mit der RT-PCR untersucht.

Als Ergebnis der RT-PCR im Bezug auf ihre Kontrollfunktion des cDNA-Arrays läßt sich feststellen, daß ein Angleich der mittels Phosphor-Imager ermittelten Werte für die Signale auf der mit Sp3-defizienter cDNA hybridisierten Membran an die Signale der mit Wildtyp-cDNA hybridisierten Membran nötig war.

Es zeigte sich, daß die mRNAs von **Ubiquitin** (3fach), **STAT3** (signal transducer and activator of transcription) (2fach) und **Kollagenase IV** (5fach) in Sp3-defizienten Fibroblastenzellen schwächer exprimiert werden als in Wildtyp-Fibroblastenzellen.

4.1.2 Preadipozytenfaktor-1 (Pref-1)

Preadipozytenfaktor-1 (Pref-1) ist ein EGF-ähnliche Domänen (EGF = epidermal growth factor = Epidermale Wachstumsfaktoren) enthaltendes Transmembran-Protein, welches durch Spaltung in eine lösliche Form umgewandelt werden kann (Smas *et al.*, 1999). Pref-1 trägt sechs EGF-ähnliche Wiederholungen. Auf Grund seiner großen Ähnlichkeit mit dem Drosophila-Protein Delta wird es auch als Delta-ähnliches Protein dlk (delta-like protein) beschrieben (Laborda *et al.*, 1993). Delta bindet über seine EGF-ähnliche Domäne an die EGF-ähnliche Domäne eines weiteren Drosophila-Proteins namens Notch und blockiert über diesen Mechanismus die Zelldifferenzierung (Artavanis-Tsakonas *et al.*, 1995). Es ist vorstellbar, daß auch Pref-1 über seine EGF-ähnliche Domäne mit anderen Proteinen interagiert und so verschiedene Differenzierungsprozesse unterbindet. Möglicherweise spielt Pref-1 bei der Differenzierung der insulinproduzierenden B-Zellen des Pankreas (Carlsson *et al.*, 1997) und bei der Differenzierung der Zellen der drei Nebennierenrindenzonen (Halder *et al.*, 1998) eine Rolle.

Entscheidend für die vorliegende Arbeit ist die Wirkung von Pref-1 auf die Adipozytendifferenzierung. Die Expression von Pref-1 oder die Zugabe *in vitro* inhibiert die Adipogenese. Das Protein ist in der Lage die Expression von C/EBP α (CCAAT-enhancer binding protein α) und PPAR γ (peroxisome proliferator activated receptor- γ), zwei für die Adipozytendifferenzierung wichtige Transkriptionsfaktoren, zu verhindern. Vermutlich ist PPAR γ der Hauptkoordinator der Adipogenese. Durch die Verringerung der Pref-1 Expression zu Beginn der Differenzierung wird über hormonale Mechanismen die C/EBP β und δ Expression induziert. Gleichzeitig wird der Transkriptionsfaktor ADD-1/SREBP-1 (adipose differentiation and determination factor/sterol regulatory binding protein) aktiviert. C/EBP β , δ und ADD-1/SREBP-1 interagieren mit Elementen des PPAR γ -Promotors und starten dessen Expression. Über die Bildung eines Heterodimers aus PPAR γ und RXR (retinoic X receptor) wird das Verlassen des Zellzyklusses eingeleitet. Durch die Interaktion von C/EBP α , einem weiteren Transkriptionsfaktor, mit PPAR γ wird die hohe PPAR γ -Konzentration in ausgereiften Adipozyten aufrechterhalten.

Es konnte in sechs verschiedenen Fibroblastenzelllinien sowohl mit Hilfe der RT-PCR (Abschnitt 3.2.1) als auch mit Northern Blots (persönliche Mitteilung Heike Göllner) gezeigt werden, daß Pref-1 mRNA in Sp3-defizienten Fibroblastenzellen deutlich stärker exprimiert wird als in Sp3-heterozygoten und Wildtyp-Fibroblastenzellen.

Da Pref-1 in der Lage ist die Adipogenese zu verhindern, sollte in der vorliegenden Arbeit untersucht werden, ob sich Sp3-defiziente und Wildtyp-Fibroblastenzellen gleichermaßen zu Fettzellen differenzieren lassen. Durch die Inkubation in verschiedenen Medien, denen Dexamethason zugesetzt wurde, sollten sich in den Zellen nach etwa 14 Tagen Lipidtropfen bilden, die sich mit Öl-Rot-O anfärben lassen. Durch das Glucocorticoid Dexamethason kann die Transkription von Pref-1 verringert werden und die Differenzierung von Preadipozyten zu Adipozyten ablaufen (Smas *et al.*, 1996 und 1999). Als Positivkontrolle dienen 3T3L1-Fibroblastenzellen, von denen bekannt ist, daß sie sich in Kultur zu Adipozyten differenzieren lassen (Reichert *et al.*, 1998; Mackall *et al.*, 1976). Die Differenzierung gelang weder mit Sp3-defizienten Fibroblastenzelllinien noch mit Wildtyp-Zelllinien, mit den zur Kontrolle verwendeten 3T3L1-Zellen hingegen problemlos.

Die Differenzierung zu Adipozyten setzt ein Stoppen des Zellwachstums und damit verbunden einen Austritt aus dem Zellzyklus voraus. Der oben beschriebene Ablauf dieses Vorganges kann durch verschiedene Faktoren unterbrochen werden: Es ist eine Sp1-Bindungsstelle (GC-Box) im C/EBP α -Promotor bekannt. Hohe Konzentrationen von Sp1 verhindern die C/EBP α Expression (Tang *et al.*, 1999) und somit die Adipogenese. Sp3 bindet ebenfalls an GC-Boxen, so daß ein Eingreifen des Transkriptionsfaktors in die Adipozytendifferenzierung über die Bindung an den C/EBP α -Promotor nicht ausgeschlossen werden kann.

Es ist vorstellbar, daß die Differenzierung der Fibroblastenzelllinien zu Adipozyten nicht nur von der Anwesenheit von Pref-1, sondern auch durch den Transkriptionsfaktor Sp3 verhindert wird. Möglicherweise konnten aus diesem Grund weder die Sp3-defizienten aber Pref-1-reichen Fibroblastenzellen noch die Wildtyp-, Pref-1-armen Fibroblastenzellen zu Adipozyten differenziert werden.

Des Weiteren ist aus vorherigen Versuchen bekannt, daß es Probleme bei der Differenzierung der 3T3L1-Zellen gab, wenn diese sich in einer zu hohen Passagenzahl befanden oder während der Kultivierung das Stadium der Konfluenz erreichten (persönliche Mitteilung Manuela Reichert). Die Fibroblastenzelllinien befanden sich beide schon in einer höheren Passagenzahl und waren vor dem Versuch der Differenzierung zu Adipozyten bereits konfluent gewachsen, so daß hiermit ein Hindernis für die Differenzierung entstanden sein könnte.

4.1.3 In MEFs untersuchte Gene auf einen Blick

Name des Gens	Nachweismethode	Expressionsunterschied
GFR	Northern Blot	↑
Integrin β	Northern Blot	↑
Kollagenase IV	Northern Blot	↓
Kollagenase IV	cDNA-Array	↓
Ubiquitin	cDNA-Array	↓
STAT3	cDNA-Array	↓
Pref-1	RT-PCR	↑
Zyxin	Northern Blot	–

Tab. 4.1: Tabellarische Auflistung der untersuchten Gene

↑: Expression des Gens ist in Sp3(-/-) MEFs stärker als in WT MEFs.

↓: Expression des Gens ist in Sp3(-/-) MEFs schwächer als in WT MEFs.

–: Expression des Gens ist in Sp3(-/-) und in WT MEFs gleich stark.

4.2 Nachweis von potentiellen Sp3-Zielgenen in der embryonalen Mauslunge

Sp3-defiziente Mäuse sterben unmittelbar nach der Geburt. Sie sind in der Entwicklung gegenüber den Wildtyp-Tieren zurückgeblieben und nicht in der Lage selbständig zu atmen. Bei histologischen Untersuchungen konnte in der Lunge von Wildtyp-Mäusen ein weites Alveolarlumen beobachtet werden, während das Lumen in Lungen von Sp3-defizienten Mäusen eng war und die Septen zwischen den Alveolen verdickt zu sein schienen (persönliche Mitteilung Prof. Dr. G. Suske).

Diese Beobachtungen gaben Anlaß zur Untersuchung der mRNA Expression der Surfactant Proteine, die durch ihre Reduktion der Oberflächenspannung in den Alveolen entscheidend zur Funktion der Atmung beitragen (Hermans *et al.*, 1998).

Es wurde ein Northern Blot mit Gesamt-RNA aus Sp3-defizienten, Sp3-heterozygoten und Wildtyp-Lungen aus Maus-Embryonen Tag E18.5 angefertigt. Für die **Surfactant Proteine A, B, C und D** konnte kein Unterschied in der Expression ihrer mRNA in den oben genannten Geweben festgestellt werden. Die mRNA der Surfactant Proteine kann also in Sp3-defizienter Mauslunge nachgewiesen werden. Trotzdem können bei den neugeborenen Tieren Störungen beim Atmen auftreten, wie sie beispielsweise für SP-B-defiziente Mäuse beschrieben werden (Hermans *et al.*, 1998). Es vorstellbar, daß die mRNA sowohl exprimiert als auch translatiert wird, die fertigen Proteine aber nicht in das Alveolarlumen sezerniert werden. Die Klärung dieser Hypothese könnte durch eine Lavage der Lunge erfolgen, die einen Nachweis der Proteine im Alveolarlumen

möglich machte. Ein Hindernis für dieses Verfahren ist die geringe Größe der Lungen der Maus-Embryonen.

Darüber hinaus wurde die Expression weiterer lungenspezifischer Gene untersucht. Mit einem Northern Blot mit Gesamt-RNA aus Sp3-defizienter, Sp3-heterozygoter und Wildtyp-Mauslunge aus Embryonen (Tag E18.5) konnte gezeigt werden, daß die mRNA folgender Proteine von der Anwesenheit des Transkriptionsfaktors Sp3 unabhängig exprimiert wird: **Elastin**, ein Protein der elastischen Fasern (Junqueira/Carneiro Springer-Verlag); **TTF-1** (Thyroid transcription factor-1), ein Transkriptionsfaktor, der die Expression der Surfactant Proteine A, B, C und von Uteroglobin reguliert (Yan *et al.*, 1997) und **LKLF** (Lung Krüppel-like factor), ein Transkriptionsfaktor, der bei der Blutgefäßentwicklung und der T-Zell-Regulation eine Rolle spielt (Kuo^{1 u. 2} *et al.*, 1997).

Uteroglobin ist ein sekretorisches Protein der Clara-Zellen (Aumüller *et al.*, 1985). Die Expression der Uteroglobin mRNA wurde ebenfalls mit einem Northern Blot aus Gesamt-RNA von Sp3-defizienten, Sp3-heterozygoten und Wildtyp-Mauslungen (Tag E18.5) untersucht. Es zeigten sich unterschiedliche Expressionsniveaus in Sp3-defizienter Mauslunge verglichen mit Sp3-heterozygoter und Wildtyp-Mauslunge. Die mRNA Expression ist in Sp3(-/-)-Lungen um den Faktor zwei schwächer als in den Wildtyp-Lungen. Für die Transkriptionsfaktoren Sp1 und Sp3 existieren Bindungsstellen im Maus Uteroglobin/CCSP-(Clara cell secretory protein)/CC10-(Clara cell 10 kDa protein) Gen (Toonen *et al.*, 1996), so daß eine Regulation des Gens durch den Transkriptionsfaktor Sp3 denkbar wäre.

Die Expressionsunterschiede von Uteroglobin in Knockout- und Wildtyp-Lungen stellen allerdings nicht die Ursache für das frühe Sterben der Sp3-knockout Mäuse dar, denn Uteroglobin-defiziente Mäuse zeigen keinen auffälligen Phänotyp (Stripp *et al.*, 1996). Es ist vorstellbar, daß die Anzahl der Clara-Zellen in Sp3-knockout Mäusen geringer ist als in Wildtyp-Tieren. Das würde eine verringerte Menge an Proteinen, die in den Clara-Zellen exprimiert werden, erklären. In dieser Arbeit wurde nur die Expression einer weiteren Protein mRNA untersucht, die in den Clara-Zellen exprimiert wird: TTF-1 mRNA. Es konnte kein Unterschied in den Expressionsniveaus von TTF-1 mRNA in Sp3-defizienter und Wildtyp-Mauslunge festgestellt werden. Um zu klären, ob die Ursache für den frühen Tod der Sp3-knockout Mäuse in anderen in den Clara-Zellen exprimierten Genen liegt, sollte daher in folgenden Versuchen deren Expression untersucht werden. Außerdem wäre es wichtig, die Histologie der Mauslungen genauer zu betrachten, um in den Sp3-knockout Tieren eventuelle Veränderungen der Morphologie der Clara-Zellen beobachten zu können.

Die mRNA des Proteins **p21**, das unter Mithilfe von p57 die Differenzierung der Skelettmuskulatur und der Lungenalveolen reguliert (Zhang *et al.*, 1998), war weder *in vitro* in Fibroblastenzellen noch in der Lunge von Maus-Embryonen mittels Northern Blot Analyse nachweisbar. Erst durch die RT-PCR konnte gezeigt werden, daß die Expression von p21 mRNA nicht von der Anwesenheit von Sp3 abhängig ist.

4.2.1 In Mauslungen untersuchte Gene auf einen Blick

Name des Gens	Nachweismethode	Expressionsunterschied
SP-A	Northern Blot	–
SP-B	Northern Blot	–
SP-C	Northern Blot	–
SP-D	Northern Blot	–
Elastin	Northern Blot	–
TTF-1	Northern Blot	–
LKLF	Northern Blot	–
UG	Northern Blot	↓
p21	RT-PCR	–

Tab. 4.2: Tabellarische Auflistung der untersuchten Gene

↓: Expression des Gens ist in Sp3(-/-) Mauslunge schwächer als in WT Mauslunge.
 –: Expression des Gens ist in Sp3(-/-) und in WT Mauslunge gleich stark.

4.3 Ausblick

Es wurden Gene entdeckt, die unterschiedliche Expressionsniveaus in Sp3-defizienten und Wildtyp-Fibroblastenzellen aufweisen: Kollagenase IV, GFR, Integrin β und Preadipozytenfaktor-1 (Pref-1). Die Expression dieser Gene sollte daher in Sp3-defizienten und Wildtyp-Tieren untersucht werden. Für Pref-1 sollten weiterhin speziell Versuche mit spezifischen Geweben durchgeführt werden, wie z.B. Nebenniere und Pankreas. Bei der Differenzierung bestimmter Zellen dieser Gewebe spielt das Protein eine große Rolle. Diese verschiedenen Differenzierungsprozesse sollten, wie in dieser Arbeit mit der Adipozytendifferenzierung geschehen, in weiteren Versuchen untersucht werden.

Sp3-knockout Mäuse sterben kurz nach der Geburt und es konnte beobachtet werden, daß die Jungtiere Probleme bei der Atmung zeigen. Die Untersuchung der Expression der Surfactant-Proteine ergab keine Regulation durch den Transkriptionsfaktor Sp3. Es wurde aber lediglich nachgewiesen, daß die mRNA der Surfactant-Proteine gebildet wird. In weiteren Untersuchungen sollte getestet werden, ob die Proteine auch sezerniert werden. Ein Fehlen der Surfactant Proteine im Lungenlumen könnte eine erhöhte Oberflächenspannung der Alveolen bewirken und damit einen Kollaps der Lunge nach sich ziehen.

Für Uteroglobulin konnte eine Veränderung in der Expression in Sp3-defizienter gegenüber Wildtyp-Mauslunge gezeigt werden. Uteroglobulin wird in der Lunge in den Clara-Zellen exprimiert. Weitere Gene, die ebenfalls in den Clara-Zellen exprimiert werden, sollten auf ihr Expressionsniveau überprüft werden. Eine unterschiedliche Anzahl an Clara-Zellen in Sp3-defizienten und Wildtyp-Mauslungen sowie eine veränderte Morphologie sind nicht auszuschließen, so daß eine genaue histologische Beobachtung erstrebenswert ist.

5 ZUSAMMENFASSUNG

Der ubiquitär vorkommende Transkriptionsfaktor Sp3 (benannt nach dem Schema der Aufreinigung über eine Sephacryl- und eine Phosphocellulose-Säule; in der Literatur auch: Specificity protein) sowie Sp1, Sp2 und Sp4 gehören zu einer Protein-Familie, die an Sequenzen auf der DNA wie die GC-Box oder die GT-Box binden. Die Proteine dieser Familie besitzen große strukturelle Gemeinsamkeiten. Ihre DNA-Bindungsdomänen am C-Terminus sind hoch konserviert und bestehen aus drei Zinkfingern vom Cys₂/His₂-Typ. N-terminal befinden sich je zwei - bei Sp2 nur eine - glutaminreiche Regionen, die als Aktivierungsdomänen dienen. Für Sp3 existiert darüber hinaus eine weitere funktionelle Domäne zwischen den glutaminreichen Regionen und den Zinkfingern. Dieser Abschnitt wirkt als inhibitorische Domäne und ist in der Lage die Transaktivierung durch die glutaminreichen Aktivierungsdomänen zu reprimieren.

Sp3-defiziente Mäuse sterben unmittelbar nach der Geburt. Sie sind in der Embryonalentwicklung gegenüber den Wildtyp-Tieren zurückgeblieben und deutlich kleiner. Es gibt Hinweise auf eine Retardierung einzelner Organe. In histologischen Schnitten konnte gezeigt werden, daß die Zahnentwicklung in Sp3-defizienten Mäusen nicht so weit fortgeschritten ist wie bei den vergleichbaren Wildtyp-Tieren. Bei neugeborenen Mäusen konnte eine Atembewegung festgestellt werden, die jedoch nicht dazu führte, daß die Lungen der Tiere ventiliert wurden. Bei histologischen Untersuchungen konnte in der Lunge von Wildtyp-Mäusen ein weites Alveolarlumen beobachtet werden, während das Lumen in Lungen von Sp3-defizienten Mäusen eng war und das Septum zwischen den Alveolen verdickt zu sein schien (persönliche Mitteilung Prof. Dr. Guntram Suske und Heike Göllner).

Ziel der Arbeit war es, potentielle Zielgene des Transkriptionsfaktors Sp3 zu identifizieren, um diese verschiedenen Phänotypen erklären zu können. Aus einer vorangegangenen Diplomarbeit am Institut für Molekularbiologie und Tumorforschung der Philipps-Universität Marburg von Heike Göllner (08/98) waren einige Gene bekannt, deren mRNA in differenzierten Sp3-defizienten embryonalen Maus-Stammzellen und in differenzierten Wildtyp-embryonalen Maus-Stammzellen unterschiedlich exprimiert werden.

Die Expression der mRNA vier dieser Gene (Zyxin, Growth factor receptor, Integrin β und Kollagenase IV) wurde mittels Northern Blot mit Gesamt-RNA aus Fibroblastenzelllinien untersucht und das Ergebnis mit Hilfe des Phosphor-Imagers ausgewertet. Danach wird die mRNA Expression von Zyxin nicht von der An-

Abwesenheit des Transkriptionsfaktors Sp3 beeinflusst. Die GFR (Growth factor receptor) und Integrin β mRNA wird in Sp3-defizienten Maus-Fibroblastenzellen 1,5fach stärker exprimiert als in Wildtyp-Maus-Fibroblastenzellen. Kollagenase IV mRNA hingegen, wird in Sp3-defizienten Fibroblastenzellen um den Faktor 3 bis 5 geringer exprimiert als in Wildtyp-Fibroblastenzellen.

Ein weiteres, schon in embryonalen Maus-Stammzellen untersuchtes Gen, wurde ausgewählt, um die Expression dessen mRNA mit Hilfe der Reversen Transkriptase-Polymerase Kettenreaktion (RT-PCR = reverse transcriptase polymerase-chain reaction) zu untersuchen. Hierbei handelte es sich um den Preadipozytenfaktor-1 (Pref-1). Für die Durchführung des Versuches wurde Gesamt-RNA aus Maus-Fibroblastenzellen verwendet. Das Ergebnis zeigte, daß Pref-1 mRNA in Sp3-defizienten Zellen deutlich stärker exprimiert wird als in Wildtyp-Zellen. Aus der Literatur ist bekannt, daß Pref-1 die Adipogenese verhindert. Darum wurde untersucht, ob sich Sp3-defiziente Fibroblastenzellen mit hohem Pref-1 Expressionsniveau und Wildtyp-Fibroblastenzellen mit kaum nachweisbarer Menge an Pref-1 mRNA zu Adipozyten differenzieren lassen. Es zeigte sich, daß eine Differenzierung zu Adipozyten weder mit Sp3-defizienten, noch mit Wildtyp-Fibroblastenzellen möglich war, während sich die zur Kontrolle verwendeten 3T3L1-Zellen problemlos zu Adipozyten differenzierten.

Weitere potentielle Zielgene des Transkriptionsfaktors Sp3 sollten mit Hilfe eines kommerziellen cDNA-Arrays, auf den 588 verschiedene Maus-cDNAs aufgebracht waren, gefunden werden. Es konnten drei Gene ermittelt werden, deren mRNA Expression in Sp3-defizienten Fibroblastenzellen um den Faktor zwei (STAT3 = signal transducer and activator of transcription), fünf (Kollagenase IV) und drei (Ubiquitin) gegenüber Wildtyp-Fibroblastenzellen geringer war.

Da die Sp3-defizienten Mausembryonen nicht selbständig atmen können, wurden Lungenproteine und Proteine, die für die Entwicklung und Funktion der Lunge von Bedeutung sind, *in vivo* untersucht. Mit Gesamt-RNA aus Lungen von Mausembryonen wurden Northern Blots durchgeführt. Die mRNAs der Surfactant Proteine A, B, C und D sind in ihrer Expression nicht von der Abwesenheit des Transkriptionsfaktors Sp3 beeinflusst. Die Expression der mRNA weiterer lungenspezifischer Proteine wie LKLF (Lung Krüppel-like factor), TTF-1 (Thyroid transcription factor-1), Elastin und p21 (WAF-1) ist ebenfalls in Sp3-defizienten, Sp3-heterozygoten und Wildtyp-Mauslungen gleich, während die mRNA von Uteroglobulin (auch: CCSP = Clara cell secretory protein oder CC10 = Clara cell 10 kDa protein), einem hauptsächlich in den Clara-Zellen

exprimierten sekretorischen Protein, in Sp3-defizienter Mauslunge deutlich schwächer exprimiert wird als in der Wildtyp-Mauslunge.

6 LITERATURVERZEICHNIS

Acarregui, M.J., Penisten, S.T., Goss, K.L., Ramirez, K., Snyder, J.M. (1999). Vascular endothelial growth factor gene expression in human fetal lung in vitro. *Am. J. Respir. Cell. Mol. Biol* **20**, 14-23.

Artavanis-Tsakonas, S., Matsuno, K., Fortini, M.E. (1995). Notch signaling. *Science* **268**, 225-232.

Aumüller, G., Seitz, J., Hevns, W., Kirchner, C. (1985). Ultrastructural localisation of uteroglobin immunoreactivity in rabbit lung and endometrium, and rat ventral prostate. *Histochemistry* **83**, 413-417.

Baniahmad, A., Steiner, C., Köhne, A.C., Renkawitz, R. (1990). Modular structure of a chicken lysozyme silencer. Involvement of an unusual thyroid hormone receptor binding site. *Cell* **61**, 505-514.

Baniahmad, A., Köhne, A.C., Renkawitz, R. (1992). A transferable silencing domain is present in the thyroid hormone receptor, in the v-erbA oncogene product and in the retinoic acid receptor. *EMBO J.* **11**, 1015-1023.

Bellefroid, E.J., Poncelet, D.A., Lecocq, P.J., Revelant, O., Martial, J.A. (1991). The evolutionarily conserved Krüppel-associated box domain defines a subfamily of eukaryotic multifingered proteins. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **88**, 3608-3612.

Berger, S.L., Cress, W.D., Cress, A., Triezenberg, S.J., Guarente, L. (1990). Selective inhibition of activated but not basal transcription by the acidic activation domain of VP16: evidence for transcriptional adaptors. *Cell* **69**, 1097-1106.

Billon, N., Carlisi, D., Datto, M.B., van Grunsven, L.A., Watt, A., Wang, X.F., Rudkin, B.B. (1999). Cooperation of Sp1 and p300 in the induction of the CDK inhibitor p21WAF1/CIP1 during NGF-mediated neuronal differentiation. *Oncogene* **18**, 2872-2882.

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

Breathnach, R., Chambon, P. (1981). Organization and expression of eukaryotic split genes coding for proteins. *Annual. Rev. Biochem.* **50**, 349-383.

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

Carlsson, C., Tornehave, D., Lindberg, K., Galante, P., Billestrup, N., Michelsen, B., Larsson, L.I., Nielsen, J.H. (1997). Growth hormone and prolactin stimulate the expression of rat preadipocyte factor-1/delta-like protein in pancreatic islets: molecular cloning and expression pattern during development and growth of endocrine pancreas. *Endocrinology* **138**, 3940-3948.

Cetin, Y., Kulaksiz, H., Redecker, P., Bargsten, G., Adermann, K., Grube, D., Forssmann, W.G. (1995). Bronchiolar nonciliated secretory (Clara) cells: source of guanylin in the mammalian lung. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **92** 5925-5929.

Courey, A.J., Tjian, R. (1988). Analysis of Sp1 in vivo reveals multiple transcriptional domains, including a novel glutamine-rich activation motif. *Cell* **55**, 887-898.

D'Amore-Bruno, M.A., Wikenheiser, K.A., Carter, J.E., Clark, J.C., Whitsett, J.A. (1992). Sequence, ontogeny, and cellular localisation of murine surfactant protein B mRNA. *Am. J. Physiol.* **262**, L40-47.

Datto, M.B., Yu, Y., Wang, X.F. (1995). Functional analysis of the transforming growth factor beta responsive elements in the WAF1/Cip1/p21 promoter. *J. Biol. Chem.* **270**, 28623-28628.

Denning, J., Beato, M., Suske, G. (1996). An inhibitor domain in Sp3 regulates its glutamine-rich activation domains. *EMBO J.* **15**, 5444-5452.

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

Fairall, L., Schwabe, J.W., Chapman, L., Finch, J.T., Rhodes, D. (1993). The crystal structure of a two zinc-finger peptide reveals an extension to the rules for zinc-finger/DNA recognition. *Nature* **366**, 483-487.

Fajas, L., Fruchart, J.C., Auwerx, J. (1998). Transcriptional control of adipogenesis. *Curr. Opin. Cell. Biol.* **10**, 165-173.

Fassler, R., Meyer, M. (1995). Consequences of lack of beta 1 integrin gene expression in mice. *Genes and Dev.* **9**, 1896-1908.

Freedmann, L.P., Luisi, B.F., Korszun, Z.R., Basavappa, R., Sigler, P.B., Yamamoto, K.R. (1988). The function and structure of the metal coordination sites within glucocorticoid receptor DNA binding domain. *Nature* **334**, 543-546.

Gill, G., Pascal, E., Tseng, Z.H., Tjian, R. (1994). A glutamine-rich hydrophobic patch in transcription factor-Sp1 contacts the dTAF(II)110 component of the Drosophila TFIID complex and mediates transcriptional activation. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **91**, 192-196.

Glasser, S.W., Korfhagen, T.R., Bruno, M.D., Dey, C., Whitsett, J.A. (1990). Structure and expression of the pulmonary surfactant protein SP-C gene in the mouse. *J. Biol. Chem.* **265**, 21986-91.

Goodrich, J.A., Tjian, R. (1994). TBP-TAF complexes: selectivity factors for eukaryotic transcription. *Curr. Opin. Cell. Biol.* **6**, 403-409.

Hagen, G., Müller, S., Beato, M., Suske, G. (1992). Cloning by recognition site screening of two novel GC 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.

Halder, S.K., Takemori, H., Hatano, O., Nonaka, Y., Wada, A., Okamoto, M. (1998). Cloning of a membrane-spanning protein with epidermal growth factor-like repeat motifs from adrenal glomerulosa cells. *Endocrinology* **139**, 3316-3328.

Hanna-Rose, W., Hansen, U. (1996). Active repression mechanisms of eukaryotic transcription repressors. *TIG* **12**, 229-234.

Hata, Y., Duh, E., Zhang, K., Robinson, G.S., Aiello, L.P. (1998). Transcription factors Sp1 and Sp3 alter vascular endothelial growth factor receptor expression through a novel recognition sequence. *J. Biol. Chem.* **273**, 19294-19303.

Hermans, C., Bernard, A. (1998). Lung epithelium specific proteins: characteristics and potential applications as markers. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* **159**, 646-678.

Huhtala, P., Chow, L.T., Tryggvason, K. (1990). Structure of the human type IV collagenase gene. *J. Biol. Chem.* **19**, 11077-11082.

Jackson, S.P., Tjian, R. (1988). O-glycosylation of eukaryotic transcription factors: implications for mechanisms of transcriptional regulation. *Cell* **55**, 125-133.

Jackson, S.P., McDonald, J.J., Lees-Miller, S., Tjian, R. (1990). GC box binding induces phosphorylation of Sp1 by a DNA-dependent protein kinase. *Cell* **63**, 155-165.

Johnson, A.D. (1995). The price of repression. *Cell* **81**, 655-658.

Junqueira/Carneiro, Springer-Verlag, 1996.

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

Kadonaga, J.T., Courey, A.J., Ladika, J., Tjian, R. (1988). Distinct regions of Sp1 modulate DNA binding and transcriptional activation. *Science* **242**, 1566-1570.

Kalff-Suske, M., Kunz, J., Grzeschik, K.-H., Suske, G. (1995). Human Sp4 transcription factor gene Sp4 maps to chromosome 7p15. *Genomics* **26**, 631-633.

Kalff-Suske, M., Kunz, J., Grzeschik, K.-H., Suske, G. (1996). Human Sp3 transcription regulator gene (Sp3) maps to chromosome 2q31. *Genomics* **37**, 410-412.

Karin, M., Hunter, T. (1995). Transcriptional control by protein phosphorylation: signal transmission from the cell surface to the nucleus. *Current Biology* **5**, 747-757.

Kennett, S.B., Udvadia, A.J., Horowitz, J.M. (1997). Sp3 encodes multiple proteins that differ in their capacity to stimulate or repress transcription. *Nucleic Acids Res.* **25**, 3110-3117.

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.

Kissinger, C.R., Liu, B., Martin-Blanco, E., Kronberg, T.B., Pabo, C.O. (1990). Crystal structure of an *engrailed* homeodomain-DNA complex at 2.8 Å resolution: A framework for understanding homeodomain-DNA interactions. *Cell* **63**, 579-590.

Korfhagen, T.R., Bruno, M.D., Glasser, S.W., Ciralo, P.J., Whitsett, J.A., Lattier, D.L., Wikenheiser, K.A., Clark, J.C. (1992). Murine pulmonary surfactant SP-A gene: cloning, sequence and transcriptional activity. *Am. J. Physiol.* **263**, L546-554.

Korfhagen, T.R., Sheftelyevich, V., Burhans, M.S., Bruno, M.D., Ross, G.F., Wert, S.E., Stahlmann, M.T., Jobe, A.H., Ikegami, M., Whitsett, J.A., Fisher, J.H. (1998). Surfactant protein-D regulates surfactant phospholipid homeostasis in vivo. *J. Biol. Chem.* **273**, 28438-28443.

Kornberg, R.D., (1996). RNA polymerase II transcriptional control. *TIBS* **21**, 325-326.

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

Kuo, C.T.¹, Veselits, M.L., Barton, K.P., Lu, M.M., Clendenin, C., Leiden, J.M. (1997). The LKLF transcription factor is required for normal tunica media formation and blood vessel stabilisation during murine embryogenesis. *Genes and Dev.* **11**, 2996-3006.

Kuo, C.T.², Veselits, M.L., Leiden, J.M. (1997). LKLF: A transcriptional regulator of single-positive T cell quiescence and survival. *Science*, **277**, 1986-1990.

Laborda, J., Sausville, E.A., Hoffmann, T., Notario, V. (1993). Dlk a putative mammalian homeotic gene differentially expressed in small cell lung carcinoma and neuroendocrine tumor cell line. *J.Biol. Chem.* **268**, 3817-3820.

Landschulz, W.H., Johnson, P.F., McNight, S.L. (1988). The leucine zipper: a hypothetical structure common to a new class of DNA binding proteins. *Science* **240**, 1759-1763.

Larsson-Blomberg, L., Dzierzak, E. (1994). Isolation of tyrosine kinase related genes expressed in the early hematopoietic system. *FEBS Lett* **348**, 119-125.

Levine, M., Manley, J.L. (1989). Transcriptional repression of eukaryotic promoters. *Cell* **59**, 405-408.

Lewin, B., (1990). Commitment and activation at Pol II promoters: A tail of protein-protein interactions. *Cell* **61**, 1161-1164.

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

Lin, Y.S., Ha, I., Malonado, E., Reinberg, D., Green, M.R. (1991). Binding of general transcription factor TFIIIB to an acidic activating region. *Nature* **353**, 569-571.

Mackall, J.C., Student, A.K., Polakis, S.E., Lane, M.D. (1976). Induction of lipogenesis during differentiation in a "Preadipocyte" cell line. *J. Biol. Chem.* **20**, 6462-6464.

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.

Margolin, J.F., Friedmann, J.R., Meyer, W.K., Vissing, H., Theisen, H.J., Rauscher III, F.J. (1994). Krüppel-associated boxes are potent transcriptional repression domains. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **91**, 4509-4513.

Marin, M., Karis, A., Visser, P., Grosvelt, F., Philipson, S. (1997). Transcription factor Sp1 is essential for early embryonic development but dispensable for cell growth and differentiation. *Cell* **89**, 619-628.

Matera, A.G., Ward, D.C. (1993). Localisation of the human Sp1 transcription factor gene to 12q13 by fluorescence in situ hybridisation. *Genomics* **17**, 793-794.

Miller, J., McLachlan, A.D., Klug, A. (1985). Repetitive zinc-binding domains in the protein transcription factor IIIA from *Xenopus* oocytes. *EMBO J.* **4**, 1609-1614.

Mitchell, P.J., Tjian, R. (1989). Transcriptional regulation in mammalian cells by sequence-specific DNA-proteins. *Science* **245**, 371-378.

Murata, Y., Kim, H.G., Rogers, K.T., Udvardia, A.J., Horowitz, J.M. (1994). Negative regulation of Sp1 trans-activation is correlated with the binding of cellular proteins to the amino terminus of Sp1 trans-activation domain. *J. Biol. Chem.* **269**, 20674-20681.

Nix, D.A., Beckerle, M.C. (1997). Nuclear-cytoplasmic shuttling of the focal contact protein, zyxin: a potential mechanism for communication between sites of cell adhesion and the nucleus. *J. Cell. Biol.* **138**, 1139-1147.

Pascal, E., Tjian, R. (1991). Different activation domains of Sp1 govern formation of multimers and mediate transcriptional synergism. *Genes and Dev.* **5**, 1646-1656.

Pavletich, N.P., Pabo, C.O. (1991). Zinc finger-DNA recognition: Crystal structure of a Zif268-DNA complex at 2.1 Å. *Science* **252**, 809-817.

Philipsen, S., Suske, G. (1999). A tale of three fingers: the family of mammalian Sp/XKLF transcription factors. *Nucleic Acids Res.* **27**, 2991-3000.

Pugh, B.F., Tjian, R. (1990). Mechanism of transcriptional activation of Sp1: evidence for coactivators. *Cell* **61**, 1187-1197.

Qin, H., Moellinger, J.D., Wells, A., Windsor, L.J., Sun, Y., Benveniste, E.N. (1998). Transcriptional suppression of matrix metalloproteinase-2 gene expression in human astrogloma cells by TNF-alpha and IFN-gamma. *J. Immunol.* **161**, 6664-6673.

Reichert, M., Eick, D. (1998). Analysis of cell cycle arrest in adipocyte differentiation. *Oncogene* **18**, 459-466.

Roeder, R.G., (1991). The complexities of eukaryotic transcription initiation: regulation of preinitiation complex assembly. *TIBS* **16**, 402-408.

Roeder, R.G., (1996). The role of general initiation factors in transcription by RNA polymerase II. *TIBS* **21**, 327-335.

Sadowski, I., Ma, J., Triezenberg, S., Ptashne, M. (1988). Gal4-VP16 is an unusually potent transcriptional activator. *Nature* **335**, 563-564.

Sauer, F., Fondell, J.D., Ohkuma, Y., Roeder, R.G., Jäckle, H. (1995). Control of transcription by Krüppel through interaction with TFIIB and TFIIE β . *Nature* **375**, 162-164.

Schohy, S., Van Vooren, P., Szpirer, C., Szpirer, J. (1998). Assignment of Sp genes to rat chromosome bands 7q36 (Sp1), 10q31-q32.1 (Sp2), 3q24-q31 (Sp3) and 6q33 (Sp4) and of the Sp2 gene to human chromosome bands 17q21.3-q22 by in situ hybridisation. *Cytogenet. Cell. Genet.* **81**, 273-274.

Schrack, J.J., Hughes, M.J., Anderson, K.P., Croyle, M.L., Lingrel, J.B. (1999). Characterization of the lung Krüppel-like transcription factor gene and upstream regulatory elements. *Gene* **236**, 185-195.

Smale, S.T., Baltimore, D. (1989). The "initiator" as a transcription control element. *Cell* **57**, 103-113.

Smas, C.M., Sul, H.S. (1993). Pref-1, a protein containing EGF-like repeats, inhibits adipocyte differentiation. *Cell* **73**, 725-734.

Smas, C.M., Green, D., Sul, H.S. (1994). Structural characterisation and alternate splicing of the gene encoding the preadipocyte EGF-like protein pref-1. *Biochemistry* **33**, 9257-9265.

Smas, C.M., Sul, H.S. (1996). Characterisation of pref-1 and its inhibitory role in adipocyte differentiation. *International Journal of Obesity* **20**, 65-72.

Smas, C.M., Chen, L., Zhao, L., Latasa, M.J., Sul, H.S. (1999). Transcriptional repression of pref-1 by glucocorticoids promotes 3T3-L1 adipocyte differentiation. *J. Biol. Chem.* **274**, 12632-12641.

Sorger, P.K., Lewis, M.J., Pelham, H.R.B. (1987). Heat shock factor is regulated differently in yeast and HeLa cells. *Nature* **329**, 81-84.

Stripp, B.R., Lund, J., Mango, G.W., Doyen, K.C., Jhonston, C., Hultenby, K., Nord, M., Whitsett, J.A. (1996). Clara cell secretory protein: a determinant of PCB bioaccumulation in mammals. *Am. J. Physiol.* **271**, L656-664.

Supp, D.M., Witte, D.P., Branford, W.W., Smith, E.P., Potter, S.S. (1996). Sp4, a member of the Sp-family of zinc finger transcription factors, is required for normal murine growth, viability and male fertility. *Dev. Biol.* **176**, 284-299.

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

Tang, Q.Q., Jiang, M.S., Lane, D. (1999). Repressive effect of Sp1 on the C/EBP α gene promoter: Role in adipocyte differentiation. *Mol. Cell. Biol.* **19**, 4855-4865.

Toonen, R.F.G., Gowan, S., Bingle, C.D. (1996). The lung enriched transcription factor TTF-1 and the ubiquitously expressed proteins Sp1 and Sp3 interact with elements located in the minimal promoter of the rat Clara cell secretory protein gene. *Biochem. J.* **316**, 1-7.

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.

Wani, M.A., Means, R.T. (Jr.), Lingrel, J.B. (1998). Loss of LKLF function results in embryonic lethality in mice. *Transgenic Res.* **7**, 229-238.

Wingender, E. (1988). Compilation of transcription regulating proteins. *Nucleic Acids Res.* **16**, 1879-902.

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

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

Yan, C., Whitsett, J.A. (1997). Protein kinase A activation of the surfactant protein B gene is mediated by phosphorylation of thyroid transcription factor 1. *J. Biol. Chem.* **272**, 17327-17332.

Zhang, P., Wong, C., Liu, D., Finegold, M., Harper, J.W., Elledge, S.J. (1999). p21CIP1 and p57KIP2 control muscle differentiation at the myogenin step. *Genes and Dev.* **13**, 213-224.

Zhao, L., Chang, L.S. (1997). The human POLD1 gene. Identification of an upstream activator sequence, activation by Sp1 and Sp3, and cell cycle regulation. *J. Biol. Chem.* **272**, 4869-4882.

Diplom- und Doktorarbeiten

Dennig, Jörg: Die Bedeutung der Transkriptionsfaktoren Sp1, Sp3 und Sp4 für die Aktivität des Uteroglobinpromotors. 1994. Philipps-Universität Marburg

Doll, Andreas: Klonierung von Interaktionspartnern des Transkriptionsfaktors Sp3 durch ein genetisches Interaktions-Screening in *Saccharomyces cerevisiae*. 1998. Philipps-Universität Marburg

Göllner, Heike: Identifizierung potentieller Zielgene der Transkriptionsfaktoren Sp1 und Sp3 in embryonalen Stammzelllinien und Etablierung Sp3-defizienter Fibroblastenzelllinien. 1998. Philipps-Universität Marburg

7 ANHANG

Abkürzungsverzeichnis

Über die gebräuchlichen SI- und IUPAC-Einheiten hinaus wurden die folgenden Abkürzungen verwendet:

A	Adenin
Abb.	Abbildung
bp	Basenpaare
BSA	Bovine Serum Albumine (Rinderserumalbumin)
C	Cytosin
cDNA	copy-deoxyribonucleic acid (komplementäre Desoxyribonucleinsäure)
Ci	Curie
cpm	Counts per minute (Zählereignisse pro Minute)
dATP	Desoxyadenosintriphosphat
dCTP	Desoxycytidintriphosphat
DEPC	Diethylpyrocarbonat
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle's Medium
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	deoxyribonucleic acid (Desoxyribonukleinsäure)
DNase	Desoxyribonuklease
dNTP	Desoxynukleosidtriphosphat
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
FCS	Foetal Calv Serum (Fötales Kälberserum)
G	Guanin
HAM's F10	Nutrient Mixture with Glutamax-I
HAM's F12	Nutrient Mixture with L-Glutamine
IBMX	3-Isobutyl-1-Methylxanthin
K	Lysin

kDa	Kilodalton
kb	Kilobasenpaar
MOPS	Morpholinopropaesulfonic acid
mRNA	messenger ribonucleic acid (Boten-Ribonukleinsäure)
E ₂₆₀	Extinktion bei einer Wellenlänge von 260 nm
PBS	phosphat buffered saline (Phosphat gepufferte Kochsalzlösung)
RNA	ribonucleic acid (Ribonukleinsäure)
RNase	Ribonuklease
rRNA	Ribosomale Ribonukleinsäure
RT-PCR	reverse transcription and polymerase chain reaction (Reverse Transkriptase-Polymerase Ketten Reaktion)
S	Svedberg-Einheit
SDS	sodium dodecyl sulfat (Natriumdodecylsulfat)
SP	surfactant protein (Flüssigkeitsfilm in den Lungen)
Sp1	<u>S</u> pecificity <u>p</u> rotein 1 oder nach dem Schema der Aufreinigung über: <u>S</u> ephacryl- und <u>P</u> hosphocellulose-Säulen
Sp2	<u>S</u> pecificity <u>p</u> rotein 2 oder s.o.
Sp3	<u>S</u> pecificity <u>p</u> rotein 3 oder s.o.
Sp4	<u>S</u> pecificity <u>p</u> rotein 4 oder s.o.
T	Thymin
Tab.	Tabelle
Tag E	Tag der Embryonalentwicklung
TE	Tris-EDTA
tRNA	transport ribonucleic acid (Transport Ribonukleinsäure)
u	unit (Einheit)
ü.N.	über Nacht
UpM	Umdrehungen pro Minute
UV-Strahlung	Ultra-violett-Strahlung
VT	Volumenteil/e

Verzeichnis der akademischen Lehrer

Meine akademischen Lehrer in Marburg waren die Damen und Herren:

Arnold, Aumüller, Barth, Basler, Baum, Blosser, Christiansen, Daut, Feuser, Gotzen, Griss, Gudermann, Grundmann, Happle, Hasilik, Hellinger, Hesse, Hofmann, Jungclas, Kern, Klenk, Krieg, Lange, Lennarzt, Lippert, Moll, T. Müller, U. Müller, Niessing, Oertel, Remschmidt, Renz, Schäfer, S.Schmidt, Schnabel, Schneyer, Seitz, Siegel, Sommer, Steininger, Stopinski, Sundermeyer, Suske, Tegtmeier, Voigt, Weihe, Zotz

Veröffentlichungen

Veröffentlichung im Rahmen meiner Doktorarbeit

P. Bouwman, H. Göllner, H.P. Elsässer, G. Eckhoff, A. Karis, F. Grosveld, S. Philipsen, G. Suske. (2000). Transcription factor Sp3 is essential for post-natal survival and late tooth development. *EMBO J.*, 19, 655-661.

Veröffentlichungen im Rahmen weiterer Forschungsarbeit

M. Schnabel, S. Marlovits, G. Eckhoff, L. Gotzen, V. Vécsei, J. Schlegel. (2000). Differentielle Genexpression humaner artikulärer Chondrozyten verschiedener Differenzierungsgrade und komparativer Vergleich mit humanen Fibroblasten. Hefte zur Zeitschrift „Der Unfallchirurg“ 282, Haas NP, Stürmer KM (Hrsg) Springer Verlag Berlin Heidelberg 144-145.

M. Schnabel, S. Marlovits, G. Eckhoff, I. Fichtel, L. Gotzen, V. Vécsei, J. Schlegel. (2002). Dedifferentiation-associated changes in morphology and gene expression in primary human articular chondrocytes in cell culture. *Osteoarthritis Cartilage*, 10, 62-70.

Danksagung

Mein besonderer Dank gilt Herrn **Prof. Dr. Guntram Suske**. Nicht allein für die Vergabe des interessanten Themas, insbesondere auch dafür, daß er mir als Medizinstudentin mit geringem fachspezifischen Vorwissen ermöglicht hat, einen Einblick in die Molekularbiologie zu gewinnen. Ich hoffe, daß ich mit den vielen Fragen, die ich gestellt habe und stets geduldig beantwortet bekam, anderen fachfremden Studenten diese Chance auf ein erfahrungsreiches Jahr nicht genommen habe.

Der gesamten Arbeitsgruppe Suske möchte ich für eine freundliche und hilfsbereite Zusammenarbeit danken; **Iris Rohner** für eine hervorragende Betreuung und viel Spaß von der ersten Stunde an und **Heike Göllner** für die Bereitstellung von Mausorganen, Fibroblastenzelllinien und so manchen hilfreichen Rat im Laufe meiner Arbeit.

Ich bedanke mich bei den Mitgliedern der Arbeitsgruppe Beato, mit denen ich einige fröhliche Mittagsstunden genießen durfte; **Jörg Klug** zusätzlich für die „Brücke“, die er für mich zum IMT geschlagen hat und für die Hilfsbereitschaft bei jeglichen Fragen.

Michael Schmidt, Stefan Eckhoff, Alexa Ertmer und **Heike Göllner** danke ich für fleißiges Korrekturlesen meiner Arbeit und kreative Verbesserungsvorschläge.

Ralf Klockgeter möchte ich meinen Dank für die Hilfe in Computerangelegenheiten und für so manches heimische „Moooin“ aussprechen. **Stefan Eckhoff, Stefan Seidemann** und **Horst Schmidt** verdanke ich große Arbeitserleichterung bei den letzten technischen Feinheiten.

Meinen Eltern danke ich für eine wunderbare Kindheit, eine Jugend voller Erfahrungen und jeglichen Rückhalt im Studium.

Mein letzter Dank gilt **Michael**, der sich immer tapfer gegen den nordischen Sturm meiner Gefühle stellt und die Wogen mit viel Liebe und vor allem Geduld zu glätten versteht.