

Aus dem Zentrum für Innere Medizin der Philipps-Universität Marburg
Klinik für Gastroenterologie und Stoffwechsel
Direktor: Prof. Dr. med. R. Arnold

**Untersuchungen zur transkriptionellen
Regulation des humanen Chromogranin A Gens
und seine Anwendung zum zellspezifischen
therapeutischen Gentransfer in neuroendokrine
Pankreastumorzellen**

**Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades der
gesamten Medizin
(Dr. med.)**

dem Fachbereich Humanmedizin
der Philipps-Universität Marburg

vorgelegt von

Tillmann Bert

aus Gießen

Marburg 2003

Angenommen vom Fachbereich Medizin
der Philipps-Universität Marburg am 11. September 2003

Gedruckt mit Genehmigung des Fachbereiches

Dekan: Prof. Dr. med. B. Maisch

Referentin: PD Dr. med. B. Simon

Koreferent: Prof. Dr. med. T. M. Behr

Inhaltsverzeichnis

1. Einleitung	1
1.1. Neuroendokrine gastroenteropankreatische (GEP) Tumore.....	1
1.1.1. Inzidenz, Tumorbilogie und klinische Charakteristika.....	1
1.1.2. Therapieprinzipien	2
1.2. Chromogranin A.....	3
1.2.1. Struktur und Funktion von Chromogranin A.....	3
1.2.2. Regulation der Biosynthese und Expression von Chromogranin A	6
1.3. Mechanismen der Expressionskontrolle	9
1.4. Targeting therapeutischer Gene in Tumorzellen.....	10
1.4.1. Anwendung gewebespezifischer Promotoren zu gentherapeutischen Zwecken.....	10
1.4.2. Der Natriumjodidsymporter (NIS) als therapeutisches Gen.....	11
1.5. Fragestellung.....	14
2. Material und Methoden	15
2.1. Geräte	15
2.1.1. Laborgeräte	15
2.1.2. Elektrophorese-Geräte und Zubehör.....	16
2.1.3. Zellkultur	16
2.1.4. Analytische Geräte.....	16
2.1.5. Kühlgeräte.....	17
2.2. Chemikalien, Enzyme und Verbrauchsmaterialien.....	17
2.2.1. Bakterienkultur	17
2.2.2. Enzyme	17
2.2.3. Sequenzierung und Polymerasekettenreaktion	18
2.2.4. Elektrophorese	18
2.2.5. Chemikalien und Puffer	18
2.2.6. Radioaktive Substanzen.....	19
2.2.7. Zellkultur	19

2.2.8. Verbrauchsmaterialien	19
2.3. Oligonukleotide.....	20
2.4. Vektoren und Herstellung von Konstrukten	21
2.4.1. Konstrukte.....	21
2.4.2. Herstellung von Chromogranin A Reportergenkonstrukten.....	21
2.4.3. Herstellung des Chromogranin A NIS Expressionskonstruktes.....	22
2.5. Sicherheitsvorkehrungen und Abfallbeseitigung.....	23
2.6. Standardmethoden.....	23
2.6.1. Präzipitieren und Waschen von DNA.....	23
2.6.2. Phenol-Chloroform-Isoamylalkohol-Extraktion.....	23
2.6.3. Bestimmung der DNA-Menge.....	24
2.6.4. Spaltung von DNA mit Restriktionsendonukleasen	24
2.7. Elektrophoretische Trennung von DNA-Fragmenten.....	25
2.7.1. Agarosegelelektrophorese.....	25
2.7.2. Acrylamidgelelektrophorese	25
2.7.3. Elution von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen	26
2.8. Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR).....	27
2.9. Sequenzierung.....	28
2.10. Klonierung von DNA-Fragmenten	29
2.10.1. Ligation	30
2.10.2. Transformation	30
2.10.3. Herstellung kompetenter Bakterienzellen	30
2.10.4. Plasmidgewinnung.....	31
2.10.4.1. Analytische Plasmidgewinnung.....	31
2.10.4.2. Präparative Plasmidgewinnung	31
2.11. Zellkultur.....	32
2.11.1. Zelllinien und Kultivierung	32
2.11.2. Einfrieren und Auftauen von Zellen.....	33
2.11.3. Transiente Transfektion.....	33
2.11.3.1. Stimulationen.....	34
2.11.3.2. Ernten der Zellen und Proteinextraktion	34
2.11.3.3. Luciferaseassay	34

2.11.3.4. Galaktosidaseassay	35
2.11.3.5. Bestimmung der Proteinkonzentration	35
2.11.3.6. Statistische Auswertung der Transfektionsergebnisse	35
2.12. Jod-Uptake-Messung	36
3. Ergebnisse	37
3.1. Strukturelle Charakterisierung des humanen Chromogranin A (hCgA) Promotors	37
3.1.1. Isolierung und Sequenzierung der 5-flankierenden DNA des Chromogranin A (hCgA) Gens	37
3.1.2. Charakterisierung putativer Transkriptionsfaktor-Bindungsseiten im humanen Chromogranin A Promotor	37
3.1.3. Interspeziesvergleich der 5'-flankierenden DNA des Chromogranin A Gens	41
3.2. Der humane Chromogranin A Promotor ist in neuroendokrinen Pankreastumorzellen transkriptionell aktiv und wird zelltyp- spezifisch exprimiert	47
3.2.1. Herstellung von Chromogranin A Reportergenkonstrukten	47
3.2.2. Transkriptionelle Aktivität und zellspezifische Expression des humanen Chromogranin A Promotors in den neuroendokrinen Pankreastumorzellen BON-1	47
3.3. Lokalisation <i>cis</i> -regulatorischer Elemente des Chromogranin A Promotors anhand von Deletionsanalysen	49
3.3.1. Herstellung von humanen Chromogranin A 5'- und 3'-Deletions- Reportergenkonstrukten	49
3.3.2. Lokalisation <i>cis</i> -regulatorischer Elemente im CgA Promotor anhand von 5'- und 3'-Deletionsmutanten in neuroendokrinen Pankreas- tumorzellen BON-1	51
3.3.3. Identifikation <i>cis</i> -regulatorischer Elemente im hCgA Promotor, die zellspezifische Expression vermitteln	55

3.4. Regulation des humanen Chromogranin A Promotors durch zyklisches AMP (cAMP) in den neuroendokrinen Pankreastumorzellen BON-1	58
3.5. Gastrin reguliert den humanen Chromogranin A Promotor zellspezifisch	61
3.6. Der humane Chromogranin A Promotor ist in den neuroendokrinen Pankreastumorzellen BON-1 nicht durch Insulin-like-growth-factor-1 (IGF-1) stimulierbar.....	69
3.7. Expression des Natriumjodidsymporter (NIS)-Gens unter der Kontrolle des hCgA Promotors in neuroendokrinen Pankreastumorzellen zur Radiojodtherapie	71
4. Diskussion	73
4.1. Strukturelle Charakterisierung und Crossspezies-Vergleich des humanen Chromogranin A Promotors.....	73
4.2. Basale und zellspezifische Aktivität des humanen Chromogranin A Promotors in neuroendokrinen Pankreastumorzellen	75
4.3. Transkriptionelle Regulation des humanen Chromogranin A Promotors durch zyklisches AMP in neuroendokrinen Pankreastumorzellen	80
4.4. Gastrinvermittelte Regulation des humanen CgA Promotors.....	82
4.5. Regulation des Chromogranin A Promotors durch IGF	85
4.6. Funktionelle Expression des Effektorproteins Natriumjodidsymporter unter der Kontrolle des humanen Chromogranin A Promotors in neuroendokrinen Pankreastumorzellen	88
5. Zusammenfassung.....	90
6. Literaturverzeichnis	91

7. Anhang	107
7.1. Verwendete Abkürzungen.....	107
7.2. Publikationen.....	110
7.3. Akademische Lehrer	112
7.4. Danksagung.....	113

1. Einleitung

1.1. Neuroendokrine gastroenteropankreatische (GEP) Tumore

1.1.1. Inzidenz, Tumorbilogie und klinische Charakteristika

Neuroendokrine Tumore des Gastrointestinaltraktes (neuroendokrine GEP-Tumore) treten mit einer weltweiten Inzidenz von 1-2/100.000 pro Einwohnern und Jahr selten auf [Modlin und Sandor, 1997]. Man kann zwischen den häufigen sporadischen und seltenen hereditären Formen unterscheiden, wobei bei der genetisch determinierten Multiplen endokrinen Neoplasie (MEN) Typ 1 die Betroffenen im Laufe ihres Lebens verschiedene Neoplasien, vorzüglich der Hypophyse, der Nebenschilddrüse und des Pankreas entwickeln. Ursächlich liegt eine Mutation im Tumorsuppressorgen *MEN1* auf Chromosom 11q13 zugrunde [Simon et al, 2000]. Die sporadischen neuroendokrinen GEP-Tumore treten dagegen isoliert am häufigsten im Pankreas, Dünndarm und Magen auf [Arnold et al, 2002].

Neuroendokrine GEP-Tumore werden unabhängig ihrer Lokalisation in funktionell aktive und funktionell inaktive Tumore unterteilt. Funktionell aktive GEP-Tumore können eine Vielzahl verschiedener Peptidhormone (z.B. Insulin, Gastrin, Glukagon, Vasoaktives Intestinales Peptid, Pankreatisches Polypeptid), biogene Amine (z.B. Serotonin, Dopamin) sowie Aminosäuretransmitter (z.B. GABA) produzieren und durch Übersekretion zu klassischen klinischen Syndromen wie beispielsweise dem Zollinger-Ellison-Syndrom oder dem Karzinoid-Syndrom führen [Arnold et al, 2001 und 2002]. Die häufigeren funktionell inaktiven neuroendokrinen GEP-Tumore enthalten zwar Hormone oder Amine, setzen diese jedoch nicht unkontrolliert frei und treten klinisch erst durch verdrängendes Tumorwachstum in Erscheinung. Die Diagnose eines neuroendokrinen GEP Tumors wird histologisch gestellt und als neuroendokrine Marker dienen immunhistochemisch Synaptophysin und Chromogranin A (CgA) [Solcia et al, 2000]. Bei den funktionellen Tumoren kann zusätzlich das jeweilige spezifische Peptidhormon nachgewiesen werden [Tilling et al, 2002; Kulke et al, 1999]. Trotz der klinischen Heterogenität zeichnen sich neuroendokrine GEP Tumore durch gemeinsame tumorbilogische und histopathologische Eigenschaften aus [Klöppel et al, 1996]. Im Gegensatz zu anderen epithelialen Tumoren des Gastrointestinaltraktes (z.B. Adenokarzinome) haben neuroendokrine Tumore besondere Wachstumseigenschaften

mit einer eher langsamen Proliferationsrate, spezifischer Tumorkinetik und Wachstumsregulation [Rindi et al, 2000, Rindi et al, 1998]. So besteht bei Patienten mit einem nicht-metastasierten neuroendokrinen GEP-Tumor eine mittlere 5-Jahresüberlebensrate (5-JÜR) von fast 100%, die bei Vorliegen von Metastasen immer noch bei 50% liegt [Mignon, 2000].

1.1.2. Therapieprinzipien

Die Therapie der NET ist aufgrund der Vielfalt der Optionen und der Heterogenität der einzelnen Tumorentitäten eine interdisziplinäre Aufgabe. Sie beruht im wesentlichen auf drei Grundprinzipien: Die Operation, die symptomatische Therapie und die antiproliferative Therapie. Die chirurgische Resektion stellt die einzige kurative Therapieoption dar und ist die Therapie der Wahl. Häufig ist jedoch bei Diagnosestellung die Tumorerkrankung bereits fortgeschritten. Bei symptomatischen Tumoren bietet das Tumordebulking mit Reduktion der Tumormasse eine palliative operative Therapiemöglichkeit [Memon und Nelson, 1997]. Zur symptomatischen medikamentösen Behandlung stehen heute vor allem Somatostatinanaloga, die die Hormonfreisetzung beim Karzinoid-Syndrom hemmen [Arnold et al, 1996] und Protonenpumpeninhibitoren zur Kontrolle des Zollinger-Ellison-Syndroms zur Verfügung [Metz et al, 1995]. Die dritte therapeutische Option besteht in der antiproliferativen Therapie mit α -Interferon oder der systemischen Chemotherapie. Das spontane Wachstumsverhalten metastasierter GEP-Tumore ist mit Ausnahme der kleinzelligen Karzinome, die explosionsartig wachsen, in der Regel nicht vorhersagbar, so dass vor Einleitung einer antiproliferativen Therapie das Wachstumsverhalten des Tumors bekannt sein sollte. In 50% der Fälle zeigte sich im Rahmen der Interferontherapie eine klinische Besserung und Abnahme der jeweiligen Hormonspiegel, in 20-40% konnte eine Stabilisierung erreicht und in 12-20% eine Reduktion der Tumormasse beobachtet werden [Arnold et al, 1996; Öberg, 2000]. Die Mehrzahl der neuroendokrinen GEP-Tumore spricht nicht auf Chemotherapeutika an. Nur bei den malignen neuroendokrinen Pankreastumoren können mit den Kombinationen Streptozotozin und Doxorubicin oder Streptozotozin und 5-Fluorouracil Ansprechraten von 20-30% erreicht werden [Rougier und Mitry, 2000; Kulke et al, 1999]. Schlecht differenzierte neuroendokrine Karzinome sprechen zu 67% auf eine Chemotherapie mit Cisplatin und Etoposid an [Moertel et al, 1991]. Bei nicht

resektablen Lebermetastasen besteht zusätzlich die Möglichkeit der Chemoembolisation [Kulke et al, 1999]. Die Rolle der Lebertransplantation bei Lebermetastasen neuroendokriner Tumore wird kontrovers diskutiert. Eine neuere Studie ergab eine 5-Jahres-Überlebensrate von 69% unter alleiniger Betrachtung der Patienten mit Karzinoidtumoren. Unter Einbeziehung aller neuroendokriner Tumore lag die 5-JÜR bei 36% [Le Treut et al, 1997]. Neuerdings werden mit Indium bzw. Yttrium-markierte Somatostatinanaloga als Radiotherapeutika eingesetzt. Zwei kleinere Studien zeigten eine klinische Verbesserung mit Rückgang des Tumorgröße [McCarthy et al, 1998; Otte et al, 1998]. Eine abschließende Bewertung ist aufgrund der Studienlage aber noch nicht möglich.

Zusammenfassend ist festzustellen, dass trotz der Fortschritte in der Kontrolle der Tumorsyndrome die derzeitigen Therapieoptionen beim metastasierten Tumorleiden hinsichtlich der Wachstumskontrolle enttäuschend sind und keine kurative Therapie zur Verfügung steht. Daher stellt die Entwicklung neuer Therapiekonzepte zur Behandlung metastasierter neuroendokriner GEP-Tumore eine Herausforderung dar.

1.2. Chromogranin A

1.2.1. Struktur und Funktion von Chromogranin A

Chromogranin A (CgA) ist Hauptvertreter der Chromogranin/Sekretogranin (Granin) Familie saurer Glykoproteine. Granine werden in sekretorischen Granula der meisten endokrinen und neuroendokrinen Zellen zusammen mit den dort vorhandenen Hormonen oder Neurotransmittern gespeichert und sezerniert [Winkler et al, 1992; Huttner et al, 1991]. Chromogranin A ist das Hauptprotein in den Katecholamin sekretorischen Granula der Nebenniere und kommt auch reichhaltig in der Hypophyse, im Pankreas, Magen und Dünndarm vor [Winkler et al, 1992]. Neben den klassischen endokrinen Geweben kann CgA auch in einzelnen neuroendokrinen Zellen der Mamma, der Lunge und Prostata nachgewiesen werden [Hendy et al, 1995]. Neuroendokrine Tumore kosezernieren immunreaktives CgA zusammen mit ihren charakteristischen Hormonen [Levine et al, 1990]. CgA wird als Tumormarker zur Diagnosestellung und Verlaufsbeurteilung bei Patienten mit neuroendokrinen Tumoren eingesetzt [Defetos et al, 1991; O'Connor et al, 1989; Cryper et al, 1991; Nobels et al, 1993; Sobol et al, 1986;

O'Connor et al, 1984]. Bei Patienten mit neuroendokrinen GEP-Tumoren, die mit Somatostatin therapiert werden, kann der CgA-Spiegel als Verlaufparameter zur Beurteilung des Therapieerfolges herangezogen werden [Moattari et al, 1989]. Hilfreich ist die Messung erhöhter CgA-Spiegel auch zur Diagnose eines nichtfunktionellen neuroendokrinen Tumors, da trotz fehlender Hormonsekretion unter Umständen erhöhte Spiegel von Chromogranin A nachweisbar sind [Deftos, 1991; Sobol et al, 1989; Nobels et al, 1993].

Die Beobachtung, dass CgA Homologe auch in Drosophila, Fischen und selbst einzelligen eukaryonten Organismen vorliegen, lassen auf eine wichtige zelluläre Funktion schließen [Peterson et al, 1987]. Es wird vermutet, dass Chromogranin A an der Speicherung und Freisetzung der mit ihm zusammen gespeicherten Hormone beteiligt ist [Deftos LJ, 1991]. Obwohl die spezifische intra- und extrazelluläre Funktion von CgA noch nicht vollständig geklärt ist, nimmt man an, dass CgA ein multivalentes Vorläufermolekül für verschiedene Polypeptide darstellt, die intrakrine, autokrine, parakrine und endokrine Funktionen ausüben [Winkler et al. 1992; Huttner et al, 1995; Hendy et al, 1995].

Das humane CgA Gen umfasst etwa 15 kb und liegt auf Chromosom 14q32 in der Nähe des Locus der schweren Ketten der Immunglobuline. Das humane als auch das bovine und murine CgA Gen haben acht Exons mit bei allen Spezies gleichermaßen erhaltener Exon-Intron Aufteilung (Abbildung 1) [Mouland et al, 1994; Iacangelo et al, 1991; Wu et al, 1991]. Exon I besteht aus einem 5'-nichtkodierenden Bereich und der das Signalpeptid kodierenden Sequenz. Exons II bis V beinhalten eine hochkonservierte aminoterminal Domäne während Exons VI und VII variable Domänen enthalten. Exon VIII kodiert eine hochkonservierte carboxyterminale Domäne und die 3'-nichtkodierende Region [Helman et al, 1988; Mouland et al, 1994].

CgA hat ein Molekulargewicht von etwa 50 kDa und wird als Prohormon durch proteolytische Spaltung durch Prohormonkonvertasen in verschiedene biologisch aktive Peptide gespalten: (1) *Pankreastatin*, das die Glukose-induzierte Insulinfreisetzung inhibiert und die Sekretion der Nebenschilddrüse hemmt [Tatemoto et al, 1986; Fasciotto et al, 1989; Drees et al, 1992], (2) β -*Granin*, der Vasodilatator *Vasostatin 2*, dessen ersten 76 Aminosäuren homolog zu *Vasostatin 1* sind und das die Sekretion der Nebenschilddrüse hemmt [Hutton et al, 1987; Aardal et al, 1992; Aardal et al, 1993; Russell et al, 1994; Drees et al, 1991], (3) *Chromostatin* mit inhibitorischer Wirkung

auf die Sekretion chromaffiner Zellen der Nebenniere [Simon et al, 1988], (4) *Parastatin*, das die bei niedrigem Calciumspiegel stimulierte Nebenschilddrüsensekretion inhibiert [Fascioto et al, 1993] und (5) das kürzlich identifizierte *Catestatin* (Aa 340-372), das die Katecholaminfreisetzung in chromaffinen Zellen inhibiert [Jiang et al, 2001] (Abbildung 2). Darüber hinaus ist über weitere durch posttranslationales Processing entstandene kurze Peptide (WE-14, GR-44, ER-37) in neuroendokrinen Tumoren berichtet worden [Orr et al, 2002; Curry et al, 2002].

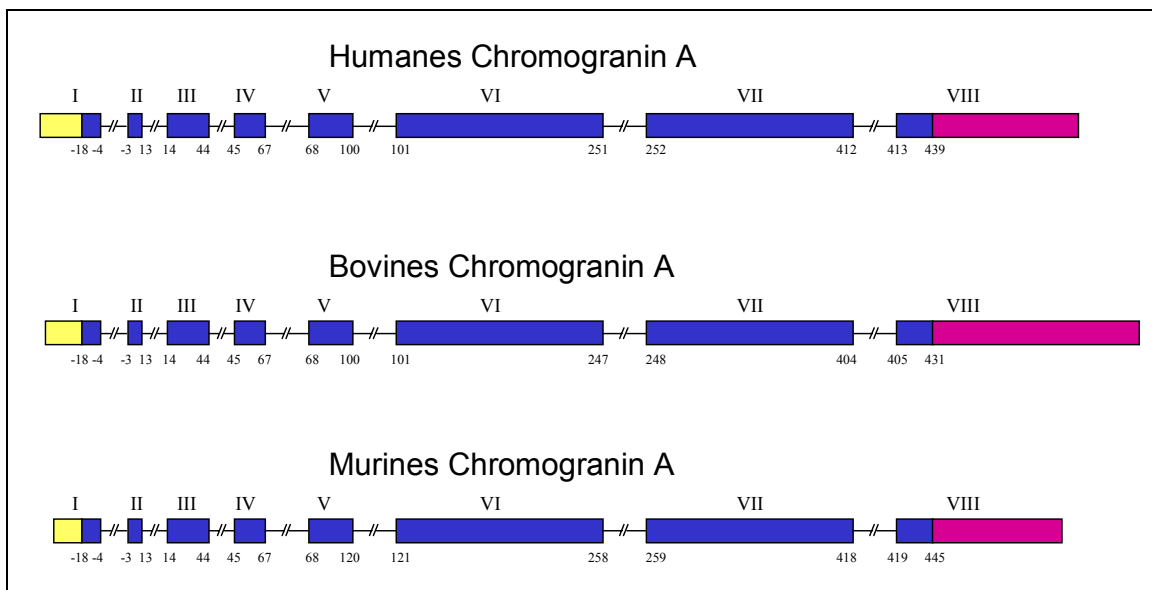


Abbildung 1: Schematische Darstellung der Exon-Intron Organisation des Chromogranin A (CgA) Gens beim Menschen, Rind und der Maus, modifiziert nach Moulard et al. 1994. Die Exone sind als Kästen dargestellt (nichttranslatierte Region Exon I gelb, kodierende Sequenz blau, carboxyterminal nichttranslatierte Sequenz rot) und anhand römischer Zahlen (I bis VIII) gekennzeichnet. Dazwischenliegend sind die Intronsequenzen dargestellt, die hinsichtlich der Sequenzlänge unterbrochen (//) aufgezeichnet sind. Die unterhalb der Kästen an den Exon-Intron Grenzen angegebenen Zahlen verweisen auf die korrespondierende Aminosäuresequenz des PräCgA Proteins, wobei die erste kodierende Aminosäure des CgA Proteins mit +1 bezeichnet ist. Exon V des murinen CgA-Gens ist aufgrund einer polymorphen (CAG)_n Polyglutaminsequenz in der Länge variabel.

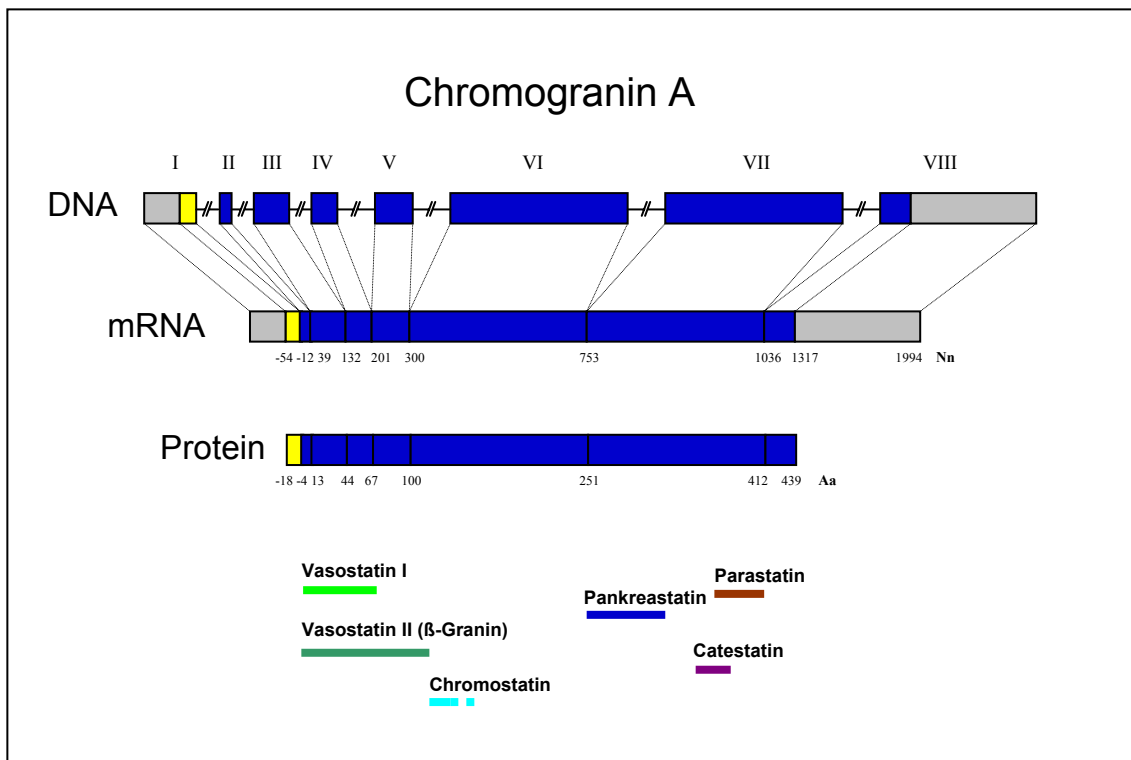


Abbildung 2: Schematische Darstellung der Struktur des CgA Gens, der mRNA und des Proteins. Chromogranin A gilt als Prohormon für verschiedene bioaktive Peptide in verschiedenen Spezies. Exon I kodiert das Signal-Peptid (gelb). Exons II bis V (blau) kodieren β-Granin (Vasostatin II) (Aa 1-131), dessen erste 76 Aminosäuren homolog zu Vasostatin I sind. Exon VI kodiert Chromostatin und innerhalb von Exon VII befindet sich die Sequenz für Parastatin und Pankreastatin und Catestatin. Die Exone sind als Kästen dargestellt (nichttranslatierte Sequenzen grau, Signalpeptid gelb, übrige kodierende Sequenz blau) und anhand römischer Zahlen (I bis VIII) gekennzeichnet. Dazwischenliegend sind die Intronsequenzen als Linien (-//-) verkürzt aufgezeichnet. Darunterliegende arabische Zahlen verweisen auf die korrespondierende Aminosäuresequenz.

1.2.2. Regulation der Biosynthese und Expression von Chromogranin A

Verschiedene intra- und extrazelluläre Faktoren sind an der Regulation der CgA Biosynthese und Sekretion beteiligt. Die extrazelluläre Regulation erfolgt über Signaltransduktionswege durch Proteinkinasen und Veränderungen intrazellulärer Ionenkonzentrationen. Daneben besteht die Möglichkeit der direkten Beeinflussung der transkriptionellen Regulation durch intrazellulär wirkende Hormone wie z.B.

Glukokortikoide [Rozansky et al, 1994]. Verschiedene Faktoren, wie Nikotin oder Carbamylcholin, Kalium und Histamin, die über einen membranständigen Calciumionenkanal wirken, können über eine Erhöhung der intrazellulären Calciumkonzentration eine Steigerung der CgA Sekretion bewirken [Galindo et al, 1991; Simon et al, 1989]. Andere Substanzen wie Bradykinin, Prostaglandin E₂ und Angiotensin II erhöhen die intrazelluläre Calciumionenkonzentration durch Freisetzung aus intrazellulären Speichern in chromaffinen Zellen mittels Proteinkinase C [Galindo et al, 1991; Simon et al 1989]. Durch Bindung an einen zytosolischen oder nukleären Rezeptor interagieren die lipophilen Steroidhormone direkt mit der DNA und können positive oder negative regulatorische Funktionen ausüben. In neuroendokrinen Zellen konnte durch Glukokortikoide eine Aktivierung des Ratten CgA Promotors nachgewiesen werden [Rozansky et al, 1994], während Estradiol die CgA-mRNA-Synthese in der Rattenhypophyse inhibierte [Anouar et al, 1991].

Die meisten molekularen Untersuchungen zur transkriptionellen Kontrolle der CgA Expression wurden unter Anwendung des murinen CgA Promotors durchgeführt. Wu konnte 1991 zeigen, dass der murine CgA Promotor (mCgA) zellspezifisch in korticotrophen Hypophysenzellen und chromaffinen Nebennierenzellen exprimiert wird. Innerhalb des mCgA Promotors charakterisierte er putative Transkriptionsfaktorbindungsstellen für Sp1 (-87 bis -77), CREB (-71 bis -64) und eine TATA-Box, wobei der Promotorbereich von -77 bis -61 bp für die zellspezifische Expression verantwortlich war [Wu et al, 1991; Wu et al, 1994; Wu et al, 1995]. Weitere Studien demonstrierten eine über Egr-1/Sp1 und CREB vermittelte Stimulierbarkeit des mCgA Promotors durch Gastrin [Höcker et al, 1998; Raychowdhury et al, 2002] und eine ebenfalls an CRE gebundene Aktivierung durch Nikotin [Tang et al, 1996]. In Phäochromozytomzellen (PC12) konnte eine IGF-1 induzierte Stimulation des mCgA Promotors nachgewiesen werden [Pugazhenti et al, 1999]. Eine hemmende Wirkung von α -Interferon auf den mCgA Promotor wurde in humanen neuroendokrinen Pankreastumorzellen beobachtet [Plath et al, 1999]. Auch *in vivo* konnte die endokrin-spezifische und gastrinabhängige Expression einer 4,8 kb umfassenden mCgA 5'-flankierenden Sequenz gekoppelt an Luciferase als Fusionsgen in transgenen Mäusen nachgewiesen werden [Höcker et al, 2001].

Untersuchungen zur transkriptionellen Expressionskontrolle humaner CgA Promotorsequenzen wurden bisher in Lungentumorzellen (BEN, NCI-H727),

Hypophysentumorzellen der Maus (AtT20) und der Ratte (GH4C1), sowie humanen medullären Schilddrüsentumorzellen (TT) und Phäochromozytomzellen der Ratte (PC12) durchgeführt. In Lungentumorzellen konnte gezeigt werden, dass die Promotorsequenz bis Nukleotid -55 bp (vom Transkriptionsstart beginnend) für zellspezifische Expression im Vergleich zu Mausfibroblasten ausreichte. Darüber hinaus konnte in diesen Zellen ein positiv regulatorisches Element „distal regulatory element“ (DRE) zwischen Nukleotiden -570 und -555 bp im Promotorbereich identifiziert werden, in dessen Sequenzbereich eine putative AP-1 Bindungsstelle liegt [Nolan et al, 1995], die in oben genannten neuroendokrinen Zellen im Gegensatz zu nichtneuroendokrinen Zellen die Transkription stimulierte. Elektrophoretische Mobilitätsshifts konnten deutliche Supershifts der an die AP-1 Seite bindenden Komplexe durch Antikörper gegen c-Jun und c-Fos in nichtneuroendokrinen COS Zellen, aber kaum in neuroendokrinen BEN Lungentumorzellen nachweisen. Dies gab einen Hinweis darauf, dass in neuroendokrinen BEN Zellen andere DNA-Bindungsfaktoren an der AP-1 Seite komplexieren [Nolan et al, 1995]. So konnte in BEN Zellen keine Stimulation durch Kotransfektion von c-fos und c-jun erreicht werden [Nolan et al, 1996]. Canaff und Mitarbeiter konnten in Analogie zum mCgA Promotor ein cAMP response Elementes (CRE) im proximalen Promotor des hCgA Promotors identifizieren, das zellspezifische Regulation und cAMP Stimulierbarkeit in Lungentumorzellen, murinen und Ratten-Hypophysentumorzellen, medullären Schilddrüsentumorzellen und humanen Phäochromozytomzellen vermittelte [Canaff et al, 1998] (Abbildung 3).

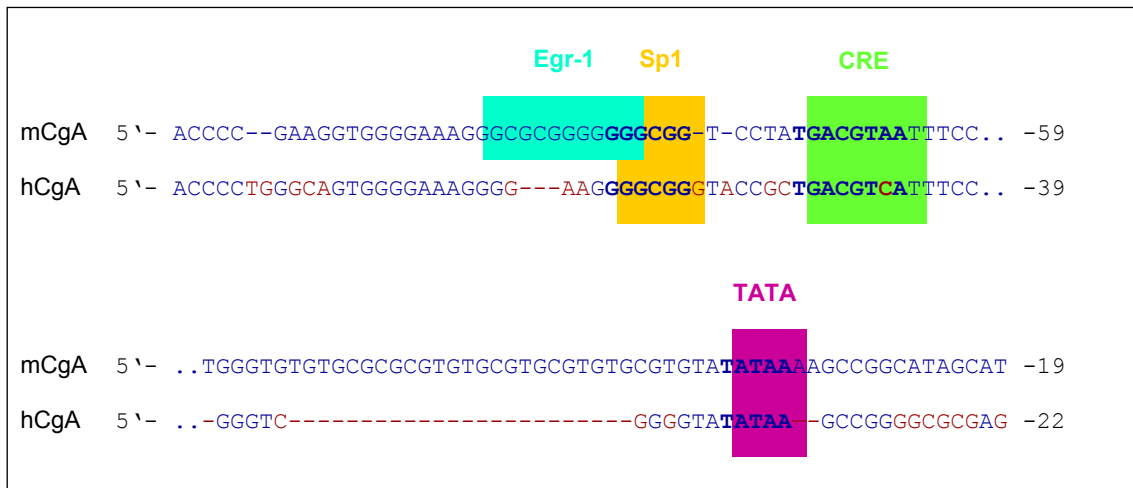


Abbildung 3: Schematische Darstellung der proximalen murinen und humanen CgA Promotorregionen. Die murine Sequenz umfasst den Bereich Nukleotid -112 bis -19, die humane Sequenz Nukleotid -91 bis -22. Farbiger unterlegt sind die Bindungsmotive CRE (cAMP Response Element), Sp1 und die in der Maus beschriebene überlappende Egr-1 Seite. Rot sind nicht homologe Basenpaare eingezeichnet. Modifiziert nach Wu et al, 1995.

1.3. Mechanismen der Expressionskontrolle

In den meisten Fällen, in denen ein Protein nur in einem bestimmten Gewebe oder nur auf ein bestimmtes Signal hin gebildet wird, geschieht dies dadurch, dass das kodierende Gen zellspezifisch oder auf einen Stimulus hin transkribiert wird [Darnell et al, 1982]. Die transkriptionelle Kontrolle hängt von der Interaktion spezifischer Proteine, den trans-aktivierenden Faktoren, mit bestimmten *cis*-regulatorischen Sequenzelementen ab, wobei man bei letzteren Promotor- und Enhancer-Sequenzen unterscheiden kann. Der Promotor ist dem Transkriptionsstart unmittelbar vorgeschaltet und enthält Sequenzen, die in sehr vielen Genen vorkommen und für die konstitutive, basale Transkription essentiell sind. Darüber hinaus enthält er Sequenzen, die nur der regulierten Transkription dienen. Enhancer-Sequenzen liegen dagegen meist in größerer Entfernung vom Transkriptionsstart und liegen per definitionem entweder stromauf- oder stromabwärts oder sogar innerhalb der Transkriptionseinheit und funktionieren unabhängig von ihrer Orientierung. Sie verstärken die Promotoraktivität und werden

deshalb „enhancer“ (Verstärker) genannt [Serfling et al, 1985]. Es gibt Enhancer, die in allen Geweben aktiv sind und solche, die gewebsspezifisch fungieren und einen Promotor nur in einem bestimmten Zelltyp aktivieren. Sequenzelemente für die basale Expression sind die TATA-, Sp1- und die CCAAT-Box. Die TATA-Box liegt meist etwa 30 bp vor einem Transkriptionsstart, findet sich in sehr vielen, aber nicht allen Genen, und spielt eine essentielle Rolle in der Positionierung der Transkriptionsstartstelle [Breathnach und Chambon, 1981]. Die TATA-Box und die Transkriptionsstartstelle, die Cap-site, machen den Grundpromotor aus [Goodwin et al, 1990] und binden mehrere für die Transkription essentielle Faktoren sowie die RNA-Polymerase II, die für die Transkription proteinkodierender Gene verantwortlich ist [Lewis und Burgess, 1982]. Die sehr geringe Aktivität dieses Grundpromotors kann durch weitere Sequenzelemente (z.B. die Sp1-Box) gesteigert werden, die weiter stromaufwärts vom Transkriptionsstart entfernt lokalisiert sind [Dyan und Tijan, 1985]. Für die regulierte Expression sind Sequenzelemente notwendig, die Faktoren binden können, welche durch spezifische Stimuli aktiviert werden und so zu einer Induktion der Genexpression führen wie z.B. das GRE („glucocorticoid responsive element“) oder das CRE („cAMP response element“).

1.4. Targeting therapeutischer Gene in Tumorzellen

1.4.1. Anwendung gewebespezifischer Promotoren zu gentherapeutischen Zwecken

Das ursprüngliche Ziel der Gentherapie war der Ersatz eines defekten Gens durch den Transfer eines gesunden Gens bei monogenetischen Erkrankungen. Dieses Konzept wurde zunehmend auch zur Behandlung von Tumorerkrankungen herangezogen. Nach initialen Studien zur Zellmarkierung und Machbarkeit konzentrieren sich die Strategien in den letzten Jahren auf das Design *therapeutischer Gene*, deren Funktionen in drei Kategorien zusammengefasst werden können: (1) Verstärkung der Tumorummunogenität durch Transfer von Zytokinen oder kostimulatorischen Molekülen, (2) direkte Zerstörung der Tumorzellen durch Transfer tumorizider Gene, Tumorsuppressorgene, Prodrug aktivierender Gene (sogenannte Suizidgene) oder Antisensetechnologie (Antisense Oligonukleotide, Antigene, Ribozyme) [Deonarain et

al, 1995; Harris et al, 1994; Dachs et al, 1997]. Die Herausforderung in der Gentherapie liegt aber in der Selektivität und Spezifität. Um nur Tumorzellen *in vivo* abzutöten ist eine selektive Strategie notwendig, nämlich die Kombination **hochspezifischen Gentransfers** mit gezielter Genexpression, spezifische Genproduktaktivität und, wenn möglich, spezifische Medikamentenaktivierung. In den letzten Jahren wurden zunehmend Fortschritte in der Entwicklung viraler (z.B. Retroviren, Adenoviren, Adeno-assoziierte Viren) als auch nichtviraler (z.B. Liposomen, Gene Gun, Injektion) Methoden zum gezielten Gentransfer („targeted delivery“) erzielt. Um die Spezifität weiter zu erhöhen, muss die Aktivität therapeutischer Gene im Zielgewebe eng kontrolliert werden. Zur Regulation der **gewebespezifischen Genexpression** („targeted expression“) bietet sich die Möglichkeit, gewebespezifische Promotoren (z.B. Mammakarzinom, Prostatakarzinom, Melanom), krankheitsspezifische Promotoren (z.B. CEA, HER-2/neu, Myc-Max response Element, DF3/MUC) oder tumorstimulierte Promotoren (z.B. glukose-reguliertes Protein GRP78/BiP oder hypoxie-induzierte Gene) einzusetzen. Die regulatorischen Sequenzen, die zur selektiven Expression erforderlich sind, liegen innerhalb der basalen Promotorsequenz oder in Enhancersequenzen. Weitere Möglichkeiten bieten durch Bestrahlung aktivierte Promotoren (z.B. Plasminogenaktivator, Early growth response gene Egr-1) oder Tetrazyklin-induzierte Elemente. Durch Kombination selektiven Gentransfers und spezifischer Genexpression mit therapeutischen Genen wird eine tumorspezifische Gentherapie möglich [Schmidt-Wolf, 1996], die auch selektiv Mikrometastasen erfassen könnte. So konnte beispielsweise die Effektivität eines Hybridkonstruktes bestehend aus dem Tyrosinasepromotor und dem Suizidgen Herpes Simplex Virus Thymidinkinase (HSVtk) beim Melanom *in vivo* und *in vitro* gezeigt werden [Siders et al 1998; Vile et al 1993]. Auch erwies sich ein System aus CEA-Promotor und Suizidgen Cytosindeaminase in Kolonkarzinom-Xenograftmodellen als wirksamer Therapieansatz [Nyati et al, 2002].

1.4.2. Der Natriumjodidsymporter (NIS) als therapeutisches Gen

Im Gegensatz zur anderen Tumoren können Schilddrüsenkarzinome durch eine Radiojodtherapie effektiv behandelt werden [Mazzaferrri, 1996]. Durch den durch den Natriumjodidsymporter (NIS) vermittelten passiven Na⁺- und I⁻-Kotransport entlang des

Natriumgradienten an der basolateralen Membran der Schilddrüse kann Jodid auf das 20-40-fache in Relation zum Serumspiegel konzentriert werden (Abbildung 4) [Spitzweg et al, 2000; Filetti et al, 1999]. Neben der Schilddrüse können auch einige andere Gewebe Jodid aufnehmen (z.B. Speicheldrüse, Brustdrüse, Kolon, Ovar), allerdings nicht effizient und ohne Organifizierung. Die Klonierung des *NIS* Gens erlaubte die Charakterisierung der molekularen Mechanismen des Iodidtransports und hat somit zu einem erweiterten Verständnis der Rolle von NIS geführt [Dai et al, 1996; Smanik et al, 1996]. Das *NIS* Gen (>20 kb) ist auf Chromosom 19p13.2-p12 lokalisiert und umfasst 15 Exons, die für die 3.9 kb *NIS* mRNA kodieren. Das NIS Protein mit einem kalkulatorischen Molekulargewicht von 70-80 kDa ist ein intrinsisches Membranglykoprotein mit 13 Transmembrandomänen. Die genauere Kenntnis des NIS Gens hat die Entwicklung von neuen Gentherapieansätzen für verschiedene Anwendungsperspektiven ermöglicht. Eine effiziente Expression von funktionellen NIS Molekülen in Schilddrüsenkarzinomen, in denen das NIS Gen durch DNA Hypermethylierung herunterreguliert ist, bietet der NIS Gentransfer eine neue Möglichkeit der Radiojodtherapie des Primärtumors und seiner Metastasen. Da die NIS Aktivität die molekulare Basis der Radiojodtherapie darstellt, besteht großes Interesse am NIS Gentransfer um die Radiojodtherapie für nicht-thyreoidale Gewebe zu ermöglichen [Chung, 2002]. So wurden bisher *in vitro* Gentransferuntersuchungen in Hepatoma-, Melanoma-, Kolonkarzinom- und Zervixkarzinomzellen durchgeführt, die im Vergleich zu den Kontrollzellen zu erhöhter Radiojodaufnahme führten. Spitzweg et al berichtete darüber hinaus auch die erhöhte ^{123}I Aufnahme in Prostatakarzinomzellen *in vivo* im Nacktmausmodell [Spitzweg et al, 2000]. Es konnte damit gezeigt werden, dass durch zellspezifische Transfektion des NIS, die Fähigkeit zur Jodaufnahme auch in anderen Geweben erworben werden kann. Neben den bisher in klinischen Studien eingesetzten sogenannten „Selbstmordgenen“ könnte somit auch der Natriumjodidsymporter (NIS) durch Gentransfer in nichtthyreoidale Tumorgewebe als Effektor zukünftig zum Einsatz kommen.

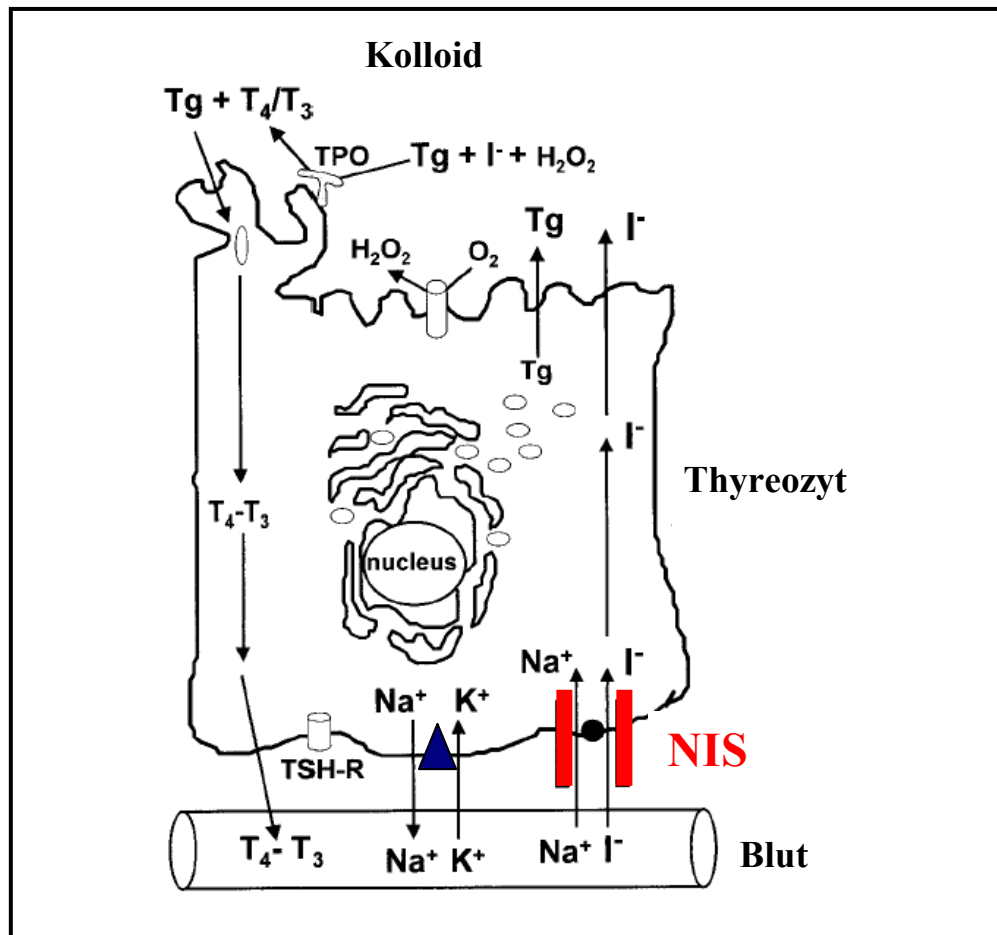


Abbildung 4. Schematische Darstellung der Jodidaufnahme an der basolateralen Membran und Biosynthese von Schilddrüsenhormonen an der apikalen Zellmembran des Thyreozyten. NIS (Natriumjodidsympporter) ist ein zentrales Molekül für die Jodidaufnahme in die Schilddrüse (II) und konzentriert Jodid aktiv 20-40fach im Thyreozyten. NIS kotransportiert zwei Natriumionen und ein Jodidion. Die hierfür notwendige Energie wird von dem Natriumgradienten geliefert, den die Na⁺-K⁺ ATPase (▲) durch einen einwärts gerichteten Na⁺-Gradienten aufbaut. (TSH-R: TSH-Rezeptor; TPO: Thyroperoxidase; Tg: Thyroglobulin).

1.5. Fragestellung

Ziel der Arbeit war die strukturelle und funktionelle Untersuchung der 5'-flankierenden DNA des Chromogranin A Gens des Menschen im Hinblick auf die Anwendung zur gewebespezifischen Expression von therapeutischen Genen in neuroendokrinen gastrointestinalen Tumoren.

Folgende Fragen sollten beantwortet werden:

1. Strukturelle Charakterisierung der 5'-flankierenden DNA des humanen Chromogranin A Promotors und Homologievergleich mit anderen Spezies zur Frage der Konservierung.
2. Wird der humane Chromogranin A Promotor in den neuroendokrinen Pankreastumorzellen BON-1 als *in vitro* Modell für neuroendokrine GEP-Tumore exprimiert und kann er zellspezifische Expression vermitteln?
3. Welche minimale Promotorsequenz des humanen Chromogranin A Gens kontrolliert die zellspezifische Expression in neuroendokrinen Pankreastumorzellen und durch welche Substanzen kann die Expression beeinflusst werden?
4. Kann der humane Chromogranin A Promotor als gewebespezifischer Promotor zur Expression therapeutischer Gene wie beispielsweise dem Natriumjodidsympporter in neuroendokrinen Pankreastumorzellen eingesetzt werden?

2. Material und Methoden

2.1. Geräte

2.1.1 Laborgeräte

Analysenwaage: AE 163	Mettler, Gießen
Autoklav: Laborautoklav Typ GLA 40	Fritz Gössner, Hamburg
Bakterien-Brutschrank: BE 400	Memmert, Schwabach
Bakterien-Inkubator:	
Inkubationshaube CERTOMAT H/HK	Braun, Melsungen
Tisch-Rundschüttler CERTOMAT R	Braun, Melsungen
Bunsenbrenner	Roth, Karlsruhe
Filmentwickler: Curix 60	AGFA, Leverkusen
Geigerzähler: Series 900 Mini Monitor	Wellhöfer Dosimetrie, Essex, GB
Geltrockner: Unigeldryer	UniEquip, Martinsried
Heizblock:	
DRI-Block DB1 und DB2A	Techne, Princeton, N.J.
Thermomixer 5436	Eppendorf, Hamburg
Kühlfalle: Uni Cryo MC 2L-60.0 C	UniEquip, Martinsried
Magnetrührer: MR3001	Heidolph, Gießen
PCR-Cycler:	
Thermo-Dux PHC-3	Techne, Princeton, N.J.
Robocycler Gradient 40	Stratagene, Heidelberg
Pipetten: 10, 20, 100, 200, 1000	Eppendorf, Hamburg
Pipettierhilfe: Pipetus-Akku	Hirschmann Laborgeräte, Eberstadt
Radioaktiv-Abfallcontainer	Roth, Karlsruhe
Radioaktiv-Schutzschild	Roth, Karlsruhe
Rotoren:	
JA-14, JA-20	Beckman, München
SW 27	Beckman, München
Tischzentrifugen:	
Biofuge 13, Sepatech	Heraeus, Hanau

Biofuge 15R, Sepatech	Heraeus, Hanau
MicroCen 13	Herolab, Wiesloch
Ultrazentrifuge: L8-70M	Beckman, München
Vakuumentrifuge: Uni Vapo 100 H	UniEquip, Martinsried
Vortex: REAX 2000	Heidolph, Kelheim
Waage: 572-33	Kern, Albstadt
Wasserbad	Köttermann, Hänigsen
Zentrifuge: J2-21	Beckman, München

2.1.2 Elektrophorese-Geräte und Zubehör

Agarosegelapparaturen: HE 99, HE 33 Minigel	Hofer, Heidelberg
Netzgeräte:	
PS 500 XT	Hofer, Heidelberg
3000 Xi	Bio-Rad, München
Röntgenkassetten	DuPont, Bad Nauheim
Sequenzierapparatur: Sequi-Gen GT	Bio-Rad, München
Transilluminator: TFX-20M	MWG-Biotech, München
Video-Dokumentationssystem:	
DocuGel V Scanalytics	MWG-Biotech, München
Verstärkerschirme	DuPont, Bad Nauheim

2.1.3 Zellkultur

Inkubator: Cytoperm 8080	Heraeus, Karlsruhe
Mikroskop: Olympus IX 50	Olympus, Hamburg
Neubauer-Kammer	Schreck, Hofheim
Sterile Werkbank: Lamin Air HLB 2448	Heraeus, Karlsruhe
Stickstoff-Tank: 35 VHC	tec-Lab, Königstein
Zentrifuge: Labofuge GL	Heraeus, Karlsruhe

2.1.4 Analytische Geräte

Luminometer: Lumat LB9501	Berthold, Wildbach
Spektralphotometer: Uvikon 860	Kontron, Eching

2.1.5 Kühlgeräte

-80°C: UF 75-45 DS, E80	Colora Messtechnik GmbH, Lorch
-20°C	Liebherr, Ochsenhausen
+4°C	Liebherr, Ochsenhausen
Eismaschine: 50-35	Ziegra, Isernhagen

2.2. Chemikalien, Enzyme und Verbrauchsmaterialien

Für molekularbiologische Routinearbeiten wurden die gängigen Stammlösungen nach Maniatis et al [Maniatis et al, 1982] aus bidestilliertem Wasser sowie den üblichen Chemikalien in p.A. Qualität hergestellt.

2.2.1. Bakterienkultur

Agar	Gibco, Eggenstein
Ampicillin	Sigma, München
Glycerol	Sigma, München
Hefeextrakt	Difco, Detroit, USA
Natriumchlorid	Roth, Karlsruhe
Trypton	Difco, Detroit, USA

2.2.2. Enzyme

AmpliTaqGold	Perkin Elmer, Langen
Restriktionsendonukleasen:	
Bgl I	New England Biolabs
EcoR V	New England Biolabs
Sal I	New England Biolabs
Sma I	Böhringer, Mannheim
Xho I	New England Biolabs
Sequenase Version 2.0	USB, Bad Homburg
T4 DNA Ligase	Promega, Madison, WI, USA

2.2.3. Sequenzierung und Polymerase-Kettenreaktion

dNTPs	Pharmacia, Freiburg
ddNTPs	USB, Cleveland
Sequense Version 2.0 DNA Sequencing Kit	USB, Cleveland

2.2.4. Elektrophorese

Agarose	Sigma, München
Ammoniumpersulfat	BioRad, München
Bromphenolblau/Xylencyanol-Lösung	Sigma, München
Ethidiumbromid	Sigma, München
Gel-Blotting-Paper 460x570 mm	Schleicher & Schüll, Dassel
Harnstoff	Merck, Darmstadt
Marker III	Böhringer, Mannheim
Marker VIII	Böhringer, Mannheim
Rotiphorese Gel 30	Roth, Karlsruhe
Sigmacote	Sigma, München
TEMED	Sigma, München

2.2.5. Chemikalien und Puffer

Borsäure	Merck, Darmstadt
BSA	Sigma, München
DTT	Sigma, München
EDTA	Roth, Karlsruhe
Ethanol	Riedel de Han AG, Seelze
Glykogen	Sigma, München
HBSS (Hank's balanced salt solution)	PAA, Linz
Hepes	Sigma, München
Isopropanol	Sigma, München
Kaliumhydroxid	Sigma, München
Natriumacetat	Merck, Darmstadt
Natriumhydroxid	Merck, Darmstadt
Natriumjodid	Sigma, München
Natriumperchlorat	Sigma, München

Phenol/Chloroform/Isoamylalkohol 25:24:1
Tris-Base

Biomol, Hamburg
USB, Cleveland

2.2.6. Radioaktive Substanzen

α [³³P]dATP (5000 Ci/mol, 10 mCi/ml)
¹²⁵J (1 Ci/ml)

Amersham, Braunschweig
Amersham, Braunschweig

2.2.7. Zellkultur

db-cAMP
DMSO
Fötales Kälberserum
GalaktoLightPlus
Gewebekulturflaschen und -schalen
Gastrin I
IGF-1
Lipofectamin-Reagent
Luciferase Assay System
Medium (RPMI, DMEM, DMEM/HAM F12)
Reporter Lysis Buffer 5x
Penicillin-Streptomycin
Protein Assay DC
Trypsin

Sigma, München
Sigma, München
PAA GmbH, Linz, Österreich
Tropix, Bedford, MA, USA
Greiner, Frickenhausen
Sigma, München
Sigma, München
Life Technologies, Karlsruhe
Promega, Madison, WI, USA
Gibco, Eggenstein
Promega, Madison, WI, USA
Gibco, Eggenstein
Biorad, München
Gibco, Eggenstein

2.2.8. Verbrauchsmaterialien

DEAE-Membran NA 45 0,45 μ m
Nuleobond Kit PC 500
Pipettenspitzen
Polypropylenröhrchen (15, 50 ml)
QIAprep Spin Miniprep Kit
Quarzküvetten
Reaktionsgefäße (0,5, 1,5, 2,0 ml)
Röntgenfilme
Zentrifugengefäße: UltraClear 25x89 mm

Schleicher & Schüll, Dassel
Machery-Nagel, Düren
Eppendorf, Hamburg
Greiner, Frickenhausen
Qiagen, Hilden
Hellma, Mühlheim/Baden
Eppendorf, Hamburg
Kodak, Rochester, USA
Beckman, München

2.3. Oligonukleotide

hCgA -2203	5'-GAT CGA TAT CGG ATC CCA GTA GAC CAA GCC CGG GCA-3'
hCgA -722	5'-GAT CGA TAT CAA GCT TCC TGG TGA AAG TGA-3'
hCgA -572	5'-GAT CGA TAT CTG AAA GTA ATG ATG ACT AAA CAT TAT T-3'
hCgA -572mut	5'-GAT CGA TAT CTG AAA GTA ATG AAC TGG AAA CAT TAT T-3'
hCgA -545	5'-GAT CGA TAT CCA AAT AAA TAC ACA TTC A-3'
hCgA -454	5'-GAT CGA TAT CCC CTC TAG AGC CTC CTA GAT ATT G-3'
hCgA -262	5'-GAT CGA TAT CAA GGC AAA TCG GTG GAA TCG-3'
hCgA -56	5'-GAT CGA TAT CCA CCG CTG ACG TCA TTT CCG-3'
hCgA -53	5'-GAT CGA TAT CGC TGA CGT CAT TTC-3'
hCgA -45	5'-GAT CGA TAT CCA TTT CCG GGG TCG GGG TA-3'
hCgA +32 <i>XhoI</i>	5'-CAC GGG GCT CGA GCA C-3'
hCgA +198 <i>Sall</i>	5'-GAT CGT CGA CGG CGG ACC CGG GCG CCG AGC AGC T-3'
hCgA -1984 Seq	5'-ATT GTG ATA AAA TAT CCC-3'
hCgA -1731 Seq	5'-AGA GTT TCA CTC TTG TTG CCC A-3'
hCgA -1482 Seq	5'-GAT TAC AGG TGT AAA CCA CTG CG-3'
hCgA -1219 Seq	5'-CAG TCT CCT TTG AGC TCC CAC CA-3'
hCgA -959 Seq	5'-AGG GAA GCC AAC CAG GAA ACT G-3'

2.4. Konstrukte und Vektoren

2.4.1. Konstrukte

hCgA-Klon 12	[Mouland et al, 1994]
pGL2 Basic	Promega, Madison, WI, USA
pGL2 Control	Promega, Madison, WI, USA
pSV- β -Galaktosidase-Vektor	Promega, Madison, WI, USA
mCgA4.8kb-Luc	[Höcker et al, 1998]
mCgA-92/-62 (pT81)	[Höcker et al, 1998]
mCgA-258/+42 (pXP1)	[Höcker et al, 1998]

2.4.2. Herstellung von Chromogranin A Reportergenkonstrukten

Die 5'-flankierende DNA des humanen Chromogranin A Gens [Mouland et al, 1994] wurde mittels PCR (10 pmol, Sense und Antisenseprimer siehe 2.3 und Abbildung 5) unter den in Tabelle 1 angegebenen Bedingungen amplifiziert. Die Amplifikationen erfolgten mittels Ampli-Taq-Gold-Polymerase (Perkin Elmer) in einem Volumen von 50 μ l bei einer MgCl₂-Konzentration von 1.5 mM. Die optimalen Bedingungen können aus Tabelle 1 entnommen werden.

Die Amplifikate wurden in den *XhoI/SmaI* geschnittenen Reportervektor pGL2 Basic (Promega) kloniert. Die Ligation der PCR-Fragmente und des pGL2 Basic-Vektors erfolgte auf der einen Seite an den glatten Enden nach *SmaI*- und *EcoRV*-Verdau, auf der anderen Seite an den überhängenden Enden nach *XhoI*- und *SalI*-Verdau. Auf diese Weise wurde der korrekte Einbau in 5'-3'-Richtung der hCgA-PCR-Fragmente in pGL2 Basic gewährleistet. Die Ligation wurde über Nacht bei 16°C mit einem Vektor-Insertverhältnis von 1:4 durchgeführt. Danach erfolgte die Transformation und Plasmidpräparation. Zur Kontrolle wurden bei allen Konstrukten nach der Klonierung das Insert und der Vektor/Insert-Übergang vollständig sequenziert. Die resultierenden Plasmide enthielten

verschiedene 5'-hCgA Promotordeletionsfragmente und mutierte Fragmente von -2203 bp bis -45 bp und 3'-Deletionsfragmente von +32 und +198 bp von der Transkriptionsstartseite entfernt. Die +198-PCR-Fragmente ließen sich nur unter Zugabe von 10% DMSO amplifizieren.

Tabelle 1: Optimierte der Amplifikationsbedingungen der hCgA-Fragmente

Fragment	Denature	Annealing	Extension	Template	Zyklen	Sonstiges
-2203/32	95°C 1'15	63°C 1'	72°C 3'	CgA 12	35	-
-722/32	95°C 1'15	61°C 1'	72°C 3'	CgA 12	35	-
-572/32	95°C 1'15	57°C 1'	72°C 3'	CgA 12	35	-
-572mut/32	95°C 1'15	51°C 1'	72°C 3'	572/198	35	-
-545/32	95°C 1'15	55°C 1'	72°C 3'	CgA 12	35	-
-454/32	95°C 1'15	61°C 1'	72°C 3'	CgA 12	35	-
-262/32	95°C 1'15	57°C 1'	72°C 3'	CgA 12	35	-
-56/32	95°C 1'15	56°C 1'	72°C 1'	CgA 12	50/45	Reamp.
-53/32	95°C 1'15	56°C 1'	72°C 1'	CgA 12	50/45	Reamp.
-45/32	95°C 1'15	56°C 1'	72°C 1'	CgA 12	50/45	Reamp.
-2203/198	95°C 1'15	55°C 1'	72°C 3'	CgA 12	40	10% DMSO
-722/198	95°C 1'15	55°C 1'	72°C 3'	CgA 12	40	10% DMSO
-572/198	95°C 1'15	57°C 1'	72°C 3'	CgA 12	40	10% DMSO
-545/198	95°C 1'15	45°C 1'	72°C 3'	CgA 12	40	10% DMSO
-454/198	95°C 1'15	57°C 1'	72°C 3'	CgA 12	40	10% DMSO
-262/198	95°C 1'15	55°C 1'	72°C 3'	CgA 12	40	10% DMSO
-56/198	95°C 1'15	55°C 1'	72°C 3'	CgA 12	40	10% DMSO
-53/198	95°C 1'15	55°C 1'	72°C 3'	CgA 12	40	10% DMSO
-45/198	95°C 1'15	55°C 1'	72°C 3'	CgA 12	40	10% DMSO

DMSO: Dimethylsulfoxid, Reamp.: Reamplifikation, CgA: Chromogranin A

2.4.3. Herstellung des Chromogranin A NIS Expressionskonstruktes

Zur Herstellung des CgA-NIS Expressionskonstruktes wurden 754 bp der 5'-flankierenden DNA des humanen Chromogranin Gens [Mouland et al, 1994] mittels PCR (Primerpaar: hCgA -722 und hCgA +32, je 10 pmol), wie in 2.4.2 beschrieben, amplifiziert. Die NIS-Konstrukte wurden in Analogie zu Schipper et al erstellt [Schipper et al, 2003].

2.5. Sicherheitsvorkehrungen und Abfallbeseitigung

Gentechnische Arbeiten wurden gemäß den Richtlinien des Gentechnikgesetzes und der Gentechniksicherheitsverordnung nur in zugelassenen Räumen der Sicherheitsstufe S1 durchgeführt.

Der Umgang mit radioaktiven Substanzen erfolgte entsprechend den gesetzlichen Bestimmungen. Mit stärkeren β -Strahlen wurde nur hinter einer Plexiglasabschirmung gearbeitet. Zum Schutz gegen Kontamination von Haut und Kleidung wurden Einweghandschuhe und Laborkittel getragen. Die individuelle Strahlenbelastung wurde mit einer Dosimeterplakette gemessen.

Infektiöses Material wurde nach Autoklavieren oder Desinfektion entsorgt. Radioaktiver Abfall sowie Lösungsmittelreste und giftige Feststoffe wurden getrennt in entsprechenden Behältern gesammelt und der vorgeschriebenen Beseitigung zugeführt.

2.6. Standardmethoden

2.6.1. Präzipitieren und Waschen von DNA

DNA wurde gewaschen und präzipitiert zum Entfernen von Salzen, Lösungsmitteln, oder um eine DNA-Lösung höherer Konzentration herzustellen.

Beim Präzipitieren wurde die DNA mit 1/10 Volumen 3 M Natriumacetat und dem 2,5-fachen Volumen 100% Ethanol versetzt. Anschließend wurde die Probe über Nacht bei -20°C oder 30 min bei -80°C inkubiert und dann 15 min bei 13000 rpm zentrifugiert. Der Überstand wurde abgossen, die verbliebene DNA mit 70% Ethanol gewaschen und erneut 5 min zentrifugiert. Nach dem Entfernen des Überstandes wurde die Probe einige Minuten im Heizblock bei 37°C getrocknet. Am Boden des Probengefäßes konnte man je nach präzipitierter DNA-Menge ein weißliches Pellet sehen, das man für weitere Versuche in einen geeigneten Puffer aufnehmen konnte.

2.6.2. Phenol-Chloroform-Isoamylalkohol-Extraktion

Um Proteine nach enzymatischen Reaktionen aus der Probe zu entfernen, wurde eine Phenol-Chloroform-Isoamylalkohol-Extraktion (PCI-Extraktion) vorgenommen. Die Probe wurde mit dem gleichen Volumen PCI (25:24:1) versetzt, geschüttelt und 5 min bei

13000 rpm zur schnelleren Phasentrennung zentrifugiert. Die obere wässrige Phase wurde abpipettiert und in ein zweites Gefäß überführt. Die gleiche Menge Wasser wurde erneut auf die Probe gegeben und reextrahiert. Der Überstand wurde in das zweite Gefäß pipettiert. Danach erfolgte eine Ethanol-fällung.

2.6.3. Bestimmung der DNA-Menge

Die Konzentration einer DNA-Lösung konnte photometrisch bei 260 nm bestimmt werden. Die Ausgangslösung wurde abhängig von der vermuteten Konzentration 1:100 auf ein Volumen von 500 µl verdünnt und in eine Quarzküvette gegeben. Die gemessene optische Dichte sollte im Bereich von 0,1 bis 1,0 liegen. Der DNA-Gehalt konnte so annähernd errechnet werden:

doppelsträngige DNA:	1 OD ₂₆₀ = 50 µg/ml
einzelsträngige DNA bzw. RNA:	1 OD ₂₆₀ = 40 µg/ml
Oligonukleotide:	1 OD ₂₆₀ = 33 µg/ml

Die Bestimmung der Reinheit errechnet sich aus dem Quotienten OD₂₆₀/OD₂₈₀. Er sollte im Bereich von 1,8 bis 2,0 liegen.

2.6.4. Spaltung von DNA mit Restriktionsendonukleasen

Restriktionsendonukleasen sind natürlich vorkommende Enzyme, die DNA an bestimmten Erkennungssequenzen spalten.

Enzymatische Spaltungen wurden mit den von den Herstellern empfohlenen Puffern durchgeführt. Der Reaktionsansatz hatte zumeist ein Volumen von 25 µl, enthielt 0,5-2 µg DNA und 1-5 U Enzym pro µg DNA. Je nach Enzym und DNA-Menge wurde die Probe 1-24 Stunden bei 25-37°C inkubiert. Anschließend wurde die Vollständigkeit der Spaltung mittels Agarosegelelektrophorese überprüft. Zur weiteren Verarbeitung der DNA wurde bei Bedarf eine PCI-Extraktion mit Ethanol-fällung durchgeführt.

2.7. Elektrophoretische Trennung von DNA-Fragmenten

2.7.1. Agarosegelelektrophorese

Gelelektrophoretische Auftrennung von DNA-Fragmenten wurde zum einen für analytische zum anderen für präparative Zwecke durchgeführt.

Agarosegele wurden in einer Konzentration von 0,7% bis 3% hergestellt, indem man die entsprechende Menge Agarose in 0,5% TBE-Puffer aufkochte und mit 0,5 µg/ml Ethidiumbromid versetzte. Nach dem Abkühlen auf 50°C wurde die noch flüssige Agarose in eine Horizontalkammer mit eingesetztem Kamm gegossen. Die mit Loading-Dye versetzten Proben pipettierte man nach dem Aushärten in die Geltaschen und schloss die Kammer an ein Netzgerät an. Die DNA-Fragmente trennten sich innerhalb von ein bis vier Stunden abhängig von der Fragment- und Kammergröße und der Gelkonzentration in Richtung Kathode auf. Unter UV-Licht-Bestrahlung konnte man die durch Ethidiumbromid gefärbten DNA-Fragmente betrachten.

TBE (1X): 90 nM Tris/Cl pH 8,3
90 nM Borsäure
2,5 mM EDTA

2.7.2. Acrylamidgelelektrophorese

Denaturierende Acrylamidgele wurden zur Auftrennung kleiner DNA-Fragmente bei Sequenzierungen verwendet. Zur Herstellung wurden fertige Vorratslösungen verwendet:

Rotiphorese Gel 30: 28,2 % Acrylamid, 0,8% Bisacrylamid

Sequenzgele wurden in einer Konzentration von 6.5 % mit 1x TBE hergestellt und mit 7 M Harnstoff versetzt. Zur Polymerisation wurde APS und TEMED hinzugegeben und das noch flüssige Gel in eine Vertikalkammer gegossen. Nach der elektrophoretischen Auftrennung der Fragmente wurde das Gel auf Blotting-Paper übertragen und im Gel Trockner 1,5 Stunden getrocknet.

2.7.3. Elution von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen

Die Isolierung von DNA-Fragmenten erfolgte nach elektrophoretischer Auftrennung von PCR-Produkten oder enzymatischen Spaltungen zur weiteren Verarbeitung.

Folgende Puffer und Materialien wurden verwendet:

DEAE-low-Puffer: 0,1 M NaCl
10 mM Tris-Cl pH 8,0
1 mM EDTA pH 8,0

DEAE-high-Puffer: 1 M NaCl
10 mM Tris-Cl pH 8,0
1 mM EDTA pH 8,0

DEAE-Membran NA 45 0,45 μ M Schleicher & Schüll

Die Membranen wurden in dünne Streifen geschnitten, 5 min in 10 mM EDTA pH 8,0 gelagert, danach 5 min mit 0,5 M NaCl behandelt und sechsmal in sterilem Wasser gewaschen. Sie konnten danach mehrere Wochen bei 4°C in sterilem Wasser aufbewahrt werden.

Zur Elution wurde das Agarosegel oberhalb und unterhalb der gesuchten DNA-Fragmente mit dem Skalpell eingeschnitten und die Membranen in die Schlitze eingesetzt. Daraufhin wurden bei 120-130 Volt die Fragmente weiter aufgetrennt, bis die zu isolierenden Fragmente in der unteren Membran hängen blieben. Die obere Membran diente als Barriere für weiter oben liegende DNA, die nicht eluiert werden sollte. Nach Entfernung der unteren Membran aus dem Gel erfolgte ein einmaliger Waschvorgang mit DEAE-low-Puffer. Zur weiteren Verarbeitung wurde die Membran in ein Reaktionsgefäß mit 300 μ l DEAE-high-Puffer überführt. Die Probe wurde bei 65°C 10 min inkubiert, dann gevortext und zentrifugiert. Eine weitere Inkubation bei 65°C für 5 min folgte. Nach Überführung des Puffers in ein zweites Gefäß, das 400 μ l H₂O gesättigtes Butanol enthielt, wurde die DNA aus der Membran erneut mit 200 μ l DEAE-high-Puffer reextrahiert und dem zweiten Gefäß hinzugefügt. Die Probe wurde gevortext und bei 13000 rpm 5 min zentrifugiert. Die obere Butanolphase wurde verworfen, der verbliebene Puffer mit 0,7 Volumen Isopropanol versetzt und 20 min bei Raumtemperatur zur Fällung inkubiert. Nach 15-minütiger Zentrifugation bei 13000 rpm folgte ein Waschvorgang mit 70%

Ethanol. Das verbliebene Pellet wurde im Vakuumtrockner getrocknet und in Wasser aufgenommen.

2.8. Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR)

Die PCR basiert auf den Mechanismen der DNA-Replikation. DNA-Polymerasen benutzen einzelsträngige DNA als Schablone (Template) zur Bildung eines neuen komplementären Stranges. Einzelsträngige DNA entsteht *in vitro* durch Hitzedenaturierung doppelsträngiger DNA. DNA-Polymerasen benötigen zur Synthese als Startpunkt doppelsträngige DNA. Durch das sogenannte Annealing eines kurzen Oligonukleotids (Primer), dessen Sequenz zur amplifizierenden DNA komplementär ist, wird die doppelsträngige DNA gebildet. Dies ist der Startpunkt der Replikation. In der ersten Synthesephase werden beiden Stränge über das durch den zweiten Primer markierte Ende hinaus dupliziert. Es entsteht so eine Bindungsstelle für den zweiten Primer. Von dieser Bindungsstelle wird ein komplementärer Strang in Gegenrichtung gebildet. Es entsteht so ein doppelsträngiges DNA-Fragment, dessen Länge durch die Primer bestimmt wird. Dieses Fragment dient als Template für einen neuen Zyklus aus Denaturierung, Annealing und Elongation. Auf diese Weise entstehen 2^n DNA-Moleküle (n =Anzahl der Zyklen), die eine DNA-Kopie des durch die Primer begrenzten DNA-Abschnittes darstellen.

Die PCR wurde mit der Polymerase Ampli-Taq-Gold (Perkin Elmer) und dem dazugehörigen Puffer bei einer $MgCl_2$ -Konzentration von 1,5 mM, Primer-Konzentrationen von je 0,02 pM, dNTPs von je 1 mM in einem Volumen von 50 μ l durchgeführt. Die Template-Menge betrug 0,1 ng pro Reaktion. In einer ersten Phase wurde eine Denaturierung von 8 min durchgeführt, die auch zur Aktivierung der Polymerase benötigt wurde. Die daraufhin folgenden Zyklen setzten sich aus folgenden Zeitspannen und Temperaturen zusammen:

95°C	1:15 min	Denaturierung
51-65°C	1 min	Annealing (Temperatur abhängig vom Primer)
72°C	1-3 min	Synthese (abhängig von der Fragmentlänge)

Die Zyklusanzahl von 30-40 variierte je nach benötigter DNA-Menge und Fragmentlänge. Im Anschluss folgte eine weitere Synthesephase bei 72°C für 10 min zur Auffüllung nicht vollständiger Fragmente.

Abhängig von den Primern wurde bei manchen PCRs zum Reaktionsansatz DMSO in einer Endkonzentration von 10% hinzugefügt.

2.9. Sequenzierung

Neue Konstrukte und ihre Übergänge zwischen Vektor- und Insertsequenzen wurden mit der Kettenabbruchmethode nach Sanger überprüft [Sanger et al, 1977]. Die Methode basiert auf einer Replikation durch DNA-Polymerase (Sequenase), bei der es durch Einbau von Didesoxyoligonukleotiden zum Kettenabbruch kommt. Mit Hilfe radioaktiver Markierung waren die Fragmente nach Auftrennung auf einem Sequenzgel und Exposition auf einem Röntgenfilm sichtbar.

Lösungen:

5 x Sequenzierungspuffer: 200 mM Tris/HCl pH 7,5, 100 mM MgCl₂,
250 mM NaCl, 100 mM DTT

Sequenaseverdünnungspuffer: 10 mM Tris/HCl pH 7,5, 5 mM DTT,
0,5 mg/ml BSA

Markierungsmix: je 1,5 µM dGTP, dCTP, dTTP

Terminationsmix: je 80 µM dGTP, dCTP, dTTP
Zusätzlich für
G-Mix: 8 µM ddGTP
A-Mix: 8 µM ddATP
T-Mix: 8 µM ddTTP
C-Mix: 8 µM ddCTP

Stop-Lösung: 95% Formamid, 20 mM EDTA,
0,05% Bromphenolblau/Xylencyanol

Alkalische Denaturierung und Hybridisierung des Primers

2-5 µg (20 µl) Plasmid-DNA wurden mit 2 µl 2 M NaOH, 2 mM EDTA versetzt und 5 min bei RT vollständig denaturiert. Anschließend wurde die Probe mit 3 µl 3 M Na-Acetat versetzt und mit 65 µl Ethanol bei -80°C 30 min präzipitiert. Die DNA wurde zentrifugiert, das Pellet gewaschen und getrocknet, um es anschließend in 6 µl H₂O, 2 µl Sequenzierungspuffer und 2 µl Primer (10-20 µg) aufzunehmen. Der Ansatz wurde 2 min auf 65°C erhitzt und über ca. 15 min auf 37°C abgekühlt.

Markierungsreaktion

Dem Hybridisierungsansatz wurden 1 µl 0,1 M DTT, 2 µl Markierungsmix und 0,5-1 µl α[³³P]-dATP zugefügt. Die Sequenase wurde erst unmittelbar vor Gebrauch 1:8 verdünnt und davon 2 µl als Letztes zur Reaktion gegeben. Die Inkubation erfolgte 3-5 min bei RT; gleichzeitig wurde eine Mikrotiterplatte mit dem Terminationsmix für 1 min auf 37°C erwärmt.

Abbruchreaktion

Zu je 2,5 µl des jeweiligen ddNTP-Mixes fügte man 3,5 µl der Markierungsreaktion hinzu und inkubierte 5 min bei 37°C. Die Reaktion wurde durch Zugabe von 4 µl Formamid-auftragspuffer gestoppt. Vor dem Beladen des Sequenzgels wurden die Platten kurz auf 95°C erhitzt, auf Eis gekühlt und 2,5 µl pro Spur aufgetragen.

2.10. Klonierung von DNA-Fragmenten

Zur Klonierung wurden die DNA-Fragmente durch Restriktionsspaltung aus der Ursprungs-DNA ausgeschnitten oder durch PCR amplifiziert. Anschließend erfolgte eine Auftrennung über eine Agarosegel, und die Fragmente wurden aus dem Gel eluiert. DNA-Fragmente mit kompatiblen Enden konnten direkt für die Ligationsreaktion verwendet werden.

2.10.1. Ligation

Durch die Ligation können DNA-Fragmente miteinander verbunden werden, so z.B. Vektoren und Inserts.

Geschnittene und gereinigte Vektoren und Inserts wurden in einem Verhältnis von 1:4 in einen 20 µl Ligationsansatz in Ligationpuffer (50 mM Tris/HCl pH 7,6, 10 mM MgCl₂, 10 mM DTT, 1 mM ATP) sowie 1 µl T4-DNA-Ligase pipettiert. Die Ligation ließ man 4-16 h bei 16°C inkubieren. Es sollte mindestens 100 ng Vektor bei der Ligation eingesetzt werden, um eine ausreichende Transformationseffizienz zu gewährleisten. Als Kontrolle wurde eine Ligation ohne Insert angesetzt. Da der Vektor mit zwei verschiedenen Enzymen geschnitten wurde, sollten sich nach der Transformation der Kontrollligation keine Kolonien bilden.

2.10.2. Transformation

Durch die Transformation wird DNA in Bakterien z.B. E. coli übertragen. 100 µl kompetente Bakterien (s. 2.10.3) wurden auf Eis aufgetaut, mit 10-20 ng Plasmid-DNA bzw. 10 µl eines Ligationsansatzes versetzt, der mit Tris/HCl pH 7,6 auf 50 µl aufgefüllt wurde und 30-60 min auf Eis inkubiert. Die Bakterien wurden dann 2 min bei 42°C einem Hitzeschock ausgesetzt und wieder 1 min auf Eis gestellt. Danach wurde 0,2-0,5 ml LB-Medium ohne Antibiotikum hinzugefügt und 30 min bei 37°C inkubiert. Die Ausplattierung erfolgte auf LB-Ampicillin-Agarplatten. Diese wurden über Nacht im Brutschrank bei 37°C bebrütet, anschließend Kolonien gepickt und mittels analytischer Minilysate auf ihren Gehalt an transformierter DNA untersucht.

2.10.3. Herstellung kompetenter Bakterienzellen

Ein Aliquot des E.coli Stammes XL-1 wurde auf einer Agarplatte ohne Antibiotika ausgestrichen, über Nacht bei 37°C inkubiert und von den entstandenen Kolonien eine Übernacht-Kultur angelegt. Diese Übernacht-Kultur wurde 1:40 in 200 ml LB-Medium überimpft und bis zu einer OD₅₉₅ von 0,5 wachsen gelassen. Nachdem die Kultur 3 min auf Eis geschwenkt worden war, wurden die Bakterien bei 4°C 10 min bei 5000 rpm pelletiert. Das Pellet wurde vorsichtig in eiskaltem 0,1 M MgCl₂ resuspendiert und noch einmal bei 4°C mit 5000 rpm zentrifugiert. Nach Resuspension in eiskalter 0,1 M CaCl₂-Lösung wurden die Bakterien 20 min auf Eis gestellt und erneut bei 4°C mit 5000 rpm zentrifugiert. Das Pellet wurde in einer Lösung, bestehend aus 9 ml CaCl₂ und 1,3 ml

Glycerol, gelöst. Die kompetenten Bakterien wurden in vorgekühlte Reaktionsgefäße aliquotiert, in flüssigem N₂ schockgefroren und bei -80°C gelagert.

2.10.4. Plasmidgewinnung

Die Plasmidgewinnung wurde zum einen für analytische, zum anderen für präparative Zwecke benötigt. Der Zeitaufwand für die analytische Plasmidgewinnung ist gering, die Reinheit der DNA dagegen schlechter als bei der präparativen Plasmidgewinnung und die Menge der erhaltenen Plasmid-DNA wesentlich geringer. Daher wurde die analytische Plasmidgewinnung zur Überprüfung einer Ligation verwendet. Für Transfektionsexperimente wurde hingegen präparativ gewonnene, sehr reine DNA verwendet.

2.10.4.1. Analytische Plasmidgewinnung

Nach einer Klonierung wurden mehrere Kolonien gepickt, und jeweils 5 ml LB-Medium unter Hinzugabe von Ampicillin mit ihnen beimpft. Die Bakterien wuchsen in einem Schüttler über Nacht. Am nächsten Tag wurden sie bei 4000 rpm zentrifugiert und der Überstand verworfen. Zur Weiterverarbeitung des Bakterienpellets wurde ein Kit verwendet (QIAprep Spin Miniprep Kit, Qiagen, Hilden) und nach dessen Anleitung verfahren. Zur Überprüfung erfolgte eine Restriktionsspaltung der Plasmide.

2.10.4.2. Präparative Plasmidgewinnung

Zur präparativen Plasmidgewinnung wurden Bakterienkulturen in 200 ml LB-Medium angesetzt, die dann über Nacht in einem Schüttler wuchsen. Nach Zentrifugation bei 4°C mit 5000 rpm wurde zur Plasmidextraktion ein Kit verwendet und nach dessen Anleitung verfahren (Nucleobond Kit PC 500, Machery-Nagel). Nach Elution der Plasmide erfolgte die photometrische Bestimmung der DNA-Menge. Die Überprüfung der Plasmide erfolgte mit Hilfe einer Restriktionsspaltung. Neue Konstrukte wurden an den Vektor-Insert-Übergängen bzw. das Insert vollständig sequenziert.

2.11. Zellkultur

2.11.1. Zelllinien und Kultivierung

Bei den BON-1 Zellen handelt es sich um eine Pankreaskarzinoidzelllinie, die aus einem humanen Pankreastumor gewonnen wurde. Die Kultivierung erfolgte mit DMEM/HAM F12 im Verhältnis 1:1 mit 10% FCS und 100 µg/ml Pencillin/Streptomycin (P/S) [Evers et al., 1991].

MSTO-211H ist eine Mesotheliom-Zelllinie. Die Kultivierung erfolgte in RPMI mit 10% FCS ohne P/S [ATCC].

Die Zelllinie EPLC 32M1 entstammt einem nicht kleinzelligen Lungentumor und wurde in RPMI mit Glutamin, 10% FCS und 1% P/S kultiviert [Bepler et al., 1988].

Bei der HCT Zelllinie handelt es sich um eine humane Kolonkarzinomzelllinie. Sie wurde in RPMI mit 10% FCS kultiviert [ATCC].

AGS-Zellen stammen aus einem humanen Magenkarzinom und wurden in RPMI mit 10% FCS gezüchtet [ATCC].

AGS-B Zellen sind mit dem Gastrin/CCK-B Rezeptor stabil transfizierte AGS-Zellen, die in DMEM mit 10% FCS gezüchtet wurden [Höcker et al, 1998].

Bei MCF-7 handelt es sich um eine Zelllinie aus einem humanen Mammakarzinom. Sie wurde in RPMI mit 10% FCS gezüchtet [ATCC].

Hacat-Zellen stammen von humanen Keratinozyten ab und wurden in RPMI mit 10% FCS und 1% P/S kultiviert [Boukamp et al., 1988].

HT-29 ist eine humane Kolonkarzinom-Zelllinie und wurde gleichfalls in RPMI unter Zugabe von 10% FCS kultiviert [ATCC].

Die beschriebenen Zelllinien wurden routinemäßig in 75 cm² Gewebekulturflaschen kultiviert. Die Kultur erfolgte in wassergesättigter Atmosphäre bei 37°C unter Begasung mit 5% CO₂ und 95% Luft in einem Brutschrank. Die Passagierung erfolgte 1-2x wöchentlich. Hierzu wurden die konfluenten Gewebeflaschen unter der sterilen Werkbank vom Medium befreit und anschließend mit PBS gewaschen. Mit 4 ml Trypsin-EDTA-Lösung wurden die Zellen vom Boden gelöst. Nach vollständiger Ablösung der Zellen wurde die Zellzahl/ml Medium ermittelt, um die Zellen in gewünschter Dichte aussäen zu können.

2.11.2. Einfrieren und Auftauen von Zellen

Zellen, die nicht für Experimente benötigt wurden, wurden eingefroren und in flüssigem Stickstoff aufbewahrt. Die Zellen wurden mit Trypsin von den Gewebeflaschen gelöst und dann das 2-fache Volumen an serumhaltigem Medium hinzugegeben. Anschließend wurde sie bei 1500 rpm zentrifugiert und der Überstand verworfen. Das Zellpellet wurde vorsichtig in 4 ml eines serumhaltigen Mediums aufgenommen und mit 10% DMSO versetzt. Nach Aliquotierung in Kryogefäße wurden die Zellen bei -80°C langsam eingefroren, bevor sie in flüssigem Stickstoff gelagert wurden.

Im Gegensatz zum langsamen Einfrieren wurden die Zellen in einem Behälter mit warmem Wasser rasch aufgetaut. Der Inhalt des warmen Kryogefäßes wurde in 9 ml Medium gegossen und danach bei 1200 rpm 5 min zentrifugiert. Nach Abgießen des Überstandes wurden die Zellen in frisches serumhaltiges Medium aufgenommen und in Gewebekulturflaschen kultiviert.

2.11.3. Transiente Transfektionen

Transfektionen ermöglichen die Übertragung von DNA in eukaryonte Zellen. Auf diese Weise kann die transkriptionelle Regulation eines Promotorbereiches bzw. die Proteinexpression untersucht werden.

Alle nachfolgenden Angaben beziehen sich auf Platten mit 35 mm Durchmesser.

Verwendete Waschlösung:

PBS 1x:	137 mM NaCl
	2,7 mM KCl
	18 mM Na_2HPO_4
	1,47 mM KH_2PO_4

Je Transfektion wurden 3 Platten verwendet. Als Transfektionsmethode wurde die Lipofektion mit dem Lipofectamin-Reagenz (Life Technologies) in einer Konzentration von 2 mg/ml verwendet. Pro Platte wurde 1,5 μg Promotorkonstrukt und 0,5 μg pSV- β -Galaktosidase-Vektor (Promega) kotransfiziert.

Einen Tag vor der Transfektion wurden die Zellen zu $0,5-1 \times 10^6$ /Platte ausgesät. Sie wuchsen über Nacht an den Transfektionsschalen fest. Am nächsten Tag erfolgte die Transfektion. Pro Platte wurden zwei Lösungen hergestellt. Die erste Lösung beinhaltete

100 µl DMEM-Medium und 10 µg Lipofectamin-Reagenz. Die zweite Lösung beinhaltete ebenfalls 100 µl DMEM-Medium und 1,5 µg Promotorkonstrukt und 0,5 µg pSV-β-Galaktosidase-Vektor (Promega). Nach Herstellung beider Lösung wurden sie gemischt und 30 min bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wurden 800 µl DMEM-Medium hinzugefügt und die gesamte Lösung auf die zu transfizierenden Zellen gegeben (insgesamt 1 ml/Platte). Nach 24-stündiger Inkubation bei 37°C und 5% CO₂ wurde die Transfektionslösung abgesaugt, die Zellen mit PBS-Medium gewaschen und frisches Medium hinzugefügt. Erneut inkubierten die Zellen 24 Stunden im Brutschrank unter oben angegebenen Bedingungen. Im Anschluss wurden die Zellen entweder zur Auswertung geerntet, oder es erfolgten Stimulationsexperimente.

2.11.3.1. Stimulationen

Grundsätzlich erfolgten Stimulationsexperimente 24-48 Stunden nach Transfektionsbeginn (s.o.). Nach Absaugen des Mediums erfolgte ein Waschvorgang mit PBS. Danach wurde neues Medium (ohne FCS und ohne Penicillin/Streptomycin), das zuvor mit einer bestimmten Konzentration des zu testenden Agens angereichert wurde, auf die Zellen gegeben. Abhängig von der Stimulationszeit wurden die Zellen geerntet.

2.11.3.2. Ernten der Zellen und Proteinextraktion

Vor dem Ernten der Zellen wurde das Zellmedium entfernt, danach die Zellen zweimal mit PBS gewaschen und im Anschluss 150 µl Reporter Lysis Puffer (1x) hinzugegeben. Mit einem Schaber wurden die Zellen von den Platten vorsichtig gelöst und in ein Eppendorf-Cup überführt, das daraufhin zweimal eingefroren und wieder aufgetaut wurde. Anschließend wurden die Cups für 1 min bei 13000 rpm zentrifugiert. Aus dem Überstand konnte dann die Luciferase- und Galaktosidaseaktivität bestimmt werden.

2.11.3.3. Luciferaseassay

Die Bestimmung der Luciferaseaktivität wurde mit dem Luciferase-Assay-Kit (Promega) durchgeführt. Es wurde nach der Anleitung verfahren. Gemessen wurden je 10 µl des Zellysates im Luminometer für je 10 Sekunden.

2.11.3.4. Galaktosidaseassay

Die Galaktosidaseaktivität wurde mit dem GalaktoLightPlus-Assay (Tropix) bestimmt. Auch hier wurde nach der Anleitung verfahren. 10 µl des Zelllysates wurden für 10 Sekunden gemessen.

2.11.3.5. Bestimmung der Proteinkonzentration

Zur Messung der Proteinkonzentration wurde Biorad DC Protein Assay, der auf dem Lowry Assay basiert, verwendet. 2-10 µl des Proteinextraktes wurden zur Messung eingesetzt und nach Anleitung verfahren. Nach 15 minütiger Inkubation wurden die Proben bei 750 nm gemessen und anhand einer Standardkurve aus 1, 2, 3, 4 und 5 µg/µl BSA die Proteinkonzentration bestimmt.

2.11.3.6. Statistische Auswertung der Transfektionsergebnisse

Jede Transfektion wurde mindestens zweimal durchgeführt, um die Reproduzierbarkeit zu gewährleisten.

Zur Transfektionskontrolle wurde immer pGL2-Control als Positivkontrolle und pGL2-Basic als Negativkontrolle pro Transfektion mittransfiziert. Bei jeder Transfektion wurden je drei gleiche Proben transfiziert und gemessen. Die gemessene Luciferase-Aktivität wurde auf die jeweilige β-Galaktosidase-Aktivität, die als interne Transfektionskontrolle diente, bezogen und daraus der Mittelwert und die Standardabweichung bestimmt. Die Auswertung erfolgte graphisch mittels Microsoft Excel. Die Signifikanz der Ergebnisse wurde mit Hilfe des Student's T-Testes ermittelt.

Bei manchen Transfektionen war es notwendig, die Proteinkonzentration als interne Kontrolle zu bestimmen.

2.12. Jod-Uptake-Messung

Die biologische Aktivität von hNIS in den transfizierten Zelllinien wurde durch Quantifizierung der Radiojodaufnahme nachgewiesen.

Waschpuffer (1x): 1 ml HBSS
 20 µl Hepes [500 mM]

Inkubationspuffer (1x): 1 ml HBSS
 20 µl Hepes
 0.1 µl NaJ [1 M]
 0.05 µl ¹²⁵J [1 Ci/ml]

Hempuffer (1x): Zusammensetzung des Inkubationspuffers
 plus 0.1 µl 1 M NaClO₄

Das Medium wurde von den Zellen entfernt und die Zellen zweimal mit je 1 ml Waschpuffer (37°C) gewaschen. Danach wurden die Zellen zunächst mit ¹²⁵J in HBSS inkubiert. Dies wurde entweder in Ab- oder Anwesenheit von Perchlorat durchgeführt, das hNIS spezifisch inhibiert (Inkubations bzw. Hempuffer jeweils 1 ml/well). Nach Inkubation des Puffers für 1 h erfolgte ein erneuter Waschvorgang mit jeweils 2x1 ml Waschpuffer (0°C). Die Zellen wurden anschließend mit 1 ml 1 M KOH lysiert und der Radio-Jod Uptake im Gamma-Counter gemessen.

3. Ergebnisse

3.1. Strukturelle Charakterisierung des humanen Chromogranin A (hCgA) Promotors

3.1.1. Isolierung und Sequenzierung der 5'-flankierenden DNA des humanen Chromogranin A (hCgA) Gens

Zur Untersuchung der transkriptionellen Regulation des humanen Chromogranin A (hCgA) Gens wurde zunächst die 5'-flankierende DNA anhand von Primern, die in den Bereichen von -2203 bp bis -2185 bp und +25 bis +40 komplementär zu der humanen CgA Promotorsequenz lagen [Mouland et al, 1994] anhand der Polymerasekettenreaktion (PCR) amplifiziert, in den pGL2-Basic Reportervektor kloniert (siehe Material und Methoden 2.4.) und die amplifizierte hCgA 5'-flankierende DNA zur Charakterisierung sequenziert (Abbildung 5).

3.1.2. Charakterisierung putativer Transkriptionsfaktor-Bindungsseiten im humanen Chromogranin A Promotor

Die bisherigen Untersuchungen zur transkriptionellen Regulation des hCgA Promotors wurden in Rattenhypophysenzellen und humanen Lungentumorzellen durchgeführt. In Rattenhypophysenzellen konnte eine über ein proximales „cAMP Response Element“ (CRE) bei Nukleotid -51 bis -43 bp vermittelte zellspezifische Regulation und in Lungentumorzellen ein *cis*-aktivierendes AP-1 Element bei Nukleotid -561 bis -555 bp im hCgA Promotor ermittelt werden [Mouland, 1994; Nolan et al, 1995].

Um weitere putative Transkriptionsfaktor-Bindungsseiten im humanen CgA Promotor zu identifizieren, wurden 2203 kb der 5'-flankierenden DNA des CgA Gens nach Bindungsseiten anhand des Matrix Suchprogramms MatInspector V2.2 unter Nutzung der TRANSFAC 4.0 Matrices der Transfac-Datenbank (www.transfac.gbf.de) analysiert [Wingender et al, 2000]. Dabei konnten putative Transkriptionsfaktor-Bindungsseiten innerhalb des humanen Chromogranin A Promotors identifiziert werden, die im folgenden kurz aufgeführt werden und in Abbildung 5 graphisch dargestellt sind:

- (1) **Sp1** (Stimulating Protein 1): Bindungsmotive bei Nukleotiden -1503 bis -1508 bp, -1010 bis -1005 bp, -973 bis -967 bp, -457 bis -452 bp, -213 bis -208 bp, -63 bis

- 58 bp und +148 bis +153 bp. Über Sp1 wird der Gastrinpromotor transkriptionell reguliert [Simon et al, 1997; Chupreta et al, 2000].
- (2) **AP-1 (Activator Protein 1)**: Bindungsmotive bei Nukleotiden -560 bis -554 bp, -420 bis -413 bp und +98 bis +105 bp. Die Homo-/Heterodimerbildung aus c-fos und c-jun formen den AP-1 Komplex, der in multiple Regulationsvorgänge involviert ist [Shaulian, 2002].
 - (3) **AP-2 (Activator Protein 2)**: Bindungsmotive bei Nukleotiden -376 bis -369 bp, -89 bis -83 bp, +47 bis +58 bp, +124 bis +134 bp und +157 bis +168 bp. AP-2 besitzt sowohl aktivierende als auch inhibitorische Wirkungen auf die transkriptionelle Regulation verschiedener Promotoren [Jiang et al, 2000; Hayashi et al, 1998].
 - (4) **OCT-1 (Octamer factor 1)**: Bindungsmotive bei Nukleotiden -1965 bis -1952 bp, -1348 bis -1337 bp, -689 bp bis -671 bp und -552 bis -540 bp. Eine über OCT-1 vermittelte Aktivierung des Thyroidhormonrezeptorpromotors konnte in COS-1 Zellen gezeigt werden [Nagasawa et al, 1997]
 - (5) **PPAR/RXR (Peroxisome proliferator-activated receptors/retinoic x receptor)**: Bindungsmotive bei Nukleotiden -1304 bis -1285 bp, -933 bis -920 bp und -150 bis -131 bp. Das Heterodimer aus PPAR/RXR ist ein zytosolischer Rezeptor der zur gleichen Familie wie der Schilddrüsenhormon- und Vitamin D₃-Rezeptor gehört [Mangelsdorf et al, 1995]. Die Aktivierung der Transkription erfolgt über ein PPRE (PPAR response element). In GH₄C₁-Zellen (Rattenhypophysenzelllinie) konnte eine über PPAR vermittelte Regulation des Prolactinpromotors nachgewiesen werden [Tolón et al, 1998].
 - (6) **RREB-1 (Ras-responsive element binding protein 1)**: Bindungsmotive bei Nukleotiden -767 bis -755 bp und +178 bis +191 bp. Es wurde nachgewiesen, dass der humane Calcitoninpromotor in medullären Schilddrüsenkarzinomzellen über RREB-1 transaktiviert wird [Thiagalingam et al, 1996].
 - (7) **SRF (Serum response factor)**: Bindungsmotive bei Nukleotiden -648 bis -634 bp und -799 bis -786 bp. Über den SRE/SRF-Komplex wird z.B. das Protoonkogen c-fos reguliert [Graham und Gilman, 1991].
 - (8) **STAT3 (Signal transducer and activator of transcription)**: Bindungsmotiv bei Nukleotid -43 bis -27 bp. Durch STAT3 wird die Expression von

Proopiomelanocortin in AtT20 (corticotrophe Hypophysentumorzelllinie) stimuliert [Bousquet et al, 1999].

- (9) **CRE (cAMP-response element)**: Bindungsmotiv bei Nukleotid -51 bis -43 bp.
- (10) **Egr-1 (Early growth response gene 1)**: Bindungsmotive bei Nukleotiden -207 bis -199 bp und -70 bis 62 bp. Egr-1 kann die transkriptionelle Regulation positiv oder negativ beeinflussen [Gashler et al 1993]. In vielen Promotoren überlappen und beeinflussen sich Sp1 und Egr-1 Bindungsmotive gegenseitig [Huang et al, 1997].
- (11) **GRE (Glucocorticoid response element)**: Bindungsmotive bei Nukleotiden -1536 bis -1510 bp und -1291 bis -1276 bp. Über das GRE wird der rCgA Promotor reguliert [Rozansky et al, 1994].
- (12) **IRF (Interferon response element)**: Bindungsmotiv bei Nukleotiden -1703 bis -1715 bp. IRF-1 und IRF-2 wirken antagonistisch onkogen und antionkogen [Harada et al, 1993].
- (13) **USF (Upstream stimulating factor)**: Bindungsmotive bei Nukleotiden -1051 bis -1042 bp und -694 bis -687 bp. USF aktiviert das gastroprotektive TTF2 Gen in gastrointestinalen Tumorzellen [Al-azzeh et al, 2002].

Es wurden nur Bindungsseiten mit Core-Bindung von 100% und Matrix-Übereinstimmung von mindestens 80% ausgewählt. Zusammenfassend gab die strukturelle Charakterisierung der hCgA-Promotorsequenz Hinweise auf zahlreiche strukturelle Übereinstimmungen zu potentiellen *cis*-regulatorischen Elementen im humanen CgA Promotor.

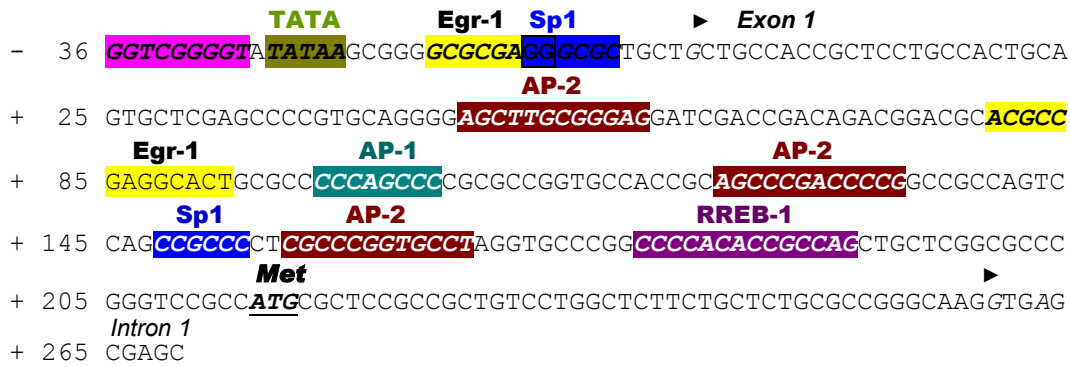


Abbildung 5: Sequenz des hCgA Gens von den Nukleotiden -2316 bis +269 in Bezug auf die Transkriptionsstartseite. Putative Transkriptionsfaktor-Bindungsseiten sind farbig unterlegt. Überlappende Transkriptionsfaktor-Bindungsseiten sind umrahmt. Die unterstrichenen Basen geben die 5'-Position von hCgA-Reportergenkonstrukten (siehe 3.2) an. Der Beginn des Exons 1 und des Intron 1 ist mit einem Pfeil markiert. Met: Methionin (ATG) kennzeichnet den Translationsstart. Sp1: Stimulating protein 1; AP-1 oder 2: Activator protein 1 oder 2; CRE: cAMP-response element; Egr-1: Early growth response gene 1; GRE: Glucocorticoid response element; IRF: Interferon regulatory factor; OCT1: Octamer factor 1; PPAR/RXR: Peroxisome proliferator-activated receptors/retinoic x receptor; RREB-1: Ras-responsive element binding protein-1; SRF: Serum response factor; STAT3: Signal transducer and activator of transcription 3; TATA: TATA-Box; USF: upstream stimulating factor.

3.1.3. Interspeziesvergleich der 5'-flankierenden DNA des Chromogranin A Gens

Homologe Sequenzen in den Promotorregionen des gleichen Gens verschiedener Spezies können auf evolutionär konservierte und funktionell wichtige *cis*-regulatorische Elemente hinweisen. Es wurde ein Alignment der 2,2 kb betragenden 5'-flankierenden humanen CgA Sequenz mit der 5'-flankierenden Sequenz des CgA Gens der Maus (m), der Ratte (r) und dem Rind (b) durchgeführt. Die genomischen Sequenzen der CgA 5'-flankierenden Sequenzen der verschiedenen Spezies wurden aus der Genbank www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?db=Nucleotide entnommen (Maus: Accession L31361, Ratte: Accession L40524, Rind: Accession S79277). Die vollständigen Sequenzen des distalen CgA Promotors der Maus und Ratte waren bisher nicht bekannt. Daher wurden genomische Datenbanken zur Identifizierung dieser distalen

Promotorsequenzen herangezogen und die fehlenden genomischen Sequenzen mithilfe des Genomic Blast Programms www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST und der hCgA genomischen Sequenz identifiziert. Beim Rind liegt die vollständige Entschlüsselung des Genoms noch nicht vor, so dass keine weiteren Sequenzen zur Vervollständigung des distalen Promotors zum Alignment zur Verfügung standen. Sequenzhomologien wurden im proximalen CgA Promotor ohne Hilfe eines Computerprogramms erstellt. Für das Alignment im distalen Promotorbereich wurde das Programm ClustalW www.ebi.ac.uk/clustalw/ angewandt.

Der Sequenzvergleich der CgA Promotoren ist in Abbildung 6 dargestellt. In den 5'-flankierenden CgA Sequenzen der verschiedenen Spezies zeigte sich eine stärkere Sequenzübereinstimmung zwischen Maus und Ratte gegenüber Mensch und Rind. Die Homologie über die CgA 5'-flankierende Gesamtsequenz war zwischen Ratte und Maus mit 83% deutlich höher als zwischen Ratte und Mensch oder Maus und Mensch mit je nur 35% Sequenzhomologie. Die 5'-flankierende Region zeigte im proximalen Bereich der CgA Promotorregionen die höchste Konservierung der Sequenzen mit zunehmend abnehmenden Sequenzhomologien in Richtung distaler Promotorbereiche. So betrug im proximalen Promotorbereich (willkürlich angenommen bis Nukleotid -500 bp des hCgA) die Sequenzhomologie zwischen Ratte und Maus 86%, zwischen Rind und Mensch 67%, zwischen Ratte und Mensch 62% und zwischen Maus und Mensch 61%. Im mittleren Promotorbereich (Nukleotid -500 bp bis -1444 bp des hCgA) betrug die Sequenzhomologie zwischen Ratte und Maus noch 84%, zwischen Maus und Mensch 51% und zwischen Ratte und Mensch nur noch 45%. Im distalen Promotorbereich fand sich nur noch zwischen Maus und Ratte eine Sequenzhomologie von 78%, dagegen zeigten Ratte und Mensch oder Maus und Mensch nur noch in 4 bis 5% der Nukleotidsequenz Übereinstimmung. Neben dem in jeder Spezies konservierten cAMP Response-Element (CRE) und der Sp1-Bindungsseite oberhalb der TATA-Box konnten im proximalen Promotor ausgehend von den homologen DNA-Bereichen in allen Spezies weitere konservierte DNA-Bindungsmotive, wie in Abbildung 6 dargestellt, identifiziert werden. Diese umfassten Erkennungssequenzen für AP-1, OCT-1, SRF, PPAR/RXR oder USF.

Somit zeigte der Cross-Speziesvergleich die stärkste Sequenzhomologie im Bereich des proximalen CgA Promotors, wogegen Sequenzen der Nager und des Menschen zunehmend in Richtung distaler Promotorbereich divergierten. Die hoch-konservierten

DNA Bereiche in den proximalen CgA Promotoren wiesen auf mögliche funktionell wichtige Transkriptionsfaktor-Bindungsseiten hin. Der Interspeziesvergleich ist in Abbildung 6 dargestellt.

rCgA	5' -	ACTTAAATATATGCTTATTGATAAA-GTGTGCTCTTGATAAAGTATG---CACTCTTGGG	-1952
mCgA	5' -	ACTTAAATATATGCT-ATTGATAAAAGTGTGCTGTGATAAAGTATG---TACTCTTGGG	-2119
hCgA	5' -	GAATTCATGCCAGCT-CTGAGCCTACATCTCCCATGGGGAAGAGAGGGCTACTTTTGGG	-2265
bCgA	5' -	-----	-0256
rCgA	5' -	GCAGTCGGTAGAGTGAGAATCTTTAAAAAGTTAGCTCTTATAGGCGACAGTGATGTTACT	-1892
mCgA	5' -	GCAGATGGCAAAGTGAGAATC----GGGGTTTAATTCCTACGGGTGATAGTGATGTTACT	-2063
hCgA	5' -	GCCTCTCTCGAAATCAGCATT----CTGGAGAGGAAAACATCTGTGAGA---ATCCTCCC	-2208
bCgA	5' -	-----	-0256
rCgA	5' -	GGAAGTCTCCTCAATCATCCTACCAAGT----GGAGGAAGCTGGGCTGTGCTGCGGAC	-1836
mCgA	5' -	GGAAGTCTCCTTCAATGCATCCCACCAAGG----GGAGGAAGCC-----CCTTGTGAAC	-2013
hCgA	5' -	TGGATCCCAGTAGACCAAGCCCAGGCTCTGGTGCCTCC-----CCTTCTGTTC	-2154
bCgA	5' -	-----	-0256
rCgA	5' -	TCTGAAACTTGTGGTGGCCTTTGGTTACCAGTACATCTCTCTGTCCACACA----TTATGC	-1780
mCgA	5' -	TCTGAAACTAGAGGTGGCCTTTGGCTCCAGTAAATCTCT--GTTACACA----CTATGC	-1959
hCgA	5' -	ACTAGTTCAGTGCCCTGTGGT--GCTCCCAG-AGATGCTGGCT--GGACAGCTTCTGTCC	-2098
bCgA	5' -	-----	-0256
rCgA	5' -	TAAAATAAGTATATATTTATATTTT-ATATGATATGAAAATAAATATAAAAATAAAAAG	-1721
mCgA	5' -	TAAAATAAGTACATATTTATATTTTACATAAATATGAAAATAAATATAAAAATAAACAG	-1899
hCgA	5' -	TCCAGGGAGGCCAGGACACCTGCTCTGCCCTGCTCTCTATCCTCCAGGCTAGAACCAG	-2038
bCgA	5' -	-----	-0256
rCgA	5' -	CCAGCACACCTAAACTGTGACCTACAAAAGGGTGCCTGGT-TGATGATGTCCAGGGAT-C	-1663
mCgA	5' -	CCAGCACATCTAAACTGTGACCCACATAAAGGGTGTCTGGGATGATGATGCCAGAGTG-C	-1840
hCgA	5' -	CCACCTTCTTGCAGTCAACATCCCACAAGA-TACTGAGAGTGATTTTTTTATTGTGAT	-1979
bCgA	5' -	-----	-0256
OCT-1			
rCgA	5' -	AGGTAGTATTTATTTATTTATTTATTTATTTATTTATTTATTTATTTAGAGACAGGGTCTCAC	-1603
mCgA	5' -	AAGGAGGGTTTATTTGTTTATTTATTTATTTA-----GAAACAGGGTCTCAC	-1793
hCgA	5' -	AAAATATCCCTAACATAACATTTTACATCTTA-----ACCATTTTTAGG	-1935
bCgA	5' -	-----	-0256
rCgA	5' -	TGTGTAGCTCTGGCT-ATCCTGGAACCTATCATGTGGACCAGGCTGGCATCGAACTCACA	-1544
mCgA	5' -	TATGTAGCTCTGGCTCGTCCTGGAACCTCGTCACATGGACCAGGCTGGCATTGAACTCA--	-1735
hCgA	5' -	GGCACAATTCAG--TGGCATTAAGTCCAATTATGTTG-CTGTGCAGCCATCATCTACTA--	-1880
bCgA	5' -	-----	-0256
rCgA	5' -	GAGATCTGCTTGATTCTGCCTCCACGCTCGGGGGTTAGAGGTTTGTGCCACCATACTTT	-1484
mCgA	5' -	GAGATCTGCTTGATTCTGACCCCGGGTTCAGGGATTAGACGTGTGTGCCACCATGCCCTT	-1675
hCgA	5' -	TCCATTTCAGAACTTTTTCATCTG--CCAAACTCTGTACCCATGAAACACTAACTCTC	-1822
bCgA	5' -	-----	-0256
rCgA	5' -	GCTGCAGCTAGTTTTTACGAGATGGTATTTTGGAGACAGCATGCCGGAGCTTGGCTGTG	-1424
mCgA	5' -	GCTGAGGCTACTATTTACGAGACG-----ATGCTAGGAGCTTGCACATG	-1631
hCgA	5' -	GTT-----TCCTCCTCCCCTCAG-----CCCCTGGAAACAGCATCCT	-1783
bCgA	5' -	-----	-0256
rCgA	5' -	ATCACAGTGACTTCATGTCCTAGGACCTGGAACACTCTGGAATTCCTCCAGTGTGAGCT	-1364
mCgA	5' -	ATCACAGCGACCTCCCATCCTAGGACCTGGAACAACC----GTTCTCCAGTGTGAGCT	-1575
hCgA	5' -	ATTTCCATTTCTGTGTGTTGTTGTTGTT-TGTTT---GTTTGTTTGAGACAGAGTT	-1727
bCgA	5' -	-----	-0256
IRF			
rCgA	5' -	GGAGTCCCTTTCTAGGAACATAATAT-ATATGAATGGAGACGCCTCA-----	-1319
mCgA	5' -	GGAGTCCCTTCTAGGAACATAATATAAATGATAGGAGATGCCTTAAATAAATGCCTTAA	-1515
hCgA	5' -	TCACCTCTGTGCCAGGCTGGAGTGCAGTGGCATGA---TCTTGGCTCACTGCACCTCT	-1671
bCgA	5' -	-----	-0256
rCgA	5' -	-----GTGCAGAAT-----	-1310
mCgA	5' -	AAGAAAAGTTGTGGCCCTTGTCCCTGGGTGGAGCCACTGTGAGGGATCTCCTATATTTCT	-1455
hCgA	5' -	-----GCCTCCACCTCTTGGGTTCAAGCGATTCCCCTGCCTCAG-CCTTCCAAGTAGCT	-1618
bCgA	5' -	-----	-0256

rCgA	5' - -----AAATGCTTTAAAT-----	-1297
mCgA	5' - CAAGATTGAGATGAGATGT-GTGCT-ATTCATCTCTGAAAGCCTTGTA-TGACCCACCTG	-1398
hCgA	5' - GGGATTACAGATGCGCCACCATGCCAGCTAATTTGTATTTTAGTAGAGATGGGGTTT	-1558
bCgA	5' - -----	-0256
	Sp1	
rCgA	5' - -TTGCTGGCCCTTG-----	-1284
mCgA	5' - CTTGCTGTTCCCTTAGAATGGACCAGACACCTTCTCCCTTAGGGGGCGTTTGGCTGGCTGC	-1338
hCgA	5' - CACCATGTTGGTCAGGCTGGTCTCGA-ACTCCTGACCTCAGGTGATCT--GCCCGCTC	-1502
bCgA	5' - -----	-0256
rCgA	5' - ----TCCCCGGG-----	-1276
mCgA	5' - TCCC TCCC TGGAGAGAGAGCTCCCCCTTACACAGGTTCTGGCTCACTTTAAATGCCAC	-1278
hCgA	5' - AGCC TCCC AAACTGCTGGGATTACAGGTGTAAACCACTGC--GCCAGCTGACCCACCT	-1444
bCgA	5' - -----	-0256
rCgA	5' - -----TAGAGCCAGCCTCTCCATACATTCCTGTCCCTCACTAGAAAC	-1234
mCgA	5' - CTCCTGGTAAGGCCTCCTCAGAACCGCTCTTCAATGTATTCTGTCCCTCACTAGAAC	-1218
hCgA	5' - ATTTAAGTATAACCCC-----ACCTGTCTCAGCACAGCCGTCCCCTTCCGTGCTGACAA	-1389
bCgA	5' - -----	-0256
rCgA	5' - TCTGCCGTCTTCTCCCCTTTATGCGCTGTAGCACGGCCATGACCCAGCATAGTGTACACCT	-1174
mCgA	5' - TCCGCCCGCTTCTCTGCTTTATGCTCGTAGCATGGCCACTACCAGCACAGTGTACATCT	-1158
hCgA	5' - ACTGTGGATGT---TACTTCTTATTCAATGTCTG-TCTCCACCATCTAGAATGTAGGCTT	-1333
bCgA	5' - -----	-0256
	GRE GRE	
rCgA	5' - TGCTTCTTTCTCTGGAAAGGGAATTCTATAAGGGTTGGGTTGCTGTTTGTTTACTGCC	-1114
mCgA	5' - TGTTTCTTTCTCTGGAAAGGGAATTCTATAAGGGTTGGGTTGCTGTTTGTTTACTAGCT	-1098
hCgA	5' - CTGTCTGTTCTGTTTAA TGCTGTACCCTCAACTGTGTACTGTTCTAGGATGTTCTAAGC-	-1274
bCgA	5' - -----	-0256
rCgA	5' - GTGTCTTTGGCATCTGGCACAGTCAAGTGGTGTCTGAGGTGTTCTAAGCCACGTTGAT	-1054
mCgA	5' - GCGTCTTTGGCACCCAGCACAGCTGAGTGGT-----TCTAAGCCACGTCGAT	-1050
hCgA	5' - ACATAGTAGGTGCTTAGCAAGC-AAATA-----TGTAATTTCATGAATGT	-1229
bCgA	5' - -----	-0256
rCgA	5' - GCTTAAACACATGATTGTTGAATGAATGCATGCAAGCAGTTTCTCATTTAGGGGCATGAG	-0994
mCgA	5' - GCTTAAACACATGGTTGTTGAATGAATCACGCGAAGCCGGTTCTCATTTAGGGGCATGAG	-0990
hCgA	5' - GGCCATTTCAATCTCCTT---TGAGCTCCACCA---GGTTCTCATTTAGGGACAGGCG	-1176
bCgA	5' - -----	-0256
rCgA	5' - TGGGCAGAGGTGTGGGCAGGAA-----GCAGGGAAGAGCAGAAGCAGGTG-----	-0949
mCgA	5' - TAGGCAGAGGTGTGGGCAGGAA-----GCAGGAAAGAGCGGAAACAGGTG-----	-0945
hCgA	5' - TAGGCACAGGTGTGGGAAAGGAAGTATTAGTAGAAACAGCAGCCGCAGATGAGAGGGG	-1116
bCgA	5' - -----	-0256
rCgA	5' - GGGACGGAAGGGGGGGGGCTCTGAAGGATGCCAGTCAGTGCCAAACTGTCATCCAGATA	-0889
mCgA	5' - CGGACAGAAAGGA--GGGGCTCTGAAGGATGCCAGTCAGTGCCAAACTGTCATCCAGATA	-0887
hCgA	5' - TGGGCAGGAAGGA--GGGGCTCTGGACGATGCCAGCCAATGACAAACCGTACCCAGATC	-1058
bCgA	5' - -----	-0256
	USF Sp1	
rCgA	5' - CCAGGCTCATTATGGCACTGGGTGCAGGCTTACAGGGCTTCCCATGTGGTC--CACAGG	-0831
mCgA	5' - CCAGGTTCACTGTGGCCCTAGGCCAGGCTGCACGGGGCTTCCCATGTGGTCTGCCCAGG	-0827
hCgA	5' - CCAGGTPC-CCGTGACAGTGGGTGAGGTGGCA-AGAGCTTCTACATGGCC--CCAGAA	-1002
bCgA	5' - -----	-0256
	Sp1	
rCgA	5' - GTGAGAGC---AGAGCTGGGATGGA GCGGGC ---AGAA-----GGAAACCAACCAGGA	-0782
mCgA	5' - GTGAGAGC---AGA ACTGCGG -T-GG CGGGC ---AGAA-----GGAAACCAACCAGGA	-0780
hCgA	5' - GCTGAGCCCAAGATCTGGAGCAT-- CAGGGGCC AGAAATAAGGGAA GCCAACCAGGA	-0944
bCgA	5' - -----	-0256
	PPAR/RXR	
rCgA	5' - AGCA-AGCTCACACCCAAAATATCCAGCTTTTAAGAG----CATTA AAAAAAAAAAAA	-0727
mCgA	5' - AGCAGGG-TTGCACCCAAAATATCCAGGTTTAAAGTA----CATTTAAG-----A	-0735
hCgA	5' - AACTGACCTTTTACACAAAATATCCAGGTTTTGAGAAATGCTCAGG-AAG-----A	-0895
bCgA	5' - -----	-0256
rCgA	5' - GACAAG-----GCGTGGCTGTTGAAGACAG--AGGTGTTCCCTGGAGTG	-0686
mCgA	5' - GACAAG-----GCTGGCTGTTGAAGGACAG--AGGTGTTCCCTGGGGTG	-0694
hCgA	5' - GGTGAGAGCTGTTCTCAAATTCAGATGGCTGCCAGTGCCAAGAAGGTGATGCTAAGGGG	-0835
bCgA	5' - -----	-0256

		SRF	
rCgA	5'-	CTGGACTAGGACTGACT-----ACTTTTGTTTTAGCTTA-ATGGTGAGA	-0643
mCgA	5'-	CTGGACTAGGACTGACC-----ACTTCTGTTTTAGTTA-ATGGTGAGA	-0651
hCgA	5'-	TTGCACTAGGGCTAATGGGTAGGTGTGCAAGGACTCCTATTTTGGCGGATGTAATAAGA	-0775
bCgA	5'-	-----	-0256
		RREB-1	
rCgA	5'-	ACTGCCTCCACTGTACCT-----GCCTTACTTGCCA	-0610
mCgA	5'-	ACTGCCTCACACTGCTACCT-----GCCTTACTTGCCC	-0618
hCgA	5'-	ACTGGCCCCACTCCTCCTCTACCTAACAAAGAGGTGCCAACAGTGCTTAAGCTTCCCT	-0715
bCgA	5'-	-----	-0256
		OCT-1	GRE
rCgA	5'-	CTTGAAA-T-A-----CTAGG----ACACACTCATGT	-0584
mCgA	5'-	CTTGAGAG-----C-TGTG-----AGCCTAGG----ACCCACCCATGT	-0585
hCgA	5'-	GGTGAAAGTGAGCCCTGGTTCCCGTGTGTATGCAGAGCCAGGATTCACACCCATGG	-0655
bCgA	5'-	-----	-0256
		SRF	
rCgA	5'-	GTGGG--CT---GGATC--TTCAATGC--ACACATGAACT-----TGTGTGAAG	-0543
mCgA	5'-	GTGGG---TT---GGACC--TTCAGTCC--ACACACTGAAC-G-----TGTGTGAAG	-0544
hCgA	5'-	CTTGAACTTTAATGGATACATTCA-TCAGTTACCTGTCAAGTGCCTTCCCTCTGTG---	-0599
bCgA	5'-	-----	-0256
		AP-1	
rCgA	5'-	CCATGGTTGTGTCAGTGA-GGAGCTCTCAGCACTGAGAAAG-CAGTGACCCTATCCCTA	-0485
mCgA	5'-	CCACTGGTTGTGTCAGCGCAGG-GCTCTCGGCACTGAGGAAG-CAGTGACCCTATCCCTA	-0486
hCgA	5'-	CCA--GATTGT--GT--GGCGCTCA--GCACTGTGAAAGTAA-TGATGACTAAACATTA	-0549
bCgA	5'-	-----	-0256
		OCT-1	
rCgA	5'-	T-CAAAATAACTATTAAATACACA--CA-----GAA--CGAGGCACAAAACCTGA	-0442
mCgA	5'-	T-CAAAATAACAATTAAATACACA--CA-----GAATGCGAGGCACACAACCTGA	-0441
hCgA	5'-	TTCAAA-------TAAATACACATTCAACAACAAGTGTGAA-----GGCACAAAAC-TA	-0501
bCgA	5'-	-----	-0256
		Sp1	
rCgA	5'-	GTTT--CAG-GAGAC----GCCTCACTCAGGTA-GGG-ATCCAAGAGCCTTCTGTGGGAC	-0390
mCgA	5'-	GTTT--CAG-GAGAG----GCCTCGCTCAGGCAAGGGGTTT-AAGAGGCTTCTGTGGGAC	-0389
hCgA	5'-	GCTTGCCAGAGAGAGAGAAGCCTCACTCAG-ACAGGGGATCGA--AGGCCCTCTAGAGC	-0444
bCgA	5'-	-----	-0256
		AP-1	
rCgA	5'-	CCGCTGTATGTTCCAGGGAGTTC TGAAGA CAAGCGTGCCTCCAACCGAGTGAATC---	-0333
mCgA	5'-	CCGCTGGATGTTCCAGGGAGTTC TTAAGA TGGGCGTGCCTCCAGCCAAGTGAATC---	-0332
hCgA	5'-	CTCCTAGATATTGGAGAGAGCCA TGAGTGA CGGGCATGCCTCCAGCCT-GTGAGACCGGG	-0385
bCgA	5'-	-----	-0256
		AP-2	
rCgA	5'-	-----AAGAG-----AAAAGTACGC-TAAGTATAGGAAAATTCAG	-0299
mCgA	5'-	-----AAGAG-----AAAAGTACGC-GAAGTATAGGAAAACCTCAG	-0298
hCgA	5'-	GGAGCATACCCCAGGCAGAGGGCACTTAGGAAAAATACGACGGG-----TC-GT-AG	-0334
bCgA	5'-	-----	-0256
rCgA	5'-	CAGCCTGGAGAGGAACCC--TAAACAGGGAAGGATGTGAGGCTCAGAGACAGGAG-GAC	-0242
mCgA	5'-	CAGTCTGGAGAGG-----TAAATAGGGGAGGAATCCGAGGCTCAGAGACAGGAGTGAC	-0245
hCgA	5'-	C-G-CTGCCAGGGACCTCAGTACACA-TGGAAGAAGGCAAGGTCCAGAGATCCGAGTGAC	-0277
bCgA	5'-	-----	-0256
rCgA	5'-	TTGCCAAGGACACACAGCAAA-TTGA-----CAGGTGGAAG-----	-0206
mCgA	5'-	TTGCCACGGACGCACAGCAA-GTTG-----CAGGTGGAAG-----	-0210
hCgA	5'-	TTGCCAAGGACACAAGGCAAA-T-----C-GGTGGAATCGTCGAGGGGTGGAGGAT	-0227
bCgA	5'-	----CCGT---C-----G-AAAGTTGGACGATCAGCT-GAG-----	-0229
		Egr-1/Sp1	
rCgA	5'-	-----TTCAGCTGTGCCACCTTCTG-AAGCCGTGTATCCTTC--ACAG	-0166
mCgA	5'-	-----TTTCAGCTGTGCCACCTTCTG-AAGCCGGTACCCTTT--ACAG	-0169
hCgA	5'-	CAGCCACAGCCCCCGCC TCCAC--GCCACCTCTGGAAACAGATACCCGTCTG--C-G	-0172
bCgA	5'-	-----TCCTCTGTGCCACCT-CCTGAAG-----TC--ACAG	-0201
rCgA	5'-	-----CCACCAATAGAA--GCA	-0150
mCgA	5'-	-----CCACCAGATACAA--GC-	-0154
hCgA	5'-	G-----CCAAGA-----CCCACCAGCTCCAA--GC-	-0149
bCgA	5'-	GTCCGCCTGGCTGCCTCACCAAGAACTGTGTGCTATGGGGGCCACCCGC---AACAG--	-0146
rCgA	5'-	GGATG-GAGGCAGCTCACCGTGAAGCTG-----GAGG-TA-GGGGGCG-----	-0110
mCgA	5'-	GGGATAGAGACAGCTGATGGAGAAGCTG-----GAGG-T-GGGGGCG-----	-0113
hCgA	5'-	GGCGGAG-GCCAGAGGTAGCGAGGGGTGAGGTTAGAGG-T--GGGGCG-----AGCGGG	-0098
bCgA	5'-	GGA-----C---GGGGG-TAAG-TGGGGG--GAGGCTGGGGGGCGGGCGAGCTGC	-0100

		AP-2		Egr-1	Sp1		CRE									
rCgA	5'-	----GGACCCC	G-AAGG	--TGGGGAAAG	GGCGCA	-GGGGGCGG	-T-CCTA	TGACGTAA -0062								
mCgA	5'-	----GGACCCC	G-AAGG	--TGGGGAAAG	GGCGCGGGGGGGCGG	-T-CCTA	TGACGTAA -0064									
hCgA	5'-	GA	CTGGACCCCTG	--GGGAG	TGGGGAAAG	GGGA-A	--GGGGGCGGTACCG-C	TGACGTCA -0044								
bCgA	5'-	TGCT	GGACCCCCG	AGGGA	-TGGGGAAAG	GGGT-A	--GGGGGCGGT	-CCGA	TGACGTCA -0046							
		STAT3					TATA									
rCgA	5'-	TTTCC	----T	--GGTGTGTG	----CGTGTGCGTGCCTGTG	-----	TATAA	AAGAGGG -0019								
mCgA	5'-	TTTCC	----T	--GGTGTGTG	CGCGCGTGTGCGTGTG	CGTGTG	TATAA	AAGCCGG -0011								
hCgA	5'-	TTTCC	GGGGTC	-GGGG	-----	-----	TATATAA	--GCGGGG -0016								
bCgA	5'-	TTTCC	GGGGTCCGGG	-----	-----	-----	TATATAA	--GCGGGT -0017								
		Egr-1/Sp1														
rCgA	5'-	CATAGC	-ATTGCT	TCGGG	-GCTGCTGCT	ACCGCC	ACCACCAT	CACCGCC	ACTGCCAC	--- +0037						
mCgA	5'-	CATAGC	-ATT	-----	GCTGCTGCT	TGCCGCC	CCACCC	CCACCAT	CACCGCT	GTTAC +0040						
hCgA	5'-	C	---GCGA	-----	GGGGCTGCTGCT	TGCC	ACCCTC	CTGCCAC	-TGCA	TGCTCGAGC +0035						
bCgA	5'-	C	---GCGA	--GCAT	GCCCCACT	GTGCA	GTGCC	GAGCTC	-----	AGTGC	----- +0024					
		AP-2					Egr-1									
rCgA	5'-	-----	-----	-----	-----	-----	-----	C +0038								
mCgA	5'-	-----	-----	-----	-----	-----	-----	C +0041								
hCgA	5'-	CCCGT	CAGGGG	AGCTT	GCGGGAG	GATCG	ACCACAG	ACGGACGC	ACGCC	GAGGCAC	TGC +0095					
bCgA	5'-	-----	-----	-----	GGAGGG	CGGAT	TCGAC	AGACAG	ACGAC	CACCG	GAGACCT	TGC +0064				
		AP-1					AP-2									
rCgA	5'-	ACC	ACCGCT	ACCGCA	-----	GTGCT	CCCCACT	-----	GGTGC	AGAGCT	----- +0077					
mCgA	5'-	ACC	ACCGCT	ACTGCA	-----	GTG	TCCCCGCT	-----	GGTGC	AGAGCT	TTTGGT +0083					
hCgA	5'-	GCC	CCAGCCC	CGCGCC	-----	GGT	GCCACCGC	AGCCCC	GAC	CCCC	GCCGC	----- +0140				
bCgA	5'-	ACC	ACCA	AACCC	CAT	CCCC	CGCTG	GTGTC	CGCC	AGCTT	GCCTGG	AGC	-GA	----- +0115		
		Sp1		AP-2			RREB-1									
rCgA	5'-	---	CCAGT	GGT	CACAG	ACCCACT	TCCGCC	ATCCT	CCTGC	AGCAG	CTCG	CCCT	-----	CT +0128		
mCgA	5'-	AGCC	CAGACTA	---	CAG	ACCCACT	CCCGCC	ATCCT	CCTGC	AGCAG	CTCG	TCCA	-----	CT +0134		
hCgA	5'-	---	CAGTC	-----	CAG	CCGCCCT	CGCCCG	-GTGCCT	AG	-GTG	CCCGG	CCCC	ACACCC	CGCC +0190		
bCgA	5'-	--	GAGTC	-----	CAG	CCGCCCT	CGCCCG	AGCGCG	CCGT	GGCC	CGCC	CCCC	AGACC	ACC +0168		
		MET														
rCgA	5'-	CTT	TCCG	CACCGT	TCC	-GG	-CTCGT	ATG	CGCT	TCC	CGCG	GCTT	TGGC	GCTT	TCTGCT	TGTG +0186
mCgA	5'-	CTT	TCCG	CACCGT	TCC	-GG	-CTCGT	ATG	CGCT	TCC	ACCG	GGT	TCTG	CGCTT	TCTGCT	TGTG +0192
hCgA	5'-	AGCT	GCT	CGGCG	CCGGG	-TCC	GC	ATG	CGCT	TCC	CGCG	TGCT	TGGC	TCTT	TCTGCT	TGTG +0249
bCgA	5'-	AGCT	GCT	CGGCG	CCCGG	CT	TCGC	ATG	CGCT	TCC	CGCG	GGT	TCTG	CGCTT	TCTGCT	TGTG +0228
rCgA	5'-	CGCC	GGGCAAG													+0197
mCgA	5'-	CGCC	GGGCAAG													+0203
hCgA	5'-	CGCC	GGGCAAG													+0260
bCgA	5'-	CGCC	GGGCAAG													+0239

Abbildung 6: Vergleichende Darstellung der 5'-flankierenden DNA-Sequenzen des humanen (hCgA), murinen (mCgA), Ratten- (rCgA) und bovinen (bCgA) Chromogranin A Gens. Fehlende Nukleotide sind mit Strichen markiert. In allen Spezies identische Nukleotide sind blau gekennzeichnet, bei Identität in drei Spezies rot. Identische Nukleotide in zwei Spezies sind grün und nicht identische schwarz gekennzeichnet. Konservierte putative DNA-Bindungsmotive in zwei oder mehr aufgezeigten Spezies sind gelb unterlegt. Nichtkonservierte DNA-Bindungsmotive im hCgA sind grau markiert. Rechtsseitig ist die Nukleotidposition in Relation zur Transkriptionsstartseite angegeben. Met: Methionin (ATG) kennzeichnet den Translationsstart. AP-1 oder -2: Activator protein 1 oder 2; CRE: cAMP-response element; EGR-1: Early growth response gene 1; GRE: Glucocorticoid response element; IRF: Interferon regulatory factor; OCT-1: Octamer factor 1; PPAR/RXR: Peroxisome proliferator-activated receptors/retinoic x receptor; RREB-1: Ras-responsive element binding protein-1; Sp1: Stimulating protein 1; SRF: Serum response factor; STAT3: Signal transducer and activator of transcription 3; TATA: TATA-Box; USF: upstream stimulating factor.

3.2 Der humane Chromogranin A Promotor ist in neuroendokrinen Pankreastumorzellen transkriptionell aktiv und wird zelltypspezifisch exprimiert

3.2.1. Herstellung von humanen Chromogranin A Reportergenkonstrukten

Zur Untersuchung, ob der humane Chromogranin A (hCgA) Promotor in den humanen neuroendokrinen Pankreastumorzellen BON-1 transkriptionell aktiv ist und zellspezifisch reguliert wird, wurde ein hCgA Reportergenkonstrukt hergestellt. Dazu wurden 2203 bp der 5'-flankierenden DNA des hCgA Gens in den promotor- und enhancerlosen pGL2-Basic Reportervektor vor das Luciferasegen kloniert (siehe 3.1.1. und 2.4.), um die hCgA Promotoraktivität anhand der Expression des Luciferasegens zu bestimmen. Das Konstrukt enthielt hCgA DNA Sequenzen von Nukleotid -2203 kb bis +32 bp relativ zur Transkriptionsstartseite und wurde als hCgALuc -2203/+32 bezeichnet.

3.2.2. Transkriptionelle Aktivität und zellspezifische Expression des humanen Chromogranin A Promotors in den neuroendokrinen Pankreastumorzellen BON-1

Um zu analysieren, ob die 2,2 kb hCgA-Promotorsequenz in neuroendokrinen Pankreastumorzellen transkriptionell aktiv ist und darüber hinaus zellspezifische Expression vermitteln kann, wurde das Reportergenkonstrukt hCgALuc -2203/+32 in die neuroendokrine Pankreastumorzelllinie BON-1 sowie unterschiedliche humane Tumorzelllinien und eine Fibroblastenzelllinie transient transfiziert. Nach Inkubation der Zellen über 24 Stunden wurde die Luciferaseaktivität als Ausdruck der Promotoraktivität in relativen Lichteinheiten (RLU) gemessen. Die Kotransfektion von 0.5 µg pSV-β-Galaktosidasevektor diente der Standardisierung der Transfektionseffizienz. Die erhaltenen Werte wurden in Relation zu pGL2-Control gesetzt. Die Ergebnisse sind in Abbildung 7 dargestellt.

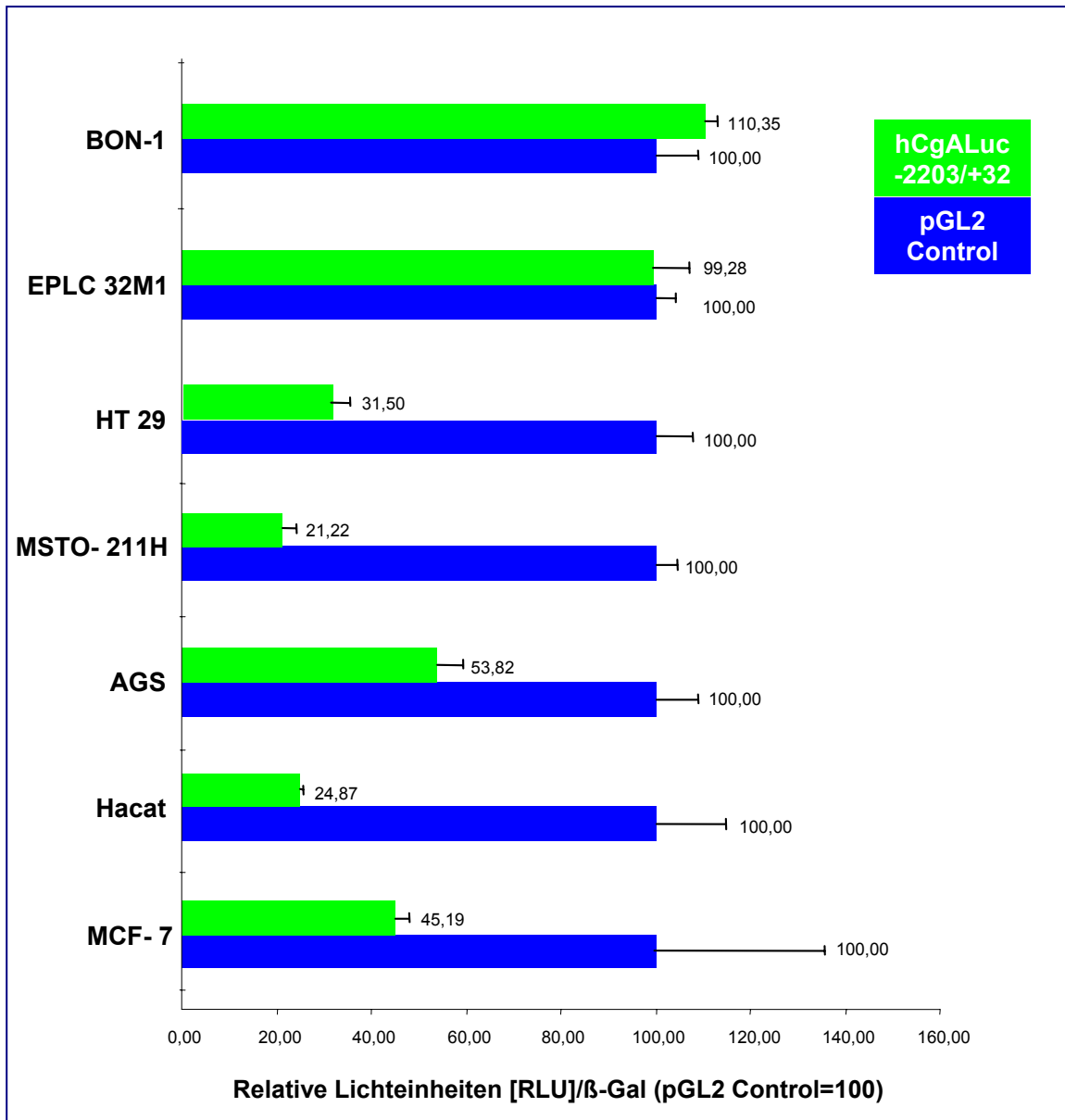


Abbildung 7: Zellspezifische Expression des hCgA-Promotors. Verschiedene Zelllinien wurden transient kotransfiziert mit dem hCgALuc -2203/+32-Reportergenkonstrukt (1,5 µg) und dem pSV-β-Galaktosidasevektor (0,5 µg) als interne Transfektionskontrolle. Die Ergebnisse der Luciferaseaktivität sind Ausdruck der Promotoraktivität des entsprechenden hCgA-Reportergenkonstruktes und werden in Bezug auf die Expression von pGL2-Control als Referenzvektor (100%) angegeben. Die Ergebnisse stellen den Mittelwert ± SEM aus drei Transfektionen dar. MCF-7: Mammakarzinomzellen; EPLC 32M1: Lungenkarzinom; MSTO-211H: Lungenfibroblasten; AGS: Magenkarzinomzellen; BON-1: humane neuroendokrine Pankreastumorzellen; Hacat: Keratinozytenzelllinie; HT 29: Kolonkarzinomzelllinie.

Während die Expression in den Zelllinien MCF-7 (Mammakarzinom), MSTO-211H (Lungenfibroblasten), AGS (Magenkarzinom), Hacat (Keratinozyten) und HT 29 (Kolonkarzinom) gering war, zeigte die 5'-flankierende hCgA DNA eine deutlich stärkere transkriptionelle Aktivität sowohl in den neuroendokrinen Pankreastumorzellen BON-1 als auch in der Lungentumorzelllinie EPLC 32M1.

Die Ergebnisse zeigen, dass die 2,2 kb umfassende 5'-flankierende DNA des hCgA Gens transkriptionell aktiv ist und zellspezifische Expression in den neuroendokrinen Pankreastumorzellen BON-1 als auch in Lungentumorzellen vermittelt.

3.3. Lokalisation *cis*-regulatorischer Elemente des Chromogranin A Promotors anhand von Deletionsanalysen

3.3.1. Herstellung von humanen Chromogranin A 5'- und 3'-Deletions-Reportergenkonstrukten

Um die *cis*-regulatorischen DNA-Sequenzelemente, die für die basale Transkription des hCgA in den neuroendokrinen Pankreastumorzellen BON-1 (siehe 3.2.2.) verantwortlich sind, näher einzugrenzen, wurden 5'- und 3'-Deletionskonstrukte hergestellt. Hierzu wurden via PCR insgesamt 19 verschiedene DNA-Fragmente amplifiziert. Die Fragmente umfassten je zehn 5'-Deletionsmutanten mit einem 3'-Ende bei +32 bp, sowie neun mit einem 3'-Ende bei +198 bp in Relation zum Transkriptionsstartpunkt. Die 5'-Oligonukleotide wurden so gewählt, dass sie am 5'-Ende eine zusätzliche Schnittstelle für *EcoRV* enthielten. Nach *EcoRV*-Verdau entstanden glatte Enden. Die 3'-Deletionsmutanten unterschieden sich in der Länge der eingeschlossenen nichttranslatierten Exon I Sequenz oberhalb der Transkriptionsinitiationsseite. Dabei reichten die +198-Reportergenkonstrukte bis kurz vor die Transkriptionsinitiationsseite bei Nukleotid +216. Die 3'-Oligonukleotide enthielten zur Herstellung der +32-Konstrukte eine *XhoI*-Schnittstelle und der +198-Konstrukte eine *SallI*-Schnittstelle. Die Ligation der PCR-Fragmente (siehe 3.1.3) und des pGL2-Basic-Vektors (3.1.2.) erfolgte am 5'-Seite an den glatten Enden nach *SmaI*- und *EcoRV*-Verdau, am 3'-Ende an den überhängenden Enden nach *XhoI*- und *SallI*-Verdau. Auf diese Weise wurde die korrekte Ligation der verschiedenen hCgA-PCR-Fragmente in 5'-3'-Richtung in den Vektor pGL2-Basic gewährleistet. Zur Kontrolle wurden bei allen Konstrukten nach der

Klonierung des Insert und der Vektor/Insert-Übergang sequenziert. Darüber hinaus wurde neben der Wildtyp-Sequenz von hCgALuc -572/+32 auch eine Mutante hCgALuc -572mut/+32 hergestellt mit der Fragestellung, ob die putative AP-1 (Aktivatorprotein 1)-Bindungsstelle auch in neuroendokrinen Pankreastumorzellen BON-1 transkriptionell relevant ist. Die Mutation in der AP1-Bindungsstelle ist im Vergleich zur Wildtypsequenz in Abbildung 8 dargestellt [Nolan et al, 1995]. Abbildung 9 zeigt eine schematische Übersicht der hergestellten hCgA-Reportergenkonstrukte.

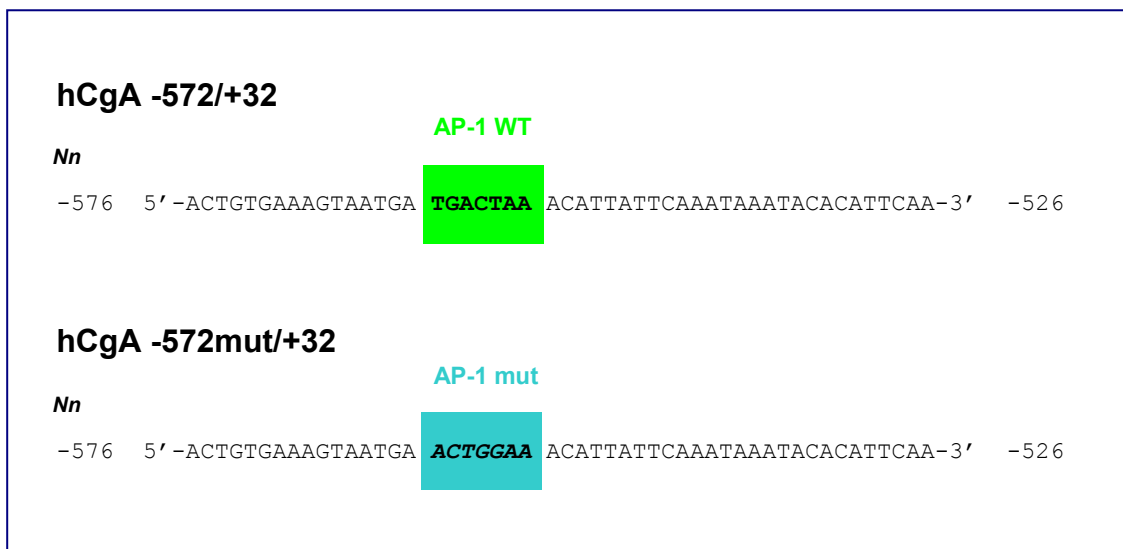


Abbildung 8: Darstellung des Wildtyp hCgA Reportergenkonstruktes -572/+32 und der Mutante hCgA -572mut/+32. Die Wildtypsequenz der putativen AP1 (Aktivatorprotein 1)-Erkennungssequenz ist grün (AP-1 WT), die mutierte DNA-Bindungssequenz blau (AP-1 mut) unterlegt.

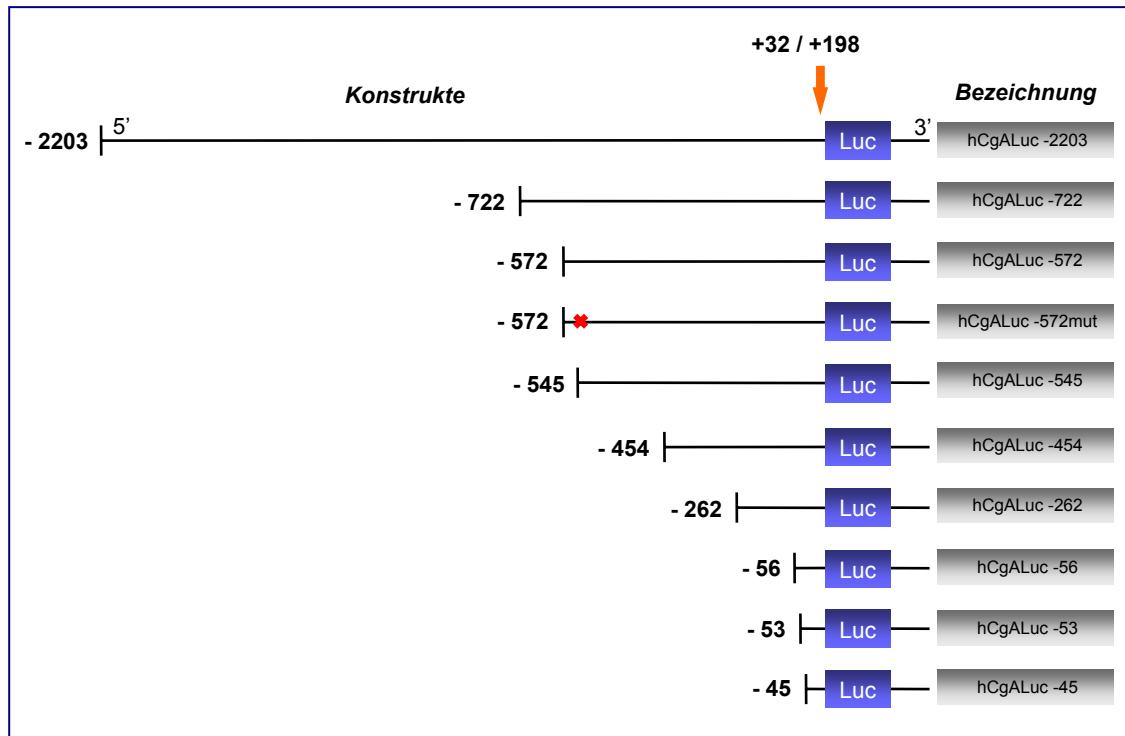


Abbildung 9: Schematische Darstellung von 5'- und 3'-Deletionsmutanten der 5'-flankierenden DNA des hCgA Gens. Die genaue Nukleotidposition des 5' terminalen Endes ist für alle Reporter-genkonstrukte angegeben. Der Pfeil +32/+198 markiert die unterschiedlichen Positionen der 3'-Enden der Deletionskonstrukte, entweder bei +32 oder +198 ausgehend vom Transkriptionsstart. **x**: AP1-Mutation. Luc: Luciferasegen.

3.3.2. Lokalisation *cis*-regulatorischer Elemente im CgA Promotor anhand von 5'- und 3'-Deletionsmutanten in neuroendokrinen Pankreastumorzellen BON-1

Zur Identifizierung *cis*-regulatorischer Elemente des hCgA Promotors in den neuroendokrinen Pankreastumorzellen BON-1 wurden die unter 3.3.1 hergestellten progressiven 5'-Deletionsmutanten/Luciferase-Reporterplasmide hCgALuc -2203/+32, hCgALuc -722/+32, hCgALuc -572/+32, hCgALuc -572mut/+32, hCgALuc -545/+32, hCgALuc -454/+32, hCgALuc -262/+32, hCgALuc -56/+32, hCgALuc -53/+32, hCgALuc -45/+32 sowie die hCgALuc -2203/+198, hCgALuc -722/+198, hCgALuc -572/+198, hCgALuc -545/+198, hCgALuc -454/+198, hCgALuc -262/+198, hCgALuc -56/+198, hCgALuc -53/+198, hCgALuc -45/+198 transient in BON-1-Zellen transfiziert und die Luciferaseaktivität als Maß der Promotoraktivität bestimmt. Hierzu wurden

jeweils 1.5 µg des jeweiligen Reportergenkonstruktes und 0.5 µg pSV-β-Galaktosidasevektor als interne Kontrolle zur Transfektionseffizienz transfiziert und nach 24h die Luciferase- und β-Galaktosidaseaktivität gemessen. Das promotor- und enhancerlose Plasmid pGL2-Basic diente als Negativkontrolle, pGL2-Control zur Bestimmung der Transfektionseffizienz. Sowohl die +32/5'-Deletionskonstrukte als auch die +198/5'-Deletionskonstrukte waren in BON-1 Zellen transkriptionell aktiv (Abbildung 10 und 11). Mit Ausnahme der Deletion zwischen Nt -53 und Nt -45 führten jedoch die progressiven 5'-Deletionen nie zu Veränderungen der transkriptionellen Aktivität die das 2- bis 3-fache überstiegen. Deletion zwischen Nt -2303 und Nt -722 in den Konstrukten hCgALuc -2203/+198 und hCgALuc -722/+198 führte zu einer leichten Steigerung der Transkriptionsaktivität, was auf insgesamt inhibitorisch wirkende *cis*-regulatorische Elemente in dieser DNA Sequenz schließen ließ. Die weitere Deletion von Nt -722 bis Nt -572 bp im Konstrukt hCgALuc -572/+198 führte hingegen zu einer etwa 2.5-fachen Verringerung der basalen Aktivität als Hinweis auf aktivierende *cis*-regulatorische Elemente in diesem Bereich. Die weiteren Deletionen von Nt -572 bis Nt -545, Nt -545 bis Nt -454, Nt -454 bis Nt -262 und Nt -262 bis -56 führten nur zu geringen nichtsignifikanten Veränderungen der Promotoraktivität in BON-1 Zellen. Im Gegensatz dazu zeigte die Deletion von Nt -53 nach Nt -45 eine signifikante Reduktion der Promotoraktivität um das 24-fache auf das Niveau des pGL2-Basic-Konstruktes. Die vergleichende Sequenzanalyse der Deletions-Reportergenkonstrukte hCgALuc -53/+198 und hCgALuc -45/+198 ist in Abbildung 12 dargestellt. Durch Deletion von 8 Basenpaaren zwischen Nukleotid -53 und -45 wurde das CRE (cAMP response Element) im proximalen hCgA Promotor bei erhaltener TATA-Box deletiert. Das weist darauf hin, dass dem CRE zwischen Nt -51 und Nt -43 eine entscheidende *cis*-regulatorische aktivierende Funktion in der Regulation des hCgA in BON-1 Zellen zukommt, da seine Deletion zum Verlust der transkriptionellen Aktivität in BON-1 Zellen führt.

Die Luciferaseaktivitäten der +198-hCgA-Reportergenkonstrukte und der +32-hCgA-Reportergenkonstrukte unterschieden sich im interindividuellen Vergleich nicht wesentlich, wobei jedoch die Unterschiede der transkriptionellen Aktivitäten nach den progressiven 5'-Deletionen in den +32-hCgA-Reportergenkonstrukte insgesamt geringer waren. Das weist darauf hin, dass der Einschluss von nichttranslatierten Exons I Sequenzen zu erhöhter Reportergenaktivität in BON-1 Zellen führt. Da beide 3'-Deletionsmutanten in den hCgALuc -45/+32 und hCgALuc -45/+198 in BON-I Zellen

praktisch inaktiv waren, wies daraufhin, dass die 3'-liegenden *cis*-regulatorischen Sequenzen nicht unabhängig von den 5'-liegenden *cis*-aktivierenden Elementen die Promotoraktivität beeinflussen.

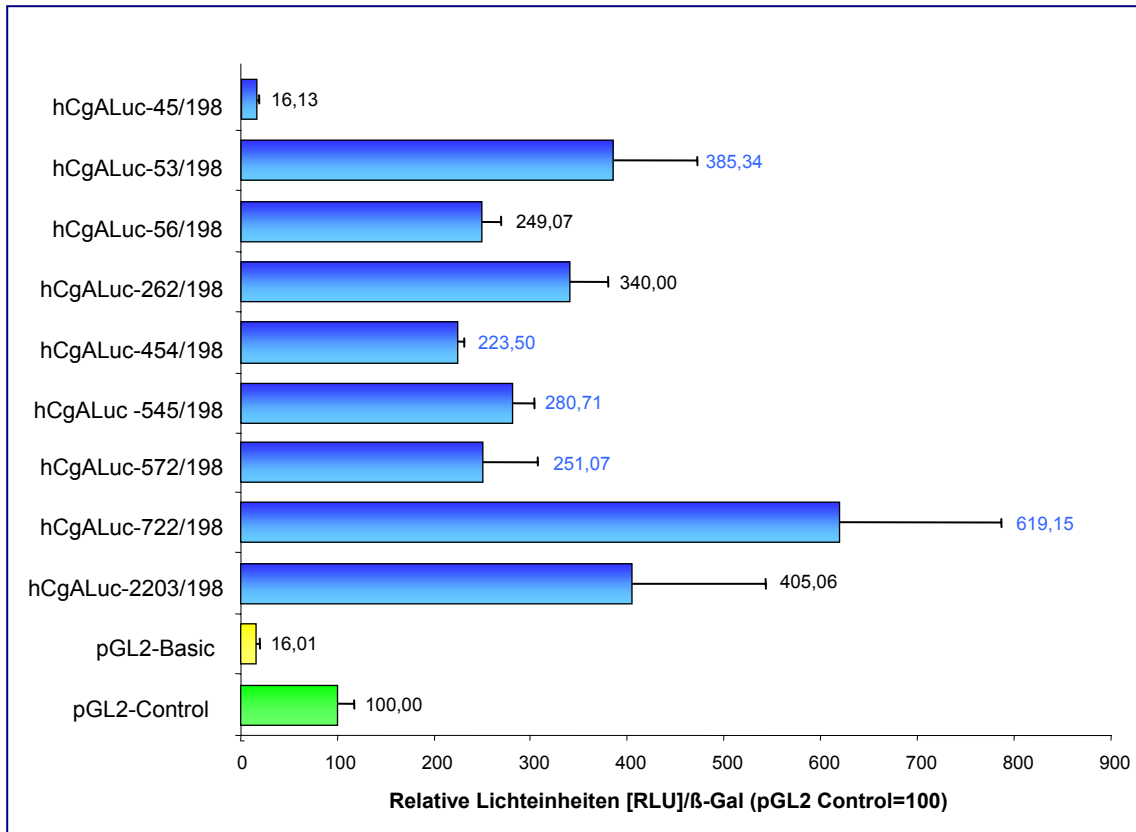


Abbildung 10: Transkriptionelle Aktivität von progressiven Chromogranin A 5'-Deletionsmutanten mit einem bis Nukleotid +198 reichendem 3'-Ende in humanen neuroendokrinen Pankreastumorzellen BON-1. Die Luciferaseaktivität wurde auf die β -Galaktosidase-Expression als interne Kontrolle normalisiert und in relativen Lichteinheiten angegeben. Die Ergebnisse der Luciferaseaktivität sind Ausdruck der Promotoraktivität des entsprechenden hCgA-Reportergenkonstrukts und werden in Bezug auf die Expression von pGL2-Control als Referenzvektor (100%) angegeben. Die Ergebnisse stellen den Mittelwert \pm SEM aus drei Transfektionen dar. Farbige Ziffern (rot, blau) deuten auf ein signifikantes Ergebnis (T-Test) im Vergleich zur nächst kürzeren Deletionsmutante hin (rot: $p < 0.001$, blau: $p < 0.05$).

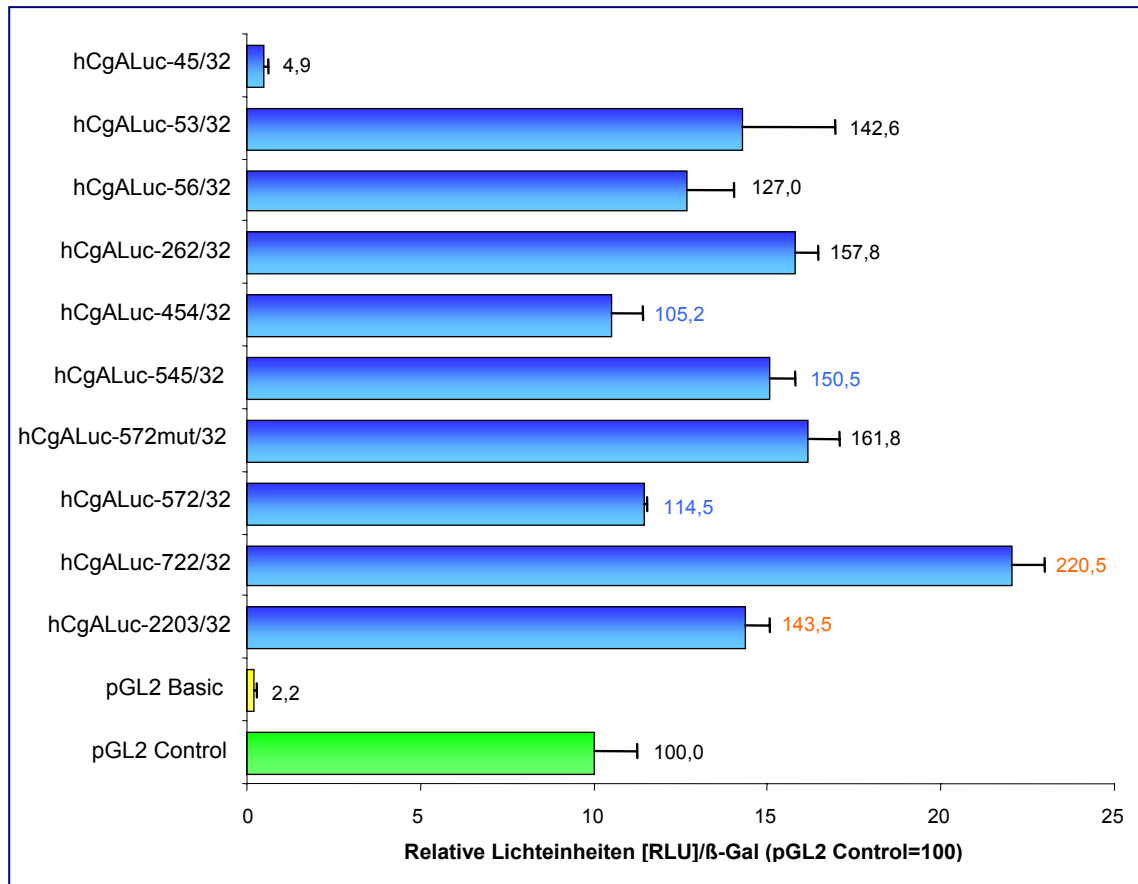


Abbildung 11: Transkriptionelle Aktivität von progressiven Chromogranin A 5'-Deletionsmutanten mit einem bis Nukleotid +32 reichendem 3'-Ende in humanen neuroendokrinen Pankreastumorzellen BON-1. Die Luciferaseaktivität wurde auf die β -Galaktosidase-Expression als interne Kontrolle normalisiert und in relativen Lichteinheiten angegeben. Die Ergebnisse der Luciferaseaktivität sind Ausdruck der Promotoraktivität des entsprechenden hCgA-Reportergenkonstrukts und werden in Bezug auf die Expression von pGL2-Control als Referenzvektor (100%) angegeben. Die Ergebnisse stellen den Mittelwert \pm SEM aus drei Transfektionen dar. Farbige Ziffern (rot, blau) deuten auf ein signifikantes Ergebnis im Vergleich zur nächst kürzeren Deletionsmutante hin (rot: $p < 0.001$, blau: $p < 0.05$, T-Test).



Abbildung 12. Vergleichende Darstellung des CRE (cAMP-response Elementes) in den Reportergenkonstrukten hCgALuc -53/+32 und hCgALuc -45/+32 des proximalen hCgA Promotors. Durch Deletion zwischen -53 bp und -45 bp wird das CRE-Element (grün unterlegt) im hCgALuc -45/+32 Konstrukt zerstört. TATA: TATA-Box, blau unterlegt. Nn: Nukleotide.

Zusammenfassend geben die Ergebnisse Hinweise darauf, dass der distale hCgA Promotor positive und negative *cis*-regulatorische DNA-Domänen enthält und dass der proximale Promotor von -53 bp oberhalb der Transkriptionsstartseite für die Expression in neuroendokrinen Pankreastumorzellen BON-1 ausreichend und essentiell für die basale Promotoraktivität ist. Dabei scheinen die im nichttranslatierten Exon I liegenden putativ regulatorischen Sequenzen (Abbildung 5) mit den weiter 5'-liegenden *cis*-aktivierenden Sequenzen bei der Regulation der hCgA Promotoraktivität in BON-1 Zellen zu kooperieren.

3.3.3. Identifikation *cis*-regulatorischer Elemente im hCgA Promotor, die zellspezifische Expression vermitteln

Zur Identifikation *cis*-regulatorischer Elemente im hCgA-Promotor, die zellspezifische Expression in der humanen neuroendokrinen Pankreastumorzelllinie BON-1 vermitteln, wurden die hCgALuc 5'-Deletionsmutanten mit dem 3'-Ende +32 (Abbildung 9) sowohl in die neuroendokrine Pankreastumorzelllinie BON-1 als auch zum Vergleich in die nichtneuroendokrine Mesotheliomzelllinie MSTO-211H transient transfiziert. Die Luciferasewerte wurden durch Kotransfektion von pSV- β -Galaktosidasevektor normalisiert. Die 5'-Deletionskonstrukte waren in den MSTO-211H-Zellen aktiv,

allerdings war die transkriptionelle Aktivität mit Ausnahme der 5'-Deletionsmutante hCgALuc -45/+32 in den nichtneuroendokrinen MSTO-211H-Zellen (Abbildung 13) deutlich geringer als in den neuroendokrinen BON-1 Zellen, was die Ergebnisse aus dem Versuch unter 3.2.2 bestätigte. Deletion von 8 Basenpaaren im CRE (hCgALuc -45/+32) zeigte eine signifikante Abnahme der hCgA Transkription in beiden Zelllinien BON-1 und MSTO-211H, die nur noch etwa doppelt so hoch war im Vergleich zu dem promotor- und enhancerlosen pGL2-Basic Vektor. Nach Transfektion des hCgALuc -53/+32 Konstruktes mit einem intakten CRE (zyklisches AMP response Element) war die transkriptionelle Aktivität in den neuroendokrinen BON-1 Zellen jedoch um fast das 30-fache ($p < 0.001$) erhöht, im Gegensatz dazu in den nichtneuroendokrinen MSTO-211H-Zellen um das 5-fache ($p < 0.001$). Die Ergebnisse weisen darauf hin, dass die transkriptionelle Aktivität des CRE, das möglicherweise mit CREB interagiert und das im hCgALuc -45/+32 Konstrukt durch die 8-Basenpaardeletion zerstört ist, in beiden Zelllinien für die basale Transkription nicht nur zellspezifisch notwendig ist. Das CRE stellt somit in den neuroendokrinen Pankreastumorzellen und nichtneuroendokrinen MSTO-211H-Zellen ein positives *cis*-regulatorisches Element dar. Da aber in den neuroendokrinen BON-1 Zellen durch das intakte CRE zwischen Nukleotid -51 und -43 die Transkription deutlich stärker (29-fach) aktiviert wurde, scheint das CRE, auch neuroendokrin-spezifische Expression in den BON-1 Zellen zu vermitteln. Die Deletion von Nukleotid -262 bis -56 bp ($p < 0.001$) und Nukleotid -546 bis -451 bp ($p < 0.05$) zeigte in MSTO-211H-Zellen einen 2-fachen Anstieg der Promotoraktivität als Hinweis auf schwach positiv *cis*-regulatorische Elemente im deletierten Sequenzbereich. Die Promotoraktivitäten des Wildtypkonstruktes hCgALuc -572/+32 und der Mutante hCgALuc -572mut/+32 zeigten in der Zelllinie MSTO-211H keinen Aktivitätsunterschied, so dass der putativen AP-1 Bindungsseite in MSTO-211H-Zellen im Gegensatz zu den BON-1 Zellen keine *cis*-regulatorische Bedeutung zukommt.

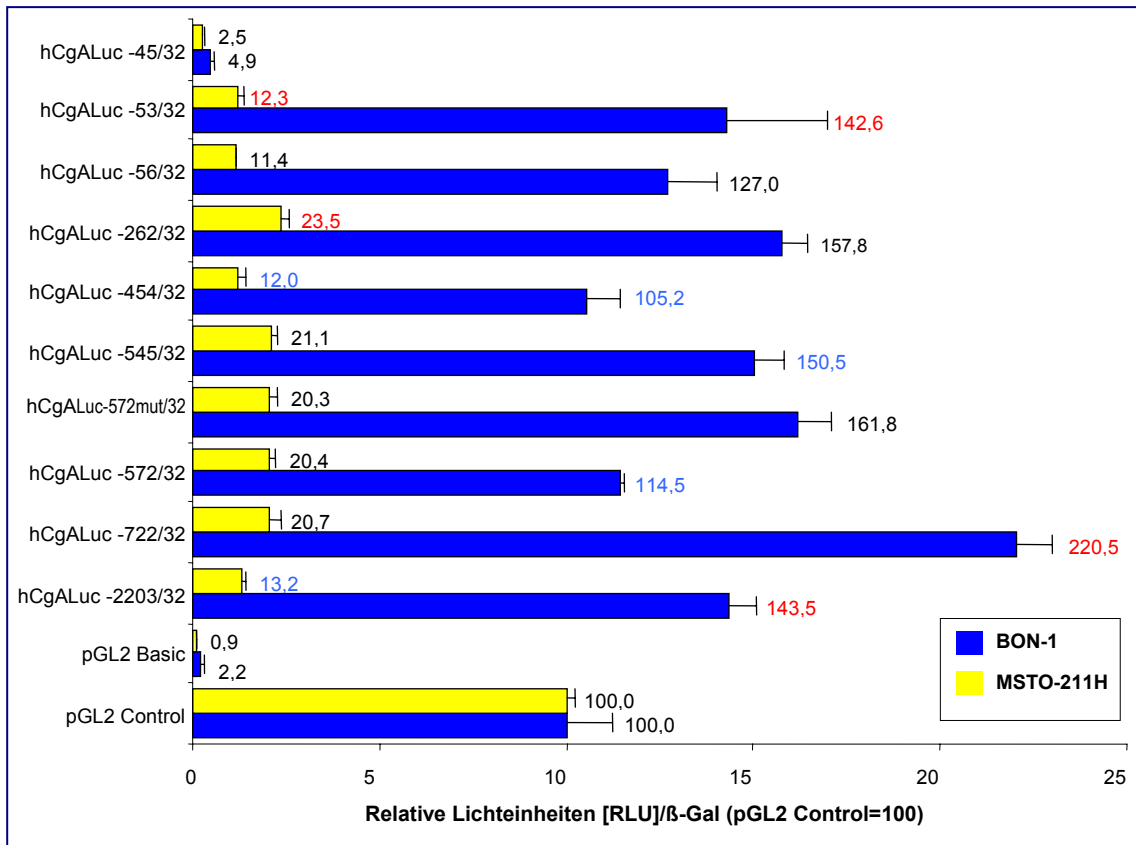


Abbildung 13: Zellspezifische Expression der hCgALuc 5'-Deletionsmutanten in der humanen neuroendokrinen Pankreastumorzelllinie BON-1 und der nichtneuroendokrinen Mesotheliomzelllinie MSTO-211H. BON-1 und MSTO-211H-Zellen wurden mit jeweils 1.5 µg des hCgALuc-Reportergenkonstruktes und 0.5 µg pSV-β-Galaktosidasevektor als interne Transfektionskontrolle transient transfiziert und nach 24h die Luciferase- und β-Galaktosidaseaktivitäten gemessen. Die Ergebnisse der Luciferaseaktivität sind Ausdruck der Promotoraktivität des entsprechenden hCgA-Reportergenkonstrukts und werden in Bezug auf die Expression von pGL2-Control als Referenzvektor (100%) in der jeweiligen Zelllinie angegeben. Die Ergebnisse stellen den Mittelwert ± SEM aus drei Transfektionen dar. Farbige Zahlen deuten auf ein signifikantes Ergebnis im Vergleich zum nächst kürzeren Deletionskonstrukt hin (rot: p<0.001, blau: p<0.05; T-Test).

3.4. Regulation des humanen Chromogranin A Promotors durch zyklisches AMP (cAMP) in den neuroendokrinen Pankreastumorzellen BON-1

Da in den vorausgegangenen Untersuchungen gezeigt werden konnte, dass das cAMP-response Element (CRE) zwischen den Nukleotiden -51 bis -43 im proximalen hCgA-Promotorbereich (siehe 3.3.2. und 3.3.3) in neuroendokrinen Pankreastumorzellen BON-1 für die zellspezifische Transkriptionsaktivität verantwortlich ist, wurde jetzt untersucht, ob cAMP die Promotoraktivität in BON-1-Zellen stimuliert. Hierzu wurde zunächst die transkriptionelle Aktivität des hCgALuc -2203/+32 in BON-1-Zellen ohne und unter Behandlung mit Dibutyryl-cAMP untersucht. Nach transienter Transfektion der Zelllinie BON-1 mit dem hCgALuc -2203/+32 Reportergenkonstrukt und anschließender Stimulation mit aufsteigenden Konzentrationen von Dibutyryl-cAMP von 1 bis 40 mM nahm die Promotoraktivität im Vergleich zur unbehandelten Kontrollgruppe bei 10 mM Dibutyryl-cAMP um das 2.8-fache signifikant zu. Durch Dosissteigerung auf 40 mM Dibutyryl-cAMP zeigte sich keine weitere signifikante Zunahme der Promotoraktivität (Abbildung 14). Die Ergebnisse zeigen, dass der humane CgA Promotor durch cAMP in den neuroendokrinen Pankreastumorzellen BON-1 stimulierbar ist.

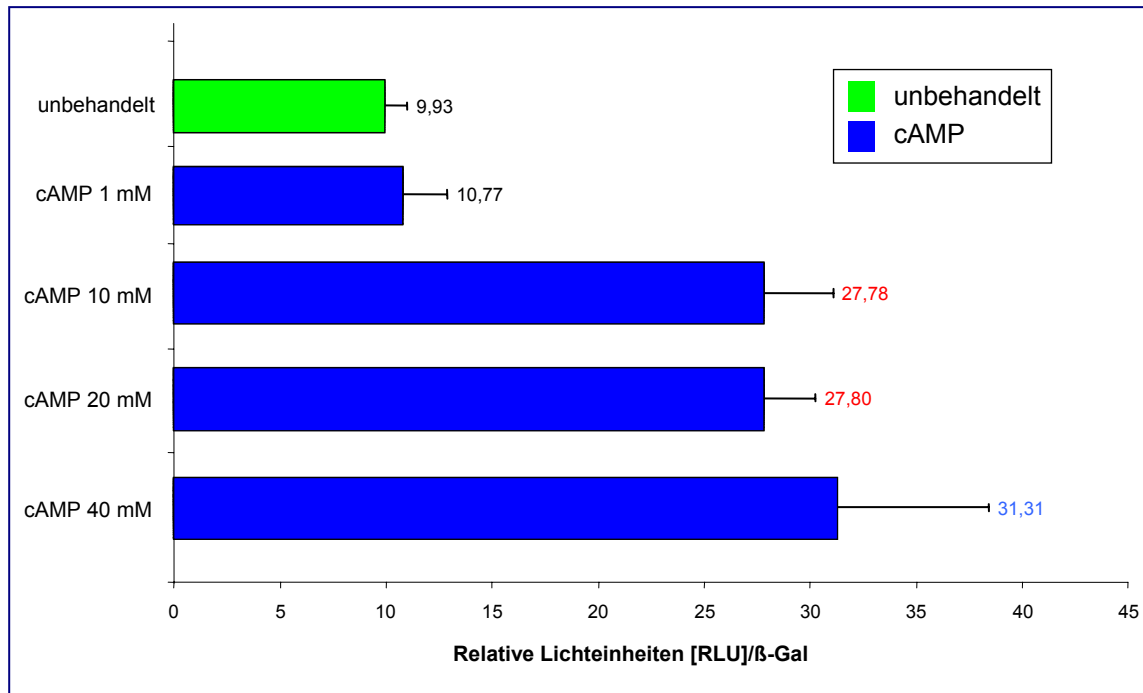


Abbildung 14: Aktivierung der hCgA-Promotoraktivität durch cAMP in neuroendokrinen Pankreastumorzellen BON-1. Nach Kotransfektion mit dem hCgALuc -2203/+32 (1.5 µg) Reportergenkonstrukt und pSV-β-Galaktosidasevektor (0.5 µg) erhielten BON-1 Zellen frisches Medium ohne oder mit ansteigenden Konzentrationen von 1 mM, 10 mM, 20mM und 40 mM Dibutyryl-cAMP für 24h. Die Luciferaseaktivität wurde auf die β-Galaktosidase-Expression als interne Kontrolle normalisiert und in relativen Lichteinheiten angegeben. Die Ergebnisse der Luciferaseaktivität sind Ausdruck der Promotoraktivität des hCgA-Reportergenkonstruktes. Die Ergebnisse stellen den Mittelwert ± SEM aus drei Transfektionen dar. Farbige Zahlen deuten auf ein signifikantes Ergebnis im Vergleich zur unbehandelten Kontrollgruppe hin (blau: $p < 0.05$, rot: $p < 0.001$).

Um nachzuweisen, ob das im proximalen hCgA Promotor lokalisierte CRE die cAMP Stimulation vermittelt, wurden die Reportergenkonstrukte hCgALuc -56/+32 (mit intaktem CRE) und hCgALuc -45/+32 (CRE deletiert) in BON-1 Zellen transfiziert und mit 10 mM Dibutyryl-cAMP über 24h behandelt. Die Promotoraktivität der Deletionsmutante hCgALuc -56/+32 nahm unter Dibutyryl-cAMP Behandlung im Gegensatz zur Deletionsmutante hCgALuc -45/+32 signifikant um das zweifache zu (Abbildung 15). Die Ergebnisse weisen darauf hin, dass das im proximalen

Promotorbereich zwischen Nukleotiden -51 bis -43 bp liegende cAMP response Element CRE als *cis*-regulatorisches Element die Stimulation durch cAMP in der neuroendokrinen Zelllinie BON-1 vermittelt.

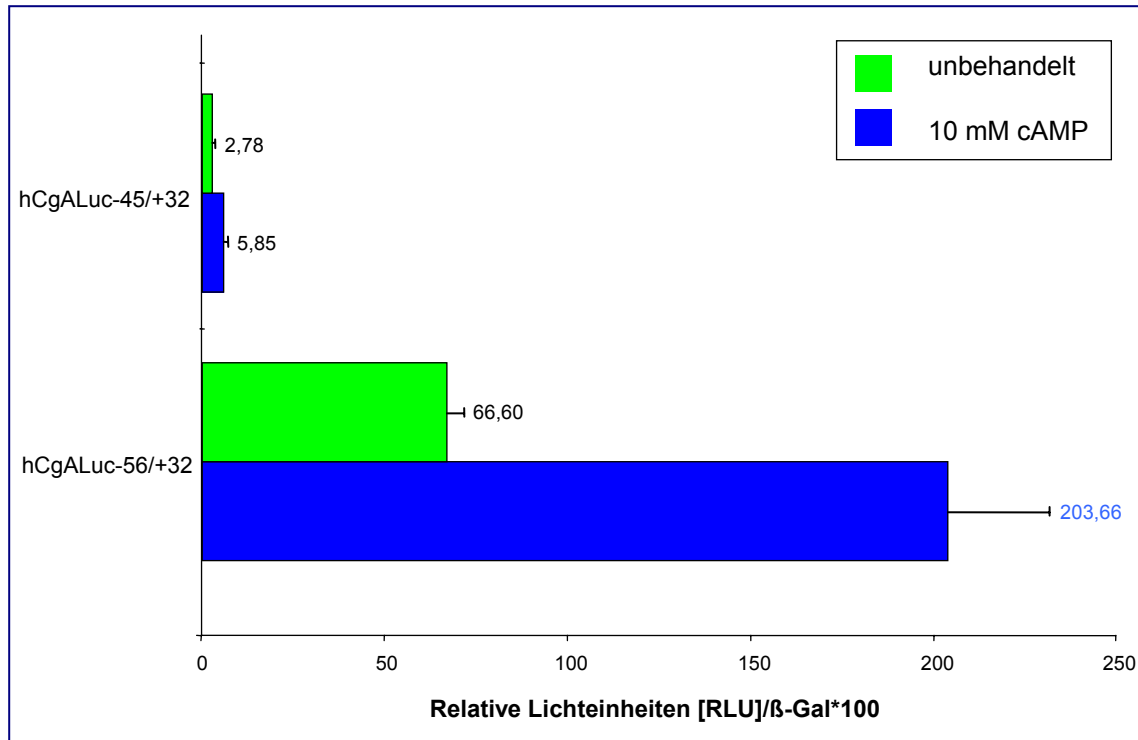


Abbildung 15: Das CRE Element im proximalen hCgA-Promotor vermittelt cAMP-induzierte Stimulation in neuroendokrinen Pankreastumorzellen BON-1. Nach Kotransfektion mit dem hCgALuc -56/+32 oder hCgALuc -45/+32 (1.5 μ g) und pSV- β -Galaktosidasevektor (0.5 μ g) erhielten BON-1-Zellen frisches Medium ohne oder mit 10 mM Dibutyryl-cAMP. Nach 24h wurde die Luciferase- und β -Galaktosidasaktivitat gemessen. Die Luciferaseaktivität wurde auf die β -Galaktosidase-Expression als interne Kontrolle normalisiert und in relativen Lichteinheiten angegeben. Die Ergebnisse der Luciferaseaktivität sind Ausdruck der Promotoraktivität des entsprechenden hCgA-Reportergenkonstruktes. Die Ergebnisse stellen den Mittelwert \pm SEM aus drei Transfektionen dar. Farbige Ziffern beschreiben das Signifikanzniveau im Vergleich zur unbehandelten Kontrollgruppe (blau: $p < 0.05$).

3.5. Gastrin reguliert den humanen Chromogranin A Promotor zellspezifisch

In den neuroendokrinen Zellen des Magens ist die Chromogranin A Genexpression unter strenger Kontrolle der Gastrinserumkonzentration [Simon et al, 1995]. Anhand transgener Tiere konnte *in vivo* nachgewiesen werden, dass 4,8 kb der 5'-flankierenden DNA des mCgA Gens zur zellspezifischen und gastrinvermittelten CgA Regulation ausreichend sind [Höcker et al, 2001]. Weiterhin grenzten *in vitro* Untersuchungen relevante *cis*-regulatorischen Sequenzen ein und konnten zeigen, dass sowohl das CRE (-71 bis -64 bp) als auch ein direkt oberhalb lokalisiertes Sp1/Egr-1-Motiv (-88 bis -62 bp) im proximalen murinen (m)CgA Promotor für die gastrin-vermittelte Promotoraktivierung in Magen-zellen notwendig war [Raychowdhury et al, 2002].

Um zu untersuchen, ob das CRE zusammen mit der oberhalb benachbart lokalisierten Sp1 Bindungsstelle im humanen CgA Promotors auch gastrinabhängige Transkription vermittelt, wurde das hCgALuc-2203/+32 sowie das mCgALuc4,8kb Reporter-genkonstrukt [Höcker et al, 1998] in die neuroendokrinen Pankreastumorzellen BON-1 transfiziert. Nach 24h wurden die Zellen mit Gastrin I in aufsteigender Konzentration für 24h behandelt und die Luciferase- sowie β -Galaktosidaseaktivität bestimmt. Nach Gastrinbehandlung zeigte sich in den BON-1 Zellen im Vergleich zu den unbehandelten Zellen keine signifikante Veränderung der Promotoraktivität weder nach Transfektion des murinen noch des humanen CgA Reporter-genkonstruktes (Abbildung 16). Die Ergebnisse weisen darauf hin, dass weder der murine noch der humane CgA Promotor in den neuroendokrinen Pankreastumorzellen BON-1 durch Gastrin stimulierbar ist.

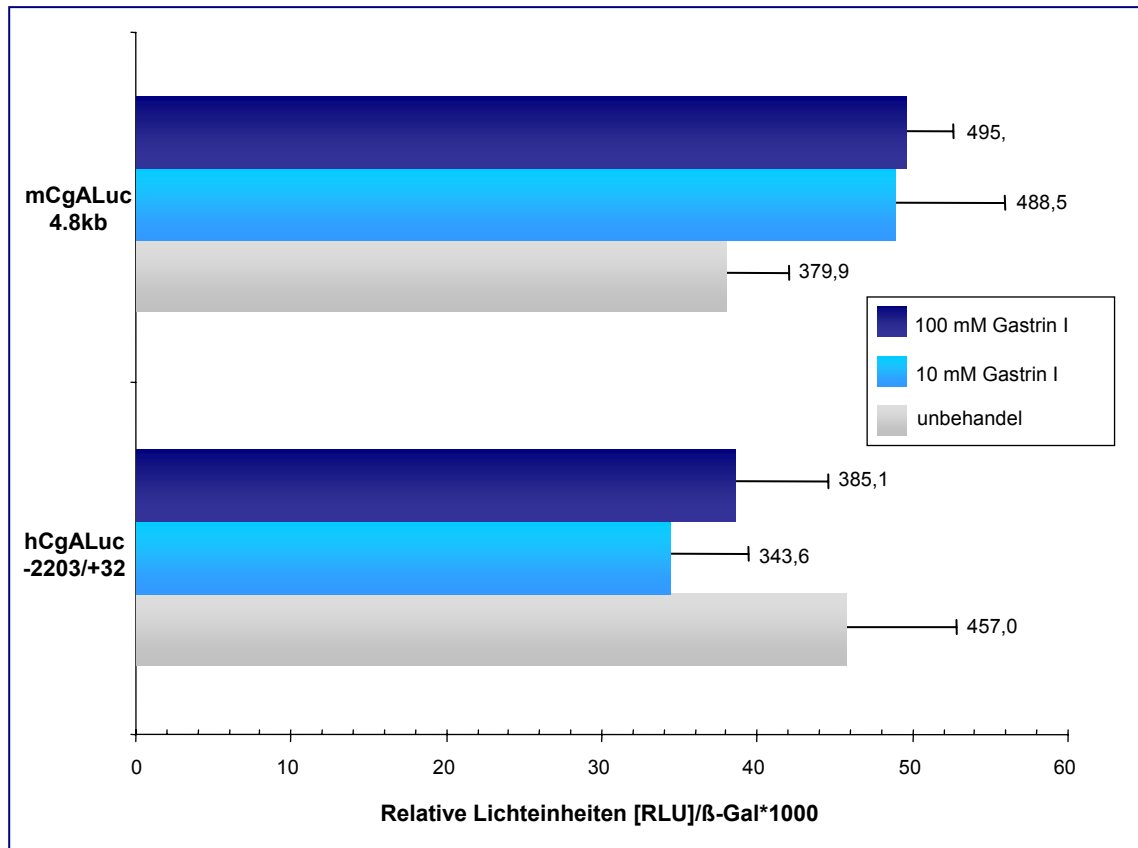


Abbildung 16: Gastrinabhängige mCgA und hCgA Promotoraktivitäten in neuroendokrinen Pankreastumorzellen BON-1. Nach transienter Transfektion der Reporter-genkonstrukte hCgALuc -2203/+32 (1.5 µg) oder mCgALuc 4,8kb (1.5 µg) sowie Kotransfektion mit pSV-β-Galaktosidasevektor (0.5 µg) wurden BON-1 Zellen nach 24h Wachstum ohne FCS mit 10 nM oder 100 nM Gastrin I für 12h behandelt. Die Luciferaseaktivität wurde auf die β-Galaktosidase-Expression als interne Kontrolle normalisiert und in relativen Lichteinheiten angegeben. Die Ergebnisse der Luciferaseaktivität sind Ausdruck der Promotoraktivität des entsprechenden hCgA-Reporter-genkonstruktes. Die Ergebnisse stellen den Mittelwert \pm SEM aus drei Transfektionen dar.

Da weder das humane hCgALuc-2203/+32 noch das murine mCgALuc4,8kb Reporter-genkonstrukt in den neuroendokrinen Pankreastumorzellen stimulierbar war, stellte sich die Frage, ob das humane CgA Reporter-genkonstrukt überhaupt durch Gastrin stimulierbar ist. Daher wurde die Magenkarzinomzelllinie AGS-B, die stabil mit dem CCK-B/Gastrinrezeptor transfiziert ist [Höcker et al, 1998] mit den

Reporterengenkonstrukten hCgALuc -2203/+32 sowie mCgALuc -92/-62 oder mCgALuc -258/+42 transfiziert und nach 24h mit 100 nM Gastrin I für 8h behandelt und die Luciferaseaktivität bestimmt. Das mCgALuc -92/-62 ist ein Minimalkonstrukt in pT81 und umfasst 30 bp des proximalen mCgA Promotors einschließlich der Egr-1/Sp1 Bindungsseite und dem CRE Motiv, wogegen mCgA -258/+42 in pXP1 300 bp des proximalen mCgA Promotors (ebenfalls Egr-1/Sp1 Bindungsseite und CRE) umfasst [Höcker et al, 1998]. Da sich in Vorversuchen gezeigt hatte, dass das unter der Kontrolle des CMV-Promotors stehende pSV- β -Galaktosidasereporterengenkonstrukt durch Gastrin I in AGS-B-Zellen (nicht in BON-1 Zellen) stimulierbar war (Abbildung 17), wurde die Proteinkonzentration als interne Kontrolle zugrunde gelegt. Im Gegensatz zu den BON-1 Zellen stimulierte Gastrin I in den AGS-B Zellen sowohl die beiden murinen 5'-Deletionsmutanten mCgALuc -92/-62 und mCgALuc -258/+42 als auch das humane CgA Reporterengenkonstrukt hCgALuc -2203/+32 (Abbildung 18). Das hCgALuc -2203/+32 zeigte unter 100 nM Gastrinbehandlung einen 6-fachen Anstieg der Promotoraktivität im Vergleich zu den unbehandelten Zellen. Ähnliche Werte wiesen die beiden murinen Reporterengenkonstrukte auf. Das Minimalkonstrukt mCgA -92/-62 zeigte mit Gastrinbehandlung einen 6,2-fachen Anstieg der Transkriptionsaktivität, das mCgA -258/+42 Reporterengenkonstrukt wies einen 6,4-fachen Anstieg auf. Die Ergebnisse weisen darauf hin, dass der humane CgA Promotor zwar nicht in BON-1 Zellen, jedoch in AGS-B Zellen durch Gastrin stimulierbar ist.

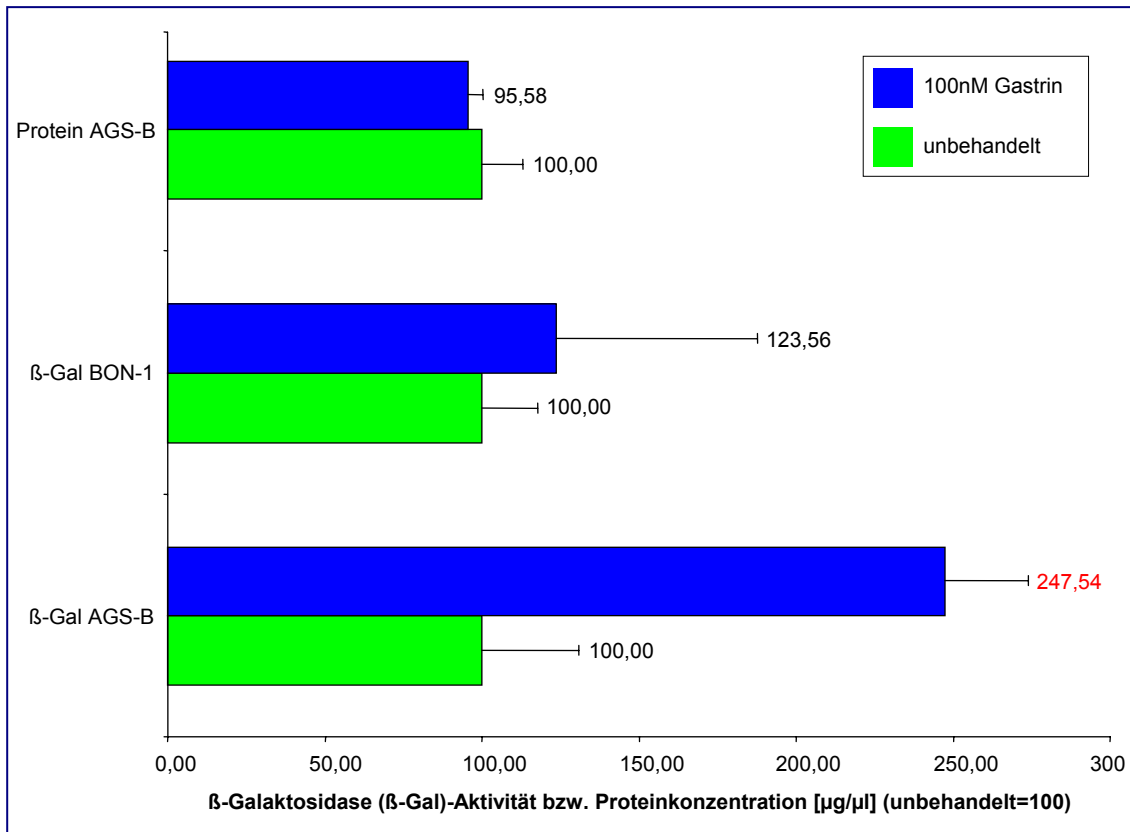


Abbildung 17: Gastrin I stimuliert die pSV-β-Galaktosidasepromotoraktivität in der Magenkarzinomzelllinie AGS-B. Die stabil mit dem CCK-B/Gastrinrezeptor transfizierte Magenkarzinomzelllinie AGS-B und BON-1 Zellen wurden mit 0.5 μg pSV-β-Galaktosidasevektor transient transfiziert und die Zellen nach 24h ohne oder mit 100nM Gastrin I behandelt. Nach 12h wurde die β-Galaktosidaseaktivität bestimmt und auf die Proteinkonzentration bezogen. Die Ergebnisse stellen den Mittelwert ± SEM aus drei Transfektionen dar. Farbige Ziffern beschreiben das Signifikanzniveau im Vergleich zur unbehandelten Kontrollgruppe (rot: p<0.05).

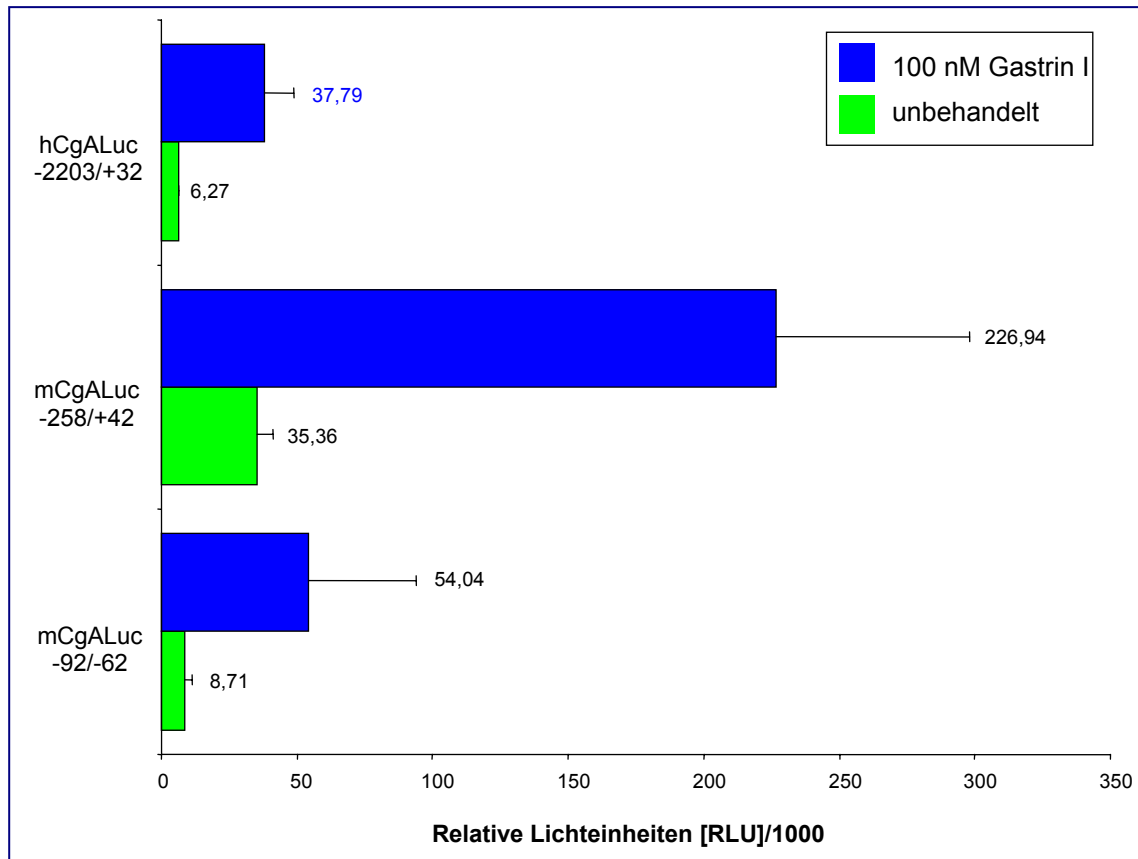


Abbildung 18: Promotoraktivität nach Stimulation mit Gastrin I in AGS-B Zellen. Nach transienter Transfektion der Reporterengenkonstrukte hCgALuc -2203/+32, mCgALuc -92/-62 oder mCgALuc -258/+42 (je 1.5 µg) wurden AGS-B-Zellen nach 24h Wachstum ohne FCS ohne oder mit 100 nM Gastrin I behandelt und nach 8h die Luciferaseaktivität gemessen. Die Ergebnisse der Luciferaseaktivität sind Ausdruck der Promotoraktivität des entsprechenden CgA-Reporterengenkonstruktes. Die Ergebnisse stellen den Mittelwert \pm SEM aus zwei Transfektionen dar. Farbige Ziffern beschreiben das Signifikanzniveau im Vergleich zur unbehandelten Kontrollgruppe (blau: $p < 0.05$).

Der murine CgA Promotor weist im proximalen Bereich ein konserviertes CRE und überlappende Sp1/Egr-1 Elemente auf, die gemeinsam gastrinabhängige Promotoraktivierung in Magenkarzinomzellen vermitteln [Raychowdhury et al, 2002]. Um nachzuweisen, welche *cis*-regulatorischen Elemente bei der gastrinabhängigen Stimulation des humanen CgA Promotors eine Rolle spielen, wurden die Magenkarzinomzellen AGS-B mit den unter 3.3.1. hergestellten progressiven 5'-

hCgALuc+32 Deletionsmutanten/Luciferase-Reporterplasmiden hCgALuc -2203/+32, hCgALuc -722/+32, hCgALuc -572/+32, hCgALuc -545/+32, hCgALuc -454/+32, hCgALuc -262/+32, hCgALuc -56/+32, hCgALuc -53/+32 und hCgALuc -45/+32 transient transfiziert und die Zellen mit oder ohne 100 nM Gastrin I über 12h behandelt. Alle 5'-Deletionsreportergenkonstrukte waren in den AGS-B Zellen transkriptionell aktiv (Abbildung 19). Die höchste Promotoraktivität zeigten die Reporterergenkonstrukte hCgALuc -56/+32 und hCgALuc -53/+32, die beide ein intaktes CRE aufweisen (siehe Abbildung 12). Durch Deletion der Nukleotide von -262 bis -56 bp nahm die basale Promotoraktivität in der Zelllinie AGS-B signifikant um das 15-fache zu ($p < 0.01$). Dies weist auf ein negativ *cis*-regulatorisches Element in diesem Promotorbereich hin, das im Vergleich zu den neuroendokrinen Pankreastumorzellen BON-1 und den Mesotheliomzellen MSTO-211H (vergleiche Abbildung 13) in den AGS-B zellspezifisch wirksam ist. Die Promotoraktivität aller hCgALuc-Reporterergenkonstrukte nahm nach Behandlung mit 100 nM Gastrin signifikant im Vergleich zur unbehandelten Gruppe um das 2- bis 5-fache zu ($p < 0.05$) (Abbildung 19). Bei bereits hoher basaler Aktivität zeigten die hCgALuc -56/+32 und hCgALuc -53/+32 Konstrukte die deutlichste Zunahme der transkriptionellen Aktivität unter Gastrinbehandlung. Die basale Aktivität des Reporterergenkonstruktes hCgALuc -45/+32 war in den AGS-B Zellen in Analogie zu den BON-1 und MSTO-211H Zellen deutlich (etwa 30-fach) im Vergleich zu dem hCgALuc -53/+32-Konstrukt ($p < 0.01$) niedriger. Das weist darauf hin, dass das CRE Element zwischen den Nukleotiden -51 bis -43 des hCgA-Promotors ein positiv *cis*-regulatorisches Element in AGS-B Zellen ist, dessen Deletion die transkriptionelle Aktivität fast vollständig aufhebt. Interessanterweise wurde das hCgALuc -45/+32-Konstrukt durch Gastrin über das dreifache -wenn auch insgesamt auf niedrigem Niveau- stimuliert. Das könnte auf eine positiv *cis*-regulatorische Sequenz unterhalb der CRE Seite hinweisen (Abbildung 5).

Die durch Gastrin vermittelte Stimulation des hCgA-Promotors in AGS-B Zellen wurde hauptsächlich durch das im proximalen Promotorbereich zwischen den Nukleotiden -51 bis -43 liegende cAMP response Element (CRE) hervorgerufen. Die Ergebnisse weisen daher darauf hin, da die Sp1 -Bindungsseite im hCgALuc -56/+32 Konstrukt deletiert ist, dass das CRE im humanen CgA Promotor im Gegensatz zum murinen CgA Promotor die gastrinvermittelte Stimulation in AGS-B Zellen unabhängig von der benachbarten Sp1-Bindungsseite im proximalen Promotorbereich vermitteln kann.

Deletion zwischen Nt -2203 und Nt -722 in den Konstrukten hCgALuc -2203/+32 und hCgALuc -722/+32 führte zu einer dreifachen Steigerung der Transkriptionsaktivität, was auf inhibitorisch wirkende *cis*-regulatorisches Elemente in dieser DNA Sequenz schließen ließ. Durch Mutation der putativen AP-1 DNA-Bindungsstelle im Reportergenkonstrukt hCgALuc -572mut/+32 zeigte sich im Gegensatz zu den BON-1 Zellen keine Veränderung der basalen oder gastrinstimulierten Promotoraktivität in den AGS-B Zellen. Die weiteren Deletionen von Nt -722 bis -545 bis Nt -455 führten nur zu geringen nichtsignifikanten Veränderungen der Promotoraktivität in AGS-B Zellen. Im Gegensatz dazu zeigte die Deletion von Nt -53 nach Nt -45 eine signifikante Reduktion der Promotoraktivität um das 30-fache auf ein Niveau des pGI2-Basic-Konstruktes. Durch Deletion von 8 Basenpaaren zwischen Nukleotid -53 und -45 wurde das CRE (cAMP response Element) im proximalen hCgA Promotor bei erhaltener TATA-Box deletiert. Die Ergebnisse weisen darauf hin, dass das CRE zwischen Nt -51 und Nt -43 auch in den AGS-B Zellen eine entscheidende *cis*-regulatorische Funktion ausübt, dessen Deletion zum Verlust der transkriptionellen Aktivität in AGS-B Zellen führt. Zusammenfassend geben die Ergebnisse Hinweise darauf, dass der proximale Promotor von Nukleotid -53 bp oberhalb der Transkriptionsstartseite für die Expression in AGS-B Zellen ausreichend und essentiell für die basale und gastrin-stimulierte hCgA Promotoraktivität ist.

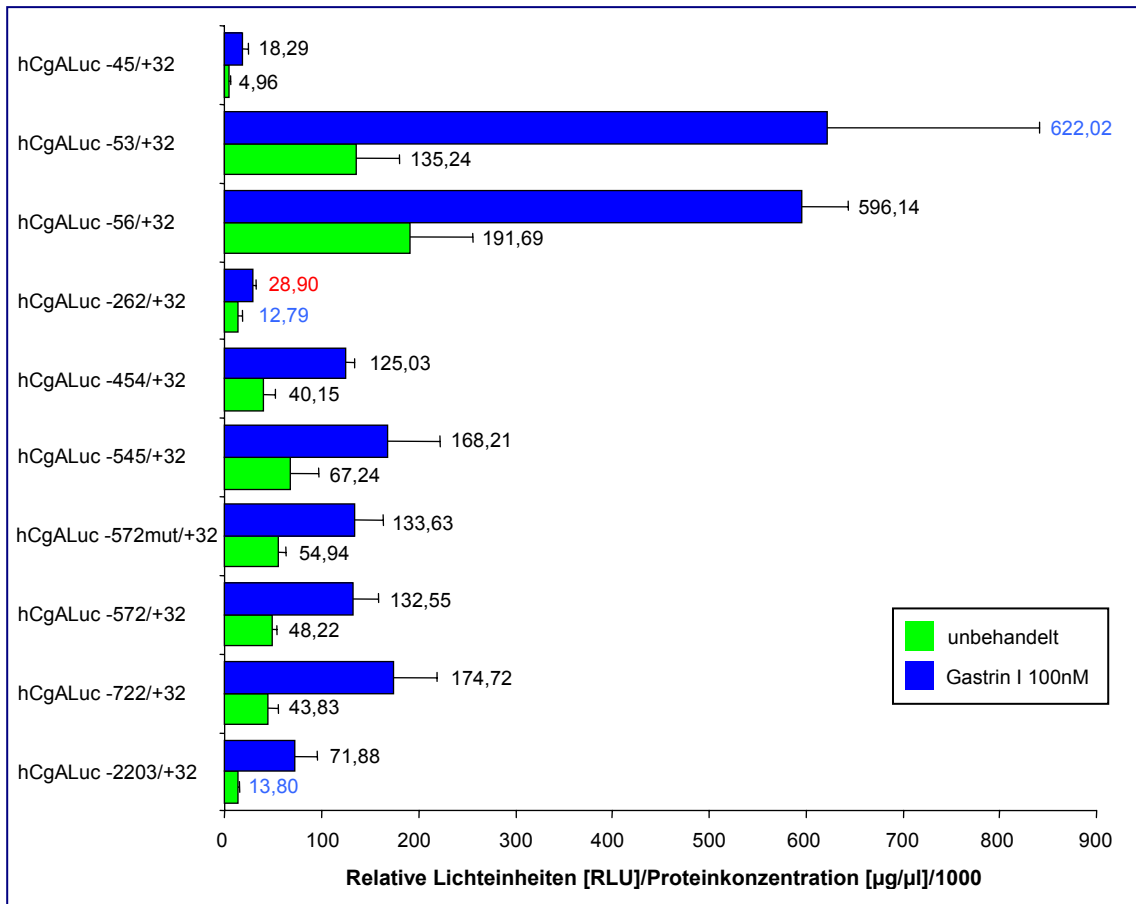


Abbildung 19: Transkriptionelle Aktivität von progressiven hCgA 5'-Deletionsmutanten und gastrinabhängige Aktivierung in humanen Magenkarzinomzellen AGS-B. Nach Transfektion mit den hCgALuc Reporterengenkonstrukten (je 1.5 µg) wurden die Zellen nach 24h ohne FCS ohne oder mit 100 nM Gastrin I für 12h behandelt. Die Ergebnisse der Luciferaseaktivität sind Ausdruck der Promotoraktivität des entsprechenden hCgA-Reporterengenkonstruktes und wurden auf die Proteinkonzentration normalisiert und in relativen Lichteinheiten angegeben. Die Ergebnisse der Luciferaseaktivität sind Ausdruck der Promotoraktivität des entsprechenden hCgA-Reporterengenkonstruktes. Die Ergebnisse stellen den Mittelwert \pm SEM aus drei Transfektionen dar. Alle Ergebnisse der gastrinbehandelten Zellen sind mit $p < 0.05$ (T-Test) im Vergleich zur unbehandelten Kontrollgruppe signifikant. Farbige Ziffern beschreiben das Signifikanzniveau im Vergleich zur nächst kürzeren Deletionsmutante (blau: $p < 0.05$; rot $p < 0.001$; T-Test).

3.6. Der humane Chromogranin A Promotor ist in den neuroendokrinen Pankreastumorzellen BON-1 nicht durch Insulin-like-growth-factor-1 (IGF-1) stimulierbar

Insulin-like-Growth-Factor-1 (IGF-1) ist ein wachstumsinduzierendes Polypeptid und an der Wachstumsregulation und Differenzierung verschiedener Zellarten beteiligt [Coolican et al, 1997; Valverde et al, 1997; Engert et al, 1996]. In Rattenphäochromozytomzellen PC12 konnte gezeigt werden, dass IGF-1 den murinen (m)CgA Promotor durch Aktivierung des Transkriptionsfaktors CREB (cAMP Response Element-binding Protein) stimuliert. Die IGF-1 induzierte Aktivierung konnte partiell durch Mutation des CRE im proximalen mCgA Promotor inhibiert werden [Pugazhenti et al, 1999]. Die humanen neuroendokrinen Pankreastumorzellen BON-1 exprimieren funktionell aktive IGF-1 Rezeptoren und IGF-1 wirkt in diesen Zellen als autokriner Regulator sowohl der CgA Sekretion als auch auf das Zellwachstum [von Wichert et al, 2000]. Es wurde daher die Frage untersucht, ob die transkriptionelle Aktivität des humanen hCgA-Promotors in BON-1 Zellen durch IGF-1 reguliert werden kann. Hierzu wurde das hCgALuc -2203/+32 Reportergenkonstrukt in BON-1 Zellen transfiziert und nach Serumdeprivation ohne oder mit IGF-1 in aufsteigender Konzentrationen von 10 ng/ml bis 100 ng/ml für 24 h behandelt. Die Kontrolle der Transfektionseffizienz erfolgte durch Kotransfektion mit dem pSV- β -Galaktosidasevektor. Die Promotoraktivität wurde anhand der Luciferaseaktivität mit der β -Galaktosidaseaktivität verrechnet. Nach Kotransfektion zeigte sich unabhängig der IGF-1 Konzentration in den mit IGF-1 behandelten BON-1 Zellen im Vergleich zu den unbehandelten Zellen keine Veränderung der transkriptionellen Aktivität des Reportergenkonstruktes hCgALuc -2203/+32 (Abbildung 20). Daher scheint IGF-1 im Gegensatz zu den Beobachtungen mit dem murinen CgA Promotor in Rattenzellen keine Wirkung auf den humanen CgA Promotor in BON-1 Zellen unter den Untersuchungsbedingungen zu haben.

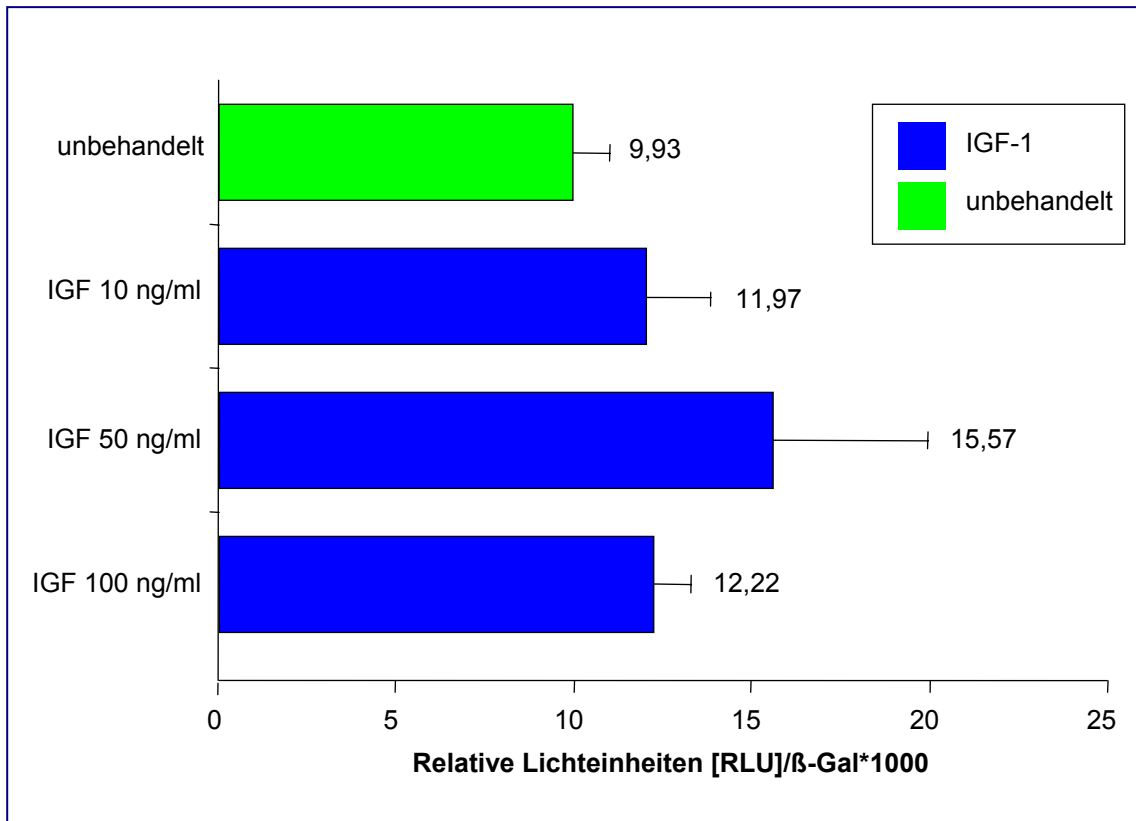


Abbildung 20: Der hCgA Promotor ist in BON-1 Zellen durch IGF-1 nicht reguliert. Nach transienter Kotransfektion des hCgALuc -2203/+32 Reportergenkonstruktes (1.5 µg) und des pSV-β-Galaktosidasevektors (0.5 µg) wurden die Zellen nach 24h Wachstum ohne FCS ohne oder mit 10 ng/ml, 50 ng/ml und 100 ng/ml IGF-1 behandelt. Die Luciferaseaktivität wurde auf die β-Galaktosidase-Expression als interne Kontrolle normalisiert und in relativen Lichteinheiten angegeben. Die Ergebnisse der Luciferaseaktivität sind Ausdruck der Promotoraktivität des entsprechenden hCgA-Reportergenkonstrukts. Die Ergebnisse stellen den Mittelwert \pm SEM aus drei Transfektionen dar.

3.7. Expression des Natriumjodidsymporter (NIS)-Gens unter der Kontrolle des hCgA Promotors in neuroendokrinen Pankreastumorzellen zur Radiojodtherapie

Die selektive Expression eines gentherapeutischen Effektormoleküls unter Kontrolle eines neuroendokrin-spezifischen Promotors könnte ein interessanter Ansatz zur Therapie neuroendokriner Tumorzellen darstellen. Als Effektormolekül wurde der Natriumjodidsymporters (NIS) gewählt, der Jodid in Zellen anreichern und organifizieren kann, und so zur selektiven Radiojodtherapie neuroendokriner Pankreastumorzellen eingesetzt werden könnte [Spitzweg et al, 2000; Heufelder et al, 2001]. Um zu untersuchen, ob Sequenzen des hCgA Promotors die funktionelle NIS-Expression in neuroendokrinen Pankreastumorzellen ermöglichen, wurden NIS-Expressionsvektoren unter Kontrolle des hCgA Promotors eingesetzt. In den folgenden Versuchen wurde zur Expression von NIS der eukaryote Expressionsvektor pcDNA3.1-V5-His (Invitrogen) mit vollständiger NIS cDNA hinter einer Kozak Sequenz eingesetzt. Der CMV Promotor in diesem Plasmid wurde entweder deletiert (Plasmid pcDNA3.1-NIS) oder zur zellspezifischen Expression mit der 5'-flankierenden DNA des hCgA Promotors von Nukleotid -722 bp bis +32 bp ersetzt (siehe Abbildung 9). Dieses Plasmid mit der NIS cDNA unter Kontrolle des hCgA Promotors wurde pcDNA3.1-hCgA-722/+32-NIS benannt.

Die neuroendokrinen Pankreastumorzellen BON-1 wurden mit pcDNA3.1-NIS oder pcDNA3.1-hCgA-722/+32-NIS transient transfiziert. Um die funktionelle Expression von NIS nachzuweisen, wurde in den transient transfizierten Zellen nach 48h der ¹²⁵Jod-Uptake gemessen. Dabei zeigte sich in den mit pcDNA3.1-hCgA-722/+32-NIS transfizierten BON-1 Zellen ein signifikant ($p < 0.05$) um das 3.8-fache höherer Radiojod-Uptake als in den mit pcDNA3.1-NIS transfizierten Zellen. Um die korrekte Funktion des NIS nachzuweisen und um eine Jodkontamination auszuschließen, wurden die transfizierten Zellen zeitgleich ohne oder mit 100 nM Natriumperchlorat, das die Jodaufnahme durch den NIS blockiert, behandelt. Durch Natriumperchlorat-Behandlung der mit pcDNA-hCgA-722/+32-NIS transfizierten Zellen konnte die Jodaufnahme signifikant auf das Niveau der nur mit pcDNA3.1-NIS transfizierten Zellen blockiert werden. Die Jodaufnahme der mit pcDNA3.1-NIS transfizierten Zellen ließ sich dagegen nicht blockieren, was auf eine, wie zu erwartende, unzureichende NIS-Expression des

promotorlosen pcDNA3.1-NIS Vektors in der neuroendokrinen Zelllinie BON-1 hinweist. Diese Ergebnisse sind in Abbildung 21 dargestellt und zeigen, dass nach transienter Transfektion der Natriumjodidsympporter (NIS) unter der Kontrolle des hCgA Promotors in der neuroendokrinen Zelllinie BON-1 funktionell exprimiert werden kann.

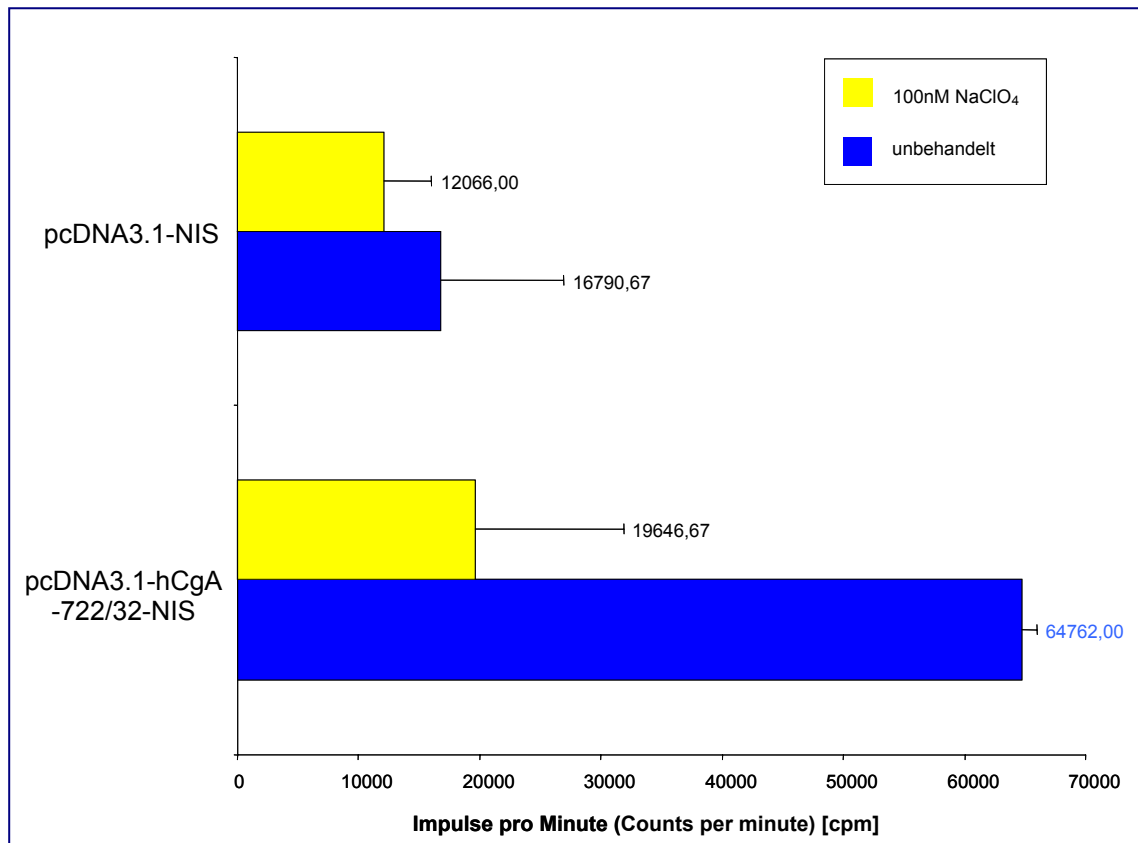


Abbildung 21: Radiojod-Uptake durch NIS-transfizierte BON-1 Zellen unter Kontrolle des hCgA-Promotors. Es wird die Aktivität des aufgenommenen radioaktiven Jods (^{125}I) ohne oder mit 100 nM Natriumperchlorat (NaClO_4) dargestellt. Es wurden jeweils 1 μg pcDNA3.1-NIS oder pcDNA3.1-hCgA-722/+32-NIS in BON-1 Zellen transient transfiziert und nach 48h ohne oder mit Zugabe von 100 nM Natriumperchlorat der Radio-Jod-Uptake gemessen. Die Ergebnisse des Radio-Jod-Uptakes sind Ausdruck der Promotoraktivität des entsprechenden Reportergenkonstrukts. Die Ergebnisse stellen den Mittelwert \pm SEM aus drei Transfektionen dar. Farbige Ziffern deuten auf ein signifikantes Ergebnis im Vergleich zur Natriumperchlorat-behandelten Gruppe und im Vergleich zum promotorlosen pcDNA-3.1-NIS-Konstrukt hin (blau: $p < 0.05$)

4. Diskussion

4.1. Strukturelle Charakterisierung und Crossspezies-Vergleich des humanen Chromogranin A Promotors

Ziel der vorliegenden Arbeit war die Charakterisierung der zellspezifische Expression des humanen CgA Promotors in neuroendokrinen Pankreastumorzellen mit der Intention der Anwendung zur selektiven Expression von therapeutischen Genen in diesen Tumorzellen. Die zunächst durchgeführte computerunterstützte Sequenzanalyse des humanen Chromogranin A (hCgA) Promotors konnte zahlreiche Kontrollelemente in *cis* innerhalb der 2529 Basenpaaren der untersuchten 5'-untranslatierten Region identifizieren. Da Sequenzkonservierung auf funktionell relevante Promotorbereiche hinweisen kann, wurden verschiedene Spezies hinsichtlich Sequenzhomologien und Transkriptionsfaktor-Erkennungsmotive vergleichend analysiert. Dabei konnte insgesamt eine hohe Sequenzkonservierung zwischen Mensch und Kuh, sowie der Nager untereinander nachgewiesen werden. Das menschliche und bovine zyklische AMP Response Element (CRE: „TGACGTCA“) zeigten im Gegensatz zur Maus und Ratte („TGACGTAA“) ein perfektes CRE-Palindrom auf. Neben dem CRE und der TATA-Box konnte in der vorliegenden Arbeit, in allen Spezies konserviert, ein weiteres in 5' Richtung gelegenes sich überlappendes Sp1/Egr-1 Motiv identifiziert werden, so dass diese proximale Region im Crossspeziesvergleich die höchste Konservierung aufwies. Dabei wiesen der humane und bovine CgA Promotor eine fast perfekte Homologie auf. Diese Ergebnisse unterstützen die Ergebnisse von vorausgegangenen Arbeiten, die unabhängig Crossspezies-Homologien im murinen und humanen proximalen Chromogranin A Promotor mit konserviertem CRE Motiv oberhalb einer TATA-Box sowie einer Sp1-Bindungsseite beobachteten [Wu et al, 1995; Canaff et al, 1998]. Konservierte CRE Seiten sind auch in den proximalen Promotorsequenzen anderer Mitglieder der Chromogranin/Secretogranin-Familie wie beispielsweise dem Chromogranin B (CgB) und Secretogranin II (SgII) nachweisbar, obwohl die Sequenzhomologien außerhalb dieser proximalen CRE Seite und der TATA-Box sehr gering sind [Pohl et al, 1990; Schimmel et al, 1992; Desmoucelles et al, 1999; Mahata et al, 1999]. Die starke Konservierung der CRE Seite im CgA Gen und weiterer

neuroendokriner Gene weist darauf hin, dass der CRE Seite im proximalen Promotor bei der transkriptionellen Regulation eine wesentliche funktionelle Relevanz zukommt. Hinsichtlich der konservierten Sp1-Bindungsstelle gibt es widersprüchliche Ergebnisse [Nolan et al, 1996]. Anhand unserer Ergebnisse handelte es sich im humanen CgA Promotor nicht um eine einfache Sp1-Erkennungssequenz, sondern um ein überlappendes konserviertes Sp1/Egr-1 Motiv, wie es kürzlich auch in der Maus charakterisiert wurde [Raychowdhury et al, 2002]. Im humanen CgA Promotor konnte zwischen der TATA-Box und dem CRE eine für den humanen CgA Promotor einzigartige STAT3 Seite identifiziert werden, die zuvor als TG-Box mit hoher Sequenzhomologie zu anderen Spezies beschrieben wurde, was die Ergebnisse in der vorliegenden Arbeit nicht bestätigen konnten. Speziesspezifisch zeigte sich im Ratten- und Mauspromotor auch eine oberhalb der TATA-Box gelegene 29 bp lange Insertion, die im humanen oder bovinen CgA nicht vorhanden war. In den distalen Promotorbereichen nahm die Sequenzhomologie zunehmend ab, so dass die humane und murine Sequenz nur noch 4-5% Sequenzübereinstimmung zeigten. In der distalen Region des hCgA Promotors wurde zuvor eine distale regulatorische Region (DRR) mit Enhancerwirkung in neuroendokrinen Lungentumorzellen beschrieben, die anhand von Mutationsanalysen auf eine in dieser Region liegende AP-1-Seite zurückgeführt werden konnte [Nolan et al, 1995]. Im Crossspeziesvergleich zeigte diese AP-1-Seite keine Konservierung. Auch konnte das mehrere hundert Basenpaare weiter 5' gelegene zuvor in der Ratte charakterisierte invertierte „Glucocorticoid Regulatory Element“ (GRE) in den anderen Spezies nicht nachgewiesen werden. Diese strukturellen Abweichungen weisen in der sonst hochkonservierten Promotorregion neben gemeinsamen transkriptionellen Regulationsmechanismen auf speziesspezifische funktionelle Unterschiede in der Promotorregulation des CgA Gens hin.

4.2. Basale und zellspezifische Aktivität des humanen Chromogranin A Promotors in neuroendokrinen Pankreas-tumorzellen

Die aus Tumorzellen des neuroendokrinen Pankreas etablierte humane BON-1 Zelllinie sezerniert Chromogranin A und wurde daher als Modellsystem zur funktionellen Charakterisierung *cis*-regulatorischer Kontrollelemente des hCgA Gens eingesetzt [Evers et al, 1991]. Die 2,2 kb der 5'-flankierenden DNA des hCgA Gens im hCgALuc -2203/+32 Reporterengenkonstrukt vermittelten im Gegensatz zu anderen Zelltypen transkriptionelle Aktivität in BON-1 Zellen und der Lungentumorzelllinie EPLC 32M1. Damit konnte erstmals gezeigt werden, dass *cis*-regulatorische Elemente innerhalb dieser 2,2 kb Promotorsequenz zellspezifische Expression in BON-1 Zellen vermitteln und bestätigten vorausgegangene Untersuchungen zur zelltypspezifischen hCgA Expression in den humanen Lungenkarzinomzellen BEN [Nolan et al, 1996]. Die schrittweise Entfernung von 5'-Sequenzen und damit Entfernung von Transkriptionsfaktorbindungsstellen zwischen -2203 bp und -43 bp der 5'-flankierenden DNA wies in BON-1 Zellen auf mehrere funktionell relevante positive und negative *cis*-regulatorische Elemente hin. So zeigten sich Promotoraktivitätsunterschiede nach Transfektion von hCgALuc -2203/+32 und -722/+32, die auf ein deletiertes negativ *cis*-regulatorisches Element schließen ließen. Durch eine Mutation im Bereich der putativen AP-1 Bindungsstelle konnte eine Steigerung der Promotoraktivität im Vergleich zum nichtmutierten hCgALuc -572/+32 Reporterengenkonstruktes gezeigt werden, so dass die AP-1 Bindungsdomäne in BON-1 Zellen die Funktion eines negativ *cis*-regulatorischen Elementes ausübt. Dagegen spielte in nichtneuroendokrinen Zellen die AP-1 Erkennungssequenz funktionell keine Rolle. Während transient transfizierte 5'-Deletionsmutanten in BON-1 Zellen eine hohe basale Transkription aufwiesen, war diese in Mesotheliomzellen MSTO-211H nur schwach nachweisbar. Die Aktivität des kurzen hCgALuc -45/+32 Reporterengenkonstruktes war dagegen sowohl in BON-1 als auch MSTO-211H vergleichbar niedrig, während die Aktivität des nur 8 Basenpaare längeren hCgALuc -53/+32 Konstruktes in den BON-1 Zellen deutlich höher war als in den MSTO-211H Zellen. Die Regulation der Expression von hCgA in BON-1 Zellen ließ sich demnach auf den proximalen Promotorbereich von Nukleotid -53 bis -45 des hCgA Promotors zurückführen, in dem die putative Transkriptionsfaktor-Bindungsstelle

des zyklischen AMP-Response Elementes liegt. Diese Ergebnisse zeigen, dass die hCgA Promotorsequenz bis Nukleotid -53 für die Promotoraktivität und zellspezifische Transkription wichtig und ausreichend ist und dem CRE für die gewebespezifische Expression von hCgA in BON-1 Zellen eine entscheidende Bedeutung zukommt. Da die Promotoraktivitäten der Reportergerkonstrukte hCgALuc -45/+32 oder hCgALuc -45/+198 mit deletiertem CRE aber intakter TATA-Box sowohl in BON-1 als auch MSTO-211H Zellen fast transkriptionell inaktiv waren, wird die neuroendokrinspezifische Expression eher durch positive transaktivierende Faktoren und nicht durch inhibierende Faktoren in den nichtneuroendokrinen Zellen bedingt. Die Untersuchungen wiesen zudem auch darauf hin, dass Elemente zwischen Nukleotid -722 und -53 zur transkriptionellen Aktivität in BON-1 Zellen beitragen.

Zellspezifische Expression des murinen CgA Gens wurde bereits von anderen Arbeitsgruppen berichtet. So konnte die zellspezifische Regulation des mCgA Promotors in murinen Hypophysenzellen AtT20 und Rattenphäochromozytomzellen PC-12 auf den Promotorbereich von Nukleotid -77 bp bis -61 bp der 5'-flankierenden DNA einschließlich eines intakten CRE eingeschränkt werden [Wu et al, 1994]. Auch in humanen medullären Schilddrüsenkarzinom- und Lungentumorzellen konnte nachgewiesen werden, dass ein 87 bp großes Fragment von Nukleotid -55 bp bis +32 des hCgA Promotors für die zelltypspezifische Regulation ausreichend war [Nolan et al, 1995 und 1996; Mouland et al, 1994]. CRE Mutationen des -55/+32-Reportergerkonstruktes beseitigten die gewebespezifische Regulation des hCgA Promotors in BEN Zellen, während CRE-Deletionsmutanten, die noch weiter proximal liegende Abschnitte des hCgA Promotors enthielten, die Promotoraktivität lediglich auf 50-70% reduzierten [Nolan et al, 1995]. Die Arbeitsgruppe unterteilte funktionell den CgA Promotor in eine proximale regulatorische Region (PRR) von Nukleotid -60 bis -20, und eine distale regulatorische Region (DRR) zwischen Nukleotid -726 und -455 [Nolan et al, 1996]. Die intakte DRR steigerte die Promotoraktivität des hCgA Promotors nur in den neuroendokrinen BEN Zellen abhängig von einem intakten AP-1 ähnlichem Bindungsmotiv „TGACTAA“, das zusammen mit dem proximalen CRE die basale hCgA Transkription in BEN Zellen um mehr als das zehnfache erhöhte. Die AP-1 Bindungsseite war für die CgA Transkription in BEN Zellen notwendig, aber nicht ausreichend. Durch Mutationen in diesem Bereich wurde die Aktivität in

neuroendokrinen Zellen im Gegensatz zu den vorliegenden Ergebnissen in den BON-1 Zellen aufgehoben [Nolan et al, 1995]. Insgesamt zeigen die vorliegenden Ergebnisse in BON-1 Zellen und die von Canaff und Mitarbeitern publizierte Daten [Canaff et al, 1998], dass die *cis*-regulatorischen Elemente zwischen Nukleotiden -700 und -55 des hCgA entweder Enhancer- oder Repressoraktivität besitzen, aber dass das Ausmaß relativ zur gesamten Promotoraktivität gesehen niedrig ist und zelltypspezifisch variiert. Transfektionen mit dem murinen CgA Promotor wiesen ebenso auf eine essentielle Rolle der proximalen Promotorregion einschließlich des CRE bei der zellspezifischen Expression in murinen Hypophysenzellen AtT20 und Rattenphäochromozytomzellen PC-12 hin, wobei auch im murinen CgA Promotor distale Sequenzen, hier zwischen Nukleotid -147 und -100, zur Verstärkung der transkriptionellen Aktivität führten [Wu et al, 1995]. Die vorliegenden Daten stützen die Arbeiten von Wu et al, die zeigten, dass der mCgA Promotor mit der proximalen CRE Region ausreichend und notwendig zur maximalen und neuroendokrinen Expression ist.

Einige Arbeitsgruppen haben unabhängig voneinander gezeigt, dass das CRE in Kombination mit anderen *cis*-aktiven Elementen eine wichtige Rolle bei der Expression von Neuropeptid- und Polypeptidhormongenen spielt [Meyer und Habener, 1993]. Die Anordnung der CRE und TATA-Box haben die Granin-Gene (Chromogranin A, Chromogranin B und Secretogranin II) gemeinsam, wobei das CRE ein wesentliches Promotorelement für neuroendokrine Expression darstellt. Zusätzlich zum CRE spielt ein SRE (Serum Response Element) im Secretogranin II (SgII) Promotor und eine Sp1 Seite im Chromogranin B (CgB) Promotor bei der Vermittlung induzierbarer Expression eine wichtige Rolle [Desmoucelles et al, 1999; Mahata et al, 1999]. Da CgA ein neuroendokrin-spezifisches sekretorisches Protein ist, könnte die Identifizierung der Regulation der hCgA Expression helfen, die regulatorischen und entwicklungsbiologischen Mechanismen des diffusen neuroendokrinen Systems besser verstehen zu lernen.

Im Gegensatz zu Arbeiten von Mouland und Mitarbeitern [Mouland et al, 1994] in medullären Schilddrüsenkarzinomzellen ergaben sich keine Hinweise auf ausschließlich neuroendokrinspezifische hCgA Promotoraktivität. Die vorliegenden Daten weisen eher darauf hin, dass der hCgA Promotor auch in nichtneuroendokrinen Zellen -wenn auch

schwach- aktiviert werden kann. Für die Unterschiede zu den vorausgegangenen Arbeiten ergeben sich mehrere Erklärungen. Zum einen wurden zur Promotoranalyse auch Zelllinien anderer Spezies angewandt, was aufgrund unterschiedlicher Ausstattung der Zelle mit Transkriptionsfaktoren zu speziesspezifischen Ergebnissen führen kann. Darüber hinaus wurde die Deletion der CRE Seite nicht vergleichend in neuroendokrinen versus nichtneuroendokrinen Zellen analysiert. Weitere Studien müssen zeigen, welche zellspezifischen Transkriptionsfaktoren bei der neuroendokrinspezifischen Transkription des hCgA in BON-1 Zellen partizipieren. Der 4,8kb-mCgA Promotor zeigte nach Transfektion in Fibroblasten NIH3T3, die kein CgA exprimieren, eine schwache Transkription, so dass das endogene mCgA Gen eine begrenztere Zellspezifität aufweist [Wu et al, 1994]. Trotz vollständiger Abwesenheit der CgA Expression in Mesotheliomzellen zeigte auch der transfizierte hCgA Promotor in der vorliegenden Arbeit in MSTO-211H Mesotheliomzellen eine schwache basale transkriptionelle Aktivität. Diese Diskrepanz wird häufiger in Transfektionsexperimenten bei der Beurteilung der Promotoraktivität beobachtet und könnte mit dem relativen Fehlen von nukleosomalen oder anderen Chromatinstrukturen in akut transfizierten episomalen Plasmiden zusammenhängen [Laybourn et al 1991]. *Cis*-aktivierende Mechanismen wie Nukleosomen-Arrangement oder Chromatin-Status könnten auch CREB oder die Bindung ähnlicher Faktoren an das CRE blockieren. Alternativ könnte das CRE im CgA Promotor nicht vollständig ausreichen, um das hochselektive Expressionsmuster des CgA Gens *in vitro* zu erklären. Der endogene Promotor und transfizierte Promotorabschnitte müssten daher weitere Elemente beinhalten, die die Wirkungen des CRE beeinflussen.

In den vorliegenden Untersuchungen konnte die von Nolan und Mitarbeitern funktionell begründete Zweiteilung des CgA Promotors in eine DRR (Nukleotid -726 bis -455) und eine PRR (Nukleotid -70 bis -22) nicht bestätigt werden [Nolan et al, 1995 und 1996]. Transfektionsexperimente in BON-1 Zellen zeigten nicht die Notwendigkeit der distalen Promotorregion (DRR) für eine starke Expression des hCgA Promotors, da das hCgALuc -2203/+32 Reporterkonstrukt nicht wesentlich stärker transkribiert wurde als das kurze hCgALuc -53/+32. Die Deletionsmutanten weiter distal gelegener DNA Abschnitte wiesen zwar auf negative und positive *cis*-regulatorische Elemente hin, diese bewirkten aber keine profunden Effekte auf die Transkriptionsaktivität oder -spezifität.

In BON-1 Zellen erwies sich dagegen der proximale Promotor als wichtige Regulatorregion, die zur maximalen und neuroendokrin-spezifischen Expression ausreichend war. Aufgrund der zum großen Teil ähnlichen hCgA Deletionsmutanten könnte die Diskrepanz der Ergebnisse hauptsächlich durch zellspezifische Eigenschaften erklärt werden.

Die Promotorkonstrukte hCgALuc +198 mit den nach 3'-verlängerten Sequenzen waren in BON-1 Zellen transkriptionell aktiver als die kürzeren hCgALuc +32 Reporter-genkonstrukte. In dem Promotorbereich von Nukleotid +33 bis +198 bp konnten anhand der computerassistierten Sequenzanalyse mehrere putative Transkriptionsfaktor-Bindungsseiten, unter anderen für Egr-1/Sp1, AP-1 und RREB-1 identifiziert werden. Diese Unterschiede wurden bereits in Lungenkarzinomzellen BEN, sowie Ratten- und murinen Hypophysenzellen beobachtet [Canaff et al, 1998]. Die Promotoraktivitäten der kürzesten hCgA Konstrukte hCgALuc -31/+32 und -31/+198 zeigten beide nur Baselineaktivität, so dass die stärkere Transkriptionsaktivität der hCgALuc+198-Fragmente durch Interaktion mit weiter distal gelegenen Promotorelementen bedingt sein muss. Im Unterschied zu dem von Canaff angewandten hCgALuc-31/+32-Reporter-genkonstruktes enthält das in der vorliegenden Arbeit eingesetzte hCgALuc-45/+32 eine zusätzliche putative STAT3 Bindungsseite zwischen TATA-Box und CRE, so dass die Interaktion des STAT3-Motivs mit den im Promotorbereich von Nukleotid +33 bis +198 bp liegenden Elementen AP-1, Sp1 bzw. RREB-1 denkbar wäre.

4.3. Transkriptionelle Regulation des humanen Chromogranin A Promotors durch zyklisches AMP in neuroendokrinen Pankreastumorzellen

Der zyklische AMP (cAMP) Pathway spielt eine wichtige Rolle in der Entwicklung neuroendokriner Gewebe, und molekulare Defekte seiner Schlüsselkomponenten konnten in endokrinen Tumoren beobachtet werden [Rosenberg et al, 2002]. In der neuroendokrinen Pankreastumorzelllinie BON-1 ließ sich durch Stimulation mit Dibutyryl-cAMP ein fast dreifacher Anstieg der hCgA Promotoraktivität induzieren. Durch Untersuchungen einzelner hCgA 5'-Deletionmutanten konnte die auf cAMP ansprechende *cis*-regulatorische Region auf den Promotorbereich zwischen Nukleotid -53 bis -45 bp mit einer Konsensus-CRE Seite eingegrenzt werden. Diese Ergebnisse bestätigen Untersuchungen des murinen CgA Promotors, die auch eine über das proximale CRE vermittelte Regulation durch cAMP in Rattenphäochromozytomzellen PC-12 und murinen Hypophysenzellen AtT20 nachweisen konnten [Wu et al, 1995]. Auch wurde über eine durch Dibutyryl-cAMP induzierte Verdoppelung der basalen Aktivität des hCgA Promotors in Lungentumorzellen BEN berichtet, ein Effekt, der durch Proteinkinaseinhibitor H-89 um 85% reduziert werden konnte. Mutation des CRE bei intaktem distalen hCgA Promotor führte dagegen nur zum 50-70% Verlust der basalen Aktivität in BEN Zellen als Hinweis dafür, dass distal gelegene *cis*-regulatorische Elemente zwischen Nukleotiden -700 und -55 unabhängig von der CRE Seite für die basale hCgA Promotoraktivität in BEN Zellen notwendig waren [Canaff et al, 1998].

Die Mechanismen, durch die cAMP die eukaryote Gentranskription aktiviert, haben in den letzten Jahren signifikante Aufmerksamkeit erfahren. Die transkriptionelle Regulation nach Stimulation des Adenylatzyklase-Signaltransduktionsweges wird durch die nukleären Faktoren CREB, CREM und ATF-1 vermittelt, die Mitglieder einer Familie von Transkriptionsfaktoren mit einem „basic Leucinzipper“ (bZIP) Motiv sind, das sequenzspezifische Bindung und Dimerisierung vermittelt. Das „cAMP Response Element Binding Protein“ (CREB) wird konstitutiv exprimiert und bindet an die palindrome CRE Sequenz „5'-TGACGTCA-3'“ [Shaywitz and Greenberg, 1999]. *In vitro* Untersuchungen weisen darauf hin, dass CREB am CRE gebunden vorliegt und

erst die Phosphorylierung zur Aktivierung und Rekrutierung von CREB Bindungsproteinen (CBP) führt. Diese bilden zusammen einen CREB/CBP/Promotor-Komplex, der mit Komponenten des Präinitiationskomplexes kontaktiert und die Transkription induziert. Die Limitation des Modells liegt darin, dass es zur gewebespezifischen Antwort gegenüber cAMP keine Erklärung bietet, da CREB und CBP ubiquitär exprimiert werden. So konnte auch gezeigt werden, dass CREB an die CREs im mCgA und hCgA gebunden vorlagen und die Expression der CREB und CBP Faktoren sowohl in den neuroendokrinen als auch nichtneuroendokrinen Zelllinien vergleichbar war [Wu et al, 1995; Nolan et al 1995; Canaff et al, 1998].

Zyklisches AMP stimuliert die Aktivität einer Vielzahl neuroendokrin-spezifischer Gene wie beispielsweise Chromogranin B, Sekretogranin II, Dopamin- β -hydroxylase, Glukagon, Parathormon, Somatostatin, Gonadotropin, Prohormonkonvertase 1, Tyrosinhydroxylase, GIP (Gastric Inhibitory Polypeptide), Insulin, Cholezystokinin oder VMAT2, deren Promotoren CRE Seiten aufweisen [Thompson et al, 1992; Thompson et al, 1994; Fischer-Colbrie et al, 1990; McMahon und Sabban, 1992; Ishiguro et al, 1993; Chen et al, 1993; Gonzalez und Montminy, 1989; Montminy et al, 1986]. Alle genannten Gene besitzen ein CRE mit einem Core Octamer „TGACGTCA“, aber unterschiedlichen flankierende Sequenzen und transkriptionellen Aktivitäten, was darauf hinweist, dass die flankierenden Sequenzen die transkriptionelle Aktivität mitbestimmen [Miller et al, 1993]. So ist das CRE im Glukagon- und Parathormongen transkriptionell wenig aktiv, während es im Somatostatin- oder Gonadotropingen transkriptionell sehr aktiv ist. Auf der anderen Seite können Promotoren auch von nichtneuroendokrinen Genen wie Fibronectin eine funktionelle CRE Seite aufweisen [Pesce et al, 1999], so dass die Anwesenheit einer CRE Seite für neuroendokrine Expression nicht spezifisch ist und in seiner Bedeutung im Gesamtkontext des bestimmten Promotors gesehen werden muss. Ein Beispiel für zellspezifischen cAMP-Response ist das Phosphoenolpyruvatcarboxykinasegen (PEPCK), das in der Leberzelle stark, aber schwach in anderen Zellen stimuliert wird. Das selbst schwache CRE funktioniert innerhalb einer cAMP Unit (CRU), die weiter distal gelegene *cis*-regulatorische Elemente mit einbezieht. Welche transkriptionelle Aktivität auf ein cAMP Signal hin entfaltet wird, hängt davon ab, welche Transkriptionsfaktoren die *cis*-regulatorischen Elemente in der CRU besetzen [Roesler,

2000]. Die durch cAMP induzierte eher moderate Stimulierbarkeit des hCgA in BON-1 und BEN Zellen könnte aber auch durch eine bereits hohe basale Promotoraktivität und damit eine nicht weiter induzierbare transkriptionelle Steigerung der Promotoraktivität bedingt sein, was auch von anderen Promotoren berichtet wurde [Iacangelo et al, 1991; Murray et al, 1988; Weiler et al, 1990]. Die Unterschiede zwischen dem humanen und murinen CgA Promotor im Hinblick auf die unterschiedlich starke Stimulierbarkeit durch cAMP könnte sowohl durch speziesspezifische Unterschiede in der Promotorstruktur als auch Anwendung verschiedener Zelllinien oder Kulturbedingungen bedingt sein.

Die vorliegende Arbeit bestätigt, dass das hCgA Gen zu den CRE abhängigen Genen gehört. Das proximale CRE des hCgA Promotors spielt in neuroendokrinen Pankreastumorzellen nicht nur eine wichtige Rolle bei der basalen Promotoraktivität, sondern auch in der cAMP-induzierten hCgA Transkription. Die Mechanismen der zellspezifischen Kontrolle der Expression, die über das CRE in den BON-1 Zellen vermittelt wird, bleiben zu untersuchen.

4.4. Gastrinvermittelte Regulation des humanen CgA Promotors

Die transkriptionelle Aktivierung des CgA Promotors scheint ein Hauptmechanismus zu sein, durch den Gastrin die CgA Expression kontrolliert [Nagata et al, 1996]. In einem transgenen Tiermodell konnte gezeigt werden, dass der murine 4.8kb-CgA Promotor spezifisch die Expression in gastrointestinalen und extragastrointestinalen neuroendokrinen Zellen *in vivo* vermittelt und dass eine Hypergastrinämie zur Steigerung der Aktivität des 4.8kb-mCgA Promotorfragmentes in den ECL Zellen des Magens führte [Höcker et al, 2001]. Gastrin hat einen pleiotrophen Effekt auf ECL Zellen und adaptiert die zellulären Funktionen an verschiedene physiologische Bedürfnisse. Diese durch Gastrin regulierten Gene wie CgA, Histidindecaboxylase (HDC) oder der vesikuläre Monoamintransporter 2 (VMAT2) haben ein proximales konserviertes CRE und Sp1-Seiten innerhalb der ersten 140 Basenpaare der 5'-flankierenden Region ausgehend von der Transkriptionsstartseite, wobei Gastrin über diese *cis*-regulatorischen Elemente unterschiedlich starke Effekte auf den jeweiligen Promotor

ausübt [Gerhard et al, 2001]. Die transkriptionelle gastrinvermittelte Regulation des humanen CgA Promotors war bisher nicht untersucht worden. In der vorliegenden Arbeit konnte anhand progressiver 5'-Deletionsanalysen in AGS-B Zellen gezeigt werden, dass der proximale hCgA Promotor bis Nukleotid -53 oberhalb des Transkriptionsstarts für die basale hCgA Promotoraktivität ausreichend und essentiell war, und auf der Präsenz des proximalen CRE zwischen den Nukleotiden -51 bis -45 beruhte. Im Bereich Nukleotid -260 bis -56 bp konnte ein weiterer in AGS-B zellspezifisch stark negativer *cis*-regulatorischer Bereich mit einer 15-fachen Veränderung der Promotoraktivität identifiziert werden, der durch Mutationsanalysen weiter zu charakterisieren bleibt. Im Gegensatz zu den BON-1 Zellen zeigte die putative AP-1 DNA-Bindungsstelle bei Nukleotid -560 in AGS-B Zellen keine funktionelle Relevanz in der basalen hCgA Transkription.

Höcker und Mitarbeiter konnten in AGS-B Zellen eine durch Gastrin vermittelte Stimulation des mCgA Promotors auf die Bereiche der Bindungsstellen für CREB und Egr-1/Sp1 im proximalen CgA Promotor zurückführen [Höcker et al, 1998; Raychowdhury et al, 2002]. Behinderung der Egr-1 Bindung reduzierte die Gastrinantwort, ohne die basale Promotoraktivität zu beeinflussen, während der Verlust der Sp1 und/oder CREB Bindung die basale und gastrinstimulierte mCgA Promotoraktivität erniedrigten [Raychowdhury et al 2002]. In einer Reihe von Genen konnten bisher Consensus-Sp1 Seiten überlappend mit Motiven für das Zinkfingerprotein Egr-1 als wichtige regulatorische Elemente identifiziert werden [Yan et al, 1997; Barroso und Santisteban, 1999; Khachigian et al, 1995; Khachigian et al, 1996]. Early growth response factor 1 (Egr-1) ist ein induzierbarer Zinkfinger Transkriptionsfaktor und gehört zu einer Gruppe von Genen, deren Expression durch verschiedene Signale einschließlich Wachstumshormonen, Hormonen und Neurotransmittern rasch und vorübergehend induziert werden können, während Sp1 ein ubiquitär vorkommender Transkriptionsfaktor ist [Barroso et al 1999; Yan et al, 1997, Khachigian et al, 1996]. Überlappende Sp1/Egr-1 Elemente erlauben beiden Transkriptionsfaktoren, zur Regulation der Gentranskription an ihre Erkennungssequenzen zu binden und funktionell zu interagieren. Durch Transfac-Sequenzanalyse [Heinemeyer et al, 1999] konnte in der vorliegenden Arbeit im humanen CgA Promotor ein zuvor nicht erkanntes überlappendes Egr-1/Sp1

Erkennungsmotiv oberhalb der CRE Seite zwischen Nukleotid -69 und -56 identifiziert werden. Die potentielle Wichtigkeit dieser regulatorischen Promotorregion im CgA Gen wurde durch die evolutionäre Konservierung unterstrichen, wobei die Sp1 Bindungsseite in allen untersuchten Spezies identisch war, die überlappende Egr-1 Seite jedoch speziesspezifische Unterschiede aufwies. Obwohl die tripartite strukturelle Organisation auch im hCgA Promotor vorhanden war, zeigten die Transfektionsuntersuchungen in AGS-B Zellen, dass die CRE Konsensussequenz im proximalen hCgA Promotorbereich die basale und gastrinvermittelte Stimulation unabhängig der benachbarten Egr-1/Sp1 Bindungsseite vermittelte. Dieser speziesspezifische Unterschied könnte dadurch erklärt werden, dass die Egr-1/Sp1 Erkennungssequenzen im mCgA („GCGGGGGGGCGG“) und hCgA Promotor („GGGAAGGGGCGG“) in ihrer Sequenz variieren, wobei die murine Egr-1 Seite mit der Konsensussequenz in 72% übereinstimmte, die humane Egr-1 Seite nur mit 63%. Untersuchungen zur gastrinvermittelten Aktivierung eines CRE Promotors gaben Hinweise darauf, dass die Signaltransduktionsmechanismen vom CRE Promotorkontext des CgA Promotors abhängig waren [Thommesen et al, 2001]. Die der humanen Egr-1/Sp1 Seite und CRE Seite benachbart liegenden putativen Transkriptionsfaktorbindungsseiten in der Promotorsequenz könnten daher die speziesspezifischen Unterschiede beeinflusst haben.

Im Gegensatz zu den humanen Magenkarzinomzellen AGS-B konnte in BON-1 Zellen keine Wirkung von Gastrin weder auf die humane noch murine CgA Promotoraktivität nachgewiesen werden. Für diese zelltypspezifische gastrinabhängige Promotoraktivierung gibt es mehrere mögliche Erklärungen. Die Ergebnisse könnten Ausdruck einer zellspezifischen gastrinabhängigen Regulation des CgA Promotors sein. Alternativ wäre in den eingesetzten BON-1 Zellen ein zu geringer Gastrinrezeptorbesatz als Ursache der ungenügenden transkriptionellen Aktivierung der CgA Reportergenkonstrukte nach Gastrinstimulation denkbar. Bezüglich der Expression von funktionellen CCK-B/Gastrinrezeptoren auf BON-1 Zellen gibt es widersprüchliche Untersuchungen. Während Evers und Mitarbeiter [Evers et al, 1991] sowie Szabo und Mitarbeiter [Szabo et al, 2000] auf BON-1 Zellen funktionelle CCK-B/Gastrinrezeptoren nachweisen konnten, war dies Kim und Mitarbeitern nicht möglich [Kim et al, 1997], so dass die fehlende Gastrinstimulation des CgA Promotors in

BON-1 Zellen auch durch das Fehlen funktioneller CCK-B/Gastrinrezeptoren oder Alterationen der gastrinvermittelten Signaltransduktion bedingt sein könnte. Die Beobachtung, dass das pSV- β -Galaktosidase-Reportergenkonstrukt nur in AGS-B-Zellen, jedoch nicht in BON-1 Zellen durch Gastrin stimulierbar war, unterstützt diese Möglichkeit.

Der unter der Kontrolle des CMV Promotors stehende pSV- β -Galaktosidasevektor konnte in den Versuchen zur gastrinabhängigen Regulation nicht als interne Transfektionskontrolle eingesetzt werden, da er durch Gastrin stimuliert wurde. Dies weist darauf hin, dass beim Einsatz von β -Galaktosidase-Reportergenkonstrukten zur Normalisierung der Transfektionseffizienz die Stimulierbarkeit des Kontrollvektors berücksichtigt werden muss, da dies ansonsten zu falschen Ergebnissen führen kann.

4.5. Regulation des Chromogranin A Promotors durch IGF-1

Insulin-like Growth Factor 1 (IGF-1) ist zusammen mit IGF-2, Nerve Growth Factor (NGF) sowie Relaxin Mitglied einer Proteinfamilie. Obwohl die Leber die Hauptquelle von IGF-1 ist, spielt IGF-1 in verschiedenen Zelltypen eine Rolle in Wachstum und Differenzierung, wo es autokrine und/oder parakrine Funktionen ausübt [Coolican et al, 1997; Valverde et al, 1997]. IGF-1 vermittelt seine Funktionen über den IGF Rezeptor Typ I, der dem Insulinrezeptor strukturell und funktionell ähnelt. IGF-1 Bindung führt zur Autophosphorylierung des Rezeptors und konsekutiver Phosphorylierung zytoplasmatischer Proteine. Die Wirkung von IGF-1 auf die Transkription wurde bisher in Rattenzellen anhand des mCgA Promotors untersucht [Pugazhenthii et al, 1999], wobei die konservierte CRE Seite in der proximalen Promotorregion für die transkriptionelle Aktivierung des CgA Gens in PC-12 Zellen wichtig war. Dies konnte durch Kotransfektion mit einem dominant negativ wirkenden CREB oder Deletionsmutation der CRE Seite signifikant, jedoch nicht vollständig blockiert werden. Es wurde daraus geschlossen, dass außer CREB weitere Faktoren an der Regulation von mCgA beteiligt sind und als mögliches Zeichen einer CREB unabhängigen IGF-1 Stimulation von CgA gewertet [Pugazhenthii et al, 1999]. Im Gegensatz zu diesen Ergebnissen führte die Behandlung mit IGF-1 in den humanen neuroendokrinen BON-1

Zellen nicht zu Veränderungen der transkriptionellen Aktivität des transient transfizierten humanen CgA Reportergenkonstruktes hCgALuc-2203/+32, das ein intaktes CRE Element beinhaltet. Aus Vorarbeiten war bekannt, dass IGF-1 als autokriner Regulator der Chromogranin A Sekretion und zellwachstumsstimulierender Faktor in BON-1 Zellen wirkt und somit funktionell aktive IGF-1 Rezeptoren aufweist [von Wichert et al, 2000]. Eine fehlerhafte IGF-1 induzierte Signaltransduktion kann daher in BON-1 Zellen für die fehlende transkriptionelle Aktivierung des humanen CgA Promotors nicht verantwortlich sein. Die murinen und humanen CgA Promotorsequenzen zeigen strukturelle Unterschiede, die trotz des konservierten CRE Elementes im proximalen Promotor diese Unterschiede in der transkriptionellen Regulation durch IGF-1 erklären könnten, zumal die IGF-1 Stimulation des mCgA auch unabhängig vom CRE erfolgte.

Aufgrund der bisherigen Kenntnisse ergibt sich die folgende in Abbildung 22 zusammengefasste schematische Übersicht der *cis*-regulatorischen Elemente des hCgA Promotorbereiches. Der hCgA Promotor enthält multiple positive und negative *cis*-regulatorische Elemente, die bei der Regulation der CgA Genexpression eine Rolle spielen. Oberhalb der Transkriptionsstartseite liegt eine sich überlappende Egr-1/Sp1-Erkennungssequenz, die möglicherweise eine Rolle bei der Verstärkung der transkriptionellen Aktivität spielt. Die proximale regulatorische Region (PRR) beinhaltet die TATA-Box, das CRE, eine überlappende Egr-1/Sp1 Bindungsseite sowie eine STAT3 Seite. Das proximale CRE vermittelt nicht nur neuroendokrin-spezifische, cAMP- und gastrinvermittelte Stimulation, sondern, wie in vorausgegangenen Untersuchungen ermittelt, auch Nikotin-, Retinolsäure-, Glukokortikoid- und PACAP-induzierte transkriptionelle Aktivierung des hCgA Gens [Tang et al, 1996; Gaetano et al, 1995; Taupenot et al, 1998; Tang et al, 1998; Rozansky et al, 1994]. Die distale regulatorische Region (DRR) enthält die in BON-1 Zellen ermittelte und in BEN Zellen berichtete transkriptionell relevante AP-1 Erkennungssequenz [Nolan et al, 1995]. Die proximale regulatorische Region (PRR) spielt für die basale, aber auch stimulierte Transkription von CgA eine wichtige Rolle, wobei möglicherweise die Transkriptionsfaktoren der PRR für die Bildung des Transkriptionskomplexes an der TATA Region von Bedeutung sind. Die distale regulatorische Region (DRR) führt in Abhängigkeit des Zelltyps zur Verstärkung der hCgA Transkription.

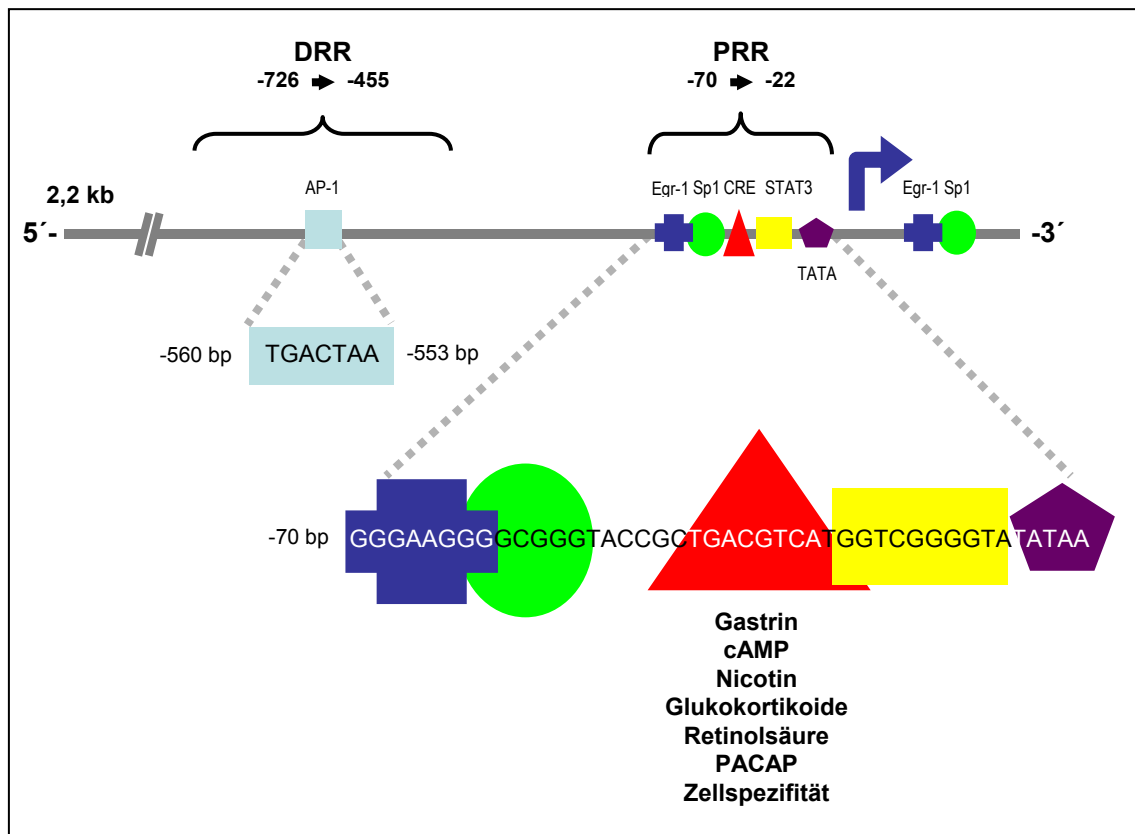


Abbildung 22: Schematische Übersicht des humanen Chromogranin A Promotors mit potentiellen *cis*-regulatorischen Elementen. Der Promotor wird in zwei Abschnitte unterteilt, die proximale regulatorische Region (PRR) und distale regulatorische Region (DRR), die Erkennungssequenzen für Transkriptionsfaktoren beinhalten, die farblich markiert sind (**Sp1**: Stimulating protein 1; **Egr-1**: Early growth response factor 1; **CRE**: cAMP response element; **STAT3**: Signal transducer and activator of transcription 3; **AP-1**: Activator protein 1; **TATA**: TATA-Box). Unterhalb des CRE sind CRE abhängige Stimulantien aufgeführt.

4.6. Funktionelle Expression des Effektorproteins Natriumjodidsymporter unter der Kontrolle des humanen Chromogranin A Promotors in neuroendokrinen Pankreastumorzellen

Die Expression des humanen Natriumjodidsymporters (hNIS) in neuroendokrinen Tumorzellen könnte eine Möglichkeit bieten, neuroendokrine Tumoren gentherapeutisch zu behandeln. Im Gegensatz zu den neuroendokrinen Tumoren können Patienten mit metastasierten Schilddrüsenkarzinomen durch Radiojodtherapie, basierend auf der Expression des Natriumjodidsymporters, der radioaktives Jod in den Tumorzellen akkumuliert und organifiziert, kurativ behandelt werden [Spitzweg et al, 2000]. Durch Expression des NIS können die Tumorzellen einer Radiojodtherapie zugänglich gemacht werden, indem sie befähigt werden, Jodid aufzunehmen und zu konzentrieren [Heufelder et al, 2001; Spitzweg et al, 2000]. Die Expression eines funktionell aktiven NIS nach Gentransfer wurde bereits in verschiedenen Tumorzelllinien, unter anderen vom malignen Melanom, Mammakarzinom, Leberkarzinom und Kolonkarzinom gezeigt [Cho et al, 2000; Boland et al, 2000; Mandell et al, 1999; Spitzweg et al, 1999; Haberkorn et al, 2001; Nakamoto et al, 2000; Shimura et al, 1997; Smit et al, 2001]. Um die Spezifität und Sicherheit einer solchen Therapie zu erhöhen, sollte das therapeutische Gen kontrolliert im Zielgewebe exprimiert werden. In der vorliegenden Arbeit wurde das NIS Gen unter der Kontrolle des Promotorfragmentes -722/+32 bp des humanen Chromogranin A in BON-1 Zellen durch Gentransfer eingebracht, um zellspezifische NIS Expression in den neuroendokrinen Tumorzellen zu gewährleisten. BON-1 Zellen wurden gewählt, da sie nativ zwar geringe Mengen NIS mRNA transkribieren, aber kein NIS Protein exprimieren (unpublizierte Daten A.E. Heufelder). Gewebespezifische NIS Expression konnte in vorausgegangenen Untersuchungen bereits durch den Einsatz des PSA Promotors erreicht werden, wodurch in einem *in vivo* Nacktmausmodell ein zytotoxischer Effekt der Radiojodtherapie in Prostatakarzinomxenografts erreicht werden konnte [Spitzweg et al, 2001]. Durch Transfer des hCgA-NIS Expressionskonstruktes wurde in der vorliegenden Arbeit eine transiente regulierte Expression von NIS unter Kontrolle des hCgA Promotorfragmentes in den

neuroendokrinen Pankreastumorzellen BON-1 erzielt. Die induzierte hNIS Aktivität war im Vergleich zur berichteten Internalisation in anderen Zelltypen niedriger, was am ehesten durch die in dieser Arbeit angewandte transiente Transfektion zu erklären ist. Die Untersuchungen in anderen Zelltypen wurden an Zelllinien mit stabil transfiziertem NIS-Konstrukt durchgeführt [Smit et al, 2001]. Die induzierte hNIS Aktivität führte zu einer Internalisation des radioaktiven ^{125}J in die genetisch modifizierten BON-1 Zellen, was durch Natriumperchlorat gehemmt werden konnte (siehe Abbildung 21, Kapitel 3.7). Anhand von *in vitro* Clonogenic Assays mit ^{131}J konnte mittlerweile auch an hCGA-NIS stabil transfizierten BON-1 und neuroendokrinen QGP-1 Zellen eine zytotoxische Zellreduktion durch Radiojodtherapie von fast 99% nachgewiesen werden [Schipper et al, 2003]. Das Konzept gilt es noch, in seiner *in vivo* Wirksamkeit an neuroendokrinen Pankreastumorzellxenografts zu bestätigen, was anhand der vorliegenden Daten vielversprechend scheint.

5. Zusammenfassung

Die Therapieoptionen zur Behandlung metastasierter neuroendokriner Tumore sind bisher ineffektiv. Der regulierte Gentransfer könnte eine weitere Möglichkeit eröffnen, metastasierte neuroendokrine Tumore zu behandeln. In der vorliegenden Arbeit wurde daher die transkriptionelle Regulation von Chromogranin A als Basis zur Gentherapie durch eine regulierte Genexpression in neuroendokrinen Tumorzellen untersucht. Chromogranin A (CgA) besitzt vielfältige Funktionen in der regulierten Sekretion von Peptidhormonen und Neurotransmittern. Es wird spezifisch in nahezu allen endokrinen und neuroendokrinen Zellen exprimiert und diagnostisch als Marker bei neuroendokrinen Tumorerkrankungen eingesetzt. Zur Identifizierung wichtiger cis-regulatorischer Elemente im humanen Chromogranin A Promotor wurde die 5'-flankierende Sequenz des hCgA Gens auf putative Transkriptionsfaktorbindungsseiten untersucht und eine Interspezieshomologie des humanen, bovinen, murinen und des Rattenchromogranin A Promotors erstellt. Es fand sich eine konservierte Sequenzhomologie in den proximalen Chromogranin A Promotorbereichen mit den putativen Transkriptionsfaktor-Bindungsseiten Egr-1/Sp1, CRE und TATA-Box. Untersuchungen zur zelltypspezifischen Regulation des Chromogranin A Promotors ergaben eine starke Expression von Chromogranin A in neuroendokrinen Pankreastumorzellen BON-1 und der Lungenkarzinomzelllinie EPLC 32M1, während sich nur eine geringe Expression in nicht neuroendokrinen Zelllinien wie z.B. der Fibroblastenzelllinie MSTO-211H zeigte. Die neuroendokrin-spezifische Regulation wurde im hCgA Promotor durch das im proximalen Promotorbereich gelegene CRE vermittelt. Ebenso konnte gezeigt werden, dass Gastrin und cAMP den hCgA Promotor über das CRE regulieren. Unter Anwendung des charakterisierten hCgA Promotors konnte die funktionelle Expression des Natriumjodidsymporters unter der Kontrolle des humanen CgA Promotors in BON-1 Zellen nachgewiesen werden. Dies bildet einen vielversprechenden neuen Therapieansatz, durch einen regulierten Gentransfer neuroendokrine Tumorzellen mittels einer Radiojodtherapie in Analogie zu Schilddrüsenkarzinomen zu behandeln.

6. Literaturverzeichnis

- Aardal, S., Helle, KB., Elsayed, S., Reed, RK., Serck-Hanssen, G. 1993. Vasostatins, comprising the N-terminal domain of chromogranin A, suppress tension in isolated human blood vessel segments. *J Neuroendocrinol* 5: 405-412
- Aardal, S., Helle, KB. 1992. The vaso-inhibitory activity of bovine chromogranin A fragment (vasostatin) and its independence of extracellular calcium in isolated segments of human blood vessels. *Regul Pept* 41: 9-18
- Al-azze, E., Dittrich, O., Vervoorts, J., Blin, N., Gott, P., Luscher, B.. 2002. Gastroprotective peptide trefoil factor family 2 gene is activated by upstream stimulating factor but not by c-Myc in gastrointestinal cancer cells. *Gut* 51(5): 685-90
- Anouar, Y., Benie, T., De Monti, M., Counis, R., Duval, J. 1991. Estradiol negatively regulates secretogranin II and chromogranin A messenger ribonucleic acid levels in the female rat pituitary but not in the adrenal. *Endocrinology* 129(5):2393-9
- Arnold, R., Simon, B. 2001. Endokrine Tumore des gastroenteropankreatischen Systems: Duodenale und pankreatische Gastrinome. In: *Praxis der Viszeralchirurgie, Band III*. M. Rothmund, J.R. Sievert, F. Harder (Hrsg.). Springer Verlag, Berlin-Heidelberg.
- Arnold, R., Simon, B. 2002. Apudome: Neuroendokrine Tumore des Gastrointestinaltraktes. In: *Klinische Onkologie*. H. Huber, W. Hiddemann, C.-R. Bartram (Hrsg.). Springer Verlag, Berlin-Heidelberg.
- Arnold, R., Trautmann, ME., Creutzfeldt, W., Benning, R., Benning, M., Neuhaus, C., Jurgensen, R., Stein, K., Schafer, H., Bruns, C., Dennler, HJ. 1996. Somatostatin analogue octreotide and inhibition of tumour growth in metastatic endocrine gastroenteropancreatic tumours. *Gut* 38: 430-8
- Barroso, I., Santisteban, P. 1999. Insulin-induced early growth response gene (Egr-1) mediates a short term repression of rat malic enzyme gene transcription. *J Biol Chem* 274 (25): 17997-8004
- Bepler, G., Koehler, A., Kiefer, P., Havemann, K., Beisenherz, K., Jaques-Gropp, C., Haeder, M. 1988. Characterization of the state of differentiation of six newly established human non-small-cell lung cancer cell lines. *Differentiation* 37: 158-71

- Boland, A., Ricard, M., Opolon, P., Bidart, JM., Yeh, P., Filetti, S., Schlumberger, M., Perricaudet, M.* 2000. Adenovirus-mediated transfer of the thyroid sodium/iodide symporter gene into tumors for a targeted radiotherapy. *Cancer Res* 60 (13): 3484-92
- Boukamp, P., Petrussevska, RT., Breitkreutz, D., Hornung, J., Markham, A., Fusenig, NE.* 1988. Normal keratinization in a spontaneously immortalized aneuploid human keratinocyte cell line. *JBC* 106: 761-771
- Bousquet, C., Melmed, S.* 1999. Critical role for STAT3 in murine pituitary adrenocorticotropin hormone leukemia inhibitory factor signaling. 1999. *JBC* 274: 10723-730
- Breathnach, R., Chambon, P.* 1981. Organisation and expression of eukaryotic split genes coding for proteins. *Annual Review of Biochemistry* 50: 349-383.
- Canaff, L., Bevan, S., Wheeler, D., Mouland, AJ, Rehfuss, RP., White, JH., Hendy, GN.* 1998. Analysis of molecular mechanisms controlling neuroendocrine cell specific transcription of the chromogranin A gene. *Endocrinology* 139:1184-96
- Chen, M., Schnermann, J., Smart, AM., Brosius, FC., Killen, PD., Briggs, JP.* 1993 Cyclic AMP selectively increases renin mRNA stability in cultured juxtaglomerular granular cells. *J Biol Chem* 268 (32): 24138-44
- Cho, JY., Xing, S., Liu, X., Buckwalter, TL., Hwa, L., Sferra, TJ., Chiu, IM., Jhiang, SM.* 2000. Expression and activity of human Na⁺/I⁻ symporter in human glioma cells by adenovirus-mediated gene delivery. *Gene Ther* 7 (9): 740-9
- Chung, JK.* 2002. Sodium iodide symporter: its role in nuclear medicine. *J Nucl Med* 43 (9): 1188-200
- Chupreta, S., Du, M., Todisco, A., Merchant, JL.* 2000. EGF stimulates gastrin promotor through activation of Sp1 kinase activity. *Am J Cell Physiol* 278: C697-C708
- Coolican, SA., Samuel, DS., Ewton, DZ., McWade, FJ., Florini, JR.* 1997. The mitogenic and myogenic actions of Insulin-like growth factors utilize distinct signaling pathways. *JBC* 272: 6653-62
- Cryer, PE., Wortsman, J., Shah, SD., Nowak, RM., Deftos, LJ.* 1991. Plasma chromogranin A as a marker of sympathochromaffin activity in humans. *Am J Physiol.* 260: E243-6

- Curry, WJ., Barkatullah, SC., Johansson, AN., Quinn, JG., Norlen, P., Connolly, CK., McCollum, AP., McVicar, CM. 2002. WE-14, a chromogranin a-derived neuropeptide. *Ann N Y Acad Sci* 971: 311-6
- Dachs, GU., Dougherty, GJ., Stratford, IJ., Chaplin, DJ. 1997. Targeting gene therapy to cancer: a review. *Oncol Res* 9 (6-7): 313-25
- Dai, G., Levy, O., Carrasco, N. 1996. Cloning and characterization of the thyroid iodide transporter. *Nature* 379: 458-60
- Darnell, JE. 1982. Variety in the level of gene control in eukaryotic cells. *Nature* 297: 365-71
- Defetos, L.J. 1991. Chromogranin A: its role in endocrine function and as an endocrine and neuroendocrine tumor marker. *Endocr Rev* 12: 181-7
- Deonarain, MP., Spooner, RA., Epenetos, AA. 1995. Genetic delivery of enzymes for cancer therapy. *Gene Ther* 2: 235-44
- Desmoucelles, C., Vaudry, H., Eiden, LE., Anouar, Y. 1999. Synergistic action of upstream elements and a promoter-proximal CRE is required for neuroendocrine cell-specific expression and second-messenger regulation of the gene encoding the human secretory protein secretogranin II. *Mol Cell Endocrinol* 157 (1-2): 55-66
- Drees, BM., Hamilton, JW. 1992. Pancreastatin and bovine parathyroid secretion. *Bone Min* 17: 335-46
- Drees, BM., Rouse, J., Johnson, J., Hamilton, JW. 1991. Bovine parathyroid glands secrete a 26-kDa-N-terminal fragment of chromogranin A which inhibits parathyroid cell secretion. *Endocrinology* 129: 3381-7
- Dynan, WS., Tjian, R. 1985. Control of eukaryotic messenger RNA synthesis by sequence specific DNA-binding proteins. *Nature* 316: 774-8
- Engert, JC., Berglund, EB., Rosenthal, N. 1996. Proliferation precedes differentiation in IGF-I stimulated myogenesis. *JBC* 135: 431-40
- Evers, BM., Townsend, CM., Upp, JR., Allen, E., Hurlbut, SC., Kim, SW., Rajaraman, S., Singh, P., Reubi, JC., Thompson, JC. 1991. Establishment and characterization of a human carcinoid in nude mice and effect of various agents on tumor growth. *Gastroenterology* 101: 303-11

- Fasciotto, BH., Gorr, S-U., De Franco, DJ., Levine, MA., Cohn, DV.* 1989. Pancreastatin, a presumed product of chromogranin A (secretory protein-1) processing, inhibits secretion from porcine parathyroid cells in culture. *Endocrinology* 125: 1617-22
- Fasciotto, BH., Trauss, CA., Greeley, GH., Cohn, DV.* 1993. Parastatin (porcine chromogranin A₃₄₇₋₄₁₉), a novel chromogranin A-derived peptide, inhibits parathyroid cell secretion. *Endocrinology* 133: 461-6
- Filetti, S., Bidart, JM., Arturi, F., Caillou, B., Russo, D., Schlumberger, M.* 1999. Sodium/iodide symporter: a key transport system in thyroid cancer cell metabolism. *Eur J Endocrinol* 141: 443-457
- Fischer-Colbrie, R., Gutierrez, J., Hsu, CM., Iacangelo, A., Eiden, LE.* 1990. Sequence analysis, tissue distribution and regulation by cell depolarization, and second messengers of bovine secretogranin II (chromogranin C) mRNA. *Biol Chem* 265 (16): 9208-13
- Gaetano, C., Manni, I., Bossi, G., Piaggio, G., Soddu, S., Farina, A., Helman, LJ., Sacchi, A.* 1995. Retinoic acid and cAMP differentially regulate human chromogranin A promoter activity during differentiation of neuroblastoma cells *Eur J Cancer* 31A (4): 447-52
- Galindo, E., Bader, MF., Aunis, D.* 1991. Regulation of chromogranin A and chromogranin B (secretogranin I) synthesis in bovine cultured chromaffin cells. *J Neuroendocrinol* 3: 669-77
- Gashler, AL., Swaminathan, S., Sukhatme, VP.* 1993. A novel repression module, an extensive activation domain, and a bipartite nuclear localization signal defined in the immediate-early transcription factor EGR-1. *Mol Cell Biol* 13: 4556-71
- Gerhard, M., Neumayer, N., Presecan-Siedel, E., Zanner, R., Lengyel, E., Cramer, T., Höcker, M., Prinz, C.* 2001. Gastrin induces expression and promoter activity of the vesicular monoamine transporter subtype 2. *Endocrinology* 142 (8): 3663-72
- Gonzalez, GA., Montminy, MR.* 1989. Cyclic AMP stimulates somatostatin gene transcription by phosphorylation of CREB at serine 133. *Cell* 59: 675-680

- Goodwin, GH., Partington, GA., Perkins, ND.* 1990. Sequence specific DNA binding proteins involved in gene transcription. In: Chromosomes: Eukaryotic, Prokaryotic and Viral (Adolph, KW., ed.) Vol.1, pp 31-85. Boca Raton, Florida; CRC Press.
- Graham, R., Gilman, M.* 1991. Distinct protein targets for signals acting at the c-fos serum response element. *Science* 251: 189-92
- Haberkorn, U., Henze, M., Altmann, A., Jiang, S., Morr, I., Mahmut, M., Peschke, P., Kubler, W., Debus, J., Eisenhut, M.* 2001. Transfer of the human NaI symporter gene enhances iodide uptake in hepatoma cells. *J Nucl Med* 42 (2): 317-25
- Harada, H., Kitagawa, M., Tanaka, N., Yamamoto, H., Harada, K., Ishihara, M., Taniguchi, T.* 1993. Anti-oncogenic and oncogenic potentials of interferon regulatory factors-1 and -2. *Science* 259:971-974
- Harris, JD., Gutierrez, AA., Hurst, HC., Sikora, K., Lemoine, NR.* 1994. Gene therapy for cancer using tumor-specific prodrug activation. *Gene Ther* 1: 170-75
- Hayashi, T., Usui, M., Nishioka, J., Zhang, ZX., Suzuki, K.* 1998. Regulation of the human protein C inhibitor gene expression in HepG2 cells: role of SP1 and AP2. *Biochem J* 332: 573-82
- Heinemeyer, T., Chen, X., Karas, H., Kel, AE., Kel, OV., Liebich, I., Meinhardt, T., Reuter, I., Schacherer, F., Wingender, E.* 1999. Expanding the TRANSFAC database towards an expert system of regulatory molecular mechanisms. *Nucleic Acids Res* 27 (1): 318-22
- Helman, LJ., Ahn, TG., Levine, MA., Allison, A., Cohen, PS., Cooper, MJ., Cohn, DV., Israel, MA.* 1988. Molecular cloning and primary structure of human chromogranin A (secretory protein I) cDNA. *J Biol Chem* 263 (23): 11559-63
- Hendy, GN., Bevan, S., Mattei, MG., Mouland, AJ.* 1995. Chromogranin A. *Clin Invest Med* 18 (1): 47-65
- Heufelder, AE., Morgenthaler, N., Schipper, ML., Joba, W.* 2001. Sodium iodide symporter-based strategies for diagnosis and treatment of thyroidal and nonthyroidal malignancies. *Thyroid* 11: 839-47
- Höcker, M., Cramer, T., O'Connor, DT., Rosewicz, S., Wiedenmann, B., Wang, TC.* 2001. Neuroendocrine-specific and gastrin-dependent expression of a chromogranin A-luciferase fusion gene in transgenic mice. *Gastroenterology* 121: 43-55

- Höcker, M., Raychowdhury, R., Plath, T., Wu, H., O'Connor, DT., Wiedenmann, B., Rosewicz, S., Wang, T.* 1998. Sp1 and CREB mediate gastrin-dependent Regulation of chromogranin A promoter activity in gastric carcinoma cells. *JBC* 273: 34000-7
- Huang, RP., Fan, Y., Ni, Z., Mercola, D., Adamson, ED.* 1997. Reciprocal modulation between SP1 and EGR-1. *J Cell Biochem* 66: 489-99
- Huttner, WB., Gerdes, HH., Rosa, P.* 1991. The granin (chromogranin/secretogranin) family. *Trends Biochem Sci* 16: 27-30
- Huttner, WB., Natori, S.* 1995. Regulated secretion. Helper proteins for neuroendocrine secretion. *Curr Biol* 5 (3): 242-5
- Hutton, JC., Davidson, HW., Grimaldi, KA., Peshavaria, M.* 1987. Biosynthesis of betagranin in pancreatic β -cells. *Biochem J* 244: 449-56
- Iacangelo, AL., Grimes, M., Eiden, LE.* 1991. The bovine chromogranin A gene: structural basis for hormone regulation and generation of biologically active peptides. *Mol Endocrinol* 5: 1651-60
- Ishiguro, H., Kim, KT., Joh, TH., Kim, KS.* 1993. Neuron-specific expression of the human dopamine beta-hydroxylase gene requires both the cAMP-response element and a silencer region. *J Biol Chem* 268 (24): 17987-94
- Jiang, JG., DeFrances, MC., Machen, J., Johnson, C., Zarnegar, R.* 2000. The repressive function of AP2 transcription factor on the hepatocyte growth factor gene promoter. *Biochem Biophys Res Comm* 272: 882-6
- Jiang, Q., Taupenot, L., Mahata, SK., Mahata, M., O'Connor, DT, Miles, LA., Parmer, R.* 2001. Proteolytic cleavage of chromogranin A by plasmin: selective liberation of a specific bioactive CgA fragment that regulates catecholamine release. *JBC*
- Khachigian, LM., Lindner, V., Williams, AJ., Collins, T.* 1996. Egr-1-induced endothelial gene expression: a common theme in vascular injury. *Science* 271 (5254): 1427-31
- Khachigian, LM., Williams, AJ., Collins, T.* 1995. Interplay of Sp1 and Egr-1 in the proximal platelet-derived growth factor A-chain promoter in cultured vascular endothelial cells. *J Biol Chem* 270 (46): 27679-86

- Kim, HJ., Evers, BM., Banker, NA., Hellmich, MR., Townsend, CM Jr.* 1997. A functional in vitro model to examine signaling mechanisms in gastrin-mediated human cell growth. *J Gastrointest Surg* 1 (1): 69-77
- Kloppel, G., Heitz, PU., Capella, C., Solcia, E.* 1996. Pathology and nomenclature of human gastrointestinal neuroendocrine (carcinoid) tumors and related lesions. *World J Surg* 20(2): 132-41
- Kulke, HK., Mayer, RJ.* 1999. Carcinoid tumors. *NEJM* 340: 858-68
- Laybourn, PJ., Kadonaga, JT.* 1991. Role of nucleosomal cores and histone H1 in regulation of transcription by RNA polymerase II. *Science* 254 (5029): 238-45
- Le Treut, YP., Delpero, JR., Dousset, B., Cherqui, D., Segol, P., Manton, G., Hannoun, L., Benhamou, G., Launois, B., Boillot, O., Domergue, J., Bismuth, H.* 1997. Results of liver transplantation in the treatment of metastatic neuroendocrine tumors. A 31-case French multicentric report. *Ann Surg* 225: 355-64
- Levine, MA., Dempsey, MA., Helman, LJ., Ahn, TG.* 1990. Expression of chromogranin-A messenger ribonucleic acid in parathyroid tissue from patients with primary hyperparathyroidism. *J Clin Endocrinol Metab* 70: 1668-73.
- Lewis, MK., Burgess, RR.* 1982. Eukaryotic RNA polymerases In: *The enzymes*, Vol. 15 (Boyer, P., ed.) pp. 109-153. New York: Academic Press.
- Mahata, SK., Mahata, M., Livsey, CV., Gerdes, HH., Huttner, WB., O'Connor, DT.* 1999. Neuroendocrine cell type-specific and inducible expression of the secretogranin II gene: crucial role of cyclic adenosine monophosphate and serum response elements. *Endocrinology* 140 (2): 739-49
- Mahata, SK., Mahata, M., Wu, H., Parmer, RJ., O'Connor, DT.* 1998. Neurotrophin activation of catecholamine storage vesicle protein gene expression: signaling to chromogranin A biosynthesis. *Neuroscience* 88: 405-424.
- Mandell, RB., Mandell, LZ., Link, CJ. Jr.* 1999. Radioisotope concentrator gene therapy using the sodium/iodide symporter gene. *Cancer Res* 59 (3): 661-8
- Mangelsdorf, DJ., Thummel, C., Beato, M., Herrlich, P., Schutz, G., Umesono, K., Kastner, P., March, M., Chambon, P., Evans, RM.* 1995. The nuclear receptor superfamily: the second decade. *Cell* 83: 835-39

- Maniatis, T., Fritsch, EF., Sambrook, J.* 1982. Molecular Cloning – A Laboratory Manual. Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor.
- Mazzaferrri, EL.* 1996. Carcinoma of follicular epithelium: radioiodine and other treatments and outcomes. In: L.E. Braverman and R.D. Utiger (eds.), The Thyroid: A fundamental and clinical Text. Philadelphia: Lippincott-Raven. pp. 922-45
- McCarthy, KE., Woltering, EA., Espenan, GD., Cronin, M., Maloney, TJ., Anthony, LB.* 1998. In situ radiotherapy with ¹¹¹In-pentetreotide: initial observations and future directions. *Cancer J Sci Am* 4: 94-102
- McMahon, A., Sabban, EL.* 1992. Regulation of expression of dopamine beta-hydroxylase in PC12 cells by glucocorticoids and cyclic AMP analogues. *J Neurochem* 59 (6): 2040-7
- Memon, MA., Nelson, H.* 1997. Gastrointestinal carcinoid tumors: current management strategies. *Dis Colon Rectum* 40: 1101-18
- Metz, DC., Jensen, RT.* 1995. Advances in gastric antisecretory therapy in Zollinger-Ellison-Syndrome. In: Mignon M., Jensen, RT. Endocrine tumours of the pancreas, frontiers of gastrointestinal research, Karger, Basel 23: 240-57
- Meyer, TE., Habener, JF.* 1993. Cyclic adenosine 3',5'-monophosphate response element binding protein (CREB) and related transcription-activating deoxyribonucleic acid-binding proteins. *Endocr Rev* 14 (3): 269-90
- Mignon, M.* 2000. Natural history of neuroendocrine enteropancreatic tumors. *Digestion* 62 (Suppl. 1): 51-58
- Miller, CP., Lin, JC., Habener, JF.* 1993. Transcription of the rat glucagon gene by the cyclic AMP response element-binding protein CREB is modulated by adjacent CREB-associated proteins. *Mol Cell Biol* 13 (11): 7080-90
- Moattari, AR., Deftos, LJ., Vinik, AI.* 1989. Effects of sandostatin on plasma chromogranin-A levels in neuroendocrine tumours. *J Clin Endocrinol Metab* 69: 902-905
- Modlin, IM., Sandor, A.* 1997. An analysis of 8305 cases of carcinoid tumors. *Cancer* 79: 813-29

- Moertel, CG., Kvols, LK., O'Connell, MJ., Rubin, J.* 1991. Treatment of neuroendocrine carcinomas with combined etoposide and cisplatin: evidence of major therapeutic activity in the anaplastic variants of these neoplasms. *Cancer* 68: 227-32
- Montminy, MR., Sevarno, KA., Wagner, JA., Mondel, G., Goodman, RH.* 1986. Identification of a cyclic AMP responsive element within the rat somatostatin gene. *PNAS* 86: 6682-6
- Mouland, AJ., Bevan, S., White, JH., Hendy, GN.* 1994. Human Chromogranin A Gene: Molecular cloning, structural analysis, and neuroendocrine cell-specific expression. *JBC* 269: 6918-26
- Nagasawa, T., Takeda, T., Minemura, K., DeGroot, LJ.* 1997. Oct-1, silencer sequence, and GC box regulate thyroid hormone receptor β 1 promoter. *Mol Cell Biol* 130: 153-65
- Nagata, A., Ito, M., Iwata, N., Kuno, J., Takano, H., Minowa, O., Chihara, K., Matsui, T., Noda, T.* 1996. G protein-coupled cholecystokinin-B/gastrin receptors are responsible for physiological cell growth of the stomach mucosa in vivo. *Proc Natl Acad Sci* 93 (21): 11825-30
- Nakamoto, Y., Saga, T., Misaki, T., Kobayashi, H., Sato, N., Ishimori, T., Kosugi, S., Sakahara, H., Konishi, J.* 2000. Establishment and characterization of a breast cancer cell line expressing Na⁺/I⁻ symporters for radioiodide concentrator gene therapy. *J Nucl Med* 41 (11): 1898-904
- Nobels, FRE., Kwerkkeboom, DJ., Coopmans, W., Hoekstra, R., De Herder, WW., Bouillon, R., Lamberts, SWJ.* 1993. A comparison between the diagnostic value of gonadotropins, α -subunit, and chromogranin-A and their response to thyrotropin-releasing hormone in clinically non-functioning, α -subunit-secreting, and gonadotropin pituitary adenomas. *J Clin Endocrinol Metab* 77: 784-9
- Nolan, EM., Cheung, TC., Burton, DW., Deftos, LJ.* 1995. Identification and characterization of a neuroendocrine-specific 5'-regulatory region of the human chromogranin A gene. *Endocrinology* 136: 5632-8

- Nolan, EM., Cheung, TC., Burton, DW., Deftos, LJ.* 1996. Transcriptional regulation of the human chromogranin A gene by its 5' distal regulatory element: novel effects of orientation, structure, flanking sequences and position on expression. *Mol Cell Endocrinology* 124: 51-62
- Nolan, EM., Helman, LJ., Deftos, LJ.* 1994. Cloning of the human chromogranin A promoter and identification of a sequence that possesses enhancer-like activity. *Endocr J* 2: 891-97
- Nyati, MK., Sreekumar, A., Li, S., Zhang, M., Rynkiewicz, SD., Chinnaiyan, AM., Rehemtulla, A., Lawrence, TS.* 2002. High and Selective Expression of Yeast Cytosine Deaminase under a Carcinoembryonic Antigen Promoter-Enhancer. *Cancer Res* 62: 2337-42
- O'Connor, DT., Bernstein, KN.* 1984. Radioimmunoassay of chromogranin A in plasma of exocytotic sympathoadrenal activity in normal subjects and patients with pheochromocytoma. *N Engl J Med* 311: 764-70
- O'Connor, DT., Pandian, MR., Carlton, E., Cervenka, JH., Hsiao, RJ.* 1989. Rapid radioimmunoassay of circulating chromogranin A: in vitro stability, exploration of the neuroendocrine character of neoplasia, an assessment of the effects of organ failure. *Clin Chem* 35: 1631-7
- Öberg, K.* 2000. Interferon in the management of neuroendocrine GEP-tumours. *Digestion* 62 (Suppl 1): 92-97
- Orr, DF., Chen, T., Johnsen, AH., Chalk, R., Buchanan, KD., Sloan, JM., Rao, P., Shaw, C.* 2002. The spectrum of endogenous human chromogranin A-derived peptides identified using a modified proteomic strategy. *Proteomics* 11: 1586-600
- Otte, A., Mueller-Brand, J., Dellas, S., Nitzsche, EU., Herrmann, R., Maecke, HR.* 1998. Yttrium-90-labelled somatostatin-analogue for cancer treatment. *Lancet* 351: 417-8
- Pesce, CG., Nogues, G., Alonso, CR., Baralle, FE., Kornblihtt, AR.* 1999. Interaction between the (-170) CRE and the (-150) CCAAT box is necessary for efficient activation of the fibronectin gene promoter by cAMP and ATF-2. *FEBS Lett* 457 (3): 445-51

- Peterson, JB., Nelson, DL., Ling, E., Hogue-Angeletti, R.* 1987. Chromogranin A-like proteins in the secretory granules of protozoan, *Paramecium tetraurelia*. *JBC* 262: 17264-7
- Plath, T., Höcker, M., Riecken, E.-O., Wand, TC., Wiedenmann, B., Rosewicz, S.* 1999. Interferon- α inhibits chromogranin A promoter activity in neuroendocrine pancreatic cancer cells. *FEBS Letters* 458: 378-82
- Pohl, TM., Phillips, E., Song, KY., Gerdes, HH., Huttner, WB., Ruther, U.* 1990. The organisation of the mouse chromogranin B (secretogranin I) gene. *FEBS Lett* 262 (2): 219-24
- Pugazhenti, S., Boras, T., O'Connor, DT., Meintzer, MK., Heidenreich, KA., Reusch, JE.-B.* 1999. Insulin-like growth factor I-mediated activation of the transcription factor cAMP response element-binding protein in PC12-cells. *JBC* 274: 2829-37
- Raychowdhury, R., Schafer, G., Fleming, J., Rosewicz, S., Wiedenmann, B., Wang, TC., Höcker, M.* 2002. Interaction of Early Growth Response Protein 1 (Egr-1), Specificity Protein 1 (Sp1), and Cyclic Adenosine 3'5'-Monophosphate Response Element Binding Protein (CREB) at a Proximal Response Element Is Critical for Gastrin-Dependent Activation of the Chromogranin A Promoter. *Mol Endocrinol* 16(12): 2802-18
- Rindi, G., Capella, C., Solcia, E.* 1998. Cell biology, clinicopathological profile, and classification of gastro-enteropancreatic endocrine tumors. *J Mol Med* 76(6): 413-20
- Rindi, G., Villanacci, V., Ubiali, A.* 2000. Biological and molecular aspects of gastroenteropancreatic neuroendocrine tumors. *Digestion* 62 Suppl. 1: 19-26
- Roesler, WJ.* 2000. What is a cAMP response unit? *Mol Cell Endocrinol* 162 (1-2): 1-7
- Rosenberg, D., Groussin, L., Bertagna, X., Bertherat, J.* 2002. cAMP pathway alterations from the cell surface to the nucleus in adrenocortical tumors. *Endocr Res* 28 (4): 765-75
- Rougier, P., Mitry, E.* 2000. Chemotherapy in the treatment of neuroendocrine malignant tumors. *Digestion* 62 (Suppl. 1): 73-78
- Rozansky, DJ., Wu, H., Tang, K., Parmer, RJ., O'Connor, DT.* 1994. Glucocorticoid activation of chromogranin A gene expression. Identification and characterization of a novel glucocorticoid response element. *J Clin Invest* 94: 2357-68

- Russell, J., Gee, P., Liu, SM., Angeletti, RH.* 1994. Inhibition of parathyroid hormone secretion by amino-terminal chromogranin peptides. *Endocrinology* 135 (1): 337-42
- Sanger, F., Nicklen, S., Coulson, AR.* 1977. DNA sequencing with chain terminating inhibitors. *PNAS* 74: 5463-67
- Schimmel, A., Braunling, O., Ruther, U., Huttner, WB., Gerdes, HH.* 1992. The organisation of the mouse secretogranin II gene. *FEBS Lett* 314 (3): 375-80
- Schipper, ML., Weber, A., Béhé, M., Göke, R., Joba, W., Schmidt, H., Simon, B., Bert, T., Arnold, R., Heufelder, AE., Behr, TM.* 2003. Radioiodide treatment following sodium iodide symporter (NIS) gene transfer is a highly effective therapy in neuroendocrine tumor cells. *Cancer Research*. Eingereicht.
- Schmidt-Wolf, GD., Schmidt-Wolf, IGH.* 1996. Cancer and gene therapy. *Ann Hematol* 73: 207-18
- Serfling, E., Jason, M., Schaffner, W.* 1985. Enhancer and eukaryotic gene transcription. *TIG* 1: 224-230
- Shaulian, E., Karin, M.* 2002. AP-1 as a regulator of cell life and death. *Nat Cell Biol* 4(5): E131-6
- Shaywitz, AJ., Greenberg, ME.* 1999. CREB: a stimulus-induced transcription factor activated by a diverse array of extracellular signals. *Annu Rev Biochem* 68: 821-61
- Shimura, H., Haraguchi, K., Miyazaki, A., Endo, T., Onaya, T.* 1997. Iodide uptake and experimental ¹³¹I therapy in transplanted undifferentiated thyroid cancer cells expressing the Na⁺/I⁻ symporter gene. *Endocrinology* 138 (10): 4493-6
- Siders, WM., Halloran, PJ., Fenton, RG.* 1998. Melanoma-specific cytotoxicity induced by a tyrosinase promoter-enhancer/herpes simplex virus thymidine kinase adenovirus. *Cancer Gene Ther* 5: 281-91
- Simon, B., Bartsch, D., Rieder, H., Joseph, K., Rothmund, M., Arnold, R.* 2000. Multiple endokrine Neoplasie Typ 1: Stand der Diagnostik und Tumorprävention. *Deutsches Ärzteblatt* 97 (11): A698-A704
- Simon, B., Eissele, R., Czornik, M., Swarovsky, B., Arnold, R.* 1995. Effect of gastrin receptor blockade on gastrin and histidine decarboxylase gene expression in rats during achlorhydria. *Scand J Gastroenterol* 30(6): 503-10

- Simon, B., Wattler, F., Merchant, JL., Münch, K., Schutze, HJ., Suske, G., Arnold, R.* 1997. RAP1-like binding activity in islet cells corresponds to members of the Sp1 family of transcription factors. *FEBS Lett* 411(2-3): 383-8
- Simon, JP., Bader MF., Aunis, D.* 1988. Secretion vom chromaffin cells is controlled by chromogranin A-derived peptides. *PNAS* 85: 1712-6
- Simon, JP., Bader MF., Aunis, D.* 1989. Effect of secretagogues on chromogranin A synthesis in bovine cultured chromaffin cells. Possible regulation by proteinkinase C. *Biochem J* 260: 915-22.
- Smanik, PA., Liu, Q., Furminger, TL., Ryu, K., Xing, S., Mazzaferri, EL., Jhiang, SM.* 1996. Cloning of the human sodium iodide symporter. *Biochem Biophys Res Comm* 226: 339-45
- Smit, JW., Schroder-van der Elst, JP., Karperien, M., Que, I., Romijn, JA., van der Heide, D.* 2001. Expression of the human sodium/iodide symporter (hNIS) in xenotransplanted human thyroid carcinoma. *Exp Clin Endocrinol Diabetes* 109 (1): 52-5
- Sobol, RE., Memoli, V., Deftos LJ.* 1989. Hormone-negativ, chromogranin A-positive endocrine tumours. *N Engl J Med* 320: 444-7
- Sobol, RE., O'Connor, DT., Addison, J., Suchocki, K., Royston, I., Deftos, LJ.* 1986. Elevated serum chromogranin A concentrations in small-cell lung carcinoma. *Ann Intern Med* 105: 698-700
- Solcia, E., Klöppel, G., Sobin, LH.* 2000. Histological typing of endocrine tumours. International histological classification of tumours, 2nd Edition Springer, Berlin, Heidelberg, New York.
- Spitzweg, C., Heufelder, AE., Morris, JC.* 2000. Thyroid iodine transport. *Thyroid* 10: 321-30
- Spitzweg, C., O'Connor, MK., Bergert, ER., Tindall, DJ., Young, CYF., Morris, JC.* 2000. Treatment of prostate cancer by radioiodine therapy after tissue-specific expression of sodium iodide symporter. *Cancer Res* 60: 6526-30

- Spitzweg, C., Zhang, S., Bergert, ER., Castro, MR., McIver, B., Heufelder, AE., Tindall, DJ., Young, CY., Morris, JC.* 1999. Prostate-specific antigen (PSA) promoter-driven androgen-inducible expression of sodium iodide symporter in prostate cancer cell lines. *Cancer Res* 59 (9): 2136-41
- Stabile, BE., Howard, TJ., Passaro, E., O'Connor, DT.* 1990. Source of plasma chromogranin A elevation in gastrinoma patients. *Arch Surg* 125: 451-3
- Szabo, I., Rumi, G., Bodis, B., Nemeth, P., Mozsik, G.* 2000. Gastrin and pentagastrin enhance the tumour proliferation of human stable cultured gastric adenocarcinoma cells. *J Physiol Paris* 94 (1): 71-4
- Tang, K., Wu, H., Mahata, SK., O'Connor, DT.* 1998. A crucial role for the mitogen-activated protein kinase pathway in nicotinic cholinergic signaling to secretory protein transcription in pheochromocytoma cells. *Mol Pharmacol* 54 (1): 59-69
- Tang, K., Wu, H., Mahata, SK., Taupenot, L., Rozansky, DJ., Parmer, RJ., O'Connor, DT.* 1996. Stimulus-transcription coupling in pheochromocytoma cells. *JBC* 271: 28382-90
- Tatemoto K., Efendic S., Mutt V., Makk G., Feistner GJ., Barchas JD.* 1986. Pancreastatin, a novel pancreatic peptide that inhibits insulin secretion. *Nature* 324: 476-8
- Taupenot, L., Mahata, SK., Wu, H., O'Connor, DT.* 1998. Peptidergic activation of transcription and secretion in chromaffin cells. Cis and trans signaling determinants of pituitary adenylyl cyclase-activating polypeptide (PACAP). *J Clin Invest* 101 (4): 863-76
- Thiagalingam, A., de Bustros, A., Borges, M., Jasti, R., Compton, D., Diamond, L., Mabry, M., Ball, DW., Baylin, SB., Nelkin, BD.* 1996. RREB-1, a novel zinc finger protein, is involved in the differentiation response to ras in human medullary thyroid carcinomas. *Mol Cell Biol* 16: 5335-45
- Thommesen, L., Hofslie, E., Paulssen, RH., Anthonsen, MW., Laegreid, A.* 2001. Molecular mechanisms involved in gastrin-mediated regulation of cAMP-responsive promoter elements. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 281 (6): E1316-25

- Thompson, ME., Valentine, DL., Strada, SJ., Wagner, JA., Scammell, JG.* 1994. Transcriptional regulation of secretogranin II and chromogranin B by cyclic AMP in a rat pheochromocytoma cell line. *Mol Pharmacol* 46 (5): 880-9
- Thompson, ME., Zimmer, WE., Wear, LB., MacMillan, LA., Thompson, WJ., Huttner, WB., Hidaka, H., Scammell, JG.* 1992. Differential regulation of chromogranin B/secretogranin I and secretogranin II by forskolin in PC12 cells. *Brain Res Mol Brain Res* 12 (1-3): 195-202
- Tilling, N., Ricke, J., Wiedenmann, B.* 2002. Neuroendokrine Tumoren des gastroenteropankreatischen Systems (GEP-NET). *Internist* 43: 210-18
- Tolón, RM., Castillo, AL., Aranda, A.* 1998. Activation of the prolactin gene by peroxisome proliferator-activated receptor- α appears to be DNA binding-independent. *JBC* 273: 26652-61
- Valverde, AM., Lorenzo, M., Navarro, P., Benito, M.* 1997. Phosphatidylinositol 3-kinase is a requirement for insulin-like growth factor I-induced differentiation, but not mitogenesis, in fetal brown adipocytes. *Mol Endocrinol* 11: 595-607
- Vile, RG., Hart, IR.* 1993. Use of tissue-specific expression of the herpes simplex virus thymidine kinase gene to inhibit growth of established murine melanomas following direct intratumoral injection of DNA. *Cancer Res* 53: 3860-4
- von Wichert, G., Jehle, PM., Hoeflich, A., Koschnick, S., Dralle, H., Wolf, E., Wiedenmann, B., Boehm, BO., Adler, G., Seufferlein, T.* 2000. Insulin-like growth factor-I is an autocrine regulator of chromogranin A secretion and growth in human neuroendocrine tumor cells. *Cancer Res* 60(16): 4573-81
- Wingender, E., Chen, X. Hehl, R., Karas, H., Liebich, I., Matys, V., Meinhardt, T., Pruss, M., Reuter, I., Schacherer, F.* 2000. An integrated system for gene expression regulation. *Nucleic Acids Research* 28: 316-9.
- Winkler, H., Fischer-Colbrie, R.* 1992. The chromogranins A and B: the first 25 years and future perspectives. *Neuroscience* 49: 497-528
- Wu, HJ., Mahata, SK., Mahata, M., Webster, NJG., Parmer, R., O'Connor, DT.* 1995. A functional cyclic AMP response element plays a crucial role in neuroendocrine cell type-specific expression of the secretory granule protein chromogranin A. *J Clin Invest.* 96: 568-78

- Wu, HJ., Rozansky, DJ., Parmer RJ., Gill, BM., O'Connor, DT.* 1991. Structure and function of the chromogranin A gene. *JBC* 266: 13130-4
- Wu, HJ., Rozansky, DJ., Webster NJG., O'Connor, DT.* 1994. Cell-type specific expression in the neuroendocrine system. *J Clin Invest* 94: 118-29
- Yan, YX., Nakagawa, H., Lee, MH., Rustgi, AK.* 1997. Transforming growth factor-alpha enhances cyclin D1 transcription through the binding of early growth response protein to a cis-regulatory element in the cyclin D1 promoter. *J Biol Chem* 272 (52): 33181-90

7. Anhang

7.1. Verwendete Abkürzungen

A ₂₆₀	Absorption bei 260 nm
Aa.	Aminosäuren
A, C, G, T	Adenin, Cytosin, Guanin, Thymin
AP-1	Aktivatorprotein 1
AP-2	Aktivatorprotein 2
APS	Ammoniumpersulfat
β-Gal	β-Galaktosidase
bp	Basenpaare
Bq	Bequerel
BSA	bovines Serumalbumin
bzw.	beziehungsweise
cAMP	zyklisches Adenosinmonophosphat
CAT	Chloramphenicol-Acetyl-Transferase
CgA	Chromogranin A
Ci	Curie
CRE	cAMP response element
CREB	cAMP response element binding protein
Da	Dalton
ddNTP	Didesoxynukleotidtriphosphat
DEAE	Diethylaminoglethan
DEPC	Diethylpyrocarbonat
d.h.	das heißt
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle Medium
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoxynukleotidtriphosphat
DRE	Distal regulatorisches Element
DRR	Distal regulatorische Region
DTT	Dithiothreitol

EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EGF	Epidermal growth factor
Egr-1	Early growth response gene 1
EtBr	Ethidiumbromid
EtOH	Ethanol
FCS	fötales Kälberserum
GRE	Glucocorticoid response element
h	Stunde
HSE	heat-shock promotor element
HSVtk	Herpes Simplex Thymidinkinase
IGF-1	Insulin-like growth factor I
kb	Kilobasen
KDa	Kilodalton
luc	Luciferase
M	Molar
MAPK	mitogen-activated proteinkinase
min	Minute
mg	milligramm
µg	mikrogramm
µl	mikroliter
mRNA	messenger RNA
NaNH ₄ Oac	Natriumammoniumacetat
NET	neuroendokriner Tumor
NGF	Nerve growth factor
NIS	Natriumiodidsympporter
Nn	Nukleotide
Nt	Nukleotid
NTP	Nukleotidtriphosphat
OD	optische Dichte
OCT-1	Octamer factor 1
PAA	Polyacrylamid
PAGE	Polyacrylamidgelelektrophorese
PBS	Phosphat-buffered Saline

PCI	Phenol/Chloroform/Isoamylalkohol
PCR	Polymerase Kettenreaktion
PEG	Polyethylenglykol
PKA	Proteinkinase A
PKC	Proteinkinase C
PPAR/RXR	Peroxisome proliferator-activated receptors/retinoic x receptor
P/S	Penicillin/Streptomycin
RLU	Relative Light Units
RNA	Ribonukleinsäure
rpm	rounds per minute = Umdrehungen/Min
RPMI	Roswell Park Memorial Institute
RREB-1	Ras-responsive element binding protein 1
RT	Raumtemperatur
s.	siehe
sec	Sekunde
SRF	Serum response factor
SMS	Somatostatin
Sp1	Stimulating Protein 1
s.o.	siehe oben
STAT3	Signal transducer and activator of transcription
s.u.	siehe unten
TBE	Tris-Bor-EDTA-Puffer
TE	Tris-EDTA-Puffer
TEMED	N,N,N',N',Tetramethylethylendiamin
Tris-Cl	Tris-Hydroxymethyl-Aminomethan/HCl
U	Unit = Einheit enzymatischer Aktivität
USF	Upstream stimulating factor
UV	Ultraviolett
z.B.	zum Beispiel

7.2. Publikationen

Bert, T., Lubomierski, N., Gangsaue, S., Münch, K., Printz, H., Prasnikar, N., Robbel, C., Simon, B. 2002. Expression spectrum and methylation-dependent regulation of melanoma antigen-encoding gene family members in pancreatic cancer cells. *Pancreatology* 2(2):146-54

Lubomierski, N., Kersting, M., Bert, T., Münch, K., Wulbrand, U., Schuermann, M., Bartsch, D., Simon, B. 2001. Tumor suppressor genes in the 9p21 gene cluster are selective targets of inactivation in neuroendocrine gastroenteropancreatic tumors. *Cancer Res.* 61(15):5905-10

Schipper, ML., Weber, A., Béhé, M., Göke, R., Joba, W., Schmidt, H., Simon, B., Bert, T., Arnold, R., Heufelder, AE., Behr, TM. 2003. Radioiodide treatment following sodium iodide symporter (NIS) gene transfer is a highly effective therapy in neuroendocrine tumor cells. *Cancer Research*. In Druck.

Abstracts:

Bert, T., Hoormann, S., Münch, K., Kalff-Suske, M., Simon, B. 2001. Klonierung und Charakterisierung von Claudin-2, einem in Pankreaskarzinomzellen inaktivierten integralen Tight Junction Membranprotein. *Z.f.Gastroenterologie* 39: P687

Bert, T., Münch, K., Klingenspor, M., Berriel Diaz, M., Suske, M., Simon, B. 2001. Identifizierung differentieller Transkription in Pankreaskarzinomzellen in Abhängigkeit von der Tumorprogression. *Z.f. Gastroenterologie* 39: P706

Bert, T., Münch, K., Klingenspor, M., Berriel Diaz, M., Simon, B. 2001. Identifizierung pulmonaler Metastasierungsgene in duktalem Pankreaskarzinomzellen anhand von cDNA Representational Difference Analysis. *Med Klinik* 96: P261

Bert, T., Hoormann, S., Schmidt, A., Iwamura, T., Böhm, S., Arnold, R., Simon, B. 2002. Rekrutierung von Claudin-2 in Tight Junctions durch Inhibition der mitogen-aktivierten Proteinkinase (MAPK) Kaskade in K-ras mutierten Pankreaskarzinomzellen. *Z. f. Gastroenterologie* 8: 624-625, V49

- Bert, T., Hoormann, S., Aurbek, N., Iwamura, T., Kalff-Suske, M., Simon, B.* 2002. Progression-dependent disturbance of junctional communication in ductal pancreatic carcinoma cells. *Pancreatology* 2: 217–361 A125
- Lubomierski, N., Robbel, C., Bert, T., Münch, K., Simon, B.* 2000. Rolle der *de novo* Methylierung in neuroendokrinen Pankreastumoren. Jahrestreffen des deutschen Pankreas Clubs, Rostock.
- Münch, K., Bert, T., Kraus, A., Arnold, R., Simon, B.* 1999. Identifizierung von alternativen Splice-Varianten des mdm2 Onkogens in duktafen und neuroendokrinen Pankreastumorzellen. *Z.f. Gastroenterologie* 37: A383
- Münch, K., Bert, T., Kraus, A., Barth, P., Arnold, R., Simon, B.* 2000. Short alternatively spliced MDM2 transcripts with loss of p53/P107/E2F1 binding domain sequences in ductal and neuroendocrine pancreatic tumor cells. *Gastroenterology* 118/4 A711
- Robbel, C., Bert, T., Steigerwald, A., Reckzeh, B., Simon, B.* 2000. Paclitaxel zeigt antiproliferative Wirkung durch G2/M Zellzyklusarrest und Einleitung von Apoptose in neuroendokrinen Pankreastumorzellen. *Med. Klinik* 69: P277

7.3. Akademische Lehrer

Meine akademischen Lehrer waren die Damen und Herren:

Amon, Arnold, Aumüller, Basler, Bauer, Baum, Beato, Daume, Daut, Egbring, Emmons, Fruhstorfer, Fuhrmann, Ganz, Gemsa, Geus, Golenhofen, Gotzen, Gressner, Griss, Habermehl, Happle, Havemann, Hilgermann, Joseph, Kaffarnik, Kern, Kleine, Kleinsasser, Klenk, Klose, Krause, Kretschmer, Krieg, Kroll, Kummer, Kuni, Lang, Lange, Lauer, Lennartz, Lorenz, Maisch, Mannheim, Mannherz, Mennel, Moll, Oertel, Pfab, Remschmidt, Riedmiller, Rothmund, Schachtschabel, Schmitz-Moormann, Schneider, Schüffel, Schulz, Seifart, Seitz, Seyberth, Simon, Slenzka, Steiniger, Thomas, v. Wichert, Voigt, Wiegand

7.4. Danksagung

Mein besonderer Dank gilt Frau PD Dr. med. Babette Simon für die thematische Anregung der vorliegenden Arbeit und für die ausgezeichnete Betreuung während deren Durchführung. Sie stand stets und in vielfacher Hinsicht als Ansprechpartnerin zur Verfügung und unterstützte mich beim Erstellen der Arbeit und darüber hinaus mehr, als zu verlangen war.

Herrn Prof. Dr. med. Rudolf Arnold danke ich für die freundliche Aufnahme in die Abteilung Gastroenterologie und das Überlassen des Laborplatzes.

Frau Karin Münch und Herrn Dr. rer. nat. Frank Wattler möchte ich herzlich für die geduldige und fachlich kompetente Einweisung in die molekularbiologischen Techniken und die Betreuung während der Durchführung der Experimente danken. Ihr Einsatz war für den Fortgang der Arbeit von großem Wert.

Mein Dank gilt weiterhin Frau Dr. med. Meike Schipper und den Mitarbeitern des Labors für die hilfsbereite Zusammenarbeit und das angenehme stets produktive Arbeitsklima.

Frau Bianca Kühnl danke ich für ihre persönliche Unterstützung und das Korrekturlesen der vorliegenden Arbeit. Sie war mir stets eine große Hilfe.

Zu guter Letzt bin ich meinen Eltern zu größtem Dank verpflichtet. Sie haben mich in jeder Hinsicht unterstützt und es mir ermöglicht, den Weg bis hierher zu gehen.