

DISSERTATION

Institut für Medizinische Biochemie der Universität Rostock
Direktor: Prof. Dr. med. Markus Tiedge

Butyrat-abhängige Wirkungen in hämatopoetischen
Vorläuferzellen Ba/F3 –
zelluläre Effekte und Analyse der molekularen Aktivierung des
bcl-x Promoters

Inauguraldissertation

zur Erlangung des akademischen Grades
Doktor der Medizin
der medizinischen Fakultät
der Universität Rostock

vorgelegt von
Johannes Kattner
aus Schweinfurt

Rostock
2010

urn:nbn:de:gbv:28-diss2011-0078-6

Dekan: Professor Dr. med. Emil Christian Reisinger
Gutachter 1: PD Dr. rer. nat. Thomas Bittorf, Institut für Medizinische Biochemie der
Universität Rostock
Gutachter 2: Professor Dr. med. habil. Robert Jaster, Gastroenterologisches
Forschungslabor der Universität Rostock
Gutachter 3: Professor Dr. Peter Erb, Medizinische Mikrobiologie, Universität Basel

Verteidigung der Dissertation am 04.05.2011 in Rostock

Inhaltsverzeichnis

1. Einleitung.....	7
2. Stand der Forschung.....	9
2.1 Butyrat und durch Butyrat vermittelte Wirkungen.....	9
2.2 bcl-x Gen und Bcl-x Protein.....	14
2.3 bcl-x Genexpression.....	18
2.4 bcl-x Promoter.....	19
3. Zielstellung.....	22
4. Material und Methoden.....	23
4.1 Material.....	23
4.2 Zellkultur.....	23
4.3 Proliferationsassay (³ H-Thymidin-Einbau)	24
4.4 Apoptosedetektion (FACS, Annexin V-FITC)	24
4.4.1 Apoptoseauslösung.....	24
4.4.2 FACS – Annexin V-FITC Analyse.....	25
4.4.3 Nukleosomale Fragmentierung.....	25
4.5 Zellzyklusanalyse durch FACS-Analysen.....	27
4.6 Nachweis der Genexpression.....	27
4.6.1 RNA-Isolierung.....	27
4.6.2 mRNA Nachweis mittels Northern Blot.....	28
4.6.3 mRNA Quantifizierung mittels RT-PCR.....	29
4.7 DNA-Manipulation.....	30
4.7.1 Isolierung genomischer DNA.....	30
4.7.2 DNA-Amplifikation mittels PCR.....	30
4.7.3 Klonierung von PCR Produkten.....	32
4.7.4 DNA-Transformation in <i>Escherichia coli</i>	33
4.8 Gewinnung von Plasmid-DNA aus Bakterien.....	34
4.9 Klonierung von bcl-x Promoterfragmenten.....	35
4.10 Sequenzierung doppelsträngiger DNA.....	36

4.11	Transiente Transfektion der Reportergenplasmide.....	38
4.12	Luziferase Reportergen Assay (LRA).....	39
4.13	Plasmid-Kotransfektion.....	40
4.13.1	Dual-Luziferase TM Reporter Assay: Messung der Transfektionseffizienz.....	40
4.13.2	Kotransfektion der Plasmide mit den cDNAs für JAK2 oder Lyn.....	40
4.14	DNA-Analyse auf Transkriptionsfaktorbindungsstellen.....	41
4.15	Electrophoretic-Mobility-Shift-Assay (EMSA).....	41
4.16	Ortsgerichtete Mutagenese.....	45
	ANHANG zu Material und Methoden:	47
	• Primersequenzen PCR, RT-PCR und ortsgewichtete Mutagenese	
	• Oligonukleotide für EMSAs	
5.	Ergebnisse.....	50
5.1	Wirkungen von Butyrat auf Proliferation und Apoptose von Ba/F3-Zellen.....	50
5.1.1	Dosisabhängiger Einfluss von Butyrat auf die Zellproliferation.....	50
5.1.2	Wechselwirkung von Butyrat und Zytokinen beim Einfluss auf die Zellproliferation.....	51
5.1.3	Einfluss von Butyrat auf das apoptotische Verhalten von Ba/F3-Zellen.....	52
5.1.4	Effekte von Butyrat auf die Zellzyklusprogression von Ba/F3-Zellen.....	54
5.2	Nachweis der Genexpression.....	55
5.2.1	Northern Blot.....	55
5.2.2	RT-PCR.....	55
5.3	Butyrat-abhängige Regulation von Transkriptionsfaktoren	56
5.4	Klonierung des bcl-x Promotors	58
5.5	Butyrat-abhängige Regulation des bcl-x Promotors	59
5.6	Darstellung funktioneller Regionen des bcl-x Promotors.....	60
5.6.1	Klonierung von bcl-x Promoter-Fragmenten.....	60
5.6.2	Butyrat-abhängige Aktivierung verkürzter bcl-x Promoterfragmente.....	61
5.6.3	Identifikation der Butyrat-responsiven Promoterregionen AR1 und AR2.....	62
5.6.4	Klonierung der Butyrat-responsiven Promoterregionen AR1 und AR2	63
5.6.5	Butyrat-abhängige Aktivierung der Promoterregionen AR1 und AR2.....	64
5.6.6	Prüfung der Transfektionseffizienz.....	64

5.7	Analyse von Transkriptionsfaktor-DNA Wechselwirkungen in den Butyrat-responsiven Promoterregionen AR1 und AR2.....	65
5.7.1	Computergestützte Identifikation potentieller Transkriptionsfaktor-Bindungsstellen in AR1 und AR2.....	65
5.7.2	Protein-DNA Wechselwirkung in AR1 und AR2.....	69
5.8	Mutagenese funktioneller Elemente in AR2.....	71
5.8.1	Ortsgerichtete Mutagenese der Bindungsstellen für AP-1 und NFAT in AR2....	71
5.8.2	Butyrat-abhängige Aktivierung des bcl-x Promoters nach ortsgerechter Mutagenese der Promotersequenz.....	72
5.8.3	Protein-DNA Wechselwirkung mit der veränderten AR2-Sequenz	73
5.9	Einfluss der Tyrosinkinasen Lyn und JAK2 auf die Butyrat-abhängige Aktivierung des bcl-x Promoters – Kotransfektion mit cDNAs für Lyn und JAK2.....	74
6.	Diskussion.....	76
7.	Zusammenfassung.....	86
8.	Literaturverzeichnis.....	88
9.	Abkürzungen.....	93
	Thesen.....	95

1. Einleitung

Die medizinische Tumorforschung hat sich zum Ziel gesetzt, Ursachen und Risikofaktoren der Krebsentstehung zu definieren und auf dieser Grundlage neue Therapiestrategien zu entwickeln. Dabei besteht ein großes Interesse daran, einfache, therapeutisch einsetzbare Substanzen zu identifizieren, die neben ihrer zytostatischen Effektivität für den Patienten möglichst verträglich sind und darüber hinaus kostengünstig hergestellt werden können.

Im Rahmen dieser Bestrebungen wurde unter anderem Butyrat, das Anion der C4 Carbonsäure zum Gegenstand grundlegender und angewandter Studien. Butyrat entsteht natürlicherweise im Rahmen bakterieller Aufspaltung von Ballaststoffen im Dickdarm. Besonders im Zusammenhang mit dem Kolonkarzinom ist für Natrium-Butyrat mehrfach eine präventive, antikanzerogene Wirkung nachgewiesen worden, die mit der Butyrat-abhängigen Induktion des programmierten Zelltods erklärt wird [1].

Diese, als Apoptose bezeichnete Elimination von Zellen ist ein grundlegender physiologischer Prozess und spielt im Rahmen der Embryo- und Morphogenese, sowie in der Regulation des normalen Gewebsumsatzes eine zentrale Rolle. Die Apoptose gewährleistet das Gleichgewicht zwischen Zellproliferation und Zellelimination und sichert in vielzelligen Organismen die Integrität der Gewebe. Der grundsätzliche Unterschied zwischen Apoptose und Nekrose wurde durch Kerr et al. definiert [2]. Die Apoptose ist aber auch bei pathologischen Prozessen von Bedeutung, unter anderem bei Autoimmunerkrankungen, bei radiogenen, chemotoxischen oder ischämischen Zellschäden und besonders in der Karzinogenese. Ein maßgeblicher Anteil an der Krebsentstehung wird der *gestörten Regulation der Apoptose* zugeschrieben.

Neben den beschriebenen Einflüssen auf Kolonzellen sind für Butyrat auch Effekte im hämatopoetischen System nachgewiesen worden. So wurde mehrfach gezeigt, dass Butyrat die Proliferation erythroider Vorläuferzellen hemmt und dabei deren Differenzierung induziert, was an der gesteigerten Expression der Globingene nach Butyrat-Exposition beobachtet werden kann [3].

Untersuchungen zur Aufklärung des molekularen Wirkmechanismus von Butyrat zeigen, dass Butyrat ein Inhibitor der Histondeacetylase ist [4]. Somit kann Butyrat Einfluss auf die strukturelle und funktionelle Organisation der DNA und folglich auf die Genexpression nehmen. Darüber hinaus konnte gezeigt werden, dass Butyrat durch Aktivierung von Transkriptionsfaktoren Einfluss auf Promotoren Apoptose-regulierender Gene nehmen kann [5].

Promotoren wiederum sind für die Aktivierung und Suppression von Genen mitverantwortlich. Die Kontrollmechanismen des programmierten Zelltodes in der Zelle werden vor allem durch die Promoter-gesteuerte Induktion proapoptotischer Gene und Suppression antiapoptotischer Gene realisiert.

Diese Mechanismen sind derzeit Gegenstand intensiver Untersuchungen in der molekularbiologischen Forschung. Es gilt, die exakten Wege und Regelkreise zu erkennen, zu verstehen und gezielt zu beeinflussen.

So konnten bereits zahlreiche Apoptose-assoziierte Proteine identifiziert und Signalwege charakterisiert werden, die auf Regulation und Ablauf der Apoptose Einfluss nehmen. Das antiapoptotische bcl-xL Gen, ein Mitglied der bcl-2 Genfamilie, ist in hämatopoetischen Zellen ein wichtiger Faktor zur Regulation des Überlebens und der Zellreifung. Es besitzt besonders in der erythroiden Differenzierung eine Schlüsselrolle [6], [7].

Ziel dieser Arbeit ist es zum einen, den Einfluss von Butyrat auf die Aktivierung des Promoters des Apoptose-regulierenden bcl-xL Gens im Rahmen der Erythropoese zu analysieren und sekundär Hinweise auf die Expression des Apoptose-regulierenden bcl-xL Gens während der Erythropoese zu gewinnen. Zum anderen sollen hier zelluläre Effekte von Butyrat auf die Apoptose bzw. das Proliferationsverhalten von Ba/F3-Zellen, einer IL-3 abhängigen Pro-B-Zell-Linie, untersucht werden.

2. Stand der Forschung

2.1 Butyrat und durch Butyrat vermittelte Wirkungen

Butyrat ist das Anion der kurzkettigen C4-Carbonsäure Buttersäure. Im menschlichen Körper wird Butyrat im Dickdarm als Hauptabbauprodukt der anaeroben, bakteriellen Aufspaltung von Ballaststoffen gebildet. Es dient den Kolonschleimhautzellen als Hauptenergiequelle und sichert sowohl ihre strukturelle Integrität als auch ihre Stoffwechselfunktionen. Dies ist jedoch nicht die alleinige bekannte Wirkung von Butyrat. Butyrat werden vielfache molekularbiologisch diskrete Effekte auf diverse zelluläre Aktivitäten zugeschrieben.

So **hemmt** Butyrat unter anderem die **Proliferation** von Kolonkarzinomzellen und **kontrolliert die terminale Differenzierung** verschiedener Zelltypen, zum Beispiel auch erythroider Vorläuferzellen.

Weiterhin konnte für Butyrat in mehreren Systemen eine **Apoptose-induzierende Wirkung** nachgewiesen werden. Die meisten Untersuchungen zur Butyrat vermittelten Apoptose wurden an malignen Zellen durchgeführt, insbesondere an Kolonkarzinomzellen.

Im Folgenden sollen die vielfältigen publizierten Butyrat-Wirkungen systematisch erläutert werden.

Butyrat und Apoptose

Apoptose (programmierter Zelltod) ist eine physiologische Form des Zelluntergangs, die sich von der Nekrose in Ursache, Ablauf und biologischer Bedeutung grundsätzlich unterscheidet. Während der Apoptose durchläuft die Zelle ein Programm der Selbstzerstörung, (zumeist) mit dem Ziel, die zelluläre Homöostase aufrecht zu erhalten. Apoptotischer Zelltod ist ein wesentlicher Mechanismus bei der Morphogenese sich entwickelnder Organismen, bei der präzisen Regulation der Zellzahl verschiedener Gewebe und der Entfernung potentiell gefährlicher Zellen, wie z.B. virusinfizierter Zellen, Tumorzellen oder auch autoreaktiver Zellen [8].

Die Charakteristika der Apoptose wurden erstmals, wie bereits erwähnt, durch Kerr et al. 1971 beschrieben.

Ein typisches Merkmal der Apoptose ist die durch Endonukleasen hervorgerufene internukleosomale Spaltung doppelsträngiger DNA in DNA-Fragmente von ca. 185 Basenpaaren (bp) oder Vielfachen von 185bp. Diese Spaltprodukte bilden in einer Agarosegelelektrophorese charakteristische DNA-Leitern (s. Kapitel 4.4.3. und 5.1.3).

Neuerdings wurden als eine weitere, zweite Form der Apoptose auch zelluläre Veränderungen mit den Charakteristika einer Autophagie mit lysosomaler Zelldegradation beschrieben [9].

Neben der Butyrat-Forschung mit Kolonkarzinomzellen wurde die gezielte Apoptose-induzierende Wirkung von Butyrat an einer Vielzahl weiterer Zellen, meist Malignomzellen untersucht, wie z.B. Zellen eines / bei:

- Kolonkarzinom ([10], [11], [12], [1])
- Großzelliges B-Zell-Non-Hodgkin-Lymphom [13]
- T-Lymphozyten [14]
- chronisch myeloischer Leukämie [15]
- Mammakarzinom [16]
- Zervixkarzinom [9]
- Magenkarzinom [17]
- Pankreaskarzinom [18]
- Hepatom [19]
- Mesotheliom [20]
- Neuroblastom [21]

Es zeigten sich ganz unterschiedliche Reaktionen in Abhängigkeit vom Zelltyp, wie z.B. die Induktion/Repression Apoptose-regulierender Gene, Beeinflussung des mitochondrialen Wegs der Apoptose, Autophagie oder Induktion oxidativer Radikale.

Die Frage, über welchen Mechanismus Butyrat dabei *direkt* Apoptose auslöst oder *indirekt* darauf Einfluss nimmt, ist derzeit Gegenstand aktueller Diskussionen.

So kann Butyrat den programmierten Zelltod sowohl durch mitochondriale Cytochrom c Freisetzung und Aktivierung der Caspase-Kaskade herbeiführen [11], [21] als auch durch lysosomale Autophagie *direkt* auslösen [9]. Des Weiteren kann Butyrat Apoptose in malignen Zellen auch durch Akkumulation von Sauerstoffradikalen verursachen, während nicht-neoplastische Zellen in der Lage sind ein erhöhtes Maß an Sauerstoffradikalen durch Redox-Proteine (Thioredoxin) abzubauen [22].

Indirekt kann Butyrat über eine Signaltransduktionskaskade Apoptose-regulierende Gene beeinflussen. Die Gene der bcl-2 Familie, wie zum Beispiel die antiapoptotischen Gene bcl-2 und bcl-x, sowie die proapoptotischen Gene bax, bak, bik und bid (s. Kapitel 2.2), deren Proteine ihre Wirkungen bekanntermaßen hauptsächlich an der Mitochondrienmembran entfalten (mitochondrialer Weg der Apoptose), spielen dabei eine bedeutende Rolle.

So kann Butyrat durch gesteigerte Genexpression der proapoptotischen Proteinen Bax, Bak, Bik und Bcl-xS Apoptose auslösen. Dabei aktiviert Butyrat zum Beispiel in Kolonkarzinomzellen den Transkriptionsfaktor „Aktivator-Protein 1“ (AP-1), der die Genexpression des proapoptotischen Bax Proteins mit anschließend eintretender Apoptose [5] induziert. Pajak B et al [11] beschrieben ebenfalls an Kolonkarzinomzellen,

dass Butyrat via TNF-alpha-Apoptose-Weg den Gehalt an proapoptotischem Bak Protein erhöht.

Butyrat und Bcl-xL

In dieser Arbeit ist der Blickwinkel insbesondere auf die Wirkung von Butyrat auf das Apoptose-beeinflussende bcl-x Gen gerichtet. Mehrfach konnte bereits berichtet werden, dass Butyrat sowohl die bcl-x mRNA, als auch die zelluläre Menge des antiapoptotischen Bcl-xL Proteins verringern und somit über mitochondriale Mechanismen Apoptose auslösen kann, wie z.B. in Kolonkarzinomzellen [10], [12], T-Lymphozyten [14] oder auch in Mesotheliomzellen [20].

Auch über den bereits oben erwähnten TNF-alpha Apoptose Weg kann Butyrat den Gehalt an antiapoptotischem Bcl-xL Protein reduzieren und Apoptose induzieren [11].

Butyrat und Proliferationshemmung / Zellzyklusarrest

Butyrat bewirkt in einigen Zelltypen eine **Proliferationshemmung**, wie zum Beispiel in Kolonkarzinomzellen [23] oder erythropoetischen Zellen [3].

Dies bedeutet, dass die Zellen nach Stimulation mit Butyrat nicht dem physiologischen Ablauf des Zellzyklus folgen. Sie verbleiben in einer bestimmten Zellzyklusphase, zumeist in der G1- oder G2-Phase. Dieser Zellzyklusstop ist oft assoziiert mit DNA-Reparatur und Zelldifferenzierung.

Als Mechanismus der Butyrat-abhängigen Zellzyklushemmung wird unter anderem die Aktivierung des Zellzyklusinhibitors (CdK-Inhibitor) p21 Waf1/Cip1 diskutiert [24]. p21 war der erste entdeckte Inhibitor der Cyclin-abhängigen Kinasen. Die Regulation der Kontrollpunkte des G1-S-Phasen-Übergangs ist ein fein abgestimmtes Zusammenspiel von Cyclinen, Cyclin-abhängigen Kinasen (CdK), CdK-Inhibitoren (z.B. p21Waf1/Cip1) und des Tumorsuppressors Retinoblastomprotein. p21 hemmt die CdKs, die somit das Retinoblastomprotein nicht phosphorylieren können, wodurch das zellzyklusinhibitorische Retinoblastomprotein in der dephosphorylierten, hemmenden Form aktiv bleibt. Dadurch wiederum werden die Zellen am Retinoblastomprotein-kontrollierten G1-S-Phasenübergang des Zellzyklus blockiert.

Butyrat kann daneben auch die Synthese von Cyclinen und Cyclin-abhängigen Kinasen direkt modifizieren und somit ebenfalls Einfluss auf den G1-S-Phasen-Übergang nehmen [25], [13].

Butyrat und Zelldifferenzierung

Zelldifferenzierung beschreibt die Entwicklung von unreifen Zellen aus einem wenig spezialisierten Zustand in einen stärker spezialisierten, reiferen Zustand mit gewebetypischen Zellmerkmalen.

Seit langem ist bekannt, dass Butyrat in einer Vielzahl von Zellen Differenzierung auslöst [26], zum Beispiel in:

- Kolonkarzinomzellen [27]
- Adipozyten [28]
- embryonalen Pankreaszellen [29]
- erythropoetischen Vorläuferzellen [30]

Die Butyrat-induzierte *Differenzierung erythropoetischer Vorläuferzellen* zeigt sich vor allem in der Reaktivierung der Globinsynthese. Zum einen sind Effekte auf die beta-Globinsynthese beschrieben [30], jedoch nimmt Butyrat insbesondere auf die fetale gamma-Globinsynthese Einfluss. Dabei steigert Butyrat die Expression des gamma-Globin-Gens durch Induktion Butyrat-responsiver Elemente (BRE) des gamma-Globin-Gen-Promotors [31]. Die Transaktivierung der BRE-Sequenzen wird unabhängig vom Histonacetylierungsmuster über erythroid-spezifische und -unspezifische Transkriptionsfaktoren vermittelt [32]. Butyrat wirkt zudem synergistisch mit dem EPO-co-stimulierenden Faktor kit-Ligand in der erythroiden Differenzierung [33].

Die durch Butyrat induzierte gamma-Globin Synthese ist Teil klinischer Studien zur Therapie der Beta-Haemoglobinopathien (Sichelzellanämie, beta-Thalassaemie). Dabei wird die Butyrat-Therapie mit EPO ergänzt, um die proliferationshemmende Wirkung von Butyrat zu kompensieren [34].

Weitere molekulare Effekte von Butyrat in der *extra- und intrazellulären Signalübertragung der Erythropoese und Hämoglobinsynthese* beziehen sich auf die Modulation der Mitglieder der Familie der mitogen-aktivierten Proteinkinasen (MAPK), die an der intrazellulären Signaltransduktion während der Erythropoese und erythroiden Differenzierung beteiligt sind [35].

Ebenso kann Butyrat in erythropoetischen Zellen die Januskinase 2 (JAK2) aktivieren und den in der Erythropoese wichtigen JAK-STAT5 Signalweg induzieren [36].

Butyrat nimmt des Weiteren Einfluss auf *Transkriptionsfaktoren der Erythropoese* wie zum Beispiel:

- GATA1, NF-E2 [37]
- SP1 [35]
- STAT5 [3]

Ein Einfluss von Butyrat auf die Transkriptionsfaktoren AP-1 und NF-kappaB, die auch in der Erythropoese eine bedeutende Rolle spielen, konnte bisher nur in nicht-erythroiden Zellen wie z.B. der myeloischen Zellreihe gezeigt werden [38], [39].

Butyrat als kompetitiver Inhibitor der Histondeacetylase

Der erste Hinweis auf *molekulare* Ansatzpunkte der zellbiologischen Butyrat-Wirkungen wurde 1977 von Riggs et al. beschrieben [40], die für Butyrat bereits eine histonmodifizierende Wirkung nachweisen konnten. Heute ist bekannt, dass Butyrat als **kompetitiver Hemmer die enzymatische Aktivität der Histondeacetylase** blockieren kann, wodurch eine Hyperacetylierung der Histone resultiert.

Die Histondeacetylase ist zusammen mit ihrem Gegenspieler Histonacetyltransferase für das Acetylierungsmuster von Histonproteinen verantwortlich. Beide Enzyme stehen in einem fein regulierten Gleichgewicht [41]. Histone sind die Hauptproteine des Chromatins. Das Acetylierungsmuster der Histonproteine, die der „DNA-Verpackung“ dienen, ist für die strukturelle und funktionelle DNA-Organisation verantwortlich und beeinflusst die Induktion bzw. Inhibition vieler Zellkern-assoziiierter Prozesse, wie z.B. DNA-Replikation, DNA-Transkription oder DNA-Abbau [42]. Dabei bewirkt die (Hyper-) Acetylierung eine gewisse Lockerung der Chromatinstruktur, die es Replikations-, Transkriptions- oder auch DNA-abbauenden Enzymen erleichtert, in Wechselwirkung mit der DNA zu treten [43]. Tumorzellen umgehen den programmierten Zelltod, indem durch unkontrollierte Aktivität der Histondeacetylase die DNA-Struktur durch Deacetylierung der Histonproteine verdichtet wird. Dadurch wird die Genexpression allgemein, insbesondere aber die Expression Apoptose-regulierender Gene erschwert.

Von den Histondeacetylase-Inhibitoren ist bekannt, dass sie je nach ihrem inhibitorischen Potenzial die Chromatinstruktur durch Hyperacetylierung lockern können und damit die Genexpression erleichtern. Dies kann die verschiedenen, zuvor für Butyrat beschriebenen biologischen Effekte wie z.B. Hemmung der Zellproliferation, Zelldifferenzierung und insbesondere in malignen Zellen auch Apoptoseinduktion auslösen [24], [22].

Die Hyperacetylierung der DNA als Ursache einer modulierten Genexpression ist jedoch *in vitro* bei prokaryonten Zellen ohne Histon-organisierte DNA respektive bei Untersuchungen mit Plasmid-DNA ohne Bedeutung.

Weitere Effekte von Butyrat

Abgesehen von den oben beschriebenen Wirkungen besitzt Butyrat weitere, zum Teil indirekte Effekte auf die Zelldynamik.

Butyrat hat zum Beispiel auch *immunmodulatorische Wirkung*, indem es durch vermehrte Kernausschleusung des Transkriptionsfaktors NFAT die IL-2 Expression und somit die T-Zell-Aktivierung hemmt [44].

Bei chronisch entzündlichen Darmerkrankungen hat Butyrat eine *entzündungshemmende Wirkung* [45], indem es die Aktivierung des Transkriptionsfaktors NF-kappaB in Monozyten hemmt. Dies führt zu einer Verringerung der Synthese des proinflammatorischen Zytokins TNF-alpha und zu einer Hemmung der Entzündungsreaktion bei Colitis ulcerosa.

Trotz der bisherigen umfangreichen Forschungsergebnisse über die Wirkung von Butyrat und seiner vielfältigen zellulären und molekularen Effekte bleiben die genauen Mechanismen nach wie vor unklar. So konnten für Butyrat weder konkrete Ansatzpunkte in der Signaltransduktion exakt identifiziert werden, noch die Wechselwirkung zwischen Butyrat und Transkriptionsfaktoren oder cis-Elementen der DNA aufgeklärt werden.

2.2 bcl-x Gen – Bcl-x Protein

Das bcl-x Gen (Chromosom 20 q11.2) codiert für ein Protein, das zur Apoptose-regulierenden bcl-2 Familie gehört.

Die bcl-2 Gen-Familie wurde nach dem bcl-2 Gen (bcl-2: „B-Cell-Lymphoma 2“) benannt. Das bcl-2 Gen (Chromosom 18 q21.3) ist in Zellen eines folliculären B-Zell-Lymphoms in den Bereich der Gene für die Immunglobuline auf Chromosom 14 transloziert [46]. Diese Chromosomen-Translokation t(14;18) bewirkt eine unkontrollierte Expression des bcl-2 Gens durch den Immunglobulin-Enhancer mit nachfolgend unkontrolliertem Zellwachstum [47].

bcl-x Gen

Ebenso wird das *bcl-x Gen* in einer Vielzahl von malignen Zellen aufgrund seiner *antiapoptotischen Wirkung* für eine ungebremste Zellproliferation verantwortlich gemacht, wie z.B. in hämatoproliferativen Erkrankungen, bei Kolorektalkarzinomen, Magenkarzinomen, Prostatakarzinomen, Mammakarzinomen oder auch bei Ovarialkarzinomen [48]. In der Zell- und Organentwicklung während der Embryogenese spielen bcl-x assoziierte antiapoptotische Effekte dagegen eine zentrale, *physiologische* Rolle [49].

Das bcl-x Gen besitzt zwei codierende, d.h. translatierbare Exone, namentlich Exon II und III. Der Translationsstartpunkt befindet sich in Exon II. Die Exone Ia und Ib sind nicht-codierend und liegen im 5'-Bereich vor dem Exon II (vgl. Abb. 2.4).

Die Transkripte der Exone II und III werden durch den Spleissprozess zu einer bcl-x mRNA zusammengefügt, die für das Bcl-xL Protein codiert [50], [51]. Häufig sind der mRNA von

Exon II und III RNA-Sequenzen entweder des Exons Ia oder des Exons Ib vorangestellt. Der Spleissprozess ist jedoch variabel und kann je nach Zellart und Zellstimulation auch zu alternativen Isoformen der *bcl-x* RNA führen. Man unterscheidet die am häufigsten transkribierte *lange* mRNA Form *bcl-xL* (L = „long“), eine kurze mRNA Form *bcl-xS* (S = „short“), sowie seltene Alternativspleißprodukte (*bcl-x gamma*, *bcl-x beta*, *bcl-x deltaTM*) [52], [53], [54], [55], [56].

Gemäß den Gentranskripten, entstehen auch in Form, Funktion und Eigenschaften unterschiedliche Bcl-X Proteine, von denen allerdings nur Bcl-xL und Bcl-xS gut untersucht sind.

Bcl-2 Proteinfamilie

Ganz allgemein können die Proteine der Bcl-2-Familie in drei Untergruppen eingeteilt werden. Auf der einen Seite der Apoptoseregulation befinden sich die antiapoptotischen Proteine Bcl-2, Bcl-xL und Mcl-1. Als Gegenspieler agieren die proapoptotischen Proteine Bax, Bak und Bcl-xS.

Die dritte Untergruppe bilden die „BH3-Proteine“ Bik, Bim, Bid und Bad, die ebenfalls vorwiegend proapoptotisch wirken [57].

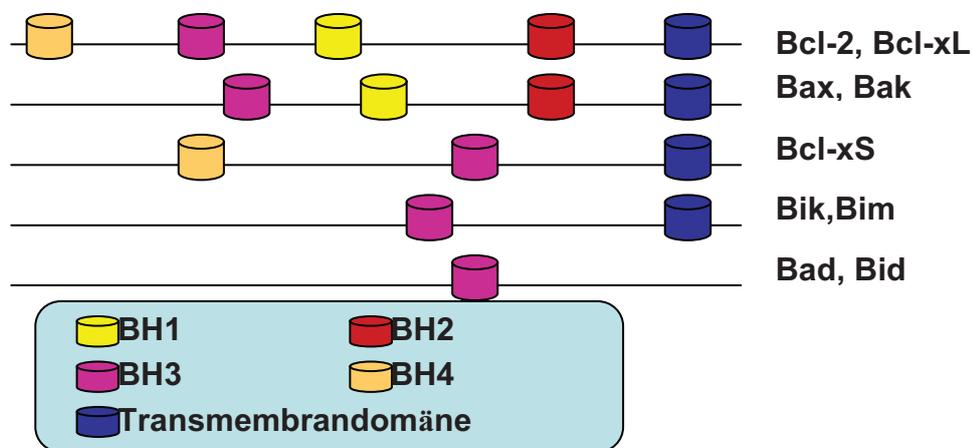


Abb. 2.2.a: Schematische Struktur der Proteine der Bcl-2-Familie. Die antiapoptotischen Proteine Bcl-2 und Bcl-xL bestehen aus den Domänen BH1-4 und einer Transmembrandomäne am C-Terminus. Bax, Bak, Bcl-xS, Bik, Bim, Bad und Bid sind proapoptotische Proteine. Bax und Bak besitzen keine BH4 Domäne. Bcl-xS fehlt die BH1 und BH2 Domäne. Bik, Bim, Bid und Bad sind reine BH3-Proteine. Ebenso zur Bcl-2-Familie gehörend, jedoch hier nicht aufgeführt, sind die antiapoptotischen Proteine Mcl-1, A1, CED-9 und Bfl-1, sowie die proapoptotischen Proteine DIVA und Egl-1.

Die Proteine der Bcl-2 Familie, die eine Transmembrandomäne besitzen, kontrollieren Abläufe der Apoptose vorwiegend an intrazellulären Membranen, insbesondere an der Mitochondrienmembran. Die Proteine ohne Transmembrandomäne befinden sich nicht an Organellen gebunden im Zytosol.

Bcl-xL Protein

Bcl-xL ist ein wirkungsvoller Inhibitor der Apoptose, während Bcl-xS interessanterweise proapoptotisch wirkt. Bcl-xL besteht aus 233 Aminosäuren und hat einen ähnlichen Aufbau wie das Bcl-2 Protein (236 Aminosäuren) mit zwei zentralen, hauptsächlich hydrophoben Alpha-Helices, die von sechs amphiphilen Alpha-Helices umgeben werden [58], [59]. Diese Helices bilden vier Domänen („bcl-2 homologe domains“ BH 1-4) und eine Transmembrandomäne am C-Terminus, wie in Abbildung 2.2.a und 2.2.b dargestellt. Dabei dient die Transmembrandomäne der Verankerung an intrazellulären Membranen, insbesondere an der Mitochondrienmembran [60].

Die alternativen Spleiß-Produkte des bcl-x Gens bcl-x beta, bcl-x gamma, bcl-x deltaTM codieren für Proteine, die in ihrer Struktur und antiapoptotischen Funktion mit dem Bcl-xL vergleichbar sind. Ihnen fehlt jedoch die Transmembrandomäne am C-Terminus. Daher können sie nicht an intrazelluläre Membranen binden und befinden sich im Zytosol.

Die BH1 und BH2 Domäne des Bcl-xL sind hauptverantwortlich für die antiapoptotische Wirkung des Proteins. Die BH1 und BH2 Domäne der proapoptotischen Proteine Bax und Bak spielen für die *direkt* Apoptose-induzierende Wirkung die entscheidende Rolle. Die Bedeutung der N-terminalen BH4 Domäne (Schleifendomäne, geringste Homologie zwischen Bcl-2 und Bcl-xL) liegt am ehesten in einer negativen Rückkopplung, da BH4-Deletionsmutanten von Bcl-xL und Bcl-2 eine qualitativ und quantitativ stärkere antiapoptotische Wirkung aufweisen [61].

Bcl-xL bildet über eine „Taschen-Formation“ der Domänen BH1, BH2 und BH3 mit den proapoptotischen Proteinen Heterodimere (Abb. 2.2.b). Die Dimerisation zwischen Bcl-xL und Bax oder Bak blockiert je nach Konzentrationsgefälle die proapoptotische Bax- [62] bzw. Bak-Wirkung [63] oder die antiapoptotische Bcl-xL Wirkung. Die Dimerbildung von Bcl-xL mit den BH-3-Proteinen Bim oder Bad wirkt *indirekt* apoptosefördernd, indem Bim- oder Bad das Bcl-xL daran hindern, Bax bzw. Bak durch Heterodimerisation zu blockieren [64].

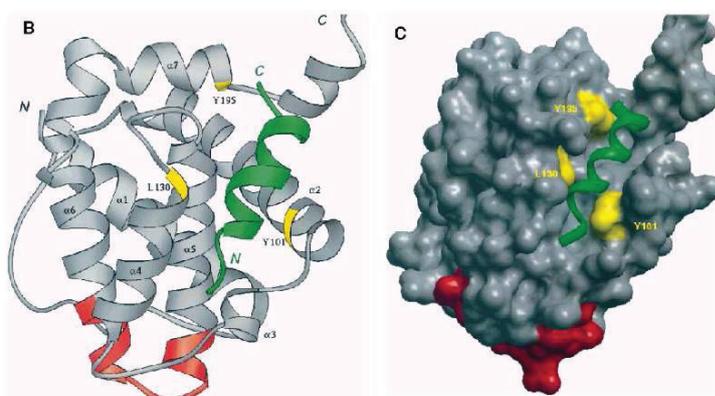


Abb. 2.2.b: Heterodimerisation von Bcl-xL mit einem BH3 Protein (grün). BH1 und BH2 Domäne des Bcl-xL formen eine hydrophobe Tasche (gelb), in der die BH3 Domäne des proapoptotischen Proteins bindet. Der C-Terminus entspricht der Transmembrandomäne, der N-Terminus der Schleifendomäne. Links Darstellung als Protein-Faltblattstruktur, rechts Darstellung als Oberflächenrepräsentation.

Das Bcl-xS Protein, die vierte Variante des bcl-x Transkripts, entsteht ebenfalls durch alternatives Spleißen. Bcl-xS fehlen 63 Aminosäuren, die genau der BH1 und BH2 Domäne von Bcl-xL bzw. Bcl-2 entsprechen. Es entfaltet seine proapoptotische Wirkung über die BH3-Domäne [58].

Neben der Heterodimerisation zwischen pro- und antiapoptotischen Proteinen der Bcl-2 Familie mit konsekutiver Wirkungsantagonisierung werden auch Apoptose-modulierende Wirkmechanismen für Bcl-xL und Bax diskutiert, die eine Porenbildung in der Mitochondrienmembran bewirken.

Bcl-xL und antiapoptotische Wirkung an den Mitochondrien

Der entscheidende Schritt zur Einleitung der Apoptose ist die Freisetzung von Cytochrom C durch den spannungsabhängigen Anionenkanal (VDAC, voltage dependent anion channel) in der äußeren Mitochondrienmembran und den damit eintretenden Funktionsverlust der Mitochondrien (Erliegen der mitochondrialen Energiebereitstellung).

Diese Freisetzung von Cytochrom C und die Durchlässigkeit des VDAC ist unter anderem durch die Interaktion der proapoptotischen mit den antiapoptotischen Proteinen der Bcl-2 Familie an der äußeren Mitochondrienmembran reguliert. Extrazelluläre proapoptotische Reize (Wachstumsfaktorentzug, Bestrahlung, DNA-Schäden) aktivieren intrazellulär proapoptotische Proteine der Bcl-2 Familie. Daraufhin bilden sich Bax-Bax-Homodimere oder Bax-Bak-Heterodimere im Zytosol, die sich an die Mitochondrienmembran binden, eine Konformationsänderung des VDAC bewirken und dadurch einen Cytochrom C Ausstrom ins Zytosol auslösen. Bax-Homodimere können auch selbst in der Mitochondrienmembran einen Kanal bilden, durch den Cytochrom C ins Zytosol gelangt [57], [65].

Die Cytochrom C - Freisetzung führt im Zytosol zur Bildung des Apoptosoms, einem Komplex aus Cytochrom C, Apaf-1 und Procaspase-9 in der Gegenwart von dATP. In diesem Komplex wird die Initiatorcaspase Caspase 9 (Cystein-Protease) aktiviert, die wiederum die Effektoren Caspase 3 und Caspase 7 aktiviert. Letztere lösen die für die Apoptose charakteristischen Zellveränderungen aus. Caspase 3 ist ein zentrales Enzym in der apoptotischen Karyo- und Zytolyse, deren Substrate Antiapoptoseproteine wie Bcl-xL und Bcl-2, Zellskelettproteine, Kernmembranproteine und Enzyme pro- und antiapoptotischer Signalwege sind [66].

Neben der Heterodimerbildung mit den proapoptotischen Bax und Bak wirkt Bcl-xL auch eigenständig durch Ionenkanalbildung in der Mitochondrienmembran antiapoptotisch bzw. durch direkte Modifikation des Aktivitätsgrades des VDAC. Bcl-xL verhindert die Cytochrom C Freisetzung und somit die Einleitung der Apoptose, erhält dabei jedoch die Durchlässigkeit des VDAC für Anionen der oxidativen Phosphorylierung (ADP, Succinat) aufrecht. Bcl-xL hat durch die Wahrung der mitochondrialen Integrität auch einen positiven

Einfluss auf den Redox- und pH-Status der Zelle [67]. Eine Schutzfunktion vor Oxidantien und freien Radikalen wird für Bcl-xL kontrovers diskutiert [68].

2.3 bcl-x Genexpression

Allgemeine Aspekte

Die Expression vieler Gene wird durch zytokinabhängige Modulation der Transkription erreicht. Dabei aktivieren die Zytokine spezifische intrazelluläre Signalkaskaden, die letztendlich über Transkriptionsfaktoren Einfluss auf die Expression des Gens nehmen. Für das bcl-x Gen ist eine zytokinabhängige Aktivierung in verschiedenen Zelltypen beschrieben, zum Beispiel:

- In Basophilen durch *IL-3* [69]
- In myeloischen Leukämiezellen durch *IL-6* [70]
- In Mastzellen durch *IL-15* [71]
- In Endothelzellen [72] und in Kolonkarzinomzellen [73] durch *EGF*,
- In B-Lymphozyten durch CD40-Ligand [74], [48]
- In Makrophagen durch CSF-1 [75].

Auf die Bedeutung des Zytokins Erythropoietin und der Transkriptionsfaktoren der Erythropoese in ihrer Beziehung zum bcl-x Gen wird im Folgenden näher eingegangen.

bcl-x Genexpression in der Hämato- und Erythropoese

Erythropoietin (**EPO**) ist das entscheidende Zytokin der Erythropoese. EPO ist für die terminale Differenzierung von erythroiden Vorläuferzellen zu reifen Erythrozyten verantwortlich. Dabei ist die EPO-induzierte Expression des antiapoptotischen bcl-x Gens sowie die Bcl-xL Synthese ein wichtiger Schritt für die späte Differenzierung und das Überleben der erythroiden Zellen [6], [7].

EPO vermittelt seine Wirkungen auf die Zelle über den EPO-Rezeptor, der nach Aktivierung intrazellulärer Signalkaskaden über Transkriptionsfaktoren entsprechende Zielgene, wie zum Beispiel das bcl-x Gen, ansteuert.

Im Folgenden werden nun die für die Erythropoese bzw. Hämatopoese wichtigen Transkriptionsfaktoren in ihrer Beziehung zum bcl-x Gen näher beschrieben.

STAT5 (Signal transducer and activator of transcription 5) ist ein zentrales Zielprotein der EPO-Signaltransduktion [76]. Die STAT5 Aktivität ist eng verknüpft mit der Aktivierung durch die Tyrosinkinase JAK2 [77]. Aktiviertes STAT5 interagiert mit dem bcl-x Gen-Promoter, führt zur Expression des bcl-x Gens und verhindert dadurch die Apoptose erythroider Zellen während der erythroiden Reifung [78].

In Ba/F3-Zellen wird der Transkriptionsfaktors STAT5 IL-3-abhängig aktiviert und kann durch die Induktion des bcl-x Promoters Einfluss auf Zelldifferenzierung und Zellüberleben nehmen [79].

AP-1 (Aktivator Protein-1) ist aus Dimeren der Phosphoproteinfamilien Fos (c-Fos, FosB) und Jun (c-Jun, JunB, JunD) aufgebaut. Für AP-1 wurden vielfache gegensätzliche Wirkungen bzgl. Apoptose, Zellproliferation und Zelldifferenzierung beschrieben, abhängig zum einen von der Zusammensetzung der Dimere aus Jun- und Fos-Proteinen und zum anderen vom Zelltyp und den Umgebungsfaktoren. So haben *in vitro* Untersuchungen mit erythroiden Zellen gezeigt, dass c-Jun nach EPO-Stimulation durch Proliferationshemmung indirekt zur Zelldifferenzierung beiträgt [80]. Die EPO-Stimulation von JunB induziert ebenfalls die erythroide Differenzierung und führt bei EPO-Entzug zu Apoptose [81]. Andere Bestandteile des AP-1 Komplexes, wie z.B. JunD und FosB, scheinen im Rahmen der Erythropoese EPO-unabhängig konstitutiv exprimiert zu sein [82].

NF-kappaB (Rel/Nuklearer Faktor kappa B) wird in hämatopoetischen Zellen ebenfalls durch EPO-Stimulation aktiviert. Daran ist höchstwahrscheinlich auch die Tyrosinkinase Lyn beteiligt [83]. Aktiviertes NF-kappaB führt seinerseits zur Induktion antiapoptotischer Gene. Besonders die Faktoren c-Rel und RelA induzieren den bcl-x Promoter und steigern damit die Expressionsrate des bcl-x Gens [84].

GATA1, ein weiterer Transkriptionsfaktor der Erythropoese, erhöht ebenfalls die Expression des bcl-x Gens und fördert die erythroide Differenzierung. GATA1 scheint aber kein unmittelbarer Bestandteil der EPO-Signalkaskade zu sein [85]. GATA-1 induziert nach IL-3 Stimulation in Ba/F3-Zellen die bcl-x Expression [86].

Die Transkriptionsfaktoren der **Ets-Familie**, Ets2 und PU.1 induzieren in der Hämatopoese synergistisch den bcl-x Promoter [75].

2.4 bcl-x Promoter

Die Apoptose ist auf vielen Ebenen komplex kontrolliert, unter anderem auch auf Ebene der Expression Apoptose-regulierender Proteine. Im Folgenden wird die Bedeutung des bcl-x Promoters als Regulator im Rahmen der bcl-x Genexpression dargestellt.

Die bcl-x Promoterregion ist aus mehreren Promotoren und Enhancern aufgebaut, die die Exons des bcl-x Gens regulieren.

Promoterorganisation

Der Promoter PII reguliert Exon II und III. Die Exons Ia und Ib werden durch die gleichnamigen Promotoren P Ia und P Ib reguliert [50], [51].

Promoter können die Auswahl der Spleißstellen beeinflussen, wodurch verschiedene mRNA Transkripte, wie in Abbildung 2.4.a dargestellt, entstehen können. Gleichzeitig bieten

verschiedene Promoter ein erweitertes Spektrum an unterschiedlichen Bindungsstellen für Transkriptionsfaktoren an [87].

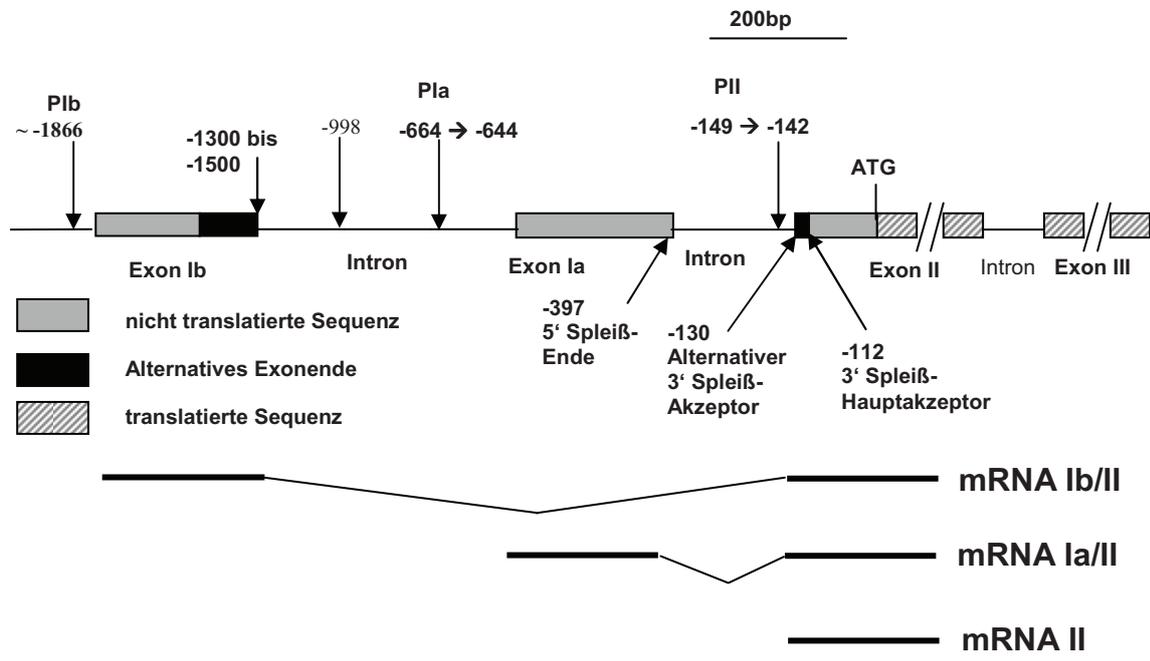


Abb. 2.4.a: Das *bcl-x* Gen besteht aus vier Exons (Ia, Ib, II, III) und fünf regulatorischen Sequenzen, von denen drei Promoterfunktion haben (Promoter Pla ca. bei -664bp bis -644bp, Promoter Plb ca. bei -1866, Promoter PII im Bereich der Nukleotide -149bp bis -142bp). Die beiden weiteren Kontrollregionen, ca. an Position -2721bp und -3412bp in Relation zum Translationsstartpunkt (Pecci A, JBC, 2001, 276(24) 21062-21069), konnten bisher auf RNA Ebene nicht verifiziert werden und besitzen wohl eher Enhanceraktivität (hier nicht dargestellt). -998 zeigt den Beginn der in dieser Arbeit klonierten *bcl-x* Promotersequenz an. ATG= Startcodon.

Im unteren Teil der Abbildung sind die Spleißvarianten der *bcl-x* RNA dargestellt (ohne Exon III).

Die Aktivierung der verschiedenen *bcl-x* Promoter variiert je nach Zelltyp.

In Erythroblasten werden mehr als 90% der *bcl-x* Transkripte über den Promoter P Ia als Transkriptionsstartpunkt realisiert [88].

In B-Lymphozyten induziert der Transkriptionsfaktor Ets den *bcl-x* Promoter P Ib, während der Transkriptionsfaktor NF-kappa den Promoter P Ia induziert [48].

In Mammakarzinom- und Ovarialkarzinomzellen liegt der Transkriptionsstartpunkt bei Promotor P Ib und es konnte überwiegend *bcl-x* RNA aus den Exonen Ib/II nachgewiesen werden.

Dagegen dominiert in Kolonkarzinomzellen der Transkriptionsstartpunkt P Ia mit einem mRNA- Spleißprodukt aus den Exonen Ia und II [50].

Zelltyp	Promoter	RNA
Erythroblasten	P Ia	Ia/II
B-Lymphozyten (Ets)	P Ib	Ib/II
B-Lymphozyten (NF-kappaB)	P Ia	Ia/II
Mammakarzinom	P Ib	Ib/II
Ovarialkarzinom	P Ib	Ib/II
Kolonkarzinom	P Ia	Ia/II

Tabelle 2.4.b: Aktivierung unterschiedlicher bcl-x Promoter und entsprechend Transkription verschiedener mRNAs je nach Zelltyp.

Somit beeinflussen die Promoterregionen die unterschiedliche Zusammensetzung der bcl-x RNA (Exon II und III entweder mit oder ohne Exon Ia / Exon Ib), wodurch wiederum verschiedene Isoformen des Bcl-x Proteins synthetisiert werden können.

3. Zielstellung

Die gezielte Einflussnahme auf zelluläre Aktivitäten wie Proliferation, Differenzierung und Apoptose steht in der aktuellen medizinischen Grundlagenforschung im Mittelpunkt experimenteller Untersuchungen.

Für Butyrat, das Anion der C4-Carbonsäure, sind vielfältige Effekte in diversen Zelltypen bekannt geworden. *In hämatopoetischen Vorläuferzellen hemmt Butyrat die Proliferation und induziert die erythroide Differenzierung, aber auch die Apoptose.* Es ist bisher weitgehend unklar, über welche Mechanismen dabei die Genexpression verändert wird. In der vorliegenden Arbeit soll der Einfluss von *Butyrat auf den Promoter des bcl-x Gens in hämatopoetischen Vorläuferzellen untersucht werden.* Das entsprechende Genprodukt ist in diesen Zellen im Ablauf antiapoptotischer Prozesse aktiviert und ist deshalb für die Entwicklung reifer Erythrozyten von großer Bedeutung.

Konkretes Ziel der in dieser Arbeit beschriebenen Experimente ist die *Lokalisierung Butyrat-abhängiger Elemente im bcl-x Promoter, sowie die Charakterisierung der Effekte von Butyrat auf Ba/F3-Zellen.* Mit den Untersuchungen soll ein Beitrag zur Aufklärung des zellulären und molekularen Hintergrunds der Butyrat-Wirkung erbracht werden.

Dabei stehen folgende Fragen im Vordergrund:

1. Welchen Einfluss hat Butyrat auf die Proliferation von Ba/F3-Zellen?
2. Gibt es Wechselwirkungen zwischen Zytokinen und Butyrat beim Einfluss auf die Mitogenese?
3. Welchen Einfluss hat Butyrat auf das Überleben von Ba/F3-Zellen?
4. Können Butyrat-sensitive Regionen im Promoter des bcl-x Gens lokalisiert werden?
5. Welche Transkriptionsfaktoren sind in die Regulation des bcl-x Gens nach Butyrat-Stimulation involviert?
6. Welchen Effekt hat die Promoteraktivierung auf die Genexpression?

4. Material und Methoden

4.1 Material

Es wurden Standardchemikalien der Firma GibcoBRL verwendet. Zur gezielten Zellstimulation wurde rekombinant murines IL-3 (rm-IL3, Biomol) verwendet. In der Arbeit wird dies zur Vereinfachung nur als IL-3 bezeichnet. Zum Zellwachstum in der Zellkultur wurde natives IL-3 verwendet, wie in Kapitel 4.2 beschrieben. Ebenso wurde zur gezielten Zellstimulation rekombinant humanes EGF (rh-EGF, Tebu-Bio) eingesetzt, welches hier nur als EGF bezeichnet wird. Chemikalien anderer Firmen sind gesondert kenntlich gemacht

4.2 Zellkultur

Sämtliche Versuche wurden mit der murinen IL-3 abhängigen pro-B-Zell-Linie Ba/F3 [89] durchgeführt. Der hier eingesetzte Zellklon der Ba/F3-Zellen zeichnet sich durch die stabile Expression von EGF/EPO-Hybridrezeptoren aus, die die extrazelluläre Domäne des humanen EGF-Rezeptors und die Transmembran- und intrazelluläre Domäne des murinen EPO-Rezeptors besitzen [83]. EGF-Stimulation aktiviert demzufolge bei diesen Zellen EPO-spezifische Signalwege.

Zur IL-3 Supplementation in der Zellkultur wurden 5% (v/v) konditioniertes Medium von BPV-Zellen (WEHI-3B Zellen) als IL-3-Quelle zugegeben [90].

Die Kultivierung erfolgte im Brutschrank (Heraeus Instruments) in H₂O-gesättigter Atmosphäre unter CO₂-Begasung (5 % v / v) bei 37 °C.

Das Standardkulturmedium setzte sich aus folgenden Komponenten zusammen:

RPMI 1640 (Biochrom) – Nährmedium	500 ml
Fetales Kälberserum FKS	10 % (v / v)
Gentamycin	50 µg / ml
Mercaptoethanol (Sigma)	145 µM
IL-3 (konditioniertes Medium von WEHI-3B Zellen)	5 % (v / v)

Tabelle 4.1:
Standardkulturmedium

Bei Versuchen mit Wachstumsfaktorentzug entspricht das „Kulturmedium“ dem Standardkulturmedium ohne Zusatz von IL-3.

Die Zellen wurden täglich mit reinem RPMI 1640 gewaschen und mit neuem Standardkulturmedium kultiviert. Dabei wurde die Zellkonzentration stets auf $1,5 - 2 \times 10^5$ Zellen / ml eingestellt und eine Zelldichte größer als 5×10^5 Zellen / ml nicht überschritten, um ein Überwachsen der Zellkultur zu vermeiden.

Wachstumsfaktorentzug

Das Wachstum der pro-B-Zell-Linie Ba/F3 ist IL-3 abhängig. Durch den kurzfristigen Entzug von IL-3 kann die Zellproliferation gehemmt werden.

1×10^7 Ba/F3-Zellen wurden mehrfach durch Zentrifugation (1000 rpm, 5 min) pelletiert und in RPMI 1640 Kulturmedium resuspendiert, um den Wachstumsfaktor IL-3 aus der Zellkultur

zu entfernen. Anschließend wurden die Zellen nochmals pelletiert und mit Kulturmedium (ohne Wachstumsfaktor) bei einer Konzentration von 1×10^6 Zellen / ml resuspendiert. Die Zellen wurden für 5 Stunden im Brutschrank (37 °C; 5 % CO₂) kultiviert.

4.3 Proliferationsassay (³H-Thymidin-Einbau)

Bei dieser Methode wird ³H-markiertes Thymidin dem Kulturmedium zugesetzt und während der S-Phase des Zellzyklus in die neu synthetisierte DNA inkorporiert. Die nach einer festgelegten Inkubationsdauer gebundene Radioaktivität ist ein Maß für die mitogene Aktivität der Zellen.

Es wurden Zellen in exponentieller Wachstumsphase abzentrifugiert und ihnen durch mehrfaches Waschen mit RPMI 1640 der Wachstumsfaktor IL-3 entzogen. Danach wurden die Zellen in Stimulationsmedium (0,1 ml RPMI 1640, inkl. 10 % (v/v) FKS, mit steigenden Dosen Butyrat in Kombination mit IL-3) bei einer Zelldichte von 2×10^5 /ml in den Vertiefungen einer 96er Mikrotiterplatte für 11 Stunden unter Kulturbedingungen inkubiert. Anschließend wurde jeder Ansatz mit 10 µl einer ³H-Thymidinlösung (200 nM; ≈ 120 mCi/l, Amersham) in RPMI 1640 vermischt (Endkonzentration 20 nM; ≈ 12 mCi/l). Darauf folgte eine weitere Inkubation unter Kulturbedingungen für 11 Stunden. Unter Verwendung eines speziellen Gerätes zur Ernte der Zellen (Skatron Instruments) wurden diese auf Filtermatten transferiert und nach kurzem Trocknen auf den Filterplättchen in je 1,5 ml Szintillationsflüssigkeit (Ultima Gold MV, LSC-Cocktail, Packard) in Szintillationsröhrchen überführt. Abschließend wurde die angereicherte Aktivität mit einem Flüssigszintillationszähler (1214 Rackbeta, LKB Wallac) gemessen.

4.4 Apoptosedetektion (FACS, Annexin V-FITC)

4.4.1 Apoptoseauslösung

Um Apoptose bei den Ba/F3-Zellen auszulösen, wurde ihnen IL-3 entzogen. Dazu wurden Zellen einer exponentiell wachsenden Kultur entnommen, abzentrifugiert und mehrfach in RPMI 1640 gewaschen. Anschließend wurden pro Stimulationsansatz 1×10^6 Zellen in den Vertiefungen einer 6er Mikrotiterplatte in Kulturmedium ohne Zytokin (3 ml RPMI 1640, inkl. 10 % (v/v) FKS) für 8 h unter Kulturbedingungen inkubiert. Danach wurden die Zellen pelletiert und der Überstand verworfen. Die Weiterverarbeitung erfolgte je nach Versuchsmodell (vgl. Kapitel 4.4.2).

4.4.2 FACS – Annexin V-FITC Analyse

Mit Hilfe der FACS-Annexin-V-FITC Methode können apoptotische Zellen identifiziert werden. Es werden Zellmembranveränderungen, die im Rahmen der Apoptose entstehen, nachgewiesen. Phosphatidylserin befindet sich auf der zytoplasmatischen Zellmembranseite normaler Zellen. Im Rahmen der Apoptose werden bereits in frühen Stadien Phospholipide, wie Phosphatidylserin, aufgrund von Veränderungen der Zellmembranpermeabilität auf die extrazelluläre Seite transloziert. Annexin V kann *in vitro* in Gegenwart von Calcium an Phosphatidylserin binden. Das Annexin V ist mit FITC (fluorescein isothiocyanat) markiert und kann somit durch Durchflusszytometrie oder Fluoreszenzmikroskopie nachgewiesen werden (FACS = Fluorescence activated cell sorting). Die Exposition von Phosphatidylserin auf der Zellmembranaußenseite erfolgt als einer der ersten Schritte der Apoptose, lange vor der Karyolyse oder der DNA-Fragmentation. Diese Tatsache wird benutzt, um apoptotische von nekrotischen Zellen unterscheiden zu können. Während der Nekrose entstehen Löcher in der Zellmembran, weshalb sich nekrotische Zellen *in vitro* ebenfalls mit Annexin-V-FITC fluorometrisch nachweisen lassen können. Eine Zweitbehandlung der untersuchten Zellen mit Propidiumiodid färbt allerdings nur Zellen an, deren Kernmembran bereits zerstört ist, resp. deren DNA freiliegt. Dies ist nur bei nekrotischen Zellen der Fall. Somit färben sich nekrotische Zellen zweifarbig, während apoptotische Zellen mit Hilfe des FACS-Annexin-V-FITC Modells nur einfarbig erscheinen (Ausnahme: Zellen in weit fortgeschrittenem Apoptosestadium zeigen das gleiche Färbeverhalten wie nekrotische Zellen).

Den Ba/F3-Zellen wurden, wie unter 4.4.1 beschrieben, der Wachstumsfaktor IL-3 entzogen, um Apoptose auszulösen. Anschließend wurden die Zellen mit verschiedenen Kombinationen (vgl. Tbl. 4.4.2.a) der Wachstumsfaktoren IL-3, EGF und mit Butyrat für 8 Stunden in 3 ml RPMI 1640 (inkl. 10 % (v/v) FKS) inkubiert. Danach wurde die FACS-Annexin-V-FITC Analyse gemäß den Angaben des Herstellers (Apoptoseanalyse: Calbiochem®, Annexin V FITC Apoptosis Detection Kit) angeschlossen, wobei die Zellen durchflusszytometrisch auf Apoptose hin untersucht wurden.

Ansatz \ Zytokin	IL-3	EGF	Butyrat
1	100pM	---	---
2	100pM	200 ng/ml	---
3	100pM	---	2mM
4	100pM	200 ng/ml	2mM
5	---	---	---
6	---	200 ng/ml	---
7	---	---	2mM
8	---	200 ng/ml	2mM

Tabelle 4.4.2.a: Stimulationsansätze für FACS Annexin V FITC: die Ba/F3-Zellen wurden für 8 Stunden mit verschiedenen Kombinationen der Wachstumsfaktoren behandelt und anschließend gemäß den Angaben des Herstellers bearbeitet (Apoptoseanalyse: Calbiochem®, Annexin V FITC Apoptosis Detection Kit).

4.4.3 Nukleosomale Fragmentierung

Eine charakteristische Erscheinung apoptotischer Zellen ist die internukleosomale Fragmentierung ihrer chromosomalen DNA infolge der Aktivierung von Endonukleasen. Die

Präparation dieser ca. 185 bp langen Fragmente und ihre elektrophoretische Auftrennung im Agarosegel stellt einen zuverlässigen Nachweis der Apoptose dar [105].

Zellkernlyse:

Die Apoptose wurde induziert wie unter 4.4.1. beschrieben. Die weiteren Präparationsschritte folgten einem Protokoll von Herrmann [91]:

1×10^6 Zellen wurden pelletiert und in 50 μ l eiskaltem Lysepuffer (1 % (v/v) NP40; 20 mM EDTA; 50 mM Tris pH 7,5) resuspendiert. Nach Zentrifugation für 5 min bei ca. 2300 x g und 4 °C wurde der Überstand, in dem DNA, RNA und Proteine gelöst sind, in ein neues Reaktionsgefäß überführt und der Vorgang mit dem verbleibenden Pellet exakt wiederholt. Es wurde erneut zentrifugiert und der zweite Überstand dem ersten zugefügt. An dieser Stelle war eine Aufbewahrung für einige Tage bei -20 °C möglich.

Degradation von RNA und Proteinen:

Zur Degradation von Proteinen und RNA wurde jeder Ansatz mit 10 μ l SDS (10%ig (v/v)) und 5 μ l RNase A (10 mg/ml, Boehringer Mannheim) versetzt und 2 h bei 56 °C inkubiert. Nachfolgend wurde jeder Ansatz mit 10 μ l Proteinase K (15,5 mg/ml, Boehringer Mannheim) für 2h bei 37 °C inkubiert.

Fällung und Reinigung der DNA:

Durch Zugabe von 60 μ l Ammoniumacetat (10 M) und 500 μ l Ethanol wurde die DNA präzipitiert und durch Zentrifugation für 20 min bei ca. 22000 x g pelletiert. Das Pellet wurde mit 500 μ l 70%igem (v/v) Ethanol gewaschen und vakuumgetrocknet (UNIVAPO 100H, UNIEQUIP). Die DNA wurde in 40 μ l deionisiertem Wasser gelöst.

Analyse mittels Gelelektrophorese:

Die Agarosegelelektrophorese dient der Visualisierung und dem Auftrennen von DNA nach ihrem Molekulargewicht.

Das Agarosegel wurde durch Aufkochen von Agarose (GibcoBRL) in 0,5 x TBE-Puffer (90 mM Tris, 90 mM Borsäure, 2 mM EDTA, pH 8,0) hergestellt.

Die Fragmentauftrennung erfolgte auf einem mit 0,3 μ g/ml Ethidiumbromid versetzten 1%igen (w/v) Agarosegel in einer horizontalen Elektrophoresekammer (Mini-Sub Cell GT, BIO-RAD). Die in 40 μ l deionisiertem Wasser gelöste DNA wurde mit 5 μ l 10 x Ladepuffer (40 % (w/v) Sucrose; 0,25 % (w/v) Bromphenolblau) gemischt. Davon wurden 10 μ l zur elektrophoretischen Auftrennung der Fragmente im Agarosegel eingesetzt. Die elektrophoretische Auftrennung wurde bei etwa 1 kV/m (Power Supply Model 200/2.0, BIO-RAD) in 0,5 x TBE-Puffer durchgeführt.

4.5 Zellzyklusanalyse durch FACS-Analysen (FACS)

Die Anfärbung der nukleären DNA mittels Propidiumiodid und die nachfolgende FACS-Analyse ist eine Möglichkeit, die Verteilung der Zellen einer Zellpopulation über die Zellzyklusphasen anhand des DNA-Gehalts zu analysieren. Der tetraploide Chromosomensatz einer Zelle in der G2- und Mitosephase ist theoretisch doppelt so stark markiert, wie ein diploider Chromosomensatz der Zelle in der G0- und G1-Phase. Während der DNA-Synthese in der S-Phase besitzt die Zelle einen Chromosomensatz zwischen diploid und tetraploid und somit eine intermediäre Markierung. Somit können Einflüsse der Zytokine EGF und IL-3, sowie Butyrat auf den Zellzyklus verglichen werden.

Weiterhin können Aussagen über die Synchronität der Zellpopulationen während des Stimulationszeitraumes getroffen werden.

2×10^6 Ba/F3-Zellen wurden zentrifugiert, in 1 ml $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ kaltem Alkohol (70 %) resuspendiert und bis zur weiteren Verarbeitung bei $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ gelagert. Für die weitere Probenaufbereitung erfolgte eine Inkubation von 20 Minuten bei $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ in der alkoholischen Lösung. Die Zellen wurden nach Pelletierung mit PBS/Tween20 (0,5 %; pH 7,4) gewaschen und 5 min mit $300 \times g$ zentrifugiert. Es folgten eine 10-minütige Inkubation mit 1 ml PBS/RNase A (1 mg/ml) bei Raumtemperatur und ein erneuter Wasch- (1 ml PBS/Tween 20) und Zentrifugationsschritt ($300 \times g$, 5 min). Abschließend wurden die Zellen in 0,5 ml PBS/Propidiumiodid (20 $\mu\text{g}/\text{ml}$, pH7.4) 10 Minuten bei Raumtemperatur unter Lichtabschluss inkubiert, bevor die Analyse mit einem FACS-Gerät (Becton Dickinson) durchgeführt wurde.

4.6 Nachweis der Genexpression

Die Analyse der Genexpression auf transkriptionaler Ebene erfolgte durch Northern Blot und RT-PCR.

4.6.1 RNA-Isolierung

Die Ba/F3-Zellen wurden nach Wachstumsfaktorentzug (vgl. Kapitel 4.2) gezielt mit 2mM Butyrat, 100pM IL-3 und 200ng/ml EGF restimuliert und die RNA anschließend zu verschiedenen Zeitpunkten zwischen 0,5 und 4 Stunden gewonnen. Die Isolation der Gesamt-RNA erfolgte mit dem Reagenz TRIZOL LS nach der Vorschrift des Herstellers (GibcoBRL). Bei diesem Verfahren wird zunächst die RNA extrahiert, durch Zugabe von Isopropanol ausgefällt und nach wiederholtem Waschen mit 70%igem (v/v) Ethanol getrocknet und in Diethylpyrocarbonate (DEPC)-behandeltem Wasser aufgelöst. Durch Erwärmen des Ansatzes auf $65\text{ }^{\circ}\text{C}$ kann der Lösungsvorgang unterstützt werden. Die Verwendung von DEPC diente der Inaktivierung von RNasen. Zur Herstellung von DEPC-behandeltem Wasser wurde deionisiertes Wasser über Nacht bei Raumtemperatur mit 0,1 % (v/v) DEPC inkubiert und anschließend autoklaviert.

Die Bestimmung der Konzentration der Gesamt-RNA erfolgte unter Benutzung eines Spektrophotometers (Ultrospec 2000, Pharmacia Biotech) bei 260nm. Der Einsatz von 2×10^6 bis 1×10^7 Ba/F3-Zellen lieferte etwa 50 µg bis 250 µg Gesamt-RNA, die typischerweise etwa 1 % mRNA enthält. Die Qualität der RNA wurde zusätzlich mittels Agarosegelelektrophorese durch den Nachweis deutlich abgegrenzter ribosomaler 18S- und 28S-RNA- Banden beurteilt.

4.6.2 mRNA Nachweis mittels Northern Blot

Die Auftrennung der RNA nach ihren molekularen Massen erfolgte in einem 1%-igem Agarosegel. Dazu wurden 1,5g Agarose in 93ml DEPC-Wasser, 30ml 1x MEN-Puffer und 27 ml Formaldehyd (37%) aufgenommen. Formaldehyd (zur RNA-Denaturierung) und MEN-Puffer wurden erst nach dem Aufkochen und einer kurzen Abkühlphase zugesetzt. Die aufzutrennenden Proben enthielten maximal 20µg RNA in 8µl DEPC-Wasser. Unterschiedliche Volumina der wässrigen RNA-Suspension wurden mit DEPC-Wasser ausgeglichen. Zusätzlich wurden 32,1µl Probenpuffer in die einzelnen Proben pipettiert.

5 x MEN	4ul
Formaldehyd 37%	7ul
Deionisiertes Formamid	20ul
Ethidiumbromid	0,1ul
Bromphenol/ Xylencyanol-Blau in 0,1% DEPC Wasser	1ul

Tabelle 4.6.2:
RNA-Probenpuffer

Um störende Effekte durch Sekundärstrukturen der RNA bei der Auftrennung zu vermindern, wurden die Proben 15 min bei 65 °C erwärmt und anschließend auf Eis abgekühlt. Vor dem Auftragen der Proben wurde das Agarosegel in der Laufkammer komplett mit 0,5 x MEN-Puffer überschichtet. In Abhängigkeit von der Gelkammergröße wurde das Gel für ca. 2 –4 h mit 100 V bzw. 150 V betrieben. Die Elektrophorese wurde beendet, wenn die Bromphenolblaubande ca. 8 cm in Richtung Anode gewandert war. Das Gel wurde dem Träger entnommen und zweimal 30 min in DEPC-Wasser langsam schüttelnd gewaschen. Anschließend wurde über Nacht geblottet. Der Blot-Vorgang erfolgte durch Fixierung des Gels auf einen Schwamm mit 2 Lagen Whatmanfilter. Über dem Gel befanden sich noch die *Hybond-NTM* Nylon-Membran (Amersham), 10 Lagen Whatmanfilter und ein Stapel saugfähiger Papierfilter, welcher leicht beschwert wurde.

Nach dem Transfer wurde die RNA auf der Membran durch UV-Strahlung immobilisiert (Crosslinking), abschließend kurz in 10 x SSC-Puffer gewaschen und bei –70 °C gelagert. Während der weiteren Arbeit mit der Membran wurde ein Austrocknen vermieden.

Radioaktive Markierung der cDNA

Zur Analyse der bcl-x mRNA Expression wurde die auf der Membran fixierte mRNA mit ca. 25ng radioaktiv markierter bcl-x cDNA hybridisiert. Die bcl-x cDNA entsprach dem 998bp langen Abschnitt des bcl-x Promoters (vgl. Kapitel 5.4). Dieser wurde nach Endonuklease-Restriktion und Geleluation (vgl. Kapitel 4.9) mit [α - 32 P]-dCTP radioaktiv markiert (Amersham, 5000 Ci/mmol, Kit von Amersham (*rediprime*TM II)). Es wurde dabei nach der vom Hersteller beigelegten Vorschrift verfahren.

Hybridisierungsreaktion

Zunächst erfolgte die Vorhybridisierung (1 h, 65 °C) der *Hybond-N*TM Membran in 20 ml *QuikHyb*[®]-Hybridisierungslösung (Stratagene). Zum Start der anschließenden Hybridisierung wurde die gesamte radioaktiv markierte bcl-x cDNA in die Lösung pipettiert und weitere 2 h bei 65 °C unter kontinuierlichem und langsamem Drehen inkubiert. Es folgte ein Waschen mit 2 x SSC-Puffer und 0,1 x SSC-Puffer für jeweils 30 min. Das Ergebnis der Hybridisierung wurde durch eine Autoradiografie dokumentiert.

Vor einer erneuten Verwendung der Membran für weitere Hybridisierungen wurde diese mit 0,1 x SSC-Puffer bei 95 °C für 10 min gewaschen.

4.6.3 mRNA Quantifizierung mittels RT-PCR

Die RT-PCR ist ein hochempfindliches Verfahren zum Nachweis spezifischer mRNA, bei der die mRNA in cDNA übersetzt wird und anschließend der cDNA-Nachweis durch PCR erfolgt. Zur Übersetzung der mRNA in cDNA wurde das Enzym Reverse Transkriptase der Firma GibcoBRL genutzt (Superscript II RT). Etwa 1 µg der Gesamt-RNA-Präparation wurde mit 0,5 µl 50 µM Oligo-(dT)-Primer versetzt und mit deionisiertem Wasser auf 4,5 µl aufgefüllt, vermischt, für 10 min bei 70 °C inkubiert und anschließend sofort auf Eis gekühlt. Der Oligo-(dT)-Primer bestand aus 17 Thymidinresten und bindet komplementär an die 3'-gelegenen Poly-Adenin-Sequenzen der Gentranskripte (mRNA).

RNA	1 µg
50 µM Oligo-(dT)-Primer	0,5 µl
Aqua bidest.	4,5 µl - x

Tabelle 4.6.3.a: RNA-Primer-Mix für RT-PCR; Inkubation für 10' bei 70°C; anschließend Kühlung auf Eis.

Weiterhin wurden folgende Reagenzien zu einem Reaktionsansatz gemischt:

5 x Erststrang-Puffer	2 µl
0,1 M DTT	1 µl
dNTP-Mix (10 mM pro Komponente)	0,5 µl
RNase-Inhibitor (GibcoBRL)	1 U
Superscript II RT (reverse Transkriptase)	100 U

Tabelle 4.6.3.b: Reaktionsansatz für RT-PCR

Dieser Reaktionsansatz wurde dann mit dem RNA-Primer-Mix vermischt und für 1 h bei 42 °C inkubiert. Nach einer 15-minütigen Hitzeinaktivierung des Enzyms bei 70 °C konnte der Ansatz bis zur weiteren Verwendung bei -20 °C aufbewahrt werden.

In einem zweiten Schritt wurde mittels PCR ein spezifisches Fragment der *in vitro* synthetisierten cDNA-Erststränge, welches durch das verwendete Primerpaar festgelegt wurde, amplifiziert. Es wurden die gleichen Primer verwendet, die auch in Kapitel 4.7.2 eingesetzt wurden, um das bcl-x Promoterfragment aus genomischer DNA zu gewinnen. Die PCR wird in Abschnitt 4.7.1 beschrieben. Der Reaktionsansatz wurde auf einem Agarosegel elektrophoretisch aufgetrennt (vgl. Kapitel 4.4.3), um die Länge des erwarteten Fragments zu verifizieren und semiquantitativ abzuschätzen.

4.7 DNA-Manipulation

4.7.1 Isolierung genomischer DNA

Die Isolierung genomischer DNA erfolgte mit dem Reagenz TRIZOL LS nach der Vorschrift des Herstellers (GibcoBRL). Bei diesem Verfahren werden RNA und DNA getrennt extrahiert. Nachfolgend wird die DNA durch Zugabe von Ethanol ausgefällt, durch mehrere Waschstschritte gereinigt, getrocknet und in 8 mM NaOH-Lösung aufgelöst. Die Bestimmung der DNA-Konzentration geschah unter Benutzung eines Spektrophotometers (Ultraspec 2000, Pharmacia Biotech) bei 260nm. Vor der Verwendung der DNA-Präparation in enzymatischen Reaktionen wurde der benötigte pH-Wert mit HEPES-Puffer eingestellt.

4.7.2 DNA-Amplifikation mittels PCR

PCR wird eingesetzt, um DNA *in vitro* zu amplifizieren [92]. Für die PCR wurde der Taq PCR Master Mix Kit (Quiagen®) gemäß Instruktionen des Herstellers verwendet.

In dieser Arbeit diente der pGL3-X Luziferase-Vektor, der ein 1000bp langes Fragment des bcl-x Promoters enthält, als Ausgangs-DNA.

Die Herstellung des pGL3-X Vektors erfolgte durch Amplifikation des bcl-x Promoters aus genomischer DNA von Ba/F3-Zellen. Die Sequenzen der verwendeten Primer lauten 5'-GGA ATT CAA AGA CAA CTA GCG-3' bzw. 5'-TTT TAT AAT AGA GAT GGG CTC AAC-3'. Anschließend wurde der amplifizierte 998bp lange Promoterabschnitt in den Luziferase-Vektor pGL3-basic kloniert (Promega, USA, vgl. Abb. 4.11.a).

Durch den Einsatz von verschiedenen 5'-Primern, die an unterschiedlichen Stellen der bcl-x Promoter Sequenz im pGL3-X binden, konnten verkürzte Fragmente des bcl-x Promoter amplifiziert werden. Die gewonnenen Fragmente des bcl-x Promoters wurden entsprechend der Länge ihrer Basensequenz bezeichnet (35bp, 111bp, 320bp, 484bp, 619bp, 835bp). Die Primersequenzen sind am Ende des Kapitels „Material und Methoden“ aufgeführt.

Die eingesetzte DNA wurden bei folgenden Konzentrationsverhältnissen der Reaktionsteilnehmer amplifiziert:

5'Primer (50 µM)	25 pmol
3'Primer (50 µM)	25 pmol
DNA	2 µg
Aqua Bidest	Differenz zu 25 µl
Taq PCR Master Mix aus :	25 µl
• Taq DNA Polymerase	1,25 U
• 5U/µl dNTP je 400mM	je 10 µmol
• 3mM MgCl ₂ .	75 nmol
Gesamt PCR – Ansatz	50 µl

Tabelle 4.7.1a: PCR Reaktionsansatz

Die Amplifikation wurde mit dem PCR-Cycler „RoboCycler® Gradient 96“ (Stratagene) nach folgendem Protokoll durchgeführt:

Zyklus	Reaktion	Dauer/min	Temperatur/°C
1	Initiale Denaturierung	5 min	94°C
2 – 25	Denaturierung	30 s	94°C
	Primer-Annealing	30 s	T _a ca. 57°C
	Elongation	30 s	72°C
26	Terminale Elongation	10 min	72°C

Tabelle 4.7.1b: PCR

Zur Kontrolle des PCR - Ergebnisses wurden 5 µl der amplifizierten DNA auf einem 1 - 2%igen horizontalen Agarosegel bei 100 V elektrophoretisch aufgetrennt. Das Molekulargewicht wurde mit Hilfe eines DNA-Molekulargewicht-Standards unter der UV-Lampe bei einer Wellenlänge von 312 nm abgeschätzt.

Spezifität, Sensitivität und Reproduzierbarkeit der PCR hängen neben dem gewählten Enzym in hohem Maße von der Auswahl geeigneter Primersequenzen ab. Bei der Primerauswahl wurden speziell folgende Punkte berücksichtigt:

Primer – Primer Wechselwirkungen (Dimerisation; Hairpin - Bildung), primerspezifische Schmelztemperatur T_m, sowie die Nucleotidverteilung (Verhältnis von Adenosin und Thymin zu Guanin und Cytidin; AT / GC Quotient).

Die Berechnungen der Schmelztemperatur T_m der Primer erfolgte nach der Formel

$$T_m = 81,5 + 16,6 \lg [Me^+] + 0,41 (\%GC) - 675/N - (\%mismatch) \quad [107].$$

Dabei bedeuten:

- [Me⁺] Konzentration monovalenter Kationen in mol/l
- (%GC) prozentualer Anteil an Guanin- und Cytosinresten
- N Länge des Oligonukleotids in bp
- (% mismatch) prozentualer Anteil von Basenfehlpaarungen

Die Anlagerungs-Temperaturen („Annealing“) wurden experimentell beginnend mit dem Wert der Schmelztemperatur optimiert. Die Primer wurden gemäß DNA-Sequenz des bcl-x Promoters ausgewählt und synthetisiert. Zusätzlich wurde die DNA-Primersequenz 5'-seitig um die spezifische Schnittsequenz einer ausgewählten Restriktionsendonuklease (Sac I: 5' GAG CTC 3') verlängert, um die molekularbiologische Weiterverarbeitung der amplifizierten DNA zu erleichtern.

4.7.3 Klonierung von PCR Produkten

Durch Integrieren der PCR-Produkte in einen Vektor wurden diese für weitere molekularbiologische Bearbeitungen verfügbar gemacht. Die durch PCR gewonnenen DNA-Fragmente wurden nach der TA-Klonierungs-Methode (s. Abb. 4.7.2a) unter Verwendung des „TOPO TA Cloning“ Kit (Invitrogen) in den Kit-eigenen Vektor „pCR®2.1 - TOPO®“ ligiert und zur Amplifikation in *Escherichia coli* (*E. coli*) transformiert.

Die Taq-Polymerase besitzt die Eigenschaft, dass sie während der PCR an das 3' Ende des amplifizierten DNA-Einzelstrangs DNA-unabhängig ein zusätzliches Adenosin („A“) als Überhang anbaut. Dieses Adenosin lagert sich komplementär an den synthetischen 3'-Thymidin-Überhang des pCR®2.1-Vektor an und wird durch eine assoziierte Topoisomerase I mit dem Vektorende kovalent verbunden. Infolge dieser Ligation löst sich die Topoisomerase I von der DNA. Die Ligation erfolgte nach der Vorschrift des Herstellers (s. Tabelle 4.7.2.b).



Abb. 4.7.2.a: „TOPO TA Cloning“ Methode (Invitrogen): Klonierung von PCR Produkten mit Adenosinüberhang in den Vektor „pCR®2.1 - TOPO®“ (Invitrogen) mit synthetischen Thymidinüberhängen mit Hilfe der vektorassoziierten Topoisomerase I.

PCR – DNA	2 µl
Aqua destillata	3 µl.
Topoisomerase Mastermix (Invitrogen™)	1 µl
<ul style="list-style-type: none"> • Plasmid DNA 10 ng/µl • 50 % Glycerol • 50 mM Tris – HCl, pH 7,4 • 1 mM EDTA • 1mM DTT • 0,1 % Triton X – 100 • BSA 100 µg/ml • Phenolrot 	

Tabelle 4.7.2.b: Ligationsansatz zur Klonierung von PCR Fragmenten in den „pCR®2.1 - TOPO®“ Vektor (Invitrogen®) nach der „TOPO TA Cloning®“ Methode.

Der Reaktionsansatz wurde bei Raumtemperatur für 5 Minuten inkubiert. Danach folgte entweder die Transformation des Vektors in kompetente *E. coli* Bakterien (vgl. Kapitel 4.7.3) oder die Lagerung bei -20°C bis zur Transformation.

4.7.4 DNA -Transformation in *Escherichia coli*

Bakterienzellen können durch verschiedene Methoden für die Aufnahme extrazellulärer DNA „kompetent“ gemacht werden. Zum DNA-Transfer eignet sich insbesondere zirkuläre DNA (Plasmid-DNA).

In dieser Arbeit wurden kommerziell verfügbare „kompetente“ *E. coli* verwendet (Invitrogen™, TOP10 One Shot *E. coli*).

Für die DNA-Transformation der Bakterienzellen wurde die Hitze-Schock-Methode nach Vorschrift des Herstellers durchgeführt.

Die bei -80°C gelagerten kompetenten *E. coli* wurden zunächst auf Eis aufgetaut und mit ca. 0,3 - 0,5 μg Plasmid im Eisbad für 5 Minuten inkubiert. Zur Transformation der Plasmide wurden die Bakterienzellen für 45 Sekunden bei 42°C inkubiert („heat-shock“) und anschließend sofort wieder auf Eis gekühlt. Danach wurden 250 μl raumtemperiertes SOC-Nährmedium zu den transformierten Bakterien hinzu gegeben und diese unter Schütteln (225 U/min) bei 37°C für eine Stunde inkubiert, um die Antibiotikaresistenzgene des Vektor „pCR®2.1 - TOPO®“ zu exprimieren (Ampicillin- und Kanamycinresistenzgene). Im Anschluss wurden 50 μl bis 200 μl der Zellkultur auf einer LB-Agar-Platte ausgestrichen, die bei 37°C für mehrere Stunden inkubiert wurde, bis sich deutlich Kolonien von *E. coli* gebildet hatten.

Die Herstellung der Mediumplatten erfolgte durch Zusatz von Agar (DIFCO Laboratories) zu LB-Medium (15 g/l) vor dem Autoklavieren. Nach Abkühlen des Mediums unter etwa 60°C wurde Ampicillin (100 $\mu\text{g}/\text{ml}$) oder Kanamycin (50 $\mu\text{g}/\text{ml}$) zugegeben. Die Lösung wurde gut gemischt, in Petrischalen gegossen und nach dem Erstarren ggf. bei 4°C einige Wochen aufbewahrt.

Die auf den Platten gewachsenen weißen Kolonien wurden bei Bedarf zum Beimpfen von LB-Flüssigkulturen benutzt, aus denen dann Plasmid-DNA isoliert werden konnte (vgl. Kapitel 4.8).

Die Differenzierung zwischen der Aufnahme eines rekombinanten Vektors (Plasmid mit integriertem PCR-Produkt) und eines nicht rekombinanten Vektors (Plasmid ohne integriertes PCR-Produkt) erfolgte mit Hilfe der α -Komplementierung / Blau-Weiß-Selektion. Die Oberfläche der Agarplatte wurde zusätzlich mit 100 μl eines Gemischs aus X-Gal (Sigma) und IPTG (Sigma) vorbehandelt, bevor die Bakterien auf der Agarplatte ausgestrichen wurden. Die rekombinanten Bakterienklone konnten danach durch eine

Weißfärbung von den nicht rekombinanten blau gefärbten Bakterienklonen unterschieden werden. Bei erfolgreicher Klonierung eines DNA-Fragments in den Vektor „pCR®2.1-TOPO®“ verliert dieser die Fähigkeit das Enzym β -Galactosidase zu exprimieren, da das klonierte Fragment die Genstruktur des β -Galactosidasegens unterbricht. X-Gal (chromogenes Lactoseanalogon 5-Bromo-4-chloro-3-indoyl- β -D-galactopyranoside) wird als Substrat durch das Enzym β -Galactosidase in einen blauen Farbstoff umgesetzt. IPTG (Isopropyl-1-thio- β -D-galactopyranoside) dient als Induktor des β -Galactosidasegens.

4.8 Gewinnung von Plasmid-DNA aus Bakterien

Eine rekombinante Bakterienkolonie wurde nach Antibiotikaselektion mit LB-Medium und Kanamycin bzw. Ampicillin (50 μ g/ml) Zusatz in einem Reaktionsgefäß für etwa 8 Stunden unter Schütteln bei 37 °C inkubiert.

Nach dem Pelletieren der Bakterien erfolgte eine alkalische Lyse der Zellen mit NaOH-SDS-Lösung. Daran schloss sich die Neutralisation des pH-Wertes mit Essigsäure an, die zum Ausfällen vieler Proteine, Lipoproteine und der chromosomalen DNA führte. Nach dem Abzentrifugieren der festen Bestandteile wurde der klare Überstand kurz mit einer DNA-bindenden Matrix (Anionenaustauschermembran-Säule) inkubiert. Während die negativ geladene Plasmid-DNA an die Anionenaustauschermembran gebunden und damit zurückgehalten wurde, konnten die anderen löslichen Bestandteile des Lysates durch Spülen mit ethanol- und salzhaltigen Waschlösungen unterschiedlicher Konzentrationen entfernt werden. Abschließend wurde die DNA durch Zugabe eines wässrigen Elutionspuffers von der Matrix eluiert. Die gewonnene DNA wurde zur Konzentrierung und Entsalzung in Ethanol oder Isopropanol ausgefällt, luftgetrocknet und in Aqua bidest. aufgelöst. Bis zur weiteren Bearbeitung wurde die gewonnene DNA bei -20 °C eingefroren.

Die Konzentration der präparierten DNA wurde bei Bedarf photometrisch bei 260 nm bestimmt (Ultraspec 2000, Pharmacia Biotech). Durch Bildung des Quotienten aus den Absorptionen bei 260 nm und 280 nm konnte die Kontamination der Präparation mit Proteinen abgeschätzt werden. Dieser Quotient lag üblicherweise bei 1,7 bis 1,8. Gelegentlich wurde die erhaltene DNA zusätzlich durch Elektrophorese im Agarosegel (Kapitel 4.4.3) überprüft.

Für Plasmid-DNA-Isolierungen aus Kulturen mit einem Volumen von 1 ml bis 2 ml wurde der „InViSorb Spin Plasmid Mini Kit®“ (InViTek) benutzt. Diese Plasmid-Minipräparation lieferte etwa 20 μ g DNA.

Für Plasmid-DNA-Isolierungen aus Kulturen mit einem Volumen von 100 ml bis 200 ml fand der „QIAfilter™ Plasmid Maxi Kit®“ (QIAGEN) Verwendung. Bei dieser Plasmid-Maxipräparation wurden etwa 100 - 350 μ g DNA erhalten.

Die detaillierten Präparationsvorschriften wurden den Angaben der Hersteller entnommen.

4.9 Klonierung von bcl-x Promoterfragmenten

Restriktionsendonuklease–Verdauung

Um DNA-Stränge an definierten Stellen zu schneiden, werden Restriktionsendonukleasen verwendet. Die Inkubation mit der zu spaltenden DNA erfolgte in einem für das jeweilige Enzym optimierten Puffer, bovinem Serumalbumin und bei einer ebenfalls enzyspezifischen Temperatur. Mindestens 5 U Endonuklease kamen pro μg DNA zum Einsatz. Bei Bedarf wurde das Enzym durch Hitzeeinwirkung inaktiviert.

Hier wurden die Restriktionsendonukleasen Sac I und Xho I (New England Biolabs NEB) zur Restriktion von ca. $10\mu\text{g}$ Plasmid-DNA verwendet.

Die bcl-x Promoterfragmente wurden durch Restriktion aus dem pCR@2.1 TOPO@ Vektor herausgetrennt. Der Luziferase-Vektor pGL3-X wurde mit den gleichen Restriktionsenzymen verdaut, um gemeinsame Schnittstellen mit den verkürzten bcl-x Promoterfragmenten zu erhalten. Diese Schnittstellen wurden in einem späteren Schritt genutzt, um die Promoterfragmente in den Reporteragen-Vektor zu klonieren.

	Rekombinanter Vektor TOPO pCR2.1 mit Promotorfragment	pGL3-X Luziferase-Vektor mit bcl-x Promoter
DNA	6,3 μg (c = 0,1 μg / μl)	10 μg (c = 2 μg / μl)
H ₂ O	---	58,2 μl
10x Puffer 1 (NEB)	8 μl	8 μl
100xBSA (NEB)	0,8 μl	0,8 μl
XhoI (NEB)	120 U (20 U/ μl)	120 U (20 U/ μl)
SacI (NEB)	40 U (20 U/ μl)	40 U (20 U/ μl)
Gesamt:	80 μl	80 μl

Tabelle 4.9.a: Restriktionsreaktion mit Endonukleasen

Agarosegel–Elektrophorese:

Die elektrophoretische Auftrennung der DNA erfolgte wie in Kapitel 4.4.3 beschrieben. Durch Vergleich mit einem dsDNA-Molekulargewichtsmarker (1 kb ladder, GibcoBRL) wurde das Molekulargewicht der aufgetrennten Proben visuell abgeschätzt.

DNA-Gewinnung durch Agarosegel–Eluation

Nach der DNA-Verdauung wurden die DNA-Fragmente in einem 1%igen Agarosegel (0,3 $\mu\text{g}/\text{ml}$ Ethidiumbromid) bei 100 V elektrophoretisch aufgetrennt. Mit Hilfe eines DNA–Massenmarkers („AmpliSize DNA Size Standard“, Fa. BioRad) konnte die Masse des jeweiligen bcl-x Promoterfragments und des linearisierten pGL3-basic-Vektors anhand der Lumineszenz unter der UV-Lampe abgeschätzt und verglichen werden.

Die Banden des gesuchten Promotor-Fragments und des linearisierten Vektor pGL3basic wurden mit einem Skalpell aus dem Agarosegel ausgeschnitten. Das DNA-haltige Gel wurde in einem mit 0,05 x TBE Puffer gefüllten Schlauch aus semipermeabler Membran verschlossen (Dialyse-Schlauch) und die DNA in einem elektrischen Feld bei 100 V (Puffer

0,5 x TBE) aus der Agarose herausgelöst. Die DNA wurde im flüssigen Inhalt des Schlauches unter 312 nm UV-Licht sichtbar gemacht und in ein Reaktionsgefäß übertragen. Nach Zentrifugation für 2 min bei 22000 x g zur Abtrennung fester Verunreinigungen (z.B. Agarosepartikel) wurde der Überstand in ein neues Reaktionsgefäß überführt. Danach wurde die DNA durch Zugabe von Ethanol (Endkonzentration 70 % (v/v)) und Ammoniumacetat (Endkonzentration 0,3 M) über Nacht bei RT oder 2 h bei -20 °C ausgefällt. Nach dem Pelletieren der DNA für 15 min bei 22000 x g und dem Entfernen des Überstandes folgten drei Waschschrte mit 70 %-igem (v/v) Ethanol. Das Pellet wurde getrocknet und in aqua bidest. aufgelöst.

Klonierung von bcl-x Promoterfragmenten in den Luziferase-Vektor pGL3-basic

Das gewonnene Promoter-Fragment wurde in den linearisierten Vektor pGL3-basic ligiert. Der Reaktionsansatz wurde nach einem molaren Verhältnis von DNA-Fragment zu Vektor-DNA von 3:1 bis 5:1 vorbereitet (Tabelle 4.9.b). Die Klonierung erfolgte unter Verwendung des Enzyms T4-DNA-Ligase (New England Biolabs NEB) für ca. 12h bei 16°C gemäß Angaben des Herstellers.

	3 : 1 Ansatz	5 : 1 Ansatz
bcl-x Promoterfragment (≈ 20 ng/μl)	0,75 μl	1,25 μl
Lineares pGL ₃ basic (≈ 50 ng/μl)	1 μl	1 μl
10x- T4-Ligase Puffer	1 μl	1 μl
H ₂ O	6,25 μl	5,75 μl
T4-Ligase (2000 U / μl)	2000 U	2000 U
Gesamt	10 μl	10 μl

Tabelle 4.9.b: Reaktionsansatz zur Ligation von PCR-Fragmenten

Die rekombinanten, promoterfragment-tragenden pGL3-Vektoren wurden nach der Länge des klonierten Promoterfragments benannt (pGL3-39, pGL3-111, pGL3-320, pGL3-484, pGL3-619, pGL3-835). Zur Amplifikation wurden die Plasmide wie beschrieben transformiert (Kapitel 4.7.3), isoliert (Kapitel 4.8) und durch DNA-Sequenzierung (Kapitel 4.10) verifiziert.

4.10 Sequenzierung doppelsträngiger DNA

Die DNA-Sequenzierung dient der genauen Analyse der Basensequenz der DNA. Mit dieser Methode wurden alle bcl-x Promoterfragmente verifiziert.

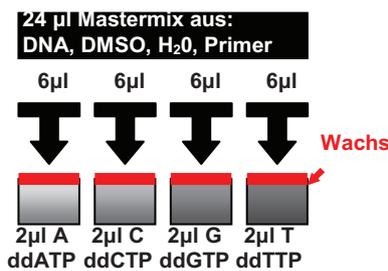
Die Sequenzierungen der Plasmid-DNA wurden unter Benutzung des „Thermo Sequenase fluorescent labelled primer cycle sequencing kit with 7-deaza-dGTP“ (Amersham Pharmacia Biotech) durchgeführt. Dieser Kit kombiniert das Verfahren der „Dideoxy-Kettenabbruchreaktion“ [93] mit einer DNA-Amplifikation durch eine zyklische Wiederholung der Reaktionsschritte (Thermocycling).

Für jede Probe wurden zunächst folgende Komponenten in einem Volumen von 24 μl als Mastermix gemischt:

DMSO 4% (v / v)	1 μ l
Primer (50 μ M), z.B. Primer PX_P4(+)'	50 pmol
DNA	2 μ g
H ₂ O	(24 μ l - x)

Tabelle 4.10.a: Mastermix der Sequenzierungsreaktion, 24 μ l (4x6 μ l)

Je 6 μ l dieses Mastermix wurden in neue Reaktionsgefäße überführt, mit 2 μ l der ddNTP-Reaktionslösungen A, C, G bzw. T vermischt und mit Wachs als Verdunstungsschutz überdeckt:



A – Reagenz : ddATP + (x)

C – Reagenz : ddCTP + (x)

G – Reagenz : ddGTP + (x)

T – Reagenz : ddTTP + (x)

(x) Tris-HCl (pH9.5), MgCl₂, TweenTM20, Nonidet P-40, 2-Mercaptoethanol, dATP, dCTP, 7-deaza-dGTP⁽¹⁾, dTTP, thermostabile Pyrophosphatase, Thermo Sequenase DNA Polymerase

Abb. 4.10.b: Reaktionsansatz zur DNA-Thermocycling-Sequenzierung nach der „dideoxy-Kettenabbruchmethode“ nach Sanger (1977).

⁽¹⁾ Die Verwendung von 7-deaza-dGTP soll Kompressionsartefakten der DNA in der Polyacrylamid Gelelektrophorese vorbeugen, die infolge nicht denaturierter DNA-Sekundärstrukturen auftreten können und die Qualität und somit die Lesbarkeit der Sequenzierungsreaktion deutlich herabsetzen könnten.

Die Schmelztemperatur der Primer wurde wie in Abschnitt 4.7.1 berechnet. Die verwendete Annealing-Temperatur (T_a) lag ca. 5°C unter der Schmelztemperatur (T_m). Das Thermocycling wurde nach folgenden Parametern durchgeführt:

Zyklus	Reaktion	Dauer	Temperatur/°C
1	Initiale Denaturierung	5 min	94°C
2 - 30	Denaturierung	30 s	94°C
	Primer-Annealing	30 s	T_a ca. 52 - 54°C
	Elongation	30 s	72°C
31	Terminale Elongation	7 min	72°C

Tabelle 4.10.c: Thermocycling der DNA-Sequenzierungsreaktion

Nach Beendigung der Reaktion wurden die Ansätze mit 5 μ l der mitgelieferten Stop-Lösung gemischt. Die elektrophoretische Auftrennung der synthetisierten DNA-Fragmente erfolgte auf einem Polyacrylamidgel mit 1 x TBE Puffer (Sequagel XR, National Diagnostics).

Ultra Pure SequaGel XR (National Diagnostics)	24 ml
Ultra Pure SequaGel® Complete Buffer Reagent (National Diagnostics)	6 ml
DMSO	320 μ l
APS (Sigma)	240 μ l

Tabelle 4.10.d: Komponenten des Polyacrylamidgels zur DNA-Sequenzierung

Ein DNA-Sequenzer (4000L, LI-COR) detektierte die fluoreszierenden Fragmente. Die Bestimmung der Basenpaarsequenz der untersuchten Probe geschah mit Hilfe der Software „BaselImageIR 4.1“.

4.11 Transiente Transfektion der Reportergenplasmide

Das Luciferase Reportergen Assay (LRA) -System wurde verwendet, um die Interaktion von Transkriptionsfaktoren mit DNA-Fragmenten, z.B. einem Gen-Promoter, messbar und vergleichbar zu machen. Mit Hilfe dieser Methode kann die Wirkung regulatorischer DNA-Sequenzen auf die Transkription untersucht werden.

Der interessierende DNA-Abschnitt wird dabei in ein spezielles Test-Plasmid an eine vorgegebene Position vor ein Reportergen kloniert. Das Reportergenplasmid wird durch transiente Transfektion (hier DNA-Transfer durch Elektroporation) in Zellen eingeschleust. Die Expression des Reportergens kann anschließend leicht quantifiziert werden.

Hier wurde der *bcl-x* Promoter in das Plasmid pGL3-basic (Promega) vor das Gen für das Enzym Firefly-Luziferase eingefügt. Der Vektor wurde anschließend in Ba/F3-Zellen durch Elektroporation transient transfiziert.

Mit den LRA-Versuchen sollte geklärt werden, ob die Stimulation der Ba/F3-Zellen mit Zytokinen (z.B. EGF, IL-3) und Butyrat zu einer Aktivierung des *bcl-x* Promoters und somit zu einer Erhöhung der Luziferasetranskription führt. Durch einfache Lumineszenzmessung konnte die Expression der Luziferase quantifiziert und Rückschlüsse auf die Aktivierung des vorgeschalteten Promotors gezogen werden.

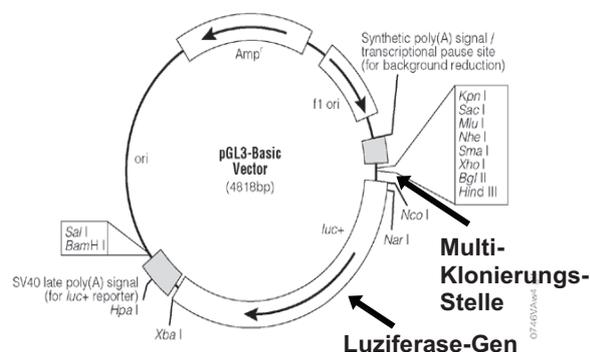


Abb. 4.11.a: Vektorkarte des Reportergenplasmid pGL3-basic (Promega)

Die transiente Transfektion wurde in folgenden Schritten mittels Elektroporation durchgeführt:

Wachstumsfaktorentzug

Das Wachstum der pro-B-Zell-Linie Ba/F3 ist IL-3 abhängig. Durch den kurzfristigen Entzug von IL-3 kann die Zellproliferation gehemmt werden.

1×10^7 Ba/F3-Zellen wurden mehrfach durch Zentrifugation (1000 rpm, 5 min) pelletiert und in RPMI 1640 Kulturmedium resuspendiert, um den Wachstumsfaktor IL-3 aus der Zellkultur zu entfernen. Anschließend wurden die Zellen nochmals pelletiert und mit Kulturmedium (ohne Wachstumsfaktor) bei einer Konzentration von 1×10^6 Zellen / ml resuspendiert. Die Zellen wurden für 5 Stunden im Brutschrank (37 °C; 5 % CO₂) kultiviert.

Transiente Transfektion

Zur Transfektion wurden die Zellen erneut gewaschen und in einer Konzentration von 1×10^7 Zellen / 0,8 ml in RPMI 1640 Kulturmedium resuspendiert. Pro Elektroporationsküvette (Füllungsvolumen 0,8 ml; Elektrodenabstand 0,4 cm; Firma BioRad) wurden 20 µg Plasmid mit 1×10^7 Zellen vermischt und 10 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert.

Bei der Elektroporation wurden die Zellen mit 0,35 kV und 960 µF (Gene Pulser™, BioRad) zur Aufnahme der Plasmide stimuliert. Es folgte eine weitere Inkubation von 10 Minuten bei Raumtemperatur.

Die Zellen jeder Transfektion wurden jeweils in einer Zelldichte von $1,5 \times 10^6$ Zellen / ml in Kulturmedium resuspendiert. Anschließend wurde jede Transfektion in 4 Ansätze aufgeteilt. Die Re-Stimulation erfolgte für jede Transfektion mit 200ng/ml EGF, 100 pM IL-3, 2mM Butyrat und einer Kontrolle ohne Zusatzfaktor nach folgendem Schema:

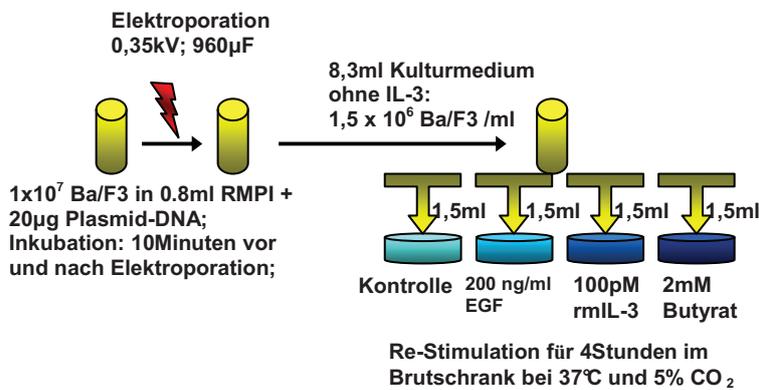


Abb. 4.11.b:
Transiente Transfektion durch Elektroporation und Re-Stimulation von Ba/F3-Zellen nach Plasmidtransfektion mit EGF, IL-3 und Butyrat

Diese Proben wurden anschließend für 4 Stunden im Brutschrank (37 °C, 5% CO₂) kultiviert.

4.12 Luziferase Reporter Gen Assay (LRA)

Mit Luziferase Reporter Gen Assays (LRA) kann das transaktivierende Potential klonierter DNA-Sequenzen quantifiziert werden. Hier wurde die bcl-x Promoterinduktion gemessen.

Die Vorbereitung der Zellen zur Luziferase-Lumineszenzmessung erfolgte gemäß den Angaben zum „Luciferase Assay System“ der Firma Promega.

Die Zellen jeder Probe wurden pelletiert (15 Sekunden Zentrifugation bei 14000 rpm), der Mediumüberstand wurde komplett entfernt und das Zellpellet mit 50 µl „Cell Culture Lysis Reagent“ (Promega) lysiert. Die lysierten Zellen können bis zur Lumineszenz-Messung bei -20 °C gelagert werden.

Zur Lumineszenz-Messung wurden die Zelltrümmer durch Zentrifugation für 60 Sekunden bei 14000 rpm erneut pelletiert und der klare Überstand - welcher das exprimierte Enzym Luziferase enthält - für die Messung verwendet. Von diesem Überstand wurden 10 µl zu 50 µl „Luciferase Assay Reagent“ in ein Lumineszenzmessröhrchen pipettiert und die

enzymatische Aktivität der Luziferase im Luminometer MiniLuminat LB 9506 (EG&G Bertold) gemessen.

4.13 Plasmid-Kotransfektion

4.13.1 Dual-Luziferase™ Reporter Assay: Messung der Transfektionseffizienz

Das Dual-Luziferase Reporter Assay System (DLR-System) wurde zur Bestimmung der Transfektionseffizienz eingesetzt.

Beim DLR-System handelt es sich um eine Kotransfektion, d.h. es wird neben dem rekombinanten Reporterplasmid ein weiteres Reporterplasmid kotransfiziert, dessen Expressionsprodukt eine zweite, ebenfalls leicht quantifizierbare, aber gut differenzierbare enzymatische Reaktion katalysiert. Hier wurde das Ko-Reporterplasmid pRL-TK (Promega) verwendet, dessen Reporter für das Enzym Renilla-Luziferase kodiert. Im Vektor pRL-TK steht das Renilla-Reporter unter der Kontrolle des konstitutiv aktivierten Promotors des Thymidinkinasegens des Herpes-Simplex-Virus. Daher wird Renilla-Luziferase konstant exprimiert und kann unabhängig von externen Einflussfaktoren quantifiziert werden. Die gemessene Renilla-Luziferase-Lumineszenz korreliert mit der Menge an transfiziertem pRL-TK Plasmid. Man kann die Effizienz und Reproduzierbarkeit des DNA-Transfers beurteilen, indem man die Renilla-Lumineszenz von parallel durchgeführten Transfektionen vergleicht.

Der allgemeine Ablauf der Transfektion und der LRA Experimente wurde wie unter 4.11/4.12 beschrieben durchgeführt. Die vom Ko-Reporterplasmid eingesetzte Menge betrug 1/100 der Menge des rekombinanten Reporterplasmids pGL3, um Interaktionseffekte zwischen beiden Promotoren und Plasmiden bestmöglich zu vermeiden.

Zur Lyse der Zellen wurden 50 µl des „Passive Lysis Buffer“ (PLB) anstelle des „Cell Culture Lysis Reagent“ verwendet.

Nach dem Messen der Aktivität der „Firefly-Luziferase“ mit „Luciferase Assay Reagent II“ wurden 50 µl „Stop & Glo“ Reagenz in das Messröhrchen hinzugegeben und erneut die Lumineszenz gemessen. „Stop & Glo“ Reagenz inhibiert unmittelbar die Firefly-Luziferase Aktivität, schafft ideale Pufferbedingungen für die *Renilla*-Luziferase und beinhaltet das Substrat für die Renilla-Luziferase-Reaktion.

PLB, „Luciferase Reagent II“ und „Stop & Glo Reagent“ sind speziell dazu konzipiert, unspezifische Hintergrundlumineszenz zu unterdrücken.

4.13.2 Kotransfektion der Plasmide mit den cDNAs für JAK2 oder Lyn

Das gleiche Prinzip der Kotransfektion wurde auch verwendet, um neben den bcl-x Promoterfragment-Plasmiden gleichzeitig Plasmide zu kotransfizieren, die entweder das Gen für die Januskinase JAK2 oder die src-Kinase Lyn tragen und konstitutiv exprimieren.

Somit konnten die intrazellulären Konzentrationen von JAK2 bzw. Lyn erhöht werden und Rückschlüsse über eine Beteiligung dieser Kinasen an der Signaltransduktion von Butyrat auf den bcl-x Promoter gezogen werden. Es wurden jeweils 10µg der cDNA für JAK2 bzw. Lyn, sowie 20 µg des Plasmids mit dem bcl-x Promoter transfiziert.

4.14 DNA-Analyse auf Transkriptionsfaktorbindungsstellen

Zum Auffinden von Transkriptionsfaktorbindungsstellen wurde die bcl-x Promotersequenz, insbesondere die aktiven Promoterregionen AR1 und AR2 mit Hilfe der Online-Datenbank „Transfac“ analysiert. Die Ergebnisse der DNA Analysen werden im Kapitel 5.7.1 dargestellt. Die „Transfac“ Datenbank (www.gene-regulation.com) enthält Informationen über DNA- und RNA-Sequenzen, Proteine sowie deren gegenseitige Wechselwirkungen [106].

Grundlage für die Katalogisierung von Protein-DNA Wechselwirkungen in der Transfac-Datenbank ist die Tatsache, dass Proteine (z.B. Transkriptionsfaktoren) mit bekannten, spezifischen DNA -Sequenzen (Konsensussequenz) interagieren. Bei den Konsensussequenzen unterscheidet man die „Core-Sequenz“ (Grundsequenz) und die, die Grundsequenz umrahmende Sequenz (Matrix). Die Core-Sequenz ist für die Protein-DNA-Wechselwirkung essentiell und besteht aus 4 oder mehr Basenpaaren in definierter Reihenfolge, an die der Transkriptionsfaktor mit hoher Affinität binden kann. Geringe Variationen in der Core-Basensequenz sind unter Umständen möglich.

Der DNA Bereich von 10-20bp 5'- und 3'-seitig der Grundsequenz wird „Matrix“ genannt und lässt eine größere Variabilität der Basensequenz zu.

Zur Identifizierung von Transkriptionsfaktoren *in vitro* wurden EMSA-Experimente durchgeführt.

4.15 Electrophoretic-Mobility-Shift-Assay (EMSA)

EMSA ist ein Protein-DNA-Bindungs-Assay, in dem *in vitro* die Fähigkeit zur Bindung von Transkriptionsfaktoren an bestimmte DNA-Sequenzen untersucht werden kann. Radioaktiv markierte Oligonukleotide werden mit Zellkernextrakten inkubiert und das Gemisch in einer nicht denaturierenden Polyacrylamid-Gelelektrophorese aufgetrennt. Mittels Autoradiographie können die gebildeten Protein-DNA-Komplexe durch langsames Laufverhalten (Bandshift) deutlich von den schnell migrierenden freien, nicht gebundenen DNA-Oligonukleotiden unterschieden werden. Nicht gebundene Proteine sind nicht sichtbar, da ihnen die radioaktive Markierung fehlt.

In modifizierten Assays mit 100fach im Überschuss vorliegenden, nicht-radioaktiv markierten DNA-Sonden wurde versucht, die Spezifität der Bindung zwischen DNA und Protein durch eine Signalabschwächung oder Signalauslöschung zu verifizieren (*homologe Competition*).

Zur weiteren Bestätigung der Spezifität der Bindung wurden auch heterologe Konkurrenzexperimente durchgeführt, bei denen zusätzlich DNA-Oligos im 100fachen Überschuss eingesetzt wurden, die mutierte Bindungsstellen für Transkriptionsfaktoren enthalten. Eine fehlende Konkurrenz mit persistierend nachweisbarem radioaktivem Signal bestätigt in diesem Fall die Spezifität des Bindungsereignisses zwischen dem Transkriptionsfaktor und dem radioaktiven Nukleotid.

Durch den Einsatz Transkriptionsfaktor-spezifischer Antikörper in den EMSAs sollten Proteine identifiziert werden. Entsprechende DNA-Protein-Antikörper-Komplexe sind aufgrund ihrer zusätzlich eingeschränkten elektrophoretischen Mobilität erkennbar (Supershift-Analyse).

Die EMSA-Experimente wurden in dieser Arbeit mit dem Ziel durchgeführt, *in vitro* den Effekt von Butyrat auf die Aktivität von Transkriptionsfaktoren und auf die Induktion des Promotors des bcl-x Gens qualitativ zu untersuchen.

Als Quelle für Transkriptionsfaktoren dienten Zellkernproteine, welche zu verschiedenen Zeitpunkten (0min, 15min, 60min, 180min) nach Butyrat-Stimulation aus Ba/F3-Zellen extrahiert wurden. Zur Kontrolle und besseren Interpretation des Butyrat-Effektes wurden ebenfalls Kernextrakte nach dem gleichen Schema aus EGF-stimulierten und aus IL-3 stimulierten Ba/F3-Zellen gewonnen. Zusätzlich wurde eine unstimulierte Probe zum Zeitpunkt 0min und 180min untersucht.

Präparation der Kernextrakte

Zur Präparation der Kernextrakte wurde den IL-3 abhängigen Ba/F3-Zellen, ähnlich wie bei der transienten Transfektion, durch mehrfaches Zentrifugieren (1000 rpm, 5 min) und Resuspendieren in RPMI Medium zunächst der Wachstumsfaktor IL-3 entzogen. Anschließend wurden die Ba/F3-Zellen ohne Wachstumsfaktor in einer Konzentration von $1,5 \times 10^6$ Zellen / ml für 6 Stunden im Brutschrank (37 °C; 5 % CO₂) kultiviert. Dadurch wurde die Zellproliferation eingestellt.

Im nächsten Schritt erfolgte die gezielte Re-Stimulation der Zellen mit EGF (200 ng/ml), IL-3 (100 pM) und Butyrat (2 mM). Die Gewinnung der Zellkernextrakte erfolgte aus jeweils $1,5 \times 10^6$ Zellen nach 15, 60 und 180 Minuten Re-Stimulation.

Zusätzlich wurden als Kontrolle Kernextrakte aus $1,5 \times 10^6$ Zellen *ohne* Stimulation zum Zeitpunkt 0 und 180 Minuten gewonnen.

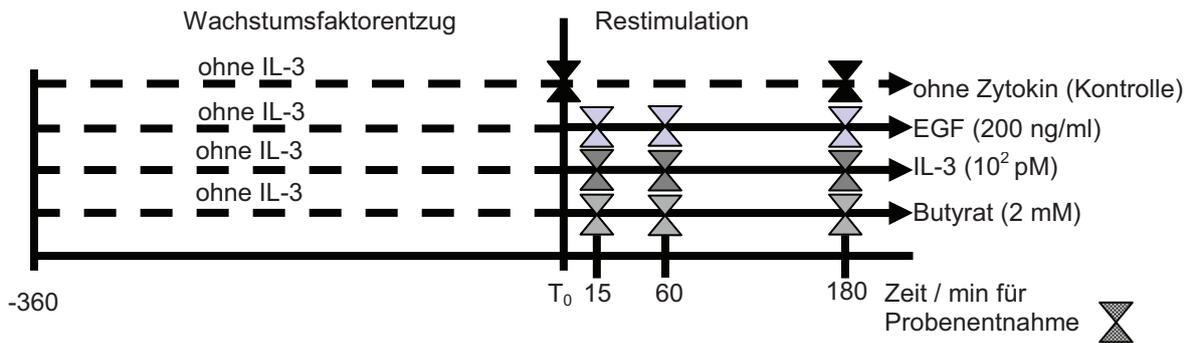


Abb. 4.15.a: Zeitpunkt T_0 definiert das Ende des Wachstumsfaktorentzugs und gleichzeitig den Beginn der Stimulation mit EGF, IL-3 oder Butyrat. Zur Gewinnung der Zellkernextrakte wurden je Probenentnahme $1,5 \times 10^6$ Zellen verwendet.

Für jede Probe erfolgte die Präparation der Kernextrakte nach folgendem Ablauf:

$1,5 \times 10^6$ Zellen wurden in PBS gewaschen, zur hypotonen Lyse in 400 μ l Puffer A resuspendiert und für 10 Minuten auf Eis inkubiert. Anschließend wurden die Zellen für 10s zentrifugiert und die zytosolischen Zellbestandteile mit dem Überstand entfernt.

Das nun vorliegende Zellkernpellet wurde zur hypertonen Lyse in 75 μ l Puffer B resuspendiert und 20 Minuten auf Eis inkubiert. Nach 3 Minuten Zentrifugation bei 14000 rpm und 4 $^{\circ}$ C wurde der, die Zellkernproteine enthaltende Überstand, in ein neues Reaktionsgefäß überführt, in flüssigem Stickstoff gefroren und bei -70 $^{\circ}$ C gelagert.

	Puffer A	Puffer B
	Hypotone Lyse	Hypertone Lyse
HEPES	10 mM	20 mM
KCl	10 mM	---
MgCl₂	1,5 mM	1,5 mM
DTT	0,5 mM	0,5 mM
Glycerol	---	25 %
NaCl	---	420 mM
EDTA	---	0,2 mM
Pepstatin	0,0007 μ g/ml	0,0007 μ g/ml
Proteasecocktail **	2 ml	0,4 ml
Vanadat	1 mM	1 mM
Aqua bidestillata	27.215ml	2.423ml

Tabelle 4.15.b:
Zusammensetzung von Puffer A und Puffer B zur Gewinnung von Zellkernextrakten.
** 1 Tablette Complete™ (Fa. Roche) wird in 2,4 ml Aqua bidest gelöst.

Herstellung doppelsträngiger Oligonukleotide

Je 500 pmol komplementärer einzelsträngiger DNA-Oligonukleotide ($50 \mu\text{M} = 50\text{pmol}/\mu\text{l}$, Fa. BioTez Berlin–Buch GmbH) wurden zusammen in einem Reaktionsgefäß mit 80 μ l H_2O für 10 Minuten auf 80 $^{\circ}$ C erhitzt ($1000\text{pmol}/100 \mu\text{l} = 10\text{pmol}/\mu\text{l} = 10 \mu\text{M}$). Die Zusammenlagerung zum DNA-Doppelstrang erfolgte beim langsamen Abkühlen auf Raumtemperatur. Zuletzt wurde die DNA-Sonde mit 300 μ l H_2O zu einer $2,5 \mu\text{M}$ Reaktionslösung verdünnt ($1000 \text{ pmol}/ 400 \mu\text{l} = 2,5\text{pmol}/ \mu\text{l} = 2,5 \mu\text{M}$).

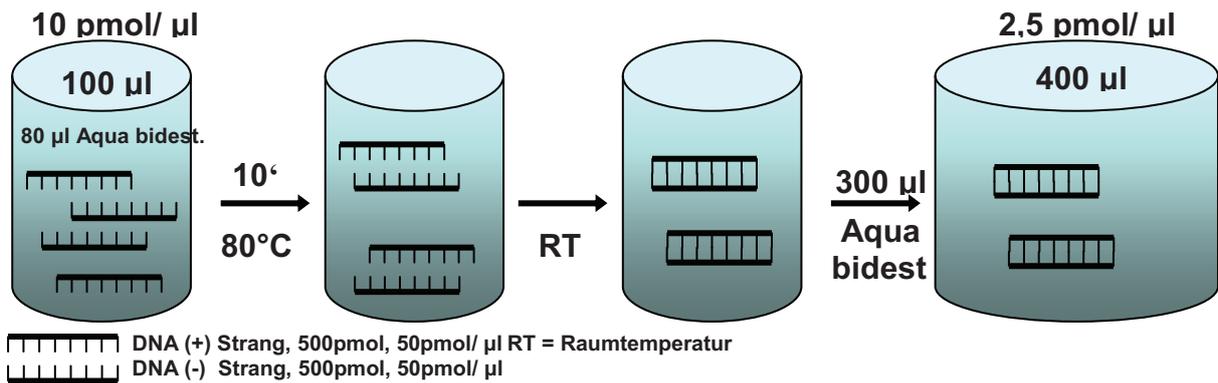


Abb. 4.15.c: Herstellung doppelsträngiger DNA-Oligonukleotide aus Einzelsträngen

Radioaktive Markierung doppelsträngiger DNA für EMSAs

Die radioaktive Markierung der DNA-Sonden erfolgte durch den Einbau von $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]\text{-dATP}$ am 5' Ende der Oligonukleotide. Synthetische Oligonukleotide besitzen keinen 5' Phosphatrest und können daher in einer Polynukleotidkinasereaktion direkt phosphoryliert werden:

Doppelsträngiges DNA Oligonukleotid (2,5µM)	2,5 pmol
10 x Kinase - Puffer	2 µl
H ₂ O	13 µl
$[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]\text{-dATP}$ (3000 Ci /mmol)	3 µl
T4 Polynukleotidkinase (PNK) (5 U / µl)	5 U

Tabelle 4.15.d: radioaktive Markierung doppelsträngiger DNA mit $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]\text{-dATP}$.

Das Reaktionsgemisch wurde 30 min bei 37 °C inkubiert. Freies, nicht gebundenes $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]\text{-dATP}$ wurde durch ein Filtersäulen-System (Sephadex G 50 Säulen, Nick-Columns™, Amersham) von den markierten Oligonukleotiden getrennt und die Oligonukleotide mittels 1x TE- Puffer aus den Säulen eluiert.

DNA-Protein Bindungsreaktion

Für die Bindungsreaktion wurden die radioaktiv markierten Oligonukleotide mit den Zellkernextrakten 30 Minuten bei 27 °C nach folgender Zusammensetzung inkubiert:

Shift-Puffer (Zusammensetzung s. Anhang):	4 µl
BSA (10 mg/ ml)	20 µg
poly dl/dC (1mg / ml)	2 µg
H ₂ O	6 µl
$[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]\text{-dATP}$ Oligonukleotid (6,25nM)	3 µl
Zellkernextrakte (1 µg / µl)	3 µg

Tabelle 4.15.e: Protein-DNA-Bindungsreaktion

Bei der homologen Competition wurde zusätzlich unmarkiertes Oligonukleotid in 100-fachem Überschuss eingesetzt.

Für die Supershift-Analyse wurde nach der Proteinbindungsreaktion der gesamte Ansatz bei 4°C für 20 Minuten mit einem Transkriptionsfaktor-spezifischen Antikörper (1µg) inkubiert.

Elektrophoretische Auftrennung der DNA-Protein-Komplexe

Das 12%ige nicht denaturierende Polyacrylamidgel wurde folgendermaßen hergestellt:

Acryl-Amid 40% (v/v) (Genaxis)	12 ml
10 x TBE, pH 8	2 ml
APS 10% (w/v) (Sigma)	480 µl
TEMED (Gibco BRL)	80 µl
aqua dest.	Ad 80 ml

Tabelle 4.15.f:
12%iges nicht denaturierendes Polyacrylamidgel zur Auftrennung der Protein-DNA-Komplexe in EMSA Experimenten

Nach einem 15 minütigen Vorlauf bei 300 V wurden 20 µl aus der Proteinbindungsreaktion in die Geltaschen pipettiert. Die Proben wurden bei 300 V für etwa 2 Stunden aufgetrennt. Anschließend wurde das Gel heißluftgetrocknet und zur Autoradiographie mit einem Röntgenfilm (Curix HAT 1.000G Plus, AGFA) exponiert.

4.16 Ortsgerichtete Mutagenese

Zur ortsgerechten Mutagenese wurde das System „QuickChange™ Site-Directed Mutagenesis Kit“ der Firma Stratagene verwendet.

Der erste Reaktionsschritt verläuft mit Hilfe einer Polymerasereaktion. Die Mutation der DNA-Sequenz wird dabei in speziell synthetisierten Primern (BioTeZ Berlin-Buch GmbH) vorgegeben. Der mutationstragende Primer ist bis auf die Mutationssequenz von maximal 4-6 Basen komplementär zur Ausgangs-DNA. Dadurch kann sich der Mutationsprimer trotz der abweichenden Basen an den parenteralen DNA-Strang anlagern. Die Pfu-Polymerase amplifiziert die DNA mit eingefügten Mutationen zuverlässig und fehlerarm.

10x Puffer für Pfu Polymerase	5µl
Ausgangs DNA (50 ng / µl)	50 ng
Mutations-Primer (+) (0,5 µM)	0,5 pmol
Mutations-Primer (-) (0,5 µM)	0,5 pmol
dNTP (10 mM)	10 nmol je dNTP
Aqua bidest.	40µl
Pfu Turbo Polymerase (2,5 U / µl)	2,5 U
Wachs	25µl

Tabelle 4.16.a:
Reaktionsansatz der Mutagenesereaktion

Die Reaktion zur ortsgerechten Mutagenese wurde nach folgendem Protokoll durchgeführt:

Zyklus	Reaktion	Dauer/min	Temperatur/°C
1	Initiale Denaturierung	5 min	95 °C
2 - 17	Denaturierung	0,5 min	95 °C
	Primer-Annealing	1 min	55 °C
	Elongation	16 min	69 °C
18	Terminale Elongation	16 min	69 °C

Tabelle 4.16.b:
Thermocycling der PCR zur ortsgerechten Mutagenese

Der Reaktionsansatz wurde anschließend auf 37 °C abgekühlt.

Nach der Mutagenesereaktion wurde das DNA Produkt mit 10 U Dpn I (Restriktionsenzym) behandelt. Dieser Ansatz wurde für 1 Minute bei 10000 rpm zentrifugiert und danach für 2 h bei 37 °C inkubiert. Dpn I verdaut gezielt methylierte und hemimethylierte DNA (Schnittsequenz 5' – G^{m6}ATC – 3'), wie sie z.B. aus *dam*⁺ *E. coli* Bakterien gewonnen wird.

DNA, die durch die Polymerase *in vitro* amplifiziert wurde, enthält keine Methylierung. Somit verdaut Dpn I bei der ortsgerichteten Mutagenese spezifisch die aus *E. coli* gewonnene methylierte Ausgangs-DNA. Die während der *in vitro* Polymerasereaktion neu synthetisierte, mutierte DNA bleibt erhalten, wird anschließend in kompetente Bakterien transformiert, amplifiziert und isoliert. Die mutierte Plasmid-DNA wurde sequenziert, mit der DNA-Sequenz des pGL3-X verglichen und entsprechend als pGL3-Muta1, pGL3-Muta2, pGL3-Muta3 und pGL3-Muta4 benannt.

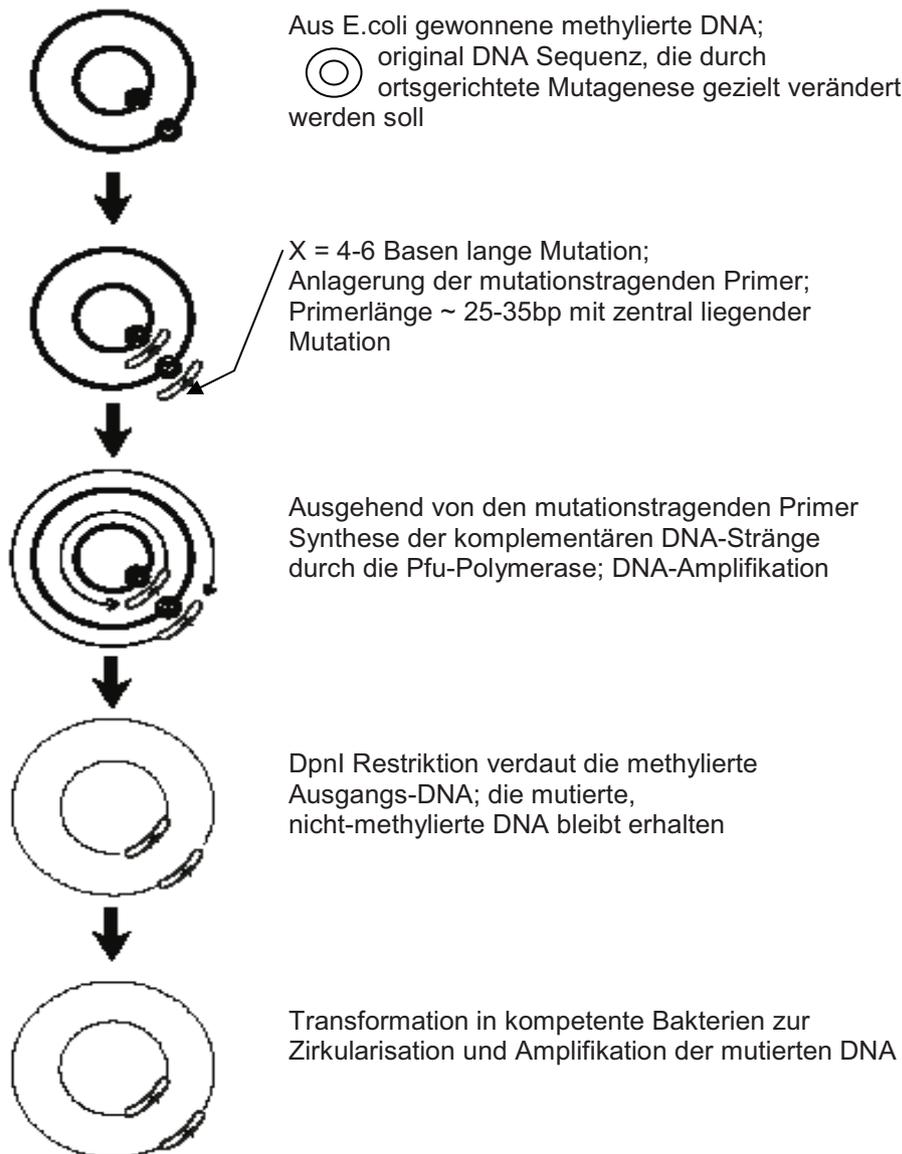


Abb 4.16.c: QuickChangeTM Site-Directed Mutagenesis (Stratagene)

ANHANG:

Primersequenzen für die Isolierung des bcl-x Promoter aus genomischer DNA:

Primer (+) 5' GGA ATT CAA AGA CAA CTA GCG 3'; 21mer

Primer (-) 5' TTT TAT AAT AGA GAT GGG CTC AAC 3'; 24mer

Primersequenzen für die verkürzten Fragmente bcl-x Promoter:

Primer: PX_(-)3'

(-) 5' CCG GAA TGC CAA GCT TAC TTA G 3'

Primer: PX_P1(+)^{5'}: pGL3-320; Position im Pbcl-X: -320 → -297; 24mer

(+) 5' GAG CTC GGT TGT AGT AAA AAG AGG CGG ATG 3'

Primer: PX_P2(+)^{5'}: pGL3-622; Position im Pbcl-X: -622 → -603; 20mer

(+) 5' GAG CTC GAG GAA CCA GGT TGT GAG GG 3'

Primer: PX_P3(+)^{5'}: pGL3-111; Position im Pbcl-X: -111 → -88; 24mer

(+) 5' GAG CTC ACC TTA TCT TGG CTT TGG ATC CTG 3'

Primer: PX_P4(+)^{5'}: pGL3-483; Position im Pbcl-X: -483 → -465; 19mer

(+) 5' GAG CTC ACC CAG CCA CCA CCT CCT C 3'

Primer: PX_P5(+)^{5'}: pGL3-835; Position im Pbcl-X: -835 → -814; 22mer

(+) 5' GAG CTC GGG TTT CGG AAG CCT CAT CTA G 3'

Primer: PX_P6(+)^{5'}: pGL3-39; Position im Pbcl-X: -39 → -19; 21mer

(+) 5' GAG CTC TTG GAC AAT GGA CTG GTT GAG CC 3'

Primer für die Aktive Region AR1 und AR2:

(+) Primer pGL3-AR1; Position im Pbcl-X: -485 → -468; 18mer

(+) 5' CGA CCC AGC CAC CAC CTC 3'

(-) Primer pGL3-AR1; Position im Pbcl-X: -124 → -100; 25mer

(-) 5' GAG AGA GAA GTC TTG GAA TAG AAC C 3'

(+) Primer pGL3-AR2; Position im PbcI-X: -998 → -979; 25mer

(+) 5' GTG CTGGA ATT CAA AGA CAA CTA GC 3'

(-) Primer pGL3-AR2; Position im PbcI-X: -626 → -607; 20mer

(+) 5' CAC AAC CTG GTT CCT CCA TC 3'

Primersequenzen für ortsgerichtete Mutagenese im bcl-x Promoter:

Sequenz der Aktiven Region AR2 als Vorlage für die Mutagenese: -756 → -724; 33mer

(+)5' CAT ACC TCC GGG AGA GTT CTC CTG ACT CCC AGT 3'

(-)5' ACT GGG AGT CAG GAG AAC TCT CCC GGA GGT ATG 3'

GAGA: NFAT Coresequenz

TGAC: AP-1 Coresequenz

Primer: Muta1+: Position im PbcI-X: -754 → -721; 34mer

(+)5' TAC CTC CGG GAG AGT Tgc agT GAC TCC CAG TAG G 3'

Primer: Muta1-

(-)5' CCT ACT GGG AGT CAc tgc AAC TCT CCC GGA GGT A 3'

Mutation einer NFAT-Bindungsstelle

Primer: Muta2+: Position im PbcI-X: -754 → -721; 34mer

(+)5' TAC CTC CGG tAc AGT TgT aCT GAC TCC CAG TAG G 3'

Primer: Muta2-

(-)5' CCT ACT GGG AGT CAG tAc AAC TgT aCC GGA GGT A 3'

Mutation von zwei NFAT-Bindungsstellen

Primer: Muta3+ Position im PbcI-X: -754 → -721; 34mer

(+)5' TAC CTC CGG GAG AGT TCT CCc ttg TCC CAG TAG G 3'

Primer: Muta3-

(-)5' CCT ACT GGG Aca agG GAG AAC TCT CCC GGA GGT A 3'

Mutation einer AP-1-Bindungsstelle

Primer: Muta4+: Position im PbcI-X: -754 → -721; 34mer

(+)5' TAC CTC CGG GAG AGT tgc aAc ttg TCC CAG TAG G 3'

Primer: Muta4-

(-)5' CCT ACT GGG Aca agT tgc aAC TCT CCC GGA GGT A 3'

Oligonukleotid Muta 1 mit Mutation der AP-1-Bindungsstelle

DNA-Oligonukleotide für EMSA-Experimente:

Oligonukleotid AR1:

Sonde 483-111 Position im Pbcl-X: -414 → -370; 45mer

(+) 5' GCCGGAGATAGATTTGAATGTAGGTGGTGGTGGTGGGGATATGCC 3'
(-) 3' CGGCCTCTATCTAAACTTACATCCACCACCACCACCCCTATACGG 5'

Oligonukleotid AR2:

Sonde 999-622: Position im Pbcl-X: -756 → -724; 33mer

(+) 5' CATACTCCGGGAGAGTTCTCCTGACTCCCAGT 3'
(-) 3' GTATGGAGGCCCTCTCAAGAGGACTGAGGGTCA 5'

Oligonukleotid Muta2 :

Position im Pbcl-X: -754 → -721

(+) 5' TACCTCCGG **tAc**AGT **TgTa**CTGACTCCCAGTAGG 3'
(-) 3' ATGGAGGCC **aTgTCA** **AcAt**GACTGAGGGTCATCC 5'

Mutation von zwei NFAT-Bindungsstellen

5. Ergebnisse

5.1 Wirkungen von Butyrat auf Proliferation und Apoptose von Ba/F3-Zellen

5.1.1 Dosisabhängiger Einfluss von Butyrat auf die Zellproliferation

Der Einfluss von Butyrat auf das Proliferationsverhalten von Ba/F3-Zellen wurde anhand der Inkorporation von ^3H -markiertem Thymidin während der DNA-Synthese untersucht.

Die Zellen wurden 11 Stunden mit Butyrat in verschiedenen Konzentrationen (0,001mM, 0,01mM, 0,1mM, 0,3mM, 1mM, 10mM, 30mM Butyrat) in Kombination mit steigenden Dosen IL-3 (0pM, 7,5pM, 15pM, 30pM, 300pM IL-3) kultiviert.

Anschließend wurden die Zellen für weitere 11 Stunden mit ^3H -markiertem Thymidin inkubiert. Nach der Ernte der Zellen, wurde die inkorporierte Radioaktivität als Maß für die Proliferation der Zellen gemessen.

Die für verschiedene Butyratkonzentrationen erhaltenen Messwerte wurden auf die Kontrollansätze ohne Butyrat normiert.

Wie aus Abbildung 5.1.1 zu entnehmen ist, hemmt Butyrat in Dosen größer als 1 mM den ^3H -Thymidin Einbau vollständig und IL-3-unabhängig. Butyrat-Dosen zwischen 0.1 und 1 mM fördern hingegen den ^3H -Thymidin Einbau in Abhängigkeit von der Konzentration des vorhandenen IL-3. Dabei nimmt die Proliferation bei niedrigen bis mittleren IL-3 Dosen zu. Der maximale Effekt, eine Verdoppelung des ^3H Thymidin-Einbaus, wurde bei einer Kombination aus 7,5 pM IL-3 und 1 mM Butyrat beobachtet.

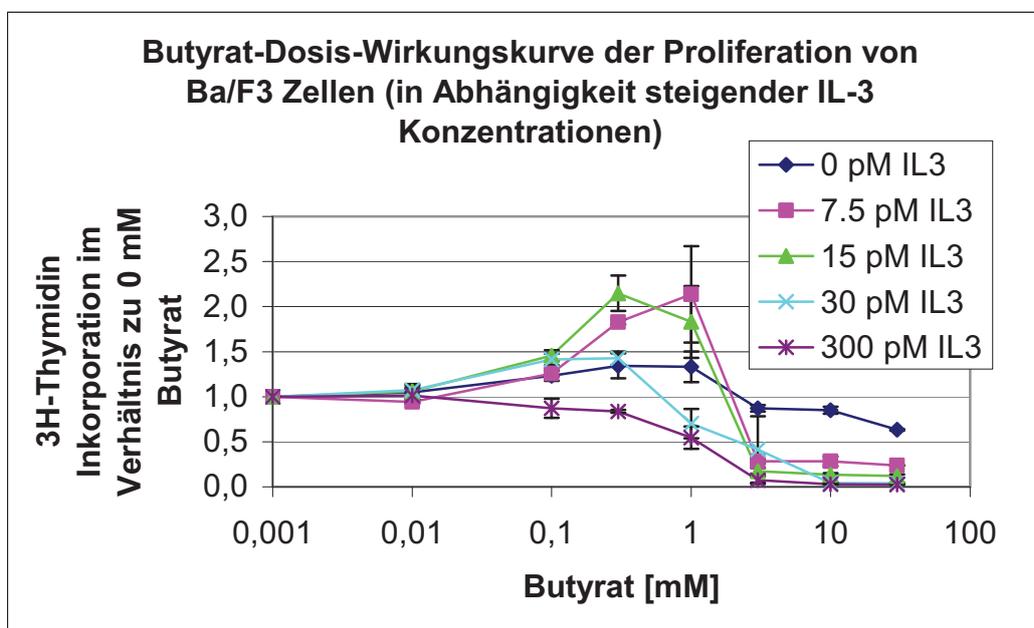


Abb. 5.1.1: Die IL-3 Konzentration bestimmt den Einfluss von Butyrat auf die proliferative Aktivität von Ba/F3-Zellen: Um den Einfluss von Butyrat auf das Proliferationsverhalten der Ba/F3-Zellen zu untersuchen, wurden die Zellen für 11 h sowohl mit verschiedenen Dosen Butyrat (0,001mM, 0,01mM, 0,1mM, 0,3mM, 1mM, 3mM, 10mM, 30mM) als auch gleichzeitig mit IL-3 kultiviert. Der Proliferationsassay wurde wie in Abschnitt 4.3. beschrieben durchgeführt. Niedrige bis mittlere Dosen Butyrat fördern die Zellproliferation in Abhängigkeit von den IL-3 Konzentrationen. Hohe Dosen Butyrat hemmen die Zellproliferation IL-3-unabhängig.

5.1.2 Wechselwirkung von Butyrat und Zytokinen beim Einfluss auf die Zellproliferation

Aufgrund der unter 5.1.1. gewonnenen Ergebnisse wurden weitere Proliferationsassays mit 2mM Butyrat durchgeführt, um die Interaktion von Butyrat mit IL-3 auf die Proliferation der Ba/F3-Zellen qualitativ näher zu bestimmen. Dabei wurden Ba/F3-Zellen für 16 Stunden in Standardkulturmedium (IL-3 haltig) in Kombination mit Butyrat (2 mM) und/oder EGF (200 ng/ml) oder auch ohne IL-3 mit EGF und/oder Butyrat kultiviert.

Die in 5 unabhängigen Versuchen gemessenen Werte wurden auf die Werte der Proben normiert, die mit Standardkulturmedium kultiviert wurden.

In Einklang mit den Beobachtungen von 5.1.1. wird der ^3H -Thymidin-Einbau der Ba/F3-Zellen durch Butyrat (2 mM) vollständig und unabhängig von IL-3 und EGF gehemmt. Ba/F3-Zellen können also in Gegenwart von Butyrat trotz adäquater Dosen mitogener Zytokine nicht proliferieren. Der Effekt der Butyrat-abhängigen Proliferationshemmung ist vergleichbar mit der ausbleibenden Proliferation (^3H -Thymidin-Einbau) nach Wachstumsfaktorentzug.

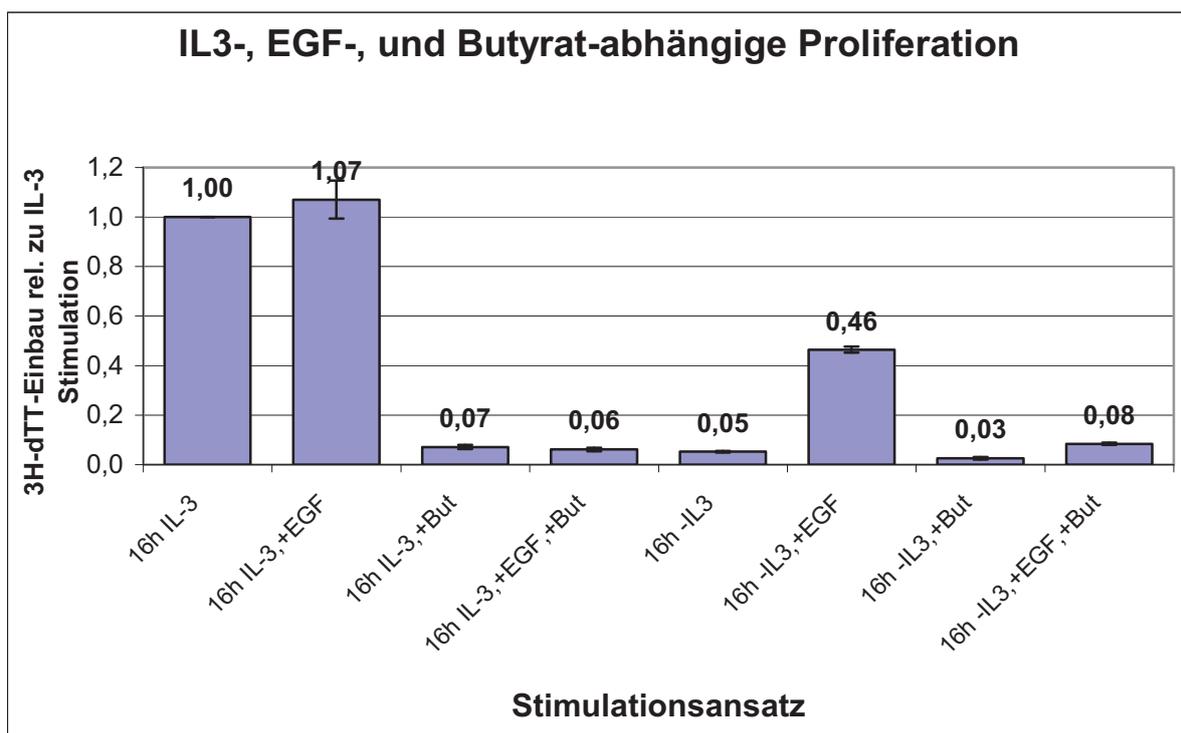


Abb. 5.1.2.: IL-3 und EGF unabhängige Proliferationshemmung der Ba/F3-Zellen durch Butyrat: Ba/F3-Zellen wurden für 16 h mit IL-3, Butyrat und EGF alleine oder in Kombination kultiviert. Butyrat hemmt in einer Dosierung von 2 mM in Ba/F3-Zellen den ^3H -Thymidineinbau/ die Proliferation vollständig und unabhängig von EGF und IL-3.

5.1.3. Einfluss von Butyrat auf das apoptotische Verhalten von Ba/F3-Zellen

Mit Hilfe der Bindung von fluoreszenzmarkiertem *Annexin V* an die Oberfläche apoptotischer Zellen und anschließender *Durchflusszytometrie* kann man den Anteil apoptotischer Zellen in einer Zellpopulationen semiquantitativ darstellen. Die Detektion nekrotischer Zellen erfolgte durch gleichzeitige Anfärbung der DNA mit Propidiumiodid.

IL-3 ist als Überlebensfaktor für Ba/F3-Zellen essentiell. Bei den hier verwendeten Ba/F3-Zellen, die zusätzlich den EGF/EPO-Hybridrezeptor exprimieren, kann EGF ebenfalls als überlebenssichernder Faktor fungieren. Deshalb wurden die Zellen mit verschiedenen Kombinationen aus 100pM IL-3, 200ng/ml EGF und 2mM Butyrat kultiviert. Nach 8 Stunden Inkubation erfolgten die Probenpräparation und die Auswertung mittels Durchflusszytometrie gemäß den Angaben des Herstellers des „Apoptosis Detection Kit“ (Calbiochem).

In den Abbildungen 5.1.3.a und b ist deutlich zu erkennen, dass die Kultivierung der Ba/F3-Zellen ohne Zytokin nach 8 Stunden zur Apoptose/Nekrose von 50% der Zellen führt. IL-3 und EGF dagegen sind einzeln und in Kombination gleichermaßen in der Lage, die Apoptose der Zellen wirkungsvoll zu verhindern, auch in Kombination mit Butyrat (2mM). Butyrat alleine kann jedoch eine Apoptose durch Wachstumsfaktorentzug nicht verhindern.

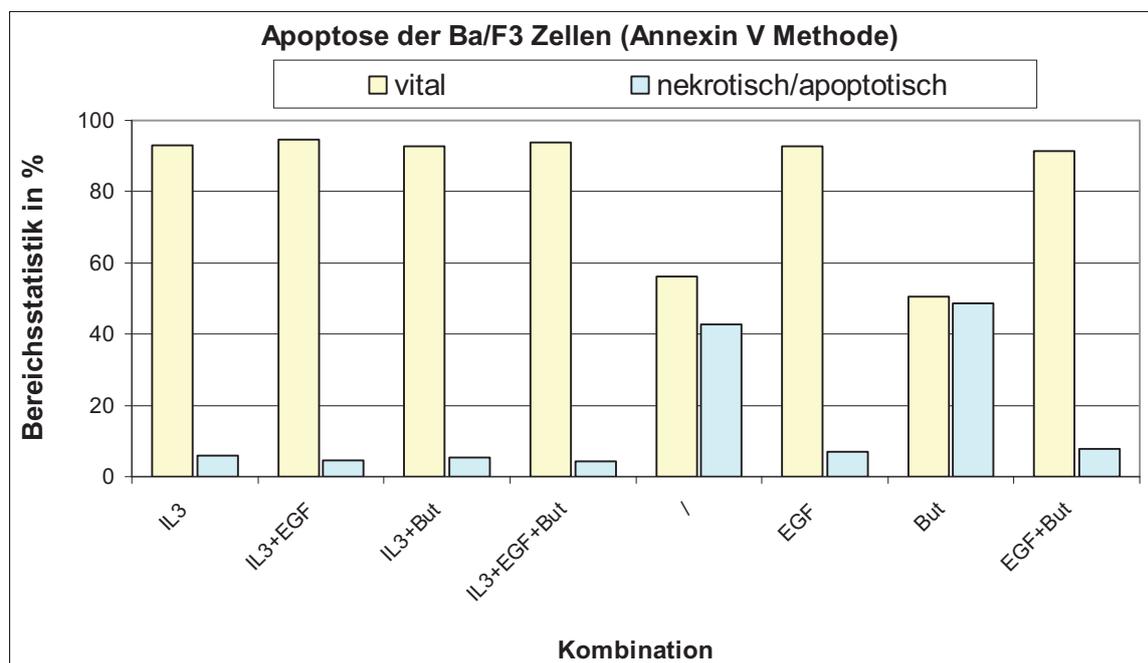


Abb. 5.1.3a: Apoptosenachweis mit Hilfe der Annexin V FITC-Methode. Ba/F3-Zellen wurden für 8 Stunden mit IL-3 (100pM), EGF (200ng/ml), Butyrat (2mM) oder einer Kombination der Faktoren kultiviert. Bei der Behandlung der Ba/F3-Zellen mit IL-3 und/oder EGF ist der überlebenssichernde Effekt deutlich zu erkennen. Butyrat-Supplementation beeinflusst den überlebenssichernden Effekt von IL-3 und / oder EGF nicht. Butyrat kann eine Apoptose von Ba/F3-Zellen nach IL-3-Entzug resp. EGF-Entzug nicht verhindern. Die Apoptose der Ba/F3-Zellen nach Wachstumsfaktorentzug (/) erscheint Butyrat-unabhängig.

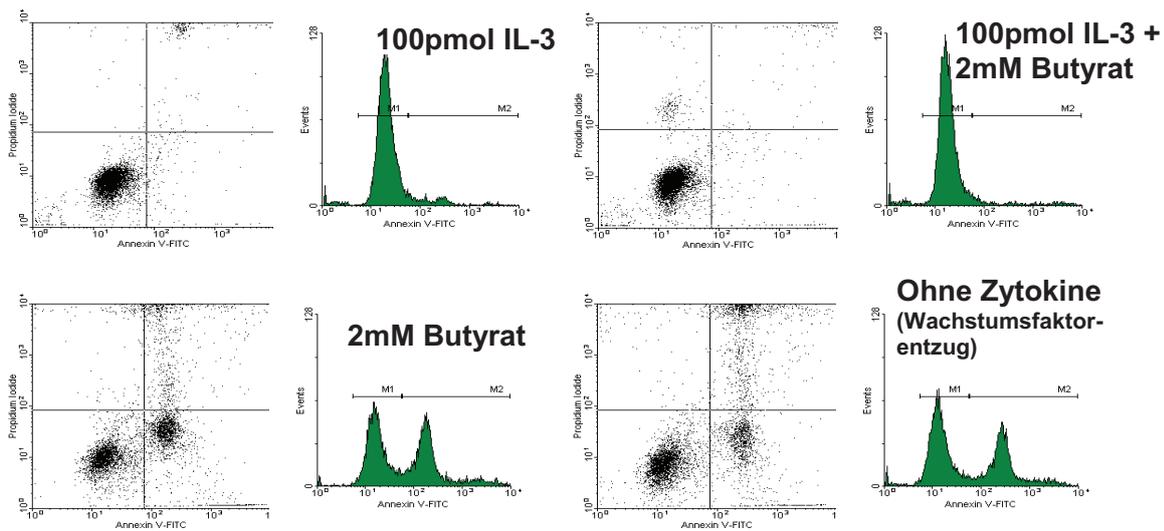


Abb. 5.1.3.b: Durchflusszytometrische Auswertung der Annexin V FITC Versuchsreihe. Darstellung der vitalen Zellen / apoptotischen Zellen als Punktdiagramme (im linken unteren Quadranten werden die vitalen Zellen angezeigt, im rechten unteren Quadranten die apoptotischen Zellen) und Histogramme:
Obere Reihe: 100pM IL-3, bzw. 100pmol IL-3 plus 2mM Butyrat sichern das Zellüberleben, genauso wie (hier nicht dargestellt) die Kombination aus 200ng/ml EGF plus 2mM Butyrat und 100pmol IL-3 plus 200ng/ml EGF plus 2mM Butyrat.
Untere Reihe: Die Kultivierung der Zellen ohne Zytokin führt nach 8 Stunden zur Apoptose/Nekrose von fast 50% der Zellen. Ein ähnliches Bild zeigt sich nach Stimulation der Zellen mit 2mM Butyrat. **Butyrat kann alleine eine Apoptose nach Wachstumsfaktorentzug nicht verhindern.**

Die *internukleosomale Fragmentierung der DNA* ist ein weiterer Indikator für die Apoptose in den untersuchten Zellen. Alle Zellen wurden mit den Wachstumsfaktoren IL-3, EPO, EGF oder mit Butyrat stimuliert. Als Kontrolle wurde eine Versuchsreihe durchgeführt, in der die Zellen ohne Zytokin kultiviert wurden.

In Abbildung 5.1.3.c zeigt sich, dass in den Ba/F3-Zellen, die den EGF-/EPO-Hybridrezeptor ekto exprimieren, wie erwartet durch IL-3 aber auch durch EGF die Apoptose inhibiert werden kann. Bei der parentalen Zelllinie ist lediglich IL-3 in der Lage, antiapoptotische Signale zu generieren und eine DNA-Fragmentation wirksam zu unterbinden.

Weder Butyrat noch EPO können in parentalen und in den EGF-/EPO-Hybridrezeptor-tragenden Zellen DNA-Fragmentation/ Apoptose verhindern.

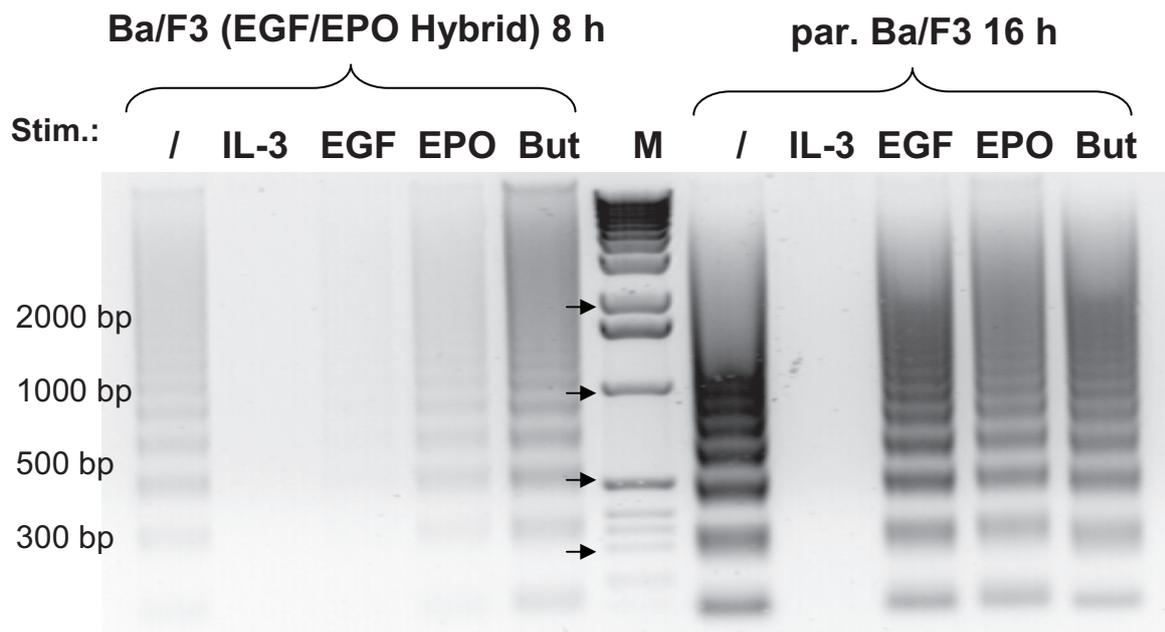


Abb. 5.1.3.c: Elektrophoretische Analyse der DNA-Fragmentation in Ba/F3-Zellen: Einfluss von Zytokinen und Butyrat auf die internukleosomale Fragmentierung in Ba/F3-Zellen. Hybridrezeptor-exprimierende Ba/F3-Zellen, sowie parentale Ba/F3-Zellen wurden für die angegebene Zeitdauer ohne Wachstumsfaktor oder mit EGF (200 ng/ml), 100 pM IL-3, 5 Units/ml Epo oder 2 mM Butyrat inkubiert. M: Molekulargewichtsmarker mit Angaben für 2000bp, 1000bp, 500bp und 300bp.

5.1.4 Effekte von Butyrat auf die Zellzyklusprogression von Ba/F3-Zellen

Die quantitative Anfärbung der nukleären DNA mit Propidium-Iodid und die nachfolgende FACS-Analyse ermöglichen Aussagen über den DNA-Gehalt einer Zelle und lassen Rückschlüsse auf die entsprechende Zellzyklusphase zu. Dadurch kann der Einfluss von externen Faktoren auf den Ablauf des Zellzyklus analysiert werden. Hier wurde die Wirkung von Butyrat auf den IL-3 abhängigen Zellzyklus der Ba/F3-Zellen geprüft.

Abbildung 5.1.4 zeigt, dass eine Stimulation der Ba/F3-Zellen mit 2 mM Butyrat in Gegenwart des Wachstumsfaktors IL-3 (100 pM) eine Akkumulation der Ba/F3-Zellen in der G₀/G₁-Phase bewirkt.

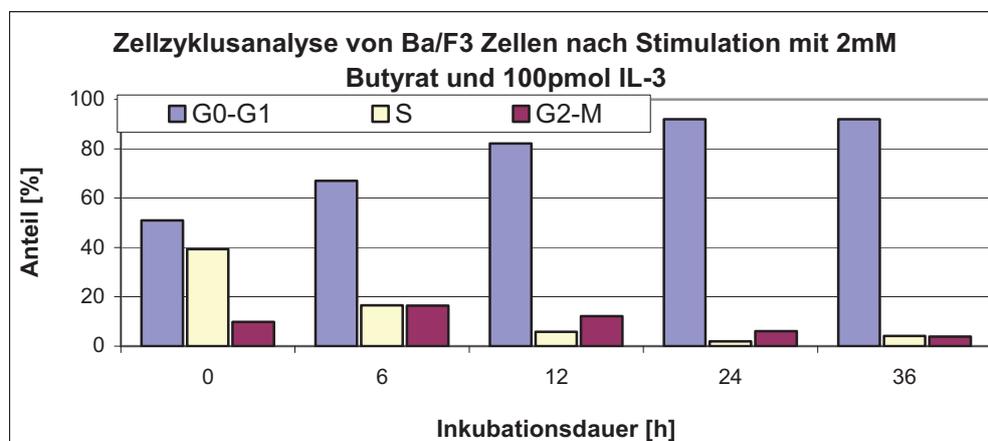


Abb. 5.1.4: Butyrat bewirkt in Ba/F3-Zellen in Anwesenheit des Wachstumsfaktors IL-3 eine Zellzyklusinhibition mit einem Verweilen der Zellen in der G₀-G₁ Phase. Ba/F3-Zellen wurden für 6, 12, 24 und 36 Stunden mit 2mM Butyrat und 100pmol IL-3 inkubiert. Mit zunehmender Inkubationsdauer zeigte sich eine Akkumulation der Zellen in der G₀-G₁ Phase.

5.2 Nachweis der Genexpression

Die Expression des bcl-x Gens wurde auf mRNA Ebene mittels Northern Blot und RT-PCR untersucht.

5.2.1 Northern Blot

Mittels Northern Blot konnte der Nachweis von bcl-x mRNA nach Butyrat-Stimulation erbracht werden. Die Ba/F3-Zellen wurden mit EGF (200ng/ml), IL-3 (100pmol) und Butyrat (2mM) für die in Abbildung 5.2.1 angegebene Dauer stimuliert. Anschließend erfolgte die RNA Isolation wie in Kapitel 4.6.1 beschrieben. Die Hybridisierung der mRNA erfolgte mit radioaktiv markierten cDNA Sonden, die einem ca. 1000bp langen DNA Abschnitt des bcl-x Gens entsprechen (vgl. Kapitel 4.6.2). EGF, IL-3 und Butyrat induzieren einen Anstieg der Menge der bcl-x mRNA in Ba/F3-Zellen. Für Butyrat zeigt sich eine deutliche Bande für bcl-xL mRNA nach 2 Stunden sowie nach 4 Stunden Stimulationsdauer. IL-3 und EGF können in Ba/F3-Zellen ebenfalls bcl-x mRNA induzieren, wobei es jedoch nach 4 Stunden zu einer Abschwächung der mRNA Bande kommt.

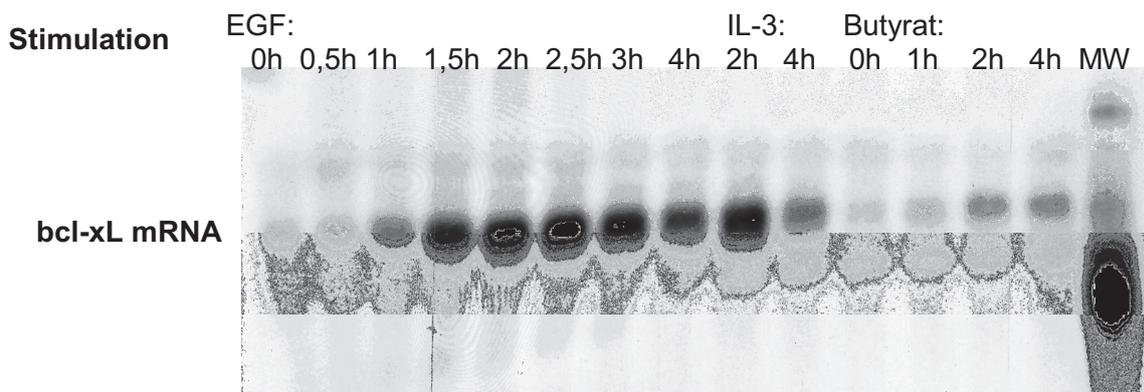


Abb. 5.2.1: Northern Blot zum Nachweis von bcl-xL-mRNA. EGF, IL-3 und Butyrat induzieren einen Anstieg der bcl-xL mRNA in Ba/F3-Zellen

5.2.2 RT-PCR

Ba/F3-Zellen wurden mit IL-3 (100pM, Inkubationsdauer 4h), EGF (200ng/ml, Inkubationsdauer 2h), und Butyrat (2mM, Inkubationsdauer 2h) stimuliert, bevor RNA gemäß dem unter 4.6.1 beschriebenen Protokoll isoliert wurde. Zur Kontrolle wurde RNA auch aus Ba/F3-Zellen gewonnen, die entweder der laufenden Zellkultur entstammten (Ansatz gemäß Protokoll zur Zellkultur, Kapitel 4.2) oder bei denen bcl-2a cDNA kotransfiziert wurde. Aus der Gesamt-RNA wurde cDNA hergestellt, die für die anschließende PCR mit bcl-x-spezifischen Primern, wie unter 5.3 erwähnt, eingesetzt wurde. Die Menge der DNA wurde

nach einer Gelelektrophorese im Vergleich zu den unstimulierten Kontrollen semiquantitativ bestimmt.

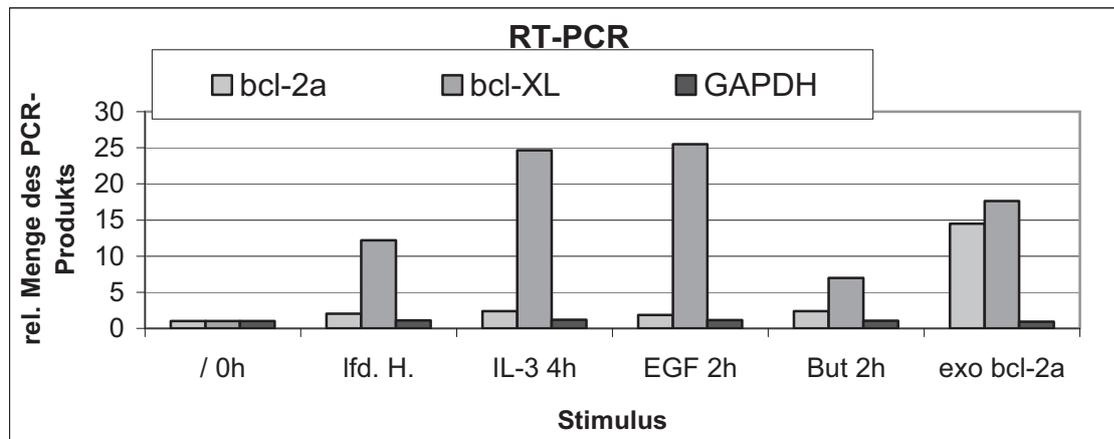


Abb. 5.2.2: RT-PCR aus mRNA von stimulierten Ba/F3-Zellen. 0h: RNA-Isolation aus Zellen vor Stimulation; lfd. H.: RNA-Isolation aus Zellen, die mit Standardkulturmedium kultiviert wurden. IL-3 4h: RNA-Isolation aus Zellen nach 4-stündiger IL-3-Inkubation; EGF 2h: RNA-Isolation aus Zellen nach 2-stündiger EGF-Inkubation; But 2h: RNA-Isolation aus Zellen nach 2-stündiger Butyrat-Inkubation; exo-Bcl-2a: Kotransfektion der bcl-2a cDNA in Ba/F3-Zellen, die mit Standardkulturmedium kultiviert wurden. GAPDH: Negativkontrolle

Diese Ergebnisse zeigen, dass Butyrat einen Anstieg der Menge an bcl-xL mRNA induziert. Dieser Anstieg fällt jedoch geringer aus, als bei Stimulation der Zellen mit IL-3 bzw. EGF. Weder Butyrat noch IL-3 oder EGF induzieren die Transkription des bcl-2a Gens, eines dem bcl-x verwandten Gens der Bcl-2 Proteinfamilie. Dagegen konnte durch Kotransfektion von bcl-2a cDNA (exo bcl-2a) gezeigt werden, dass die RT-PCR methodisch keine Fehler aufweist. Nach Kotransfektion der bcl-2a-cDNA wird bcl-2a DNA amplifiziert. GAPDH (Glycerinaldehyd-3phosphat-Dehydrogenase) diente als endogene Kontrolle.

5.3 Butyrat-abhängige Regulation von Transkriptionsfaktoren

Die Aktivierung von DNA-Abschnitten durch extrazelluläre Faktoren wird unter anderem intrazellulär durch Transkriptionsfaktoren vermittelt. Transkriptionsfaktoren sind Proteine, die intrazellulär aktiviert werden, in den Zellkern translozieren und dort mit der DNA in Wechselwirkung treten. Diese Protein-DNA Interaktion kann mit Hilfe von „Electrophoretic Mobility Shift Assays“ (EMSA, Kapitel 4.15) analysiert werden.

Es wurden EMSAs durchgeführt, um zu klären, ob Butyrat in Ba/F3-Zellen die DNA-Bindungsaktivität von Transkriptionsfaktoren beeinflusst.

Ba/F3-Zellen wurden mit 2mM Butyrat zu verschiedenen Zeitpunkten (0, 15, 60, 180 Minuten) stimuliert. Anschließend wurden Zellkernextrakte präpariert und die Transkriptionsfaktoren auf ihre Fähigkeit hin untersucht, an eine radioaktiv markierte kurze DNA-Sequenz (Oligonukleotid) mit entsprechender Bindungsstelle zu binden. Die dadurch

veränderte elektrophoretische Mobilität der DNA gilt dabei als Nachweis für die Bildung eines Protein-DNA-Komplexes.

Als Positivkontrolle dienten Zellkernextrakte aus Ba/F3-Zellen, die mit 200 ng/ml EGF oder 100 pM IL-3 behandelt wurden.

Dieser Versuchsaufbau wurde für sämtliche Stimulationsversuche verwendet, sofern dies nicht anders im Text beschrieben ist.

Zunächst wurden Transkriptionsfaktoren untersucht, die in der Erythropoese eine bedeutende Rolle spielen, wie zum Beispiel AP-1, NF-kappaB und STAT5. Die verwendeten Oligonukleotide enthielten Konsensus-DNA-Sequenzen, an die die jeweiligen Transkriptionsfaktoren binden. Dadurch sollten Transkriptionsfaktoren identifiziert werden, die in Ba/F3-Zellen durch Butyrat in ihrer Aktivität beeinflusst werden können.

Es konnten unterschiedliche Reaktionen der Transkriptionsfaktoren aufgezeigt werden:

Nach Stimulation der Ba/F3-Zellen mit 2mM Butyrat waren sowohl NF-kappaB-spezifische, als auch AP-1-spezifische DNA-Bindungsaktivitäten in den Kernextrakten nachweisbar (Abb. 5.3.a und 5.3.b), jedoch keinerlei STAT5-Bindungsreaktionen (Abb. 5.3.c).

Die Bindungsaktivität von NF-kappaB nahm mit zunehmender Expositionsdauer zu. Die Induktion von AP-1 war nach 15 Minuten stark nachweisbar und nahm nach längerer Expositionsdauer (60 Minuten) wieder ab.

Die Qualität der Kernextrakte wurde durch Stimulation der Ba/F3-Zellen mit EGF und IL-3 kontrolliert. Es konnten die bekannten, typischen Bindungsereignisse zwischen den Transkriptionsfaktoren und den Oligonukleotiden nachgewiesen werden.

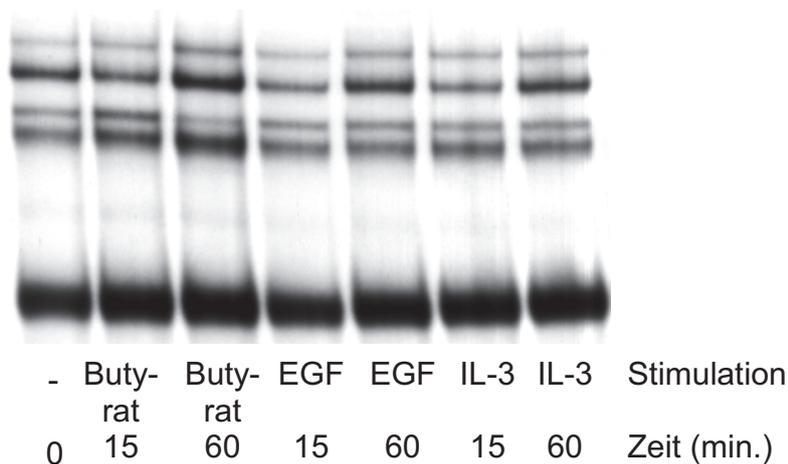


Abb. 5.3.a: EMSA zum Nachweis der NF-kappaB-DNA-Bindungsaktivität mit Kernextrakten aus Ba/F3-Zellen (Inkubation mit Butyrat, EGF und IL-3). Die unveränderte Bindungsaktivität nach 180min wurde hier nicht dargestellt.

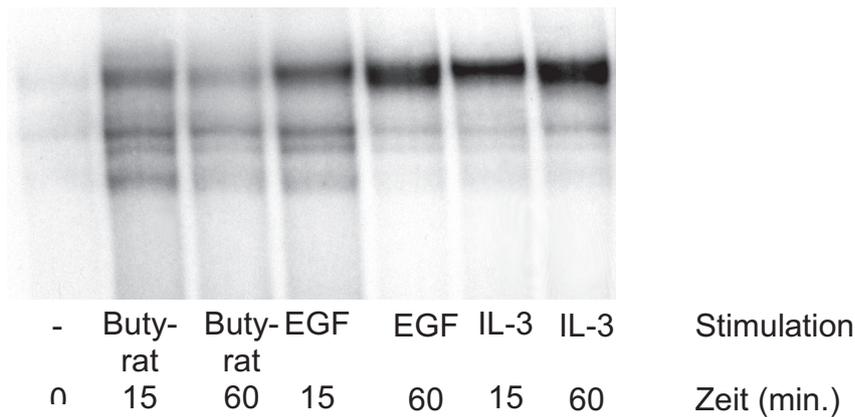


Abb. 5.3.b: EMSA zum Nachweis der AP-1-DNA-Bindungsaktivität mit Kernextrakten aus Ba/F3-Zellen (Inkubation mit Butyrat, EGF und IL-3). Die unveränderte Bindungsaktivität nach 180min wurde hier nicht dargestellt.

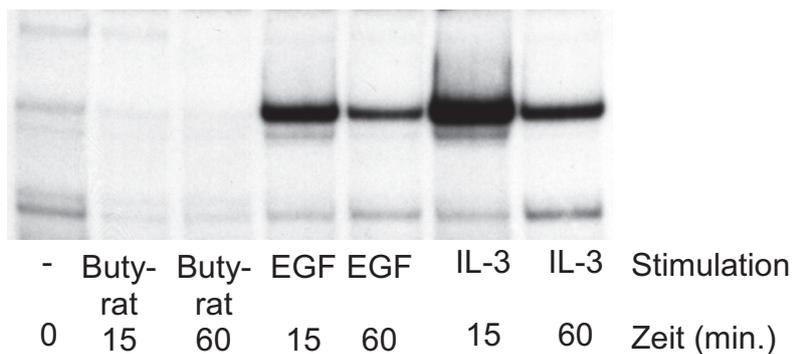


Abb. 5.3.c: EMSA zum Nachweis der STAT5-DNA-Bindungsaktivität mit Kernextrakten aus Ba/F3-Zellen (Inkubation mit Butyrat, EGF und IL-3). Die unveränderte Bindungsaktivität nach 180min wurde hier nicht dargestellt.

5.4 Klonierung des bcl-x Promoters

Infolge des Nachweises der Butyrat-abhängigen Induktion des bcl-x Gens in Ba/F3-Zellen mit konsekutiver bcl-xL mRNA Synthese (Kapitel 5.2) wurde anschließend *der Einfluss von Butyrat auf den Promoter* des bcl-x Gens analysiert. Somit sollten Erkenntnisse über die molekularen, intrazellulären Effekte von Butyrat in Ba/F3-Zellen gewonnen werden.

Für die hier dargestellten Untersuchungen wurde eine ca. 1000 Basenpaare lange Sequenz aus dem regulatorischen Bereich (Promoter) des bcl-x Gens verwendet. Zunächst wurde aus Ba/F3-Zellen genomische DNA präpariert und der gewünschte DNA-Bereich durch PCR amplifiziert. Die Sequenzen der verwendeten Primer lauten 5'-GGA ATT CAA AGA CAA CTA GCG-3' bzw. 5'-TTT TAT AAT AGA GAT GGG CTC AAC-3'. Das PCR-Produkt wurde

mittels der TA-Klonierungsmethode zunächst in den Vektor pCR2.1 ligiert und anschließend nach Transformation und Propagation in *E. coli* isoliert.

Der klonierte Promoterbereich wurde sequenziert und durch Vergleich mit der publizierten Sequenz verifiziert (EMBL-Datenbank, Zugriffsnummer: AF088904). Der interessierende Sequenzabschnitt wurde dann mit Hilfe der Restriktionsendonukleasen *SacI* und *XhoI* herausgetrennt, in einem Agarosegel aufgereinigt und in den zuvor mit den gleichen Enzymen linearisierten Vektor pGL3-Basic (Promega, USA, vgl. Abb. 4.11.a) vor das Firefly-Luziferase-Gen subkloniert. Das Konstrukt wurde erneut in *E. coli* amplifiziert, isoliert und durch Sequenzanalyse verifiziert. Dieses Konstrukt wird im Folgenden mit pGL3-X bezeichnet. Abbildung 5.4 zeigt eine schematische Darstellung der Insertion des *bcl-x* Promoters in den Reportergenvektor pGL3.

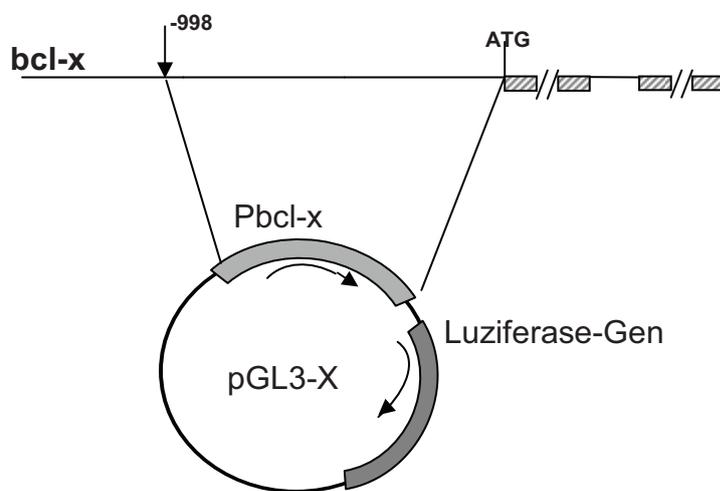


Abb. 5.4: Schematische Darstellung des Luziferase-Reportergenvektors pGL3-X mit der klonierten Promoterregion (P**bcl-x**) des *bcl-x* Gens. Bezüglich detaillierter Struktur des *bcl-x* Promoters siehe auch Abbildung 6.1.

5.5 Butyrat-abhängige Regulation des *bcl-x* Promoters

In Luziferase Reportergen Assays wurde zunächst untersucht, ob Butyrat in Ba/F3-Zellen den *bcl-x* Promoter aktiviert. Dazu wurde die Induktion des Firefly-Luziferase-Gens des Reportergenplasmids pGL3-X gemessen. Die Stimulation erfolgte mit ansteigenden Konzentrationen von Butyrat. Zur Kontrolle wurden die Messwerte mit der Aktivität des Basisvektors pGL3-basic (Kontrollversuchsreihe, hier nicht aufgeführt) ins Verhältnis gesetzt.

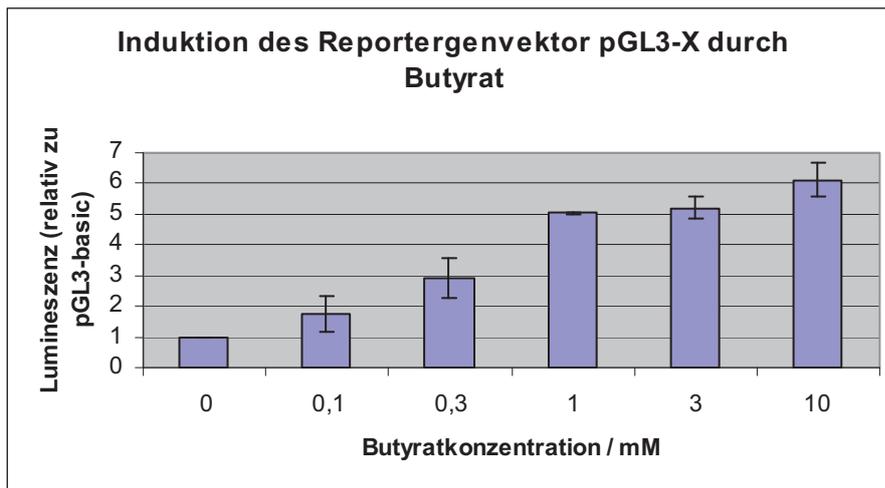


Abb. 5.5: Luziferase Reporter-gen Assay: Butyrat induziert den Reporter-genvektor pGL3-X dosisabhängig. Mit steigenden Dosen Butyrat wird das Reporter-gen zunehmend transaktiviert.

Die Ergebnisse zeigen deutlich, dass Butyrat den *bcl-x* Promotor dosisabhängig aktiviert. Oberhalb einer Konzentration von 3 mM ist kaum noch eine Zunahme der Reporter-genaktivität feststellbar. Für alle weiteren LRAs wurde, wie bereits in Kap. 5.1.1 erwähnt, eine Butyratkonzentration von 2 mM verwendet.

5.6 Darstellung funktioneller Regionen des *bcl-x* Promoters

Durch schrittweise Verkürzung der DNA-Sequenz des *bcl-x* Promoters (Deletion) sollten Butyrat-responsive Elemente in der Promotersequenz genauer lokalisiert werden. In *Firefly*-Luziferase Reporter-gen Assays (LRA) wurde die Aktivierbarkeit verkürzter *bcl-x* Promoter-Fragmente durch Butyrat vergleichend untersucht. Als Ausgangsmaterial für die schrittweise 5'-seitige Verkürzung der Promotersequenz stand das pGL3-X-Reporter-genplasmid zur Verfügung (Abbildung 5.2).

5.6.1 Klonierung von *bcl-x* Promoter-Fragmenten

Die Promoterfragmente wurden unter Verwendung geeigneter Primer durch PCR-Amplifikation innerhalb der Promotersequenz des Plasmids pGL3-X gewonnen. Die PCR-Produkte wurden durch TA-Klonierung in den Vektor pCR2.1 eingefügt und zur Vervielfältigung in *E. coli* transformiert. Die zu untersuchenden Promoterabschnitte wurden mit den Restriktionsendonukleasen Sac I und Xho I aus dem Plasmid isoliert und in den Luziferase-Reporter-gen-Vektor pGL3-basic kloniert. Die Konstrukte wurden sequenziert und mit der DNA-Sequenz des pGL3-X verglichen.

Abbildung 5.6.1 zeigt eine schematische Übersicht der Deletionskonstrukte. Das Plasmid pGL3-X entspricht dem pGL3-basic Vektor mit einem klonierten 998 Basenpaare (bp)-langen Abschnitt der Promoterregion (P*bcl-x*) des *bcl-x* Gens (*bcl-x*). ATG stellt das Startcodon der Translation dar und gilt als Ausgangspunkt der Längenbestimmung der

Deletionskonstrukte in Basenpaaren (bp) vor dem Startcodon. Die resultierenden Deletionskonstrukte sind nach der Länge des klonierten Promoterabschnitts benannt: pGL3-39, pGL3-111, pGL3-320, pGL3-483, pGL3-622 und pGL3-835.

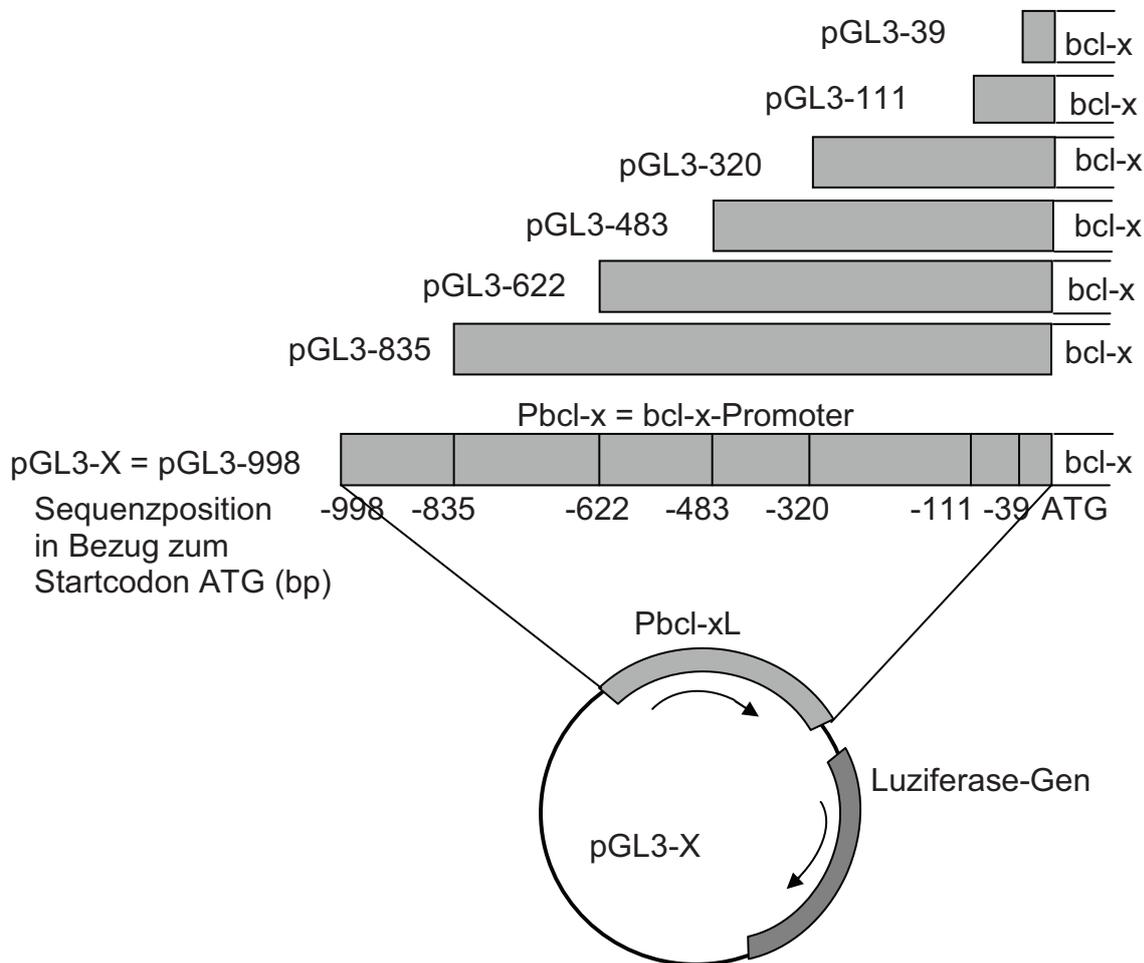


Abb. 5.6.1 Übersicht über die klonierten bcl-x Promoter-Fragmente

5.6.2 Butyrat-abhängige Aktivierung verkürzter bcl-x Promoterfragmente

Mit Luziferase Reportergen Assays (LRA) kann die Promoteraktivität klonierter DNA-Sequenzen quantifiziert werden.

Die Reportgenplasmide pGL3-basic und pGL3-X, sowie dessen Deletionskonstrukte (pGL3-39 bis pGL3-835) wurden in LRAs eingesetzt, um nachzuweisen, ob der Einfluss von Butyrat auf den bcl-x Promoter in bestimmten Promoterteilsequenzen lokalisiert werden kann.

10^7 Ba/F3-Zellen (Zellklon, der EGF/EPO-Hybridrezeptoren überexprimiert) wurden durch Elektroporation transient mit den Plasmiden transfiziert und für 6 Stunden mit 2mM Butyrat inkubiert. Zur Kontrolle wurden Zellen mit EGF (200 ng / ml) und IL-3 (100 pM) stimuliert.

Abbildung 5.6.2 zeigt, dass die Aktivität des bcl-x Promoters nach Butyrat-Stimulation mit zunehmender Länge des klonierten bcl-x Promoterfragments ansteigt. Als Bezug dienten Ansätze, die mit dem promoterlosen Vektor „pGL3-Basic“ transfiziert wurden.

Innerhalb der Promotersequenz zeigte sich in den Abschnitten von 111bp - 483bp und 622bp - 998bp jeweils eine signifikante Induktionssteigerung, während im Bereich 483bp - 622bp keine Zunahme zu erkennen war (U-Test für nicht normalverteilte Mengen, $n=9$, α 0,05).

Nur das kleinste Promoterkonstrukt pGL-39 zeigte eine Aktivität, die unterhalb der Induktion des „Leervektors“ pGL3-basic liegt. Demzufolge wurde die benachbarte Promotorsequenz bis 111bp als essentiell für die minimale Butyrat-Induktion definiert und als Minimalpromotor identifiziert.

In den Kontrollversuchen konnten weder EGF noch IL-3 eine Aktivierung sämtlicher Konstrukte des bcl-x Promoter hervorrufen, die über die Aktivität des Kontrollvektors pGL3-basic hinausging.

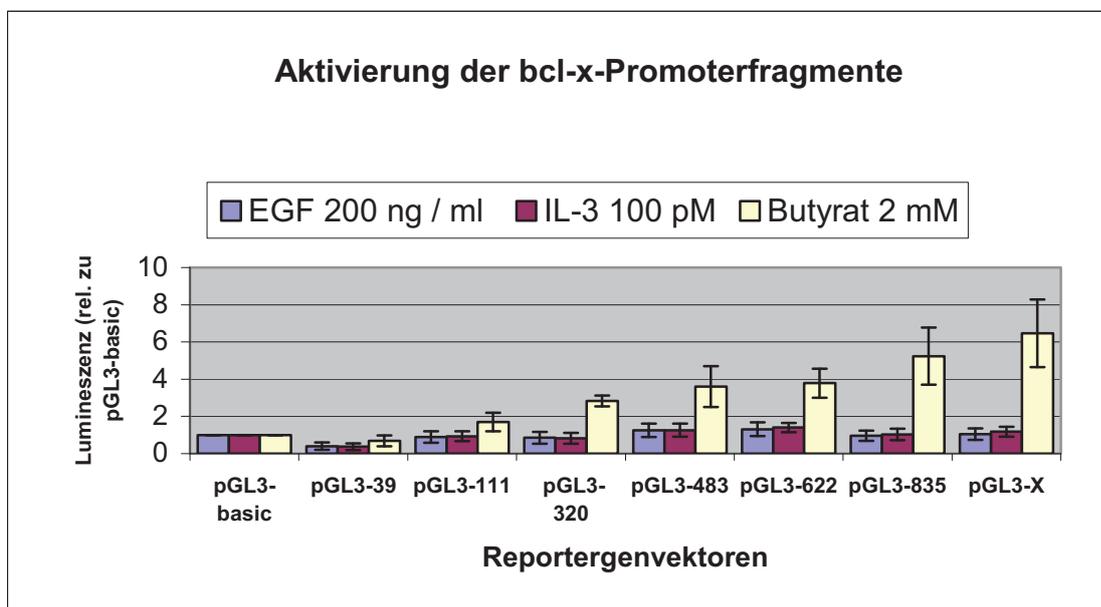


Abb. 5.6.2 Luziferase Reportergen Assay. Aktivierung des Reportergenvektors pGL3-X und der klonierten Promoterfragmente pGL3-39 bis pGL3-835 durch 2mM Butyrat; Kontrollstimulation mit EGF und IL-3.

5.6.3 Identifikation der Butyrat-responsiven Promoterregionen AR1 und AR2

Mit den LRAs wurde die deutliche Induktion des bcl-x Promoters durch Butyrat in den Bereichen 111-483bp und 619-998bp nachgewiesen. Diese Abschnitte wurden als „Aktive Region 1“ (AR1: 111-483bp) und „Aktive Region 2“ (AR2: 619-998bp) definiert.

Zur Beurteilung der Signifikanz der gefundenen Aktivitätszunahme in den Bereichen zwischen 111bp - 483bp sowie 622bp - 998bp wurde der U-Test für nicht normalverteilte Mengen angewandt.

Hier konnte (bei $n=9$ Versuchen und einem Signifikanzniveau $\alpha = 0,05$) die Signifikanz der Induktionssteigerung für beide Regionen bestätigt werden.

n = 9	pGL3-622	pGL3-X	pGL3-111	pGL3-483
Rangsumme	48	123	45	126
Teilprüfgrösse	78	3	81	0
Prüfgrösse	-	3	-	0
Empirische Prüfgrösse für n=9	17	17	17	17

Tabelle 5.6.3: U-Test (nach Mann-Whitney) für nicht normalverteilte Mengen. Die Nullhypothese „Die beiden untersuchten Elemente sind gleich (z.B. „Die Induktion von pGL3-622 und pGL3-X ist gleich“ oder „Die Induktion von pGL3-111 und pGL3-483 ist gleich“) darf verworfen werden, wenn die Prüfgröße des Rangsummentests kleiner ist, als die empirische Prüfgröße.

5.6.4 Klonierung der Butyrat-responsiven Promoterregionen AR1 und AR2

Zur weiteren Analyse von AR1 und AR2 wurden diese beiden Regionen aus dem bcl-x Promoter durch PCR isoliert und in den Luziferase-Vektor kloniert.

Nach Auswahl geeigneter Primer konnten AR1 und AR2 mittels PCR amplifiziert werden. Die Klonierung in den pGL-3 Reportergenvektor erfolgte analog den unter 5.6.1 beschriebenen Schritten für die Klonierung der bcl-x Promoterfragmente. Die gewonnenen Reportergenvektoren wurden entsprechend als pGL3-AR1 und pGL3-AR2 bezeichnet. Abbildung 5.6.4 zeigt schematisch die klonierten Abschnitte von AR1 und AR2 in Bezug auf den bcl-x Promoter und das Translationsstartcodon ATG.

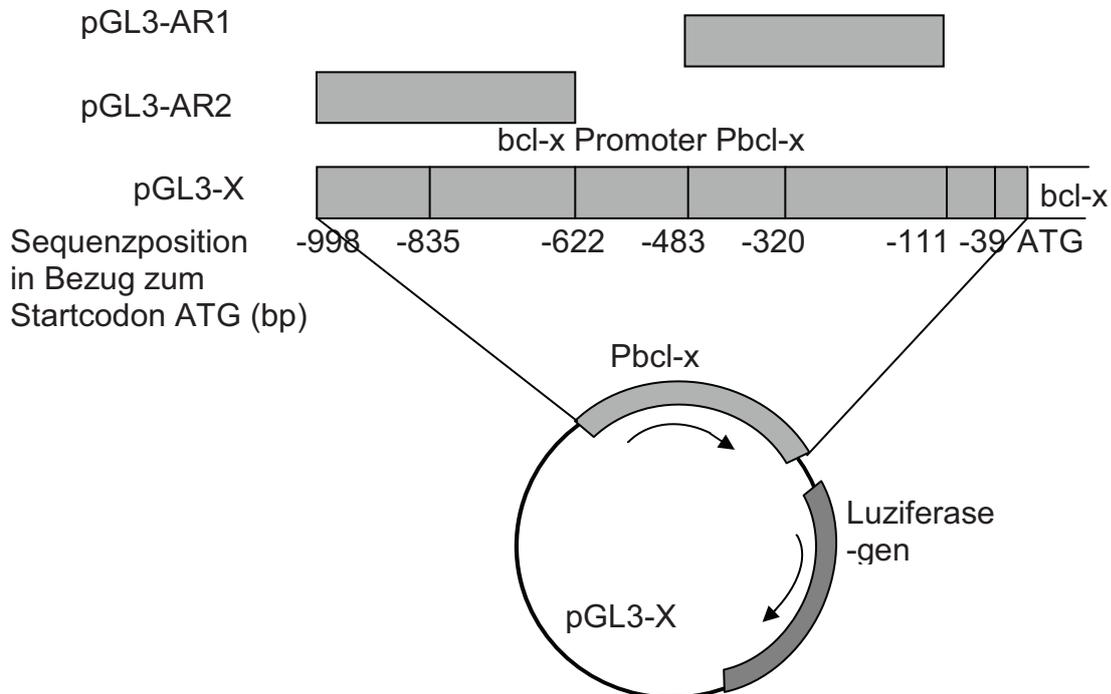


Abb. 5.6.4: Übersicht über die Reportergenvektoren pGL3-AR1 und pGL3-AR2

5.6.5 Butyrat-abhängige Aktivierung der Promoterregionen AR1 und AR2

Zur Bestimmung der Induzierbarkeit von AR1 und AR2 wurden die Plasmide pGL3-AR1 und pGL3-AR2 durch Elektroporation transient in Ba/F3-Zellen transfiziert und mit LRAs analysiert.

Stimulation und Kontrollversuche erfolgten wie unter 5.6.2 beschrieben.

Anhand der Daten wird deutlich, dass AR2 durch Butyrat in gleichem Maße aktiviert wird, wie der komplette bcl-x Promoter (Abb. 5.6.5).

Die Aktivierung von AR1 durch Butyrat fiel jedoch im Vergleich zum Gesamtpromoter signifikant geringer aus (U-Test, $n = 4$, $\alpha = 0.05$).

In den Kontrollversuchen mit EGF und IL-3 konnten AR1 und AR2 entsprechend den Ergebnissen der Promoterfragmente (5.6.2) nicht aktiviert werden. Es ist zu vermuten, dass die Aktivierung des klonierten bcl-x Promoters durch Butyrat somit im Bereich AR2 erfolgt.

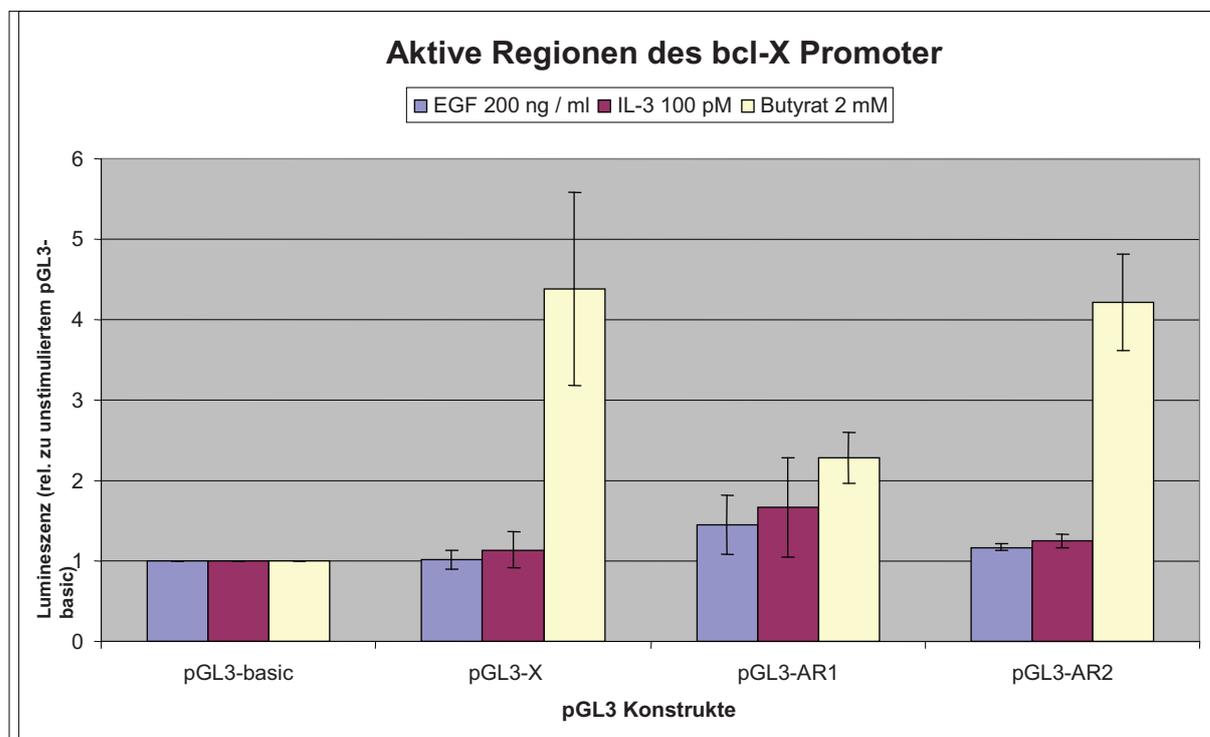


Abb. 5.6.5: Luziferase Reportergen Assay. Transaktivierung des Reportergenvektors pGL3-X und der Konstrukte pGL3-AR1 und pGL3-AR2 durch 2mM Butyrat, 200ng/ml EGF und 100pM IL-3.

5.6.6 Prüfung der Transfektionseffizienz

Die Effizienz der Transfektion von Plasmiden in Ba/F3-Zellen wurde in einer Reihe von Versuchen untersucht, um auszuschließen, dass Messwertunterschiede auf Variationen in der Anzahl transfizierter Plasmide beruhen. Zur Prüfung der Transfektionseffizienz wurde das Dual- Luziferase Reportergen Assay-System mit dem Ko-Reportergenplasmid pRL-TK verwendet. pRL-TK enthält den Thymidinkinase-Promoter zur dauerhaften Expression der *Renilla*-Luziferase, im Gegensatz zur Firefly-Luziferase im pGL3-basic.

Die Stimulation erfolgte identisch zu den unter 5.6.2.beschriebenen LRAs.

Zur Berechnung der relativen Transfektionseffizienzen wurde jeweils der Mittelwert der Lumineszenz der Versuche 2-7 mit dem Mittelwert der Lumineszenz des Versuches 1 ins Verhältnis gesetzt (Abb. 5.6.6).

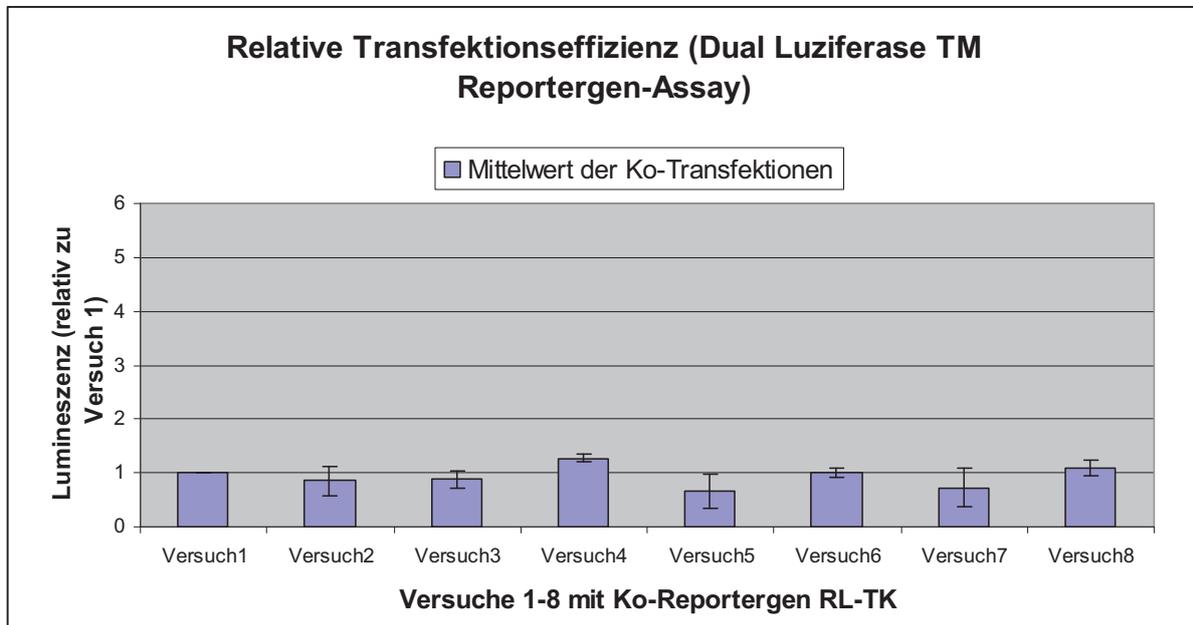


Abb. 5.6.6 Bestimmung der relativen Transfektionseffizienz mit dem Dual-Luziferase Reportergergen Assay: Kotransfektion des Plasmid pRL-TK (Renilla-Luziferase-Thymidinkinase): Gleichmäßige Aktivierung des Renilla-Luziferase-Gens in allen Versuchen.

Es konnten keine signifikanten Unterschiede in der Aktivierung der Renilla-Luziferase zwischen den einzelnen Versuchen nachgewiesen werden. Somit wurde von einer gleichmäßigen Transfektion ausgegangen.

5.7 Analyse von Transkriptionsfaktor-DNA Wechselwirkungen in den Butyrat-responsiven Promoterregionen AR1 und AR2

In Abschnitt 5.5 wurde bereits gezeigt, dass Butyrat in Ba/F3-Zellen die Aktivität von Transkriptionsfaktoren beeinflussen kann. In diesem Abschnitt sollen nun gezielt in den Regionen AR1 und AR2 Bindungsereignisse mit Transkriptionsfaktoren analysiert werden.

5.7.1 Computergestützte Identifikation potentieller Transkriptionsfaktor-Bindungsstellen in AR1 und AR2

Zunächst wurde die DNA-Sequenz von AR1 und AR2 hinsichtlich der Existenz von Konsensus-Sequenzen für die Bindung von Transkriptionsfaktoren analysiert. Dabei wurde die Software „Match 1.0 public version“ der Online-Datenbank „Transfac“ (www.gene-regulation.com) genutzt, in der DNA- und RNA-Sequenzen, Proteinstrukturen und deren gegenseitige Wechselwirkungen katalogisiert sind.

Speziell in dieser Arbeit wurde die *bcl-x* Promotersequenz vor allem nach Bindungsstellen für Transkriptionsfaktoren wie AP-1, NF-kappaB, NFAT und STAT5 abgesucht, die im Rahmen der Regulation der Genexpression erythroider Zellen relevant sind.

Mit dem genannten Programm konnten in beiden Regionen jeweils diverse Transkriptionsfaktor-Bindungsstellen identifiziert werden.

Aufgrund der Lokalisation und Häufung bestimmter Bindungsstellen wurde jeweils ein repräsentativer DNA-Sequenzabschnitt (Oligonukleotid AR1 und AR2) für die anschließende experimentelle Analyse ausgewählt.

Abbildung 5.7.1a zeigt schematisch die Lokalisation der Transkriptionsfaktor-Bindungsstellen aus AR1 gemäß der Analyse aus der Transfac Datenbank.

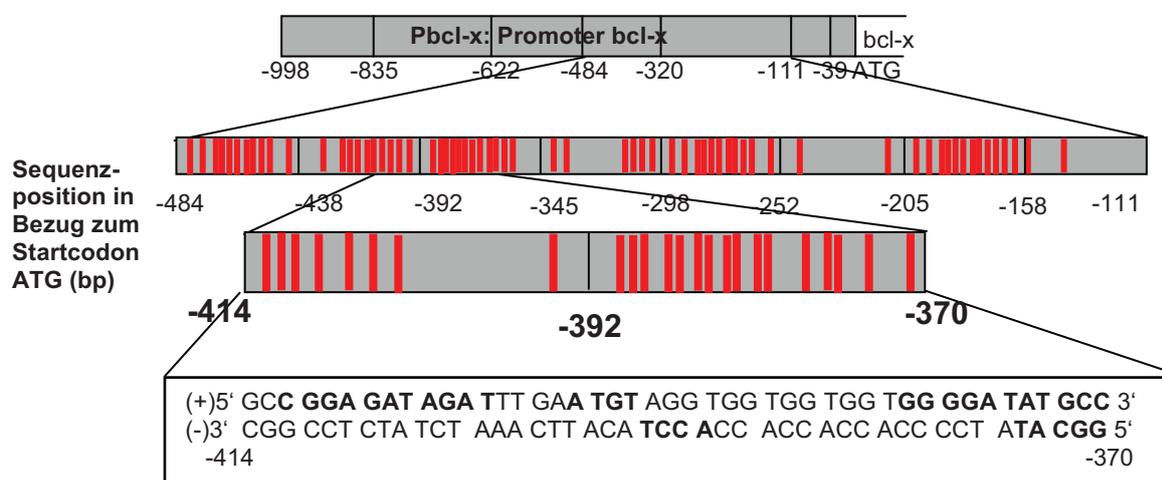


Abb. 5.7.1a: Schematische Darstellung der Transkriptionsfaktor-Bindungsstellen in der aktiven Region 1 mit vergrößerter Projektion des ausgewählten Oligonukleotids AR 1 (45bp, -414 → -370 stromaufwärts vom Startcodon). Jeder senkrechte Balken entspricht einer potentiellen Transkriptionsfaktorbindungsstelle. In der DNA-Sequenz wurden Core-Sequenzen **fett** markiert. Zum Teil kommt es zur Überschneidung der Core-Sequenzen, weshalb mehr als nur 4 Basen markiert wurden. NF-kappaB Core-Sequenz [(+) 5' GGGA 3'] an Position -379.

Aus AR1 wurde ein Abschnitt von 45bp mit der Sequenz (+) 5' GCC GGA GAT AGA TTT GAA TGT AGG TGG TGG TGG TGG GGA TAT GCC 3' (Oligonukleotid AR 1) ausgewählt und synthetisiert. Die Transfac-Analyse zeigte unter anderem am 3'Ende der Aktiven Region 1 eine potentielle Bindungsstelle für den Transkriptionsfaktor NF-kappaB [(+) 5' GGGA 3']. Tabelle 5.7.1b führt die Position und Konsensussequenz der für das Oligo AR1 gefundenen Transkriptionsfaktoren resp. Bindungsstellen auf.

Transkriptionsfaktor	Position im Oligonukleotid AR 1 / im Promoter oberhalb des ATG	Konsensussequenz (Core-Sequenz in Großbuchstaben)
Ets1	(+) 1 / -414	gcCGGAgata
GATA1	(+) 2 / -413	ccggaGATAgattt
GATA1	(+) 2 / -413	cggaGATAgattt
GATA1	(+) 4 / -411	cggaGATAgattt
LMO2COM	(+) 4 / -411	gaGATAgat
GATA3	(+) 6 / -408	atAGATtga
OCT1	(+) 7 / -407	tagattgaATGTa
DELTAEF1	(-) 19 / -396	caccACCTaca
IK2	(+) 32 / -383	ggtgGGGAtatg
MZF1	(+) 32 / -383	ggtGGGGa
LMO2COM	(+) 36 / -379	ggGATatgc
NF-kappaB	(+) 36 / -379	GGGAtatgcc

Tabelle 5.7.1b: Transkriptionsfaktorbindungsstellen im Oligonukleotid AR1 (45bp) der aktiven Region 1. Im 5'Bereich von AR1 liegt eine Bindungsstelle für den Transkriptionsfaktor Ets1, am Ende liegt eine für NF-kappaB. [(+) Plus-Strang, (-) Minus-Strang]. Die Analyse wurde mit „Transfac“ unter www.gene-regulation.com durchgeführt.

Abbildung 5.7.1c zeigt schematisch die Lokalisation der Transkriptionsfaktor-Bindungsstellen für AR2.

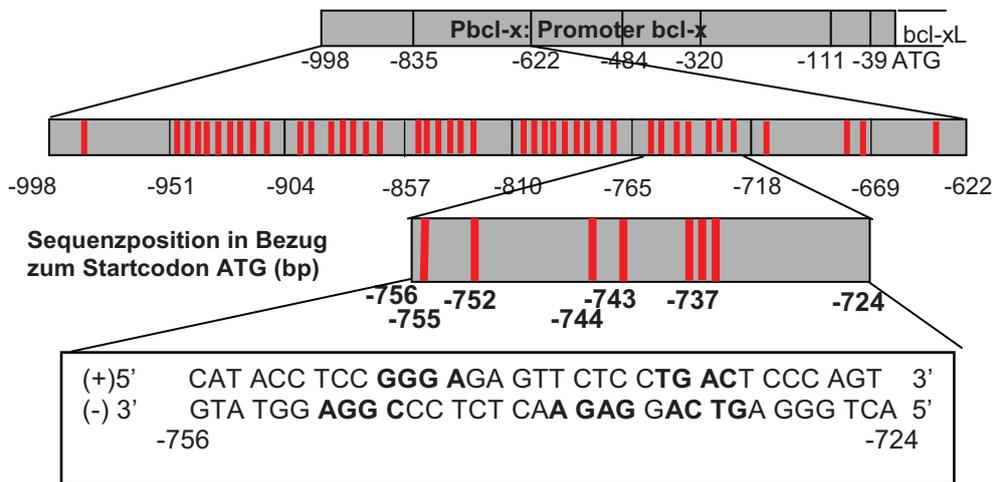


Abb. 5.7.1c: Schematische Darstellung der Transkriptionsfaktor-Bindungsstellen in der aktiven Region 2 mit vergrößerter Projektion des ausgewählten Oligonukleotids AR 2 (33bp, -756 → -724 stromaufwärts vom Startcodon). Jeder senkrechte Balken entspricht einer potentiellen Transkriptionsfaktorbindungsstelle. In der DNA-Sequenz wurden die Core-Sequenzen der Transkriptionsfaktorbindungsstellen **fett** markiert, für AP 1 [(+) 5' TGAC 3'], sowie für NFAT [(+) 5' GAGA 3'].

Aus AR2 wurde die 33bp lange Sequenz (+)5' CAT ACC TCC GGG AGA GTT CTC CTG ACT CCC AGT 3' (Oligonukleotid AR 2) ausgewählt und synthetisiert.

Innerhalb dieser Sequenz liegt eine Bindungsstelle für den Transkriptionsfaktor AP-1 [(+) 5' TGAC 3'], sowie zwei modifizierte Bindungsstellen für NFAT, mit einer alternativen Core-Sequenz [(+) 5' GAGA 3'] statt [(+) 5' GAAA 3']. Die Sequenz 5' GAGA 3' entspricht einer Variation der üblichen NFAT-Bindungsstelle 5' GAAA 3'. In der Transfac Datenbank wurde 5' GAGA 3' jedoch als alternative NFAT-Bindungsstelle mit einer Häufigkeit von 4% beschrieben.

Tabelle 5.7.1d führt die Position und Konsensussequenz der für das Oligo AR2 gefundenen Transkriptionsfaktoren resp. Bindungsstellen auf.

Transkriptionsfaktor	Position im Oligonukleotid AR 2 / im Promoter oberhalb des ATG	Konsensussequenz (Core-Sequenz in Großbuchstaben)
CETS1	(-) 3	ccCGGAggta
IK2	(+) 6 /-751	ctccGGGAgagt
NFAT	(+) 12 / -745	ccggGAGAgttc
NFAT	(-) 18 / -739	tcagGAGAactc
AP-1FJ	(+) 21 / -736	ccTGACTccca
AP-1	(+) 21 / -736	ccTGACTccca

Tabelle 5.7.1d: Transkriptionsfaktorbindungsstellen in der Region AR2. In der Tabelle **hervorgehoben** ist eine Konsensussequenz für AP-1 sowie zwei alternative Core-Sequenzen für den Transkriptionsfaktor NFAT (+5' GAGA 3'), wobei die zweite auf dem komplementären DNA-Strang vorliegt (-5' GAGA 3'). Die Analyse wurde mit „Transfac“ unter www.gene-regulation.com durchgeführt.

Abbildung 5.7.1e zeigt zusammenfassend die Lokalisation der Transkriptionsfaktorbindungsstellen für NF-kappaB, AP-1 und NFAT in Bezug zum klonierten bcl-x Promoter.

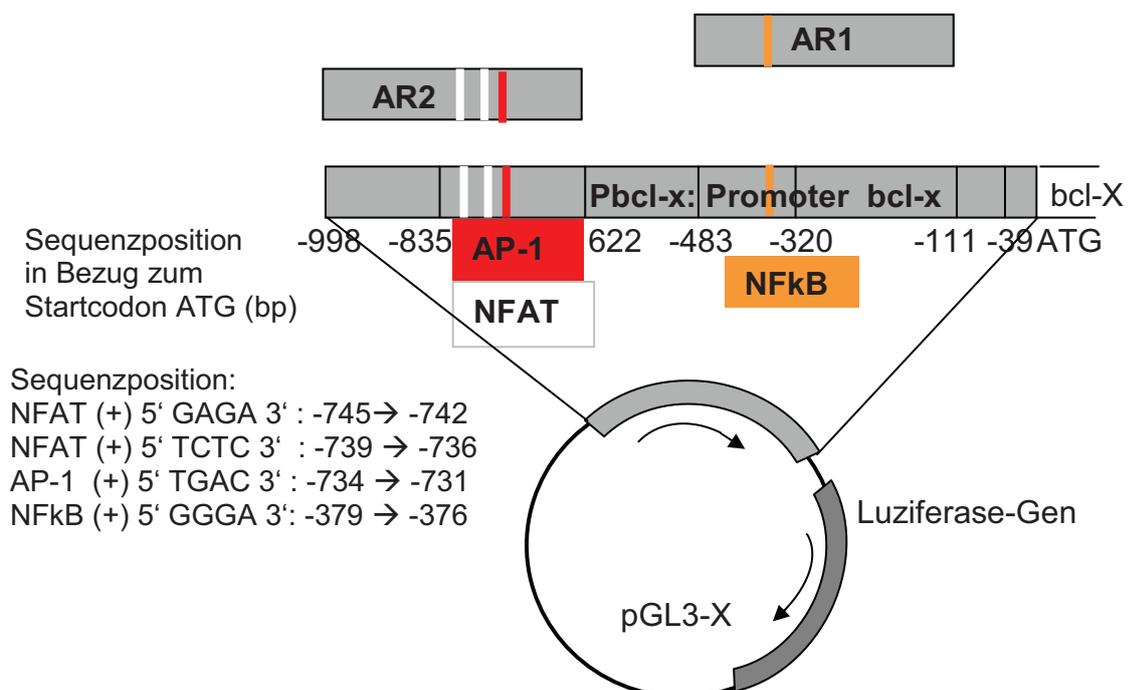


Abb. 5.7.1e: Lokalisation der Transkriptionsfaktor-Bindungsstellen für NF-kappaB in AR1 und für AP-1 und NFAT in AR2.

5.7.2 Protein-DNA Wechselwirkung in AR1 und AR2

Die Oligonukleotide AR1 und AR2 (vgl Kapitel 5.7.1) dienen in EMSA-Experimenten als DNA-Sonden zur Untersuchung der Bindungsereignisse mit Transkriptionsfaktoren.

Beide Oligonukleotide wurden als doppelsträngige DNA-Sonden wie unter 4.15 beschrieben mit [γ^{32} P]ATP radioaktiv markiert.

Die Gewinnung der Transkriptionsfaktoren aus Zellkernextrakten erfolgte ebenfalls wie unter 4.15 beschrieben.

Zusätzlich wurden Supershift-Analysen für AR1 und AR2 mit Antikörpern gegen die Transkriptionsfaktoren NFAT, NF-kappaB, Ets und AP-1 (Jun) durchgeführt. Die Komplexe, die durch ein Bindungsereignis zwischen einem radioaktiv markierten Oligonukleotid, einem Transkriptionsfaktor und einem Antikörper entstehen, können dabei an einer zusätzlich veränderten elektrophoretischen Mobilität (Supershift) erkannt werden.

In Abbildung 5.7.2a zeigt sich für AR1 mit zunehmender Stimulationsdauer (0, 15, 60 Minuten) mit 2mM Butyrat eine zunehmende DNA-Bindungsaktivität. Mit Antikörpern gegen NFAT, NF-kappaB, Ets, AP-1 (jun) konnte jedoch kein Supershift nachgewiesen werden.

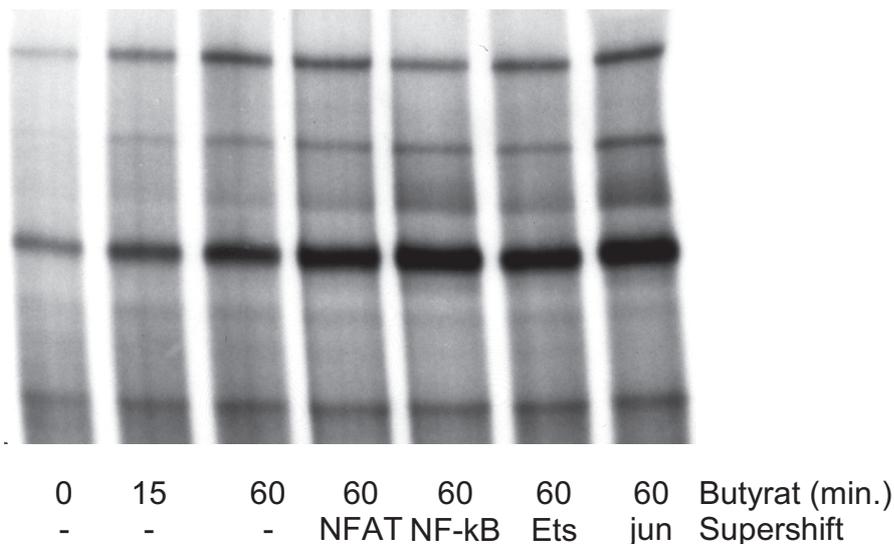


Abb. 5.7.2a: EMSA mit Kernextrakten aus Butyrat-exponierten Ba/F3-Zellen und dem Oligonukleotid AR1: In den Spalten 1-3 von links erkennt man entsprechend der Stimulationsdauer eine zunehmende Bandenstärke. Nach Zugabe von Antikörpern gegen die Transkriptionsfaktoren NFAT, NF-kappaB, Ets und jun (AP-1) kann kein Supershift ausgelöst werden.

In Abbildung 5.7.2b und 5.7.2c (Kompetitionsversuch) erkennt man für AR2 ebenfalls eine Zunahme der Bindungsaktivität mit längerer Stimulationsdauer (0, 15, 60 Minuten, 2mM Butyrat). Im Supershift-Experiment zeigt sich ein deutlicher Bandshift für NFAT. Die Antikörper gegen NF-kappaB, Ets und AP-1 (jun) konnten keinen Supershift auslösen.

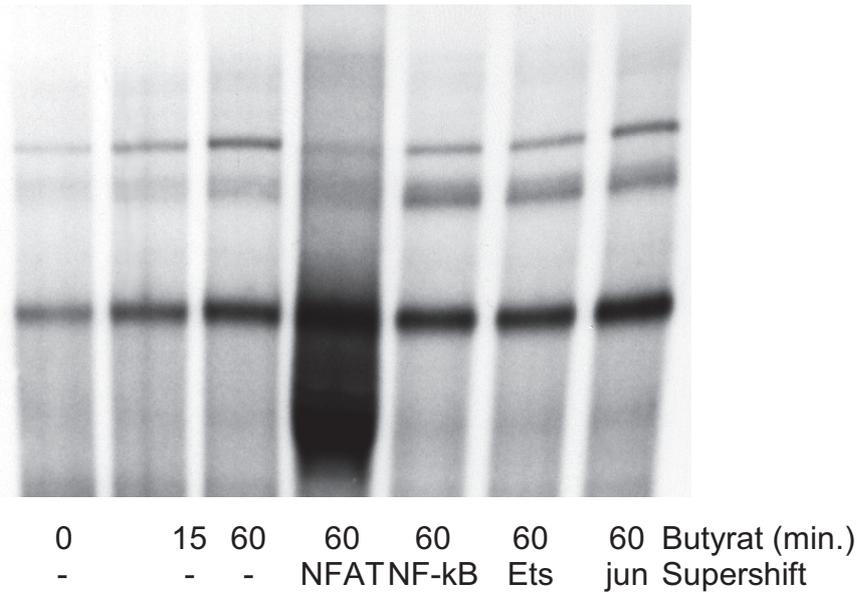
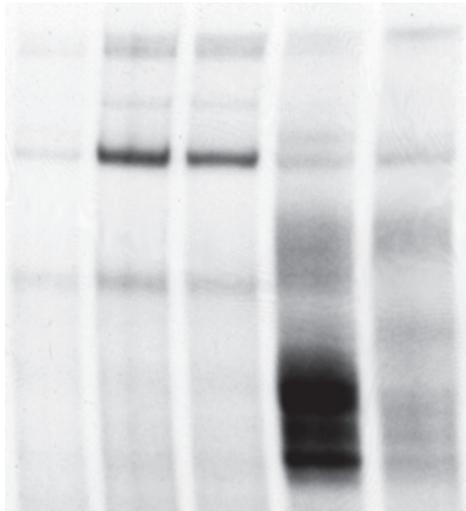


Abb. 5.7.2b: EMSA mit Kernextrakten aus Butyrat-exponierten Ba/F3-Zellen und dem Oligonukleotid AR2: In den Spalten 1-3 von links erkennt man entsprechend der Stimulationsdauer eine zunehmende Bandenstärke. Nach Zugabe von Antikörpern gegen die Transkriptionsfaktoren NFAT, NF-kappaB, Ets und jun (AP-1) erkennt man in der 4. Spalte von links einen Bandshift der auf die Anwesenheit des Transkriptionsfaktors NFAT hinweist. Bei den anderen Transkriptionsfaktoren zeigt sich kein Supershift.

Um die Spezifität der Bindung zu überprüfen wurden Wettbewerbsversuche durchgeführt. Hierbei wird zusätzlich zur radioaktiv markierten DNA noch die gleiche unmarkierte DNA im Überschuss hinzugegeben. Die Bindungswahrscheinlichkeit der Transkriptionsfaktoren an die, im Überschuss vorliegenden, nicht markierten und daher radiographisch nicht darstellbaren Sonden ist somit höher. In Abbildung 5.7.2c wird das Supershift-Signal von NFAT durch Zugabe der im Überschuss vorliegenden nicht-radioaktiven Oligonukleotide AR2 und Muta2 (zu Oligonukleotid Muta 2 vgl. auch Kapitel 5.8) ausgelöscht und somit die Bindung zwischen NFAT und AR2 verifiziert.

Interessanterweise zeigt der Shift-Komplex aus Oligonukleotid AR2, Transkriptionsfaktor NFAT und dem Antikörper gegen NFAT ein schnelleres Laufverhalten in der Elektrophorese. Dies könnte darauf zurückgeführt werden, dass durch den Antikörper hervorgerufene sterische Effekte den Komplex aus DNA, Transkriptionsfaktor und Antikörper modifizieren. Somit würde ein kleinerer, leichter und folglich in der Elektrophorese schnellerer Komplex entstehen.



0	15	60	60	60	Butyrat (min.)
-	-	-	NFAT	NFAT	Supershift
-	-	-	-	WT	Kompetition

Abb. 5.7.2c: Kompetitions-EMSA für den Supershift zwischen Oligonukleotid AR2 und Transkriptionsfaktor NFAT: In der 4. Spalte von links ist der Supershift deutlich zu erkennen. Spalte 5 und 6 zeigt die Auslöschung des Supershift-Signals durch Zugabe von nicht radioaktiv markierten Oligonukleotiden AR2 und Muta 2 (für Oligonukleotid Muta 2 vgl. auch Kapitel 5.7).

5.8 Mutagenese funktioneller Elemente in AR2

Die ortsgerichtete Mutagenese dient der gezielten Veränderung von DNA- bzw. RNA-Sequenzen durch z.B. Insertion, Deletion oder Punktmutationen. Auf der Grundlage der Ergebnisse aus 5.7 wurden sowohl im Oligonukleotid AR2 als auch im Reportergenplasmid pGL3-AR2 die DNA-Bindungsstellen für die Transkriptionsfaktoren NFAT und AP-1 verändert, um deren Funktion in der Butyrat-abhängigen Aktivierung des bcl-x Promoters zu untersuchen.

5.8.1 Ortsgerichtete Mutagenese der Bindungsstellen für AP-1 und NFAT in AR2

Zunächst wurden entsprechende Primer zur ortsgerichteten Mutagenese abgeleitet. Es wurden jeweils gezielt Punktmutationen eingefügt, um die Bindungsstellen der Transkriptionsfaktoren AP-1 und NFAT zu verändern. Der Versuchsablauf der ortsgerichteten Mutagenese ist im Kapitel 4.16 beschrieben.

Durch Mutation 1 wurde eine NFAT-Bindungsstelle verändert [(+) 5' TCTCC 3' → (+) 5' TGCAG 3']. In der Mutation 2 wurden Basen in 2 NFAT-Bindungsstellen ausgetauscht [(+) 5' GAGA 3' → (+) 5' TACA 3'] und [(+) 5' TCTCC 3' → (+) 5' TGTAC 3']. Die Mutation 3 führte zu einer Modifikation der AP-1-Bindungsstelle [(+) 5' TGAC 3' → (+) 5' CTTG 3'], bei Mutation 4 wurden Basen in der AP-1-Bindungsstelle [(+) 5' CTGAC 3' → (+) 5' ACTTG 3'] und in einer NFAT Bindungsstelle [(+) 5' TCTCC 3' → (+) 5' TGCAA 3'] ausgetauscht.

Übersicht der Sequenzen der (+)Strang-Primer für die ortsgerichtete Mutagenese:

Sequ. Oligo AR 2: (+) 5' CAT ACC TCC GGG AGA GTT CTC CTG ACT CCC AGT 3'

Sequ. Oligo Mutation1: (+) 5' T ACC TCC GGG AGA GTT **gca** gTG ACT CCC AGT AGG 3'

Sequ. Oligo Mutation2: (+) 5' T ACC TCC GG**t AcA** GTT **gTa** CTG ACT CCC AGT AGG 3'

Sequ. Oligo Mutation3: (+) 5' T ACC TCC GGG AGA GTT CTC **Cct tgT** CCC AGT AGG 3'

Sequ. Oligo Mutation4: (+) 5' T ACC TCC GGG AGA GTT **gca Act tgT** CCC AGT AGG 3'

Die neu entstandenen Varianten des bcl-x Promoters wurden als pGL3-Muta 1 – 4 bezeichnet. Die eingefügten Mutationen wurden durch Sequenzierung verifiziert.

5.8.2 Butyrat-abhängige Aktivierung des bcl-x Promoters nach ortsgerichteter Mutagenese der Promotersequenz

Mit den Reportergenplasmiden pGL3basic und pGL3X, sowie mit den Mutationskonstrukten (pGL3-Muta1 bis pGL3-Muta4) wurden LRAs durchgeführt, um zu klären, ob die betreffenden Transkriptionsfaktorbindungsstellen an der Butyrat-abhängigen Induktion des bcl-x Promoters beteiligt sind. Die transiente Transfektion erfolgte wie unter 4.11 beschrieben nach demselben Schema wie bei der Transfektion der verkürzten Promoterfragmente (Kapitel 5.6.2) mit Butyrat, EGF und IL-3.

Abbildung 5.8.2 zeigt, dass die Butyrat-abhängige Aktivierung des Promoters durch die eingefügten Mutationen einzelner Transkriptionsfaktorbindungsstellen nicht signifikant verändert wird (U-Test für nicht normalverteilte Mengen, n=4, $\alpha=0,05$). Die gemessene Lumineszenz der Firefly-Luziferase ist trotz Mutation der AP-1 resp. NFAT-Bindungsstellen in der bcl-x Promotersequenz nicht signifikant schwächer im Vergleich zur nativen Promotersequenz im pGL3-X. Ein einzelner Transkriptionsfaktor ist somit nicht alleinverantwortlich für die Butyrat-abhängige Induktion des bcl-x Promoters.

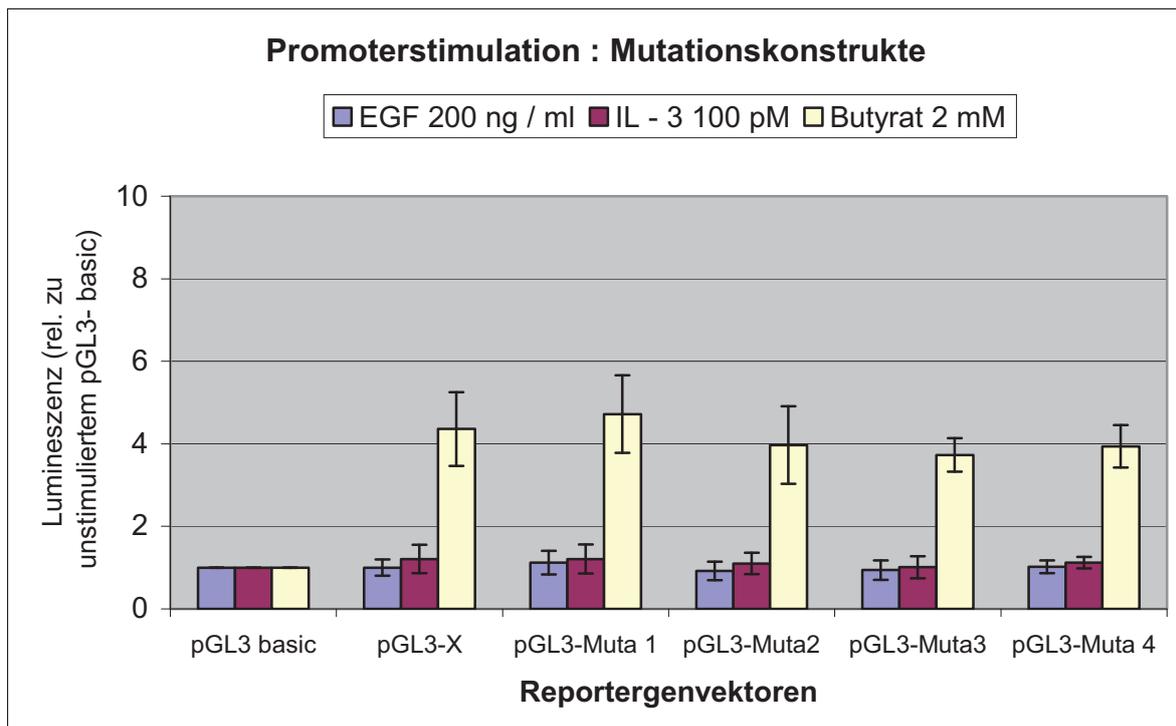


Abb. 5.8.2: LRA: Aktivierung des Reporter-genvektor pGL3-X und der Mutationskonstrukte pGL3-Muta 1 – pGL3-Muta 4 durch 2mM Butyrat. Kontrollstimulation mit 200ng/ml EGF und 100pM IL-3. Die in die Promotersequenz eingefügten Mutationen für die Transkriptionsfaktorbindungsstellen für AP-1 und NFAT bewirken keine Änderung in der Aktivierung des Promoters.

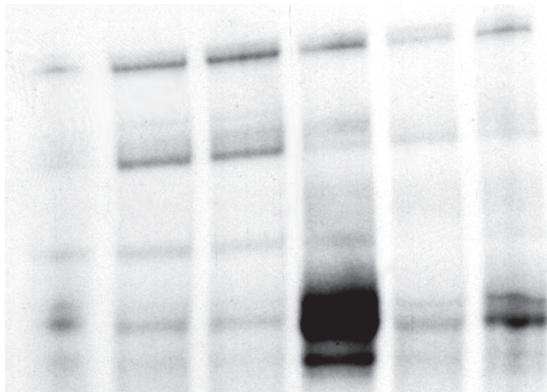
5.8.3 Protein-DNA Wechselwirkung mit der veränderten AR2-Sequenz

Um die Folgen der eingefügten Mutationen im Oligo AR2 auch in EMSA-Experimenten zu studieren, wurde ein mutiertes Oligonukleotid synthetisiert (Oligo Muta 2) und nach Hybridisierung zum Doppelstrang und radioaktiver Markierung mit $[\gamma^{32}\text{P}]\text{ATP}$ (Polynukleotidkinase-Reaktion, Kapitel 4.15) in EMSAs eingesetzt. Mit Hilfe der EMSAs sollte der Einfluss der Mutation der Core-Bindungssequenz für die Bindung des Transkriptionsfaktor NFAT evaluiert werden. Die Mutation der Bindungsstelle für AP-1 wurde in EMSAs nicht weiter verfolgt, da sich bereits in den EMSAs in Kapitel 5.7.2 (vgl Abb 5.7.2.b) nach Antikörperzusatz kein Hinweis für eine Beteiligung des Transkriptionsfaktors AP-1 ergab.

Die Gewinnung der Zellkernextrakte aus den Ba/F3-Zellen sowie der Ablauf der EMSAs erfolgten wie unter 4.15 beschrieben.

Abbildung 5.8.3a bestätigt die zunehmende Protein-DNA-Bindungsaktivität mit längerer Stimulationsdauer wie bereits in Kapitel 5.7.2 für AR2 nachgewiesen. Ebenso zeigt sich ein Supershift nach Reaktion mit Antikörpern gegen NFAT. Die *Kompetition* mit nicht radioaktiv markiertem Oligonukleotid AR2 löscht das Supershift-Signal aus und bestätigt somit die Spezifität der Bindung. Eine *Kompetition* mit nicht-radioaktiv markiertem Oligonukleotid Muta 2 (Mutation zweier NFAT Konsensussequenzen) kann den Bandshift nicht mehr

auslöschen. Dies spricht für eine funktionelle Veränderung der NFAT Bindungsstellen in der Oligonukleotidsequenz von Muta 2.



0	15	60	60	60	60	Butyrat (min.)
-	-	-	NFAT	NFAT	NFAT	Supershift
-	-	-	-	AR2	Mut 2	Kompetition

Abb. 5.8.3a: Kompetitions-EMSA für den Supershift zwischen Oligonukleotid AR2 und Transkriptionsfaktor NFAT: In der 4. Spalte von links ist nach Zugabe eines NFAT-Antikörpers der Supershift deutlich zu erkennen. Spalte 5 zeigt die Auslöschung des Supershift-Signals durch Zugabe von nicht-radioaktiv markierten Oligonukleotiden AR2. Spalte 6 zeigt, dass die Zugabe von nicht-radioaktiv markiertem Oligo Muta2 den Supershift nicht auslöschen kann und bestätigt damit die Spezifität der Wechselwirkung.

5.9 Einfluss der Tyrosinkinase Lyn und JAK2 auf die Butyrat-abhängige Aktivierung des bcl-x Promoters - Kotransfektion mit cDNAs für Lyn und JAK2

Tyrosinkinase wie die Januskinase (JAK) 2 und die src-Kinase Lyn sind an Signalvorgängen in hämatopoetischen Zellen maßgeblich beteiligt. Eines der über Transkriptionsfaktoren angesteuerten Zielgene ist unter anderem auch das bcl-x Gen. Hier wurde untersucht, ob eine Überexpression der Kinasen bzw. eine Blockade ihrer Wirkungen über dominant negative Konstrukte die Butyrat-induzierte Aktivierung des bcl-x Promoters beeinflusst. Dazu wurden zusätzlich zum Reportergenvektor pGL3-X jeweils 10 µg cDNA kotransfiziert (gemäß Transfektionsprotokoll Kapitel 4.11), um eine transiente Expression von JAK2 bzw. Lyn zu erreichen. Wie in Abbildung 5.9 dargestellt, wird die Aktivierung des bcl-x Promoters sowohl durch die Ko-Expression von JAK2 als auch von Lyn deutlich verstärkt. Die Kotransfektion von dominant-negativer cDNA für JAK2 und Lyn hingegen bleibt ohne Einfluss auf die Promoterinduktion. Beim kombinierten Einsatz von Butyrat und EPO bzw. IL-3 liegt das Niveau der Induktion sogar niedriger als der Kontrollwert.

Diese Ergebnisse zeigen, dass ein modifiziertes zelluläres Potential zur Tyrosinphosphorylierung die Induktion des bcl-x Promoters durch Butyrat beeinflussen kann.

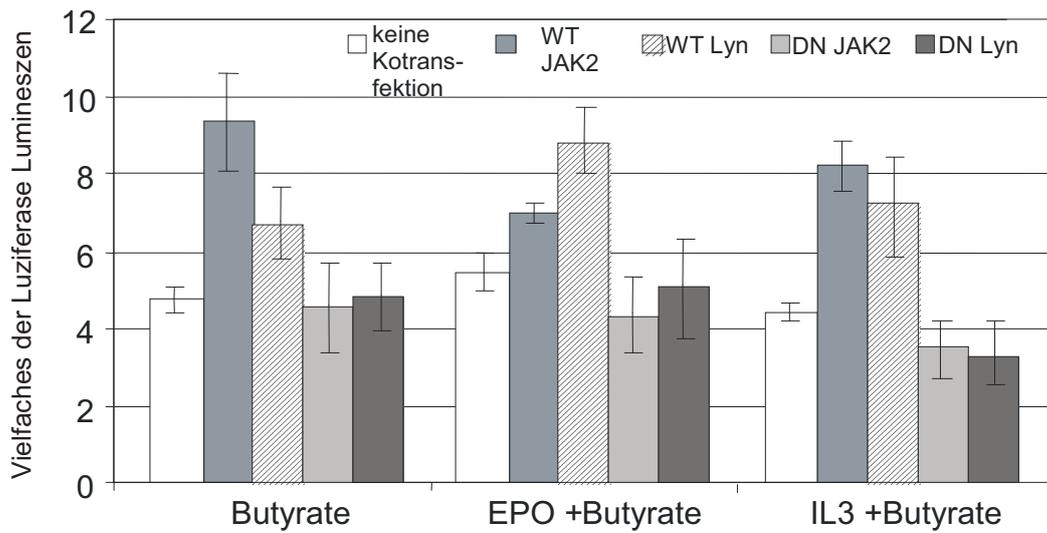


Abb. 5.9: Kotransfektion der cDNAs für die Tyrosinkinase JAK2 (WT JAK2) bzw. für die src-Kinase Lyn (WT Lyn) und dominant-negativer Konstrukte (DN JAK2, DN Lyn) zusammen mit dem Reporterplasmid pGL3-X.

Die LRAs wurden unter Bedingungen durchgeführt wie sie unter 4.12 beschrieben wurden. Für diese Transfektionen wurde jedoch ein Subklon der Ba/F3-Zellen verwendet, der den EPO-Rezeptor stabil überexprimiert. Zur Stimulation dieses Rezeptors wurde anstelle von EGF EPO (5U/ml) eingesetzt.

6. Diskussion

Von Butyrat ist bekannt, dass es vielfältige Einflüsse auf Zellfunktionen, wie z.B. Apoptose, Zellproliferation und -differenzierung hat. **Butyrat inhibiert die Zellproliferation**, indem die Zelle nach Butyrat-Behandlung in der G0-Phase des Zellzyklus sistiert. **Butyrat löst insbesondere in einer Vielzahl maligner Zelltypen Apoptose** aus, unter anderem auch durch Suppression des antiapoptotischen bcl-x Gens. In nicht-malignen Zellen kann Butyrat dagegen keine Apoptose auslösen [22].

Als ein Wirkmechanismus für Butyrat ist einerseits eine inhibitorische Wirkung auf die Histondeacetylase beschrieben (vgl. Kapitel 2.1), andererseits hat Butyrat auf multiple Transkriptionsfaktoren Einfluss, wie z.B.:

- STAT5 [3]
- NF-kappaB [39]
- AP-1 [5]
- GATA1, NF-E2 [37]
- SP-1 [35].

In Anlehnung an die Ergebnisse von Coradini et al. [23] und Siavoshian et al. [94], die beide eine Butyrat-abhängige Zellproliferationshemmung von Kolonkarzinomzellen beschrieben, sowie Vaziri [25], der den gleichen Effekt in Fibroblasten beschrieb, konnte auch hier in initialen Dosis-Wirkungsversuchen gezeigt werden, dass **Butyrat in Konzentrationen über 2mM die Zellproliferation von Ba/F3-Zellen komplett und unabhängig von der Gegenwart der Zytokine IL-3 und EGF hemmt.**

Mittlere Dosen von Butyrat (0,1 mM - 1mM) förderten hingegen die Zellproliferation in Abhängigkeit von den IL-3 Dosen. Ein maximaler proliferativer Effekt zeigte sich dabei bei einem Zusatz von 7,5pM IL-3. Möglicherweise wirkt Butyrat also in niedrigen Dosen synergistisch mit der zytokinbedingten Zellproliferation. Ebenso wäre denkbar, dass IL-3 und EGF die proliferationshemmende Wirkung von niedrigdosiertem Butyrat aufheben können.

Der Mechanismus der Zellproliferationshemmung durch Butyrat wurde, wie von Archer et al. [95] publiziert, bisher einem p21 Waf1/Cip1 kontrollierten Zellzyklusarrest in der G0-G1 Phase zugeschrieben.

In Zellzyklusanalysen konnte im Einklang mit Archer et al. nachgewiesen werden, dass es bei Dosen von 2mM Butyrat zu einem G0-G1 Arrest des Zellzyklus der Ba/F3-Zellen kommt. Eine simultane Zugabe der Wachstumsfaktoren IL-3 und/oder EGF konnte diesen zellzyklushemmenden Effekt von Butyrat nicht verhindern.

Dies bestätigt die These, dass die **Zellproliferationshemmung durch Butyrat mit einem Zellzyklusarrest in der G0-G1 Phase** in Zusammenhang steht.

Nakano et al. [96] beschrieben für den Butyrat-induzierten Zellzyklusarrest in Kolonkarzinomzellen, dass Butyrat über den Transkriptionsfaktor SP1 den Promoter des p21 Gens aktiviert und die Expression des p21Waf1/Cip1-Gens steigert.

Dai et al [39] fanden in myeloischen Leukämiezellen einen direkten Zusammenhang zwischen dem Butyrat-abhängigen Zellzyklusarrest und der Beteiligung des Transkriptionsfaktors NF-kappaB in der Aktivierung des Zellzyklusinhibitors p21Waf1/Cip1.

Interessant ist daher zum einen, ob p21Waf1/Cip1 in Ba/F3-Zellen einen Butyrat-vermittelten Zellzyklusarrest unterstützt, sowie eine Analyse, ob SP1 oder NF-kappaB als Transkriptionsfaktoren an der Induktion der Butyrat-vermittelten Zellproliferations-/Zellzyklusinhibition in Ba/F3-Zellen beteiligt sein könnten. Bei den hier durchgeführten Analysen zur Butyrat-abhängigen Aktivierung von Transkriptionsfaktoren konnte tatsächlich eine zeitabhängige Induktion des Transkriptionsfaktors NF-kappaB gezeigt werden. Analysen zur Induktion des Zellzyklusinhibitors p21/Waf1/Cip1 durch Butyrat in Ba/F3-Zellen könnten zusätzliche Erkenntnisse zum Mechanismus des hier aufgezeigten Zellzyklusarrest bringen.

Wang et al [13] publizierten einen p21/Waf1/Cip1-unabhängigen Zellzyklusarrest nach Butyrat-Stimulation bei Zellen eines diffus großzelligen B-Zell-Lymphoms. Dabei wurde der Zellzyklusarrest auf eine Butyrat-abhängige Veränderung der Expression von Cyclinen und Cyclin-abhängigen Kinasen (Cdc2, CDK 4 und Cyclin A) zurückgeführt.

Butyrat kann vor allem in malignen Zelltypen Apoptose auslösen (vgl. Kapitel 2.1: Butyrat und Apoptose). Nach Inkubation von Ba/F3-Zellen mit Butyrat konnten in dieser Arbeit ebenfalls Zeichen der Apoptose nachgewiesen werden. Die apoptotischen Zellreaktionen nach Butyrat-Stimulation waren dabei vergleichbar mit der Apoptose nach Entzug des Wachstumsfaktors IL-3.

Dagegen waren diese apoptotischen Zeichen wie DNA-Fragmentation nicht nachweisbar, als die Zellen mit einer Kombination aus Butyrat plus einem der überlebenssichernden Zytokine IL-3 oder EGF behandelt wurden. Butyrat könnte demzufolge in Ba/F3-Zellen eine direkt Apoptose-induzierende Wirkung auslösen. Andererseits ist auch denkbar, **dass Butyrat keine apoptosemodulierende Wirkung in Ba/F3-Zellen besitzt und somit die, nach Wachstumsfaktorentzug, eintretende Apoptose nicht direkt beeinflussen kann.**

Die Regulation des programmierten Zelltods (Apoptose), der Zellproliferation und Zelldifferenzierung ist aktuell Gegenstand intensiver *molekularbiologischer* Forschung, um die molekularen Kontrollmechanismen aufzudecken. In der komplexen Regulation der Apoptose sind unter anderem auch die Proteine der bcl-2 Genfamilie beteiligt. Ein Mitglied

dieser Gruppe ist das bcl-x Gen, welches sowohl für Apoptose-induzierende (z.B. Bcl-xS) als auch für Apoptose-inhibierende Proteine (z.B. Bcl-xL) codieren kann. Um seine apoptosemodifizierende Wirkung zu entfalten liegt das Bcl-xL Protein hauptsächlich gebunden an die Mitochondrienmembran vor, man findet es aber auch als freies Protein im Zytosol. An der Mitochondrienmembran kontrolliert Bcl-xL die Homöostase des Cytochrom C und somit eine Kaskade von karyo- und zytolytischen Enzymen. Daher erklärt sich der divergierende Einfluss des bcl-x Gens auf Zellreifung und -überleben einerseits und Zelltod andererseits.

Die exakte Regulation des bcl-x Gens ist nach wie vor noch nicht vollständig aufgeklärt. Einige extrazelluläre Faktoren, die die bcl-x Genexpression induzieren, sind bereits bekannt, wie zum Beispiel EPO [6], [7], [96], IL-3 [79], [69], IL-6 [97], [98] oder CSF-1 [99]. Dennoch ist bisher nur wenig darüber berichtet worden, wie nach extrazellulärer Stimulation die Signalwege für die Regulation der bcl-x Genexpression in der Zelle vermittelt werden. Wenige Transkriptionsfaktoren konnten bisher in der Signaltransduktionskaskade des bcl-x Gens charakterisiert werden. So kann z.B. STAT5 nach EPO- oder IL-3-Stimulation eine bcl-x Expression auslösen [78], [79], [100]. Ebenso sind NF-kappaB [84], AP-1 [82] und GATA 1 [85] bei der bcl-x Genexpression beteiligt.

Insgesamt sind auch über die Wirkung von Butyrat in Bezug auf das bcl-x Gen in der Literatur bisher nur wenige Daten publiziert worden. Die von verschiedenen Zellarten bekannte Apoptose-induzierende Wirkung von Butyrat wurde unter anderem mit einer verringerten bcl-x Genexpression und konsekutiver Abnahme der Expression an antiapoptotischem Bcl-xL Protein erklärt.

Roy et al. [10] und Pajak et al. [11] berichteten über diesen Zusammenhang erst kürzlich in Kolonkarzinomzellen. Cao et al. [20] konnten in apoptotischen Mesotheliomzellen nach Butyrat-Behandlung sowohl einen verringerten Gehalt an bcl-xL mRNA als auch an Bcl-xL Protein nachweisen.

Die Analyse der Genexpression kann sowohl auf RNA- als auch auf Proteinebene erfolgen. In dieser Arbeit wurden hierfür nur RNA-Analysen durchgeführt. Zum Nachweis der bcl-xL RNA dienten Northern-Blots und RT-PCRs. **In Ba/F3-Zellen konnte nach Butyrat-Stimulation eine zeitabhängige bcl-x mRNA Produktion nachgewiesen werden.** Verglichen mit den überlebenssichernden Faktoren IL-3 und EGF fiel der Butyrat-Effekt auf die bcl-x Genexpression in Ba/F3-Zellen jedoch geringer aus. Dies entspricht den Daten von Emanuele et al. [19], die in Hepatokarzinomzellen ebenfalls eine vermehrte Produktion von bcl-xL mRNA nach Butyrat-Stimulation beschrieben. Paradoxe Weise wiesen Emanuele et al. jedoch eine Verringerung der Menge des Bcl-xL Proteins, sowie einen gesteigerten Gehalt an Bcl-xS Protein und die Induktion der Apoptose nach.

Dieses Phänomen mit erhöhter Menge an bcl-xL mRNA nach Butyrat-Behandlung und dennoch nachweisbarer Apoptose wurde in dieser Arbeit am ehesten im Rahmen einer posttranskriptionellen mRNA-Modifikation interpretiert, welche möglicherweise zu einer Verringerung des Bcl-xL Proteins führen könnte. Anstelle von Bcl-xL könnte auch aus einer Vorläufer-RNA nach posttranskriptioneller Modifikation Bcl-xS gebildet worden sein, das hier nicht explizit experimentell gesucht wurde. Für Bcl-xS spricht, dass in Ba/F3-Zellen nach Butyrat-Behandlung Apoptose eintritt. Gegen Bcl-xS spricht allerdings, dass sich kein direkter apoptoseinduzierender Effekt durch Butyrat zeigt. Butyrat ist nämlich nicht in der Lage, bei gleichzeitiger Behandlung der Ba/F3-Zellen mit IL-3 oder EGF die überlebenssichernde Wirkung der Zytokine aufzuheben.

Als Voraussetzung für die hier experimentell durchgeführten molekularbiologischen Untersuchungen diente die Erkenntnis, *dass Butyrat nachweislich in der Lage ist, den bcl-x Promoter zu induzieren.*

Im Rahmen dieser Arbeit wurde ein 998bp langer Promoterabschnitt des bcl-x Gens unmittelbar oberhalb des Startcodons untersucht, um die Butyrat-abhängige Induktion des bcl-x Promoters genauer zu charakterisieren. Darüber hinaus wurde versucht, qualitative Aspekte der Promoterinduktion zu analysieren, d.h. Butyrat-responsive Regionen im bcl-x Promoter zu definieren und Transkriptionsfaktoren zu identifizieren, die an Protein-DNA Interaktionen mit dem bcl-x Promoter beteiligt sind.

Als experimentelles System wurde dafür die Ba/F3-Zelle (eine IL-3-abhängige pro-B-Zell-Linie) verwendet. **Mit Dosis-Wirkungsversuchen konnte bis zu einer Dosis von 3 mM Butyrat eine Induktionssteigerung des bcl-x Promoter nachgewiesen werden.** Höhere Dosen erbrachten keine fortschreitend stärkere Aktivierung, so dass für alle weiteren Versuche eine Standarddosis von 2 mM Butyrat festgelegt wurde.

Anschließend interessierte die Frage, ob es Bereiche im bcl-x Promoter gibt, die sensitiver auf eine Stimulation mit Butyrat reagieren als andere Regionen. Durch gezielte Verkürzung der Promotersequenz in 6 Teilabschnitte konnten Promoterregionen identifiziert und lokalisiert werden, die für die bcl-x Induktion durch Butyrat kritisch sind (Butyrat-responsive Elemente).

Die Induktionsversuche mit den verkürzten Promoterabschnitten (Deletionskonstrukte) zeigten, dass mindestens 111 Basenpaare oberhalb des ATG notwendig sind, um eine Induktion des bcl-x Promoters durch Butyrat nachweisen zu können. **Der Minimalpromoter für das bcl-x Gen liegt also im Bereich 111bp oberhalb des Translationsstartpunktes.** Diese Ergebnisse decken sich in etwa mit den von Tian et al. [88] beschriebenen Befunden, der von einem Minimalpromoter von 197bp ausgeht.

Durch weitere gezielte Induktionsversuche (LRA) mit den Promoter-Deletionskonstrukten konnten außerdem zwei Butyrat-responsive „Aktive Regionen“ des bcl-x Promoters nachgewiesen werden. Bei konstanter Stimulation mit 2mM Butyrat zeigte sich eine zunehmende Promoterinduktion mit steigender Promoterlänge, wobei in den Regionen zwischen 111 und 484bp (Aktive Region 1: AR1), sowie zwischen 622 und 998bp (Aktive Region 2: AR2) oberhalb des ATG ein jeweils signifikanter Anstieg der Induktion dargestellt werden konnte. **Die Aktive Region AR1 und die Aktive Region AR2 sind demzufolge die für die Transaktivierung relevanten Abschnitte im Bereich der ersten 1000bp des bcl-x Promoters.**

Bei vergleichender Betrachtung der bcl-x Genstruktur mit der entsprechenden Lokalisation der Aktiven Regionen 1 und 2 zeigt sich, dass **die Aktive Region 1 weitgehend mit dem Intron zwischen Exon Ia und Exon II übereinstimmt**, während die **Aktive Region 2 im Bereich des Introns zwischen Exon Ib und Exon Ia des bcl-x Promoters liegt**. In diesen beiden Regionen liegen auch die von Grillot et al. [51] beschriebenen Promotoren P1 und P2 (s. Abb. 6.1).

Weitere, für die Aktivität des Promoters relevante Regionen, die in dieser Arbeit nicht untersucht wurden, sind von MacCarthy-Morrogh et al. [50], Pecci A et al. [87] und von Tian et al. [88] im Bereich 1500 – 1800bp oberhalb des Translationsstartpunktes beschrieben worden. Pecci et al. identifizierten darüber hinaus auch noch Enhancerregionen im Bereich 2700 und 3400bp vor dem Startcodon ATG, die ebenfalls nicht Gegenstand der vorliegenden Arbeit sind.

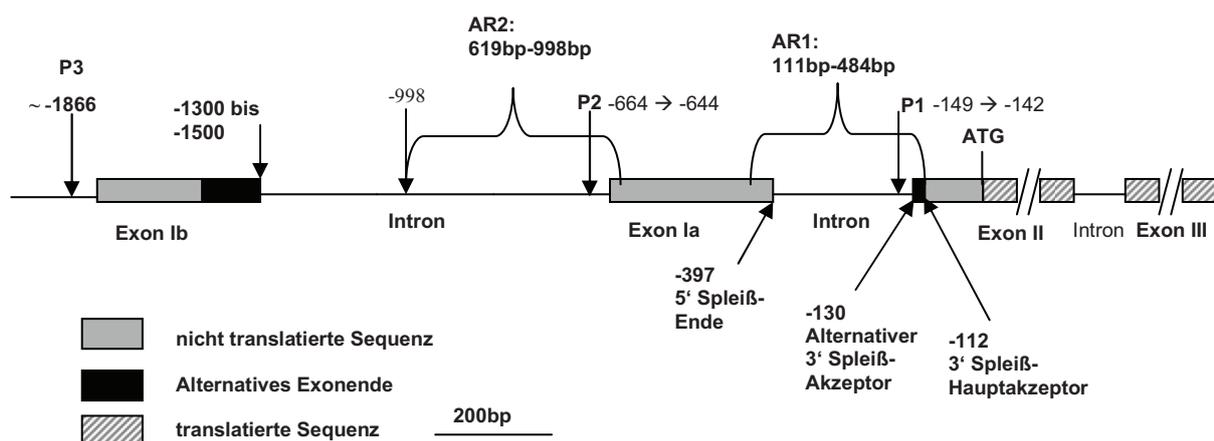


Abb. 6.1: Lokalisierung der Aktiven Region 1 und 2 in der DNA Sequenz des bcl-x Promoters mit Introns und Exons. P1, P2 und P3 sind Promoterregionen verschiedener bcl-x Transkriptionsprodukte

Um die Wirkung von Butyrat auf den bcl-x Promoter weiter zu spezifizieren, wurden die beiden aktiven Regionen AR1 und AR2 aus dem Promoter isoliert und einzeln analysiert. Dabei zeigte sich erstaunlicherweise, dass Butyrat auf AR2 alleine eine vergleichbare

Induktionswirkung hat wie auf die Gesamtsequenz von 998bp. Die Wirkung von Butyrat auf AR1 dagegen war nahezu halbiert, verglichen mit dem Gesamtpromoter bzw. AR2. Diese Ergebnisse sind vergleichbar mit den Untersuchungen von Tian et al. [88] und Grillot et al. [51], die zeigen, dass als Transkriptionsstartpunkt für erythroide Vorläuferzellen der Region im Bereich 640-660bp oberhalb des ATG die größte Bedeutung zukommt.

Ausgehend von den beschriebenen Wirkungen stellt sich die Frage nach dem *Mechanismus der Butyrat-induzierten Aktivierung des Promoters*.

Die Wirkung von Butyrat als Histondeacetylaseinhibitor kann hier vernachlässigt werden, da Plasmid-DNA für die Promoter-Induktionsversuche (LRA) verwendet wurde und hier eine Regulation durch das Acetylierungsmuster von Histonproteinen weitgehend ausgeschlossen werden kann.

Weitere Überlegungen, wie Butyrat auf den bcl-x Promoter wirken kann, führen zu der nahe liegenden Vorstellung, dass Butyrat Signalereignisse, die zur Aktivierung/Inaktivierung von Transkriptionsfaktoren führen, moduliert oder alternativ direkt Transkriptionsfaktoren beeinflusst.

Untersucht wurde deshalb zunächst der Einfluss von Butyrat auf die, in der Erythropoese beteiligten und, wie bereits zuvor erwähnt, inzwischen nachweislich in der Induktion des bcl-x Gens involvierten Transkriptionsfaktoren STAT5, NF-kappaB und AP-1. Erkenntnisse über *Wechselwirkungen von Butyrat mit oben genannten Transkriptionsfaktoren* liegen nur aus Zellsystemen vor, die wenig bis gar keinen Zusammenhang mit der Erythropoese haben, mit Ausnahme für STAT5.

In IL-3 abhängigen erythroiden Vorläuferzellen steigert Butyrat via STAT5 die gamma-Globin-Synthese, hemmt jedoch gleichzeitig die Zellproliferation [3]. Des Weiteren ist bekannt, dass Butyrat in Kolonkarzinomzellen AP-1 induzieren kann und dort Apoptose auslöst [5]. NF-kappaB kann in Monozyten bei chronisch entzündlichen Darmerkrankungen durch Butyrat induziert werden und durch eine konsekutive Reduktion des TNF-alpha Levels die Entzündungsreaktion reduzieren [45].

Um für die Aktivierung dieser Transkriptionsfaktoren durch Butyrat einen genauen Nachweis zu erbringen, wurden in der vorliegenden Arbeit Ba/F3-Zellen mit Butyrat stimuliert und anschließend die Zellkernextrakte präpariert. Mit Hilfe von Gelshiftassays konnten somit Rückschlüsse auf die durch Butyrat stimulierten Transkriptionsfaktoren gewonnen werden. Dabei zeigte sich, dass **für AP-1 eine frühe Induktion durch Butyrat** nach 15 Minuten Stimulation besteht, erkennbar an einer prominenten Bande im Polyacrylamidgel. Dieses Signal schwächt sich nach 60 Minuten wieder ab. **Anders verhält es sich bei NF-kappaB. Mit zunehmender Stimulationsdauer zeigt sich eine steigende Intensität der Bande im Gelshift.**

Im Gegensatz dazu konnte ein Nachweis von aktiviertem STAT5, einem ebenfalls für die Erythropoese wichtigen Transkriptionsfaktor, **in Ba/F3-Zellen nach Stimulation durch Butyrat mittels Gelshiftassays nicht erbracht werden**. Eine Butyrat-abhängige Aktivierung des für die Erythropoese wichtigen Transkriptionsfaktors STAT5, wie von Boosalis et al. [3] und Yamashita et al. [36] beschrieben, konnte in dieser Arbeit somit nicht bestätigt werden.

Die oben genannten Ergebnisse aus den EMSAs führen zu der Frage, ob in den aktiven Regionen AR1 und AR2 eine Beteiligung der Transkriptionsfaktoren AP-1 oder NF-kappaB nachgewiesen werden kann.

Dazu wurde sowohl für AR1 als auch für AR2 ein **computergestütztes Mapping der DNA-Sequenz** durchgeführt, um potentielle Transkriptionsfaktor-Bindungsstellen zu identifizieren. Für die Suche wurde die **Online-Datenbank Transfac** (www.gene-regulation.com) verwendet.

Aus einer Vielzahl der Transkriptionsfaktor-Bindungsstellen, die im Bereich von AR1 und AR2 gefunden werden konnten, wurde gezielt nach Bindungsstellen für die aus dem erythroiden System bekannten Transkriptionsfaktoren AP-1, NF-kappaB, STAT5, Ets und GATA1 gesucht.

Nach genauer Lokalisation und Identifikation einer theoretischen Bindungsstelle für NF-kappaB in AR1, sowie einer Bindungsstelle für AP-1 und von zwei Bindungsstellen für NFAT in AR2 wurden entsprechend DNA-Oligonukleotide abgeleitet. Diese beiden Oligonukleotide, ebenfalls als OligoAR1 und OligoAR2 benannt, repräsentieren nur einen Teil der Sequenz des bcl-x Promoters und spiegeln bei weitem nicht alle möglichen Transkriptionsfaktor-Bindungsstellen wider. Dies bleibt zusätzlichen Versuchsreihen vorbehalten, in denen der bcl-x Promoter auf die Existenz weiterer Bindungsstellen untersucht werden sollte.

Neben den oben beschriebenen Transkriptionsfaktoren AP-1 und NF-kappaB wurde auch nach dem aus der T-Zell-Aktivierung bekannten Transkriptionsfaktor NFAT gesucht. NFAT wurde deshalb in die Untersuchung mit einbezogen, weil es strukturelle Verwandtschaft zu NF-kappaB hat und als NFAT-Dimer an NF-kappaB-Bindungsstellen angreifen kann. Auch kann NFAT mit AP-1 einen gemeinsamen, synergistischen Komplex zur Transaktivierung bestimmter Gene bilden [103].

Das Oligonukleotid AR1 (entsprechend der Sequenz 370 bis 414bp oberhalb des Translationsstartpunktes) **zeigt in den Gelshiftassays keine Reaktion, die für ein Bindungsereignis zwischen einem der untersuchten Transkriptionsfaktoren und der DNA sprechen würden**. Allerdings nimmt unter Butyrat die Intensität der dargestellten Banden im Gelshift mit zunehmender Expositionsdauer zu. Somit kann von einer im

Zeitverlauf zunehmenden Bindung von unbekanntem Transkriptionsfaktoren ausgegangen werden.

Für den fehlenden Nachweis spezifischer Bindungsereignisse mittels Supershift am OligoAR1 können verschiedene Ursachen existieren. Zum einen können andere, hier nicht untersuchte Transkriptionsfaktoren eine Rolle spielen. Andererseits spiegelt Oligo AR1 nur einen kleinen Ausschnitt der aktiven Region AR1 wieder. Des Weiteren hat AR1, gemäß den Ergebnissen der LRAs, eher eine untergeordnete Bedeutung für die Induktion des bcl-x Promoters durch Butyrat. Angesichts der Vielzahl der potentiellen Transkriptionsfaktor-Bindungsstellen in AR1 sind zusätzliche Untersuchungen über Bindungsereignisse zwischen weiteren Transkriptionsfaktoren und der AR1-DNA nötig, um weitere Aufschlüsse über die Bedeutung von AR1 zu bekommen.

In den Gelshiftassays für OligoAR2 konnte ebenso wie bei OligoAR1 unter Butyrat eine stärkere Intensität der Banden mit zunehmender Stimulationsdauer gesehen werden.

Durch Zugabe eines spezifischen Antikörpers **konnte hier der Transkriptionsfaktor NFAT im Gelshiftassay identifiziert werden**. Bei den NFAT Bindungsstellen im OligoAR2 handelt es sich um eine Variante der Core-Sequenz für NFAT (5' GAGA 3'), die gemäss Datenbank Transfac nur ca. 4% der nachgewiesenen NFAT Bindungsstellen ausmacht. Die klassische NFAT Bindungsstelle lautet 5' GAAA 3'.

In Wettbewerbsversuchen mit unmarkiertem Oligo AR2 im Überschuss (Abbildung 5.7.2.c) wurde das Signal des Supershifts für NFAT ausgelöscht. Somit wurde das Bindungsereignis von NFAT mit Oligo AR2 bestätigt.

Bisher ist in der Literatur kein Effekt von Butyrat auf NFAT-Aktivitäten in hämatopoetischen Vorläuferzellen beschrieben. Von NFAT weiss man, dass es in T-Zellen nach Aktivierung des T-Zell-Rezeptors eine Induktion des bcl-2-Gens auslösen kann [104]. Jetzt konnte jedoch erstmals eine Butyrat-abhängige Induktion des Transkriptionsfaktors NFAT nachgewiesen werden, die ein Bindungsereignis von NFAT am bcl-x Promoter zur Folge hat. Dies steht allerdings im Gegensatz zu den von Diakos et al. [44] publizierten Ergebnissen. Diakos beschrieb für Butyrat eine immunsuppressive Wirkung an T-Zellen, indem Butyrat die IL-2-Genexpression durch verringerte NFAT Aktivität hemmen konnte. Als Erklärung wurde eine verringerte NFAT-DNA-Bindungsaktivität bzw. eine gesteigerte Translokation des phosphorylierten Transkriptionsfaktors vom Zellkern ins Zytosol postuliert. Bindungsereignisse für die Transkriptionsfaktoren NF-kappaB, Ets und AP-1 (jun) mit OligoAR2 konnten in den Gelshiftassays ebenfalls wie bei OligoAR1 nicht nachgewiesen werden.

Eine mögliche gemeinsame Transaktivierung des Oligos AR2 durch einen NFAT-AP-1 Komplex ist in diesem Fall ebenso sehr unwahrscheinlich, da im Gelshiftassay nach Zugabe

eines AP-1-spezifischen Antiköpers keine Veränderung der elektrophoretischen Mobilität der Banden zu erkennen ist (Abbildung 5.7.2.b).

Um die Bedeutung der identifizierten NFAT Bindungsstellen im Oligonukleotid AR2 zu analysieren, **wurde ein Oligonukleotid Muta2 synthetisiert, in welchem die NFAT Bindungsstellen durch Punktmutation gezielt verändert wurden.**

Erneut wurden EMSAs mit OligoAR2 durchgeführt, die den Supershift für NFAT zweifelsfrei bestätigen. Oligo Muta2, das die Mutation beider NFAT Bindungsstellen trägt, wurde als heterologer Kompetitor in dieser Versuchsreihe eingesetzt. Oligo Muta2 konnte den bekannten Supershift (Bindungsereignis zwischen NFAT und OligoAR2) nicht auslöschen. **Dies zeigt, dass nach gezielter Veränderung der NFAT-Bindungsstellen im Oligo Muta2, keine funktionellen Bindungsereignisse mehr detektierbar sind.**

In einem weiteren Schritt wurde die Relevanz von NFAT, aber auch von AP-1 für die Induktion des bcl-x Promoters durch Butyrat analysiert. Es wurden 4 modifizierte Oligonukleotide (Oligo Muta1-4) in Anlehnung an die Sequenz des OligoAR2 synthetisiert, **in denen die Core-Sequenzen dieser Transkriptionsfaktor-Bindungsstellen durch Punktmutagenese gezielt verändert wurde.** Die Mutationen sind in Kapitel 5.8 definiert.

Die mutierten Oligos wurden in Form von Singlestrand-DNA als Mutations- tragende Primer für die PCR-Mutagenese verwendet. Somit konnten die in die Oligos eingefügten Mutationen auch in den bcl-x Promoter eingefügt werden. Es resultierten vier mutierte bcl-x Promotoren, die in den Luziferase-Reportergenvektor kloniert wurden (pGL3 Muta1 – 4). Um zu klären, welchen Einfluss die erzeugten Mutationen der Transkriptionsfaktor-Bindungsstellen auf die Induktion des bcl-x Promoters nehmen, wurden wiederum LRAs durchgeführt.

Die Aktivierung des bcl-x Promoters nach Stimulation mit 2mM Butyrat in LRAs wird durch die eingefügten Mutationen der Transkriptionsfaktor-Bindungsstellen für AP-1 und NFAT jedoch nicht signifikant verringert. Möglicherweise sind andere, in der vorliegenden Arbeit nicht berücksichtigte Transkriptionsfaktoren für die Induktion mitverantwortlich. Der für die Mutationsanalyse ausgewählte Promoterabschnitt könnte zu klein sein, um signifikante Veränderungen der Transaktivierung zu verursachen. Unter Umständen ist die Auswahl nur eines Transkriptionsfaktors zu gering, um den komplexen Induktionsmechanismus des bcl-x Promoters durch Butyrat zu erklären.

Es bleibt allerdings unklar, ob Butyrat einen direkten Effekt auf die Transkriptionsfaktoren hat oder indirekt über Modulation von Signalwegen oder Enzymen die Transkriptionsfaktoren aktiviert. Um zu klären, ob auch Tyrosinkinase bei den Butyrat-abhängigen Effekten beteiligt sind wurden Kotransfektionen mit cDNAs für JAK2 und Lyn durchgeführt. Beide Tyrosinkinase sind Enzyme, die unmittelbar an der Signalübermittlung

in der Hämato- und Erythropoese beteiligt sind. Nach Liganden-vermittelter Rezeptoraktivierung werden durch die intrazelluläre Rezeptordomäne von Zytokinrezeptoren Tyrosinkinase rekrutiert und aktiviert. Die aktivierten Kinasen wiederum phosphorylieren z.B. Tyrosinreste der intrazellulären Rezeptordomäne oder von Transkriptionsfaktoren. Somit wird Adapterproteinen, weiteren Kinasen und Transkriptionsfaktoren ermöglicht, an den phosphorylierten Rezeptor anzudocken und Signale über Kaskaden (MAPK-Signalweg, JAK-STAT-Signalweg) ins Zellinnere bzw. in den Zellkern weiterzuleiten.

Für Butyrat sind nur vereinzelt Effekte auf derartige Modulatorproteine bekannt. So beschrieben Hirsch et al. [101], dass Butyrat in Kolonkarzinomzellen einen inhibierenden Effekt auf die Aktivität der src-Kinasen (u.a. Lyn) hat und somit die Zellproliferation hemmt. Yamashita et al. [36] konnten in erythropoetischen Zellen eine Butyrat-abhängige Aktivierung des JAK2-STAT5 Signalweges nachweisen.

In den hier durchgeführten Untersuchungen zeigte sich bei gleichzeitiger Kotransfektion von cDNA für die Kinasen Lyn oder JAK2 eine signifikante Steigerung der Butyrat-abhängigen Aktivierung des bcl-x Promoters. Diese Ergebnisse machen die Beteiligung signalmodulierender Enzyme an der Induktion des bcl-x Promoters durch Butyrat sehr wahrscheinlich. Somit ist in der Butyrat-abhängigen Signaltransduktion eine indirekte Modulation von Transkriptionsfaktoren durch Tyrosinkinase nahe liegend. Ob Butyrat in Ba/F3-Zellen z.B. den JAK-STAT Weg aktiviert oder eine Stimulation des Transkriptionsfaktors NF-kappaB durch Lyn bewirkt, könnte durch weitere Versuche, die die Protein-Protein-Interaktion untersuchen, analysiert werden.

Aufgrund der gesteigerten Induktion des bcl-x Promoters nach Kotransfektion der Tyrosinkinase Jak2 und Lyn kann man postulieren, dass Jak2 und Lyn die Signalproteine, welche an der Induktion des bcl-x Promoters beteiligt sind, modulieren.

Für Lyn ist z.B. bei chronisch myeloischer Leukämie eine Beteiligung an antiapoptotischen Signaltransduktionskaskaden gezeigt worden [102]. JAK2 ist, wie seit längerem bekannt, in der Signaltransduktionskaskade der Erythropoese / Zelldifferenzierung involviert [36], [77].

Zusammenfassend ist aus den vorliegenden Ergebnissen der Schluss zu ziehen, dass Butyrat über den Einfluss auf Signalwege mit Beteiligung von Transkriptionsfaktoren und Tyrosinkinase den bcl-x Promoter aktiviert und dadurch die auf zellulärer Ebene bekannten Effekte wie z.B. Proliferationshemmung und Apoptose bewirkt.

Aufbauend auf dieser Arbeit können weitere Untersuchungen dazu beitragen, die zellulären Effekte von Butyrat auf molekularer Ebene zu analysieren und intrazelluläre Vorgänge zu verstehen. Dazu bietet sich an, angesichts der Vielzahl von Transkriptionsfaktor-Bindungsstellen im Bereich der aktiven Regionen des bcl-x Promoters, gezielt weitere Bindungspartner durch massenspektrometrische Verfahren zu identifizieren.

7. Zusammenfassung

Ein Fokus der aktuellen medizinischen Forschung liegt auf der gezielten Beeinflussung zellulärer Aktivitäten wie Mitogenese, Zell-Differenzierung und Apoptose. Dabei steht die Suche nach entsprechenden Substanzen und ihrem molekularen Wirkungsmechanismus im Vordergrund der experimentellen Untersuchungen.

So wird auch Butyrat als Produkt der Fermentation von Ballaststoffen im Dickdarm in Bezug auf seinen Einfluss auf verschiedene Zelltypen untersucht.

Wie bereits bekannt, hemmt Butyrat in hämatopoetischen Vorläuferzellen die Proliferation und induziert die erythroide Differenzierung.

In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass Butyrat in hohen Konzentrationen die Zellproliferation in Ba/F3-Zellen zytokinunabhängig hemmt. Dies ist vereinbar mit einem schon zuvor mehrfach postulierten Butyrat-abhängigen G0-G1-Zellzyklusarrest. Der Mechanismus dieses Zellzyklusarrests wird jedoch kontrovers diskutiert.

Butyrat löst in Ba/F3-Zellen weder Apoptose aus, noch entfaltet es antiapoptotische Aktivitäten. Die bisher publizierten apoptoseinduzierenden Effekte von Butyrat wurden in erster Linie in Kolonkarzinomzellen und anderen Malignomen beschrieben, konnten jedoch hier an den hier verwendeten Zellen nicht bestätigt werden.

Mit dem Nachweis von *bcl-x* mRNA konnte bestätigt werden, dass Butyrat in Ba/F3-Zellen die Expression des *bcl-x* Gens induziert.

Anschließend wurde evaluiert, ob, wie bereits in Kolonkarzinomzellen und anderen Zelltypen, das Apoptose-regulierende *bcl-x* Gen auch in hämatopoetischen Zellen in die Regulation von Mitogenese und Überleben involviert ist. In diesem Zusammenhang wurde hier *die Butyrat-abhängige Aktivierung des bcl-x Promoters* in hämatopoetischen Vorläuferzellen untersucht.

Es konnte eine dosisabhängige Induktionssteigerung des *bcl-x* Promoters bis zu einer Dosis von 3mM Butyrat nachgewiesen werden. Anhand von verkürzten Promoterkonstrukten konnte anschließend die Butyrat-abhängige Wirkung im Bereich des *bcl-x* Promoters lokalisiert werden. Unterhalb einer Promoterlänge von 111bp oberhalb des Translationsstartpunktes konnte keine Promoterinduktion mehr nachgewiesen werden. Der Promoterabschnitt von 111bp oberhalb des Translationsstartpunktes konnte somit als Minimalpromoter identifiziert werden.

Des Weiteren konnten mit den verkürzten Promoterkonstrukten zwei Butyrat-responsive Regionen des *bcl-x* Promoters identifiziert werden, zum einen im Bereich von 111bp bis 484bp („Aktive Region 1“ = AR1) und im Bereich 622bp bis 998bp („Aktive Region2“ = AR2)

oberhalb des Translationsstartpunktes. Der Vergleich, der für die Transaktivierung des bcl-x Promoters relevanten Abschnitte AR1 und AR2 mit der von Grillot et al. [51] postulierten Promoterorganisation zeigt, dass AR1 mit dem Promoter P1 im Bereich des Introns zwischen Exon Ia und Exon II übereinstimmt, während AR2 mit dem Promoter P2 im Bereich des Introns zwischen Exon Ib und Exon Ia des bcl-x Promoters korreliert.

Die Analyse von Faktoren, die an der Transaktivierung des bcl-x Promoters beteiligt sind, zeigte, dass Butyrat in Ba/F3-Zellen die in der Hämatopoese relevanten Transkriptionsfaktoren AP-1 und NF-kappaB, nicht jedoch STAT5 aktiviert.

Um die Butyrat-abhängige Induktion des bcl-x Promoters qualitativ zu evaluieren, wurden die aktiven Regionen AR1 und AR2 genauer analysiert. Dazu wurden die entsprechenden Butyrat-sensitiven Regionen in den Reportergenvektor pGL-3basic kloniert, um die Transaktivierung durch Butyrat zu testen (LRA). Es konnte gezeigt werden, dass AR2 nach Butyrat-Stimulation das gleiche transaktivierende Potential besitzt wie die komplette Promotersequenz. AR1 alleine zeigte nach Butyrat-abhängiger Stimulation eine im Vergleich zum kompletten Promoter eine um die Hälfte verringerte Transaktivierung

In DNA-Protein-Bindungsassays (EMSA) von AR1 und AR2 konnte für den ausgewählten 33bp umfassenden Abschnitt aus AR2 eine Interaktion mit dem Transkriptionsfaktors NFAT nachgewiesen werden. Für den 45bp langen Abschnitt aus AR1 konnten keine Interaktionen mit den untersuchten Transkriptionsfaktoren nachgewiesen werden.

Durch Mutagenese wurde ein Promoter kloniert, dem diese NFAT Bindungsstelle aus AR2 fehlt. Mittels LRAs konnte zwischen mutiertem Promoter und nativen Promoter kein Unterschied in der Induzierbarkeit durch Butyrat gefunden werden. In EMSAs mit dem NFAT-mutierten Promoterabschnitt konnte gezeigt werden, dass durch die eingefügte Mutation das Bindungsereignis zwischen DNA und NFAT ausgelöscht wird.

In Versuchen mit Überexpression der Tyrosinkinasen Jak2 und Lyn, die an der Aktivierung der Transkriptionsfaktoren STAT5 (JAK2) und NF-kappaB (Lyn) beteiligt sind, konnte eine Verstärkung der Butyrat-abhängigen Aktivierung des bcl-x Promoters gezeigt werden.

Weitere Untersuchungen zur Evaluation der Beteiligung der Tyrosinkinasen einerseits, sowie RNA (bcl-xL, bcl-xS) und Proteinspezifisierung (Bcl-xL, Bcl-xS, Transkriptionsfaktoranalyse, Massenspektrometrie) andererseits könnten zusätzliche Erkenntnisse über den Zusammenhang der beschriebenen zellulären Effekte von Butyrat in Ba/F3-Zellen und dem zugrunde liegenden molekularen Mechanismus bringen.

8. Literaturverzeichnis

1. Litvak, D.A., et al., *Butyrate-induced differentiation of Caco-2 cells is associated with apoptosis and early induction of p21Waf1/Cip1 and p27Kip1*. *Surgery*, 1998. **124**(2): p. 161-9; discussion 169-70.
2. Kerr, J.F., A.H. Wyllie, and A.R. Currie, *Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics*. *Br J Cancer*, 1972. **26**(4): p. 239-57.
3. Boosalis, M.S., et al., *Short-chain fatty acid derivatives stimulate cell proliferation and induce STAT-5 activation*. *Blood*, 2001. **97**(10): p. 3259-67.
4. Marks, P.A., V.M. Richon, and R.A. Rifkind, *Histone deacetylase inhibitors: inducers of differentiation or apoptosis of transformed cells*. *J Natl Cancer Inst*, 2000. **92**(15): p. 1210-6.
5. Mandal, M., et al., *Butyric acid induces apoptosis by up-regulating Bax expression via stimulation of the c-Jun N-terminal kinase/activation protein-1 pathway in human colon cancer cells*. *Gastroenterology*, 2001. **120**(1): p. 71-8.
6. Silva, M., et al., *Erythropoietin can promote erythroid progenitor survival by repressing apoptosis through Bcl-XL and Bcl-2*. *Blood*, 1996. **88**(5): p. 1576-82.
7. Gregoli, P.A. and M.C. Bondurant, *The roles of Bcl-X(L) and apopain in the control of erythropoiesis by erythropoietin*. *Blood*, 1997. **90**(2): p. 630-40.
8. Steller, H., *Mechanisms and genes of cellular suicide*. *Science*, 1995. **267**(5203): p. 1445-9.
9. Shao, Y., et al., *Apoptotic and autophagic cell death induced by histone deacetylase inhibitors*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2004. **101**(52): p. 18030-5.
10. Roy, M.J., et al., *In vitro studies on the inhibition of colon cancer by butyrate and carnitine*. *Nutrition*, 2009. **25**(11-12): p. 1193-201.
11. Pajak, B., B. Gajkowska, and A. Orzechowski, *Sodium butyrate sensitizes human colon adenocarcinoma COLO 205 cells to both intrinsic and TNF-alpha-dependent extrinsic apoptosis*. *Apoptosis*, 2009. **14**(2): p. 203-17.
12. Ruellemele, F.M., et al., *Butyrate induced Caco-2 cell apoptosis is mediated via the mitochondrial pathway*. *Gut*, 2003. **52**(1): p. 94-100.
13. Wang, Y.F., et al., *Sodium butyrate induces apoptosis and cell cycle arrest in primary effusion lymphoma cells independently of oxidative stress and p21(CIP1/WAF1) induction*. *Mol Cell Biochem*, 2006. **285**(1-2): p. 51-9.
14. Kurita-Ochiai, T., K. Ochiai, and K. Fukushima, *Butyric-acid-induced apoptosis in murine thymocytes and splenic T- and B-cells occurs in the absence of p53*. *J Dent Res*, 2000. **79**(12): p. 1948-54.
15. Huang, H.M. and J.C. Liu, *c-Jun blocks cell differentiation but not growth inhibition or apoptosis of chronic myelogenous leukemia cells induced by STI571 and by histone deacetylase inhibitors*. *J Cell Physiol*, 2009. **218**(3): p. 568-74.
16. Chopin, V., et al., *P21(WAF1/CIP1) is dispensable for G1 arrest, but indispensable for apoptosis induced by sodium butyrate in MCF-7 breast cancer cells*. *Oncogene*, 2004. **23**(1): p. 21-9.
17. Litvak, D.A., et al., *Induction of apoptosis in human gastric cancer by sodium butyrate*. *Anticancer Res*, 2000. **20**(2A): p. 779-84.
18. Natoni, F., et al., *Sodium butyrate sensitises human pancreatic cancer cells to both the intrinsic and the extrinsic apoptotic pathways*. *Biochim Biophys Acta*, 2005. **1745**(3): p. 318-29.
19. Emanuele, S., et al., *Sodium butyrate induces apoptosis in human hepatoma cells by a mitochondria/caspase pathway, associated with degradation of beta-catenin, pRb and Bcl-XL*. *Eur J Cancer*, 2004. **40**(9): p. 1441-52.
20. Cao, X.X., et al., *Histone deacetylase inhibitor downregulation of bcl-xl gene expression leads to apoptotic cell death in mesothelioma*. *Am J Respir Cell Mol Biol*, 2001. **25**(5): p. 562-8.

21. Muhlethaler-Mottet, A., et al., *Complex molecular mechanisms cooperate to mediate histone deacetylase inhibitors anti-tumour activity in neuroblastoma cells*. Mol Cancer, 2008. **7**: p. 55.
22. Marks, P.A. and X. Jiang, *Histone deacetylase inhibitors in programmed cell death and cancer therapy*. Cell Cycle, 2005. **4**(4): p. 549-51.
23. Coradini, D., et al., *Sodium butyrate modulates cell cycle-related proteins in HT29 human colonic adenocarcinoma cells*. Cell Prolif, 2000. **33**(3): p. 139-46.
24. Davie, J.R., *Inhibition of histone deacetylase activity by butyrate*. J Nutr, 2003. **133**(7 Suppl): p. 2485S-2493S.
25. Vaziri, C., L. Stice, and D.V. Faller, *Butyrate-induced G1 arrest results from p21-independent disruption of retinoblastoma protein-mediated signals*. Cell Growth Differ, 1998. **9**(6): p. 465-74.
26. Kruh, J., N. Defer, and L. Tichonicky, *[Molecular and cellular action of butyrate]*. C R Seances Soc Biol Fil, 1992. **186**(1-2): p. 12-25.
27. Orchel, A., et al., *Butyrate-induced differentiation of colon cancer cells is PKC and JNK dependent*. Dig Dis Sci, 2005. **50**(3): p. 490-8.
28. Kim, S.N., H.Y. Choi, and Y.K. Kim, *Regulation of adipocyte differentiation by histone deacetylase inhibitors*. Arch Pharm Res, 2009. **32**(4): p. 535-41.
29. Haumaitre, C., O. Lenoir, and R. Scharfmann, *Histone deacetylase inhibitors modify pancreatic cell fate determination and amplify endocrine progenitors*. Mol Cell Biol, 2008. **28**(20): p. 6373-83.
30. Bhatia, H., et al., *Short-chain fatty acid-mediated effects on erythropoiesis in primary definitive erythroid cells*. Blood, 2009. **113**(25): p. 6440-8.
31. Pace, B.S., Q. Li, and G. Stamatoyannopoulos, *In vivo search for butyrate responsive sequences using transgenic mice carrying A gamma gene promoter mutants*. Blood, 1996. **88**(3): p. 1079-83.
32. Ikuta, T., et al., *Alterations in protein-DNA interactions in the gamma-globin gene promoter in response to butyrate therapy*. Blood, 1998. **92**(8): p. 2924-33.
33. Gabbianelli, M., et al., *Hemoglobin switching in unicellular erythroid culture of sibling erythroid burst-forming units: kit ligand induces a dose-dependent fetal hemoglobin reactivation potentiated by sodium butyrate*. Blood, 2000. **95**(11): p. 3555-61.
34. Perrine, S.P., et al., *Induction of fetal globin in beta-thalassemia: Cellular obstacles and molecular progress*. Ann N Y Acad Sci, 2005. **1054**: p. 257-65.
35. Yang, J., et al., *Sodium butyrate induces transcription from the G alpha(i2) gene promoter through multiple Sp1 sites in the promoter and by activating the MEK-ERK signal transduction pathway*. J Biol Chem, 2001. **276**(28): p. 25742-52.
36. Yamashita, T., et al., *Differentiation inducers modulate cytokine signaling pathways in a murine erythroleukemia cell line*. Cancer Res, 1998. **58**(3): p. 556-61.
37. Chenais, B., *Requirement of GATA-1 and p45 NF-E2 expression in butyric acid-induced erythroid differentiation*. Biochem Biophys Res Commun, 1998. **253**(3): p. 883-6.
38. Rubio, M.A., et al., *Granulocyte-macrophage colony-stimulating factor, phorbol ester, and sodium butyrate induce the CD11c integrin gene promoter activity during myeloid cell differentiation*. Blood, 1995. **86**(10): p. 3715-24.
39. Dai, Y., M. Rahmani, and S. Grant, *An intact NF-kappaB pathway is required for histone deacetylase inhibitor-induced G1 arrest and maturation in U937 human myeloid leukemia cells*. Cell Cycle, 2003. **2**(5): p. 467-72.
40. Riggs, M.G., et al., *n-Butyrate causes histone modification in HeLa and Friend erythroleukaemia cells*. Nature, 1977. **268**(5619): p. 462-4.
41. Van Lint, C., S. Emiliani, and E. Verdin, *The expression of a small fraction of cellular genes is changed in response to histone hyperacetylation*. Gene Expr, 1996. **5**(4-5): p. 245-53.
42. Grunstein, M., *Histone acetylation in chromatin structure and transcription*. Nature, 1997. **389**(6649): p. 349-52.
43. Annunziato, A.T., et al., *Treatment with sodium butyrate inhibits the complete condensation of interphase chromatin*. Chromosoma, 1988. **96**(2): p. 132-8.

44. Diakos, C., et al., *Novel mode of interference with nuclear factor of activated T-cells regulation in T-cells by the bacterial metabolite n-butyrate*. J Biol Chem, 2002. **277**(27): p. 24243-51.
45. Segain, J.P., et al., *Butyrate inhibits inflammatory responses through NFkappaB inhibition: implications for Crohn's disease*. Gut, 2000. **47**(3): p. 397-403.
46. Tsujimoto, Y., et al., *Cloning of the chromosome breakpoint of neoplastic B cells with the t(14;18) chromosome translocation*. Science, 1984. **226**(4678): p. 1097-9.
47. Pegoraro, L., et al., *A 14;18 and an 8;14 chromosome translocation in a cell line derived from an acute B-cell leukemia*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1984. **81**(22): p. 7166-70.
48. Habens, F., et al., *Distinct promoters mediate constitutive and inducible Bcl-XL expression in malignant lymphocytes*. Oncogene, 2007. **26**(13): p. 1910-9.
49. Motoyama, N., et al., *bcl-x prevents apoptotic cell death of both primitive and definitive erythrocytes at the end of maturation*. J Exp Med, 1999. **189**(11): p. 1691-8.
50. MacCarthy-Morrogh, L., et al., *Identification of a novel human BCL-X promoter and exon*. Oncogene, 2000. **19**(48): p. 5534-8.
51. Grillot, D.A., et al., *Genomic organization, promoter region analysis, and chromosome localization of the mouse bcl-x gene*. J Immunol, 1997. **158**(10): p. 4750-7.
52. Boise, L.H., et al., *bcl-x, a bcl-2-related gene that functions as a dominant regulator of apoptotic cell death*. Cell, 1993. **74**(4): p. 597-608.
53. Yang, X.F., G.F. Weber, and H. Cantor, *A novel Bcl-x isoform connected to the T cell receptor regulates apoptosis in T cells*. Immunity, 1997. **7**(5): p. 629-39.
54. Gonzalez-Garcia, M., et al., *bcl-XL is the major bcl-x mRNA form expressed during murine development and its product localizes to mitochondria*. Development, 1994. **120**(10): p. 3033-42.
55. Fang, W., et al., *Cloning and molecular characterization of mouse bcl-x in B and T lymphocytes*. J Immunol, 1994. **153**(10): p. 4388-98.
56. Ban, J., et al., *Identification of a human cDNA encoding a novel Bcl-x isoform*. Biochem Biophys Res Commun, 1998. **248**(1): p. 147-52.
57. Tsujimoto, Y. and S. Shimizu, *VDAC regulation by the Bcl-2 family of proteins*. Cell Death Differ, 2000. **7**(12): p. 1174-81.
58. Chang, B.S., et al., *The BH3 domain of Bcl-x(S) is required for inhibition of the antiapoptotic function of Bcl-x(L)*. Mol Cell Biol, 1999. **19**(10): p. 6673-81.
59. Petros, A.M., E.T. Olejniczak, and S.W. Fesik, *Structural biology of the Bcl-2 family of proteins*. Biochim Biophys Acta, 2004. **1644**(2-3): p. 83-94.
60. Minn, A.J., et al., *Bcl-x(L) forms an ion channel in synthetic lipid membranes*. Nature, 1997. **385**(6614): p. 353-7.
61. Chang, B.S., et al., *Identification of a novel regulatory domain in Bcl-X(L) and Bcl-2*. EMBO J, 1997. **16**(5): p. 968-77.
62. Sedlak, T.W., et al., *Multiple Bcl-2 family members demonstrate selective dimerizations with Bax*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1995. **92**(17): p. 7834-8.
63. Sattler, M., et al., *Structure of Bcl-xL-Bak peptide complex: recognition between regulators of apoptosis*. Science, 1997. **275**(5302): p. 983-6.
64. Cheng, E.H., et al., *BCL-2, BCL-X(L) sequester BH3 domain-only molecules preventing BAX- and BAK-mediated mitochondrial apoptosis*. Mol Cell, 2001. **8**(3): p. 705-11.
65. Korsmeyer, S.J., et al., *Pro-apoptotic cascade activates BID, which oligomerizes BAK or BAX into pores that result in the release of cytochrome c*. Cell Death Differ, 2000. **7**(12): p. 1166-73.
66. Degterev, A., M. Boyce, and J. Yuan, *The channel of death*. J Cell Biol, 2001. **155**(5): p. 695-8.
67. Vander Heiden, M.G., et al., *Bcl-xL promotes the open configuration of the voltage-dependent anion channel and metabolite passage through the outer mitochondrial membrane*. J Biol Chem, 2001. **276**(22): p. 19414-9.

68. Shimizu, S., et al., *Prevention of hypoxia-induced cell death by Bcl-2 and Bcl-xL*. Nature, 1995. **374**(6525): p. 811-3.
69. Didichenko, S.A., et al., *IL-3 induces a Pim1-dependent antiapoptotic pathway in primary human basophils*. Blood, 2008. **112**(10): p. 3949-58.
70. Lotem, J. and L. Sachs, *Regulation of bcl-2, bcl-XL and bax in the control of apoptosis by hematopoietic cytokines and dexamethasone*. Cell Growth Differ, 1995. **6**(6): p. 647-53.
71. Masuda, A., et al., *Interleukin-15 prevents mouse mast cell apoptosis through STAT6-mediated Bcl-xL expression*. J Biol Chem, 2001. **276**(28): p. 26107-13.
72. Karl, E., et al., *Unidirectional crosstalk between Bcl-xL and Bcl-2 enhances the angiogenic phenotype of endothelial cells*. Cell Death Differ, 2007. **14**(9): p. 1657-66.
73. Schulze-Bergkamen, H., et al., *Bcl-x(L) and Myeloid cell leukaemia-1 contribute to apoptosis resistance of colorectal cancer cells*. World J Gastroenterol, 2008. **14**(24): p. 3829-40.
74. Lee, H.H., et al., *NF-kappaB-mediated up-regulation of Bcl-x and Bfl-1/A1 is required for CD40 survival signaling in B lymphocytes*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1999. **96**(16): p. 9136-41.
75. Sevilla, L., et al., *Bcl-XL expression correlates with primary macrophage differentiation, activation of functional competence, and survival and results from synergistic transcriptional activation by Ets2 and PU.1*. J Biol Chem, 2001. **276**(21): p. 17800-7.
76. Bittorf, T., et al., *Activation of STAT5 during EPO-directed suppression of apoptosis*. Cell Signal, 2000. **12**(1): p. 23-30.
77. Bittorf, T., et al., *Requirement for JAK2 in erythropoietin-induced signalling pathways*. Cell Signal, 1997. **9**(1): p. 85-9.
78. Silva, M., et al., *Erythropoietin can induce the expression of bcl-x(L) through Stat5 in erythropoietin-dependent progenitor cell lines*. J Biol Chem, 1999. **274**(32): p. 22165-9.
79. Dumon, S., et al., *IL-3 dependent regulation of Bcl-xL gene expression by STAT5 in a bone marrow derived cell line*. Oncogene, 1999. **18**(29): p. 4191-9.
80. Poindessous-Jazat, V., Y. Augery-Bourget, and J. Robert-Lezenes, *C-Jun modulates apoptosis but not terminal cell differentiation in murine erythroleukemia cells*. Leukemia, 2002. **16**(2): p. 233-43.
81. Jacobs-Helber, S.M., et al., *Role of JunB in erythroid differentiation*. J Biol Chem, 2002. **277**(7): p. 4859-66.
82. Jacobs-Helber, S.M., et al., *AP1 regulation of proliferation and initiation of apoptosis in erythropoietin-dependent erythroid cells*. Mol Cell Biol, 1998. **18**(7): p. 3699-707.
83. Bittorf, T., et al., *Activation of the transcription factor NF-kappaB by the erythropoietin receptor: structural requirements and biological significance*. Cell Signal, 2001. **13**(9): p. 673-81.
84. Chen, C., L.C. Edelstein, and C. Gelinas, *The Rel/NF-kappaB family directly activates expression of the apoptosis inhibitor Bcl-x(L)*. Mol Cell Biol, 2000. **20**(8): p. 2687-95.
85. Gregory, T., et al., *GATA-1 and erythropoietin cooperate to promote erythroid cell survival by regulating bcl-xL expression*. Blood, 1999. **94**(1): p. 87-96.
86. Yu, Y.L., et al., *MAPK-mediated phosphorylation of GATA-1 promotes Bcl-XL expression and cell survival*. J Biol Chem, 2005. **280**(33): p. 29533-42.
87. Pecci, A., et al., *Promoter choice influences alternative splicing and determines the balance of isoforms expressed from the mouse bcl-X gene*. J Biol Chem, 2001. **276**(24): p. 21062-9.
88. Tian, C., P. Gregoli, and M. Bondurant, *The function of the bcl-x promoter in erythroid progenitor cells*. Blood, 2003. **101**(6): p. 2235-42.
89. Palacios, R. and M. Steinmetz, *Il-3-dependent mouse clones that express B-220 surface antigen, contain Ig genes in germ-line configuration, and generate B lymphocytes in vivo*. Cell, 1985. **41**(3): p. 727-34.

90. Ymer, S., et al., *Constitutive synthesis of interleukin-3 by leukaemia cell line WEHI-3B is due to retroviral insertion near the gene*. *Nature*, 1985. **317**(6034): p. 255-8.
91. Herrmann, M., et al., *A rapid and simple method for the isolation of apoptotic DNA fragments*. *Nucleic Acids Res*, 1994. **22**(24): p. 5506-7.
92. Saiki, R.K., et al., *Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase*. *Science*, 1988. **239**(4839): p. 487-91.
93. Sanger, F., S. Nicklen, and A.R. Coulson, *DNA sequencing with chain-terminating inhibitors*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1977. **74**(12): p. 5463-7.
94. Siavoshian, S., et al., *Butyrate and trichostatin A effects on the proliferation/differentiation of human intestinal epithelial cells: induction of cyclin D3 and p21 expression*. *Gut*, 2000. **46**(4): p. 507-14.
95. Archer, S.Y., et al., *p21(WAF1) is required for butyrate-mediated growth inhibition of human colon cancer cells*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1998. **95**(12): p. 6791-6.
96. Nakano, K., et al., *Butyrate activates the WAF1/Cip1 gene promoter through Sp1 sites in a p53-negative human colon cancer cell line*. *J Biol Chem*, 1997. **272**(35): p. 22199-206.
97. Schwarze, M.M. and R.G. Hawley, *Prevention of myeloma cell apoptosis by ectopic bcl-2 expression or interleukin 6-mediated up-regulation of bcl-xL*. *Cancer Res*, 1995. **55**(11): p. 2262-5.
98. Kovalovich, K., et al., *Interleukin-6 protects against Fas-mediated death by establishing a critical level of anti-apoptotic hepatic proteins FLIP, Bcl-2, and Bcl-xL*. *J Biol Chem*, 2001. **276**(28): p. 26605-13.
99. Sevilla, L., et al., *The Ets2 transcription factor inhibits apoptosis induced by colony-stimulating factor 1 deprivation of macrophages through a Bcl-xL-dependent mechanism*. *Mol Cell Biol*, 1999. **19**(4): p. 2624-34.
100. Moucadel, V. and S.N. Constantinescu, *Differential STAT5 signaling by ligand-dependent and constitutively active cytokine receptors*. *J Biol Chem*, 2005. **280**(14): p. 13364-73.
101. Hirsch, C.L., E.L. Smith-Windsor, and K. Bonham, *Src family kinase members have a common response to histone deacetylase inhibitors in human colon cancer cells*. *Int J Cancer*, 2006. **118**(3): p. 547-54.
102. Donato, N.J., et al., *BCR-ABL independence and LYN kinase overexpression in chronic myelogenous leukemia cells selected for resistance to STI571*. *Blood*, 2003. **101**(2): p. 690-8.
103. Macian, F., C. Garcia-Rodriguez, and A. Rao, *Gene expression elicited by NFAT in the presence or absence of cooperative recruitment of Fos and Jun*. *EMBO J*, 2000. **19**(17): p. 4783-95.
104. Gomez, J., et al., *The Bcl-2 gene is differentially regulated by IL-2 and IL-4: role of the transcription factor NF-AT*. *Oncogene*, 1998. **17**(10): p. 1235-43.
105. Tomei LD, Cope FO (Hrsg.), *Apoptosis: The Molecular Basis of Cell Death*. Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York, 1991.
106. Wingender, E., et al., *TRANSFAC: a database on transcription factors and their DNA binding sites*. *Nucleic Acids Res*, 1996. **24**(1): p. 238-41.
107. Baldino, F., Jr., M.F. Chesselet, and M.E. Lewis, *High-resolution in situ hybridization histochemistry*. *Methods Enzymol*, 1989. **168**: p. 761-77.

9. Abkürzungen

Abb.	Abbildung
AP	Aktivator Protein aus den Proteinen Jun und Fos
APS	Ammoniumperoxodisulfat
Apaf	Apoptotic Protease Activating Factor
AR	Aktive Region
bcl-x	bcl-x Gen
bcl-xL	Abkürzung für RNA des bcl-x "Long"
bcl-xS	Abkürzung für RNA des bcl-x "Short"
Bcl-xL	Bcl-x "Long" Protein (233 Aminosäuren)
Bcl-xS	Bcl-x "Short" Protein (170 Aminosäuren)
BH	bcl-2 homologe domain
bp	Basenpaare
BSA	bovine serum albumin
CdK	cyclin dependent kinase
cDNA	complementary DNA
CSF	Kolonie-stimulierender Faktor
dam ⁺ <i>E. coli</i>	<i>E. coli</i> mit dam Methylase: methyliert Adenin in der Sequenz GATC
DEPC	Diethylpyrokarbonat
DMSO	Dimethylsulfoxid
DN	dominant negativ
dNTP	Desoxynukleosidtriphosphat
DTT	Dithiothreitol
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
EGF	epidermal growth factor
EMSA	electrophoretic mobility shift assay
EPO	Erythropoetin
FACS	fluorescence activated cell sorting
FITC	Fluoresceinisothiocyanat
FKS	Fetales Kälberserum
GAPDH	Glycerinaldehyd-3phosphat-Dehydrogenase
³ H	Tritium
HEPES	N-(2-Hydroxyethyl)piperazin-N-2-ethansulfonsäure
IL	Interleukin
IPTG	Isopropyl-beta-D-Thiogalaktosid

JAK	Janus-Kinase
LB	luria broth base
LRA	Luziferase Reportergen Assay
MAPK	MAP-Kinase = mitogen activated protein kinase
MEN	MOPS/EDTA/NaOH
mM	millimolar
Muta	nach ortsgerichteter Mutagenese veränderte DNA
NFAT	nuklearer Faktor von aktivierten T Zellen
NF-kappaB	nuklearer Faktor kappa B
NF-E2	nuclear factor erythroid derived 2
NP40	Nonidet P-40
NTP	Nukleosidtriphosphat
P	Promoter
PAGE	Polyacrylamidgelelektrophorese
PBS	phosphat buffered saline
PCR	polymerase chain reaction
pGL3	Plasmid Glow Luziferase 3 (<i>firefly</i> -Luziferase)
PLB	passive Lysis Buffer
pM	picomolar
pRL-TK	Plasmid Renilla-Luziferase mit Thymidinkinasegenpromoter
RT	Raumtemperatur
RT-PCR	Reverse Transkriptase PCR
SDS	Sodiumdodecylsulfat
SOC	Bakteriennährmedium aus Trypton, Hefe, NaCl, MgCl ₂ , KCl, Glucose
SSC	Sodium salt citrat (Natriumcitrat)
STAT	signal transducer and activator of transcription
TA	Topoisomerase – Adenosin
<i>Taq</i>	<i>Thermus aquaticus</i>
TBE	Tris-Borat-EDTA
TE	Tris-EDTA
TEMED	N,N,N',N'-tetramethylethylendiamin
Tm	Schmelztemperatur
TNF-alpha	Tumor-necrosis-factor alpha
Tris	2-Amino-2-(hydroxymethyl)-1,3-propandiol
VDAC	voltage dependent anion channel
WT	Wild-Typ
X-Gal	5-Brom-4-Chlor-3-Indolyl-beta-D-Galaktosid

Thesen

1. Für Butyrat, das Anion der C4-Carbonsäure, sind vielfältige Effekte auf Prozesse diverser Zelltypen bekannt. In hämatopoetischen Vorläuferzellen hemmt Butyrat die Proliferation und induziert die erythroide Differenzierung, beeinflusst aber auch die Apoptose. In der vorliegenden Arbeit wurde untersucht, welche Wirkung Butyrat auf Proliferationsverhalten bzw. Apoptose von Ba/F3-Zellen, einer IL-3 abhängigen Pro-B-Zell-Linie, hat.
2. In Proliferationsassays mit ^3H -Thymidineinbau konnte gezeigt werden, dass Butyrat in Konzentrationen über 2mM die Zellproliferation in Ba/F3-Zellen hemmt. Diese Proliferationshemmung bleibt auch bestehen, wenn Ba/F3-Zellen neben Butyrat zusätzlich mit einem die Proliferation induzierenden Zytokin (IL-3 und/oder EGF) stimuliert werden.
3. FACS-Zellzyklusanalysen zeigen, dass Butyrat-Dosen über 2mM in Ba/F3-Zellen einen G0-G1-Zellzyklusarrest induzieren.
4. Hohe Dosen Butyrat über 2mM supprimieren in Ba/F3-Zellen die Apoptose nicht, wie in FACS-AnnexinV-FITC Experimenten nachgewiesen werden konnte.
5. Es ist bisher weitgehend unklar, über welche molekularen Mechanismen Butyrat diese Effekte in Ba/F3-Zellen auslöst. Aus diesem Grund wurde in dieser Arbeit untersucht, ob Butyrat in Ba/F3-Zellen die Genexpression des bcl-x Gens induziert. Das bcl-x Gen gehört zur Apoptose-regulierenden bcl-2 Genfamilie.
6. Nach Butyrat-Stimulation von Ba/F3-Zellen konnte bcl-xL mRNA mittels Northern Blot und RT-PCR qualitativ und semiquantitativ nachgewiesen werden. Butyrat bewirkt in Ba/F3-Zellen eine verstärkte Expression des bcl-x Gens.
7. Um den molekularen Hintergrund näher zu klären, wurde anschließend der Einfluss von Butyrat auf den Promoter des bcl-x Gens in Ba/F3-Zellen analysiert. Ziel der Promoteranalyse war die Lokalisierung Butyrat-abhängiger Elemente im bcl-x Promoter.

8. In Luziferase Reporter Assays (LRA) wurde die Induzierbarkeit des bcl-x Promoters durch Butyrat mit Hilfe des pGL3-X Vektors untersucht, in dem ein 998bp langer Abschnitt des bcl-x Promoters die Expression des Reportergens kontrolliert. Mit Dosis-Wirkungsversuchen konnte bis zu einer Dosis von 3mM Butyrat eine Induktionssteigerung des bcl-x Promoters nachgewiesen werden.

9. In LRAs mit dem Vektor pGL3-X konnte ebenfalls aufgezeigt werden, dass der Minimalpromoter für das bcl-x Gen im Bereich 111 Basenpaare oberhalb des Translationsstartpunktes liegt, d.h. für eine nachweisbare Induktion des bcl-x Promoters muss die Promotersequenz vor dem Translationsstartpunkt mindestens eine Länge von 111bp besitzen.

10. Innerhalb der 998bp langen Promotersequenz wurden zwei „Aktive Regionen“ identifiziert, in deren Bereich die Induktion des bcl-x Promoters signifikant ansteigt. Diese als „Aktive Region AR1“ und „Aktive Region AR2“ bezeichneten Abschnitte sind somit die für die Transaktivierung relevanten Regionen im Bereich der ersten 998bp des bcl-x Promoters.

11. Das bcl-x Gen besteht aus 4 Exons (Exon Ia, Ib, II und III). Im Vergleich der bcl-x Promoterstruktur mit AR1 und AR2 zeigte sich, dass AR1 mit dem Intron zwischen Exon Ia und Exon II übereinstimmt, während AR2 im Bereich des Introns zwischen Exon Ib und Exon Ia lokalisiert ist.

12. Mittels Electrophoretic Mobility Shift Assays (EMSA) wurde analysiert, ob Butyrat bestimmte Transkriptionsfaktoren der Erythropoese in Ba/F3-Zellen aktiviert. Dabei zeigte sich, dass Butyrat in Ba/F3-Zellen die Transkriptionsfaktoren AP-1 und NFkappaB aktiviert, nicht jedoch STAT5.

13. Innerhalb der Aktiven Regionen AR1 und AR2 der bcl-x Promotersequenz wurden mittels Transfac (www.gene-regulation.com) potentielle Transkriptionsfaktorbindungsstellen identifiziert. Daraufhin wurden aufgrund quantitativer Häufung potentieller Transkriptionsfaktorbindungsstellen eine 45bp lange Sequenz aus AR1 (Oligo AR1) und eine 33bp lange Sequenz aus AR2 (Oligo AR2) synthetisiert.

14. In EMSAs für Oligo AR1 konnten nach Butyrat-Stimulation keine Hinweise für Bindungsereignisse zwischen den Transkriptionsfaktoren AP-1, NFkappaB, Ets oder NFAT und dem bcl-x Promoter gefunden werden.

15. In EMSAs für Oligo AR2 konnte im Gegensatz zu Oligo AR1 nach Butyrat-Stimulation ein Bindungsereignis zwischen dem Transkriptionsfaktor NFAT und dem OligoAR2 durch Supershift und Kompetitionsversuche nachgewiesen werden.

16. Durch Punktmutagenese konnten im Oligo AR2 potentielle Bindungsstellen für den Transkriptionsfaktor NFAT verändert werden (Oligo Muta 2). In anschließenden EMSAs mit Kompetitionsversuchen zwischen Oligo AR2 und Oligos Muta 2 konnte die Spezifität der Bindung zwischen Oligo AR2 und dem Transkriptionsfaktor NFAT nicht bestätigt werden.

17. Als Primer für die ortsgerichtete Mutagenese der NFAT- und AP-1-Bindungsstellen im bcl-x Promoter wurden die Oligos Muta 1-4 synthetisiert. Die mutationstragenden Reporterengenkonstrukte wurden als pGL3-Muta 1-4 bezeichnet. In LRAs wurde die Induzierbarkeit des mutierten bcl-x Promoters untersucht. Die Aktivierung des bcl-x Promoters nach Stimulation mit 2mM Butyrat wird durch die eingefügten Mutationen der Transkriptionsfaktor-Bindungsstellen für AP-1 und NFAT jedoch nicht signifikant verringert.

18. Im Ablauf der intrazellulären Signaltransduktionskaskade zur Aktivierung des bcl-x Gens sind in der Erythropoese neben den genannten Transkriptionsfaktoren auch die Tyrosinkinasen JAK2 und Lyn beteiligt. Hier konnte in LRAs mit gleichzeitiger Überexpression der cDNAs für die Tyrosinkinasen JAK2 und Lyn gezeigt werden, dass die Butyrat-abhängige Aktivierung des bcl-x Promoters durch Tyrosinkinasen verstärkt wird.

Selbständigkeitserklärung

Ich erkläre, dass ich die eingereichte Dissertation selbständig und ohne fremde Hilfe verfasst, andere als die von mir angegebenen Quellen und Hilfsmittel nicht benutzt und die den benutzten Werken wörtlich und inhaltlich entnommenen Stellen als solche kenntlich gemacht habe.

Basel, 10.10.2010

Johannes Kattner