

---

# Der Zinkfingertranskriptionsfaktor Egr-1: Signaltransduktion, Zielgene und Funktion

---

Dissertation  
zur Erlangung des Grades  
des Doktors der Naturwissenschaften  
der Naturwissenschaftlich-Technischen Fakultät III  
Chemie, Pharmazie, Bio- und Werkstoffwissenschaften  
der Universität des Saarlandes

von  
**Sabine Mayer**  
Saarbrücken  
2008

---

Tag des Kolloquiums: 17.12.2008

Dekan: Prof. Dr. U. Müller

Berichterstatter: Prof. Dr. G. Thiel

Prof. Dr. F. Schmitz

Prof. Dr. C. Kaltschmidt

---

## Inhaltsverzeichnis

I. Einleitung.....	7
I.1 Das Egr-1 Protein .....	9
I.2 Der Egr-1 Promotor .....	10
I.3 Funktionen von Egr-1 .....	12
II. Ziel der Arbeit.....	13
III. Material und Methoden .....	14
III.1 Geräte.....	15
III.2 Verbrauchsmaterialien .....	15
III.3 Chemikalien.....	15
III.5 Zellkultur.....	21
III.5.1 Zelllinien und Kulturbedingungen .....	21
III.5.1.1 $\alpha$ T3-1 und $\alpha$ T3M3 .....	21
III.5.1.2 MIN6 .....	22
III.5.1.3 INS-1 .....	22
III.5.1.4 293T-17.....	23
III.5.1.5 Primäre Astrozyten.....	23
III.5.1.5.1 Herstellung primärer Astrozyten .....	23
III.5.1.5.2 Genotypisierung .....	24
III.5.1.5.3 Immunfluoreszenz .....	25
III.4.2 Kryokonservierung und Reaktivierung von Zellen.....	26
III.4.3 Synchronisation der Zellen in der G <sub>0</sub> -Phase .....	26
III.4.4 Proliferationsanalysen .....	27
III.4.5 Lentivirale Transfektion .....	27
III.4.5.1 Kalziumphosphat Transfektion .....	28
III.4.5.2 Lentivirale Infektion .....	28
III.4.6 Reportergenanalysen .....	29
III.5 Proteinbiochemische Analysen.....	30
III.5.1 Herstellung von Proteinextrakten.....	30
III.5.1.1 Ganzellextrakt.....	30
III.5.1.2 Kernextrakt.....	30

III.5.1.3 Präparation von Membranproteinen .....	32
III.5.2 Proteinbestimmung.....	32
III.5.3 SDS-Gelelektrophorese .....	32
III.5.4 Western Blot .....	33
III.5.5 “Strippen” der Nitrozellulosemembran .....	34
III.5.6 Antikörper.....	35
III.6 Arbeiten mit DNA.....	36
III.6.1 ChIP Assay .....	36
III.6.2 EMSA (Electrophoretic mobility shift assay).....	39
III.6.3 Polymerasekettenreaktion.....	40
III.6.4 Auftrennung der DNA-Moleküle durch Agarosegel-Elektrophorese.....	42
III.6.5 Ortsspezifische Mutagenese.....	43
III.7 Arbeiten mit RNA.....	45
III.7.1 RNA-Isolierung aus eukaryotischen Zellen.....	45
III.7.2 cDNA-Synthese mit reverser Transkriptase und semiquantitative RT-PCR .....	46
IV. Ergebnisse .....	47
IV.1 Gonadotrope Hypophysenzellen.....	47
IV.1.1 Aktivierung der Egr-1 Biosynthese durch Buserelin oder Carbachol .....	47
IV.1.2 Die transkriptionelle Aktivierung des Egr-1 Gens benötigt $Ca^{2+}$ -Ionen, Proteinkinase C und Transaktivierung des EGF-Rezeptors .....	48
IV.1.3 Die Aktivierung der ERK-Signalkaskade ist essentiell für die Induktion der Egr-1 Expression nach Buserelin oder Carbachol-Stimulation.....	50
IV.1.4 Expression der MKP-1 unterbindet die Egr-1 Biosynthese .....	50
IV.1.5 Der ternäre Komplexfaktor Elk-1 ist für die Biosynthese von Egr-1 in gonadotropen Hypophysenzellen nach Stimulation mit Buserelin oder Carbachol unerlässlich .....	52
IV.1.6 Der Einfluss der bZIP-Transkriptionsfaktoren ATF2 und CREB auf die transkriptionelle Aktivierung des Egr-1 Gens .....	54
IV.1.7 Eine dominant negative Mutante von CREB vermindert die Egr-1 Biosynthese nach Stimulation mit Buserelin oder Carbachol .....	56
IV.1.8 Zielgene des Egr-1 Proteins in gonadotropen Hypophysenzellen .....	58
IV.1.9 ATF3 ist ein Zielgen von Egr-1 .....	60
IV.1.10 Die Biosynthese von Egr-1 und ATF3 ist abhängig von einer erhöhten $Ca^{2+}$ -Konzentration und der Aktivierung von ERK.....	60
IV.1.11 Der Einfluss von Proteinphosphatasen auf die Expression von Egr-1 und ATF3 .....	62
IV.1.12 Expression einer dominant-negativen Mutante von Egr-1 blockiert die Biosynthese von ATF3.....	64
IV.1.13 Exkurs: Regulation der ATF3-Expression durch bZIP-Proteine .....	67

IV.1.13.1 Inhibierung von CREB reduziert die Expression von ATF3 in Buserelin-stimulierten $\alpha$ T3-1 Zellen .....	67
IV.1.13.2 Die Rolle der bZIP-Faktoren ATF2 und c-Jun auf die Buserelin-induzierten Biosynthese von ATF3.....	68
IV.1.13.3 Buserelinstimulation von $\alpha$ T3-1 Zellen führt zu gesteigerter AP-1 Aktivität, einer Phosphorylierung von c-Jun und der Bindung von Phospho-c-Jun an die AP-1 Bindestelle.....	71
IV.1.14 ATF3 reguliert seine eigene Transkription.....	72
IV.1.15 ATF3 reguliert die Transkription des Chromogranin B-Gens .....	74
IV.1.16 Egr-1 bindet in Buserelinstimulierten $\alpha$ T3-1 Zellen an das Chromogranin B Gen.....	75
IV.2 MIN6.....	77
IV.2.1 Biosynthese von Egr-1 nach Stimulation von $\beta$ -Zellen mit Glukose, Tolbutamid oder Kaliumchlorid.....	77
IV.2.2 Transkriptionelle Aktivierung des Egr-1 Gens ist abhängig von einem Anstieg der intrazellulären $Ca^{2+}$ -Konzentration und der Proteinkinasen PKC und ERK .....	78
IV.2.3 Elk-1 ist essentiell für die transkriptionelle Aktivierung des Egr-1 Gens .....	82
IV.2.4 Der bZIP-Transkriptionsfaktor CREB beeinflusst die Biosynthese von Egr-1 .....	84
IV.2.5 Zielgene von Egr-1 in $\beta$ -Zellen des Pankreas .....	88
IV.3 INS-1.....	90
IV.3.1 Auswirkung verschiedener Steroidhormone auf die Egr-1 Biosynthese in $\beta$ -Zellen des Pankreas 91	
IV.3.2 Wirkung von PregS auf andere Transkriptionsfaktoren .....	92
IV.3.3 Der Einfluss von $Ca^{2+}$ auf die transkriptionelle Aktivierung des Egr-1 Gens.....	93
IV.3.4 Die Rolle des TRPM3-Rezeptors auf die Egr-1 Expression.....	94
IV.3.5 Der Einfluss von L-Typ $Ca^{2+}$ -Kanälen auf die PregS-Stimulierte Egr-1 Expression .....	96
IV.3.6 Einfluss der Membrandepolarisation auf die Egr-1 Biosynthese.....	97
IV.3.7 Die Rolle der Raf-Kinase für die PregS-induzierte Egr-1 Biosynthese .....	99
IV.3.8 Der Einfluss von Protein-Phosphatasen auf die Egr-1 Biosynthese.....	99
IV.3.9 Elk-1 ist essentiell für die Aktivierung der Egr-1 Transkription .....	100
IV.3.10 CREB spielt keine Rolle in der transkriptionellen Aktivierung des Egr-1 Gens .....	101
IV.3.11 Untersuchung des Egr-1 Promoters.....	102
IV.3.12 Der Einfluss von Egr-1 auf das Synapsin I- Gen .....	103
IV.3.13 Regulation des Insulingens durch Egr-1 .....	105
IV.3.14 Egr-1 transaktiviert das Chromogranin B Gen .....	106
IV.4 Astrozyten .....	107
IV.4.1 Biosynthese von Egr-1 und Proliferation von Astrozyten .....	107
IV.4.2 Der Einfluss von Protein-Phosphatasen auf die EGF-induzierte Proliferation von Astrozyten . .....	109
IV.4.3 Untersuchung des Egr-1 Promoters .....	110

IV.4.4 Inhibierung der EGF-induzierten Proliferation von Astrozyten durch eine dominant-negative Mutante von Elk-1 .....	111
IV.4.5 Vergleich der Wachstumsraten von Astrozyten aus Wildtyp- und Egr-1-defizienten Mäusen .. .....	113
IV.4.6 Die Rolle von Protein-Phosphatasen und des Ternären Komplexfaktors für die EGF-induzierte Proliferation von Astrozyten aus Egr-1 defizienten Mäusen .....	114
IV.4.7 Eine dominant-negative Mutante der Egr-Proteine verhindert das Wachstum von Astrozyten nach EGF-Stimulation .....	116
IV.4.8 Der Korepressor der Egr-Proteine NAB2 unterbindet die Proliferation von Astrozyten .....	121
IV.4.9 Transaktivierung des bFGF Gens durch Egr-Proteine .....	122
V. Diskussion .....	124
V.1 Signaltransduktion.....	127
V.1.1 Kinetik der Stimulusinduzierten Egr-1 Expression .....	127
V.1.2 Bedeutung membranständiger Effektormoleküle.....	128
V.1.3 Einfluss von Ca <sup>2+</sup> -Ionen auf die Stimulusinduzierte Egr-1 Biosynthese .....	128
V.1.4 Die Bedeutung Ca <sup>2+</sup> -abhängiger PKC-Isoenzyme .....	129
V.1.5 Regulation der Egr-1 Genexpression durch die ERK-Kinasen .....	130
V.1.6 Der ternäre Komplexfaktor Elk-1 reguliert die Egr-1 Expression .....	131
V.1.7 Stimulusabhängiger Einfluss von bZIP-Proteinen auf die Egr-1 Expression .....	133
V.2 Zielgene von Egr-1.....	135
V.3 Funktionen von Egr-1 in Astrozyten.....	139
VI. Zusammenfassung .....	143
VII. Summary.....	144
VIII. Abkürzungsverzeichnis .....	145
Danksagung.....	149
IX. Literaturverzeichnis .....	150
X. Publikationen und Poster.....	168

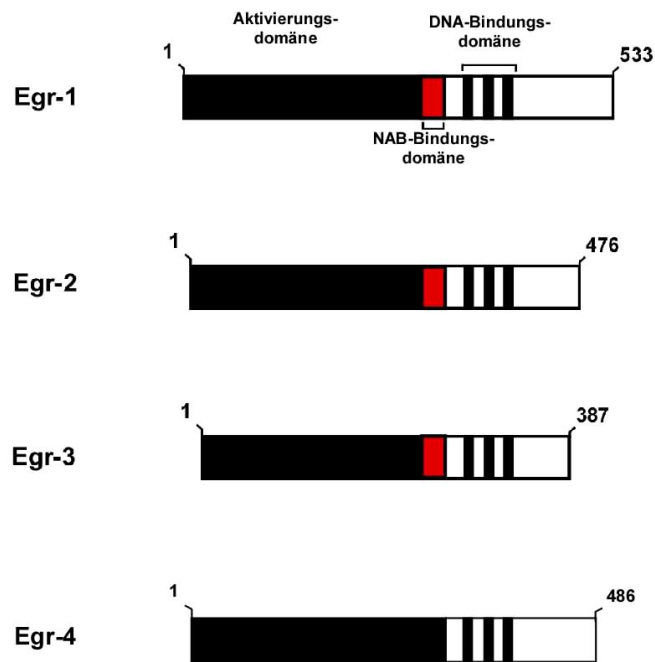
## I. Einleitung

Eine veränderte Genexpression ist ein grundlegender Mechanismus zur Reaktion einer Zelle auf extrazelluläre Signale. Signalmoleküle binden an membranständige Rezeptoren, die das Signal ins Innere der Zelle übermitteln, wo dieses über einen komplexen Mechanismus verschiedener Signalkaskaden weitergeleitet wird. Im Nukleus übernehmen Transkriptionsfaktoren die Funktion der Transkriptionskontrolle. Sie binden an regulatorische Elemente innerhalb der Promotorregion eines Gens und beeinflussen dessen Transkription. Dieser Mechanismus dient der Synthese von Proteinen, die zur Anpassung der Zelle an veränderte Umweltbedingungen oder zum Überleben notwendig sind.

Der in dieser Arbeit untersuchte Transkriptionsfaktor Egr-1 gehört zur Gruppe der Zinkfingertranskriptionsfaktoren. Egr-1 ist das erste der 4 Mitglieder umfassenden Familie der Egr-Proteine. Weitere Vertreter sind Egr-2, Egr-3 und Egr-4. Proteine der Egr-Familie besitzen als gemeinsames Strukturmotiv drei Zinkfinger des Cys<sub>2</sub>His<sub>2</sub>-Typs. Sie sind als Triplet angeordnet und bilden die DNA-Bindungsdomäne (Abbildung 1), deren dreidimensionale Struktur für Egr-1 durch Pavletich und Pabo (Pavletich und Pabo 1991) aufgeklärt wurde. Die Zinkfingerdomäne weist innerhalb der Egr-Familie eine Homologie von 90% auf. Außerhalb der hochkonservierten Zinkfinger erstreckt sich die Homologie auf die benachbarten basischen Regionen. Eine signifikante Abweichung in den terminalen Sequenzbereichen erlaubt eine Einteilung in Unterklassen. Die Zinkfinger-Proteine der Egr-Familie binden an sehr ähnliche GC-reiche Zielsequenzen und wirken als transkriptionelle Aktivatoren. Das DNA-Konsensusmotiv mit der Sequenz GCG(G/T)GGGCG, wird auch als EBS (Egr-Bindungssequenz) bezeichnet (Chavrier et al.; 1988; Christy und Nathans, 1989; Cao et al., 1990; Lemaire et al., 1990; Patwardhan et al., 1991; Crosby et al., 1991). Die vier Mitglieder der Egr-Familie sind jeweils unter zahlreichen Synonymen beschrieben worden. Das Egr-1 Gen wurde erstmals nach Stimulation von PC12-Zellen mit Nervenwachstumsfaktoren (NGF) entdeckt. Dies hat die Entdecker dazu veranlasst, das Protein NGFI-A zu nennen, was für „Nerve-Growth-Factor Inducible A“ steht (Milbrandt, 1987). Kurz darauf wurden folgende spezieübergreifende Homologe zu diesem Gen gefunden: das murine Tis-8 Gen wurde durch Induktion von 3T3 Zellen mit TPA entdeckt (Lim et al., 1987), das murine Zif268 Gen steht für Zinkfinger und wurde durch Induktion von Mauszellen durch Serumbestandteile entdeckt (Christy et al., 1988). Die cDNA des Krox-24 Gens (Krüppel Box) wurde aus stimulierten 3T3 Zellen isoliert (Lemaire et al., 1988). Der

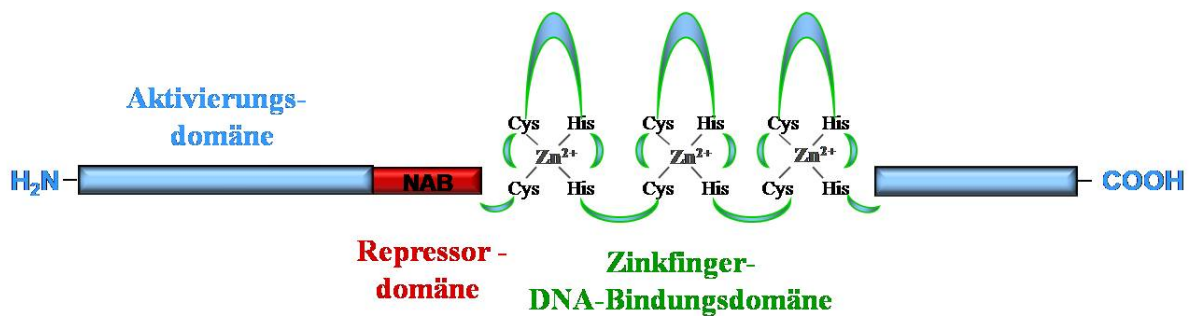
Begriff Egr-1 (early growth response 1) wurde von Sukhatme geprägt, der sich mit der Stimulation von humanen und Mausfibroblasten durch NGF beschäftigte (Sukhatme et al., 1988). Das Krox-20 Gen, ein Synonym für Egr-2, wurde mit einer cDNA-Sonde der Zinkfingerregion des Krüppelgens aus *Drosophila* in murinen Zellen identifiziert (Chavrier et al., 1988). Humane Egr-2 cDNA wurde aus aktivierten T-Zellen (Zipfel et al., 1989) und Fibroblasten isoliert (Joseph et al., 1988). Egr-3 cDNA wurde aus Serum-stimulierten humanen 3T3 Zellen isoliert (Patwardhan et al., 1991). Egr-3 Homologe wurden weiterhin in der Maus (Patwardhan et al., 1991) und der Ratte beschrieben (Yamagata et al., 1994). Das vierte und letzte Mitglied der Egr-Familie, Egr-4, wurde ebenfalls von mehreren Gruppen gleichzeitig entdeckt. Das Egr-4 Gen der Ratte wurde 1991 von Crosby und Kollegen entdeckt und als NGFI-C bezeichnet (Crosby et al., 1992), wohingegen das humane Homolog den Namen pAT133 trägt (Müller et al., 1991). Egr-1, 2 und 3 sind untereinander stark homolog. Abbildung 1 zeigt die modulare Struktur der Egr-Proteine im Vergleich. Egr-1, 2 und 3 werden durch die transkriptionellen Korepressoren NAB1 und 2 reguliert (Russo et al., 1995; Svaren et al., 1996; Swirnoff et al., 1998), wohingegen Egr-4 keine solche Bindestelle besitzt (Crosby et al., 1992). NAB2 (*NGFI-A binding protein 2*), welches im Gegensatz zu NAB1 induzierbar ist, ist ein durch verschiedene Stimuli, wie Stress und Wachstumsfaktoren, induzierbares Kernprotein und als Korepressor der Transkriptionsfaktoren Egr-1, Egr-2 und Egr-3 beschrieben. Zeitversetzt zu den Mitgliedern der Egr-Familie wird durch die gleichen Stimuli das NAB2-Gen induziert, wodurch eine überschießende Aktivierung der Egr-Ziel promotoren verhindert wird (Kirsch et al., 1996; Svaren et al., 1996). Nach extrazellulären Signalen induzieren Egr-1, Egr-2 und Egr-3 die Expression ihres eigenen Korepressors NAB2, wodurch ein negativer Rückkopplungsmechanismus etabliert wird (Kumbrink et al., 2005).





**Abbildung 1: Modulare Struktur der Egr-Proteine.** Alle Egr-Proteine besitzen eine N-terminale Aktivierungsdomäne und die Zinkfinger-DNA-Bindungsdomäne. Jedoch nur Egr-1,2 und 3 besitzen die NAB-Bindungsdomäne.

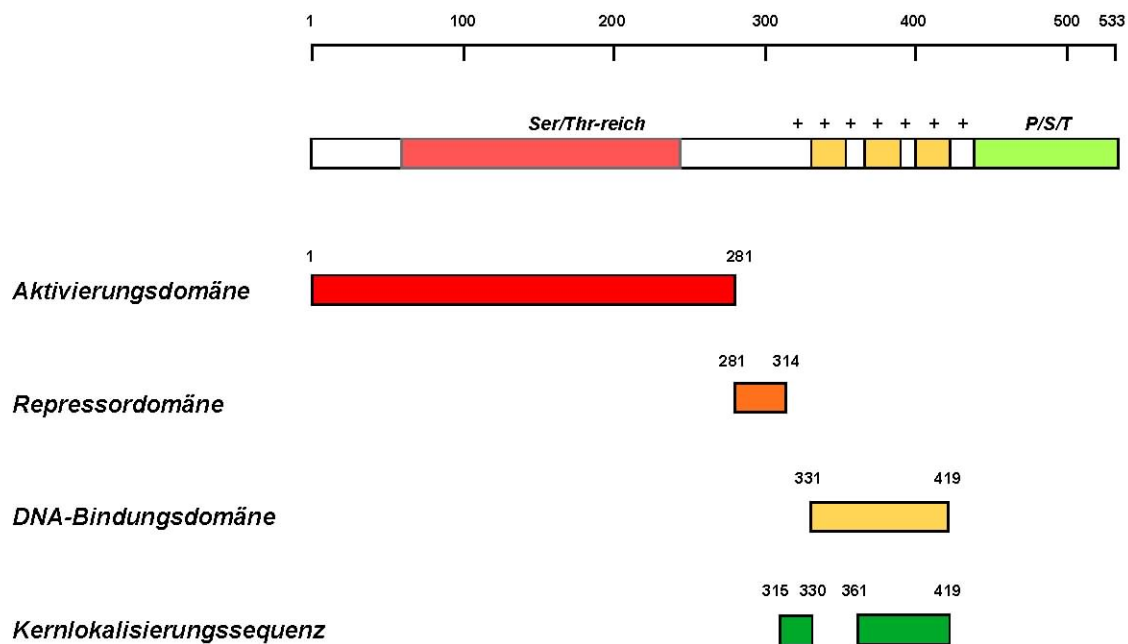
### 1.1 Das Egr-1 Protein



**Abbildung 2: Modulare Struktur des Egr-1 Proteins.** Das Egr-1 Protein besitzt neben der N-terminalen Aktivierungsdomäne eine Bindungsstelle für die transkriptionellen Korepressorproteine NAB1 und NAB2. Die DNA-Bindungsdomäne besteht aus 3 Zinkfingern des  $H_2C_2$ -Typs.

Die modulare Struktur des Egr-1 Proteins ist aus strukturell unabhängigen, funktionellen Domänen aufgebaut wie in Abbildung 2 dargestellt. Egr-1 trägt als zentrales Motiv die DNA-Bindungsdomäne mit den 3 Zinkfingern des  $Cys_2$ -His $_2$ -Typs. Die Struktur der Zinkfinger wurde durch Röntgenstrukturanalysen und Methylase-Interferenz-Studien mit einem Egr-1/DNA-Komplex aufgeklärt (Christy und Nathans, 1989; Lemaire et al., 1990; Pavletich und Pabo, 1991). Jede Zinkfingerdomäne besteht aus einem antiparallelen  $\beta$ -Faltblatt und einer  $\alpha$ -

Helix. Die drei Zinkfinger sind in einer semizirkulären Struktur arrangiert, die sich in die große Furche der B-DNA einfügt. Neben einer starken N-terminalen Aktivierungsdomäne (Gashler et al., 1993; Thiel et al., 2000) konnte eine Repressordomäne identifiziert werden, die durch Bindung der transkriptionellen Kofaktoren NAB1 und NAB2 die Aktivität des Egr-1 Proteins negativ reguliert (Russo et al., 1995; Svaren et al., 1996; Thiel et al., 2000). Da Egr-1 die Expression des NAB2 Gens reguliert (Ehrengruber et al., 2000) (Kumbrink et al., 2005), ist es möglich, dass Egr-1 seine biologische Aktivität durch einen negativen Rückkopplungsmechanismus über die Synthese von NAB2 steuert. Egr-1 besitzt eine zweigeteilte Kernlokalisationssequenz (NLS) bei der sowohl der Zinkfinger 2 als auch Zinkfinger 3 zusammen mit einer N-terminalen Sequenz von 15 AS die Kernlokalisierung vermitteln können (Gashler et al., 1993; Matheny et al., 1994). Der N-Terminus des Egr-1 Proteins ist Serin und Threoninreich, der C-Terminus hat zusätzlich hohe Anteile von Prolin. Der hohe Prolinanteil kann die Affinität zur Ausbildung von  $\alpha$ -Helices vermindern.

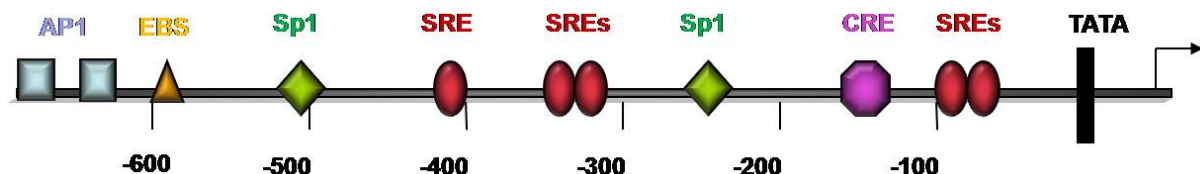


**Abbildung 3: Übersicht der funktionellen Domänen von Egr-1:** Der Serin/Threoninreiche N-terminus ist dargestellt, die basische Region von Egr-1 ist mit +++ gekennzeichnet, die drei Zinkfinger sind durch gelbe Kästchen dargestellt. Der Prolin/Serin/Threoninreiche C-Terminus wird als P/S/T bezeichnet.

## 1.2 Der Egr-1 Promotor

Die 5' untranslatierte Region des humanen Egr-1 Gens enthält innerhalb der Promotorregion unter anderem fünf Areale, die durch die Induktion von Serumbestandteilen die Transkription aktivieren (Tsai-Morris et al., 1988) (Abbildung 4). Diese sogenannten „serum response

elements“ (SRE) enthalten die hochkonservierte Sequenz CC (A/T)<sub>6</sub> GG, die auch CARG Box genannt wird (Christy und Nathans, 1989; Sakamoto et al., 1991). Sie vermitteln nicht nur die seruminduzierte Transkription, sondern auch die Induktion von Egr-1 durch Phorbol ester, ROI (Reactive Oxygen Intermediates), bzw. durch Bestrahlung (Datta et al., 1993). In direkter Nachbarschaft zu den CARG-Boxen befinden sich Bindungsstellen für Transkriptionsfaktoren der Ets-Klasse (z.B. ternäre Komplexfaktor). Die SRE kommen in zwei Gruppen im Egr-1 Promotor vor. Es gibt eine distale Gruppe bestehend aus drei SRE, und eine Gruppe aus zwei SRE der sich in der proximalen Region des Promotors befindet. Um das SRE zu aktivieren sind zwei unterschiedliche Transkriptionsfaktoren nötig: zum einen der „serum response factor“ SRF zum anderen der ternäre Komplexfaktor. Die ternären Komplexfaktoren binden sowohl an die DNA als auch an die SRF und vermitteln nur in diesem Komplex ihre Funktion. Zusätzlich zu den fünf SRE's enthält der Egr-1 Promotor ein cAMP response element (CRE), welches unter anderem als Bindungsstelle für den bZIP-Faktor CREB dient. Die CRE-Bindestelle im Egr-1 Promotor unterscheidet sich um eine Base von der regulären CRE-Sequenz. Die Funktionalität dieses Elements im Egr-1 Promotor ist umstritten, da sich Egr-1 Biosynthese nicht durch Forskolin, einem Aktivator der Adenylatcyklase, stimulieren lässt (von der Kammer et al., 1998; Tremblay & Drouin, 1999; Meyer et al., 2002). Deshalb wurde propagiert, dass ATF2 anstelle von CREB die p38/stressaktivierte Proteinkinase vermittelte Transkription des Egr-1 Gens kontrolliert (Rolli et al., 1999). Erst kürzlich wurde jedoch gezeigt, dass eine konstitutiv aktive Form von CREB ein Egr-1 Promotor/Luziferasereporter gen transaktiviert (Al Sarraj et al., 2005), was dafür spricht, dass Egr-1 ein Zielgen von CREB ist. Durch das Vorhandensein einer EBS-Bindestelle kann Egr-1 interessanterweise an seinen eigenen Promotor binden (Cao et al., 1993).



**Abbildung 4: Regulatorische Elemente innerhalb des Egr-1 Promotors.** Der Transkriptionsstart ist durch einen Pfeil gekennzeichnet. Die 5'-untranslatierte Region des Egr-1 Promotors enthält neben der TATA-Box zwei proximale und drei distale SRE (serum response elemente), ein CRE-Element (cAMP response element), zwei Sp1- und eine EBS (Egr-1 binding sequence)-Bindungsstelle.

### ***1.3 Funktionen von Egr-1***

Seit der Entdeckung von Egr-1 wird dem Protein eine Reihe unterschiedlicher, jedoch hauptsächlich proliferativer Funktionen zugeschrieben. Egr-1 dient in Fällen von Gewebsverletzungen oder Unterversorgung mit Sauerstoff dem Wachstum und Überleben der Zellen oder des Gewebes (Hallahan et al., 1991; Hallahan et al., 1995; Khachigian et al., 1997; Yan et al. 1999; Nishi et al., 2002; Liao et al., 2004). Andere Arbeiten bezeichnen Egr-1 als proapoptisches Gen, das als Tumorsuppressor wirken kann (de Belle et al., 1999; Liu et al., 1999). Zu den Funktionen von Egr-1 gehören unter anderem die Regulation der synaptischen Plastizität im Nervensystem (Jones et al., 2001; Lee et al., 2004), die Reproduktion (Lee et al., 1996; Topilko et al., 1997) und die Vermittlung der Immunantwort (McMahon & Monroe, 1996; Cai et al., 2006). Diese Ergebnisse konnten durch Verwendung von Egr-1-defizienten Mäusen bestätigt werden. Egr-1-defiziente Mäuse zeigen wenige Veränderungen. Die Tiere weisen eine geringere Körpergröße auf und sind steril (Lee et al., 1996; Topilko et al., 1997), was sich auf einen Hormondefekt zurückführen lässt. Verhaltensuntersuchungen zeigten, dass Egr-1 essentiell für die Verarbeitung von Erinnerungen ist. Egr-1 hat einen profunden Effekt auf die synaptische Plastizität wie auch auf das Schmerz- und Angstgedächtnis (Cole et al., 1989; Wei et al., 2000; Ko et al., 2005; James et al., 2006). Egr-1 defiziente Mäuse zeigen wenig Einschränkungen in der Verarbeitung von Kurzzeithalten. Die Überführung von Lernprozessen ins Langzeitgedächtnis ist bei Egr-1 defizienten Mäusen jedoch nicht möglich (Jones, et al., 2001). Weiterhin zeigen Egr-1 defiziente Mäuse eine verzögerte Leberregeneration nach einer partiellen Hepatektomie (Liao et al., 2004). Es kommt zu einer verzögerten Tumorentstehung bei Prostatakarzinomen, wenn das Egr-1-Gen ausgeschaltet wurde (Abdulkadir, et al., 2001) Der relativ milde Phänotyp der homozygoten Egr-1<sup>-/-</sup>-Mäuse lässt sich dadurch erklären, dass andere Egr-Proteine durch ihre Fähigkeit an die Egr-Konsensussequenz zu binden, die Funktionen von Egr-1 übernehmen.

## II. Ziel der Arbeit

Diese Arbeit teilt sich in drei zu untersuchende Aufgabenfelder. Erstens, die Analyse der intrazellulären Signalwege, die zur Aktivierung der Egr-1 Expression führen. Zweitens, die Identifikation von Egr-1 Zielgenen, und drittens, die Funktionsanalyse von Egr-1.

Die Signalwege die zur Aktivierung der Egr-1 Biosynthese führen wurden in den letzten Jahren vielfach untersucht, jedoch macht die Vielzahl der unterschiedlichen Stimuli, die zur Aktivierung der Egr-1 Transkription beitragen, den Vergleich schwierig. Deshalb haben wir uns auf die Untersuchung der Signaltransduktion von Egr-1 im endokrinen System und in primären Astrozyten beschränkt. Es galt Signalwege zu untersuchen, die durch drei verschiedene Rezeptortypen aktiviert werden. In der gonadotropen Hypophysenzelllinie  $\alpha$ T3-1 oder  $\alpha$ T3M3 wurde die Induktion der Egr-1 Biosynthese über  $G\alpha_{q/11}$ -gekoppelte Rezeptoren untersucht. Die Verwendung der  $\beta$ -Zelllinien MIN6 und INS-1 hingegen erlaubte uns Einblicke in die Ionenkanal vermittelte Egr-1 Biosynthese. Durch die Untersuchung der Rezeptortyrosinkinase induzierten Egr-1 Expression in primären Astrozyten konnten wir den dritten Rezeptortyp abdecken. Der Vergleich der intrazellulären Signalwege, die diese drei Rezeptorarten aktivieren um zur Egr-1 Transkription beizutragen, gehört zum ersten Teil der Arbeit.

Die Analyse der Egr-1 regulierten Gene gibt indirekt Aufschluss über die zellspezifische Funktion dieses Zinkfingertranskriptionsfaktors.

Der dritte Teil dieser Arbeit beschäftigt sich mit der Aufklärung der Funktion dieses Transkriptionsfaktors in Astrozyten. Seit der Entdeckung von Egr-1 als Serum induziertem Transkriptionsfaktor gab es die Hypothese, dass Egr-1 proliferationsfördernde Eigenschaften hat. Diese Hypothese beruht jedoch lediglich auf der Korrelation zwischen Mitogenstimulation und Egr-1 Induktion (Peng et al., 1999). Es konnte noch keine kausale Beziehung zwischen diesen beiden Ereignissen hergestellt werden, deshalb wollte ich nach Hinweisen suchen, die diese Hypothese bestätigen.

### III. Material und Methoden

#### III.1 Geräte

Analysewaage	Sartorius
Auflichtmikroskop (Stemi2000)	Zeiss, Göttingen
Autoklav	Schütt
Blottingapparatur	Hoefler, San Fransisco
Brutschränke	div. Hersteller
Elektrophoresekammer für Agarosegele	Biometra, Göttingen
Entwicklermaschine Gevomatic 60	AGFA-Gevaert
Fluoreszenzmikroskop Axioskop	Zeiss, Göttingen
Geldokumentationsanlage	Biorad , München
Heizblock	Eppendorf, Hamburg
Kühlzentrifuge	Eppendorf, Hamburg
Luminometer	Berthold Detection Systems
Durchlichtmikroskop (Axiovert25)	Zeiss, Göttingen
Photometer Microplate Reader Model 550	Biorad, München
pH-Meter	WTW
Pipetten	Eppendorf, Abimed
Pipettus	Hirschmann
Präparationsbesteck	WPI
Präzisionswaage	Sartorius
Röntgenfilmkassette	Molecular Dynamics
Schüttelgeräte	Biometra, Göttingen
Sonifier	Branson
Steril-Werkbank	Holten
Thermocycler	Sensoquest
Tischzentrifuge Biofuge	Heraeus
Ultrazentrifuge (Optima TL)	Beckman

Westernblot-Apparatur

Biorad, München

### III.2 Verbrauchsmaterialien

Polystyren-Röhrchen

Becton Dickensen, Heidelberg

Kryoröhrchen

Greiner Bio-one, Frickenhausen

Kanülen

B.Braun, Melsungen

Küvetten

Eppendorf, Hamburg

Spritzen

B.Braun, Melsungen

Nitrocellulosemembran Biotrace NT

Pall Gelman Laboratory

Reaktionsgefäße 1,5 ml

Sarstedt, Nümbrecht

Filter 22, 45 µm

Sarstedt, Nümbrecht

Druckfiltrationseinheiten

Sarstedt, Nümbrecht

Zellkulturflaschen (25, 75, 175 cm<sup>2</sup>)

Greiner Bio-one, Frickenhausen

Zellkulturschalen

Greiner Bio-one, Frickenhausen

### III.3 Chemikalien

Acrylamid

Roth, Karlsruhe

Adenosin-5'-triphosphat (ATP) kristallisiertes Dinatriumsalz

Roche, Mannheim

AG1478

Merck, Calbiochem

Agarose ultra pure DNA Grade

Roth, Karlsruhe

Ammoniumchlorid

Merck, Darmstadt

Ammoniumsulfat

Roth, Karlsruhe

Ampicillin

Merck, Darmstadt

Anisomycin

Axxora, Lörrach

APS (Ammoniumperoxodisulfat)

Serva, Heidelberg

BAPTA-AM

Merck, Calbiochem

BME (Basal Medium Eagle)	Sigma, Deisenhofen
Bromphenolblau	Serva, Heidelberg
BSA (Bovines Serum Albumin)	Roth, Karlsruhe
Buserelin	Sigma, Deisenhofen
Calciumchlorid	Roth, Karlsruhe
Carbachol	Sigma, Deisenhofen
Chelex-100	Biorad, München
Chloroquin Disulfat	Sigma, Deisenhofen
Chloroform	Merck, Darmstadt
CoA	Sigma, Deisenhofen
Complete Proteaseinhibitoren	Roche, Mannheim
DEPC (Diethylpyrocarbonat)	Sigma, Deisenhofen
DMSO (Dimethylsulfoxid)	Roth, Karlsruhe
dNTPs (Na-Salze)	Fermentas, St.Leon-Rot
DTT (Dithiothreitol)	Roth, Karlsruhe
Dulbecco's Modified Essential Medium (DMEM)	PAA, Marburg
Basal Medium Eagle (BME)	Sigma, Deisenhofen
EDTA (Ethyldiamintetraacetat)	Merck, Darmstadt
EGTA	Sigma, Deisenhofen
Essigsäure	Merck, Darmstadt
Ethanol	Merck, Darmstadt
Ethidiumbromid	Roche, Mannheim
FCS (Fötale Kälberserum)	Gibco BRL
Formaldehyd 37%	Merck, Darmstadt
Formamid	Merck, Darmstadt
G418-Sulfat (Geneticin)	Gibco BRL
Gelatine	Sigma, Deisenhofen
Glukose	Merck, Darmstadt
Glutamin	Merck, Darmstadt



Glutaraldehyd	Sigma, Deisenhofen
Glycerin	Merck, Darmstadt
Glycin	Roth, Karlsruhe
Guanidiniumisothiocyanat	Sigma, Deisenhofen
HCl	Merck, Darmstadt
Hepes	Roth, Karlsruhe
Hotstar Taq-Polymerase	Qiagen, Hilden
Isoamylalkohol	Merck, Darmstadt
Isopropanol	Sigma, Deisenhofen
Kaliumchlorid	Merck, Darmstadt
Kaliumdihydrogenphosphat (KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> )	Merck, Darmstadt
Kaliumhydrogenphosphat (K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> )	Merck, Darmstadt
Lachssperma-DNA	Sigma, Deisenhofen
Lithiumchlorid	Roth, Karlsruhe
Luziferin	Sigma, Deisenhofen
M2-Agarose	Sigma, Deisenhofen
Magnesiumchlorid	Merck, Darmstadt
β-Mercaptoethanol	Serva, Heidelberg
Methanol	Merck, Darmstadt
Methylenblau	Serva, Heidelberg
Molekulargewichtsmarker	Fermentas, St.Leon-Rot
M-MuLV Reverse Transkriptase	Fermentas, St.Leon-Rot
Natriumacetat	Merck, Darmstadt
Natriumchlorid	Merck, Darmstadt
Natriumdihydrogenphosphat (NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> )	Merck, Darmstadt
Natriumfluorid	Merck, Darmstadt
Natriumhydrogencarbonat	Merck, Darmstadt
Natriumhydrogenphosphat (Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> )	Merck, Darmstadt
Natriumhydroxid	Merck, Darmstadt

Natriumlauroylsarcosin	Sigma, Deisenhofen
Natriumvanadat (Na <sub>3</sub> VO <sub>4</sub> )	Merck, Darmstadt
Nifedipin	Sigma, Deisenhofen
Nonidet P40	Sigma, Deisenhofen
N-Propyl-gallat	Sigma, Deisenhofen
ONPG	Sigma, Deisenhofen
Paraformaldehyd	Sigma, Deisenhofen
PD 98059	Axxora, Lörrach
Penicillin	PAA, Marburg
Phenol	Roth, Karlsruhe
PMSF (Phenylmethylsulfonyl-Fluorid)	Sigma, Deisenhofen
Polybrene	Sigma, Deisenhofen
Pregnenolon	Sigma, Deisenhofen
Pregnenolonsulfat	Sigma, Deisenhofen
Primer	Sigma-Genosys
Progesteron	Sigma, Deisenhofen
Protein-A-Sepharose	GE-Healthcare, München
Ponceau S	Roth, Karlsruhe, Karlsruhe
Reporterlysepuffer	Promega, Mannheim
Ribonuklease Inhibitoren	Fermentas, St.Leon-Rot
RPMI	PAA, Marburg
Saccharose	Roth, Karlsruhe
Salzsäure	Sigma, Deisenhofen
Schwefelsäure	Sigma, Deisenhofen
SDS (Natriumdodecylsulfat)	Roth, Karlsruhe
Sucrose	Roth, Karlsruhe
Taq-Polymerase	Fermentas, St.Leon-Rot
TEMED (N,N,N,N'-Tetramethyl-ethylen-diamin)	Roth, Karlsruhe
Tolbutamid	Sigma, Deisenhofen

TPA	Sigma, Deisenhofen
Tricin	Merck, Darmstadt
Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan	Merck, Darmstadt
Triton X-100 (Octophenolpolyethylen-glykolether)	Serva, Heidelberg
Trypsin 10x	PAA, Marburg
Tween20	Roth, Karlsruhe
Verapamil	Sigma, Deisenhofen
W7	Axxora, Lörrach
X-gal (5-Bromo-4-Chloro-3-Indoyl- $\beta$ -D-galaktopyranosid)	Roche, Mannheim

### **Kits**

BCA Protein Assay	Pierce, Bonn
BrdU, Cell Prolifertation ELISA	Roche, Mannheim
ECLplus	GE-Healthcare, München
Qiaquick PCR Purification Kit	Qiagen, Hilden
QuikChange Lightning Site-Directed Mutagenesis Kit	Stratagene, Heidelberg

### **Lentivirale Transfervektoren**

**pFUWATF2 $\Delta$ N:** Kodiert für eine dominant-negative Mutante von ATF2.

**pFUWmATF3:** Kodiert für die cDNA von murinem ATF3.

**pFUWmATF5:** Kodiert für die cDNA von ATF5.

**pFUWPP2C:** Kodiert für die Proteinphosphatase 2C.

**pFUWDA-Raf:** Kodiert für eine dominant-negative Mutante von Raf.

**pBabepuro3 $\Delta$ B-Raf:ER:** Fusionsprotein von der katalytischen Domäne von B-Raf und der Ligandenbindungsdomäne des Östrogenrezeptor.

**pFUWc-Jun $\Delta$ N:** Kodiert für eine dominant-negative Mutante von c-Jun.

**pFUW $\Delta$ CnA:** Kodiert für eine konstitutiv aktive Mutante von Calcineurin (Rössler et al., 2008).

**pFUWEgr-1/Zn:** Kodiert für eine dominant-negative Mutante der Egr-Proteine.

**pFUWEgr-1/Zn ZF 2/3:** Kodiert für eine dominant-negative Mutante der Egr-Proteine bei der die Cysteine 365 und 396 der Zinkfinger 2 und 3 gegen Serine ausgetauscht wurden.

**pFUW-MKP-1:** Kodiert für die MAP-Kinase Phosphatase 1 (Stefano et al., 2007).

**pFUW-MKP-5:** Kodiert für die MAP-Kinase Phosphatase 5.

**pFUWmNAB2:** Kodiert für den transkriptionellen Korepressor NAB2.

**pFUW-REST/CREB:** Kodiert für eine dominant-negative Mutante von CREB.

**pFUW-REST/Elk-1ΔC:** Kodiert für eine dominant-negative Mutante des ternären Komplexfaktors Elk-1 (Stefano et al., 2006).

**pFUWSp1ΔN:** Kodiert für eine dominant-negative Mutante von Sp1.

**pFWATF3.luc:** Kodiert für ein ATF3-Promotor/Luziferase Reporterogen.

**pFWEgr-1SRE.luc:** Kodiert für ein Luziferase Reporterogen, dessen Expression von den beiden proximalen SRE des Egr-1 Promoters kontrolliert wird.

**pFWEgr-1.1.luc:** Kodiert für ein Luziferase Reporterogen welches die Sequenzen von -239 bis +235 des humanen Egr-1-Gens und damit die beiden proximalen SRE und das CRE-Element enthält.

**pFWEgr-1.2.luc:** Kodiert für ein Luziferase Reporterogen welches die Sequenzen von -490 bis +235 des humanen Egr-1-Gens und damit die drei distalen, die beiden proximalen SRE und das CRE-Element enthält.

**pFWCgB.luc:** Kodiert für ein ChromograninB-Promotor/Luziferase Reporterogen.

**pFWColl.luc:** Kodiert für ein Collagenase-Promotor/Luziferase Reporterogen.

**pFWINS.luc:** Kodiert für ein Insulin-Promotor/Luziferase Reporterogen.

**pFWSynapsin I.luc:** Kodiert für ein SynapsinI-Promotor/Luziferase Reporterogen.

**pLL3.7TrpM3:** Kodiert für eine TrpM3 spezifische shRNA.

**pLL3.7ATF2:** Kodiert für eine ATF2 spezifische shRNA.

**pLL3.7ATF3:** Kodiert für eine ATF3 spezifische shRNA.

Alle lentiviralen Vektoren wurden freundlicher Weise von Prof. Thiel zur Verfügung gestellt.

### **III.5 Zellkultur**

Alle Zellkulturarbeiten wurden steril unter einer Sicherheitswerkbank durchgeführt. Alle Zelllinien und primäre Zellen wurden bei 37°C, 5% CO<sub>2</sub> und 95% Luftfeuchtigkeit im Brutschrank kultiviert. Die verwendeten Medien und Lösungen waren auf 37°C vorgewärmt. In Abhängigkeit von der Zelllinie wurde als Kulturmedium Dulbeccos modified Eagles Medium (DMEM), Roswell Park Memorial Institute 1640 (RPMI) oder Basal Medium Eagle (BME) verwendet. Als Supplement enthielten die Medien 10% hitzeinaktiviertes (30 min, 56°C) fetal calf serum (FCS). Vor der Subkultivierung wurden die Zellen zunächst lichtmikroskopisch hinsichtlich ihrer Morphologie und Konfluenz beurteilt. Die Kultivierung adhärenter Zellen erfolgte in beschichteten Plastikgewebekulturflaschen oder -schalen variabler Größe. Das alte Medium wurde vollständig abgesaugt und der Zellrasen einmal mit 1x PBS gewaschen. Mit 1x Trypsin-Lösung erfolgte dann eine Inkubation bei 37°C, bis sich die Zellen vom Kulturgefäßboden ablösten. Danach wurde frisches Medium zugegeben und die resuspendierten Zellen in neue Kulturgefäße ausgesät.

#### ***III.5.1 Zelllinien und Kulturbedingungen***

##### **III.5.1.1 $\alpha$ T3-1 und $\alpha$ T3M3**

Wildtyp  $\alpha$ T3-1 sowie  $\alpha$ T3M3-Zellen wurden mir freundlicher Weise von Gary Willars (Department of Cell Physiology and Pharmacology, University of Leicester, UK) zur Verfügung gestellt. Bei  $\alpha$ T3-1 Zellen handelt es sich um eine gonadotrope Hypophysenzelllinie der Maus die endogene GnRH-Rezeptoren exprimieren (Windle et al., 1990). Zusätzlich exprimieren die stabil transfizierten  $\alpha$ T3M3 einen rekombinanten muskarinischen M3 Acetylcholinrezeptor (Willars et al., 1998).

**DMEM:**      10% FCS  
                 25 mM Glucose  
                 2mM L-Glutamin  
                 100 U/ml Penicillin  
                 100  $\mu$ g/ml Streptomycin  
  
( $\alpha$ T3M3:      300  $\mu$ g/ml G418)

### III.5.1.2 MIN6

Die murine Insulinoma Zelllinie MIN6 wurden mir freundlicherweise von Franz Schuit (Gene Expression Unit, Department of Molecular Cell Biology, KU-Leuven, Belgien) zur Verfügung gestellt. Im Gegensatz zu anderen  $\beta$ -Zelllinien, die häufig eine veränderte Glukoseempfindlichkeit aufweisen, reagieren die MIN6-Zellen in einem Bereich von 0,7mM bis 25mM Glukose mit einer dosisabhängigen Insulinfreisetzung (Miyazaki et al., 1990).

**DMEM:** 15% FCS  
25 mM Glukose  
75  $\mu$ M  $\beta$ -Mercaptoethanol  
2mM L-Glutamin  
100 U/ml Penicillin  
100  $\mu$ g/ml Streptomycin

Eine 10 mM Mercaptoethanollösung wurde steril filtiert und das entsprechende Volumen zum Medium zugesetzt.

### III.5.1.3 INS-1

Die Ratteninsulinomazelllinie INS-1 (Asfari et al., 1992) wurde freundlicherweise von Claes B. Wollheim und Susanne Ullrich, Division de Biochimie Clinique, Universität Genf, Schweiz) zur Verfügung gestellt.

**RPMI1640:** 10% FCS  
10 mM Hepes  
2mM L-Glutamin  
1mM Na-pyruvat  
50  $\mu$ M  $\beta$ -Mercaptoethanol  
100 U/ml Penicillin  
100  $\mu$ g/ml Streptomycin

#### **III.5.1.4 293T-17**

293T Zellen leiten sich von humanen embryonalen Nierenzellen (293) ab, die mit dem T-Antigen SV40 transformiert wurden (DuBridge et al., 1987; Graham et al., 1977). Diese wurden freundlicherweise von D. Baltimore (Rockefeller University, New York, USA) zur Verfügung gestellt.

**DMEM:** 10% FCS  
25 mM Glukose  
2mM L-Glutamin  
100 U/ml Penicillin  
100 µg/ml Streptomycin

#### **III.5.1.5 Primäre Astrozyten**

Primäre Astrozyten wurden aus dem Cerebrum neugeborener C57Bl/6J Mäusen isoliert (Herstellung s. Kapitel III.5.1.5.1). Es wurden sowohl Wildtyp als auch Egr-1-defiziente Mäuse verwendet, die wir mit freundlicher Genehmigung von Patrick Charnay (Unité 368 de L'institut National de la Santé et de la Recherche Médical, Ecole Normale Supérieure, F-75230 Paris) erhalten haben.

**BME:** 10% FCS  
25 mM Glukose  
2mM L-Glutamin  
100 U/ml Penicillin  
100 µg/ml Streptomycin

##### **III.5.1.5.1 Herstellung primärer Astrozyten**

Neugeborene Mäuse (1-2 Tage) wurden dekapitiert, die Köpfe kurz in 70% EtOH getaucht und anschließend in DISG-Puffer in einer sterilen Schale auf Eis aufbewahrt. Die Schnauze wird mit einer chirurgischen Pinzette fixiert und die Haut über den Ohren eingeschnitten und mit einer Pinzette abpräpariert. Über das Neuralrohr wird die Kalotte an einer Seite aufgeschnitten und die Hirnschale abgezogen. Das Cerebellum und der Nervus Opticus wurden entfernt und das Gehirn in eine neue Schale mit DISG-Puffer überführt. Unter dem Stereomikroskop wurden die Hemisphären von den Meningen befreit, um die Verunreinigung

der Kulturen mit Fibroblasten zu vermeiden. Anschließend wurden die Hemisphären in eine neue Schale überführt und mit einer Mikroschere zerkleinert. Die Fragmente wurden mit 3 ml 0,5% Trypsin/DISG-Puffer versetzt und 10 min bei 37°C inkubiert. Zwischenzeitlich wurde in 2 x 15 ml Röhren 5 ml BME-Medium vorgelegt. Das Gewebe wurde in das erste Röhren überführt um den Trypsinverdau zu stoppen. Nach kurzer Zentrifugation wurde das Sediment in das zweite Gefäß überführt und mit einer durch Schmelzen verengten Pasteurpipette eine Zellsuspension erzeugt. Die homogene Zelllösung wurde in eine 75 cm<sup>2</sup>-Zellkulturflasche gegeben und mit Medium aufgefüllt. Nach 24-48 Stunden erfolgt ein Mediumwechsel.

<b>DISG-Puffer:</b>	137 mM	NaCl
	5,4 mM	KCl
	197 µM	Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>
	35 µM	KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>
	5 mM	Glukose
	58 mM	Saccharose

pH auf 6,5 einstellen und steril filtrieren.

### III.5.1.5.2 Genotypisierung

Um DNA aus Mäuseschwanzbiopsien zu gewinnen wurde ein Chelex-100 haltiger Lysepuffer verwendet. Chelex-100 ist ein Kationenaustauscherharz, der divalente Metallionen sowie polare Zellkomponenten bindet, die die PCR-Reaktion stören könnten (Walsh et al., 1991). Mäuseschwanzbiopsien von neugeborenen Mäusen wurden in ein Eppendorfgefäß überführt, mit 200 µl Chelex-Lysispuffer und 10 µl Proteinase K (10 mg/ml) versetzt und über Nacht bei 55°C inkubiert. Die gewonnene DNA-Suspension wird 2 min bei 16.000 x g zentrifugiert, der Überstand wird in ein neues Eppendorfgefäß überführt, zur Inaktivierung der Proteinase K 10 min bei 95°C gekocht und erneut 4 min bei 16.000 x g zentrifugiert. Die so gewonnene DNA wird 1:5 verdünnt und je 2 µl der genomischen DNA pro PCR-Ansatz verwendet.

Zum Nachweis des zerstörten Egr-1 Gens wurde ein Set aus 3 Primern verwendet (Topilko et al., 1997): ein gemeinsamer 5' Primer der in der kodierenden Sequenz des Egr-1-Gens liegt (5'-GAGTGTGCCCTCAGTAGCTT-3') und zwei verschiedene 3'-Primer von denen einer komplementär zum Egr-1 Gen ist (5'GGTGCTCATAGGGTGTTCGCT-3') und der andere an das LacZ-Gen bindet (5'-AACGACTGTCCTGGCCGTAACC-3'). Die PCR



Amplifikation umfasst 35 Zyklen bestehend aus 15 Sek. Denaturierung der DNA bei 96 °C, 30 Sek. „Annealing“ bei 55°C und einer anschließenden 50 Sek. dauernden Elongation bei 72°C.

**Chelex-Lysepuffer:** 0,5 % Natrium-Lauroylsarcosin

0,1 M NaCl

50 Chelex-100

### **III.5.1.5.3 Immunfluoreszenz**

Zur Überprüfung der Reinheit der Astrozytenkulturen wurde die Expression des „Glial Fibrillary Acidic Protein“ (GFAP) untersucht. Das Prinzip der Immunhistochemie beruht auf der Markierung von Epitopen mit Hilfe fluoreszenzgekoppelter Antikörper. Man verwendet dazu einen nicht markierten, primären Antikörper, der das Epitop erkennt. Ein sekundärer, fluoreszenzmarkierter, Antikörper ist gegen den primären Antikörper gerichtet. Da mehrere Antikörper an einen primären Antikörper binden, führt diese Methode zu einer Signalverstärkung. Die Zellen werden zuerst fixiert, dann wird die Zellmembran durch Detergenzien teilweise permeabilisiert. Anschließend wird die Antikörpermarkierung durchgeführt. Unter dem Fluoreszenzmikroskop kann die Lokalisierung der Antikörper und damit der markierten Proteine analysiert werden.

#### ***Beschichtung der Deckgläser***

Deckgläser der benötigten Größe wurden in 0,5% Gelatine/PBS- Lösung in einer kleinen Schale geschüttelt und anschließend zwei Mal mit 1 x PBS gewaschen. Zwanzig Minuten wurden die Gelatine mit 2 % Glutaraldehyd quervernetzt und erneut zwei Mal mit 1 x PBS gewaschen. Die beschichteten Deckgläser wurden in 70% Ethanol geschwenkt um sie für die sterile Zellkultur vorzubereiten. Nachdem sie mit 1 x PBS mehrmals gewaschen wurden schüttelten sie erneut 1 Stunde in 1 x PBS. Nachdem das PBS erneuert wurde konnten die Deckgläser bei 4 °C gelagert werden.

#### ***Immunfluoreszenz***

Die Zellen wurden auf den gelatinebeschichteten Deckgläsern kultiviert und mit 2 % Paraformaldehyd für 30 Minuten bei 4 °C fixiert. Nachdem die fixierten Zellen mit PBS gewaschen wurden, wurden sie mit 0,1 % Triton X-100 30 min permeabilisiert. Um unspezifische Bindung des Antikörpers zu verhindern, wurden die so vorbereiteten Zellen in 0,5 % BSA inkubiert. Der Primärantikörper wurde in einer entsprechenden Verdünnung über

Nacht bei 4°C inkubiert. Am folgenden Tag wurden die Deckgläser 6 x fünf Minuten in einem großen Überschuss 1 x PBS/0,1 % Triton X-100 gewaschen. Der Sekundärantikörper wurde in einer 1:1000 Verdünnung auf die Deckgläser gegeben und eine Stunde bei Raumtemperatur inkubiert. Daraufhin wurden die Deckgläser wiederum 6 x 5 Minuten in 1 x PBS/ 0,1 % Triton X-100 gewaschen. Nach dem letzten Waschschrift erfolgte das Eindeckeln der Deckgläser mit 1,5 % N-Propylgallat (in 60 % Glycerin).

### ***III.4.2 Kryokonservierung und Rekultivierung von Zellen***

Die in dieser Arbeit verwendeten Zellen wurden zur langfristigen Sicherung des Zellbestandes in flüssigem Stickstoff gelagert. Zellen, die sich in der logarithmischen Wachstumsphase befanden, wurden in ein 50 ml Reaktionsgefäß überführt und bei 200 x g, und 4°C 3 min (Eppendorf, Centrifuge 5810R) zentrifugiert. Das im Einfriermedium resuspendierte Zellsediment konnte anschließend in Kryogefäße überführt werden. Um den Einfrierprozess so schonend wie möglich zu gestalten, wurden die Kryogefäße in Papier gewickelt, in eine Styroporschachtel gestellt und für einen Tag bei -80°C langsam heruntergekühlt. Anschließend erfolgte die Lagerung der Zellen in flüssigem Stickstoff.

Zur Rekultivierung von Zellen für entsprechende Experimente wurden die gefrorenen Zellen im 37°C warmen Wasserbad aufgetaut und sofort in 5 ml vorgewärmtem Medium aufgenommen. Nach einer Zentrifugation bei 200 x g, 3 min bei 25°C (Eppendorf, Centrifuge 5810R) erfolgte die Resuspension der Zellen in frischem Medium und die Kultivierung in Gewebekulturflaschen mit 25 cm<sup>2</sup> Wachstumsfläche. Zur Sicherstellung optimaler Wachstumsbedingungen wurde das Medium nach einem Tag gewechselt.

**Einfriermedium:** 90% (v/v) FCS  
10% (v/v) DMSO

### ***III.4.3 Synchronisation der Zellen in der G<sub>0</sub>-Phase***

Serumentzug durch Reduktion des Anteils an Serum im Kulturmedium in Kombination mit Kontaktinhibition ist eine häufig eingesetzte Methode, um Zellen in der G<sub>0</sub>-Phase reversibel zu arretieren (Davis et al., 2001; Merrill, 1998). Die verwendeten Zellen wurden in entsprechender Anzahl in Gewebekulturschalen ausgesät und 24 h in serumhaltigem Medium kultiviert. Das Medium wurde vollständig abgesaugt und nach zweimaligem Waschen mit

PBS durch serumfreies Medium ersetzt. In diesem Mitogenmangel-Medium erfolgte die Inkubation der Zellen für weitere 24 h. Zur Untersuchung der glukosesensitiven MIN6 – Zellen wurde zusätzlich noch auf Glukose im Medium verzichtet. Die synchronisierten Zellen wurden anschließend entsprechend der Applikation weiter behandelt.

#### ***III.4.4 Proliferationsanalysen***

Zur Bestimmung der Proliferationsrate der Zellen wurde das Cell Proliferation ELISA, BrdU (colorimetric) Kit der Firma Roche verwendet. Die Proliferation wurde über die Menge des inkorporierten Thymidinanalogon Bromodeoxyuridin (BrdU) ermittelt. Das Testprinzip beruht darauf, dass das Analogon BrdU bei der DNA-Replikation während der S-Phase anstelle des Thymidin in die DNA eingebaut wird (Gratzner, 1982). Nach Denaturierung und Fixierung der Zellen folgte die Detektion über einen spezifischen Peroxidase-gekoppelten Antikörper. Die Durchführung des Assays erfolgte nach den Angaben des Herstellers. Die Peroxidase-Reaktion wurde mit 1M Schwefelsäure gestoppt und bei 450nm gegen 650nm gemessen.

#### **Durchführung:**

Je 10.000 Zellen wurden in eine 96-Lochplatte ausgesät. Am folgenden Tage wurde den Zellen das Serum entzogen und für weitere 24 Stunden kultiviert. Die folgende Stimulation der Zellen mit dem entsprechenden Wirkstoff wurde abermals 24 Stunden durchgeführt. Nach abgeschlossener Inkubationszeit wurde den Zellen BrdU-POD zugegeben und dieser 4 Stunden bei 37 °C inkubiert. Die Zellen wurden daraufhin 30 Minuten fixiert und anschließend für 90 Minuten mit der Antikörperlösung inkubiert. Der Umsatz des zugegebenen Substrates konnte kolorimetrisch gemessen werden.

#### ***III.4.5 Lentivirale Transfektion***

Das zum Gentransfer verwendete lentivirale Grundgerüst basiert auf einem selbst-inaktivierenden Vektor der unter der Kontrolle des humanen Ubiquitinpromotors steht (Lois et al., 2002). Um den sehr eingeschränkten Tropismus des HI-Virus zu umgehen wurden die Viren mit dem Protein G des Vesikular-Stomatitis-Virus (VSV-G) pseudotypisiert (Akkina et al., 1996; Reiser et al., 1996). Das zu untersuchende Gen enthält im Transferplasmid die Verpackungssequenz  $\psi$  die eine Verpackung der viralen RNA in die Hüllproteine

gewährleistet. Eine Erhöhung der Expression der lentiviral eingeführten Transgene wird durch den Einbau eines posttranskriptionell regulierend wirkendem Element des Waldmurmeltier-Hepatitis-Virus (WPRE) bewerkstelligt. WPRE ist eine RNA-Sequenz mit ausgeprägter Sekundärstruktur, die den Export von einfach- und ungespleißter Provirus-RNA ins Zytosol fördert (Zufferey et al., 1999). Außerdem vereinfacht das HIV-flap-Element den Kerntransport der Viren-DNA (Sirven et al., 2000) und erhöht damit den Virentiter. In dieser Arbeit wurde der Gentransfer durch Kotransfektion von 3 separaten Plasmiden durchgeführt. Die Verpackungszelllinie 293T wird mit einem Verpackungsplasmid, dem VSV-G Expressionsplasmid und einem selbstinaktivierenden (SIN) Transfervektor (Zufferey et al., 1998) kotransfiziert. Die gebildeten Virenpartikel werden nach 2-3 Tagen auf die Zielzellen gegeben um den eigentlichen Gentransfer durchzuführen.

#### **III.4.5.1 Kalziumphosphat Transfektion**

Zur Herstellung der benötigten Virenpartikel wurde die  $\text{Ca}^{2+}$  Phosphat-Transfektion verwendet.

##### **Durchführung:**

$2,3 \times 10^6$  293T-Zellen wurden ausgesät und 24 h in 10% DMEM kultiviert. Für jede Kalziumphosphattransfektion ( $\text{CaCl}_2$ / DNA Suspension) wurde ein Mix aus zwei unterschiedlichen Lösungen angesetzt:

Lösung 1: benötigte Menge DNA wurde mit Wasser auf 250  $\mu\text{l}$  aufgefüllt und mit 27,5  $\mu\text{l}$  2,5 M  $\text{CaCl}_2$ -Lösung versetzt und langsam zu Lösung 2 gegeben.

Lösung 2 (2 x HBSS): 274 mM NaCl, 25 mM KCl, 3,75 mM  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ , 27,75 mM Glukose und 105 mM HEPES pH 7,05- 7,12.

Das Medium wurde durch Chloroquinhaltiges (25  $\mu\text{M}$ ) Medium ersetzt und 500  $\mu\text{l}$  der Kalziumchlorid/ DNA-Suspension zugegeben. Chloroquin erhöht die Transfektionseffizienz, in dem es durch Neutralisation des pH-Wertes innerhalb der Vesikel lysosomale DNAsen hemmt. Nach acht Stunden Inkubation bei 37°C unter 5%  $\text{CO}_2$  wurden die Zellen zwei Mal mit PBS gewaschen um Reste des Chloroquinhaltigen Mediums zu entfernen und mit frischen Medium versetzt. Nach zwei bis drei Tagen wurden die Virenpartikel im Überstand geerntet.

#### **III.4.5.2 Lentivirale Infektion**

24 Stunden vor der Infektion wurden die Zielzellen in Gewebekulturschalen bzw. -Platten ausgesät. Zum Zeitpunkt der Infektion wurden die Virenüberstände aus der vorangegangenen

Transfektion der Verpackungszelllinie in neue Gefäße überführt und das virenhaltige Medium durch Cellulosefilter mit 45 µm Porengröße filtriert, um eine Kontamination der Zielzellen mit der Verpackungszelllinie zu verhindern. Nach Zugabe von 8 µg/ml Polybrene, einem Polykation, welches die Adsorption der Virenpartikel an die Zelloberfläche erleichtert, zum virenhaltigen Überstand wurde dieser auf die am Tag zuvor ausgesäten Zielzellen gegeben. Nach 12-16 h Inkubation bei 37°C und 5% CO<sub>2</sub> wurde der Virenüberstand abgenommen und durch frisches Kulturmedium ersetzt. Nachfolgende Versuche wurden am zweiten Tag nach der Infektion durchgeführt.

### ***III.4.6 Reportergenanalysen***

In einem Luziferase-Reportergen-Assay ist der zu untersuchende Promotor dem Reportergen (Luziferase) vorangestellt, so dass bei Aktivierung des Promotors die Transkription der Luziferase induziert wird. Wird Luziferase exprimiert, setzt sie das Substrat D-Luziferin in Oxyluciferin und Licht um, wodurch sich die vorhandene Menge an Luziferase und damit der Grad der Promotor-Aktivierung quantifizieren lässt. In dieser Arbeit wurden die entsprechenden Reportergene mittels lentiviralem Gentransfer in das Genom der Wirtszelle integriert und erlaubt so die Untersuchung der Transkriptionsaktivierung unter den restriktiven Bedingungen der ins Chromatin eingebetteten Gene.

Die Versuche wurden in vierfacher Ausführung durchgeführt um eine statistische Auswertung der Ergebnisse zu erlauben. Die Zellen wurden in 50-100 µl Reporterlysepuffer aufgeschlossen. Je 10 µl des erhaltenen Gesamtzellextrakts wurden mit 100 µl Working Luciferase Assay Reagent (WLAR) versetzt und die Luziferaseaktivität im Luminometer bestimmt. Die relative Luziferaseaktivität wurde durch Normalisierung der Luziferaseaktivitäten über die Proteinkonzentration der jeweiligen Probe ermittelt.

#### **Working Luciferase Assay Reagent (WLAR)**

9 Vol. Luciferase Assay Reagent Stock (LARS)

1 Vol. 4,7 mM Luziferin

#### **Luciferase Assay Reagent Stock (LARS)**

22 mM Tricine (pH 7,8)

1,177 mM (MgCO<sub>3</sub>)<sub>4</sub>Mg(OH)<sub>2</sub> x 5 H<sub>2</sub>O

2,94 mM MgSO<sub>4</sub> x 7 H<sub>2</sub>O

0,11 mM EDTA ( Natriumsalz)

36,3 mM DTT

297  $\mu$ M Koenzym A (Natriumsalz)

583  $\mu$ M ATP (Natriumsalz)

## **III.5 Proteinbiochemische Analysen**

### ***III.5.1 Herstellung von Proteinextrakten***

#### **III.5.1.1 Ganzzellextrakt**

Bei der Herstellung von Ganzzellextrakten wurde zum Zellsediment das gleiche Volumen an eiskaltem Lysepuffer zugegeben, das dem Volumen des Zellsedimentes entsprach. Durch mehrfaches schnelles Ziehen des Reaktionsgefäßes über einen Eppendorfständer wurden die Zellen durch auftretende Scherkräfte mechanisch aufgeschlossen. Die Proben wurden für zwanzig Minuten auf Eis inkubiert, wobei alle fünf Minuten die Suspension gemischt wurde. Nach einer Zentrifugation für 10 min bei 13000 x g und 4°C (Heraeus, Biofuge pico) konnte der Überstand, der den Ganzzellextrakt darstellte, vollständig abgenommen werden. Nach Bestimmung des Proteingehaltes (s. Kapitel III.5.2) wurde der Extrakt mit 2 x SDS-Probenpuffer versetzt und bei -20°C gelagert werden.

<b>Lysispuffer:</b>	10 mM	Tris/HCl pH 8,0
	1 mM	EDTA
	400 mM	NaCl
	10 % v/v	Glycerol
	0,5 % v/v	NP40 (frisch dazu)
	1 mM	DTT (frisch dazu)
	1 x	Complete Proteaseinhibitormix (25x) (frisch dazu)

#### **III.5.1.2 Kernextrakt**

Zur Gewinnung der Kernproteine wurden die Zellen zunächst durch Zugabe von 100  $\mu$ l des hypotonen Puffers A und einem zusätzlichen Detergenz (NP40) aufgeschlossen. Durch

mehrfaches schnelles Ziehen des Reaktionsgefäßes über einen Eppendorfständler konnten die Zellen durch auftretende Scherkräfte zusätzlich auch mechanisch aufgeschlossen werden. Nach 20 minütiger Inkubation auf Eis und anschließender Zentrifugation der Zellsuspension enthielt der Überstand die zytosolischen Proteine, das Pellet die Kernfraktion. Durch Zugabe von 20-50 µl des hochmolaren Salzpuffers C wurden die Kerne aufgeschlossen und nochmals 20 min auf Eis inkubiert. Nach dem Zentrifugieren wurde die im Überstand enthaltene Kernfraktion in ein neues Eppendorfgefäß überführt. Nach der Bestimmung des Proteingehalts (s.Kapitel III.5.2) wurden die Proben mit 2 x SDS-Puffer versetzt.

<b>Puffer A:</b>	10 mM	HEPES/ KOH p 7,9
	1,5 mM	MgCl <sub>2</sub>
	10 mM	KCl
	0,5 % v/v	NP40 (frisch dazu)
	0,5 mM	DTT (frisch dazu)
	0,2 mM	PMSF (frisch dazu)
	1 x	Complete Proteaseinhibitormix (25x) (frisch dazu)

<b>Puffer C:</b>	20 mM	HEPES/ KOH p 7,9
	25 %	Glycerol
	420 mM	NaCl
	1,5 mM	MgCl <sub>2</sub>
	0,5 mM	DTT (frisch dazu)
	0,2 mM	PMSF (frisch dazu)
	1 x	Complete Proteaseinhibitormix (25x) (frisch dazu)

<b>SDS-Auftragspuffer (Stock):</b>	125 mM	Tris pH 6,8
	3 mM	EDTA
	20%	Glycerol
	9 %	SDS
	0,05%	Bromphenol Blau

<b>SDS-Auftragspuffer-Puffer:</b>	9 Vol.	SDS-Auftragspuffer-Stocklösung
	1 Vol.	β- Mercaptoethanol

### III.5.1.3 Präparation von Membranproteinen

Das Zellsediment wurde zur Lyse in 300 µl CLB-Puffer resuspendiert und die Zellen mittels Ultraschall aufgeschlossen. Größere Fragmente und die Zellkerne wurden bei 2500 rpm 10 min durch Zentrifugation abgetrennt. Das Pellet konnte zur Kernextraktion (s. Kapitel III.5.1.2) verwendet werden. Der Überstand, der die Membranproteine enthielt, wurde in der Ultrazentrifuge bei 125.000 x g 60 min bei 4°C zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das Pellet in 50 µl 25 mM HEPES/SDS, pH7,4, aufgenommen.

<b>CLB-Puffer:</b>	250 mM	Sucrose
	20 mM	HEPES pH 7,4
	1 mM	EGTA

### III.5.2 Proteinbestimmung

Der BCA-Assay kombiniert die Biuret-Reaktion (Reduktion von  $\text{Cu}^{2+}$  zu  $\text{Cu}^{1+}$  durch Protein unter alkalischem pH) und die Fähigkeit von BCA, mit  $\text{Cu}^{1+}$  einen stabilen, photometrisch messbaren Komplex zu bilden. Dafür wurden je 2 µl des zu messenden Proteinextrakts mit 100 µl Reaktionslösung versetzt und 30 Minuten bei 37°C inkubiert. Die Messung erfolgte bei 562 nm. Als Standard dienten BSA-Lösungen in einer Konzentration von 0, 200, 400, 600, 800, 1000, 1200 µg/ml. Die Konzentrationsbestimmung erfolgte durch Interpolation der Standardkurve.

### III.5.3 SDS-Gelelektrophorese

Die diskontinuierliche SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE) wurde angewendet, um Proteine entsprechend ihres Molekulargewichtes aufzutrennen. Dazu wurden 1 mm dicke Polyacrylamidgele unterschiedlicher Konzentrationen hergestellt. Die Proben wurden mit 2x SDS-Auftragspuffer versetzt und fünf Minuten bei 95°C gekocht. Nach Beladung der Gele mit den denaturierten Proben und dem vorgefärbten Molmassenmarker erfolgte die elektrophoretische Auftrennung bei 25 mA je Gel.



**Acrylamid-Lösung:** 30% Acrylamid  
0,8 % Bis-Acrylamid

<b>Trenngel</b>	<b>Acrylamid-Lösung [ml]</b>	<b>1M Tris/HCl, pH 8,8 [ml]</b>	<b>H<sub>2</sub>O [ml]</b>	<b>10 % APS [µl]</b>	<b>TEMED [µl]</b>
7,5 %	2,5	2,5	4	100	10
10 %	3,3	2,5	3,5	100	10
15 %	5	2,5	1,5	100	10

<b>Sammelgel</b>	<b>Acrylamid-Lösung [µl]</b>	<b>1M Tris/HCl, pH 8,8 [µl]</b>	<b>H<sub>2</sub>O [ml]</b>	<b>10 % APS [µl]</b>	<b>TEMED [µl]</b>
5 %	350	750	1,4	30	3

**1x Laemmli-Laufpuffer:** 3,03 g Tris  
14,22 g Glycin  
1 g SDS  
auf 1 l mit H<sub>2</sub>O auffüllen

### ***III.5.4 Western Blot***

Mit Hilfe der Western-Blot-Technik können durch SDS-PAGE (s. Kapitel III.5.3) aufgetrennte Proteine auf eine Transfermembran übertragen werden, um anschließend mit immunochemischen Techniken analysiert und charakterisiert zu werden (Towbin et al., 1979). Zur Immobilisierung der elektrophoretisch aufgetrennten Proteine auf Nitrocellulose-Membranen wurde das Nass-Elektroblot-Verfahren angewendet. Nach einer Transferzeit von neunzig Minuten bei 400 mA erfolgte die Inkubation der Membran für mindestens 60 Minuten in 5% (w/v) Magermilchpulver in 1x TBS, um unspezifische Bindestellen zu blockieren. Die Inkubation mit dem primären Antikörper wurde entweder für 3 Stunden bei Raumtemperatur oder über Nacht bei 4°C durchgeführt. Der sekundäre enzymgekoppelte Antikörper wurde nach dreimaligem Waschen der Membran in 1x TBS(T) für eine Stunde bis anderthalb Stunden bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wurde die Membran mehrmals mit 1x TBS(T) gewaschen. Die Detektion der immobilisierten Antigen-Antikörper-Komplexe erfolgte nun durch katalysierte Reaktionen der Enzyme, die mit den sekundären

Antikörpern konjugiert waren. Bei horseradish peroxidase (HRP)-gekoppelten sekundären Antikörpern erfolgte der Nachweis durch die sensitive „Enhanced Chemoluminescence Reaction“ (ECL). Hierbei kommt es unter alkalischen Bedingungen zur Peroxidase-katalysierten Oxidation des Diazylhydrazids Luminol, welches im angeregten Zustand Licht emittiert, das über einen Film als Schwärzung nachgewiesen wird. Zunächst mussten zwei Lösungen hergestellt werden, die separiert einerseits das Substrat Luminol und den Enhancer para-Coumarsäure, andererseits das Oxidationsmittel  $H_2O_2$  enthielten. Diese Lösungen wurden unmittelbar vor der Detektion vereinigt und die Membran fünf Minuten darin inkubiert. Anschließend wurde die Membran zwischen zwei Folien platziert und die Expositionszeit der darauf gelegten Filme je nach Signalstärke variiert.

**ECL-Lösung 1:** 100 mM Tris/HCl pH 8,5

**ECL-Lösung 2:** 5,4 mM  $H_2O_2$   
2,5 mM Luminol  
100 mM Tris/HCl pH 8,5  
400  $\mu$ M para-Coumarsäure

### ***III.5.5 “Strippen” der Nitrozellulosemembran***

Um denselben Immunoblot mit unterschiedlichen Antikörpern behandeln zu können, wurden die Antikörper mit Hilfe eines speziellen Puffers von der Membran gelöst. Dies ermöglichte eine erneute Antikörperinkubation. Die Membran wurde 30 min bei 50 °C mit Stripping-Puffer inkubiert und anschließend drei Mal 10 min mit TBST gewaschen. Danach wurden die unspezifischen Bindungsstellen mit 5 % Magermilchpulver geblockt, um anschließend die nächste Antikörperinkubation durchführen zu können.

**Stripping-Puffer:** 62,5 mM Tris pH 6,7  
2 % SDS  
100  $\beta$ -Mercaptoethanol

### III.5.6 Antikörper

Die für Immundetektion, Immunpräzipitation und Immunfluoreszenz verwendeten primären und sekundären Antikörper sind in Tabelle 1 und 2 näher beschrieben. Für die Immundetektion wurde die entsprechende Antikörper-Lösung in der angegebenen Verdünnung und entsprechenden Lösungsmittel inkubiert.

**Tabelle 1: Primäre Antikörper :**

<b>Antikörper</b>	<b>Verdünnung</b>	<b>Referenzen</b>
Egr-1	1:1000 WB 5 µl ChIP	Santa Cruz, Heidelberg, #sc-189
Egr-2	5 µl ChIP	Santa Cruz, Heidelberg, # sc-20690
Egr-3	5 µl ChIP	Santa Cruz, Heidelberg, # sc-191
P-CREB	1:1000 WB 5 µl ChIP	Upstate, Hamburg # 06-519
CREB	1:1000 WB	Upstate, Hamburg # 06-863
P-ATF2	1:1000 WB 5 µl ChIP	Santa Cruz, Heidelberg # sc-8398
HDAC-1	1:3000 WB	Upstate, Hamburg, # 05-100
P-ERK1/2	1:5000 WB	Promega, Mannheim # V8031
Sp1	1:1000 WB	Santa Cruz, Heidelberg, # sc-59
P-c-Jun	1:1000 WB 5 µl ChIP	Upstate, Hamburg # 06-569
c-Jun	1:2500 WB	Epitomics # 1254-1
P-Elk-1	1:1000 WB 5 µl ChIP	Santa Cruz, Heidelberg, # sc-8406
ATF3	1:1000 WB	Santa Cruz, Heidelberg, # sc-188
ER	1:1000 WB	Santa Cruz, Heidelberg, # sc-542
Anti-FLAG M2	1:3000 WB	Sigma, Deisenhofen, # F3165
Synapsin	1:3000 WB	T.Südhof, UTSouthwestern
Histon H3 (dimethyl K9)	4 µl ChIP	Abcam, Cambridge, UK # ab7312
Histon H3 (trimethyl K4)	4 µl ChIP	Abcam, Cambridge, UK # ab8580

**Tabelle 2: Sekundäre Antikörper**

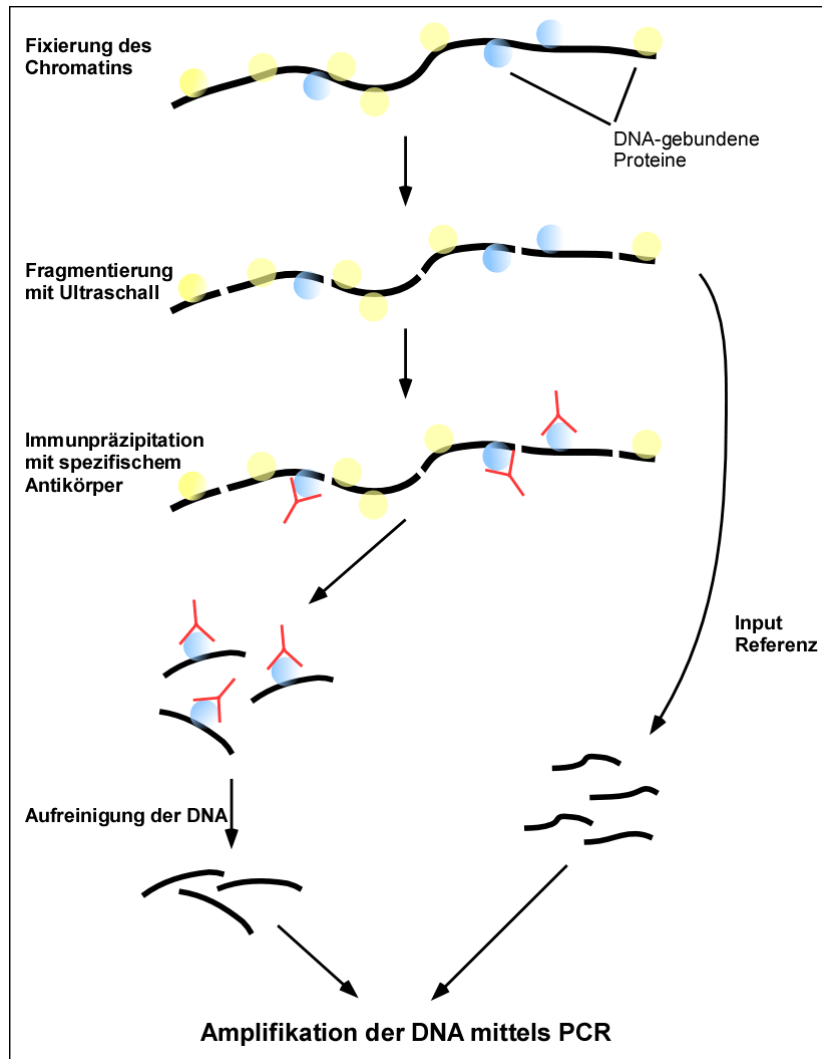
<b>Antikörper</b>	<b>Verdünnung</b>	<b>Referenzen</b>
Anti-Kaninchen-IgG HRP Konjugat	1:10000	Dianova, Hamburg, #111-035-003
Anti-Maus-IgG HRP Konjugat	1:10000	Sigma, Deisenhofen, #A-4416

### **III.6 Arbeiten mit DNA**

Alle Arbeiten mit DNA (Plasmidpräparation, Bestimmung der DNA-Konzentration, enzymatische Reaktionen und Aufreinigung der DNA-Fragmente) wurden nach allgemeinen Standardmethoden der Molekularbiologie durchgeführt.

#### ***III.6.1 ChIP Assay***

Der Chromatin Immunoprecipitation Assay ist eine Methode mit der die Bindung von Proteinen, wie z.B. Transkriptionsfaktoren an die DNA, in vivo nachgewiesen werden kann. Es werden zwei Phasen unterschieden: Erstens die Fixierung der Proteine an die DNA und zweitens die anschließende Immunpräzipitation des DNA-Protein-Komplexes mittels spezifischer Antikörper (Kuo & Allis, 1999).



**Abbildung 5: Schematische Abfolge des Chromatin Immunoprecipitation Tests.** Die Quervernetzung von DNA und Proteinen wird durch Formaldehydfixierung der Zellen gewährleistet. Die darauffolgende Fragmentierung mittels Ultraschall dient der Herstellung ca. 400-600 bp großer Fragmente. Durch Bindung spezifischer Antikörper an die zu untersuchenden Proteine kann die gebundene DNA immunpräzipitiert werden. Ein Proteinase K-Verdau resultiert in proteinfreien DNA-Fragmenten, die durch PCR-Reaktionen amplifiziert werden können.

Die zu untersuchenden Zellen wurden auf 100 mm<sup>2</sup> Zellkulturschalen bis zu einer Konfluenz von ca. 90% kultiviert. Nach der Serumreduktion und anschließender Stimulation der Zellen mit dem entsprechenden Wirkstoff wurden die Proteine mit der DNA durch Zugabe von 37% Formaldehyd zu einer Endkonzentration von 1% direkt im Medium für 10 min quervernetzt. Die Reaktion wurde durch Zugabe von 250 mM Glycin gestoppt und die Zellen anschließend mit PBS gewaschen und geerntet. Die geernteten Zellen wurden in ein Eppendorfgefäß überführt und 5 min bei 700 x g zentrifugiert. Zum Aufschluss der Zellen wurde das Pellet in 1 ml Zellysepuffer resuspendiert und 10 min auf Eis inkubiert. Die Zellkerne wurden durch Zentrifugation (5 min bei 8000 x g) separiert und mit 400 µl Kernlysepuffer aufgeschlossen. Nach 10 minütiger Inkubation auf Eis wurde das Chromatin durch Ultraschall in ca. 500 bp

große Fragmente zerkleinert. Die Suspension wurde 5 min bei 16.000 x g zentrifugiert, um Kernhüllen und größere Fragmente abzutrennen. Der Überstand wurde in ein neues Eppendorfgefäß überführt und 1:5 in Chip-Puffer verdünnt. Zur Vorreinigung der DNA-Fragmente wurde zu den Ansätzen jeweils 80 µl Protein-A-Sepharose gegeben und 30 min bei 4°C geschüttelt. Der nun gereinigte Überstand wurde in 3 Fraktionen aufgeteilt. Die erste Fraktion wurde als Input-Kontrolle zurückbehalten und erst wieder bei der reversen Quervernetzung weiterbehandelt. Das zweite Aliquot wurde mit Antikörper versetzt. Der verbleibende Rest fungierte als Negativkontrolle der kein Antikörper oder Präimmunserum zugesetzt wurde. Die Antikörperinkubation erfolgte über Nacht bei 4°C. Für die Präzipitation der Antikörper-Protein-DNA-Komplexe wurde Protein A-Sepharose verwendet. Bei Protein A handelt es sich um ein Oberflächenprotein von *Staphylococcus aureus*, welches die Eigenschaft besitzt, die Fc-Domäne von Antikörpern zu binden. Diese Bindung ist reversibel und kann durch Detergenzbehandlung oder sauren pH-Werten aufgelöst werden. Jede Probe wurde mit 80 µl Protein-A-Sepharose versetzt und eine Stunde geschüttelt. Anschließend wurden die Immunkomplexe sukzessiv mit low-salt-Puffer, high-salt-Puffer, LiCl-wasch-Puffer und 2-mal mit TE-Puffer gewaschen. Schließlich wurden die Immunkomplexe durch Zugabe von 250 µl Elutionspuffer von der Protein-A-Sepharose gelöst. Die Immunkomplexe wurden 15 Minuten in dem Elutionspuffer geschüttelt, der Überstand in ein neues Eppendorfgefäß überführt und die DNA erneut mit 250 µl Elutionspuffer versetzt. Die beiden Fraktionen wurden vereinigt und mit 1µl 10 mg/ml RNaseA und 20 µl 5 M NaCl versetzt und für vier Stunden bei 65°C inkubiert. Die Fällung der DNA erfolgte durch Zugabe von 0,8 Vol Isopropanol über Nacht bei -20°C. Nach dem Waschen des so gewonnenen DNA-Pellets mit 70% EtOH wurde das Pellet in Wasser aufgenommen, mit 10 µl 0,5 M EDTA, 20 µl 1M Tris/HCl pH 6,5 und 1 µl 20 mg/ml Proteinase K versetzt und für eine Stunde bei 45 °C inkubiert, um die Proteine von der DNA zu lösen. Aufgereinigt wurde die DNA über Säulen der Firma Qiagen (QiaQuick Spin PCR Purification Kit) laut den Herstellerangaben. Die Amplifikation der DNA erfolgte durch PCR-Reaktion mit spezifischen Primer für das zu untersuchende Gen.

<b>Cell-Lysis-Buffer:</b>	5 mM	Pipes (KOH) pH 8,0
	85 mM	KCl
	0,5 %	NP-40

<b>Nuclear-Lysis-Buffer:</b>	50 mM	Tris pH 8,1
------------------------------	-------	-------------

	10 mM	EDTA
	1 %	SDS
<b>CHIP-Buffer:</b>	0,01 %	SDS
	1,1 %	Triton X-100
	1,2 mM	EDTA
	16,7 mM	Tris pH 8,1
	167 mM	NaCl
<b>Low-salt-buffer:</b>	0,1 %	SDS
	1 %	Triton X-100
	2 mM	EDTA
	20 mM	Tris pH 8,1
	150 mM	NaCl
<b>High-salt-buffer:</b>	0,1 %	SDS
	1 %	Triton X-100
	2 mM	EDTA
	20 mM	Tris pH 8,1
	500 mM	NaCl
<b>Li-wash-buffer:</b>	0,25 M	LiCl
	1%	NP-40
	1 %	Desoxychololat
	1 mM	EDTA
	10 mM	Tris pH 8,0
<b>Elution-buffer:</b>	1 %	SDS
	0,1 M	NaHCO <sub>3</sub>

### ***III.6.2 EMSA (Electrophoretic mobility shift assay)***

DNA-Sequenzen, die *in vitro* von Proteinen aus Zellkern-Extrakten gebunden werden, können mittels EMSA identifiziert werden, basierend auf dem Prinzip, dass Protein-DNA-Komplexe ein anderes Laufverhalten im Gel zeigen als DNA Fragmente allein (Fried & Crothers, 1981; Henninghausen & Lubon, 1987).

Die Bindungsreaktion erfolgte 10 min bei RT. Dabei wurden pro Ansatz 10 µl Kerndialysepuffer mit 2 µl EMSA-Puffer, 1 µl 2 mM ZnCl<sub>2</sub>, 1 µl Poly-dIdC (Roche, Mannheim) und 3 µg Kernextrakt versetzt. Nach Ablauf der Inkubationszeit wurde die radioaktiv-markierte DNA-Probe zugefügt und weitere 15 min bei RT inkubiert. Anschließend wurden die Proben direkt auf ein natives Polyacrylamidgel geladen, welches 1,5 h bei 100 V vorgelaufen war. Das Gel lief bei 4°C mit 200 V für 5-6. Das Gel wurde anschließend für 2 h bei 60 °C getrocknet. Die Filmexposition erfolgte über Nacht bei -80°C. Die radioaktiv-markierte Probe enthielt 4 aufeinander folgende Egr-1 Bindestellen und wurde mir durch Prof. Thiel zur Verfügung gestellt.

**Kerndialysepuffer:** 25 mM HEPES, pH 7,6  
 0,1 mM EDTA  
 40 mM KCl  
 10 % Glycerol  
 1 mM DTT

**EMSA-Puffer:** 150 mM HEPES, pH 7,6  
 100 mM KCl  
 2,5 mM DTT  
 40 mM Spermidin  
 1 mg/ml BSA  
 20 M MgCl<sub>2</sub>

### ***III.6.3 Polymerasekettenreaktion***

Mit Hilfe der PCR-Technik kann DNA durch eine thermostabile DNA-Polymerase *in vitro* spezifisch amplifiziert und/oder gezielt verändert werden (Saiki et al., 1988).

Der Reaktionsansatz setzt sich wie folgt zusammen:

---

<b>Reagenz</b>	<b>Finale Konzentration</b>
10 x PCR-Puffer (+NH <sub>4</sub> SO <sub>3</sub> )	1 x
25 mM MgCl <sub>2</sub>	1-4 µM
2 mM dNTP-Mix	0,2 mM

---



Primer forward	0,1-1 µM
Primer reverse	0,1-1 µM
Taq DNA-Polymerase	1,25u/50µl
Template DNA	10pg-1µg

mit sterilem PCR-H<sub>2</sub>O auf 20 µl auffüllen

Die Reaktion lief unter folgenden Bedingungen im Thermocycler ab:

<b>PCR-Zyklen:</b>	Initiale Denaturierung:	3 min 94°C	} n Zyklen
	Denaturierung	30 sec 94°C	
	Annealing	30 sec x °C	
	Elongation	45 sec 72°C	
	Finale Elongation	10 min 72°C	

Die Hybridisierungs-Temperatur (T<sub>m</sub>) wurde nach der Faustregel  $T_m = 4 \cdot (C+G) + 2 \cdot (A+T)$  berechnet, wobei C, G, A und T die Anzahl der jeweiligen Basen ist, oder sie wurde mit Hilfe einer Gradienten-PCR ermittelt. Je nach Fragmentgröße wurden die Zeiten für Denaturierung, Hybridisierung und Elongation angepasst. Die Zyklenzahl wurde der Expressionsstärke des Gens angepasst. Die erhaltenen Produkte werden über ein Agarosegel, wie unter Kapitel III.6.4 beschrieben, aufgetrennt und dokumentiert.

**Tabelle 3: Primer für RT-PCR**

Gen	5'- Primer	3'-Primer	Produktgröße
TGFβ (Maus)	gactctccacctgcaagacc	agacagccactcaggcgtat	506
bFGF (Maus)	ggaaacagaggcaggatgaa	gaataagggtgcccagaca	510
TNFα (Maus)	tttccgagggtggaatgag	gaataagggtgcccagaca	456
PTEN (Maus)	ggcactgctgtttcacaaga	tctggattgatggctcctc	501
GAPDH (Maus)	ccctgcatccactggtgctgc	cattgagagcaatgccagccc	292
Insulin (Maus)	ccagctataatcagagacca	gtgtagaagaagccacgct	197
Insulin (Ratte)	gtacctggtgtgtgggaac	ccagttgtagaggggagcag	200

**Tabelle 4: Primer für ChIP-PCR**

<b>Gen</b>	<b>5'- Primer</b>	<b>3'-Primer</b>	<b>Produktgröße</b>
TGFβ (Maus)	gcccacgctaagatgaagac	cctggctgtctggaggat	195
bFGF (Maus)	gcctagcgggacagattctt	gagggagccccttgagtga	146
TNFα (Maus)	cacacacaccctcctgattg	cctcggaaaacttccttggt	204
PTEN (Maus)	cccagcctgttgacctttg	aagagtcccgccacatcac	272
Egr-1 (Maus)	gtgccaccactcttgat	cgaatcggcctctattcaa	157
Insulin (Maus)	gaaggtctcaccttctgg	gggggttactggatgcc	271
Insulin (Ratte)	gtccccaacaactgcaactt	aggaggggtaggtaggcag	261
Synapsin I (Ratte)	gagccttactacgggtccag	ggtgaggtaggggagtttg	245
PDX-1 (Ratte)	cttagctggtcagtgacaga	ggttaacaacatcaggctga	183
CgB (Maus)	gatctacagcacctggcgtcc	tgaagggcagggcgggtg	185
CgB (Ratte)	cctgagatccacagcacctg	ggcctggctcttatgaagg	204
SgII (Maus)	aaagaagggggaagaagctg	ttatgtggaaggetccaagc	271
ATF3 (Maus)	ccagttctccctggagcta	cgttgcatcacccttttaa	110
Coll.luc	gagtgtgtctccttcgcaca	ctttatgttttggcgtcttcc	297

### ***III.6.4 Auftrennung der DNA-Moleküle durch Agarosegel-Elektrophorese***

Die Agarosegel-Elektrophorese dient der Auftrennung, Identifizierung und Reinigung von DNA-Fragmenten. Dabei ist die Wanderungsgeschwindigkeit linearer, doppelsträngiger DNA-Moleküle durch das elektrophoretische Feld eines Agarosegels umgekehrt proportional zum  $\log_{10}$  ihrer Molekulargewichte. Die aufgetrennten DNA-Banden wurden nach der Elektrophorese durch das fluoreszierende, interkalierende Ethidiumbromid angefärbt und unter UV-Licht sichtbar gemacht. In dieser Arbeit wurden Horizontal-Elektrophoresen mit 1-2 %-igen Gelen durchgeführt. DNA-Proben wurden vor dem Auftragen mit 6 x Proben-Auftragspuffer versetzt. Die Elektrophorese erfolgte in 1 x TAE-Puffer bei einer Spannung von 60-80 mA. Als Größenmarker für die Gelelektrophorese wurde der GeneRuler™ 100 bp DNA Ladder plus (Fermentas, St.Leon-Rot) verwendet. Anschließend wurde das Gel unter UV-Beleuchtung (254 nm) fotografiert.

**1 x TAE-Puffer:** 40 mM Tris, pH 8

5 mM NaAc

1 mM EDTA

**1× Proben-Auftragspuffer:** 30 % (v/v) Glycerin

0,25 % (w/v) Bromphenolblau

### ***III.6.5 Ortsspezifische Mutagenese***

Bei der gezielten Mutagenese („site-directed mutagenesis“) wird mit Hilfe eines sequenzspezifischen Primers, der die Mutation trägt, der Austausch einer oder mehrerer Basen erreicht. Dabei wird mit einem mutagenen Primer ein Strang der zirkulären Plasmid-DNA mittels PCR amplifiziert. Anschließend wird der parenterale, methylierte Strang mit dem Restriktionsenzym *DpnI*, welches nur methylierte DNA spaltet, abgebaut. Danach wird die amplifizierte, mutierte, einzelsträngige DNA in Bakterien transformiert und dort zur doppelsträngigen Plasmid-DNA vervollständigt (Shenoy & Visweswariah, 2003).

Die Durchführung der ortsgerichteten Mutagenese erfolgte mit Hilfe des QuikChange™ Lightning Site-Directed Mutagenesis Kit (Stratagen, Heidelberg). Die verwendeten Primer sind in Tabelle 5 gezeigt.

Die Amplifikation erfolgte in zwei Schritten mit je einem Primerset. Nach Beendigung der PCR-Reaktion wurden je 2 µl *DpnI* zu jeder PCR-Probe zugeben und 5 min bei 37 °C inkubiert. Die anschließende Transformation erfolgte in XL10-Gold Bakterien. Je Probe wurden 45 µl Bakterien in ein vorgekühltes Reagiergefäß gegeben. Nach der Inkubation der Bakterien für 2 min mit 2 µl β-Mercaptoethanol wurde in jedes Gefäß je 2 µl der *DpnI* verdauten PCR-Probe gegeben. Nach 30 min auf Eis erfolgte der Hitzeschock für 30 sek im 42°C warmen Wasserbad. Anschließend wurden die Zellen sofort für weitere 2 min auf Eis inkubiert und anschließend auf LB-AMP-Platten ausgestrichen und über Nacht bei 37°C inkubiert. Die entstandenen Kolonien wurden aufbereitet und die DNA mittels Sequenzanalyse überprüft.

**PCR-Reaktion;** 5 ml 10x Reaktionspuffer

10-100 ng dsDNA

125 ng Primer 1

125 ng Primer 2  
 1 ml dNTP-Mix  
 1,5 ml QuikSolution-Reagenz  
 auf 50 ml mit H<sub>2</sub>O auffüllen  
 1 ml QuikChange Lightning Enzyme

**PCR-Programm:**

1. 95 °C 2 min
2. 95 °C 20 sek  
 60 °C 10 sek  
 68 °C 30 sek/kb  
 --> 18 Zyklen
3. 68 °C 5 min

**Tabelle 5: Zur Mutagenese verwendete Primer:**

Primer	5'-Primer	3'-Primer
C365S	gccagaagcccttccagtctcgaatctgcatg	catgcagattcgagactggaagggttctggc
C396S	gcgagaagccttttgcctctgacatttgaggag	ctccacaaatgtcagaggcaaaagcttctcgc

**NZY<sup>+</sup>-Medium:**

10 g/l NZ-Amin (Caseinhydrolysat)  
 5 g/l Hefeextrakt  
 5 g/l NaCl  
 pH mit NaOH auf 7,5 einstellen  
 Zusätze sterilfiltrieren und vor Gebrauch frisch zugeben  
 12,5 ml 1M MgCl<sub>2</sub>  
 12,5 ml 1M MgSO<sub>4</sub>  
 10 l 2M Glukose

### III.7 Arbeiten mit RNA

#### *III.7.1 RNA-Isolierung aus eukaryotischen Zellen*

Bei der RNA-Isolierung erhält man ein RNA-Gemisch. Der Anteil der mRNA beträgt nur 3-5 % der Gesamt-RNA einer Zelle. Zuerst wird aus den Zellen die Gesamtmenge aller Nukleinsäuren isoliert. Diese Präparation dient als Ausgangsmaterial zur mRNA-Isolierung. Der Extraktionspuffer, in dem die Zellen homogenisiert werden, enthält Guanidiniumthiocyanat mit einer chaotropen Wirkung. Es bewirkt eine Denaturierung der Proteine und Inaktivierung der RNA-Endonukleasen, welche die RNA nach dem Homogenisieren der Zellen verdauen könnten (Chirgwin et al., 1979). Die anschließende Chloroform-Phenol-Extraktion dient der Abtrennung von Proteinen aus dem Isolat. Durch eine Ethanol-fällung werden die Nukleinsäuren konzentriert.

Voraussetzung für eine RNA-Präparation ist die Minimierung von RNase-Aktivität während der gesamten Präparation. Deshalb werden alle Lösungen mit DEPC behandeltem H<sub>2</sub>O hergestellt. Chemikalien, die man zur Isolierung von RNA benötigt, werden nur für diesen Zweck verwendet. Sämtliche RNA-Arbeiten werden mit Handschuhen durchgeführt.

2 · 10<sup>6</sup> Zellen/ 60 mm<sup>2</sup> Gewebekulturschale wurden 24 h in serumfreien Medium kultiviert und anschließend entsprechend der Applikation stimuliert. Der Zellrasen wurde mit kaltem DEPC-Wasser gewaschen. Die Lyse der Zellen erfolgte durch direkte Zugabe von 500µl Lysispuffer auf den Zellrasen. Die gewonnene Nukleinsäure-Suspension wurde durch mehrmaliges Aufziehen durch eine 21G-Kanüle geschert und nach der Zugabe von 500µl Phenol/Chloroform/Isoamylalkohol (1:1:24) für 15 min auf Eis inkubiert. Nach der Zentrifugation für 10 Minuten bei 16.000x g wurde die obere wässrige Phase in ein neues Eppendorfgefäß überführt. Die RNA wurde mit 0,8 Vol. Isopropanol versetzt und über Nacht bei -20°C gefällt. Nach dem Waschen des gewonnenen RNA-Pellets mit 70 % Ethanol wurde die RNA-Matrix in 50 µl DEPC-H<sub>2</sub>O aufgenommen. Die Quantifizierung der RNA erfolgte durch Messung der OD<sub>260</sub> in einer Verdünnung von 1:100 (40 µg/ml RNA entspricht 1 OD<sub>260</sub>).

**RNA-Lysispuffer:**    4 M                    Guanidiniumisothiocyanat  
                               25 mM                Natriumcitrat pH 7,0  
                               0,5 % (w/v)        N-Lauroylsarkosyl

1 %  $\beta$ -Mercaptoethanol

### ***III.7.2 cDNA-Synthese mit reverser Transkriptase und semiquantitative RT-PCR***

RNA Moleküle können mit Hilfe einer reversen Transkriptase (RT) in komplementäre DNA (cDNA) umgeschrieben und über Amplifikation mittels der PCR in kleinsten Konzentrationen nachgewiesen werden. Somit stellt die RT-PCR eine sehr empfindliche Methode zur Untersuchung des Transkriptionsniveaus ausgewählter Gene dar. Zur Synthese der cDNA wurde die M-MuLV-Transkriptase (Moloney-Maus-Leukämie-Virus) (Fermentas, St.Leon-Rot) verwendet. 1  $\mu$ g RNA wurde mit DEPC-Wasser auf 10  $\mu$ l aufgefüllt und mit 1  $\mu$ l Random-Hexamer-Primer versetzt. Nach zehnminütiger Inkubation bei 20 °C wurde jeder Probe ein Mix aus 2  $\mu$ l 5x Probenpuffer, 1  $\mu$ l dNTP-Mix 10 mM, 0,5  $\mu$ l RNase-Inhibitor und 1  $\mu$ l M-MuLV zugegeben und 60 Minuten bei 37 °C inkubiert. Abschließend wurden die Proben für 5 Minuten auf 95 °C erhitzt und bei -20°C gelagert.

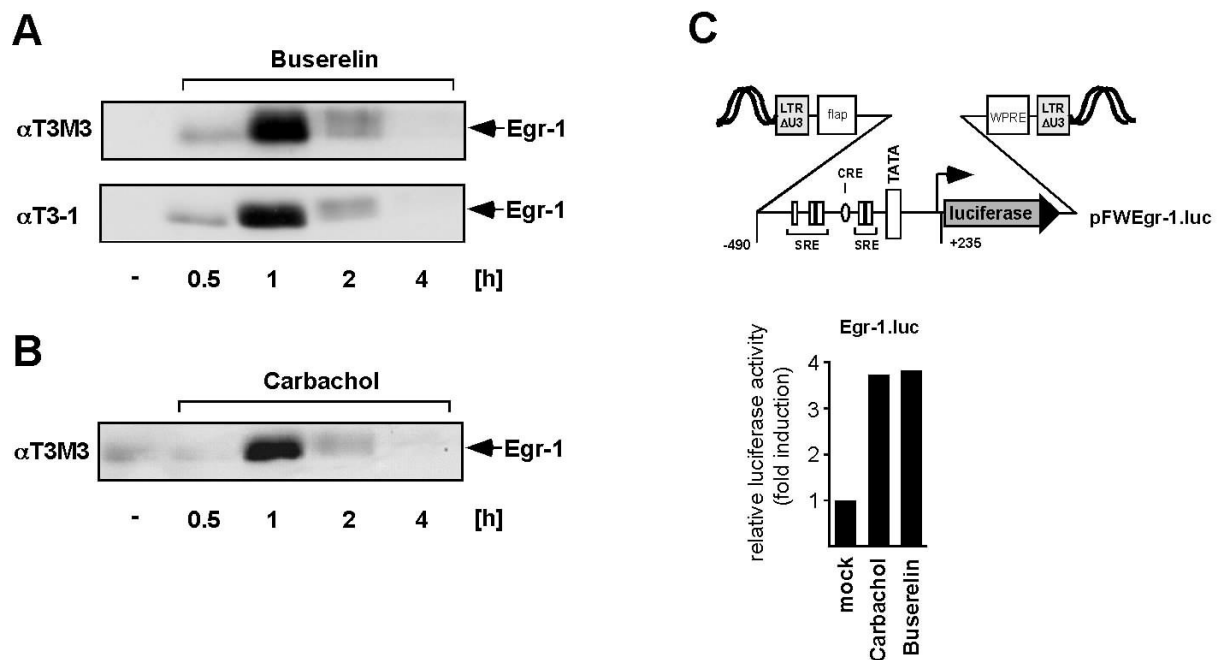
2  $\mu$ l einer 1:10 Verdünnung der erhaltenen cDNA wurden für die semiquantitative RT-PCR verwendet. Die Zyklusbedingungen sind abhängig von Template, Primer und Thermocycler. Die Anzahl der Zyklen, sowie die "Annealing-Temperatur" müssen für jedes Gen empirisch bestimmt werden. Tabelle 3 zeigt die verwendeten Primer. Die PCR-Reaktion wurde gemäß Kapitel III.0 durchgeführt.

## IV. Ergebnisse

### IV.1 Gonadotrope Hypophysenzellen

#### IV.1.1 Aktivierung der Egr-1 Biosynthese durch Buserelin oder Carbachol

Die gonadotrope Hypophysenzelllinie  $\alpha$ T3M3 exprimiert GnRH-Rezeptoren und muskarinische M3-Acetylcholinrezeptoren. Dadurch war es möglich, zwei Signalwege zu untersuchen, die durch  $G\alpha_{q/11}$ -gekoppelte Rezeptoren aktiviert werden. In dieser Studie wurden die GnRH-Rezeptoren mit dem GnRH-Analogon Buserelin stimuliert, die muskarinischen M3-Acetylcholinrezeptor mit dem Acetylcholinrezeptor-Agonisten Carbachol.



**Abbildung 6: Buserelin oder Carbachol-induzierte Biosynthese von Egr-1.** **A.**  $\alpha$ T3-1 oder  $\alpha$ T3M3 Zellen wurde 24 Stunden das Serum entzogen bevor sie mit Buserelin (10 nM) stimuliert wurden. Die Kernproteine wurden isoliert und mittels SDS-PAGE aufgetrennt. In der Westernblotanalyse erfolgte die Detektion von Egr-1 mittels spezifischer Antikörper. **B.** Transiente Expression von Egr-1 nach Stimulation von  $\alpha$ T3M3 Zellen mit dem Acetylcholinrezeptoragonisten Carbachol.  $\alpha$ T3M3 Zellen wurden nach 24 Stunden Serumentzug mit Carbachol (1 mM) für die angegebenen Zeitpunkte stimuliert und die Expression von Egr-1 im Westernblot untersucht. **C.** Egr-1 Promoter/Luziferase-Reportergen Analyse von Buserelin oder Carbachol-stimulierten  $\alpha$ T3M3 Zellen.  $\alpha$ T3M3-Zellen wurden mit Lentiviren infiziert, die für ein Egr-1 Promotor/Luziferase-

Reportergen kodieren. Nach Serumentzug für 24 Stunden wurden die Zellen mit Buserelin (10 nM) oder Carbachol (1mM) für weitere 24 h stimuliert. Als Kontrolle wurden unstimulierte Zellen untersucht. Die Luziferaseaktivität wurde gemessen und über die Proteinkonzentrationen normalisiert.

Abbildung 6A zeigt die transiente Expression des Egr-1 Gens in  $\alpha$ T3-1 oder  $\alpha$ T3M3-Zellen nach Buserelinstimulation. Es zeigten sich keine Abweichung der Syntheseraten oder Kinetiken der Egr-1 Expression im Vergleich von  $\alpha$ T3-1 mit  $\alpha$ T3M3-Zellen. Stimulation von  $\alpha$ T3M3-Zellen mit dem Acetylcholinrezeptoragonisten Carbachol führte ebenfalls zu einer transienten Expression von Egr-1 mit einem Maximum nach einer Stunde (Abbildung 6B). Außerdem führte eine Stimulation sowohl mit Buserelin als auch mit Carbachol zur Aktivierung des Egr-1 Promotors, wie die Reporteranalyse bewies (Abbildung 6C).

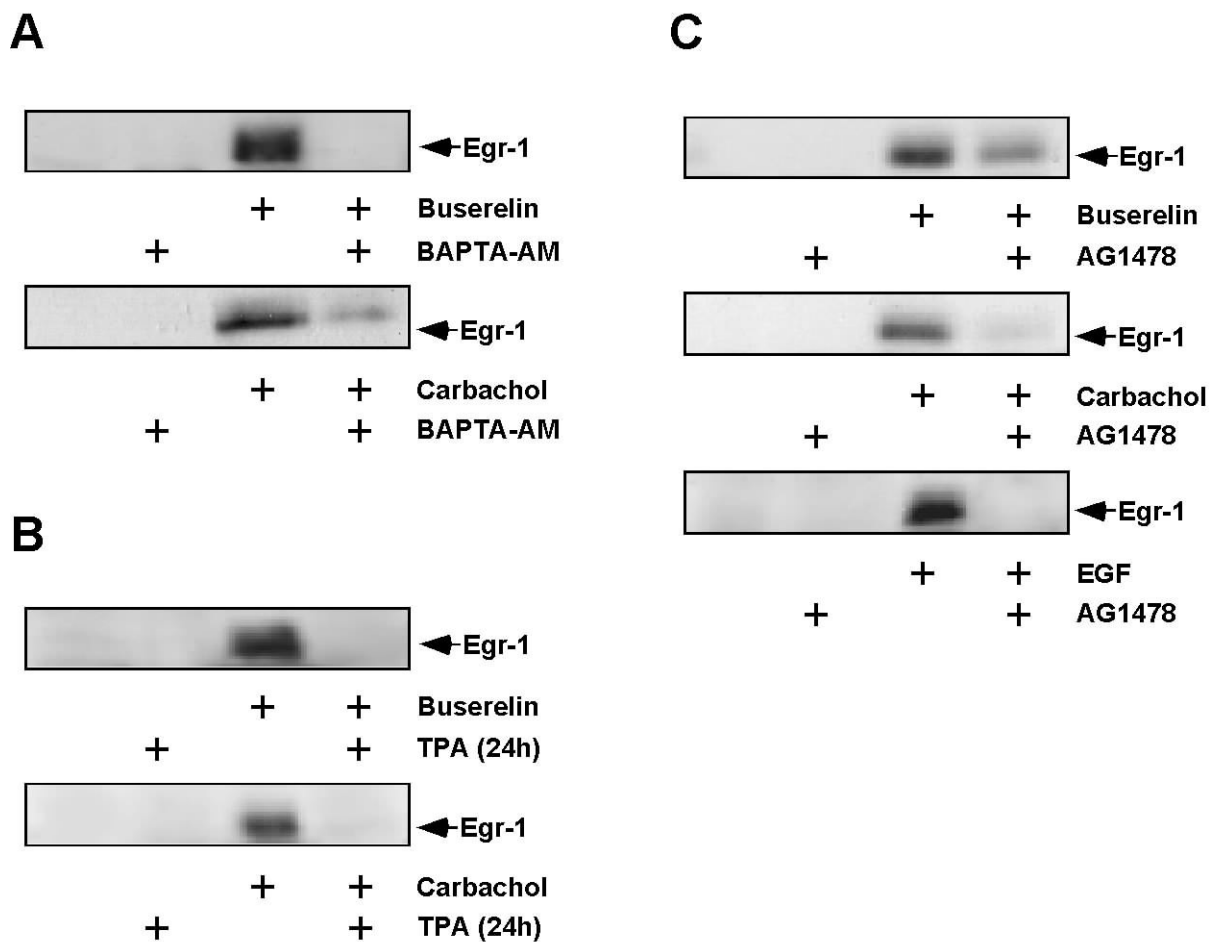
#### ***IV.1.2 Die transkriptionelle Aktivierung des Egr-1 Gens benötigt $Ca^{2+}$ -Ionen, Proteinkinase C und Transaktivierung des EGF-Rezeptors***

Stimulation des GnRH- und des muskarinischen M3 Rezeptors führt zur Aktivierung der Phospholipase C, der Generierung von  $IP_3$  und dadurch zur Freisetzung von  $Ca^{2+}$ -Ionen ins Zytosol über Aktivierung von  $IP_3$ -Rezeptoren des endoplasmatischen Retikulums. Es wurde schon beschrieben, dass ein erhöhter  $Ca^{2+}$ -Spiegel innerhalb der Zelle für die GnRH-Signaltransduktion essentiell ist (Reiss et al., 1997; Mulvaney & Roberson, 2000). Allerdings wurde auch postuliert, dass  $Ca^{2+}$  für die ERK-Aktivierung durch GnRH nicht nötig ist (Grosse et al., 2000). Um Licht in diese widersprüchlichen Ergebnisse zu bringen wurde die Rolle von  $Ca^{2+}$  in der Signalkaskade von GnRH- und muskarinischen Acetylcholinrezeptor untersucht.  $\alpha$ T3M3-Zellen wurden mit dem  $Ca^{2+}$ -Chelator BAPTA-AM vorinkubiert. Dadurch wurde die Induktion nach Buserelin oder Carbacholstimulation gehemmt (Abbildung 7A).

Aktivierung eines G-Protein gekoppelten Rezeptors kann einerseits zur Aktivierung der PKC über die Freisetzung von  $Ca^{2+}$  aus dem ER beitragen, andererseits auch zur Transaktivierung des EGF-Rezeptors führen (Daub et al., 1996; Daub et al., 1997). Es wurde gezeigt, dass GnRH die Biosynthese von Egr-1 über die Aktivierung der PKC einleiten kann (Duan et al., 2002). Um die Rolle der PKC in beiden Signalkaskaden zu untersuchen wurden  $\alpha$ T3M3-Zellen 24 Stunden mit dem Phorbolster TPA behandelt. Eine verlängerte TPA-Stimulation führte zum proteolytischen Abbau von Diacylglycerol-regulierten PKC-Isoformen (Liu et al., 2002). Wie in Abbildung 7B zusehen ist blockierte die Inkubation der Zellen mit TPA die Buserelin- oder Carbachol-induzierten Signalwege die zum Egr-1 Gen führen. In Neuronen



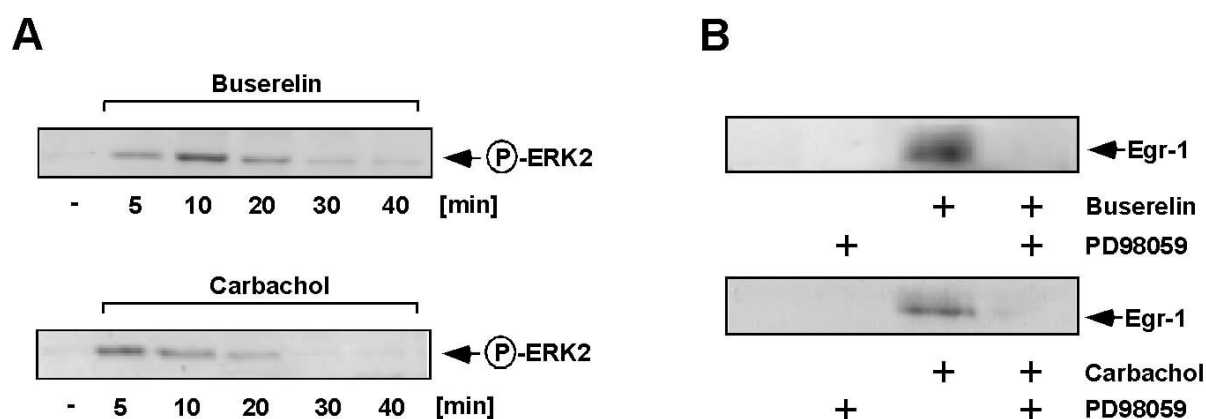
des Hypothalamus und in  $\alpha$ T3-1 Zellen führte die Stimulation von GnRH-Rezeptoren zur Transaktivierung des EGF-Rezeptors (Grosse et al., 2000; Shah et al., 2003; Shah et al., 2006). Um die Funktion des EGF-Rezeptors in den Buserelin- oder Carbachol induzierten Signalkaskaden zu untersuchen, wurden die Zellen mit dem Tyrosinkinaseinhibitor AG1478 präinkubiert. Abbildung 7C zeigt, dass der EGF-Rezeptor ein wichtiger Bestandteil der Buserelin- oder Carbachol induzierten Signalkaskade ist, welcher zur Aktivierung des Egr-1 Gens führt. Als Kontrolle konnte gezeigt werden, dass AG1478 die EGF-vermittelte Egr-1 Synthese wie erwartet hemmte (Abbildung 7C).



**Abbildung 7 Intrazelluläre Signalmoleküle die den GnRH- und den muskarinischen Acetylcholinrezeptor mit der Egr-1 Biosynthese verbinden:** A.  $\alpha$ T3M3-Zellen wurden nach 24 h Serumreduktion eine Stunde mit dem Acetoxymethylester des  $\text{Ca}^{2+}$ -Chelators BAPTA (25 $\mu$ M) (A), TPA (20 ng/ml), um die DAG-abhängigen PKC-Isoformen zu hemmen (B) oder mit dem spezifischen EGF-Rezeptorinhibitor AG1478 (0,5  $\mu$ M) (C) inkubiert. Anschließend wurden die Zellen zwei Stunden mit Buserelin (10 nM) oder eine Stunde Carbachol (1 mM) stimuliert. Als Positivkontrolle für die Funktion des EGF-Rezeptorinhibitor AG1478 wurden die Zellen mit EGF (10 ng/ml) für eine Stunde stimuliert. Es wurden die Kernproteine isoliert, über eine SDS-PAGE aufgetrennt und die Proteine im Westernblot mittels spezifischer Antikörper gegen Egr-1 detektiert.

### IV.1.3 Die Aktivierung der ERK-Signalkaskade ist essentiell für die Induktion der Egr-1 Expression nach Buserelin oder Carbachol-Stimulation

Die Transaktivierung des EGF-Rezeptors oder die Aktivierung der PKC können den ERK-Signalweg aktivieren. In Abbildung 8A kann man sehen, dass Stimulation von  $\alpha$ T3M3 Zellen mit Buserelin oder Carbachol zur Phosphorylierung von ERK führte. Durch Einsatz von PD98059, eines MEK-Inhibitors, der die Phosphorylierung der MAP Kinase Kinase verhinderte, konnte gezeigt werden, dass eine ERK-Aktivierung zu den wichtigen Schritten in der transkriptionellen Aktivierung des Egr-1 Gens zählt (Abbildung 8B).

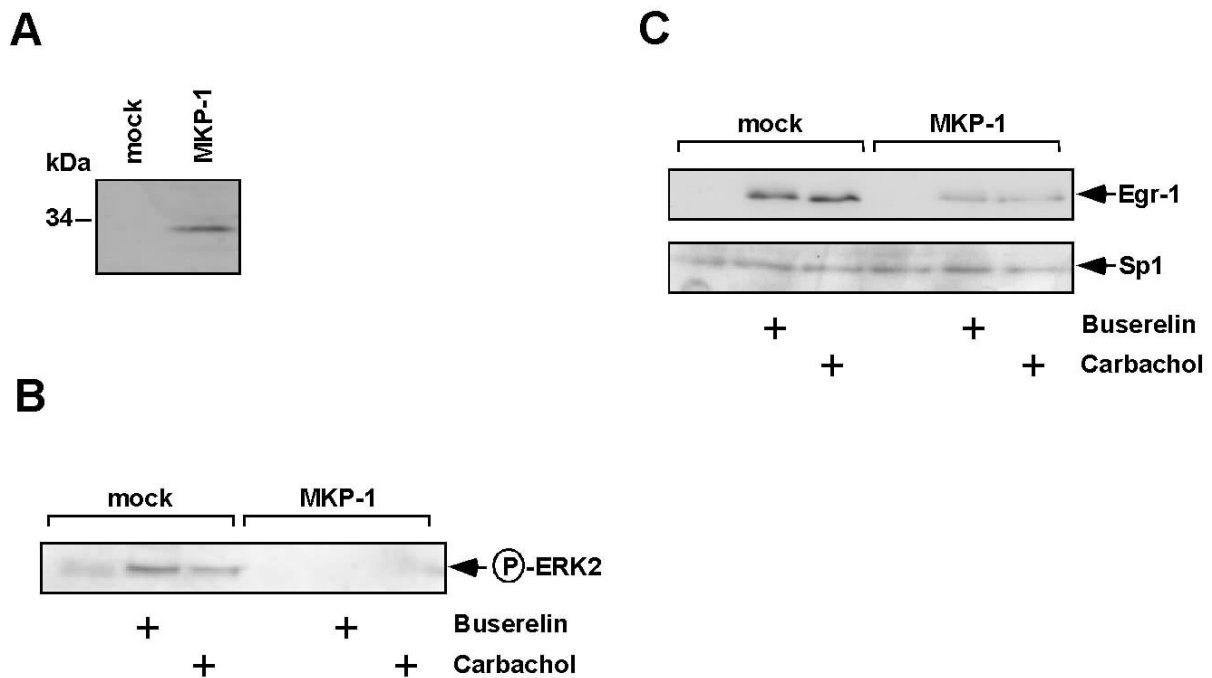


**Abbildung 8: Einfluss der ERK-Kinase auf die Egr-1 Biosynthese.** **A.**  $\alpha$ T3M3 Zellen wurden nach 24 stündigem Serumentzug für die angegebenen Zeiten mit Buserelin (10 nM) oder Carbachol (1 mM) stimuliert. Ganzzellextrakte wurden präpariert und durch SDS-Gelelektrophorese fraktioniert. Der Nachweis von aktivem ERK erfolgte im Westernblotverfahren mit phosphospezifischen Antikörpern gegen ERK2. **B.**  $\alpha$ T3M3 Zellen wurden nach 24 stündigem Serumentzug eine Stunde mit dem MEK-Inhibitor PD98059 (50  $\mu$ M) präinkubiert, bevor sie mit Buserelin oder Carbachol für zwei, bzw. eine Stunde stimuliert wurden. Kernextrakte wurden präpariert und durch SDS-Gelelektrophorese fraktioniert. Der Nachweis von Egr-1 erfolgte im Westernblotverfahren mit Egr-1 spezifischen Antikörpern.

### IV.1.4 Expression der MKP-1 unterbindet die Egr-1 Biosynthese

Die MAP-Kinase Phosphatase 1 (MKP-1) wird in unterschiedlichsten Zelltypen nach ERK-Aktivierung synthetisiert. Die MKP-1 ist möglicherweise Teil eines negativen Rückkopplungsmechanismus, welcher zur Inaktivierung von ERK im Kern führt (Keyse, 1998). In  $\alpha$ T3-1 Zellen wird die Expression der MKP-1 durch GnRH induziert (Zhang & Roberson, 2006). Deshalb stellte sich die Frage, ob eine Überexpression dieser Kinase Einfluss auf die Egr-1 Biosynthese nach Buserelin- oder Carbacholstimulation hat.  $\alpha$ T3M3-Zellen wurden zu diesem Zweck mit Lentiviren infiziert, die für die MKP-1 kodieren. Abbildung 9A zeigt die immunologische Detektion des Transgens im Westernblot. In

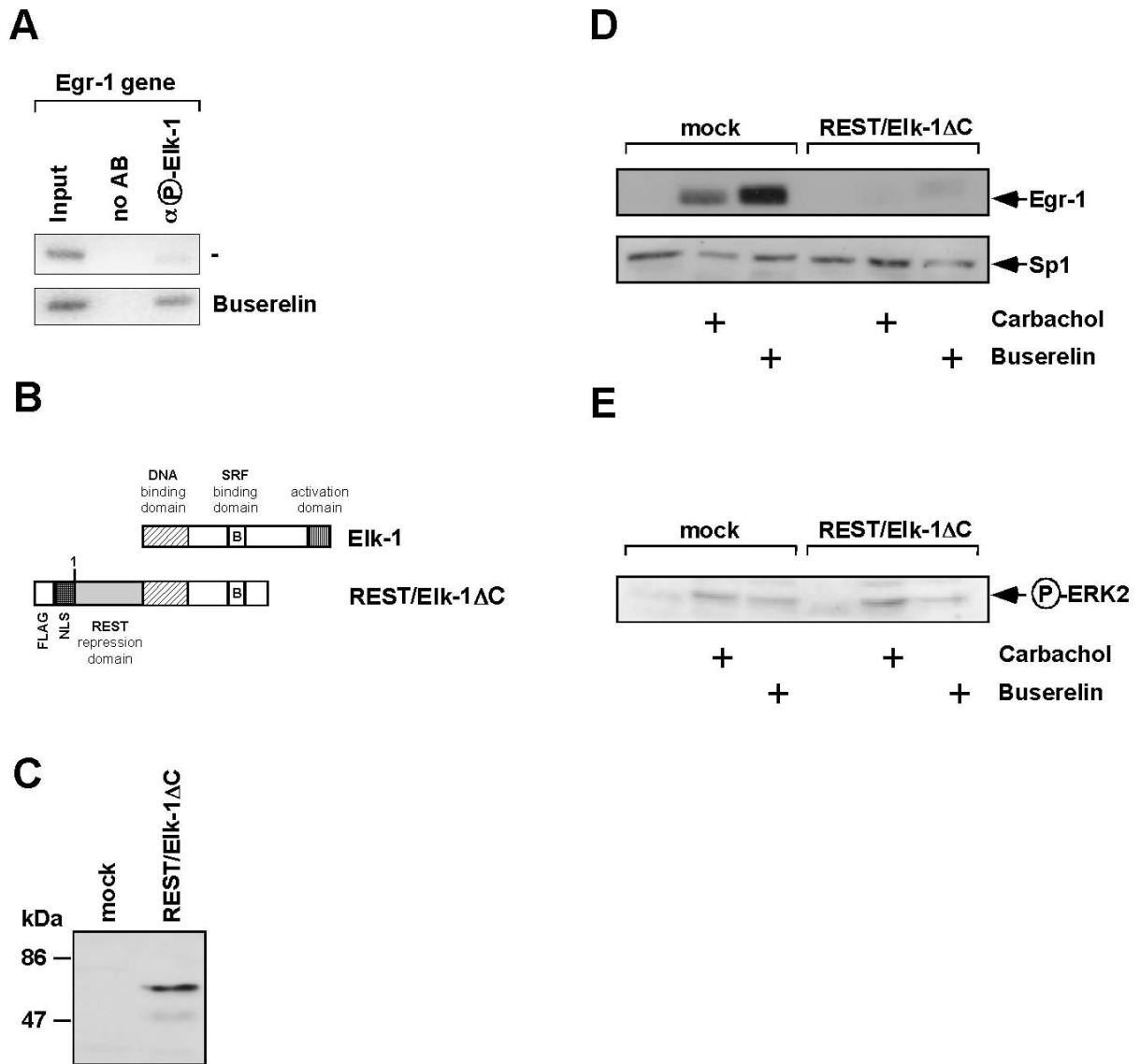
Abbildung 9B ist zu sehen, dass eine Überexpression der MKP-1 mittels lentiviralem Gentransfer zur Dephosphorylierung von ERK im Zellkern führte. Ebenso konnte man eine fast vollständige Inhibierung der Egr-1 Biosynthese nach Buserelin oder Carbachol-Stimulation in  $\alpha$ T3M3 Zellen beobachten (Abbildung 9C). Zusammengenommen zeigen diese Ergebnisse, dass die Phosphorylierung von ERK ein integraler Bestandteil der Signalkaskade ist, welcher die Stimulation der Zellen mit Buserelin oder Carbachol mit der Egr-1 Biosynthese verbindet.



**Abbildung 9: Die Rolle der MKP-1 in der Buserelin- oder Carbachol-induzierten Egr-1 Biosynthese.**  $\alpha$ T3M3 Zellen wurden mit Lentiviren infiziert die für MKP-1 kodieren. Als Kontrolle wurden mock-infizierte Zellen analysiert. **A.** Der Nachweis des Transgens erfolgte im Westernblotverfahren mit gegen das FLAG-Epitop gerichteten Antikörpern. **B.** Den Zellen wurde 24 Stunden das Serum entzogen, bevor sie mit Buserelin für 10 min oder mit Carbachol für 5 min stimuliert wurden. Kernproteine wurden extrahiert und durch SDS-PAGE aufgetrennt. Die Detektion erfolgte im Westernblot mit phosphospezifischen Antikörpern gegen ERK2. **C.** Den Zellen wurde 24 Stunden das Serum entzogen, bevor sie mit Buserelin oder Carbachol für zwei, bzw. eine Stunde stimuliert wurden. Kernproteine wurden extrahiert und durch SDS-PAGE aufgetrennt. Die Detektion erfolgte im Westernblot mit Antikörper gegen Egr-1. Als Kontrolle wurde die Expression von Sp1 in mock- und virusinfizierten Zellen untersucht.

#### ***IV.1.5 Der ternäre Komplexfaktor Elk-1 ist für die Biosynthese von Egr-1 in gonadotropen Hypophysenzellen nach Stimulation mit Buserelin oder Carbachol unerlässlich***

Im Nukleus kann die phosphorylierte ERK-Proteinkinase transkriptionsregulierende Proteine durch Phosphorylierung aktivieren. Die Phosphorylierung des ternären Komplexfaktors Elk-1 verbindet den ERK-Signalweg mit der SRE-vermittelten Transkription. Um diese Verbindung zwischen Elk-1 Phosphorylierung und Egr-1 Biosynthese zu überprüfen, wurde ein ChIP-Experiment durchgeführt, welches erlaubte, eine mögliche Bindung von Elk-1 an die regulatorische Domäne des Egr-1 Gens zu verifizieren. Abbildung 10A zeigt, dass Elk-1 tatsächlich nach Stimulation von  $\alpha$ T3M3 Zellen mit Buserelin an das Egr-1 Gen bindet. Um nun den Einfluß der Elk-1 Bindung an das Egr-1 Gen zu untersuchen, wurden  $\alpha$ T3M3 Zellen mit Lentiviren infiziert, die für eine dominant-negative Mutante von Elk-1 kodieren. Der Mutante REST/Elk-1 $\Delta$ C fehlte die phosphorylierungsregulierte Aktivierungsdomäne von Elk-1. Sie enthielt aber immer noch die DNA und SRF-Bindedomänen, so dass sie durch Bindung an DNA und SRF die Bindung endogenen Elk-1 blockieren konnte. Das verkürzte Elk-1 wurde als Fusionsprotein zusammen mit der transkriptionellen Repressordomäne von REST exprimiert. Die Repressordomäne führt zu einer Veränderung der Chromatinstruktur in eine geschlossene Konformation, die die Bindung von Transkriptionsfaktoren an die DNA erschwert (Thiel et al. 1998; Thiel et al., 2004). Wie in Abbildung 10D zu sehen ist, verhinderte die Expression der dominant-negativen Mutante von Elk-1 die Biosynthese von Egr-1 in  $\alpha$ T3M3-Zellen nach Buserelin bzw. Carbacholstimulation. Im Gegensatz dazu hatte REST/Elk-1 $\Delta$ C keinen Einfluß auf die Stimulusinduzierte Phosphorylierung von ERK (Abbildung 10E). Die Ergebnisse machen deutlich, dass die Aktivierung des ternären Komplexfaktors Elk-1 für die Egr-1 Biosynthese nach Buserelin oder Carbacholstimulation essentiell ist.



**Abbildung 10: Aktivierung der Egr-1 Biosynthese durch Buserelin oder Carbachol wird durch eine dominant-negative Mutante von Elk-1 gehemmt.** **A.** Bindung von Phospho-Elk-1 an die regulatorische Region im Egr-1 Gen. Mit Hilfe eines Chromatin Immunopräzipitationsexperiments wurde Chromatin untersucht, das entweder aus Buserelin oder Carbachol-stimulierten oder aber aus unstimulierten  $\alpha$ T3M3 gewonnen wurde. Die Immunpräzipitation erfolgte mit Hilfe eines phosphospezifischen Antikörpers gegen Elk-1. Das immunpräzipitierte Chromatin wurde mittels PCR-Primern amplifiziert die die regulatorische Region des Egr-1 Gens umspannen. Als Negativkontrolle wurde Chromatin verwendet, welches mit Protein-A-Sepharose, aber ohne Zugabe von Antikörpern (noAB), immunpräzipitiert wurde. Als Positivkontrolle diente Chromatin welches nicht immunpräzipitiert wurde (input). **B.** Schematische Darstellung von wildtyp Elk-1 und der dominant-negativen Mutante REST/Elk-1ΔC. **C.** Westernblotanalyse von  $\alpha$ T3M3 Zellen, die mit rekombinanten Lentiviren infiziert wurden, die für REST/Elk-1ΔC kodieren. Als Kontrolle wurden mock-infizierte Zellen untersucht. Der Westernblot wurde mit Antikörpern inkubiert, die gegen das FLAG-Epitop gerichtet sind. **D.** Die Expression von REST/Elk-1ΔC in  $\alpha$ T3M3 Zellen blockiert die Aktivierung der Egr-1 Genexpression nach Buserelin- oder Carbachol-Stimulation.  $\alpha$ T3M3 Zellen wurden mit REST/Elk-1ΔC kodierenden Lentiviren infiziert, als Kontrolle wurden mock-infizierte Zellen untersucht. Die Zellen wurden mit Buserelin für zwei Stunden stimuliert, Kernextrakte hergestellt und diese mittels Egr-1 spezifischen Antikörpern im Westernblot detektiert. Als Kontrolle wurde die Expression von Sp1 in mock- und virusinfizierten Zellen untersucht. **E.** Die Expression von REST/Elk-1ΔC in  $\alpha$ T3M3 Zellen hat keine Auswirkung auf die Phosphorylierung von ERK.  $\alpha$ T3M3 Zellen wurden mit REST/Elk-1ΔC kodierenden Lentiviren infiziert; als Kontrolle wurden mock-infizierte Zellen untersucht. Die Zellen wurden mit Buserelin für 10 Minuten oder mit Carbachol für 5 Minuten stimuliert, Ganzzellextrakte wurden hergestellt und diese mittels phosphospezifischen Antikörpern gegen ERK2 im Westernblot untersucht.

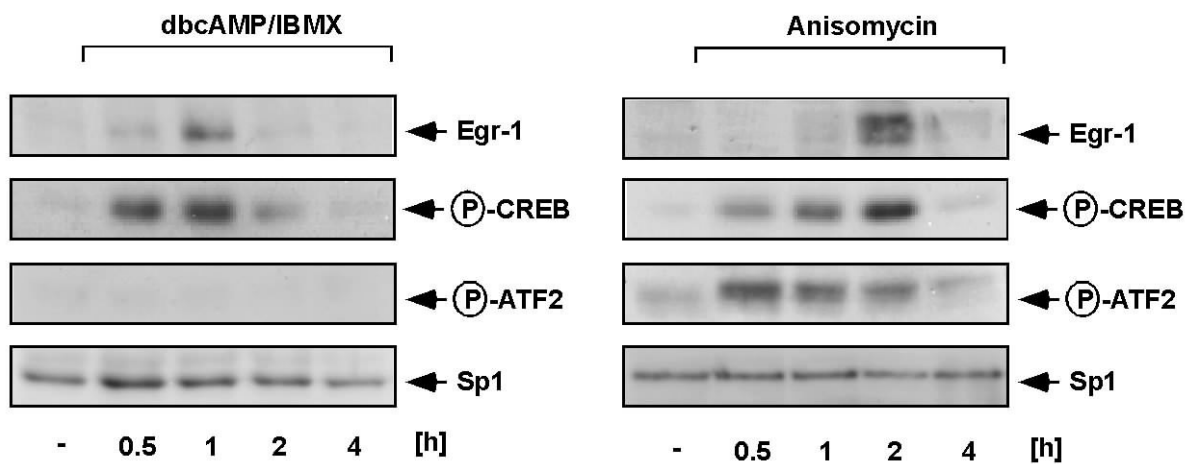
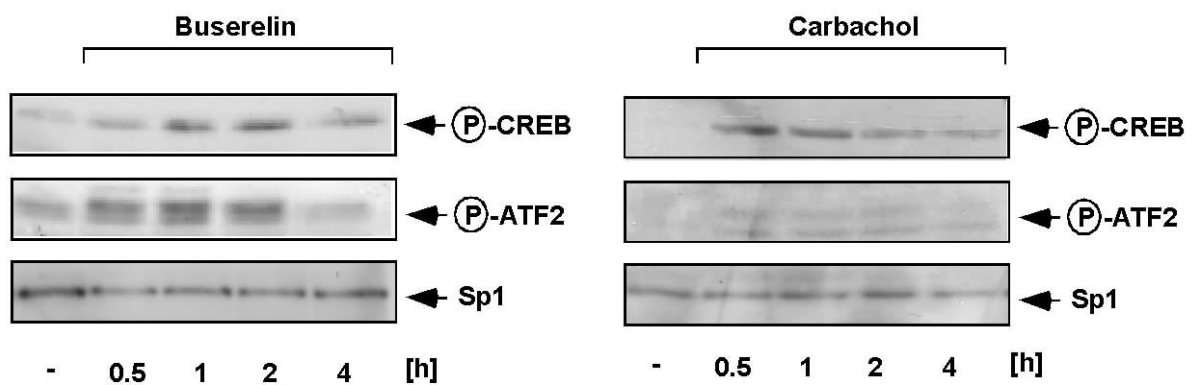
#### ***IV.1.6 Der Einfluss der bZIP-Transkriptionsfaktoren ATF2 und CREB auf die transkriptionelle Aktivierung des Egr-1 Gens***

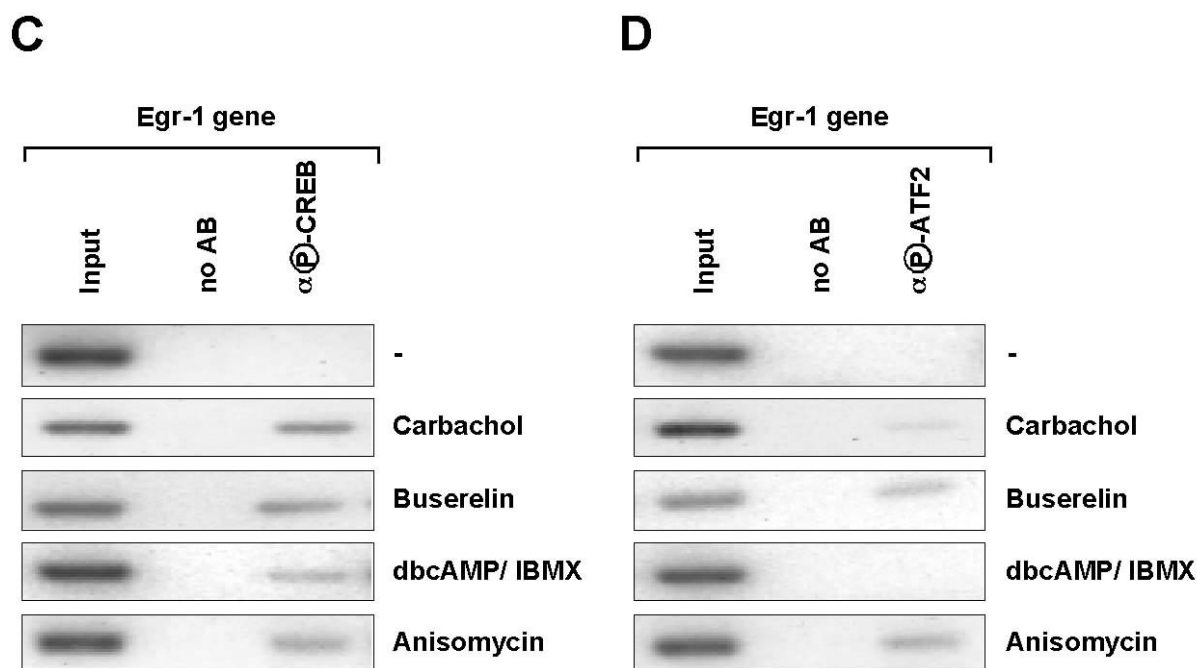
Zusätzlich zu den fünf SRE's enthält der Egr-1 Promotor ein cAMP response element (CRE) welches unter anderem als Bindungsstelle für den bZIP-Faktor CREB dient. Um den Einfluss von CREB auf die Stimulusinduzierte Biosynthese von Egr-1 zu untersuchen, wurden  $\alpha$ T3M3 Zellen mit dem cAMP Analogon dbcAMP in Anwesenheit des Phosphodiesterasehemmers IBMX stimuliert und im Westernblot die transiente Expression von Egr-1 beobachtet. Die Stimulation mit Anisomycin, einem Aktivator der stressregulierten Proteinkinase JNK und p38 (Hazzalin et al., 1998), führte ebenfalls zur Biosynthese von Egr-1 (Abbildung 11A).

Die Stimulation des GnRH-Rezeptors erhöhte die Aktivität von JNK (Mulvaney & Roberson, 2000). Dies bedeutet, dass das Substrat der JNK und p38-Kinase, ATF2 möglicherweise nach Rezeptorstimulation phosphoryliert wird. Der Hauptaktivator von CREB ist die PKA, jedoch zeigen unsere Ergebnisse, dass GnRH- und muskarinischer Acetylcholinrezeptorstimulation mit dem Egr-1 Gen über die MAP-Kinasen verbunden ist und nicht über die PKA (0 und 0). Die Phosphorylierung von CREB kann einerseits über die PKA erfolgen, andererseits kann sie auch über eine Aktivierung von ERK vermittelt werden und zwar über die Mitogen- und Stressaktivierten Proteinkinasen MSK1 und 2 (Deak et al., 1998; Wiggin et al., 2002). Tatsächlich wurde die Phosphorylierung von CREB in GnRH-stimulierten hypothalämischen GT1-7 Zellen beobachtet (Neithardt et al., 2006). In dieser Arbeit wurden  $\alpha$ T3M3 Zellen mit Buserelin oder Carbachol stimuliert und die Phosphorylierung von CREB und ATF2 untersucht. Abbildung 11B zeigt, dass sowohl Buserelin- als auch Carbacholstimulation die Phosphorylierung von CREB induzierte, allerdings in einem viel geringeren Maß als nach Stimulation der Zellen mit dbcAMP/IBMX. Auch eine Stimulation der Zellen mit Anisomycin führte zur Phosphorylierung von CREB. Stimulation der Zellen mit Buserelin oder Anisomycin induzierte ebenfalls die Phosphorylierung von ATF2, wogegen Stimulation mit dbcAMP/IBMX oder Carbachol wenig oder gar keinen Effekt auf die ATF2-Phosphorylierung hatte (Abbildung 11A,B).

Um eine Verbindung zwischen CREB- oder ATF2-Phosphorylierung und Egr-1 Biosynthese herzustellen wurde ein ChIP-Experiment durchgeführt, welches Aufschluss über die Bindung von Phospho-CREB oder Phospho-ATF2 an das Egr-1 Gen geben sollte. Das Formaldehyd fixierte und mittels Ultraschall zerkleinerte Chromatin von unstimulierten, oder aber mit

Buserelin, Carbachol, dbcAMP oder Anisomycin stimulierten  $\alpha$ T3M3 Zellen wurde mittels phospho-spezifischer Antikörper gegen CREB oder ATF2 immunpräzipitiert. Abbildung 11C zeigt, dass phosphoryliertes CREB an die regulatorische Region des Egr-1 Gens gebunden wurde, wenn die Zellen mit Buserelin, Carbachol, dbcAMP oder Anisomycin stimuliert wurden. Dagegen konnte eine Bindung des phosphorylierten ATF2 an das Egr-1 Gen nur nach Stimulation von  $\alpha$ T3M3 Zellen mit Buserelin oder mit Anisomycin nachgewiesen werden. Carbachol oder dbcAMP/IBMX-Stimulation führte weder zur Phosphorylierung, noch zur Bindung von Phospho-ATF2 an das Egr-1 Gen (Abbildung 11D).

**A****B**



**Abbildung 11: Einfluss von CREB und ATF2 auf die Egr-1 Biosynthese.** A.  $\alpha$ T3M3 Zellen wurden mit dbcAMP (1 mM)/IBMX (0,5 mM) oder Anisomycin (0,1  $\mu$ M) für die angegebenen Zeiten inkubiert. Kernextrakte wurden isoliert und im Westernblot mit Antikörpern detektiert die gegen Egr-1, Phospho-CREB oder Phospho-ATF2 gerichtet sind. Als Kontrolle wurde die Expression von Sp1 untersucht. B.  $\alpha$ T3M3 Zellen wurden mit Buserelin (10 nM) oder Carbachol (1 mM) für die angegebenen Zeiten inkubiert. Kernextrakte wurden isoliert und im Westernblot mit Antikörpern detektiert, die gegen Phospho-CREB oder Phospho-ATF2 gerichtet sind. Als Kontrolle wurde die Expression von Sp1 untersucht. C. D. Bindung von Phospho-CREB (C) oder Phospho-ATF2 (D) an die regulatorische Region im Egr-1 Gen. Mit Hilfe eines ChIP-Experiments wurde Chromatin untersucht, das entweder aus Buserelin, Carbachol, dbcAMP/IBMX, Anisomycin-stimulierten oder aber aus unstimulierten  $\alpha$ T3M3 gewonnen wurde. Die Immunpräzipitation des mit Formaldehyd vernetzten und sonifizierten Chromatins erfolgte mit Hilfe eines Phospho-spezifischen Antikörpers gegen CREB oder ATF2. Das immunpräzipitierte Chromatin wurde mittels PCR-Primern amplifiziert, die die regulatorische Region des Egr-1 Gens umspannen. Als Negativkontrolle wurde Chromatin verwendet, welches mit Protein-A-Sepharose, aber ohne Zugabe von Antikörpern (noAB), immunpräzipitiert wurde. Als Positivkontrolle diente nicht immunpräzipitiertes Chromatin (input).

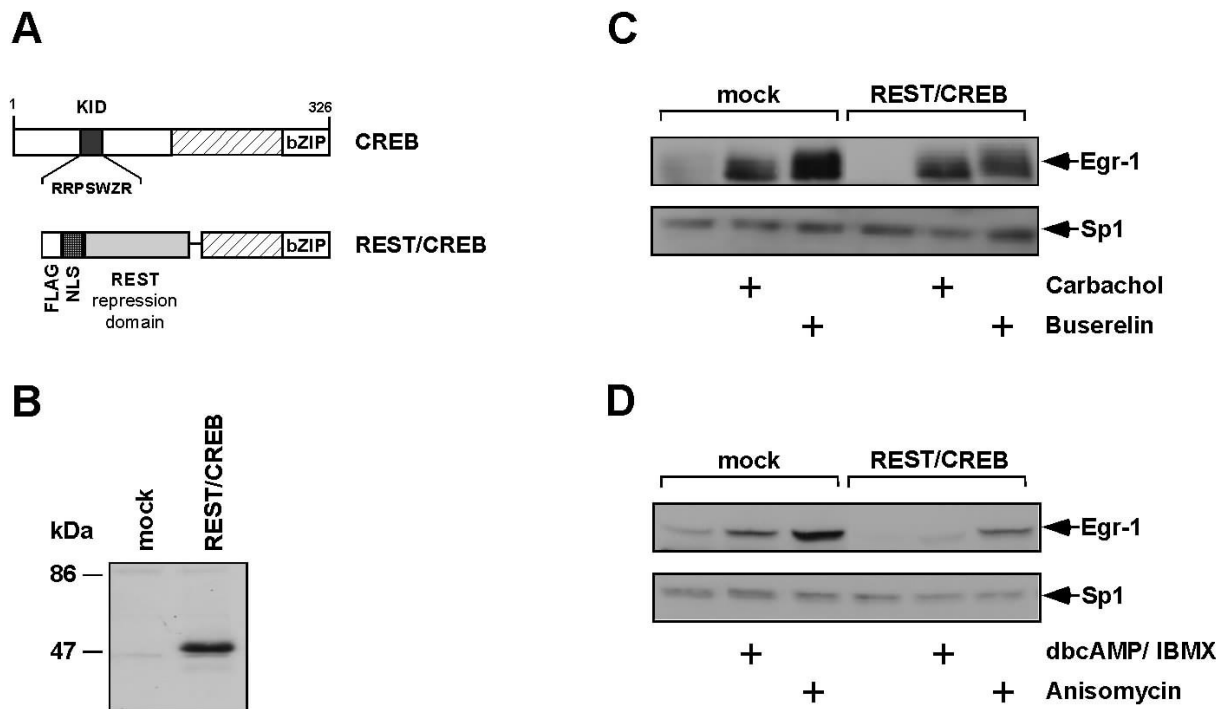
#### IV.1.7 Eine dominant negative Mutante von CREB vermindert die Egr-1

##### *Biosynthese nach Stimulation mit Buserelin oder Carbachol*

Da die vorangegangenen Experimente gezeigt haben, dass Buserelin- oder Carbacholstimulation von  $\alpha$ T3M3 Zellen zur Phosphorylierung von CREB und zu dessen Bindung an das Egr-1 Gen führt, sollte die Funktionalität dieses Transkriptionsfaktors für die Aktivierung der Egr-1 Biosynthese untersucht werden. Dazu wurden  $\alpha$ T3M3 Zellen mit Lentiviren infiziert, die für eine dominant-negative Mutante von CREB kodieren. Der Mutante REST/CREB fehlte die Aktivierungsdomäne von CREB, so dass sie nicht mehr phosphoryliert werden konnte und somit inaktiv blieb. Die Mutante konnte jedoch immer noch an die DNA binden und blockierte so die Bindestelle für endogenes CREB. Zusätzlich führte die Fusionierung des



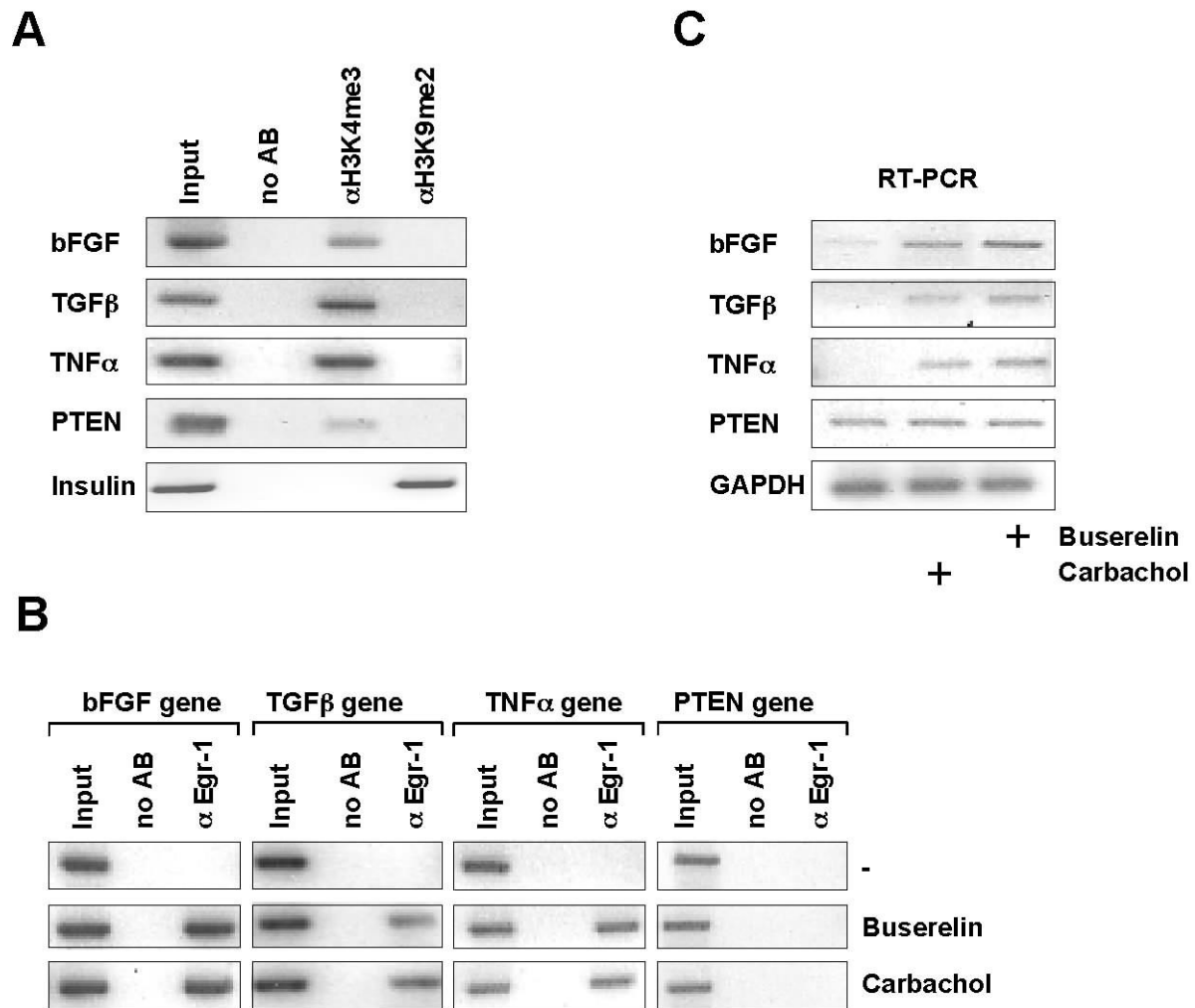
verkürzten CREB mit der Repressordomäne von REST zu einer geschlossenen Chromatinstruktur, die die Bindung von Transkriptionsfaktoren an die DNA erschwerte (Abbildung 12A). Die Expression von REST/CREB führte in  $\alpha$ T3M3-Zellen zu einer Reduktion der Buserelin oder Carbachol-induzierten Egr-1 Biosynthese (Abbildung 12C). Die dbcAMP/IBMX-induzierte Biosynthese von Egr-1 wurde durch die Mutante komplett inhibiert, wohingegen die Anisomycin-induzierte Biosynthese von Egr-1 nur reduziert wurde. Dies lässt den Schluß zu, dass CREB die GnRH- und muskarinische Acetylcholinrezeptorstimulation mit der Egr-1 Genexpression verbindet. Folglich spielen sowohl CREB als auch Elk-1 eine Rolle in der Buserelin- oder Carbachol-induzierten Signaltransduktion von Egr-1 in gonadotropen Hypophysenzellen.



**Abbildung 12 Expression einer dominant-negativen Mutante von CREB inhibiert die Stimulusinduzierte Egr-1 Biosynthese in Hypophysenzellen.** **A.** Schematische Darstellung von wildtyp CREB und der dominant-negativen Mutante REST/CREB. **B.** Westernblotanalyse von  $\alpha$ T3M3 Zellen die mit rekombinanten Lentiviren infiziert wurden die für REST/CREB kodieren. Als Kontrolle wurden mock-infizierte Zellen untersucht. Der Westernblot wurde mit Antikörpern inkubiert, die gegen das FLAG-Epitop gerichtet sind. **C. D.** Die Expression von REST/CREB hemmt in  $\alpha$ T3M3 Zellen die Aktivierung der Egr-1 Genexpression nach Buserelin- oder Carbacholstimulation.  $\alpha$ T3M3 Zellen wurden mit REST/CREB kodierenden Lentiviren infiziert. Als Kontrolle wurden mock-infizierte Zellen untersucht. Die Zellen wurden für zwei Stunden mit Buserelin (10 nM) oder für eine Stunde mit Carbachol (1mM) (C) oder mit dbcAMP/IBMX für eine Stunde oder Anisomycin für zwei Stunden (D) inkubiert, Kernextrakte hergestellt und diese mittels Egr-1 spezifischem Antikörper im Westernblot detektiert. Als Kontrolle wurde die Expression von Sp1 in mock- und virusinfizierten Zellen untersucht.

#### ***IV.1.8 Zielgene des Egr-1 Proteins in gonadotropen Hypophysenzellen***

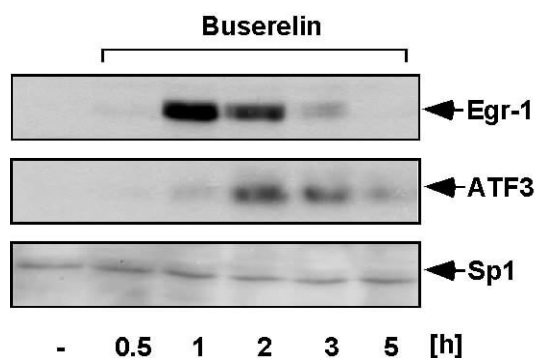
Da die Gene, die für bFGF, TNF $\alpha$ , TGF $\beta$  und PTEN kodieren in anderen zellulären Systemen als Egr-1 Zielgene identifiziert wurden (Biesiada et al., 1996; Yao et al., 1997; Liu et al., 1999; Virolle, et al., 2001), wurde die epigenetische Konfiguration dieser Gene in  $\alpha$ T3M3 Zellen untersucht, um Aufschluss darüber zu erlangen ob diese Gene auch in gonadotropen Hypophysenzellen aktiv transkribiert werden. Der Aminoterminus von Histon H3 kann am Lysinrest 9 durch Methyltransferasen wie SUV39H1 oder auch G9a methyliert werden (Rea et al., 2000). Die Modifikation H3mK9 dient als Bindungsstelle für das Silencer-Protein Heterochromatin Protein 1 (HP1). HP1 führt zur Formation einer höher geordneten Chromatinstruktur (Thiel et al., 2004). Deshalb fungiert die Methylierung von H3K9 als Marker für ruhende Gene. Ein Marker für aktiv-transkribierte Gene ist die Methylierung des Lysinrestes 4 von Histon H3 (Santos-Rosa et al., 2002). Der Methylierungsstatus des bFGF, TNF $\alpha$ , TGF $\beta$ , PTEN und des Insulin-Gens in gonadotropen Hypophysenzellen wurde mittels ChIP-Assay untersucht. Die für die Immunpräzipitation verwendeten Antikörper waren entweder gegen die trimethylierte Form von H3K4 oder aber gegen die dimethylierte Form von H3K9 gerichtet. Abbildung 13A zeigt, dass die bFGF, TNF $\alpha$ , TGF $\beta$  und PTEN- Gene in einer offenen Chromatinstruktur vorlagen, da sie am Lysinrest 4 des Histons H3 trimethyliert waren. Dagegen lag das Insulingen wie zu erwarten in einer geschlossenen Konformation vor, da es am Lysinrest 9 des Histons H3 dimethyliert war. Daraufhin stellte sich die Frage, ob Egr-1 in einer Stimulusabhängigen Weise an diese Gene gebunden wird. Dazu wurde fixiertes und zerkleinertes Chromatin von unstimulierten  $\alpha$ T3M3 und Zellen, die mit Buserelin oder Carbachol stimuliert wurden, mit einem Egr-1 spezifischen Antikörper immunpräzipitiert. Wie in Abbildung 13B zu sehen ist, wurde Egr-1 nach Buserelin- oder Carbacholstimulation an die bFGF-, TNF $\alpha$ - und TGF $\beta$ -Gene gebunden. Jedoch konnte keine Bindung von Egr-1 an das PTEN Gen gezeigt werden. Zusätzlich wurde die Expression dieser Gene nach Buserelin- oder Carbacholstimulation mittels semiquantitativer RT-PCR untersucht. Es konnte eine stimulationsabhängige Erhöhung der Konzentrationen von bFGF, TNF $\alpha$  und TGF $\beta$  mRNA, jedoch nicht von PTEN mRNA, nachgewiesen werden (Abbildung 13C). Die Ergebnisse zeigen, dass in  $\alpha$ T3M3 Zellen die Expression von bFGF, TNF $\alpha$  und TGF $\beta$ , jedoch nicht von PTEN durch Egr-1 reguliert wird.



**Abbildung 13 Identifizierung von Egr-1 Zielgenen in gonadotropen Hypophysenzellen.** **A.** Epigenetische Modifikation von möglichen Egr-1 Zielgenen in  $\alpha$ T3M3 Zellen. Es wurde ein ChIP-Assay mit anti-dimethyl H3K9 oder anti-trimethyl H3K4 Antikörpern durchgeführt. Die immunpräzipitierten Chromatinfragmente wurden mit Primern amplifiziert, die die Egr-1 Bindestellen in den regulatorischen Regionen des bFGF, TGF $\beta$ , TNF $\alpha$  und des PTEN Gens umfassten. Die Primer des Insulins umspannen die CRE-Bindestelle im Promotor. Als Negativkontrolle diente Chromatin welchem kein Antikörper bei der Immunpräzipitation zugesetzt wurde (noAB). Als Positivkontrolle diente nicht immunpräzipitiertes Chromatin (input). **B.** Bindung von Egr-1 an die regulatorische Region von Egr-1 Zielgenen. Chromatin von Zellen, die mit Buserelin oder Carbachol stimuliert wurden, oder aber von unstimulierten Zellen, wurde mit einem Antikörper gegen Egr-1 immunpräzipitiert. Die anschließende Amplifikation der Fragmente erfolgte mit Primern, die die Egr-1 Bindestelle innerhalb der regulatorischen Region der Zielgene umfassten. **C.** Steigerung der mRNA Synthese von TNF $\alpha$ , bFGF, TGF $\beta$  nach Stimulation von  $\alpha$ T3M3 Zellen mit Buserelin oder Carbachol. Die Gesamt-RNA wurde isoliert und mit Hilfe von reverser Transkriptase in cDNA umgeschrieben, welche wiederum mittels PCR-Primern untersucht wurde, die zur cDNA der zu untersuchenden Gene komplementär waren.

### IV.1.9 ATF3 ist ein Zielgen von Egr-1

Stimulation von  $\alpha$ T3-1 Zellen mit Buserelin führte zur Biosynthese von Egr-1. Der transkriptionelle Repressor ATF3, ein bZIP-Protein, wird ebenfalls durch Stimulation mit Buserelin synthetisiert (Xie et al., 2005). In Krebszellen wurde schon gezeigt, dass Egr-1 ATF3 transaktiviert (Bottone Jr. et al., 2005). Deshalb wurden die Kinetiken der Synthesen von Egr-1 und ATF3 verglichen und festgestellt, dass die Egr-1-Synthese ein Maximum bei 1 Stunde hat, wohingegen ATF3 erst nach 2 Stunden exprimiert wird (Abbildung 14). Egr-1 könnte also auch in gonadotropen Hypophysenzellen das ATF3-Gen transaktivieren; die Zeitverläufe der Synthesen sprechen dafür.



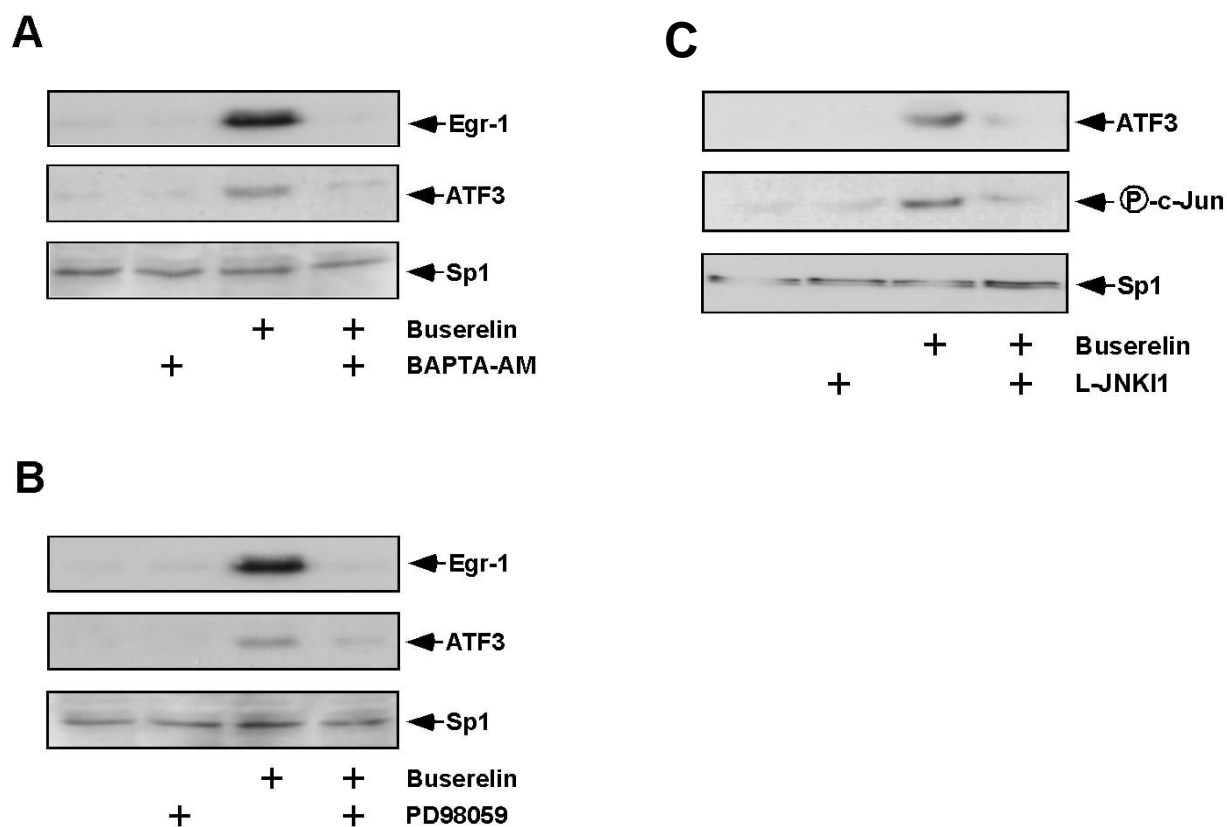
**Abbildung 14: Kinetiken der Egr-1 und ATF3 Biosynthesen nach Buserelin-Stimulation.**  $\alpha$ T3-1 Zellen wurden nach 24 Stunden Serumentzug mit dem GnRH-Analogen Buserelin (10 nM) für die angegebenen Zeitpunkte stimuliert. Die Expression von ATF3 und Egr-1 wurde im Westernblot mit spezifischen Antikörpern nachgewiesen. Als Kontrolle wurde die Expression von Sp1 untersucht.

### IV.1.10 Die Biosynthese von Egr-1 und ATF3 ist abhängig von einer erhöhten $Ca^{2+}$ -Konzentration und der Aktivierung von ERK

Wenn Egr-1 die Biosynthese von ATF3 reguliert, müsste eine Inhibierung der Egr-1 Biosynthese auch die ATF3 Expression hemmen. Die Stimulation des GnRH-Rezeptors führt zur Aktivierung der Phospholipase C, der Generierung von  $IP_3$  und der Freisetzung von  $Ca^{2+}$  über die Stimulation von ionotropen  $IP_3$ -Rezeptoren des endoplasmatischen Retikulums. Es konnte bislang gezeigt werden, dass eine Erhöhung der intrazellulären  $Ca^{2+}$ -Konzentration für die Signaltransduktion von GnRH essentiell ist. Ebenso war für die Egr-1 Biosynthese eine Aktivierung der ERK-Signalkaskade unerlässlich. Folglich sollte, wenn Egr-1 tatsächlich das ATF3-Gen reguliert, die Unterbrechung der Signalkaskaden, die zur Egr-1 Biosynthese

führen, auch die ATF3 Synthese hemmen. Deshalb wurde durch Präinkubation der Zellen mit dem  $\text{Ca}^{2+}$ -Chelator BAPTA-AM der Anstieg der intrazellulären  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration verhindert und durch Einsatz des spezifischen MEK-Inhibitors PD98059 die Aktivierung der ERK-Signalkaskade blockiert. Abbildung 15A zeigt, dass die Bindung von intrazellulärem  $\text{Ca}^{2+}$  nicht nur die Egr-1 Biosynthese sondern auch die von ATF3 blockierte. Der MAP-Kinase Kinase Inhibitor PD98059 verhinderte ebenso sowohl die Expression von Egr-1 als auch die von ATF3 (Abbildung 15B).

Die Stimulation von GnRH-Rezeptoren steigerte die Aktivität von JNK (Mulvaney und Roberson, 2000; Harris et al., 2003). Um den Einfluss von JNK auf die Expression des ATF3 Gens zu untersuchen wurden  $\alpha\text{T3-1}$  Zellen mit dem JNK-Inhibitor 1 Peptid (L-JNK1I) inkubiert. Dieses Peptid blockiert spezifisch die Interaktion von JNK mit seinen Substraten wie z.B. c-Jun. Im Gegensatz dazu ist der oft verwendete „Inhibitor“ SP600125 (Xie et al., 2005; Xie & Roberson, 2008) unspezifisch, da er auch die Aktivität vieler anderer Proteinkinasen beeinflusst (Bain et al., 2003; Bain et al., 2007). Abbildung 15C zeigt, dass die Buserelin-stimulierte ATF3 Expression durch die Verwendung des JNK-Inhibitor 1 Peptids komplett unterbunden wurde, ebenso wurde die Phosphorylierung von c-Jun inhibiert. Folglich ist eine erhöhte  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration und die Aktivierung von ERK und JNK von essentieller Bedeutung für die Buserelin-induzierte Biosynthese von ATF3. JNK ist jedoch für die Egr-1 Biosynthese nicht notwendig.



**Abbildung 15: Intrazelluläre Signalmoleküle die den GnRH-Signalweg mit der ATF3 Biosynthese verbinden:** A.  $\alpha$ T3-1-Zellen wurden nach 24 h Serumreduktion eine Stunde mit dem Acetoxymethylester des  $\text{Ca}^{2+}$ -Chelators BAPTA (25  $\mu\text{M}$ ) (A), dem MEK-Inhibitor PD98059 (50  $\mu\text{M}$ ) (B) oder für eine Stunde mit dem JNK Inhibitor 1 Peptid (L-JNK11) (1  $\mu\text{M}$ ) (C) inkubiert. Anschließend wurden die Zellen mit Buserelin (10 nM) zwei Stunden stimuliert. Als Positivkontrolle wurde der Phosphorylierungsstatus von c-Jun untersucht. Die Kernproteine wurden mittels SDS-Gelelektrophorese fraktioniert und die Expression von Egr-1, ATF3, Phospho-cJun und Sp1 im Westernblot untersucht.

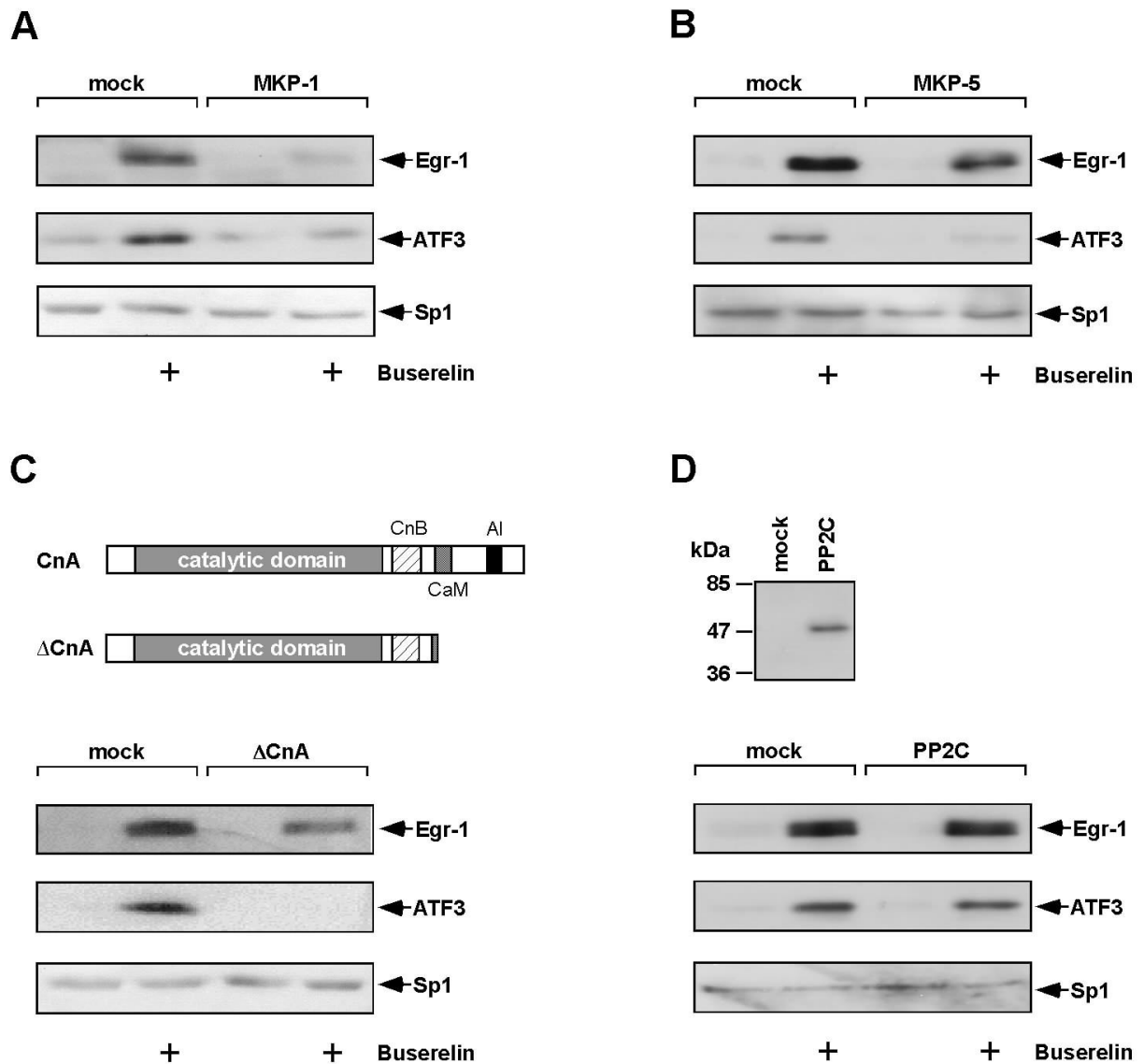
#### ***IV.1.11 Der Einfluss von Proteinphosphatasen auf die Expression von Egr-1 und ATF3***

Die vorangegangenen Untersuchungen haben gezeigt, dass die MKP-1 als negativer Regulator der Egr-1 Expression in  $\alpha$ T3-Zellen wirkte (Abbildung 9). Die MKP-1 dephosphoryliert ERK, JNK und p38 Proteinkinasen (Keyse, 1998). Deshalb stellte sich die Frage, ob die Expression dieser Phosphatase auch einen Effekt auf die ATF3 Expression hat. In Abbildung 16A kann man sehen, dass die Expression der MKP-1 mittels lentiviralem Gentransfer zur Hemmung der ATF3 Biosynthese führte.

Die Stimulation von GnRH-Rezeptoren führt jedoch neben der Aktivierung des ERK-Signalwegs auch zur Aktivierung von JNK (Mulvaney & Roberson, 2000; Harris et al., 2003). Um die Rolle von JNK in der Signalkaskade zu untersuchen, die eine GnRH-Rezeptorstimulation mit der Transkription von ATF3 verbindet, wurde in  $\alpha$ T3-1 Zellen die MKP-5 überexprimiert. MKP-5 dephosphoryliert selektiv JNK und p38-Kinasen (Tanoue et al., 1999). Abbildung 16B zeigt, dass eine Expression dieser Phosphatase die Transkription des ATF3-Gens komplett blockierte. Das lässt darauf schließen, dass JNK für die ATF3 Expression in Buserelin-stimulierten  $\alpha$ T3-1 eine vorrangige Rolle spielt. Da JNK für die Egr-1 Expression keine Rolle spielte, liegt der Schluss nahe, dass das ATF3-Gen nicht nur durch Egr-1 reguliert wird.

Die Aktivierung von GnRH-Rezeptoren führt über die Stimulation von IP<sub>3</sub>-Rezeptoren des endoplasmatischen Retikulums zu einer Freisetzung von Ca<sup>2+</sup>-Ionen in das Zytosol. Der Anstieg der zytosolischen Ca<sup>2+</sup>-Konzentration kann Calcineurin aktivieren. Calcineurin ist eine Serin/Threoninphosphatase die sowohl durch Ca<sup>2+</sup> als auch Calmodulin reguliert wird (Rusnak & Mertz, 2000). Calcineurin besteht aus zwei Polypeptiden, einer katalytischen (CnA) und einer regulatorischen Untereinheit (CnB). CnA enthält außerdem eine C-terminale autoinhibitorische Domäne, die die Bindung eines Substratmoleküls an die katalytische Domäne verhindert. Bindet nun Ca<sup>2+</sup> an CnA wird die Autoinhibition aufgehoben und CnA aktiviert. Aktives CnA dephosphoryliert den ternären Komplexfaktor Elk-1 und unterbindet somit die SRE-vermittelte Transkription (Tian & Karin 1999). Der Mutante  $\Delta$ CnA fehlte die autoinhibitorische Domäne sowie Teile der Calmodulin-Bindungsdomäne (Abbildung 16C). Sie enthielt jedoch weiterhin die katalytische Domäne, so dass sie konstitutiv Elk-1 dephosphorylierte. Abbildung 16C zeigt die Auswirkung der lentiviralen Expression der Mutante  $\Delta$ CnA auf die Buserelin-induzierte Egr-1 und ATF3 Biosynthese. Die Dephosphorylierung von Elk-1 durch  $\Delta$ CnA inhibiert vollständig die Synthese von ATF3, jedoch nur partiell die Biosynthese von Egr-1.

Als Kontrolle wurde die Proteinphosphatase PP2C in  $\alpha$ T3-1 Zellen exprimiert. Diese Phosphatase hatte weder einen Effekt auf die Biosynthese von ATF3 nach Buserelinstimulation noch auf die Biosynthese von Egr-1 (Abbildung 16D).



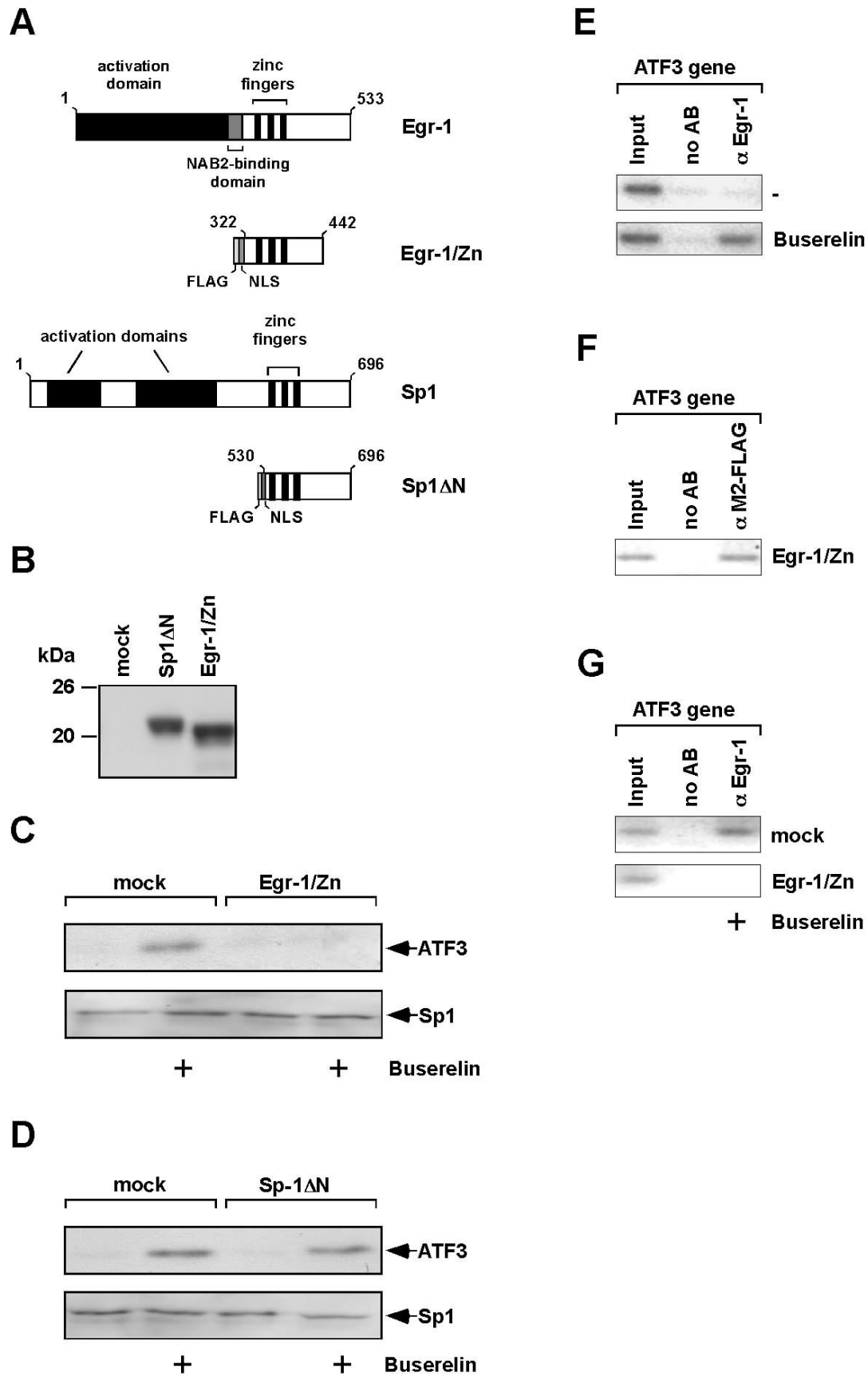
**Abbildung 16: Rolle von Phosphatasen in der Buserelin-induzierten Egr-1 und ATF3 Biosynthese.**  $\alpha$ T3-1 Zellen wurden mit Lentiviren infiziert die für MKP-1 (A), MKP-5 (B),  $\Delta$ CnA (C) oder PP2C (D,E) kodieren. Als Kontrolle wurden mock-infizierte Zellen analysiert. Den Zellen wurde 24 Stunden das Serum entzogen bevor sie mit Buserelin für zwei Stunden stimuliert wurden. Kernproteine wurden extrahiert und durch SDS-PAGE aufgetrennt. Die Detektion erfolgte im Westernblot mit Antikörpern gegen Egr-1 oder ATF3. Als Kontrolle wurde die Expression von Sp1 in mock- und virusinfizierten Zellen untersucht.

#### ***IV.1.12 Expression einer dominant-negativen Mutante von Egr-1 blockiert die Biosynthese von ATF3***

Bisher konnte gezeigt werden, dass die Kinetiken der Egr-1 und ATF3 Biosynthese eine Regulation von ATF3 durch Egr-1 theoretisch möglich machen. Außerdem sind die Signalwege, die zur Expression beider Gene führten, sehr ähnlich. Beide benötigten einen Anstieg der intrazellulären  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration und die Aktivierung des ERK-Signalwegs.



Um zu zeigen, dass Egr-1 tatsächlich ein Regulator des ATF3-Gens ist, wurden  $\alpha$ T3-1 Zellen mit Lentiviren infiziert, die für eine dominant-negative Mutante von Egr-1 kodierten. Der Mutante Egr-1/Zn fehlten die N-terminale Aktivierungsdomäne und die Bindungsstellen für den transkriptionellen Korepressor NAB1/2. Die Mutante enthielt jedoch immer noch die Zinkfinger-Bindungsdomäne, so dass sie an die DNA binden konnte und somit die Bindungsstellen für endogenes Egr-1 blockiert wurden. Als Kontrolle wurde in  $\alpha$ T3-1 Zellen eine dominant-negative Mutante von Sp1 exprimiert. Sp1 $\Delta$ N fehlte die N-terminale Aktivierungsdomäne. Abbildung 17A zeigt sowohl die modulare Struktur von Egr-1 und der dominant-negativen Mutante Egr-1/Zn als auch die modulare Struktur von Sp1 und der dominant-negativen Mutante Sp1 $\Delta$ N. Die lentiviral-vermittelte Expression von Egr-1/Zn unterband die Biosynthese von ATF3 (Abbildung 17C), wohingegen Sp1 $\Delta$ N keinen oder nur einen sehr geringen Effekt zeigte (Abbildung 17D). Eine längere Exposition des Filmes zeigte, dass die ATF3 Synthese von Egr-1/Zn nur partiell gehemmt wurde. Daraus lässt sich schließen, dass neben Egr-1 auch noch andere Transkriptionsfaktoren die ATF3 Expression regulieren. Egr-1 und Egr-1/Zn binden an dieselbe Konsensussequenz in den regulatorischen Regionen ihrer Zielgene. Um zu überprüfen ob Egr-1 auch an das ATF3-Gen gebunden wird, wurde ein ChIP-Experiment durchgeführt. Dazu wurde Chromatin aus Buserelin-stimulierten und unstimulierten  $\alpha$ T3-1 Zellen mit einem Antikörper gegen Egr-1 immunpräzipitiert und anschließend mit Primern amplifiziert, die die Egr-1 Bindungsstelle im ATF3 Gen umfassten. Die Ergebnisse zeigten, dass Egr-1 tatsächlich unter physiologischen Bedingungen an das ATF3 Gen gebunden wird (Abbildung 17E). ATF3 wird folglich tatsächlich durch Egr-1 reguliert. Um die Funktionalität der Egr-1 Mutante nochmals zu bestätigen, wurde die Bindung der Mutante an die Egr-1 Bindestelle des ATF3-Gens mittels ChIP-Assay bestätigt (Abbildung 17F). Zusätzlich konnte gezeigt werden, dass Egr-1/Zn unter physiologischen Bedingungen die Bindung von endogenem Egr-1 an das ATF3 Gen verhinderte (Abbildung 17G).



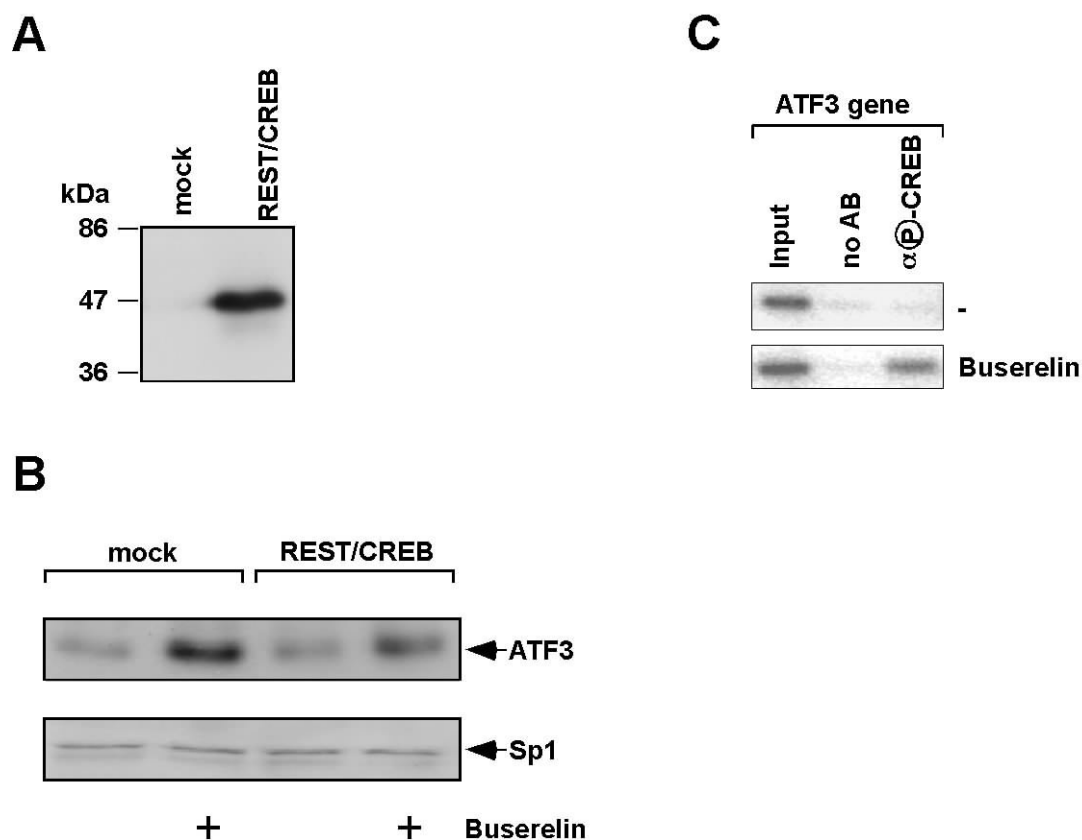
**Abbildung 17:** In gonadotropen Hypophysenzellen ist ATF3 ein Zielgen von Egr-1. **A.** Schematische Darstellung von Egr-1, Egr-1/Zn, Sp1 und Sp1ΔN. **B.** Immunologischer Nachweis der Transgene Sp1ΔN und Egr-1/Zn. **C. D.** Die Expression der dominant-negativen Mutante von Egr-1 hemmt die ATF3 Biosynthese. αT3-

1 Zellen wurden mit rekombinanten Lentiviren infiziert, die entweder für Egr-1/Zn (C) oder für Sp1ΔN (D) kodieren. Als Kontrolle wurden mock-infizierte Zellen untersucht. Nach 24 h Serumentzug wurden die Zellen für zwei Stunden mit Buserelin (10 nM) stimuliert. Die Kernproteine wurden durch SDS-Gelelektrophorese fraktioniert. Die Detektion von ATF3 erfolgte im Westernblot mittels spezifischer Antikörper. Als Kontrolle wurde die Expression von Sp1 in mock- und virusinfizierten Zellen untersucht. **E.** Bindung von Egr-1 an das ATF3 Gen. Ein ChIP-Experiment wurde mit Chromatin durchgeführt, welches entweder aus Buserelin-stimulierten oder aber unstimulierten Zellen gewonnen wurde. Die Immunpräzipitierung erfolgte mit Egr-1 spezifischen Antikörpern. Die präzipitierten DNA-Fragmente wurden mittels Primern amplifiziert, die die Egr-1 Bindestelle im ATF3-Promotor umspannen. **F.** Bindung von Egr-1/Zn an das ATF3 Gen. Ein ChIP-Experiment wurde mit Chromatin durchgeführt, das aus  $\alpha$ T3-1 Zellen gewonnen wurde, welche mit Egr-1/Zn kodierenden Lentiviren infiziert wurden. Die Immunpräzipitation erfolgte mit M2-Agarose welche selektiv die FLAG-getaggte Mutante präzipitierte. **G.** Ein ChIP-Experiment wurde mit Chromatin durchgeführt, welches entweder aus mock-infizierten  $\alpha$ T3-1 Zellen gewonnen oder aber aus Zellen die mit Egr-1/Zn kodierenden Lentiviren infiziert wurden. Die Zellen wurden nach 24 h Serumentzug für 2 h mit Buserelin (10 nM) stimuliert. Die Immunpräzipitation erfolgte mit einem spezifischen Antikörper gegen Egr-1.

### ***IV.1.13 Exkurs: Regulation der ATF3-Expression durch bZIP-Proteine***

#### **IV.1.13.1 Inhibierung von CREB reduziert die Expression von ATF3 in Buserelin-stimulierten $\alpha$ T3-1 Zellen**

Durch die vorangegangenen Experimente wurde deutlich, dass Egr-1 nicht alleine für die Regulation der ATF3 Biosynthese verantwortlich sein kann. Das ATF3-Gen enthält neben der Egr-1 Bindungsstelle noch ein cAMP-responsives Element (CRE). Also könnte auch der bZIP-Faktor CREB zur Aktivierung der ATF3 Transkription beitragen. Außerdem haben die Ergebnisse von Kapitel IV.1.6 gezeigt, dass die Stimulation des GnRH-Rezeptors mit Buserelin zu einer Phosphorylierung von CREB führte. Um den Einfluss des bZIP-Faktors CREB auf die Buserelin-induzierte ATF3 Biosynthese zu untersuchen, wurden  $\alpha$ T3-1 Zellen mit rekombinanten Lentiviren infiziert, die für eine dominant-negative Mutante von CREB kodierten. REST/CREB fehlt, wie in Kapitel IV.1.7 beschrieben, die Aktivierungsdomäne von CREB und kann somit nicht mehr durch Phosphorylierung aktiviert werden. Die Expression der Mutante reduziert die Buserelin-induzierte Synthese von ATF3 (Abbildung 18C). Zusätzlich konnte die Bindung der phosphorylierten Form von CREB an die regulatorische Region im ATF3 Gen mittels ChIP-Assay nachgewiesen werden (Abbildung 18D). Folglich ist CREB einer der Komponenten, die die GnRH-Rezeptor Aktivierung mit der Induktion der ATF3 Biosynthese verknüpfen.



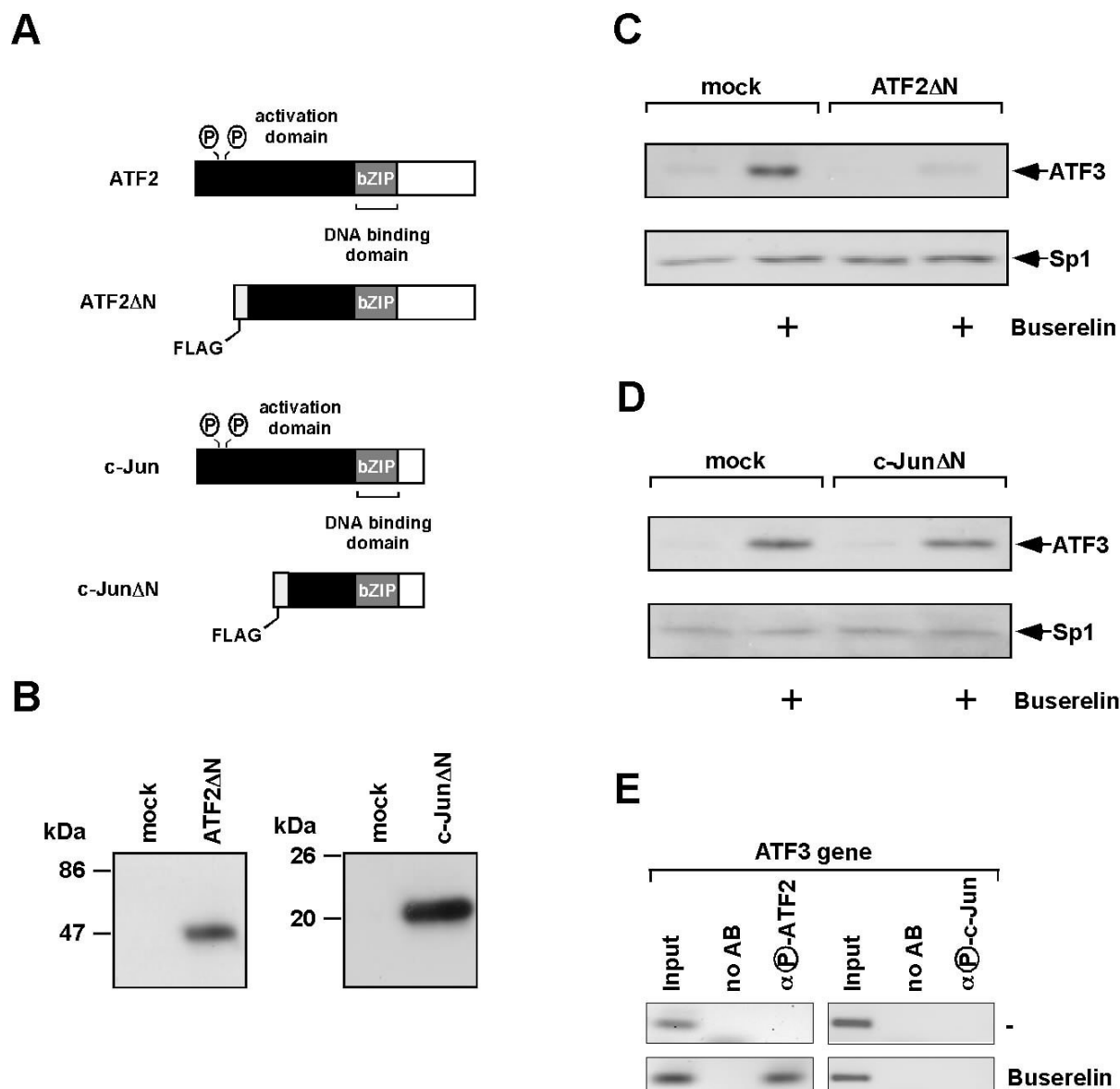
**Abbildung 18: Expression einer dominant-negativen Mutante von CREB vermindert die ATF3-Biosynthese.** **A.** Immunologischer Nachweis des Transgens. **B.** Die Expression der dominant-negativen Mutante von CREB hemmt die ATF3 Biosynthese.  $\alpha$ T3-1 Zellen wurden mit rekombinanten Lentiviren infiziert, die für REST/CREB kodieren. Als Kontrolle wurden mock-infizierte Zellen untersucht. Nach 24 h Serumentzug wurden die Zellen für zwei Stunden mit Buserelin (10 nM) stimuliert, Kernextrakte präpariert und die Proteine durch SDS-Gelelektrophorese fraktioniert. Die Detektion von ATF3 erfolgte im Westernblot mittels spezifischer Antikörper. Als Kontrolle wurde die Expression von Sp1 in mock- und virusinfizierten Zellen untersucht. **C.** Bindung von Phospho-CREB an das ATF3 Gen. Ein ChIP-Experiment wurde mit Chromatin durchgeführt, das entweder aus Buserelin-stimulierten oder aber unstimulierten Zellen gewonnen wurde. Die Immunpräzipitierung erfolgte mit phosphospezifischen Antikörpern gegen CREB. Die präzipitierten DNA-Fragmente wurden mittels Primern amplifiziert, die das CRE-Element im ATF3-Promotor umspannen.

#### IV.1.13.2 Die Rolle der bZIP-Faktoren ATF2 und c-Jun auf die Buserelin-induzierten Biosynthese von ATF3

Frühere Experimente konnten zeigen, dass der JNK-Inhibitor L-JNK1 die Biosynthese von ATF3 blockierte, und dass eine Überexpression der MKP-5 zu einer Verminderung der ATF3 Expression führte. Dies lieferte die ersten Hinweise, dass die Aktivierung von JNK und p38 Proteinkinase Teile der Signalkaskade sind, die die GnRH-Rezeptorstimulation mit einer gesteigerten ATF3-Expression verbinden. In primären Fibroblasten des Menschen konnte die Beteiligung von JNK, p38 und ATF2 an der Aktivierung der ATF3 Synthese gezeigt werden (Kool et al., 2003). Außerdem zeigte sich, dass ATF2 auch unter physiologischen

Bedingungen an das ATF3-Gen bindet (Bhoumik et al., 2005). Die Bindung von ATF2 an das Egr-1 Gen konnte mittels ChIP-Assay nachgewiesen werden (Kapitel IV.1.6). Um den Einfluss von ATF2 nicht nur auf das Egr-1 Gen, sondern auch auf die Expression von ATF3 zu untersuchen, wurde in  $\alpha$ T3-1 Zellen eine dominant-negative Mutante von ATF2 exprimiert. ATF2 $\Delta$ N konnte die Transkription nicht mehr induzieren, da ihr die N-terminale Aktivierungsdomäne fehlte (Abbildung 19A). Die Mutante enthielt jedoch noch immer die Dimerisierungs- und die DNA-Bindungsdomänen, so dass sie noch als Homo- oder Heterodimer an die DNA binden konnte und somit die Bindungsstelle für endogenes ATF2 blockierte. Die Expression dieser Mutante in  $\alpha$ T3-1 Zellen inhibierte die Expression von ATF3 vollständig (Abbildung 19C). Dass die phosphorylierte Form von ATF2 nicht nur an Egr-1 sondern auch an das ATF3 Gen gebunden wurde, konnte mittels ChIP-Assay gezeigt werden (Abbildung 19D). Der bZIP-Faktor ATF2 hat somit neben Egr-1 und CREB Einfluss auf die ATF3 Biosynthese.

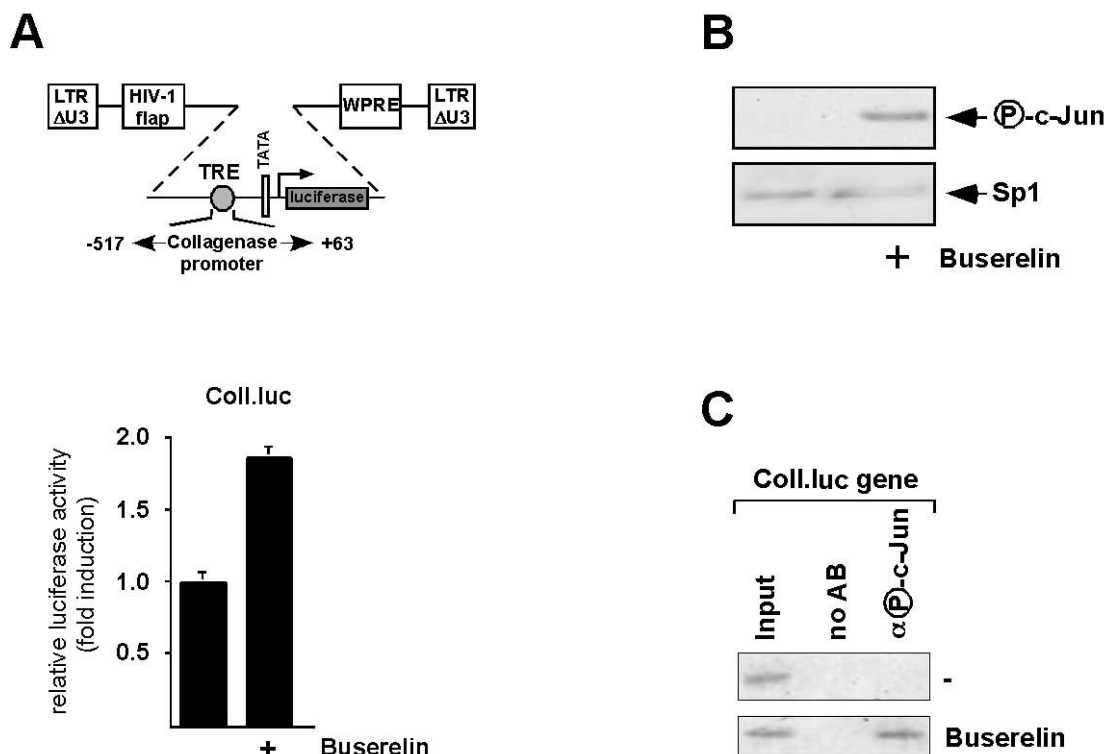
JNK- und p38 Proteinkinasen induzieren nicht nur die Phosphorylierung von ATF2 sondern auch die von c-Jun. Die Phosphorylierung von c-Jun nach Stimulation von GnRH-Rezeptoren wurde schon gezeigt (Mulvaney & Roberson, 2000; Xie et al., 2005). Um zu überprüfen ob auch c-Jun die Expression von ATF3 reguliert, wurde in  $\alpha$ T3-1 Zellen eine dominant-negative Mutante von c-Jun exprimiert. c-Jun $\Delta$ N fehlte die Aktivierungsdomäne von c-Jun. Die Mutante enthielt aber die Dimerisierung- und DNA-Bindungsdomänen (Abbildung 19A). Abbildung 19C zeigt eine unvermindert starke Synthese von ATF3 nach Buserelin-Stimulation, trotz Expression der dominant-negativen Mutante c-Jun $\Delta$ N. Auch konnte keine Bindung von c-Jun an die regulatorische Region des ATF3 Gens gezeigt werden (Abbildung 19D). c-Jun hat folglich keinerlei Einfluss auf die transkriptionelle Aktivierung des ATF3 Gens.



**Abbildung 19: Expression einer dominant-negativen Mutante von ATF2 vermindert die ATF3-Biosynthese.** **A.** Schematische Darstellung von ATF2, ATF2 $\Delta$ N, c-Jun und c-Jun $\Delta$ N. **B.** Immunologischer Nachweis der Transgene. **C. D.** Die Expression der dominant-negativen Mutante ATF2 $\Delta$ N hemmt die ATF3 Biosynthese.  $\alpha$ T3-1 Zellen wurden mit rekombinanten Lentiviren infiziert, die für ATF2 $\Delta$ N (C) oder c-Jun $\Delta$ N (D) kodieren. Als Kontrolle wurden mock-infizierte Zellen untersucht. Nach 24 h Serumentzug wurden die Zellen mit Buserelin (10 nM) für zwei Stunden stimuliert. Kernextrakte präpariert und durch SDS-Gelelektrophorese fraktioniert. Die Detektion von ATF3 erfolgte im Westernblot mittels spezifischer Antikörper. Als Kontrolle wurde die Expression von Sp1 in mock- und virusinfizierten Zellen untersucht. **E.** Bindung von Phospho-ATF2 und Phospho-c-Jun an das ATF3 Gen. Ein ChIP-Experiment wurde mit Chromatin durchgeführt, das entweder aus Buserelin-stimulierten oder aber unstimulierten Zellen gewonnen wurde. Die Immunpräzipitierung erfolgte entweder mit phosphospezifischen Antikörpern gegen ATF2 oder c-Jun. Die präzipitierten DNA-Fragmente wurden mittels Primern amplifiziert, die das CRE-Element im ATF3-Promotor umspannen.

#### IV.1.13.3 Buserelinstimulation von $\alpha$ T3-1 Zellen führt zu gesteigerter AP-1 Aktivität, einer Phosphorylierung von c-Jun und der Bindung von Phospho-c-Jun an die AP-1 Bindestelle

Die bisherigen Ergebnisse zeigen eindeutig, dass c-Jun nicht in der Regulation des ATF3 Gens involviert ist. Um die Funktionalität des verwendeten Antikörpers und die damit generierten Ergebnisse überprüfen zu können, wurden  $\alpha$ T3-1 Zellen mit Lentiviren infiziert, die für ein Luziferase-Reportergen kodieren, welches unter der Kontrolle des humanen Kollagenasepromotors steht. Dieser Promotor besitzt eine AP-1 Bindestelle und wurde vielfach benutzt um die AP-1 Aktivität zu untersuchen (Angel et al., 1987; Steinmüller et al., 2001). Die Stimulation von  $\alpha$ T3-1 Zellen mit Buserelin führte zu einer transkriptionellen Aktivierung des AP-1-responsiven Kollagenase-Promotor-Luziferasereportergens (Abbildung 20A). Folglich führte die Stimulation von GnRH-Rezeptoren zu einer gesteigerten AP-1 Aktivität unter diesen Bedingungen. Das TPA-responsive Element (TRE) im Kollagenasepromotor fungiert als Bindungsstelle für c-Jun und c-Fos (Chiu et al., 1989). Abbildung 20B zeigt, dass die Stimulation der Zellen mit Buserelin zu einer Phosphorylierung von c-Jun führte. Phospho-c-Jun wurde unter physiologischen Bedingungen an das Kollagenasepromotor-Reportergen gebunden (Abbildung 20C). Buserelin-Stimulation führte folglich zur Phosphorylierung von c-Jun, zur Bindung von c-Jun an die AP-1 Bindestelle und zu einer gesteigerten AP-1 Aktivität. Allerdings spielte c-Jun in der Buserelin-induzierten Regulation des ATF3 Gens keine Rolle.

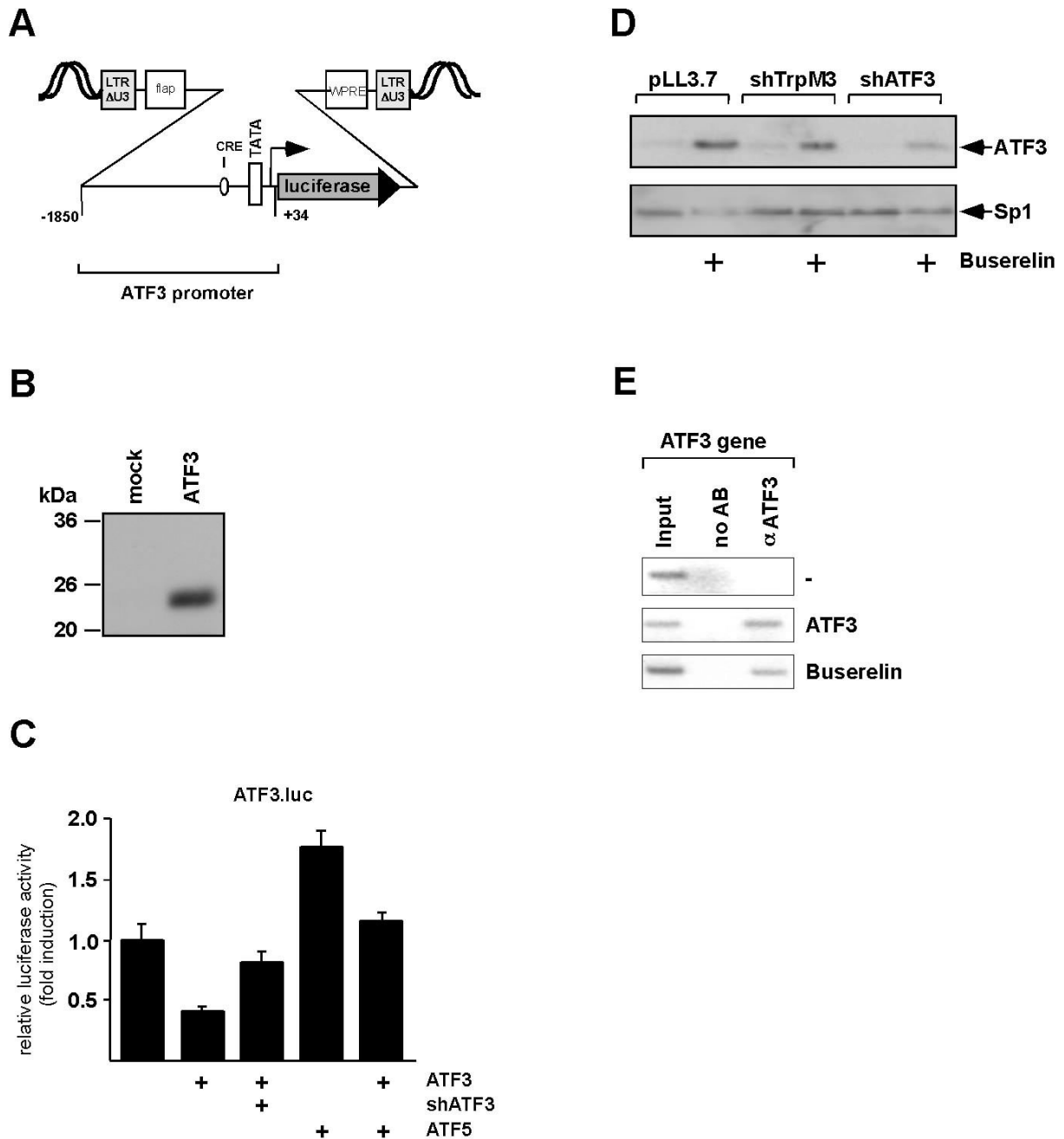


**Abbildung 20: Buserelinstimulation erhöht die AP-1 Aktivität, bewirkt die Phosphorylierung von c-Jun und Bindung von c-Jun an die AP-1 Bindestelle.** **A.** Schematische Darstellung des integrierten Provirus der für ein Kollagenasepromotor-Luziferasereporter gen kodiert.  $\alpha$ T3-1 Zellen wurden mit Lentiviren infiziert, die für ein Kollagenasepromotor-Luziferasereporter gen kodieren. Den Zellen wurde 24 h das Serum entzogen bevor sie für weitere 24 h mit 10 nM Buserelin stimuliert wurden. Zellextrakte wurden hergestellt und die Luziferaseaktivität gemessen und über die Proteinkonzentrationen normalisiert. **B.**  $\alpha$ T3-1 Zellen wurden 24 h ohne Serum kultiviert, bevor sie für 2 h mit 10 nM Buserelin stimuliert wurden, Kernextrakte wurden isoliert und die Proteine im Westernblotverfahren mittels eines phosphospezifischen Antikörpers gegen c-Jun detektiert. **D.** Bindung von Phospho-c-Jun an die AP-1 Bindestelle im Kollagenasepromotor-Luziferasereporter gen. Ein ChIP-Experiment wurde mit Chromatin durchgeführt, welches aus Buserelin-stimulierten oder aber unstimulierten Zellen gewonnen wurde die zuvor mit Lentiviren infiziert wurden, die für ein Kollagenasepromotor-Luziferasereporter gens kodieren. Die Immunpräzipitierung erfolgte mit phosphospezifischen Antikörpern gegen c-Jun. Die präzipitierten DNA-Fragmente wurden mittels Primern amplifiziert, die das TRE-Element im Kollagenase-Promotor umspannen.

#### ***IV.1.14 ATF3 reguliert seine eigene Transkription***

ATF3 fungiert entweder als transkriptioneller Repressor oder als Aktivator (Chen et al., 1994). In HeLa Zellen bindet ATF3 auch an das ATF3 Gen und reprimiert dessen Transkription. Der Effekt wird dabei über das CRE-Element im Promotor vermittelt (Wolfgang et al., 2000). Um die Funktion von ATF3 für die Regulation seiner eigenen Transkription in gonadotropen Hypophysenzellen zu untersuchen, wurde in  $\alpha$ T3-1 Zellen ein ATF3 Promotor/Luziferase Reporter gen in das Chromatin inseriert. Abbildung 21A zeigt die schematische Darstellung des integrierten Provirus. Um den Effekt von ATF3 auf die Expression dieses Reporter gens zu untersuchen wurden die Zellen zusätzlich mit ATF3 kodierenden Lentiviren infiziert. Abbildung 21C zeigt den Effekt der ATF3 Expression auf die Luziferaseaktivität des ATF3 Promotor/Luziferase Reporter gens. Der reprimierende Effekt der ATF3-Expression konnte jedoch durch die gleichzeitige Expression einer ATF3 spezifischen shRNA rückgängig gemacht werden. Die Spezifität der shRNA zeigt Abbildung 21D. Im Vergleich zu Zellen, die mit Lentiviren infiziert wurden, die für einen Vektor kodieren der kein Protein exprimiert (pLL3.7) oder mit Kontroll-shRNA kodierenden Lentiviren infiziert wurden, kam es ausschließlich in den shATF3 exprimierenden Zellen zu einer Inhibierung der ATF3 Biosynthese. Die Expression des bZIP-Proteins ATF5 hat dagegen eine genau entgegengesetzte Wirkung auf das ATF3-Gen. Wird ATF5 gleichzeitig zu einem ATF3 Promotor/Luziferasereporter gens exprimiert, kommt es zu einer transkriptionellen Aktivierung des Reporter gens. Eine zusätzliche Expression von ATF3 verhinderte dagegen die ATF5-induzierte Aktivierung des Reporter gens (Abbildung 21C). Über ChIP-Experimente konnte außerdem gezeigt werden, dass ATF3 sowohl nach einer Überexpression von ATF3 mittels lentiviralem Gentransfer, als auch nach Stimulation mit Buserelin an seinen eigenen Promotor bindet (Abbildung 21E).



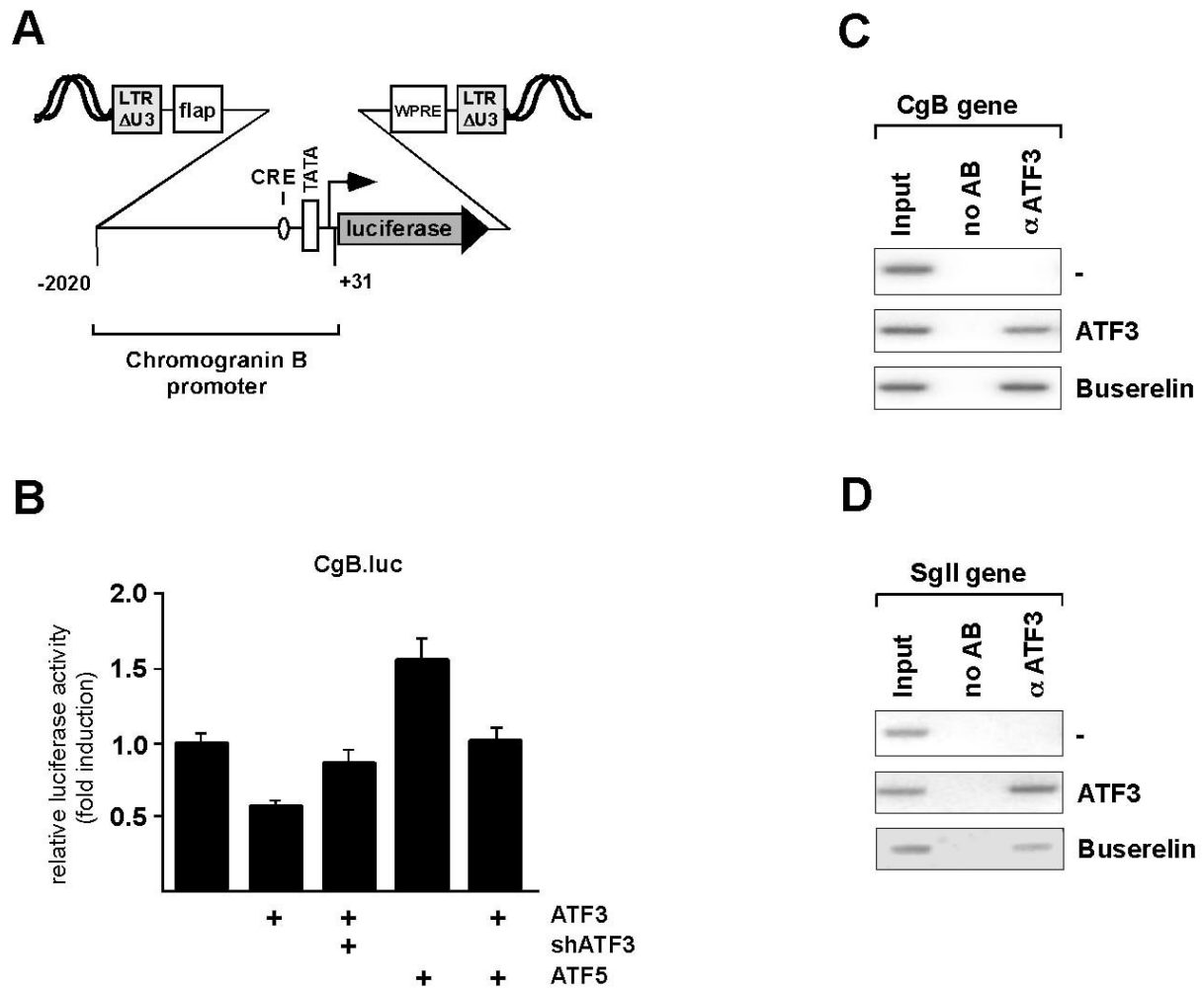


**Abbildung 21: ATF3 bindet an den eigenen Promotor und reprimiert dessen Expression.** **A.** Schematische Darstellung des integrierten Provirus der für ein ATF3-Promotor/Luziferasereporter gen kodiert. **B.** Immunologischer Nachweis des Transgens. **C.** Die Expression von ATF3 hemmt die Aktivität eines ATF3-Promotor/Luziferasereporter gens.  $\alpha$ T3-1 Zellen wurden mit rekombinanten Lentiviren infiziert, die für ein ATF3 Promotor/ Luziferasereporter gen kodieren. Nach 24 h wurden die Zellen erneut mit Lentiviren infiziert, die für ATF3, ATF5 oder shATF3 kodieren. Ganzzellextrakte wurden präpariert, die Luziferaseaktivität gemessen und über die Proteinkonzentration normalisiert. **D.**  $\alpha$ T3-1 Zellen wurden mit Lentiviren infiziert, die entweder für eine spezifische ATF3 oder TRPM3 shRNA kodierten. Außerdem wurden die Zellen mit Lentiviren infiziert, die nicht für eine shRNA kodierten (pLL3.7). Die Zellen wurden 24 h ohne Serum kultiviert und anschließend für 2 h mit Buserelin (10 nM) stimuliert. Kernproteine wurden im Westernblotverfahren mittels ATF3-spezifischer Antikörper detektiert. **E.** Bindung von ATF3 an das ATF3 Gen. Ein ChIP-Experiment wurde mit Chromatin durchgeführt, das entweder aus Buserelin-stimulierten, unstimulierten oder aber mit ATF3 kodierenden Lentiviren infizierten Zellen gewonnen wurde. Die Immunpräzipitierung erfolgte mit spezifischen Antikörpern

gegen ATF3. Die präzipitierten DNA-Fragmente wurden mittels Primern amplifiziert, die das CRE-Element im ATF3-Promotor umspannen.

#### ***IV.1.15 ATF3 reguliert die Transkription des Chromogranin B-Gens***

Granine gehören zu einer Gruppe saurer Proteine der sekretorischen Granula, die in neuroendokrinen Zellen stark exprimiert werden. Interessanterweise werden eine Vielzahl der Mitglieder dieser Proteinfamilie, einschließlich Chromogranin B und Segretogranin II von Genen kodiert, die ein CRE Element in ihrem Promotor beinhalten (Jüngling et al., 1994; Cibelli et al., 1996). Da ATF3 an das CRE-Element bindet, stellte sich die Frage, ob ATF3 auch die Transkription von Chromogranin B reguliert. Dafür wurde in  $\alpha$ T3-1 Zellen ein CgB Promotor/Luziferase Reportergen exprimiert. Abbildung 22A zeigt die schematische Darstellung des integrierten Provirus. Um den Effekt von ATF3 auf die Expression dieses Reportergens zu untersuchen wurden die Zellen zusätzlich mit ATF3 kodierenden Lentiviren infiziert. Abbildung 22B zeigt den Effekt der ATF3 Expression auf die Luziferaseaktivität des CgB Promotor/Luziferase Reportergens. Der Einsatz einer ATF3 spezifischen shRNA führte auch im Fall von CgB zur Neutralisierung der Repression, die durch die Expression von ATF3 hervorgerufen wurde. Ebenso wie im Falle des ATF3 Reportergens bewirkte die Expression von ATF5 auch eine Steigerung der CgB-Reportergenaktivität. Diese durch ATF5 hervorgerufene Aktivierung konnte durch gleichzeitige Expression von ATF3 wieder zu Normalwerten herunterreguliert werden. CHIP-Experimente zeigten zudem, dass ATF3 sowohl nach einer Überexpression von ATF3 mittels lentiviralem Gentransfer als auch nach Stimulation mit Buserelin an das CgB Gen (Abbildung 22C) oder aber an das SgII Gen (Abbildung 22D) gebunden wurde. ATF3 wirkt folglich als transkriptioneller Repressor für das Chromogranin B-Gen.



**Abbildung 22: ATF3 reguliert die Expression von Chromogranin B.** **A.** Schematische Darstellung des integrierten Provirus der für ein CgB-Promotor/Luziferasereporter gen kodiert. **B.** Die Expression von ATF3 hemmt die Aktivität eines CgB-Promotor/Luziferasereporter gens. αT3-1 Zellen wurden mit rekombinanten Lentiviren infiziert, die für ein CgB-Promotor/Luziferasereporter gen kodieren. Nach 24 h wurden die Zellen erneut mit Lentiviren infiziert, die für ATF3, ATF5 oder shATF3 kodieren. Ganzelleextrakte wurden präpariert und die Luziferaseaktivität gemessen. **C. D.** Bindung von ATF3 an das CgB (C) oder SgII (D) Gen. Das ChIP-Experiment wurde mit Chromatin durchgeführt, das entweder aus Buserelin-stimulierten, unstimulierten oder aber mit ATF3 kodierenden Lentiviren infizierten Zellen gewonnen wurde. Die Immunpräzipitierung erfolgte mit spezifischen Antikörpern gegen ATF3. Die präzipitierten DNA-Fragmente wurden mittels Primern amplifiziert, die das CRE-Element im CgB- oder SgII-Promotor umspannen.

#### IV.1.16 Egr-1 bindet in Buserelinstimulierten αT3-1 Zellen an das

##### Chromogranin B Gen

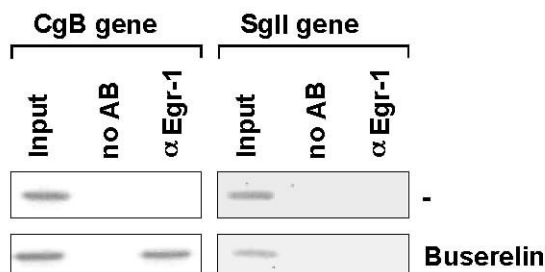
In PC12 Zellen wurde vor kurzem gezeigt, dass Egr-1 das Chromogranin B Gen reguliert (Mahapatra et al., 2006). Die Betrachtung des murinen CgB-Gens brachte zu Tage, dass sich im Promotorbereich neben der CRE-Bindestelle auch eine Bindestelle für Egr-1 befindet (Abbildung 23A). Außerdem spricht die Tatsache, dass die Egr-1 Expression durch Buserelin in gonadotropen Hypophysenzellen aktiviert wird dafür, dass das CgB-Gen in diesen

Zelltypus ebenfalls durch Egr-1 reguliert wird. Um diese Hypothese zu bestätigen, wurde ein ChIP-Experiment durchgeführt. Chromatin von unstimulierten sowie von Buserelin-stimulierten Zellen wurde mit Antikörpern gegen Egr-1 immunpräzipitiert. Die so gewonnene DNA wurde mit Primern amplifiziert, die sowohl die Egr-1 Bindestelle als auch das CRE-Element im proximalen Bereich des CgB-Promotors umspannten. In Abbildung 23B ist gut zu erkennen, dass Egr-1 zwar an das CgB-Gen jedoch nicht an das SgII-Gen gebunden wurde. CgB gehört also tatsächlich zu den Egr-1 regulierten Genen in  $\alpha$ T3-1 Zellen. Die Tatsache, dass keine Bindung von Egr-1 an das SgII Gen nachgewiesen werden konnte, spricht dafür, dass die Granine durch gemeinsame (CREB, ATF3) und unterschiedliche Transkriptionsfaktoren (Egr-1) reguliert werden.

**A**



**B**



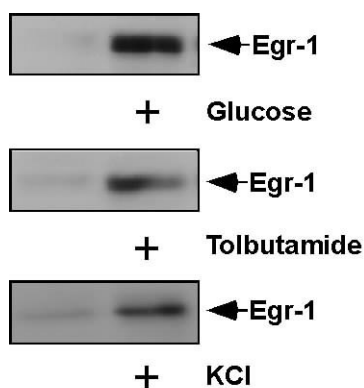
**Abbildung 23 Egr-1 bindet an das Chromogranin B-Gen in Buserelin-stimulierten  $\alpha$ T3-1 Zellen: A.** Sequenz der proximalen Promotorregion des murinen ChromograninB B Gens (Acc.No. NM\_007694.3). **B.** Bindung von Egr-1 an das CgB oder SgII Gen. Das ChIP-Experiment wurde mit Chromatin durchgeführt, das entweder aus Buserelin-stimulierten oder unstimulierten Zellen gewonnen wurde. Die Immunpräzipitierung erfolgte mit spezifischen Antikörpern gegen Egr-1. Die präzipitierten DNA-Fragmente wurden mittels Primern amplifiziert, die das CRE-Element und die Egr-1 Bindestelle im CgB- oder das CRE-Element im SgII-Promotor umspannen.

## IV.2 MIN6

### IV.2.1 Biosynthese von Egr-1 nach Stimulation von $\beta$ -Zellen mit Glukose,

#### *Tolbutamid oder Kaliumchlorid*

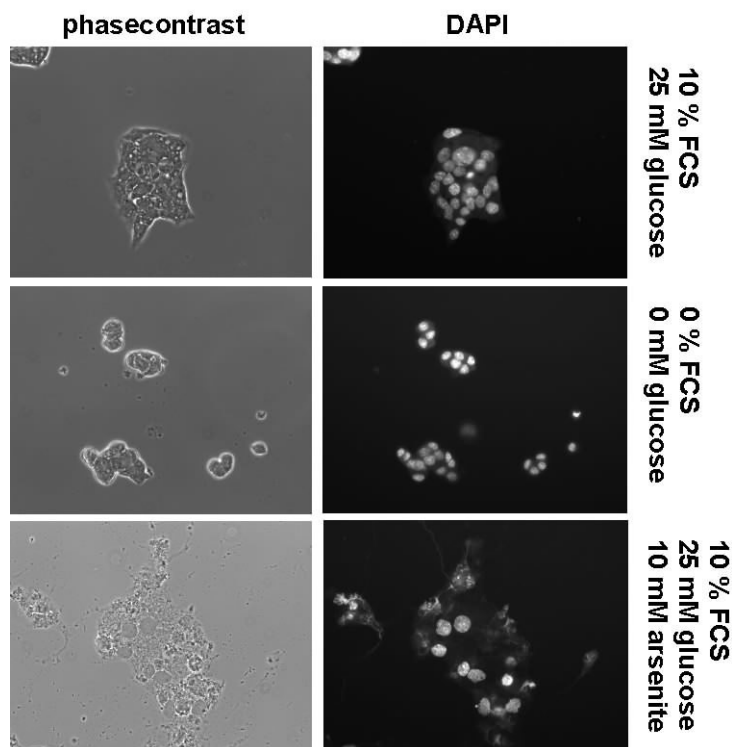
Glukose wird in  $\beta$ -Zellen des Pankreas über GLUT2 Glukosetransporter in die Zelle aufgenommen und dort verstoffwechselt. Der durch den Stoffwechsel steigende ATP/ADP Koeffizient führt zum Verschluss ATP-sensitiver  $K^+$ -Kanäle und dadurch zur Depolarisierung der Membran, da der Überschuss positiv geladener Ionen in der Zelle nicht mehr ausgeglichen werden kann. Durch die Depolarisation der Membran öffnen sich spannungsabhängige  $Ca^{2+}$ -Kanäle (Prentki & Matschinsky, 1987; Ashcroft & Ashcroft, 1990). Der Anstieg der intrazellulären  $Ca^{2+}$ -Konzentration kann in  $\beta$ -Zellen zum einen zur Sekretion von Insulin führen (Rajan et al., 1990), andererseits ist  $Ca^{2+}$  ein potenter „second messenger“, der die Genexpression durch Aktivierung spezifischer Signalkaskaden reguliert. Die Depolarisation und damit die Öffnung der spannungsabhängigen  $Ca^{2+}$ -Kanäle kann man ebenso durch Einsatz von Sulfonamiden wie Tolbutamid herbeiführen. Tolbutamid ist ein spezifischer  $K^+$ -Kanalinhistor der diese selektiv verschließt und somit den Ausstrom von  $K^+$  verhindert. Eine weitere Möglichkeit, eine Depolarisation herbeizuführen, ist die Zugabe von extrazellulärem  $K^+$ . Um herauszufinden ob die Aktivierung von  $Ca^{2+}$ -Kanälen und der Einstrom von  $Ca^{2+}$  in die Zelle zur Aktivierung der Egr-1 Biosynthese führt, wurden MIN6 Zellen nach 24 Stunden Serum- und Glukoseentzug mit Glukose, Tolbutamid oder KCl für eine Stunde stimuliert. Wie in Abbildung 24 zu sehen ist, führte sowohl eine Stimulation der Zellen mit Glukose als auch mit Tolbutamid und KCl zur Biosynthese von Egr-1.



**Abbildung 24: Glukose, Tolbutamid oder KCl- Stimulation von  $\beta$ -Zellen des Pankreas führt zur Biosynthese von Egr-1.** MIN6 Zellen wurden 24 Stunden in serum- und glukosefreiem Medium kultiviert bevor sie entweder mit 25 mM Glukose, 100  $\mu$ M Tolbutamid oder 25 mM KCl für 1 Stunde stimuliert wurden.

Kernproteine wurden extrahiert und mittels SDS-PAGE aufgetrennt. Die Westernblot Analyse erfolgte mittels Egr-1 spezifischen Antikörpern.

Um ausschließen zu können, dass eine 24 stündige Serum-und Glukosereduktion zu Sekundäreffekten durch apoptotische Zellen etc. führt, wurden die Zellkerne mit dem Hoechstfarbstoff 33258 angefärbt, um kondensierte Zellkerne oder fragmentierte DNA darzustellen. Es zeigten sich keine Unterschiede zwischen den in 10 % FCS, 25 mM Glukose kultivierten Zellen oder den Zellen, denen beides entzogen wurde (Abbildung 25). Die Stimulation der Zellen mit Arsenit diente als Positivkontrolle.



**Abbildung 25:** Hoechst 33258 Färbung von MIN6 Zellen. MIN6 Zellen wurden 24 h in entsprechendem Kulturmedium gehalten bevor sie mit Paraformaldehyd fixiert und für 10 min mit 10 µg/ml Hoechst 33258 gefärbt wurden.

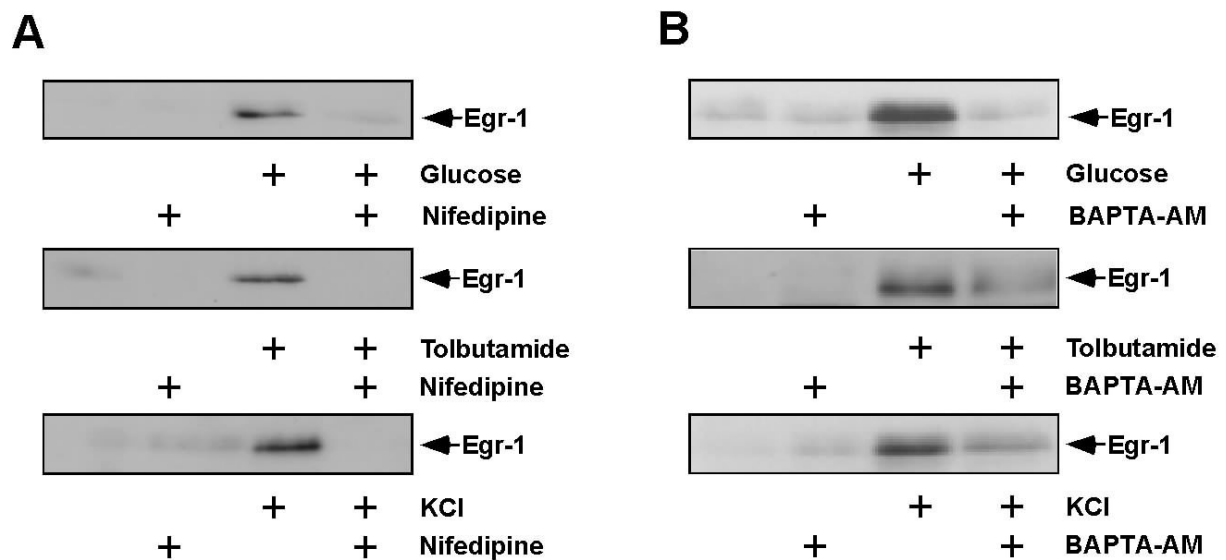
#### ***IV.2.2 Transkriptionelle Aktivierung des Egr-1 Gens ist abhängig von einem***

##### ***Anstieg der intrazellulären Ca<sup>2+</sup>-Konzentration und der Proteinkinasen***

##### ***PKC und ERK***

Wie zuvor beschrieben, führte eine Stimulation von  $\beta$ -Zellen des Pankreas mit Glukose, Tolbutamid oder auch KCl zur Öffnung spannungsabhängiger Ca<sup>2+</sup>-Kanäle und dadurch zu einem Anstieg der intrazellulären Ca<sup>2+</sup>-Konzentration. Um zu untersuchen in wieweit Ca<sup>2+</sup>-abhängige Signalübertragungswege bei der Expression des Egr-1 Gens von Bedeutung sind,

wurde die synthetische Substanz BAPTA-AM und der  $\text{Ca}^{2+}$ -Kanalblocker Nifedipine eingesetzt. Der Acetomethylester des  $\text{Ca}^{2+}$ -Chelators BAPTA ist zellgängig und spaltet innerhalb der Zelle den Acetomethylrest durch Esterasen ab, so dass gewährleistet ist, dass nur intrazelluläres  $\text{Ca}^{2+}$  gebunden wird. Nifedipin blockiert selektiv L-Typ  $\text{Ca}^{2+}$ -Kanäle.



**Abbildung 26: Intrazelluläre Signalmoleküle die an der Induktion der Egr-1 Biosynthese in MIN6 Zellen beteiligt sind.** A. B. MIN6 Zellen wurden für eine Stunde mit dem Nifedipine (50  $\mu\text{M}$ ) (A) oder für eine Stunde mit dem Acetomethylester des  $\text{Ca}^{2+}$ -Chelators BAPTA (30  $\mu\text{M}$ ) (B) behandelt und anschließend für eine Stunde mit Glukose (25 mM), Tolbutamid (100  $\mu\text{M}$ ) oder KCl (25 mM) stimuliert. Kernproteine wurden isoliert und mittels SDS-Gelelektrophorese fragmentiert. Die Detektion von Egr-1 erfolgte im Westernblot mittels spezifischer Antikörper.

Abbildung 26 zeigt, dass die Glukose, Tolbutamid und KCl-induzierten Signalübertragungswege, welche die Expression von Egr-1 regulieren, von der intrazellulären  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration abhängig sind. Damit konnte gezeigt werden, dass  $\text{Ca}^{2+}$  eine wichtige Rolle als „second messenger“ in der Glukose, Tolbutamid oder KCl- induzierten Biosynthese von Egr-1 spielt.

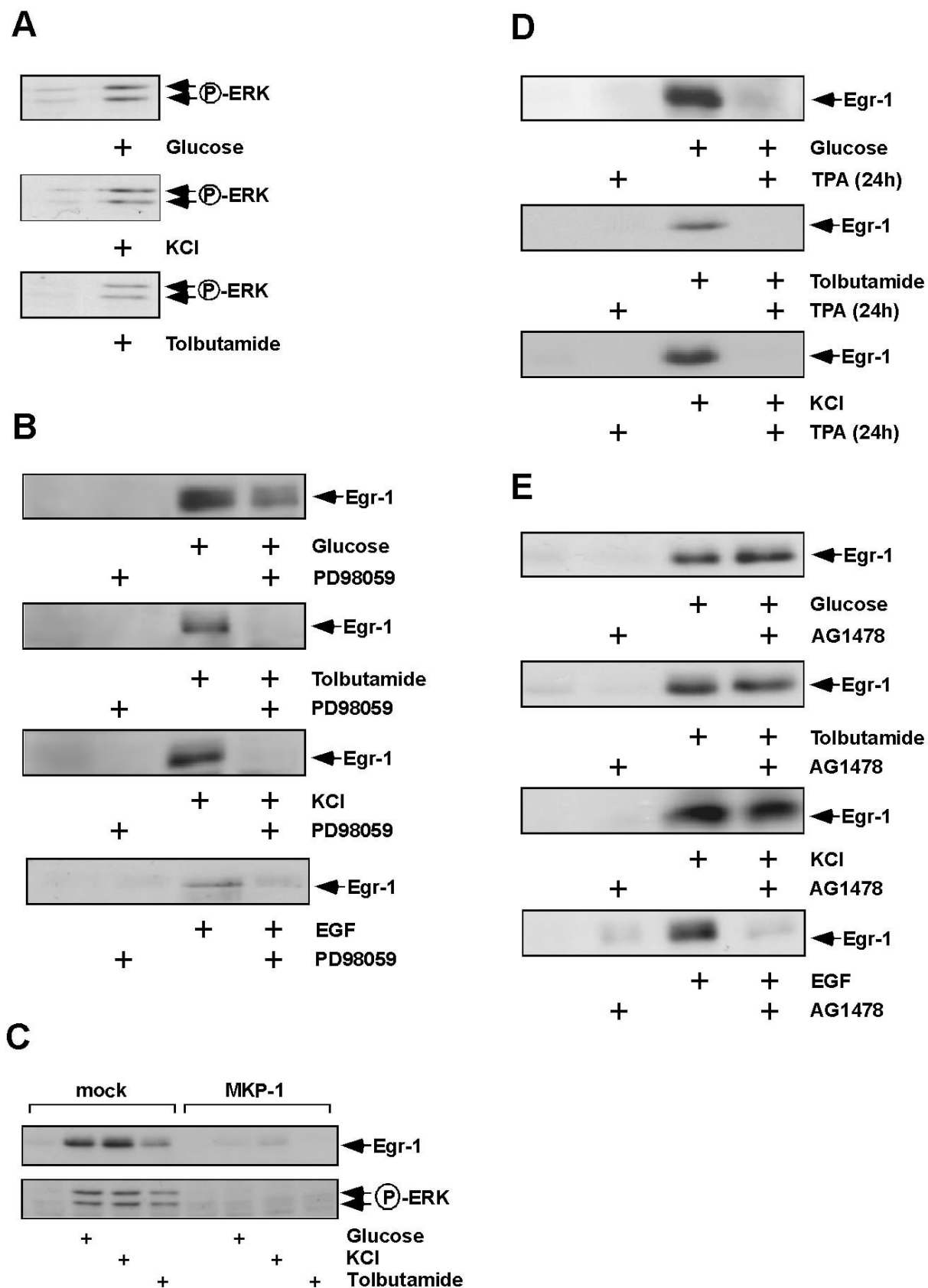
Es ist bekannt, dass Stimulation von  $\beta$ -Zellen des Pankreas zur Aktivierung der ERK-Signalkaskade führt (Frödin et al., 1995; Arnette et al., 2003). In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass Stimulation von MIN6 mit Glukose, KCl oder Tolbutamid zur Phosphorylierung von ERK führte (Abbildung 27A). Anschließend wurde die Rolle von ERK für die Signalkaskade, die zur Egr-1 Biosynthese führt, untersucht, indem MIN6 Zellen vor der Stimulation mit Glukose, Tolbutamid oder KCl mit dem spezifischen MEK-inhibitor PD98059 inkubiert wurden. Die Inhibierung der ERK-Aktivierung hemmte ebenfalls die Glukose, Tolbutamid oder KCl- induzierte Egr-1 Expression (Abbildung 27B). Da diese

Ergebnisse zeigen, dass ERK ein wichtiger Bestandteil der Signalkaskade ist, die zur Egr-1 Biosynthese führt, stellte sich die Frage, ob eine Überexpression der MKP-1, eines Enzyms, das ERK im Nukleus dephosphoryliert, einen Einfluss auf die transkriptionelle Aktivierung des Egr-1 Gens hat. Abbildung 27C zeigt die Effekte der Überexpression der MKP-1. Die Expression der MKP-1 dephosphorylierte ERK im Kern und führte somit zur Inhibierung der Egr-1 Biosynthese.

Eine erhöhte intrazelluläre  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration kann zur Aktivierung  $\text{Ca}^{2+}$ -sensitiver PKC-Isoformen führen. Diese Kinasen können den ERK-Signalweg aktivieren. Dies geschieht entweder über direkte oder indirekte Aktivierung von Raf (Kolch et al., 1993; Schönwasser et al., 1998; Corbit et al., 2003). Um die Rolle der PKC für die Glukose, Tolbutamid und KCl-induzierten Signalübertragungswege zu untersuchen, wurden MIN6 Zellen 24 Stunden mit dem Phorbolster TPA stimuliert. Eine verlängerte Exposition der Zellen mit TPA führt zur proteolytischen Degradierung von DAG-abhängigen PKC-Isoformen (Benes et al., 1999). Und wie Abbildung 27D zeigt, blockierte die Präinkubation der Zellen mit TPA die Glukose, Tolbutamid und KCl-induzierte Egr-1 Biosynthese in MIN6 Zellen.

Die Signalwege, die zur Biosynthese von Egr-1 führen, beinhalten in einigen Fällen auch eine Transaktivierung des EGF-Rezeptors. Um herauszufinden, ob es nach Glukose, Tolbutamid oder KCl Stimulation von MIN6 Zellen zu einer Transaktivierung des EGF-Rezeptors kommt und dies zur transkriptionellen Aktivierung des Egr-1 Gens führt, wurden die Zellen mit dem spezifischen EGF-Rezeptorinhibitor AG1478 präinkubiert. Als Positivkontrolle wurden die Zellen mit EGF stimuliert. Und wie in Abbildung 27E zu sehen ist, inhibierte AG1478 die Aktivierung des EGF-Rezeptors durch EGF. Die Inkubation mit AG1478 hatte jedoch keinen Einfluss auf die Biosynthese von Egr-1 nach Stimulation der MIN6 Zellen mit Glukose, Tolbutamid oder KCl. Diese Ergebnisse lassen auf eine EGF-Rezeptor-unabhängige Induktion der Egr-1 Expression schließen.



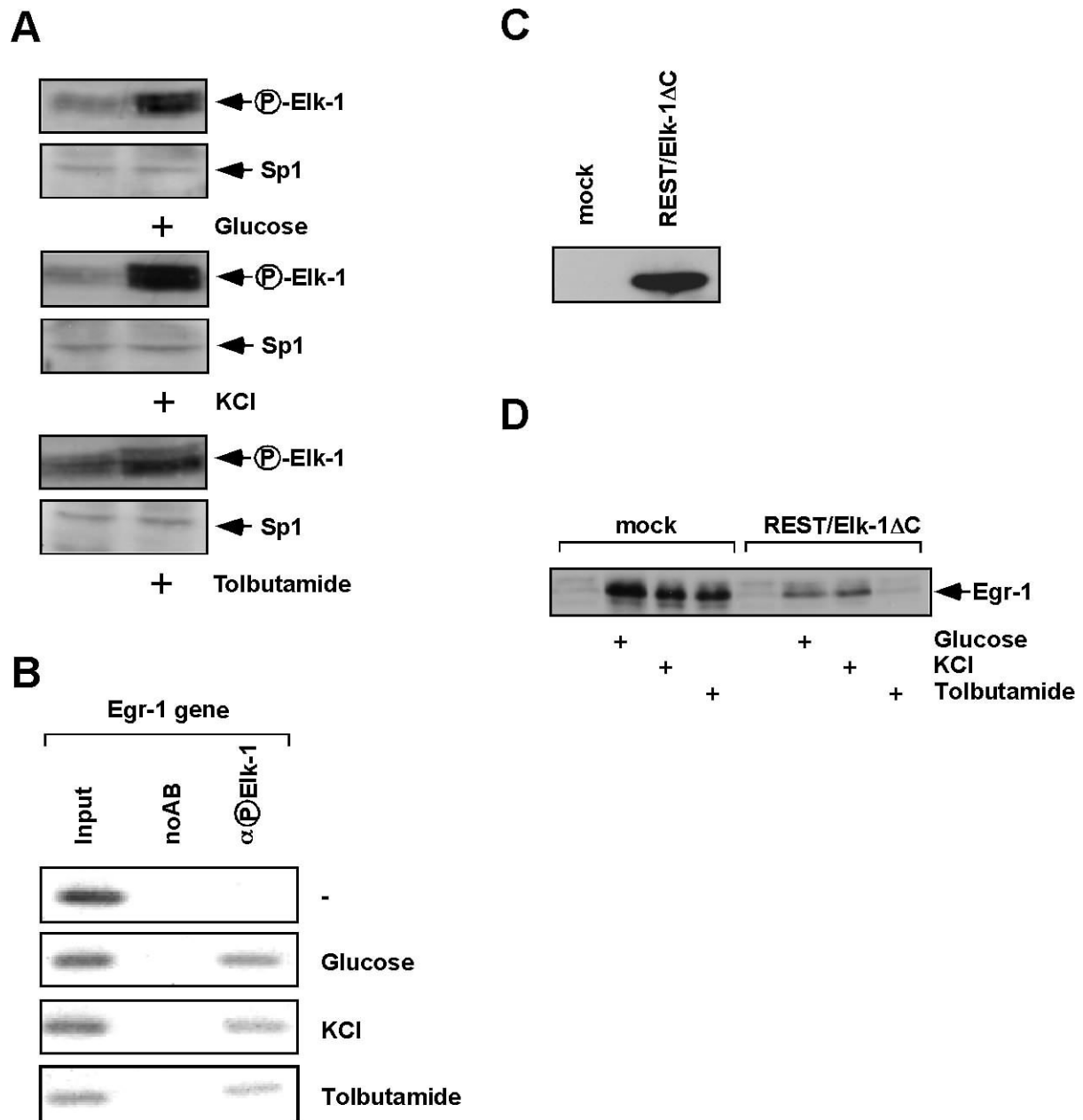


**Abbildung 27** Die Rolle von ERK, PKC und der Transaktivierung des EGF-Rezeptors in der Glukose, Tolbutamid oder KCl-induzierten Egr-1 Biosynthese. **A.** MIN6-Zellen wurden nach 24 h Serum- und Glukosereduktion mit Glukose (5 min), Tolbutamid (15 min) oder KCl (10 min) stimuliert. Ganzzelextrakte wurden präpariert und die Proteine im Westernblotverfahren mit einem phosphospezifischen Antikörper gegen Erk1/2 detektiert. **B.** MIN6-Zellen wurden nach 24 h Serum- und Glukosereduktion für eine Stunde mit dem

MEK-Inhibitor PD58059 (50  $\mu$ M) präinkubiert bevor sie für eine weitere Stunde mit Glukose, Tolbutamid oder KCl stimuliert wurden. Es wurden die Kernproteine isoliert, über eine SDS-PAGE aufgetrennt und die Proteine im Westernblot mittels spezifischer Antikörper gegen Egr-1 detektiert. **C.** MIN6 Zellen wurden mit rekombinanten Lentiviren infiziert, die für die MKP-1 kodieren. Nach 24 Stunden Serum- und Glukoseentzug wurden die Zellen für eine Stunde mit Glukose, Tolbutamid oder KCl stimuliert. Es wurden die Kernproteine isoliert, über eine SDS-PAGE aufgetrennt und die Proteine im Westernblot mittels spezifischer Antikörper gegen Egr-1 oder die phosphospezifische Form von ERK1/2 detektiert. **D.** MIN6-Zellen wurden nach 24 Stunden Serum- und Glukosereduktion weitere 24 Stunden mit TPA (20 ng/ml) behandelt, um die DAG-abhängigen PKC-Isoformen zu hemmen. Anschließend wurden die Zellen mit Glukose, Tolbutamid oder KCl für eine Stunde stimuliert. **E.** MIN6-Zellen wurden nach 24 h Serum- und Glukosereduktion für eine Stunde mit dem spezifischen EGF-Rezeptorinhibitor AG1478 (0,5  $\mu$ M) inkubiert. Anschließend wurden die Zellen mit Glukose, Tolbutamid oder KCl für eine Stunde stimuliert. Als Positivkontrolle wurden die Zellen mit EGF (10 ng/ml) für eine Stunde stimuliert. Es wurden die Kernproteine isoliert, über eine SDS-PAGE aufgetrennt und die Proteine im Westernblot mittels spezifischer Antikörper gegen Egr-1 detektiert.

#### ***IV.2.3 Elk-1 ist essentiell für die transkriptionelle Aktivierung des Egr-1 Gens***

Die phosphorylierte Form von ERK kann im Nukleus die Gentranskription durch Phosphorylierung von transkriptionellen Regulatorproteinen beeinflussen. Die Phosphorylierung des ternären Komplexfaktors Elk-1 verbindet den ERK-Signalweg mit der SRE vermittelten Transkription. MIN6 Zellen wurden mit Glukose, Tolbutamid oder KCl stimuliert und der Phosphorylierungsstatus von Elk-1 mittels Immunoblotting mit phosphospezifischen Antikörpern untersucht, die gegen Phospho-Elk-1 gerichtet sind. Abbildung 28A zeigt, dass sowohl eine Stimulation von MIN6 Zellen mit Glukose als auch mit Tolbutamid oder KCl zu einer Phosphorylierung von Elk-1 führte. ChIP-Experimente bestätigten, dass Phospho-Elk-1 nach Stimulation der Zellen mit Glukose, Tolbutamid oder KCl tatsächlich an das Egr-1 Gen gebunden wurde (Abbildung 28B).



**Abbildung 28: Die essentielle Rolle des ternären Komplexfaktors Elk-1 für die Regulation der Egr-1 Transkription in Glukose, Tolbutamid oder KCl stimulierten MIN6 Zellen: A.** Die Stimulation von MIN6 Zellen mit Glukose, Tolbutamid oder KCl induziert die Phosphorylierung von Elk-1. MIN6 Zellen wurden mit Glukose (5 min), Tolbutamid (15 min) oder KCl (10 min) stimuliert. Kernextrakte wurden gewonnen und mittels eines phosphospezifischen Antikörpers gegen Elk-1 im Westernblot detektiert. **B.** Bindung von Phospho-Elk-1 an die regulatorische Region im Egr-1 Gen. Mit Hilfe eines ChIP-Experiments wurde Chromatin untersucht, das entweder aus Glukose, Tolbutamid oder KCl stimulierten MIN6 gewonnen wurde, oder aber aus unstimulierten Zellen. Die Immunpräzipitation des mit Formaldehyd vernetzten und sonifizierten Chromatins erfolgte mit Hilfe eines Phospho-spezifischen Antikörpers von Elk-1. Die gewonnene DNA wurde mittels PCR-Primern amplifiziert, die die regulatorische Region des Egr-1 Gens umfassen. Als Negativkontrolle wurde Chromatin verwendet, welches mit Protein-A-Sepharose, aber ohne Zugabe von Antikörper (noAB) immunpräzipitiert wurde. Als Positivkontrolle diente nicht immunpräzipitiertes Chromatin (input). **C. D.** Westernblotanalyse von MIN6 Zellen die mit rekombinanten Lentiviren infiziert wurden, die für REST/Elk-1ΔC kodieren. Als Kontrolle wurden mock-infizierte Zellen untersucht. Die Westernblots wurden mit Antikörpern inkubiert die gegen den FLAG-Tag gerichtet sind. **D.** Die Expression von REST/Elk-1ΔC in MIN6 Zellen blockiert die Aktivierung der Egr-1 Genexpression nach Glukose, Tolbutamid oder KCl Stimulation. MIN6 Zellen wurden mit REST/Elk-1ΔC kodierenden Lentiviren infiziert. Als Kontrolle wurden mock-infizierte Zellen untersucht. Die Zellen wurden mit

Glukose, Tolbutamid oder KCl für eine Stunde inkubiert, Kernextrakte hergestellt und diese mittels Egr-1 spezifischer Antikörper im Westernblot untersucht.

Da diese Experimente gezeigt haben, dass die Stimulation der MIN6-Zellen mit Glukose, Tolbutamid oder KCl nicht nur zur Phosphorylierung von Elk-1 führte sondern Phospho-Elk-1 auch unter physiologischen Bedingungen an die regulatorische Region des Egr-1 Gens gebunden war, sollte mittels eines „loss-of-function“ Experiments die tatsächliche Rolle von Elk-1 in der Transkriptionsregulation des Egr-1 Gens untersucht werden. Hierfür wurden MIN6 Zellen mit Lentiviren infiziert, die für eine dominant negative Mutante von Elk-1 kodieren. Abbildung 28D zeigt, dass REST/Elk-1 $\Delta$ C die Biosynthese von Egr-1 in Glukose, Tolbutamid oder KCl-stimulierten MIN6 inhibierte. Somit verbindet die Aktivierung des ternären Komplexfaktor die Glukose, Tolbutamid und KCl-induzierte Signalkaskade mit der Biosynthese von Egr-1.

#### ***IV.2.4 Der bZIP-Transkriptionsfaktor CREB beeinflusst die Biosynthese von Egr-1***

Um herauszufinden, ob CREB auch in MIN6 Zellen das Egr-1 Gen transaktivieren kann, wurden die Zellen mit dem cAMP Analogon dbcAMP stimuliert. Die gleichzeitige Gabe des Phosphodiesterasehemmers IBMX gewährleistete die Stabilität des cAMP Analogon. Es zeigte sich, dass die Aktivierung der PKA durch dbcAMP neben der Phosphorylierung von CREB auch zur Aktivierung der Egr-1 und c-Fos Biosynthese führte (Abbildung 29A). Das c-Fos-Gen ist eines der bekannten Zielgene von CREB. Die Ergebnisse zeigten, dass in MIN6 Zellen die Transkription des Egr-1 und c-Fos-Gens ein Ergebnis von erhöhten cAMP-Konzentrationen ist.

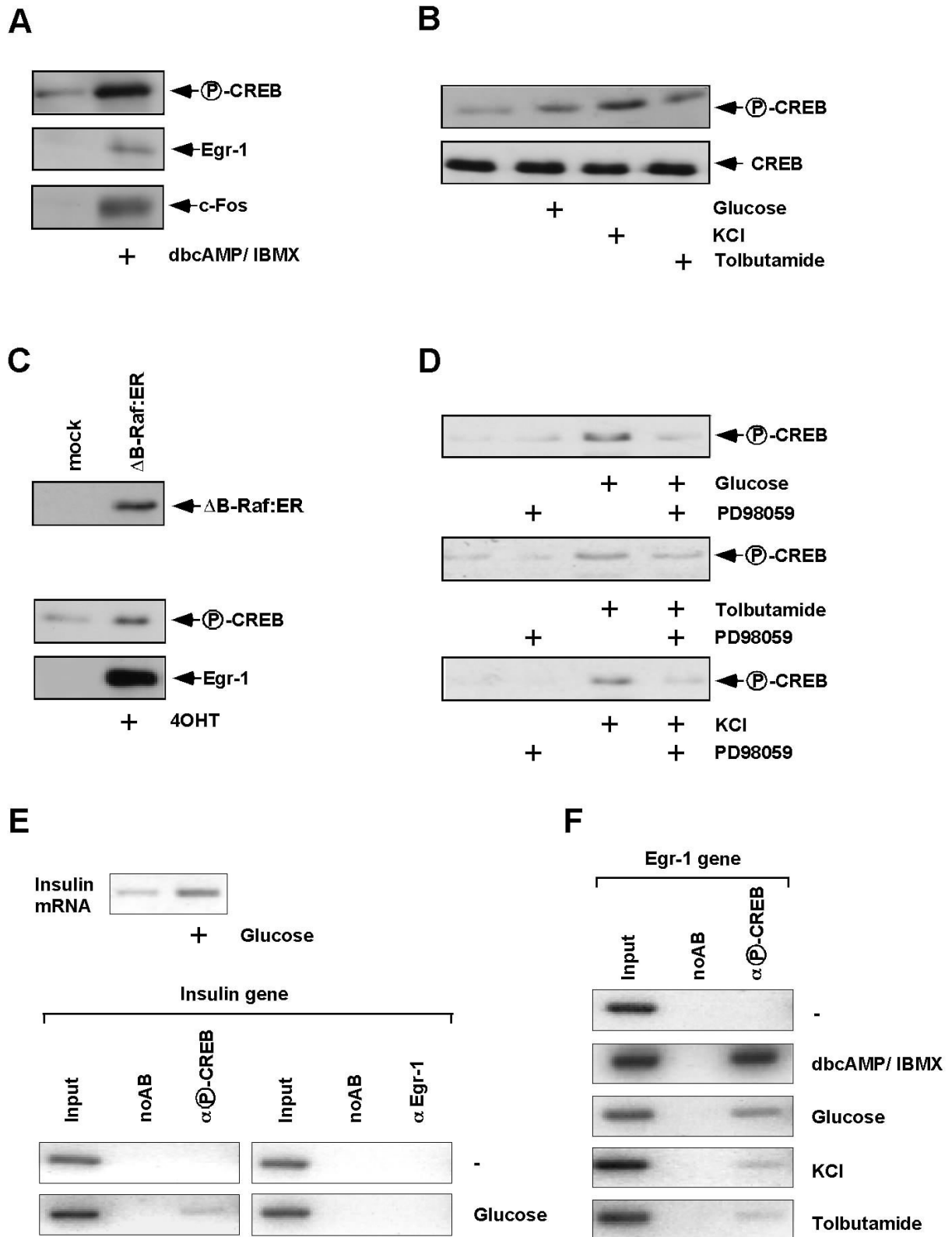
Die Phosphorylierung von CREB und die Aktivierung der Egr-1 und c-Fos Expression durch die Stimulation von MIN6 Zellen mit dbcAMP/IBMX verlaufen über den PKA-Signalweg. Im Gegensatz dazu zeigten die vorhergehenden Experimente, dass die Expression von MKP-1 die Glukose-, Tolbutamid oder KCl-induzierte Biosynthese von Egr-1 blockierte. Also ist in Glukose, Tolbutamid oder KCl stimulierten MIN6-Zellen eine Aktivierung der ERK-Signalkaskade und nicht der PKA nötig, um die Expression von Egr-1 zu induzieren. Da CREB nach Aktivierung des ERK-Signalweg über MSK-1 und 2 phosphoryliert werden kann (Wiggin et al., 2002), stellte sich die Frage, ob eine Stimulation von MIN6 Zellen mit Glukose, Tolbutamid oder KCl zur Phosphorylierung von CREB führt. Im Westernblot

konnte die Phosphorylierung von CREB nach Stimulation der Zellen mit Glukose, Tolbutamid oder KCl nachgewiesen werden (Abbildung 29B).

Um einen direkten Nachweis zu liefern, dass der ERK-Signalweg die Phosphorylierung von CREB in MIN6 Zellen induziert, wurde von Prof. Thiel mittels retroviralem Gentransfer die Zelllinie MIN6- $\Delta$ B-Raf:ER generiert. B-Raf enthält drei Domänen, die als CR1, CR2 und CR3 bezeichnet sind. CR3 stellt die Proteinkinasedomäne dar. Die Expression dieser katalytischen Domäne von B-Raf als Fusionsprotein mit der Ligandenbindungsdomäne des Östrogenrezeptors hält die Proteinkinase in Abwesenheit des Hormons in einem inaktiven Stadium. Durch Zugabe des Hormons lässt sich jedoch die Raf-Kinase spezifisch induzieren. Die Nutzung einer Rezeptormutante (ER<sup>Tamoxifen Mutant</sup>) erlaubte den Einsatz des synthetischen Liganden 4-Hydroxytamoxifen (4OHT). Abbildung 29C zeigt, dass die Stimulation von  $\Delta$ B-Raf-ER exprimierenden MIN6 Zellen mit 4OHT zu einer starken Egr-1 Expression führte. Zudem sieht man, dass neben der Egr-1 Expression auch die Phosphorylierung von CREB aktiviert wurde.

Um eine weitere Verbindung zwischen ERK-Signalweg und CREB Phosphorylierung zu knüpfen, wurde der Phosphorylierungsstatus von CREB nach Präinkubation der Zellen mit dem spezifischen MEK-Inhibitor PD98059 untersucht. Blockierte man den ERK Signalweg, reduzierte man auch die Glukose, Tolbutamid oder KCl-induzierte Phosphorylierung von CREB (Abbildung 29D). Zusätzlich konnte mittels ChIP-Assay gezeigt werden, dass die Stimulation von MIN6 Zellen mit dbcAMP, Glukose, Tolbutamid oder KCl nicht nur zur Phosphorylierung von CREB führte, sondern dass das phosphorylierte CREB auch unter physiologischen Bedingungen an das Egr-1 Gen gebunden wurde (Abbildung 29F).

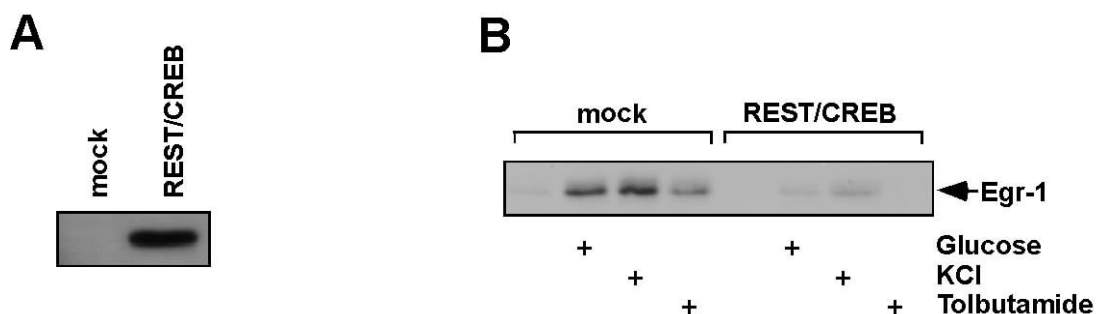
RT-PCR Experimente zeigten, dass eine Behandlung von MIN6 Zellen mit Glukose zu erhöhten Insulin mRNA-Konzentrationen führte (Abbildung 29E). Aufgrund dieser Information wurde ein ChIP-Experiment durchgeführt, das zeigen sollte, ob Phospho-CREB oder Egr-1 an das Insulingen gebunden wurden. Abbildung 29E zeigt deutlich, dass zwar die phosphorylierte Form von CREB nicht jedoch Egr-1 an das Insulingen gebunden wurde.



**Abbildung 29:** A. MIN6 Zellen wurden 24 Stunden in Serum- und Glukosefreiem Medium kultiviert und anschließend mit dbcAMP/IBMX für eine Stunde inkubiert. Die Kernproteine wurden isoliert, mittels SDS-Page aufgetrennt und im Westernblot durch phosphospezifische Antikörper gegen CREB, Egr-1 oder c-Fos detektiert. B. MIN6 Zellen wurden 24 Stunden in Serum- und Glukosefreiem Medium kultiviert und anschließend mit Glukose, Tolbutamid oder KCl für eine Stunde inkubiert. Die Kernproteine wurden isoliert, mittels SDS-Page aufgetrennt und im Westernblot durch phosphospezifische Antikörper gegen CREB, detektiert. C. Das Fusionsprotein ΔB-Raf:ER wurde mittels eines spezifischen Antikörpers detektiert, der die Östrogenrezeptor-Ligandenbindungsdomäne erkennt. MIN6 Zellen wurden 24 Stunden in Glukose- und Serumfreiem Medium

kultiviert und anschließend mit 4OHT (500 nM) für weitere 24 Stunden stimuliert. Die mittels SDS-PAGE aufgetrennten Kernproteine wurden im Westernblot auf die Expression von Egr-1 und der phosphorylierten Form von CREB untersucht. **D.** MIN6 Zellen wurden 24 Stunden in Glukose- und Serumfreiem Medium kultiviert und anschließend für 1 h mit dem MEK-Inhibitor PD98059 (50µM) inkubiert, bevor für eine weitere Stunde mit Glukose, Tolbutamid oder KCl stimuliert wurden. Die mittels SDS-PAGE aufgetrennten Kernproteine wurden im Westernblot auf die Expression der phosphorylierten Form von CREB untersucht. **E.** MIN6 Zellen wurden 24 Stunden in Glukose- und Serumfreiem Medium kultiviert und anschließend für 1 h mit 25 mM Glukose stimuliert. Die Gesamt-RNA wurde isoliert, reverstranskribiert und die cDNA wurde in einer PCR-Reaktion mittels Primern analysiert, die Insulin cDNA detektieren. Mit Hilfe eines ChIP-Experiments wurde Chromatin untersucht, das entweder aus Glukose-stimulierten oder aber unstimulierten MIN6 gewonnen wurde. Die Immunpräzipitation erfolgte mit Hilfe eines Phospho-spezifischen Antikörpers gegen CREB oder gegen Egr-1. Das immunpräzipitierte Chromatin wurde mittels PCR mit Primern amplifiziert, die die regulatorische Region des Egr-1 Gens umfassen. Als Negativkontrolle wurde Chromatin verwendet welches mit Protein-A-Sepharose, aber ohne Zugabe von Antikörper (noAB) immunpräzipitiert wurde. Als Positivkontrolle diente nicht immunpräzipitiertes Chromatin (input). **F.** Bindung von Phospho-CREB an die regulatorische Region im Egr-1 Gen. Mit Hilfe eines ChIP-Experiments wurde Chromatin untersuche, das entweder aus dbcAMP/IBMX, Glukose, Tolbutamid oder KCl stimulierten MIN6 gewonnen wurde, oder aber aus unstimulierten Zellen. Die Immunpräzipitation des mit Formaldehyd vernetzten und sonifizierten Chromatins erfolgte mit Hilfe eines Phospho-spezifischen Antikörpers gegen CREB. Das immunpräzipitierte Chromatin wurde mittels PCR mit Primern amplifiziert, die die regulatorische Region des Egr-1 Gens umfassen. Als Negativkontrolle wurde Chromatin verwendet welches mit Protein-A-Sepharose, aber ohne Zugabe von Antikörper (noAB) immunpräzipitiert wurde. Als Positivkontrolle diente nicht immunpräzipitiert Chromatin (input).

Da gezeigt werden konnte, dass die Glukose, Tolbutamid oder KCl-Stimulation von MIN6 Zellen nicht nur zur Phosphorylierung von CREB sondern auch zu dessen Bindung an den Egr-1- Promoter führte, stellte sich die Frage, in wie weit CREB zur Aktivierung der Egr-1 Genexpression beiträgt. Hierzu wurden MIN6 Zellen mit Lentiviren infiziert, die für eine dominant negative Mutante von CREB kodierten. Abbildung 30C zeigt, dass REST/CREB ebenso wie REST/Elk-1ΔC (Kapitel IV.0) die Biosynthese von Egr-1 in Glukose, Tolbutamid oder KCl-stimulierten MIN6 partiell unterdrücken konnte. Daraus kann man folgern, dass auch CREB für die Induktion der Egr-1 Expression in Glukose, Tolbutamid oder KCl-stimulierten MIN6 eine wichtige Rolle spielt.



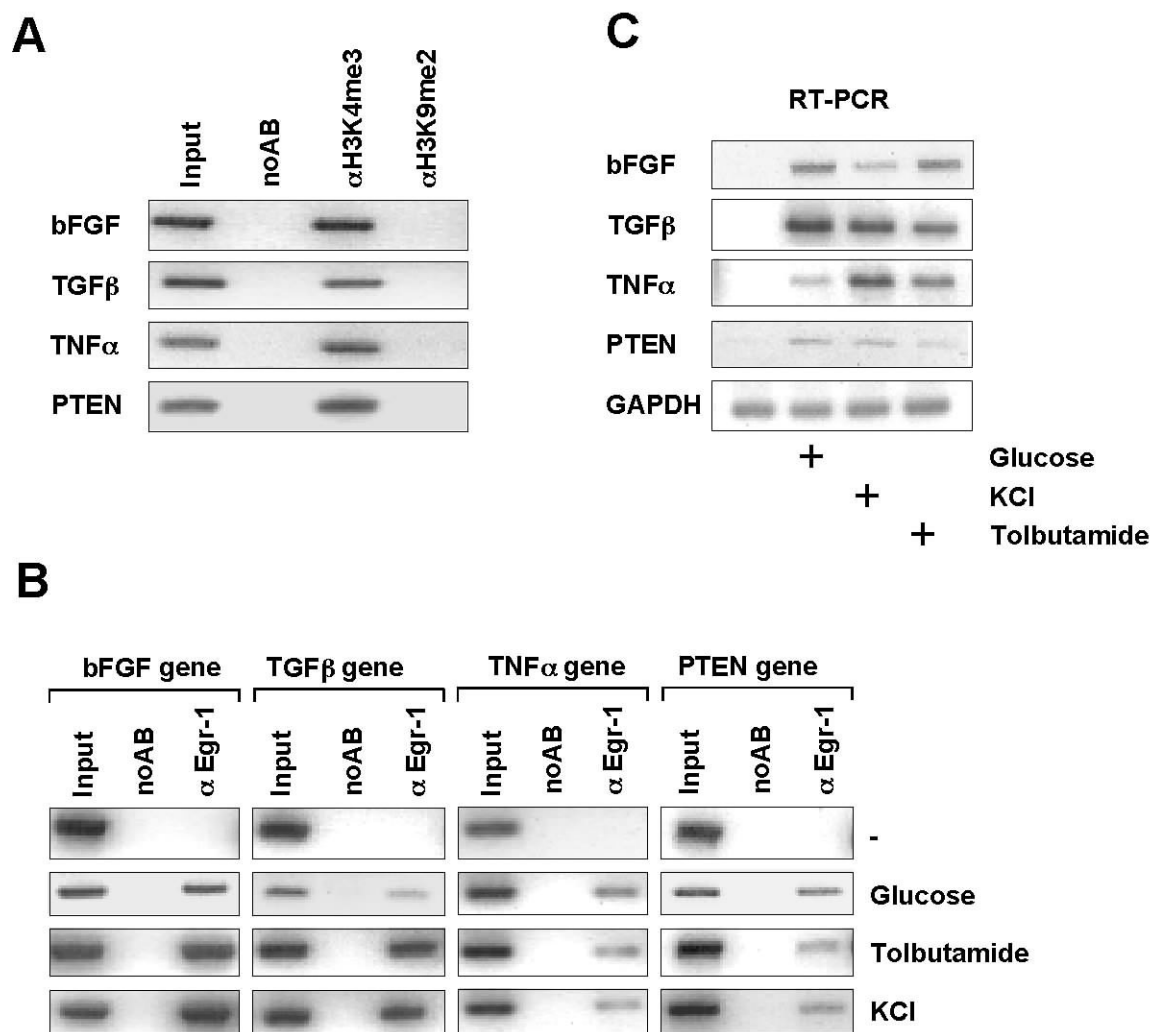
**Abbildung 30: Expression einer dominant-negativen Mutante von CREB inhibiert die Expression des Egr-1 Gens nach Glukose, Tolbutamid oder KCl Stimulation.** **A.** Westernblotanalyse von MIN6 Zellen die mit rekombinanten Lentiviren infiziert wurden, die für REST/CREB kodieren. Als Kontrolle wurden mock-infizierte Zellen untersucht. Die Westernblots wurden mit Antikörpern inkubiert die gegen den FLAG-Tag

gerichtet sind. **B.** Die Expression von REST/CREB blockiert in MIN6 Zellen die Aktivierung der Egr-1 Genexpression nach Glukose, Tolbutamid oder KCl Stimulation. MIN6 Zellen wurden mit REST/CREB kodierenden Lentiviren infiziert. Als Kontrolle wurden mock-infizierte Zellen untersucht. Die Zellen wurden mit Glukose, Tolbutamid oder KCl für eine Stunde inkubiert, Kernextrakte hergestellt und diese mittels Egr-1 spezifischem Antikörper im Westernblot untersucht.

#### ***IV.2.5 Zielgene von Egr-1 in $\beta$ -Zellen des Pankreas***

In anderen zellulären Systemen, unter anderem auch  $\alpha$ T3M3-Zellen, wurden das bFGF-, TGF $\beta$ -, TNF $\alpha$ - und das PTEN-Gen als Zielgene des Egr-1 Proteins identifiziert (Biesiada et al., 1996; Liu et al., 1999; Svaren et al., 2000; Virolle et al., 2001; Fu et al., 2003; Lee et al., 2005). Zunächst wurde die epigenetische Konfiguration dieser Gene mittels epigenetischer Marker untersucht, die zwischen aktiv transkribierten und „ruhenden“ Genen unterscheiden (s. Kapitel 0). Der Methylierungsstatus des Histons H3 von Egr-1 Zielgenen wurde mittels ChIP-Assay untersucht, unter Verwendung spezifischer Antikörper gegen die trimethylierte Form von Histon H3K4 oder dimethylierte Form von Histon H3K9. Wie in Abbildung 31A zu sehen ist sind in MIN6 Zellen die Egr-1 Bindestellen des bFGF, TGF $\beta$ , TNF $\alpha$  und PTEN Gens in einem nukleosomalen Kontext eingebettet, in dem an Histon H3 der Lysinrest 4 trimethyliert ist. Das bedeutet, dass diese Gene von einer offenen Chromatinstruktur umgeben sind, die die Bindung von Transkriptionsfaktoren an die DNA zulässt und somit aktive Gene markiert. Daraufhin stellte sich die Frage, ob Egr-1 in einer stimulusabhängigen Weise an diese Gene bindet. Dazu wurde fixiertes und zerkleinertes Chromatin von unstimulierten MIN6 und Zellen, die mit Glukose, Tolbutamid oder KCl stimuliert wurden, mit einem Egr-1 spezifischen Antikörper immunpräzipitiert. Abbildung 31B zeigt, dass Egr-1 nach Glukose, Tolbutamid oder KCl-Stimulation an die Gene gebunden war die für bFGF, TNF $\alpha$  und TGF $\beta$  und das PTEN kodierten. Zusätzlich wurde die Expression dieser Gene nach Glukose, Tolbutamid oder KCl-Stimulation mittels semiquantitativer RT-PCR untersucht. Es konnte eine stimulationsabhängige Erhöhung der Konzentrationen von bFGF, TNF $\alpha$ , TGF $\beta$  und PTEN mRNA nachgewiesen werden (Abbildung 31C). Die Ergebnisse zeigten, dass in MIN6 Zellen die Expression von bFGF, TNF $\alpha$ , TGF $\beta$  und PTEN durch Egr-1 reguliert wird.

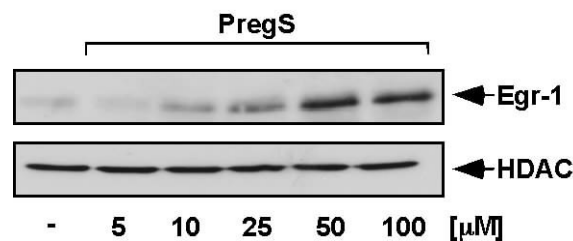




**Abbildung 31: Identifizierung von Egr-1 Zielgenen in MIN6 Zellen.** **A.** Epigenetische Modifikationen von möglichen Egr-1 Zielgenen in MIN6 Zellen. Es wurde ein ChIP-Assay mit  $\alpha$ -dimethyl H3K9 oder  $\alpha$ -trimethyl H3K4 Antikörpern durchgeführt. Die Immunpräzipitierten Chromatinfragmente wurden mit Primern amplifiziert, die die Egr-1-Bindestellen in den regulatorischen Regionen des bFGF, TGF $\beta$ , TNF $\alpha$  und des PTEN Gens umfassen. Als Negativkontrolle diente Chromatin welchem kein Antikörper bei der Immunpräzipitation zugesetzt wurde (noAB) verwendet. Als Positivkontrolle diente Chromatin welches nicht immunpräzipitiert wurde (input). **B.** Bindung von Egr-1 an die regulatorische Region von Egr-1 Zielgenen. Chromatin von Zellen die mit Glukose, Tolbutamid oder KCl stimuliert wurden oder aber unstimulierte Zellen wurde mit einem Antikörper gegen Egr-1 immunpräzipitiert. Die anschließende Amplifikation der Fragmente erfolgte mit Primern, die die Egr-1 Bindestelle innerhalb der regulatorischen Region der Zielgene umfassen. Als Negativkontrolle wurde bei der Immunpräzipitation auf Zugabe von Antikörpern verzichtet, als Positivkontrolle diente nicht immunpräzipitiertes Chromatin (input). **C.** Steigerung der mRNA Synthese von TNF $\alpha$ , bFGF, TGF $\beta$  und PTEN nach Stimulation von MIN6 Zellen mit Glukose, Tolbutamid oder KCl für eine Stunde. Die Gesamt-RNA wurde isoliert und mit Hilfe von Reversertranskriptase in cDNA umgeschrieben, die wiederum mittels PCR und Primern untersucht wurden, die zur cDNA der zu untersuchenden Gene komplementär waren.

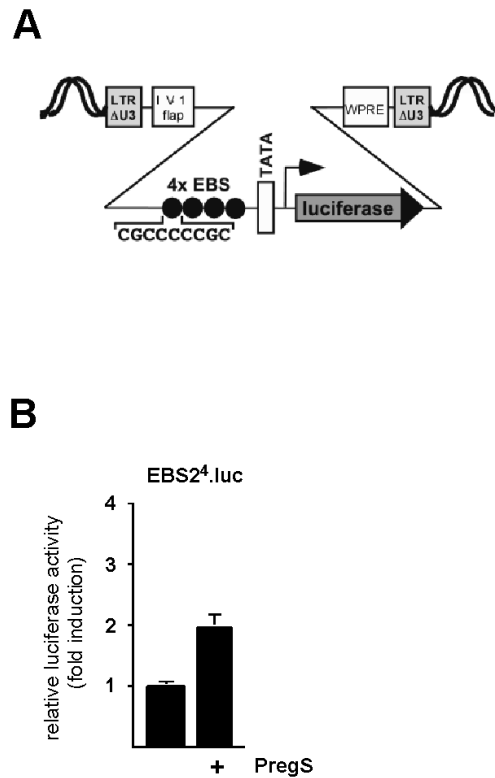
### IV.3 INS-1

Erst kürzlich konnten J. Oberwinkler, et al. (unveröffentlichte Daten) zeigen, dass die Stimulation der  $\beta$ -Zelllinie INS-1 mit dem Steroidhormon Pregnenolonsulfat zu einem massiven  $\text{Ca}^{2+}$ -Einstrom in die Zelle führte. Dieser  $\text{Ca}^{2+}$ -Einstrom wurde durch die Aktivierung des TRPM3 (transient receptor potential) Kanals vermittelt. Pregnenolonsulfat (PregS) aktivierte den  $\text{Ca}^{2+}$ -spezifischen TRPM3-Kanal,  $\text{Ca}^{2+}$  strömte in die Zelle ein, es kam zur Depolarisation der Membran was wiederum in der Öffnung spannungsabhängiger  $\text{Ca}^{2+}$ -Kanäle resultierte. Da  $\text{Ca}^{2+}$  die Egr-1 Biosynthese beeinflusst, stellte sich die Frage, ob die Stimulation von INS-1 Zellen mit PregS nicht nur zum  $\text{Ca}^{2+}$ -Influx sondern auch zur Induktion der Egr-1 Transkription führt. Abbildung 33 zeigt deutlich, dass PregS die Egr-1 Biosynthese in einer konzentrationsabhängigen Weise aktivieren konnte.



**Abbildung 32 Konzentrationsabhängige Induktion der Egr-1 Biosynthese durch PregS.** INS-1 Zellen wurde 24 Stunden Serum entzogen bevor die Zellen mit unterschiedlichen Konzentrationen von PregS für eine Stunde stimuliert wurden. Kernextrakte wurden präpariert und durch SDS-Gelelektrophorese fraktioniert. Der Nachweis von Egr-1 erfolgte im Westernblotverfahren mit Egr-1 spezifischen Antikörpern. Als Ladungskontrolle wurde die Expression der Histondeacetylase HDAC-1 untersucht.

Um biologisch aktives Egr-1 nachzuweisen wurden INS-1 Zellen mit Lentiviren infiziert die, für ein Luziferase-Reportergen kodieren, welches vier Egr-1 Bindestellen enthielt. Wird Egr-1 nach PregS-Stimulation synthetisiert, bindet es an das Reportergen und induziert die Expression der Luziferase, deren Aktivität anhand des Substratumsatzes und des daraus resultierenden Lichtes gemessen werden kann. Abbildung 33A zeigt die modulare Struktur des integrierten Provirus. Abbildung 33B zeigt die erhöhte Luziferaseaktivität nach PregS-Stimulation.

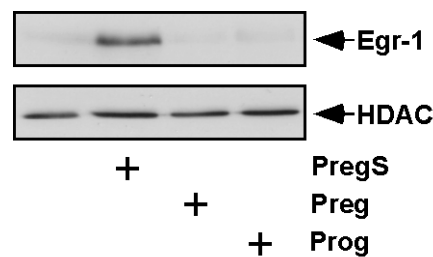


**Abbildung 33 Nachweis von biologisch-aktivem Egr-1 nach PregS-Stimulation.** **A.** Schematische Darstellung von integrierten Proviren die für EBS2<sup>4</sup>-Promotor-Luziferase-Reportergen kodieren. Dieses Reportergen enthält vier Egr-1 Bindestellen welche das Luziferasegen regulieren. **B.** INS-1 Zellen wurden mit Lentiviren infiziert, die für das EBS2<sup>4</sup>-Luziferase-Reportergen kodieren. Nach 24 stündigem Serumentzug wurden die Zellen für weitere 24 Stunden mit PregS stimuliert. Ganzellextrakte wurden präpariert und die Luziferaseaktivität untersucht. Die Luziferaseaktivität wurde über die Proteinkonzentration normalisiert.

### *IV.3.1 Auswirkung verschiedener Steroidhormone auf die Egr-1 Biosynthese in $\beta$ -Zellen des Pankreas*

Steroidhormone können über zwei unterschiedliche Wege die Transkription von Genen beeinflussen (Falkenstein et al., 2000; Losel et al., 2003). Diese beiden Wege werden als genomische und nicht-genomische Steroidwirkung bezeichnet. Unter genomischer Steroidwirkung versteht man das Eindringen von lipophilen Steroidhormonen in die Zelle. Dort bindet das Steroidhormon an einen cytosolischen Hormonrezeptor unter Freisetzung des HSP90. Der Steroidhormon-Rezeptor-Komplex transloziert in den Nukleus, wo er an spezifische „hormone response elements“ HRE im Promoter seiner Zielgene bindet und somit die Transkription des Gens aktiviert. Unter der sogenannten nicht-genomischen Steroidwirkung versteht man eine Rezeptor-vermittelte Signalweiterleitung durch *second-messenger*-Systeme. Ein sulfatiertes Steroidhormon ist amphiphil und hat somit keine

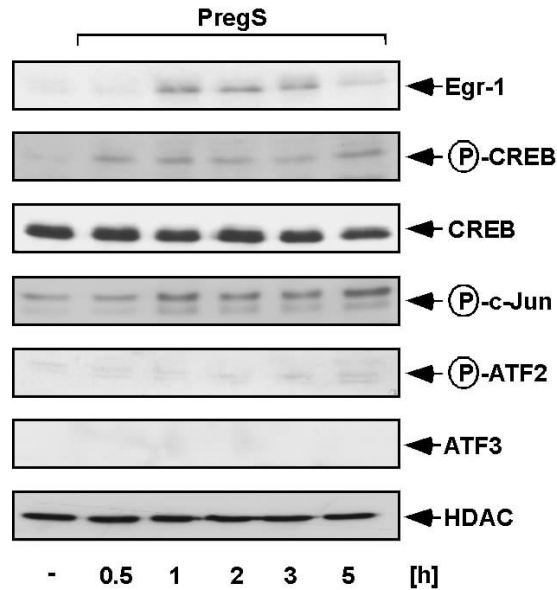
Möglichkeit, die lipophile Plasmamembran zu durchdringen. Folglich muss es als Ligand an membranständige Rezeptoren binden, die wiederum über intrazelluläre Signalwege die Transkription aktivieren. Es wurde der Effekt verschiedener Steroidhormone auf die Expression von Egr-1 in  $\beta$ -Zellen des Pankreas untersucht. Wie in Abbildung 34B zu sehen ist, bewirkt nur eine Stimulation der INS-1 Zellen mit Pregnenolonsulfat eine Induktion der Egr-1 Expression. Stimulation der Zellen mit Pregnenolon oder Progesteron hatte keinerlei Einfluss auf die Egr-1 Biosynthese. Das spricht dafür, dass die Aktivierung der Egr-1 Expression durch PregS-Stimulation in INS-1-Zellen über Rezeptor-abhängige Signalwege erfolgt.



**Abbildung 34: Steroidhormon-induzierte Egr-1 Biosynthese.** INS-1 Zellen wurde 24 Stunden das Serum entzogen bevor sie für eine Stunde mit Pregnenolonsulfat (PregS 50  $\mu$ M), Pregnenolon (Preg 50  $\mu$ M) oder Progesteron (Prog 50  $\mu$ M) stimuliert wurden. Kernproteine wurden isoliert und durch SDS-Gelelektrophorese aufgetrennt. Der Nachweis von Egr-1 erfolgte im Westernblotverfahren mit spezifischen Antikörpern. Als Ladungskontrolle wurde die Expression der Histondeacetylase HDAC-1 untersucht.

#### ***IV.3.2 Wirkung von PregS auf andere Transkriptionsfaktoren***

Um die Wirkung einer PregS-Stimulation von INS-1 auf die Expression anderer Transkriptionsfaktoren zu untersuchen, wurden in einem Zeitverlauf die Phosphorylierung von CREB, ATF2 und c-Jun sowie die Biosynthese von ATF3 untersucht. Die Stimulation der Zellen mit PregS führte neben der Aktivierung von Egr-1 auch zur Phosphorylierung von CREB und c-Jun. Der Phosphorylierungsstatus von ATF2 sowie die Expression von ATF3 blieben durch die Stimulation unbeeinflusst (Abbildung 35C).

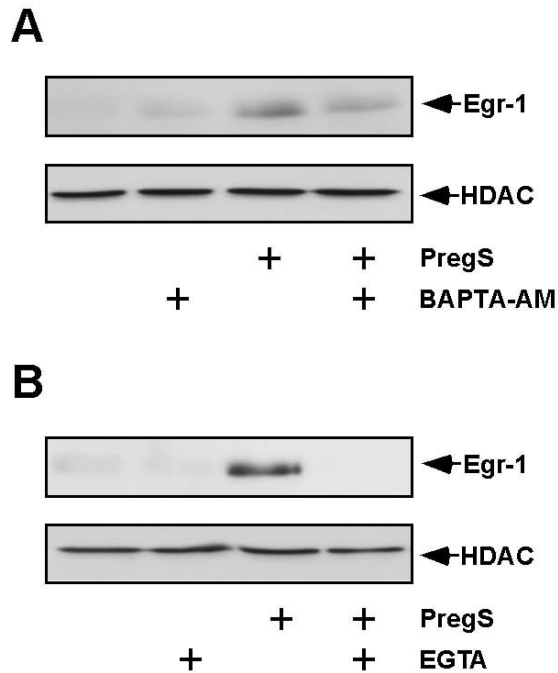


**Abbildung 35 Spezifität der PregS-Stimulation:** INS-1 Zellen wurde 24 Stunden das Serum entzogen bevor die Zellen mit PregS (50  $\mu$ M) (A) wie angegeben stimuliert wurden. Kernproteine wurden isoliert und durch SDS-Gelelektrophorese aufgetrennt. Der Nachweis von Egr-1, Phospho-CREB, CREB, Phospho-c-Jun, c-Jun, Phospho-ATF2 und ATF3 erfolgte im Westernblotverfahren mit spezifischen Antikörpern. Als Ladungskontrolle wurde die Expression der Histondeacetylase HDAC-1 untersucht.

### IV.3.3 Der Einfluss von $Ca^{2+}$ auf die transkriptionelle Aktivierung des *Egr-1*

#### *Gens*

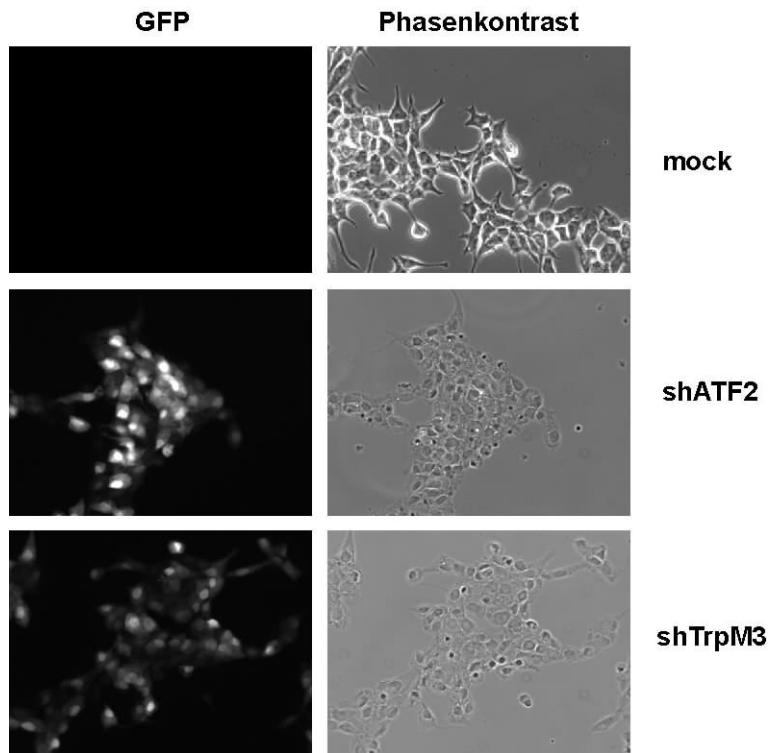
Die Untersuchung der Signaltransduktion von *Egr-1* zeigte bislang, dass  $Ca^{2+}$  in der Signalweiterleitung vom aktivierten Rezeptor zur *Egr-1* Genexpression eine große Rolle spielt. Folglich sollte die Rolle von  $Ca^{2+}$  in der PregS-vermittelten *Egr-1* Expression untersucht werden. Dazu wurden INS-1 Zellen mit dem  $Ca^{2+}$ -Chelator BAPTA präinkubiert. Abbildung 36A zeigt, dass die *Egr-1* Biosynthese durch den Mangel an intrazellulärem  $Ca^{2+}$  als Aktivator gehemmt wurde. Der Einfluss von extrazellulärem  $Ca^{2+}$  lässt sich durch Einsatz von EGTA untersuchen. EGTA bindet  $Ca^{2+}$  im Medium, so dass kein  $Ca^{2+}$  zum Einstrom in die Zelle zur Verfügung steht. Bindet man nun das  $Ca^{2+}$  im Medium durch Präinkubation der Zellen mit EGTA, führte das zu einer kompletten Blockade der *Egr-1* Biosynthese (Abbildung 36B). Diese Ergebnisse zeigen, dass  $Ca^{2+}$  für die PregS-induzierte *Egr-1* Biosynthese in INS-1 Zellen essentiell ist.



**Abbildung 36: Der Einfluss von  $\text{Ca}^{2+}$ -Ionen auf die PregS- induzierte Egr-1 Biosynthese.** A. INS-1 Zellen wurden nach 24 stündigem Serumentzug eine Stunde mit dem  $\text{Ca}^{2+}$ -Chelator BAPTA-AM (25  $\mu\text{M}$ ) (A) oder EGTA (500  $\mu\text{M}$ ) (B) präinkubiert bevor sie mit PregS (50  $\mu\text{M}$ ) für eine Stunde stimuliert wurden. Kernextrakte wurden präpariert und die Proteine durch SDS-Gelelektrophorese aufgetrennt. Der Nachweis von Egr-1 erfolgte im Westernblotverfahren mit Egr-1 spezifischen Antikörpern. Als Ladungskontrolle wurde die Expression der Histondeacetylase HDAC untersucht.

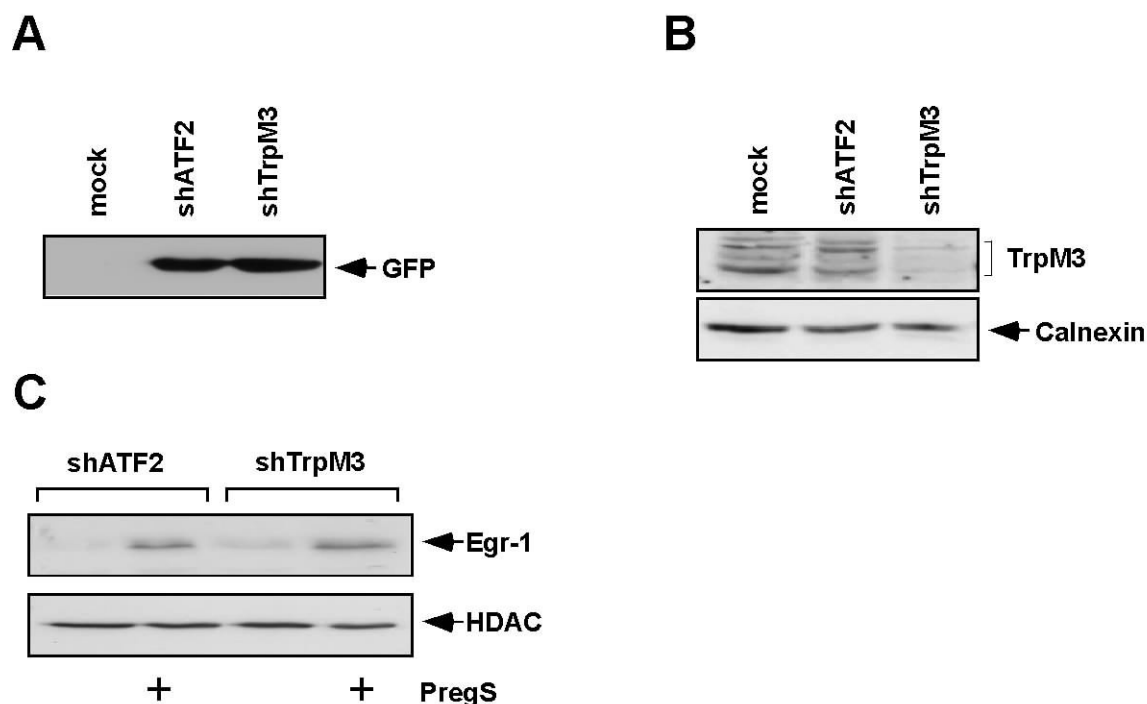
#### ***IV.3.4 Die Rolle des TRPM3-Rezeptors auf die Egr-1 Expression***

PregS-Stimulation von INS-1 Zellen führt zur Aktivierung des TRPM3-Kanals (Oberwinkler et al., unveröffentlichte Daten). Dieser *transient-receptor-potential-channel* ist selektiv für  $\text{Ca}^{2+}$ -Ionen und dessen Aktivierung führt zum Einstrom von extrazellulärem  $\text{Ca}^{2+}$  in die Zelle (Oberwinkler, 2007; Oberwinkler et al., 2005; Grimm et al., 2003). Ob die Aktivierung dieses  $\text{Ca}^{2+}$ -Kanals ausreicht, um die Transkription des Egr-1 Gens zu induzieren wurde mit Hilfe einer TRPM3 spezifischen shRNA untersucht. Der lentivirale Vektor trägt außer der Sequenz, die für die shRNA kodiert, zusätzlich die Kodierregion von EGFP unter der Kontrolle des CMV-Promotors. Dies erlaubte die Effizienz der Infektion sowohl im Westernblotverfahren als auch durch Fluoreszenzmikroskopie (Abbildung 37) zu untersuchen. Durch Auswertung der Imagingdaten und durch FACS-Analyse (durchgeführt von Dr. S. Philipp, Institut für Pharmakologie und Toxikologie, Universität des Saarlandes) konnte festgestellt werden, dass eine über 90%-ige Infektionseffizienz erreicht wurde.



**Abbildung 37 Immunfluoreszenzaufnahmen von INS-1 Zellen die mit TRPM3 oder ATF2 spezifischen shRNA kodierenden Lentiviren infiziert wurden.**

Die Kontrolle der Funktionalität dieser shRNA zeigte, dass in Zellen die mit shTRPM3 kodierenden Lentiviren infiziert wurden die Expression von TRPM3 zu 80% reduziert werden konnte (durchgeführt von Dr. S. Philipp) (Abbildung 38B). Der Einsatz der shRNA zeigte jedoch keinerlei Wirkung auf die Expression von Egr-1 (Abbildung 38C). Das bedeutet, dass der  $\text{Ca}^{2+}$ -Einstrom durch den TRPM3-Kanal nicht ausreicht um die Egr-1 Biosynthese zu induzieren.



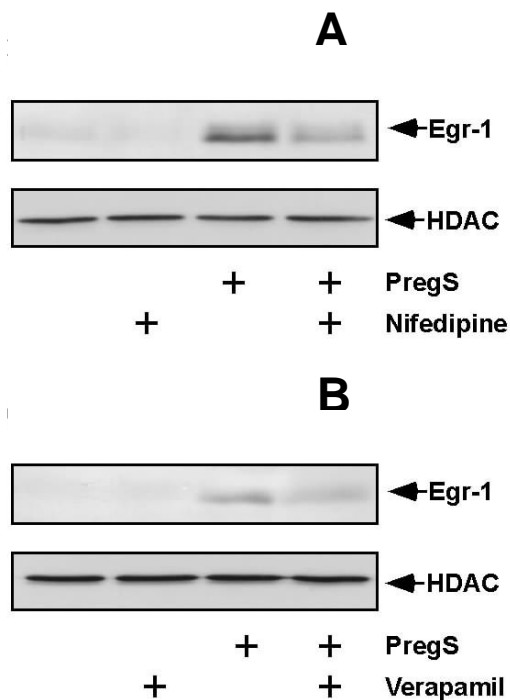
**Abbildung 38: TRPM3 spielt kein Rolle bei der PregS-induzierten Egr-1 Expression.** A. B.C. INS-1 Zellen wurden mit Lentiviren infiziert, die für shATF2 (Negativkontrolle) oder aber shTRPM3 kodieren. A. Ganzzellextrakte wurden präpariert über ein SDS-Gel aufgetrennt und im Westernblot mittels spezifischer Antikörper gegen GFP detektiert. B. Membranproteine wurden isoliert, durch SDS-Gelelektrophorese fraktioniert und im Westernblotverfahren mit spezifischen Antikörpern gegen TRPM3 detektiert. Die Detektion von Calnexin diente als Ladungskontrolle. (Daten mit freundlicher Genehmigung von Dr.S.Philipp) C. Kernproteine wurden präpariert, über ein SDS-Gel aufgetrennt und im Westernblot mittels spezifischer Antikörper gegen Egr-1 detektiert. Die Untersuchung der HDAC-1 Expression diente als Ladungskontrolle.

#### *IV.3.5 Der Einfluss von L-Typ $Ca^{2+}$ -Kanälen auf die PregS-Stimulierte Egr-1 Expression*

Die vorangegangenen Experimente konnten zeigen, dass die Egr-1 Biosynthese unabhängig vom TRPM3-Kanal induziert wird. Der  $Ca^{2+}$ -Einstrom in die Zelle durch die Stimulation des TRPM3-Kanals durch PregS könnte eine Depolarisation der Membran bewirken, die zur Öffnung spannungsabhängiger  $Ca^{2+}$ -Kanäle führt (Prentki & Matschinsky, 1987; Ashcroft & Ashcroft, 1990). Ebenso könnte PregS neben der Aktivierung des TRPM3-Kanals auch direkt die Öffnung spannungsabhängiger  $Ca^{2+}$ -Kanäle bewirken. Um die Rolle dieser  $Ca^{2+}$ -Kanäle auf die PregS-induzierte Egr-1 Biosynthese zu untersuchen, wurden INS-1 Zellen nun mit den L-Typ- $Ca^{2+}$ -Kanalinhibitoren Nifedipin und Verapamil inkubiert. Abbildung 36A und B zeigen deutlich, dass Inhibierung der  $Ca^{2+}$ -Kanäle durch  $Ca^{2+}$ -Kanalblocker Nifedipin und



Verapamil auch die Egr-1 Biosynthese hemmte. Folglich hängt die Aktivierung der Expression des Egr-1-Gens durch PregS in INS-1-Zellen von L-Typ  $\text{Ca}^{2+}$ -Kanälen ab.

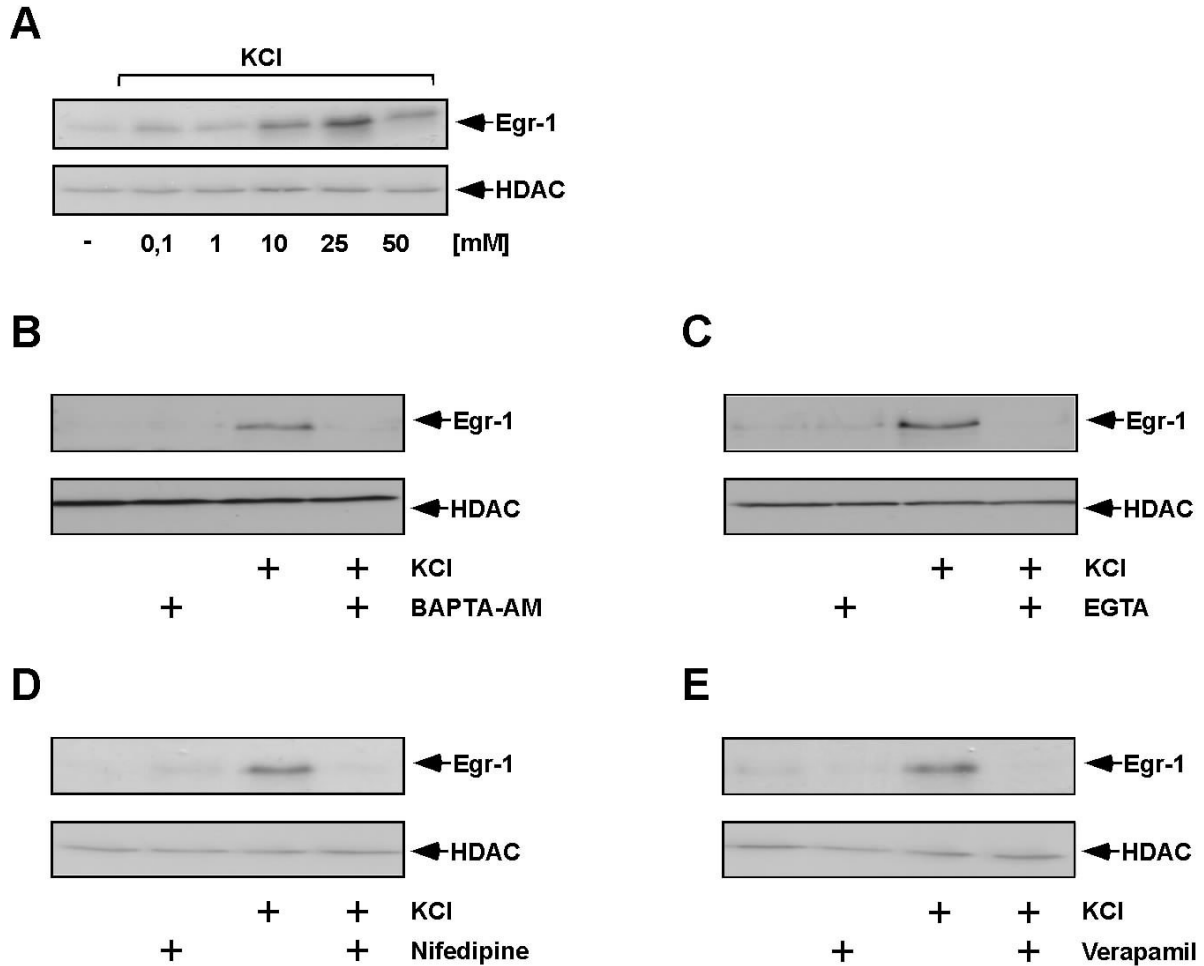


**Abbildung 39: Der Einfluss von L-Typ  $\text{Ca}^{2+}$ -Kanälen auf die PregS- induzierte Egr-1 Biosynthese. A. B.** INS-1 Zellen wurden nach 24 stündigem Serumzug eine Stunde mit dem  $\text{Ca}^{2+}$  kanalinhistor Nifedipine (50  $\mu\text{M}$ ) (A) oder Verapamil (50  $\mu\text{M}$ ) (B) präinkubiert bevor wie mit PregS (50  $\mu\text{M}$ ) für eine weitere Stunde stimuliert wurden. Kernextrakte wurden präpariert und durch SDS-Gelelektrophorese fraktioniert. Der Nachweis von Egr-1 erfolgte im Westernblotverfahren mit Egr-1-spezifischen Antikörpern. Als Ladungskontrolle wurde die Expression der Histondeacetylase HDAC-1 untersucht.

#### ***IV.3.6 Einfluss der Membrandepolarisation auf die Egr-1 Biosynthese***

Der PregS-induzierte  $\text{Ca}^{2+}$ -Einstrom in die Zelle durch Aktivierung des TRPM3-Kanals führt zur Depolarisation der Membran und somit zur Öffnung von spannungsabhängigen  $\text{Ca}^{2+}$ -Kanälen. Eine weitere Möglichkeit eine Depolarisierung der Membran zu erreichen ist die Zugabe von KCl zum Kulturmedium.  $\text{K}^+$ -Ionen strömen zum osmotischen Ausgleich in die Zelle und lösen so eine Depolarisation aus. Um die Auswirkungen dieser Depolarisation und damit der Rolle von spannungsabhängigen  $\text{Ca}^{2+}$ -Kanälen auf die Egr-1 Expression zu untersuchen, haben wir INS-1 Zellen mit 25 mM KCl stimuliert. Abbildung 40A zeigt die dosisabhängige Egr-1 Expression nach KCl Stimulation. Eine Depolarisation der Membran ist folglich ausreichend, um eine Aktivierung der Egr-1 Gentranskription zu bewirken. Untersucht man daraufhin den Einfluss von  $\text{Ca}^{2+}$ -Ionen und L-Typ-  $\text{Ca}^{2+}$ -Kanälen auf die Egr-

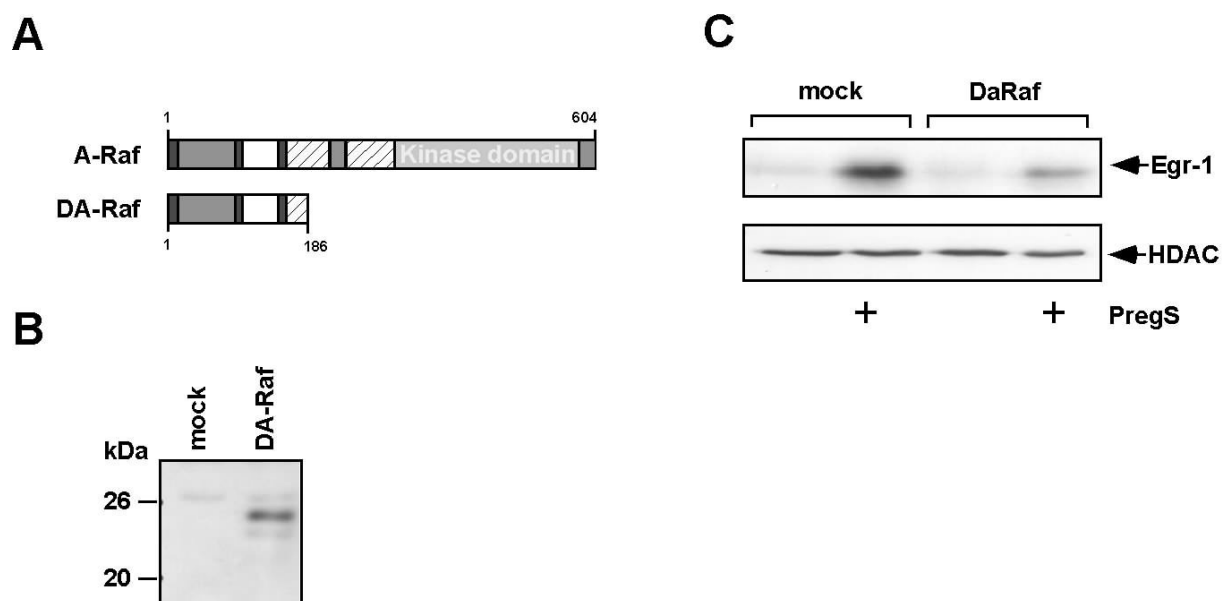
1 Expression zeigte sich, dass sowohl intra- und extrazelluläres  $\text{Ca}^{2+}$  (Abbildung 40B.C.) als auch die Aktivierung spannungsabhängiger  $\text{Ca}^{2+}$ -Kanäle (Abbildung 40D.E.) für die Induktion der Egr-1 Biosynthese von Nöten sind.



**Abbildung 40** Der Einfluss von  $\text{Ca}^{2+}$ -Ionen auf die KCl-induzierte Egr-1 Biosynthese. **A.** INS-1 Zellen wurden nach 24 stündigem Serumentzug eine Stunde mit unterschiedlichen Konzentrationen KCl stimuliert. **B.** INS-1 Zellen wurden nach 24 stündigem Serumentzug eine Stunde mit dem  $\text{Ca}^{2+}$ -Chelator BAPTA-AM (25  $\mu\text{M}$ ) (B), EGTA (500  $\mu\text{M}$ ) (C) oder den  $\text{Ca}^{2+}$ -Kanalinhibitoren Nifedipine (50  $\mu\text{M}$ ) (D) oder Verapamil (50  $\mu\text{M}$ ) (E) präinkubiert, bevor wie mit KCl (25 mM) für eine Stunde stimuliert wurden. Kernextrakte wurden präpariert und durch SDS-Gelelektrophorese fraktioniert. Der Nachweis von Egr-1 erfolgte im Westernblotverfahren mit Egr-1 spezifischen Antikörpern. Als Ladungskontrolle wurde die Expression der Histondeacetylase HDAC untersucht.

### IV.3.7 Die Rolle der Raf-Kinase für die PregS-induzierte Egr-1 Biosynthese

Ein Anstieg der intrazellulären  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration kann über Aktivierung der PKC die Raf-Kinase aktivieren (Kolch, et al., 1993). Raf-Proteine bestehen aus 3 konservierten Domänen CR1, CR2 und CR3 (Abbildung 41A) (Hagemann & Rapp 1999; Mercer & Pritchard 2003; Wellbrock et al, 2004). CR1 enthält Bindedomänen für aktives Ras und für die Membranrekrutierung. CR3 repräsentiert die Kinasedomäne. Der dominant-negativen Mutante DA-Raf fehlen die Domänen CR2 und CR3, sie kann also sowohl aktives Ras als auch an die Membran binden, jedoch kann das Signal aufgrund der fehlenden Kinasedomäne nicht mehr weitergeleitet werden (Yokoyama et al., 2007). Abbildung 41C zeigt, dass die Expression dieser Mutante in INS-1 Zellen die Biosynthese von Egr-1 nach PregS-Stimulation deutlich reduzierte. Somit konnte gezeigt werden, dass die Aktivierung von Raf ein essentieller Bestandteil der Signalkaskade zu Egr-1 ist.

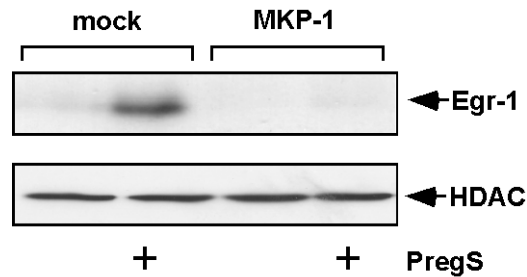


**Abbildung 41: Expression einer dominant-negativen Mutante von Raf inhibiert die Egr-1 Expression.** **A.** Schematische Darstellung von A-Raf und der dominant-negativen Mutante DA-Raf. **B. C.** INS-1 Zellen wurden mit DA-Raf kodierenden Lentiviren infiziert. Als Kontrolle wurden mock-infizierte Zellen untersucht. **B.** Immunologischer Nachweis des Transgens. **C.** Nach 24-stündigem Serumentzug wurden die Zellen für eine Stunde mit PregS (50  $\mu\text{M}$ ) stimuliert. Kernextrakte wurden präpariert und durch SDS-Gelelektrophorese fraktioniert. Der Nachweis von Egr-1 erfolgte im Westernblotverfahren mit Egr-1 spezifischen Antikörpern. Als Ladungskontrolle wurde die Expression der Histondeacetylase HDAC untersucht.

### IV.3.8 Der Einfluss von Protein-Phosphatasen auf die Egr-1 Biosynthese

Die Raf-Kinase kann über die Aktivierung von MEK den ERK-Signalweg anschalten. Zur Untersuchung des ERK-Signalwegs wurde in INS-1 Zellen die MKP-1 überexprimiert (s.

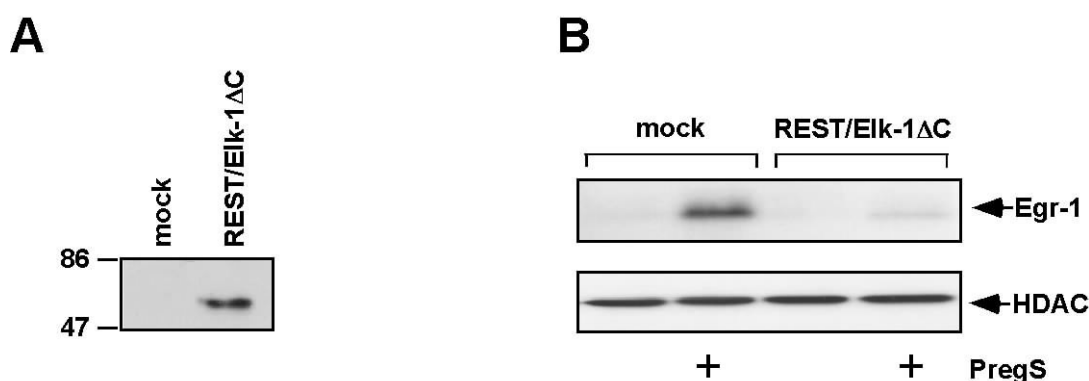
Kapitel VI.0). Es zeigte sich, dass die Dephosphorylierung von ERK im Nukleus durch die MKP-1 die Egr-1 Biosynthese komplett unterband. Folglich vermittelt der ERK-oder JNK-Signalweg die PregS-induzierte Egr-1 Expression.



**Abbildung 42: Dephosphorylierung von ERK durch die MPK-1 blockiert die PregS-induzierte Biosynthese von Egr-1.** INS-1 Zellen wurden mit MKP-1 kodierenden Lentiviren infiziert. Als Kontrolle wurden mock-infizierte Zellen untersucht. Nach 24-stündigem Serumentzug wurden die Zellen für eine Stunde mit PregS (50  $\mu$ M) stimuliert. Kernextrakte wurden präpariert und durch SDS-Gelelektrophorese fraktioniert. Der Nachweis von Egr-1 erfolgte im Westernblotverfahren mit Egr-1 spezifischen Antikörpern. Als Ladungskontrolle wurde die Expression der Histondeacetylase HDAC untersucht.

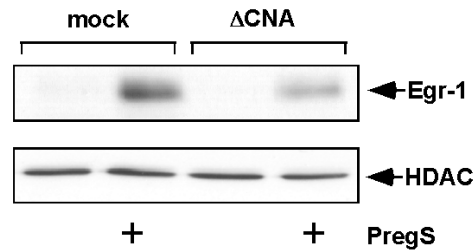
#### IV.3.9 Elk-1 ist essentiell für die Aktivierung der Egr-1 Transkription

Wie in Kapitel IV.1.5 beschrieben, lässt sich über die Expression einer dominant-negativen Mutante von Elk-1 der Einfluss des ternären Komplexfaktors auf die Egr-1 Expression untersuchen. In Abbildung 43C sieht man, dass die Expression dieser Mutante in INS-1 Zellen mittels lentiviralem Gentransfer die Egr-1 Biosynthese nach PregS-Stimulation blockierte.



**Abbildung 43: Der ternäre Komplexfaktor Elk-1 ist essentiell für die PregS-induzierte Biosynthese von Egr-1.** **A.** Westernblotanalyse von INS-1 Zellen, die mit rekombinanten Lentiviren infiziert wurden, die für REST/Elk-1 $\Delta$ C kodieren. Als Kontrolle wurden mock-infizierte Zellen untersucht. Die Westernblots wurden mit Antikörpern inkubiert die gegen das FLAG-Epitop gerichtet sind. **B.** INS-1 Zellen wurden mit REST/Elk-1 $\Delta$ C kodierenden Lentiviren infiziert. Als Kontrolle wurden mock-infizierte Zellen untersucht. Nach 24-stündigem Serumentzug wurden die Zellen für eine Stunde mit PregS (50  $\mu$ M) stimuliert. Kernextrakte wurden präpariert und durch SDS-Gelelektrophorese fraktioniert. Der Nachweis von Egr-1 erfolgte im Westernblotverfahren mit Egr-1 spezifischen Antikörpern. Als Ladungskontrolle wurde die Expression der Histondeacetylase HDAC untersucht.

Eine weitere Möglichkeit den Einfluss des ternären Komplexfaktors Elk-1 zu untersuchen ist die Expression einer konstitutiv aktiven Mutante von Calcineurin A (s. Kapitel VI.1.11). Abbildung 44B zeigt die Auswirkung der lentiviralen Expression der Mutante  $\Delta$ CnA auf die PregS-induzierte Egr-1 Biosynthese. Die Dephosphorylierung von Elk-1 durch  $\Delta$ CnA bewirkte eine Hemmung der Egr-1 Biosynthese nach PregS-Stimulation. Die Resultate verdeutlichen die Relevanz von Elk-1 für die Egr-1 Expression nach PregS Stimulation.

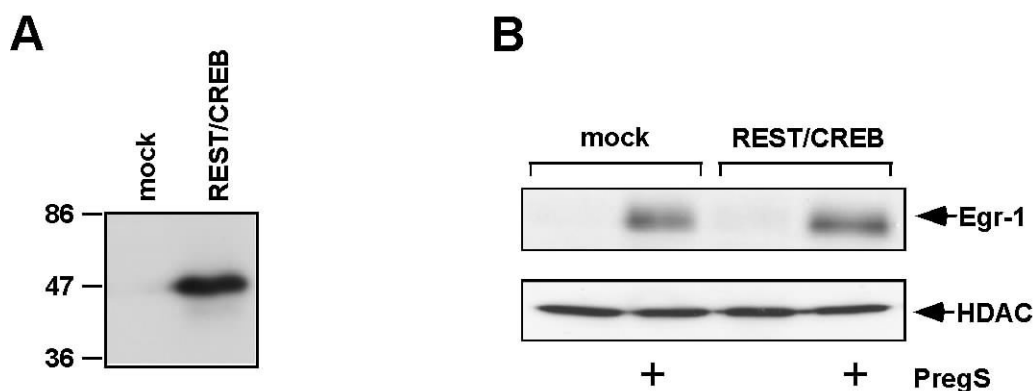


**Abbildung 44 Eine konstitutiv-aktive Mutante von Calcineurin inhibiert die PregS-induzierte Biosynthese von Egr-1.** INS-1 Zellen wurden mit  $\Delta$ CnA kodierenden Lentiviren infiziert. Als Kontrolle wurden mock-infizierte Zellen untersucht. Nach 24-stündigem Serumentzug wurden die Zellen für eine Stunde mit PregS (50  $\mu$ M) stimuliert. Kernextrakte wurden präpariert und durch SDS-Gelelektrophorese fraktioniert. Der Nachweis von Egr-1 erfolgte im Westernblotverfahren mit Egr-1 spezifischen Antikörpern. Als Ladungskontrolle wurde die Expression der Histondeacetylase HDAC untersucht.

#### ***IV.3.10 CREB spielt keine Rolle in der transkriptionellen Aktivierung des***

##### ***Egr-1 Gens***

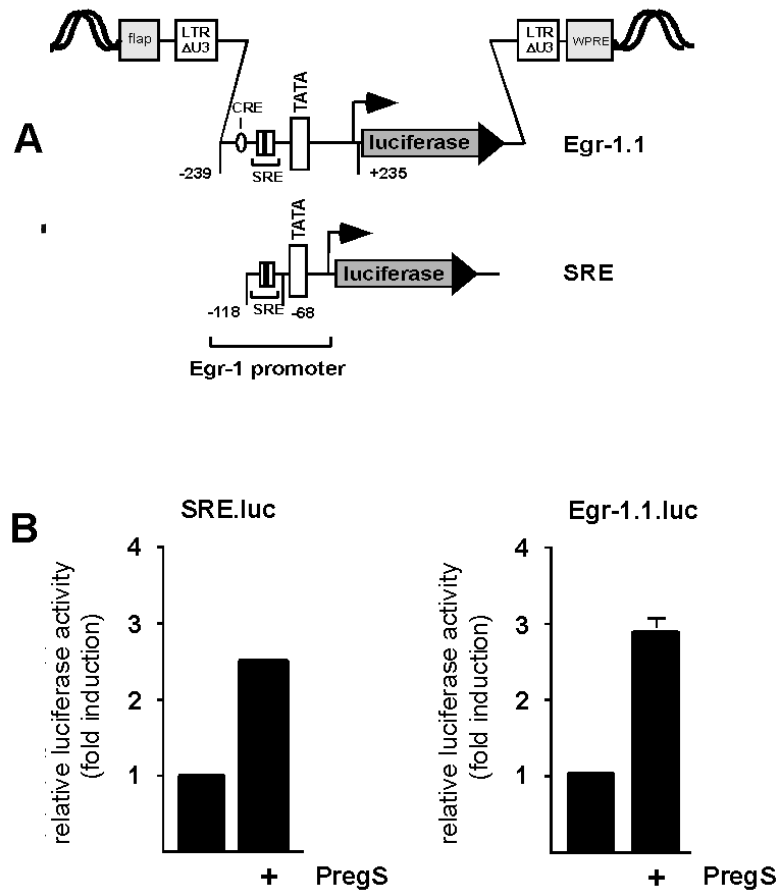
Neben den fünf SRE enthält der Egr-1 Promoter auch eine Bindungsstelle für CREB. Auch wenn nach der gängigen Literatur die Funktionalität dieses Elements für die Egr-1 Expression strittig ist (Meyer et al., 2002; Tremblay & Drouin 1999; von der Kammer et al., 1998), konnte in anderen Zelltypen unter anderem auch in  $\beta$ -Zellen des Pankreas die Funktionalität des CRE-Elementes als CREB-Bindungsstelle bestätigen werde. Deshalb sollte auch in INS-1 Zellen die Rolle von CREB auf die PregS-induzierte Egr-1 Biosynthese untersucht werden. Dafür wurde der Einfluss der lentiviral-vermittelten Expression einer dominant-negativen Mutante von CREB auf die Egr-1 Biosynthese untersucht. Abbildung 45C zeigt, dass die Expression der Mutante REST/CREB in INS-1 Zellen keinerlei Einfluss auf die PregS-induzierte Egr-1 Expression hatte.



**Abbildung 45: CREB spielt keine Rolle in der PregS-induzierten Biosynthese von Egr-1.** **A.** Westernblotanalyse von INS-1 Zellen, die mit rekombinanten Lentiviren infiziert wurden, die für REST/CREB kodieren. Als Kontrolle wurden mock-infizierte Zellen untersucht. Die Westernblots wurden mit Antikörpern inkubiert, die gegen das FLAG-Epitop gerichtet sind. **B.** INS-1 Zellen wurden mit REST/CREB kodierenden Lentiviren infiziert. Als Kontrolle wurden mock-infizierte Zellen untersucht. Nach 24-stündigem Serumentzug wurden die Zellen für eine Stunde mit PregS (50  $\mu$ M) stimuliert. Kernextrakte wurden präpariert und durch SDS-Gelelektrophorese fraktioniert. Der Nachweis von Egr-1 erfolgte im Westernblotverfahren mit Egr-1 spezifischen Antikörpern. Als Ladungskontrolle wurde die Expression der Histondeacetylase HDAC untersucht.

#### IV.3.11 Untersuchung des *Egr-1* Promoters

Um die vorangegangenen Untersuchungsergebnisse zu bestätigen und zu untersuchen, welche genetischen Elemente für die Aktivierung der *Egr-1* Transkription nötig sind, wurden INS-1 Zellen mit Lentiviren infiziert, die für die Transgene *Egr-1.1luc* und *Egr-1.SREluc* kodieren. *Egr-1.1luc* enthält zusätzlich zu den in *Egr-1SREluc* vorhandenen distalen SRE's des humanen *Egr-1* Promoters auch noch das CRE-Element (Abbildung 46C). So konnte der Einfluss der Transkriptionsfaktoren Elk-1 und CREB nochmals untersucht werden. Abbildung 46D zeigt keinerlei Zunahme der Luziferaseaktivitäten wenn zusätzlich zu den SREs noch das CRE-Element des Promoters verfügbar ist. Das bestätigte die Annahme, dass zwar der ternäre Komplexfaktor Elk-1 nicht aber CREB für die PregS-induzierte *Egr-1* Biosynthese eine Rolle spielt.

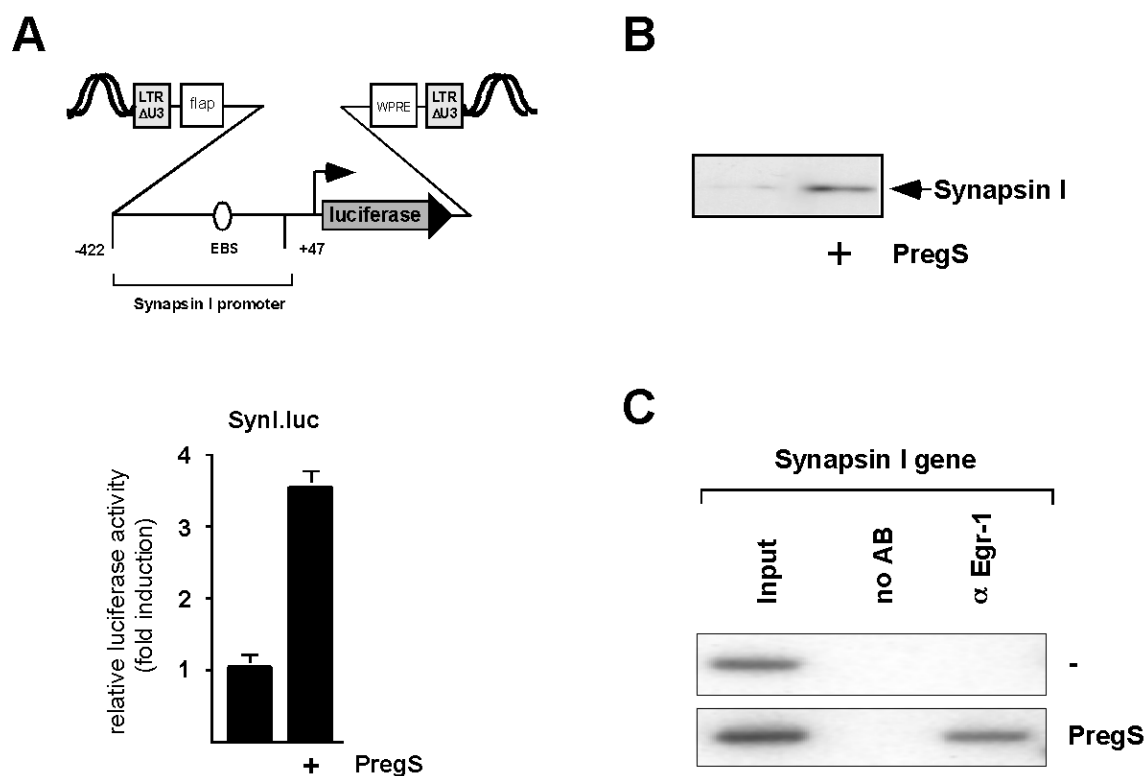


**Abbildung 46 Untersuchung wichtiger regulatorischer Elemente im Egr-1 Promoter.** **A.** Schematische Darstellung von integrierten Proviren, die für die oben gezeigten Promotor-Luziferase-Reportergene kodieren. Der Transfervektor pFWEgr-1.1luc enthält die Sequenzen von -239 bis +235 des humanen Egr-1 Promoters. Der Transfervektor pFWEgr-1SREluc enthält die beiden proximalen SRE-Bindestellen des Egr-1 Promoters. Die wichtigen genetischen Elemente innerhalb der regulatorischen Region des Egr-1 Promoters sind dargestellt und beinhalten die SREs und das CRE-Element. **B.** INS-1 Zellen wurden mit Lentiviren infiziert, die für die Egr-1 Promotor-Luziferase-Reportergene kodieren. Nach 24-stündigem Serumentzug wurden die Zellen für weitere 24 Stunden mit PregS stimuliert. Ganzzellextrakte wurden präpariert und die Luziferaseaktivität untersucht. Die Luziferaseaktivität wurde über die Proteinkonzentration normalisiert.

#### IV.3.12 Der Einfluss von Egr-1 auf das Synapsin I- Gen

Das für das synaptische Vesikelprotein Synapsin I kodierende Gen enthält in seiner regulatorischen Region eine Egr-1 Bindestelle (Thiel et al., 1994). Synapsine werden auch in nicht-neuronalen Zellen wie den  $\beta$ -Zellen des Pankreas exprimiert und spielen eine wichtige Rolle bei der Insulinsekretion (Thomas-Reetz & De Camilli, 1994; Matsumoto et al., 1999; Tabuchi et al., 2000). Deshalb stellte sich die Frage, ob das Synapsin I-Gen durch Egr-1 reguliert wird. Daraufhin wurde ein ChIP-Experiment durchgeführt. Die Resultate bestätigen

die Bindung von Egr-1 unter physiologischen Bedingungen an das Synapsin I Gen in PregS-stimulierten INS-1-Zellen (Abbildung 47C). Folglich wurden INS-1 Zellen mit Lentiviren infiziert, die für ein Synapsin I-Promotor/Luziferase-Reporter gen kodierten. Wurde Egr-1 nach PregS-Stimulation synthetisiert, bindet es an den Synapsinpromoter und aktiviert damit das Luziferasegen. Abbildung 47 A zeigt den integrierten Provirus und die Induktion der Luziferaseaktivität nach PregS-Stimulation. Zusätzlich wurde die Biosynthese von Synapsin I nach PregS-Stimulation im Westernblot nachgewiesen (Abbildung 47B). Der Zeitverlauf der Expression würde zu der Hypothese passen, dass Synapsin I durch Egr-1 transaktiviert wird. Die Egr-1 Expression gelangte nach einer Stunde zu einem Maximum, wohingegen die Synapsin I-Expression erst nach 4 Stunden ihr Maximum erreichte. Zusammengefasst weisen die Ergebnisse darauf hin, dass in INS-1-Zellen das Synapsin I Gen von Egr-1 reguliert wird.



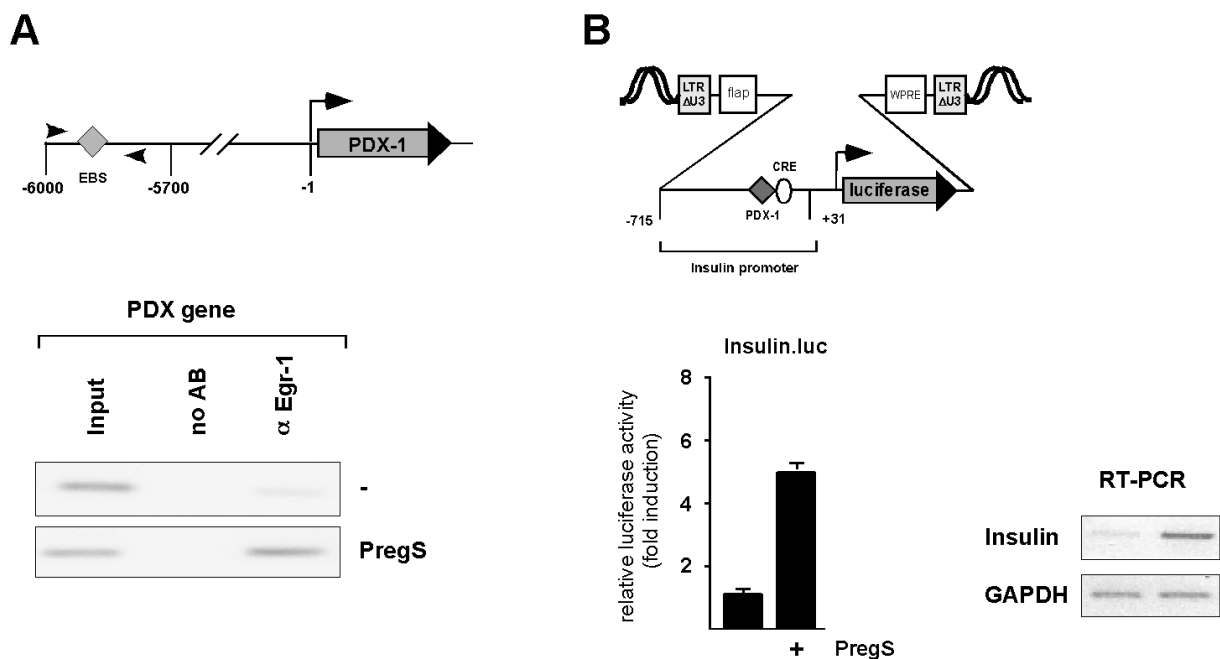
**Abbildung 47: Einfluss von Egr-1 auf das Synapsin I Gen.** **A.** Schematische Darstellung von integrierten Proviren, die für Synapsin I-Luziferase-Reporter gen kodieren. Dieses Reporter gen enthält die Sequenzen von -422 bis +47 des humanen Synapsin I Promoters. Die Egr-1 Bindestelle im Synapsin I Promoter ist als EBS bezeichnet. INS-1 Zellen wurden mit Lentiviren infiziert, die für das Synapsin I-Luziferase-Reporter gen kodieren. Nach 24-stündigem Serumentzug wurden die Zellen für weitere 24 Stunden mit PregS stimuliert. Ganzzellextrakte wurden präpariert und die Luziferaseaktivität untersucht. Die Luziferaseaktivität wurde über die Proteinkonzentration normalisiert. **B.** Westernblotanalyse der Synapsin I Expression nach PregS Stimulation. Nach 24-stündigem Serumentzug wurden INS-1 Zellen für vier Stunden mit PregS (50  $\mu$ M) stimuliert. Kernextrakte wurden präpariert und durch SDS-Gelelektrophorese fraktioniert. Der Nachweis von Synapsin I erfolgte im Westernblotverfahren mit Synapsin I spezifischen Antikörpern. **C.** Bindung von Egr-1 an die regulatorische Region von Synapsin I. Chromatin von unstimulierten Zellen oder aber von Zellen, die für eine Stunde mit PregS stimuliert wurden, wurden mit einem gegen Egr-1 gerichteten Antikörper immunpräzipitiert.



Die anschließende Amplifikation der Fragmente mittels PCR erfolgte mit Primern, die die Egr-1 Bindestelle innerhalb der regulatorischen Region des Synapsin I Gens umfassen. Als Negativkontrolle wurde bei der Immunpräzipitation auf Zugabe von Antikörpern verzichtet, als Positivkontrolle diente nicht immunpräzipitiertes Chromatin (input).

### IV.3.13 Regulation des Insulingens durch Egr-1

Das Pankreas Duodenum Homeobox Protein I (PDX-1) ist nicht nur essentiell für die Entwicklung des Pankreas, sondern ist auch ein potenter Aktivator des Insulin-Gens (Marshak et al., 1996; Melloul, 2004; Kaneto et al., 2007). Das PDX-1-Gen besitzt eine funktionelle Egr-1 Bindestelle in seinem Promoter (Eto et al., 2007). Im ChIP-Experiment konnte gezeigt werden, dass Egr-1 in INS-1 Zellen tatsächlich unter physiologischen Bedingungen an das PDX-1 Gen gebunden wurde (Abbildung 48A). Außerdem führte PregS-Stimulation zu erhöhter Luziferaseaktivität in INS-1 Zellen, die ein Insulin-Promoter/Luziferase-Reportergen exprimierten. Wird Egr-1 durch PregS-Stimulation synthetisiert, aktiviert es die Transkription des PDX-1 Gens. PDX-1 wiederum kann an das Insulin-Gen binden und es damit aktivieren (Abbildung 48B). Die Aktivierung des Insulingens durch PregS konnten wir zusätzlich mittels semiquantitativer RT-PCR zeigen (Abbildung 48B). Egr-1 reguliert folglich das PDX-I Gen, und somit hat es auch einen indirekten Einfluss auf die Expression von Insulin.

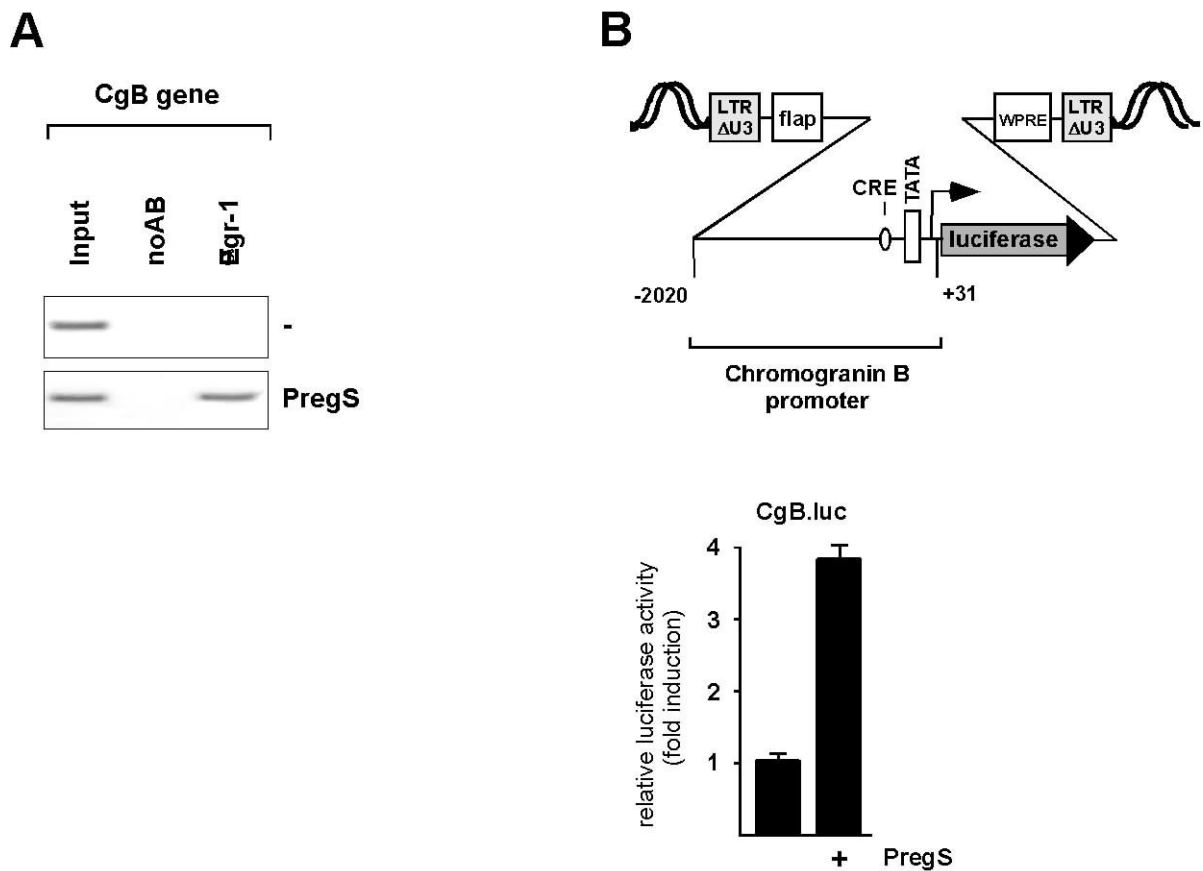


**Abbildung 48 Einfluss von Egr-1 auf das PDX-1- und das Insulin-Gen.** A. Schematische Darstellung des PDX-1 Gens. Die Egr-1 Bindestelle wird als EBS bezeichnet. Die Pfeile zeigen die Lage der ChIP-Primer. Bindung von Egr-1 an die regulatorische Region von PDX-1. Chromatin von unstimulierten Zellen oder aber von Zellen, die für eine Stunde mit PregS stimuliert wurden, wurde mit einem gegen Egr-1 gerichteten Antikörper immunpräzipitiert. Die anschließende Amplifikation der Fragmente mittels PCR erfolgte mit Primern, die die Egr-1 Bindestelle innerhalb der regulatorischen Region des PDX-1 Gens umfassen. Als

Negativkontrolle wurde bei der Immunpräzipitation auf Zugabe von Antikörpern verzichtet. Als Positivkontrolle diente nicht immunpräzipitiertes Chromatin (input). **B.** Schematische Darstellung eines integrierten Provirus, der für ein Insulin-Luziferase-Reportergen kodiert. Dieses Reportergen enthält die Sequenzen von -715 bis +31 des Insulin I Promoters der Ratte. Die PDX-1-Bindestelle sowie das CRE-Element im Insulin I Promoter sind dargestellt. INS-1 Zellen wurden mit Lentiviren infiziert, die für das Insulin-Luziferase-Reportergen kodieren. Nach 24-stündigem Serumentzug wurden die Zellen für weitere 24 Stunden mit PregS stimuliert. Ganzzelextrakte wurden präpariert und die Luziferaseaktivität untersucht. Die Luziferaseaktivität wurde über die Proteinkonzentration normalisiert. RT-PCR-Analyse von Insulin mRNA. INS-1 Zellen wurden nach 24-stündigem Serumentzug für eine Stunde mit PregS (50  $\mu$ M) stimuliert. Die Gesamt-RNA wurde isoliert und mittels Reversertranskriptase in cDNA umgeschrieben. Die anschließende Amplifikation erfolgte mit Insulin spezifischen Primern.

#### IV.3.14 Egr-1 transaktiviert das Chromogranin B Gen

Wir konnten schon während der Untersuchung der Buserelin-induzierten Zielgene in gonadotropen Hypophysenzellen zeigen, dass Egr-1 unter physiologischen Bedingungen an das Chromogranin B Gen bindet (s. Kapitel VI.1.16). In INS-1 Zellen konnte dieses Ergebnis für  $\beta$ -Zellen des Pankreas bestätigt werden. Auch hier bindet Egr-1 nach PregS Stimulation an das CgB Gen (Abbildung 49). Zusätzlich aktivierte die Stimulation der Zellen mit PregS die Transkription eines CgB Promotor/Luziferase Reportergens (Abbildung 49B).



**Abbildung 49 Regulation des CgB Gens durch Egr-1:** **A.** Bindung von Egr-1 an die regulatorische Region des CgB Gens. Chromatin von unstimulierten Zellen oder aber von Zellen, die für eine Stunde mit PregS stimuliert wurden, wurde mit einem gegen Egr-1 gerichteten Antikörper immunpräzipitiert. Die anschließende

Amplifikation der Fragmente mittels PCR erfolgte mit Primern, die die Egr-1 Bindestelle innerhalb der regulatorischen Region des CgB Gens umfassen. Als Negativkontrolle wurde bei der Immunpräzipitation auf Zugabe von Antikörpern verzichtet. Als Positivkontrolle diente nicht immunpräzipitiertes Chromatin (input). **B.** Schematische Darstellung von integrierten Proviren, die für ein CgB Promotor/Luziferase-Reportergen kodieren. Dieses Reportergen enthält die Sequenzen von -2020 bis +31 des CgB Promoters. Die Egr-1 Bindestelle im CgB Promoter ist als EBS bezeichnet. INS-1 Zellen wurden mit Lentiviren infiziert, die für das CgB Promotor/Luziferase-Reportergen kodieren. Nach 24-stündigem Serumentzug wurden die Zellen für weitere 24 Stunden mit PregS stimuliert. Ganzzelextrakte wurden präpariert und die Luziferaseaktivität untersucht. Die Luziferaseaktivität wurde an der Proteinkonzentration normalisiert.

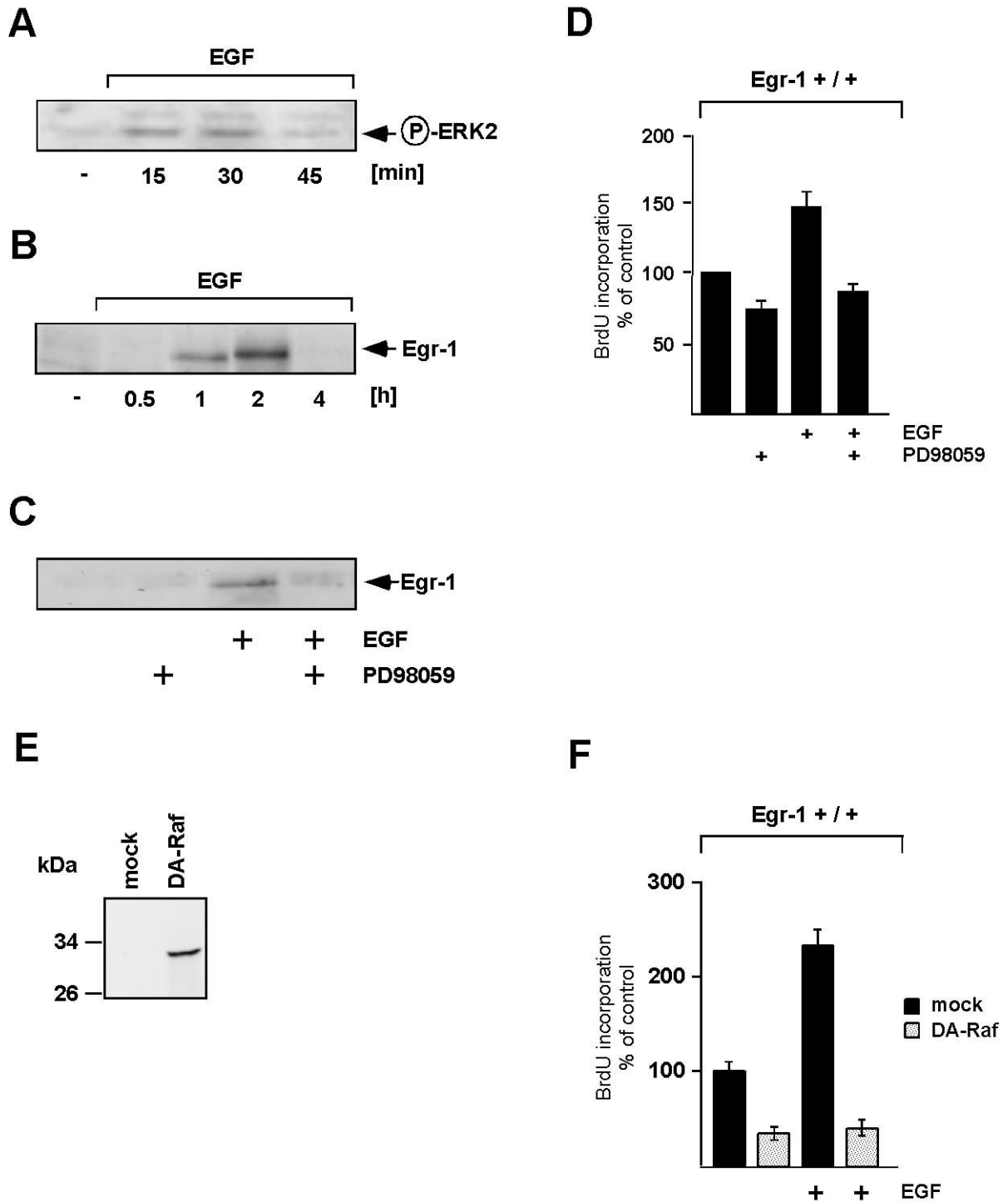
## **IV.4 Astrozyten**

Egr-1 (early growth response) wurde ursprünglich als ein Gen entdeckt, das sehr früh nach Stimulation mit Mitogenen exprimiert wird (Sukhatme et al., 1988). Seither wurde versucht, die Funktion von Egr-1 für Wachstum und Proliferation zu belegen. In der vorliegenden Arbeit wurde versucht, Erkenntnisse über die Funktion von Egr-1 in Astrozyten zu erlangen. Deshalb wurde in primären Astrozyten nach einem funktionellen Zusammenhang zwischen Egr-1 Biosynthese und mitogenstimulierter Proliferation gesucht.

### ***IV.4.1 Biosynthese von Egr-1 und Proliferation von Astrozyten***

Die Stimulation des EGF-Rezeptors mit EGF führte zur Aktivierung der ERK-Signalkaskade (Abbildung 50A). Die Aktivierung von ERK führte wiederum zur Induktion der Egr-1 Expression (Abbildung 50B). Die Inkubation der Zellen mit dem MEK-Inhibitor PD98059 hemmte die Biosynthese von Egr-1 effizient (Abbildung 50C). Um die Proliferation der Zellen nachzuweisen, wurde die DNA-Syntheserate mittels BrdU-Inkorporation bestimmt. Der Einbau des Thymidinanalogon BrdU wurde als Maß für DNA-Replikation verwendet und diente als Indikator für zelluläre Aktivität in der S-Phase des Zellzyklus. In Abbildung 50D sieht man, dass die Stimulation primärer Astrozyten mit EGF im Vergleich zu unstimulierten Zellen zu einer signifikanten Steigerung der BrdU-Inkorporation führte. Um den Einfluss von ERK auf die EGF-induzierte Proliferation zu untersuchen, wurden primäre Astrozyten mit dem MEK-Inhibitor PD98059 präinkubiert. PD98059 verhinderte nicht nur die Biosynthese von Egr-1 (Abbildung 50C), sondern auch die EGF-induzierte Proliferation von Astrozyten (Abbildung 50D). Die Aktivierung des ERK-Signalwegs nach Stimulation des EGF-

Rezeptors erfolgt über die Aktivierung von Raf. Um den Einfluss von Raf auf die Proliferation von Astrozyten zu untersuchen wurden die Zellen mit Lentiviren infiziert, die für eine dominant-negative Mutante von Raf kodieren (s. Kapitel VI.3.7). Abbildung 50F zeigt, dass die Expression der Mutante DA-Raf die EGF-induzierte Proliferation von Astrozyten komplett inhibierte. Sowohl die Raf-Kinase als auch der ERK-Signalweg sind folglich essentielle Bestandteile der EGF-induzierten Astrozytenproliferation.

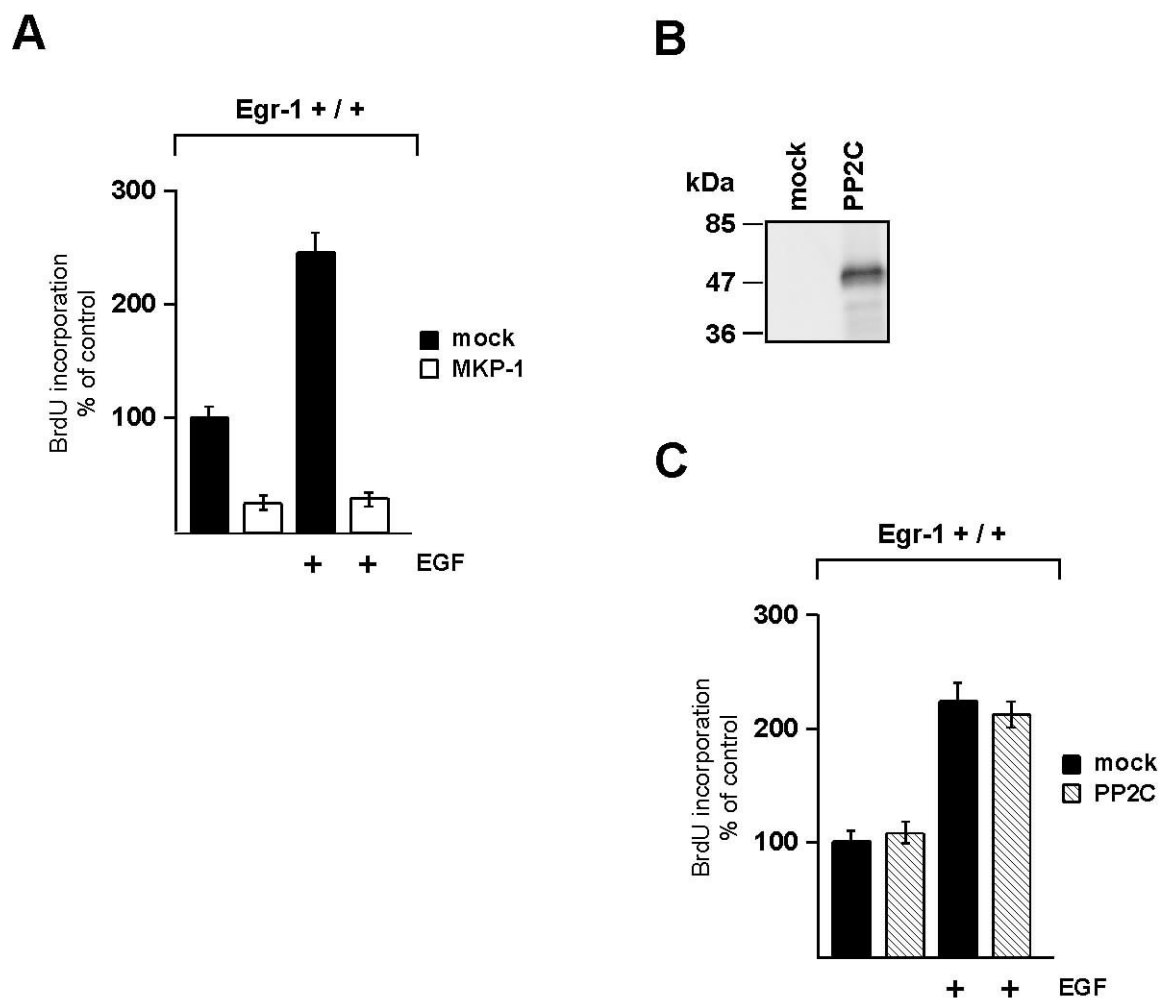


**Abbildung 50: EGF-Stimulation induziert die Egr-1 Biosynthese und aktiviert die Proliferation von Astrozyten über Aktivierung des ERK-Signalwegs.** **A.** Phosphorylierung von ERK1/2 in EGF-stimulierten Astrozyten. Nach 24-stündigem Serumentzug wurden primäre Astrozyten mit EGF (10 ng/ml), wie angegeben stimuliert. Ganzzellextrakte wurden hergestellt und Phospho-ERK1/2 im Westernblotverfahren detektiert. **B.** Kinetik der Egr-1 Expression nach EGF-Stimulation. Primäre Astrozyten wurden nach 24 Stunden Serumentzug mit EGF (10ng/ml) für die angegebenen Zeiten stimuliert. Kernextrakte wurden präpariert und mittels SDS-Gelelektrophorese fraktioniert. Die Detektion von Egr-1 erfolgte mittels Immunoblotting mit Egr-1 spezifischen Antikörpern. **C.** Der Effekt des MAP Kinase Kinaseinhibitors PD98059 auf die Biosynthese von Egr-1 wurde durch Präinkubation primärer Astrozyten mit PD98059 (50 µM) untersucht. Die anschließende Stimulation mit EGF (10 ng/ml) erfolgte für weitere zwei Stunden. Kernproteine wurden isoliert und mittels SDS-Gelelektrophorese aufgetrennt. Die Detektion von Egr-1 erfolgte mittels Immunoblotting mit Egr-1 spezifischen Antikörpern. **D.** EGF induziert die Proliferation primärer Astrozyten.  $1 \times 10^4$  Zellen/well wurden in eine 96/Lochplatte gesät und für 24 Stunden in BME kultiviert, welches mit 10 % FCS supplementiert war. Am folgenden Tag wurde den Zellen das Serum entzogen und nach weiteren 24 Stunden erfolgte die Präinkubation der Zellen mit dem MEK-Inhibitor PD98059 (50 µM) für eine Stunde, bevor die Zellen mit EGF (10 ng/ml) für weitere 24 Stunden stimuliert wurden. Die Induktion der DNA-Synthese wurde mittels BrdU-Inkorporation in die DNA proliferierender Zellen gemessen. Die Messung der BrdU-Inkorporation erfolgte mittels spezifischer Antikörper in einem kolorimetrischen System. **E.** Immunologischer Nachweis des Transgens. Primäre Astrozyten wurden mit DA-Raf kodierenden Lentiviren infiziert. Als Kontrolle wurden mock-infizierte Zellen untersucht. **F.** Primäre Astrozyten wurden mit DA-Raf kodierenden Lentiviren infiziert. Als Kontrolle wurden mock-infizierte Zellen untersucht. Die Induktion der DNA-Synthese wurde mittels BrdU-Inkorporation in die DNA gemessen.

#### ***IV.4.2 Der Einfluss von Protein-Phosphatasen auf die EGF-induzierte***

##### ***Proliferation von Astrozyten***

Bisher konnte gezeigt werden, dass der ERK-Signalweg für die EGF-induzierte Proliferation von Astrozyten notwendig ist. ERK kann im Zytoplasma und in der Plasmamembran Substrate phosphorylieren. ERK kann jedoch auch in den Zellkern translozieren und dort beispielsweise Transkriptionsfaktoren wie den ternären Komplexfaktor Elk-1 phosphorylieren. Um zu zeigen, dass nukleäres ERK für die EGF-induzierte Astrozytenproliferation notwendig ist, wurde in Astrozyten mittels lentiviralem Gentransfer die MKP-1 überexprimiert (s. Kapitel VI.1.4). Die Inaktivierung von ERK durch Expression der MKP-1 hemmte das Wachstum der Astrozyten (Abbildung 50A). ERK ist folglich sowohl für die EGF-induzierte Egr-1 Expression als auch für die Proliferation primärer Astrozyten unabdingbar. Die Ergebnisse lassen auf eine Korrelation zwischen Egr-1 Biosynthese und EGF-induzierter Proliferation schließen. Als Kontrolle wurden Astrozyten mit Lentiviren infiziert, die für die zytoplasmatische Proteinphosphatase PP2C kodierten (s. Kapitel VI.1.11). Wie in Abbildung 51C gut zu erkennen ist, beeinflusst die Expression von PP2C die EGF-induzierte Proliferation von Astrozyten in keiner Weise.

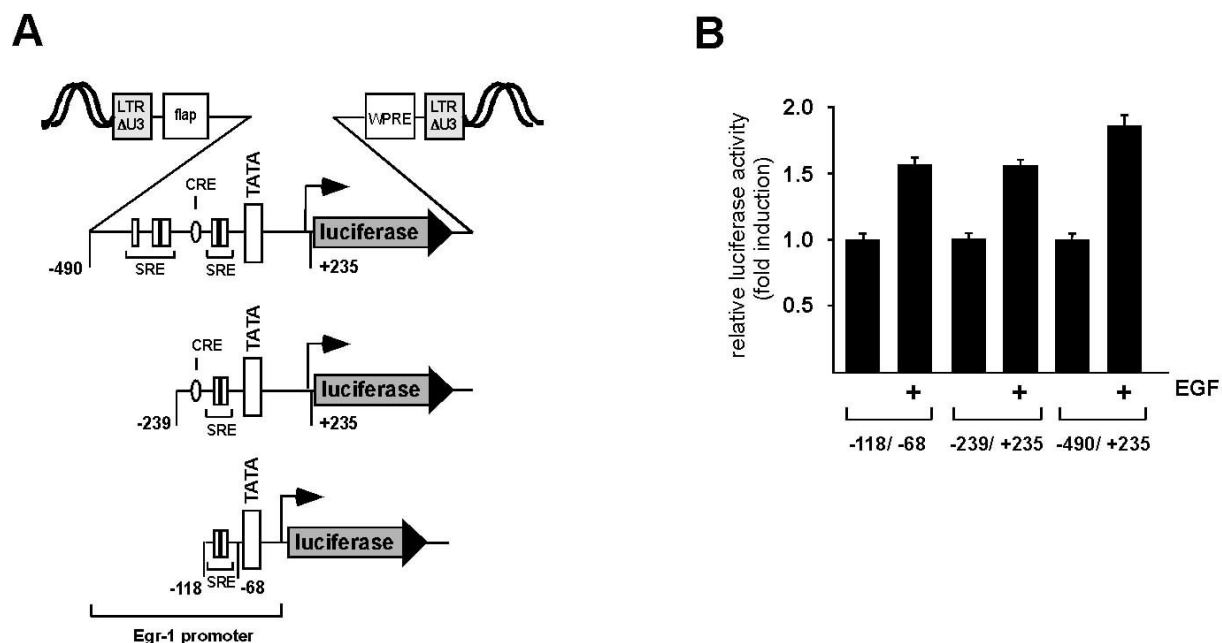


**Abbildung 51 Die Rolle von Protein-Phosphatasen auf die EGF-induzierte Proliferation von Astrozyten:**  
**A.** Primäre Astrozyten wurden mit MKP-1 kodierenden Lentiviren infiziert, als Kontrolle wurden mock-infizierte Zellen untersucht. Die Induktion der DNA-Synthese wurde mittels BrdU-Inkorporation in die DNA gemessen. **E.** Immunologischer Nachweis des Transgens. Primäre Astrozyten wurden mit PP2C kodierenden Lentiviren infiziert, als Kontrolle wurden mock-infizierte Zellen untersucht. **F.** Primäre Astrozyten wurden mit PP2C kodierenden Lentiviren infiziert, als Kontrolle wurden mock-infizierte Zellen untersucht. Die Induktion der DNA-Synthese wurde mittels BrdU-Inkorporation in die DNA gemessen.

#### IV.4.3 Untersuchung des *Egr-1* Promoters

Um relevante regulatorische Elemente im *Egr-1* Promoter zu identifizieren wurden Astrozyten mit Lentiviren infiziert, die für drei unterschiedlich lange *Egr-1* Promoter/Luziferasereporter gene kodierten. *Egr-1.2* enthält die zwei proximalen sowie die drei distalen SRE-Bindungsstellen und das CRE-Element. *Egr-1.1* fehlen die drei proximalen SRE-Bindungsstellen und *Egr-1SRE* besteht nur aus einem minimalen Promoter mit beiden distalen SRE-Bindestellen (Abbildung 52A). Ein Vergleich der Luziferaseaktivitäten nach EGF-Stimulation zeigt, dass es keine signifikanten Unterschiede in den Luziferaseaktivitäten

der drei Transgene gab (Abbildung 52B). Folglich sind die beiden proximalen SRE's ausreichend um eine Egr-1 Synthese nach EGF-Stimulation zu gewährleisten.



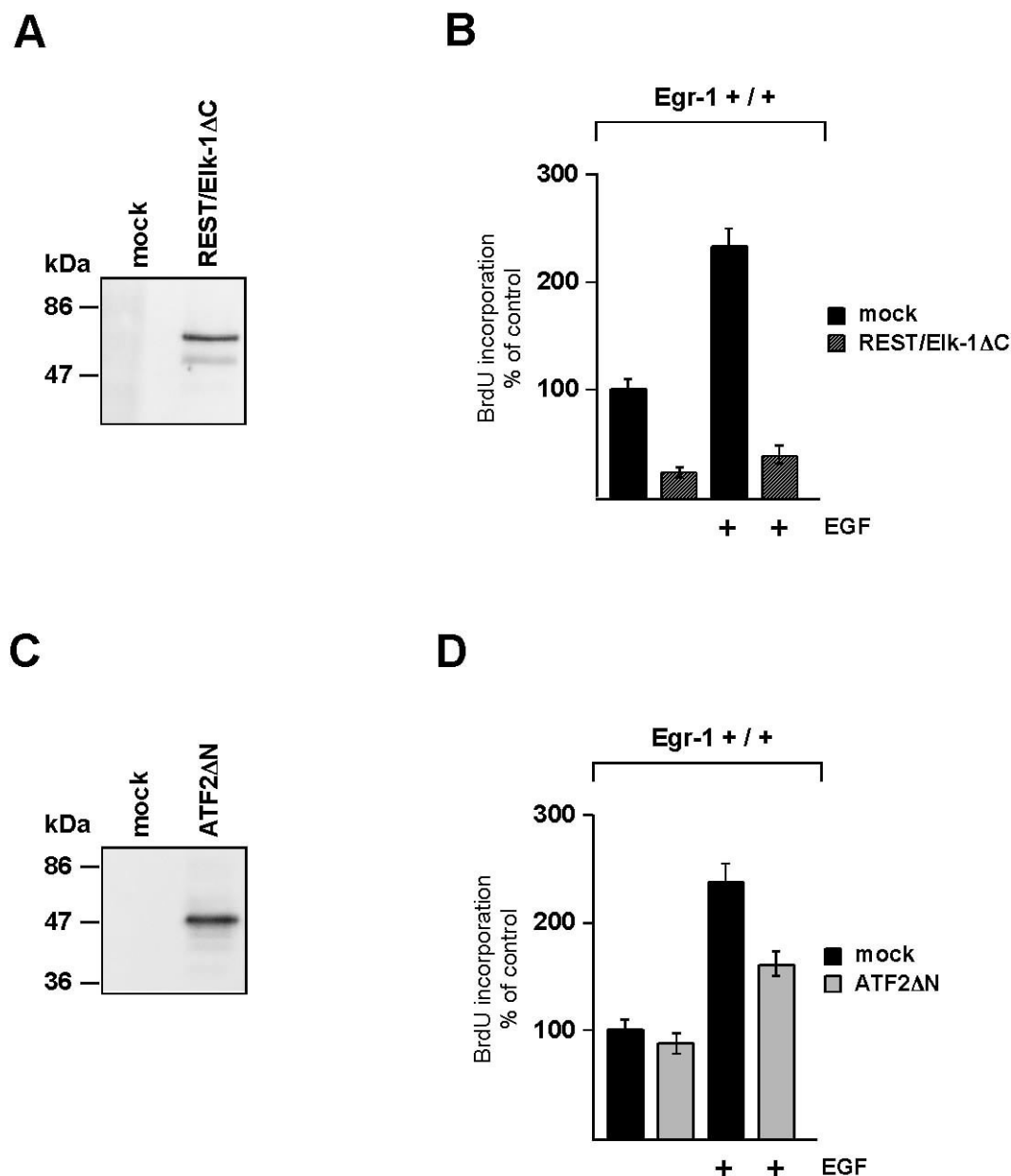
**Abbildung 52: Transkriptionelle Aktivierung von ins Chromatin eingebetteten Egr-1 Promoter/Luziferase Reportergenen in EGF stimulierten Astrozyten A.** Modulare Struktur des integrierten Provirus der für Egr-1 Promoter/Luziferase Reportergene kodiert. Die Transfervektoren pFWEgr-1.1luc und pFWEgr-1.2luc enthalten die Sequenzen von -239 bis +235 oder von -490 bis +235 des humanen Egr-1 Gens. Der Transfervektor pFWEgr-1SREluc enthält nur die beiden proximalen SRE des Egr-1 Promoters. Die relevanten genetischen Elemente innerhalb der Regulatorischenregion von Egr-1 sind dargestellt und beinhalten die fünf SRE's und ein CRE-Element. **B.** Primäre Astrozyten wurden mit rekombinanten Lentiviren infiziert, die für die oben abgebildeten Egr-1 Promoter/ Luziferase Reportergene kodierten. Nach 24 Stunden Serumentzug wurden die Zellen für weitere 24 Stunden mit EGF (10 ng/ml) stimuliert. Als Kontrolle dienen unstimulierte Zellen. Ganzzelextrakte wurden präpariert und auf ihre Luciferaseaktivität untersucht. Die Luciferaseaktivität wurde über die Proteinkonzentration normalisiert.

#### IV.4.4 Inhibierung der EGF-induzierten Proliferation von Astrozyten durch

##### *eine dominant-negative Mutante von Elk-1*

Die SRE-vermittelte Aktivierung der Egr-1 Gentranskription wird über den ternären Komplexfaktor Elk-1 aktiviert. Um den Einfluss von Elk-1 auf die EGF-induzierte Proliferation von Astrozyten zu untersuchen, wurde mittels lentiviralem Gentransfer eine dominant negative Mutante von Elk-1 exprimiert (s. Kapitel VI.1.5). Die Mutante REST/Elk-1 $\Delta$ C blockierte die EGF-stimulierte Proliferation von Astrozyten komplett (Abbildung 53C). Das führte zu dem Schluss, dass der ternäre Komplexfaktor Elk-1 für die Konvertierung des mitogenen Signals in eine proliferative Antwort essentiell ist. Als Kontrolle wurden

Astrozyten mit Lentiviren infiziert, die für eine dominant-negative Mutante von ATF2 kodieren (s. Kapitel VI.1.13.2). Die Expression von ATF2 $\Delta$ N zeigte nur einen geringen Einfluss auf die Wachstumsrate EGF-stimulierter Astrozyten.



**Abbildung 53: Die Expression einer dominant-negativen Mutante des ternären Komplexfaktors Elk-1 unterbindet die EGF-induzierte Proliferation von Astrozyten.** **A.** Astrozyten wurden mit rekombinanten Lentiviren infiziert, die für REST/EIk-1 $\Delta$ C kodieren. Der Transgennachweis erfolgte mittels Westernblotanalyse von mock- und lentiviral infizierten Astrozyten. **B.** Astrozyten wurden mit rekombinanten Lentiviren infiziert, die für REST/EIk-1 $\Delta$ C kodieren. Als Kontrolle dienten mock-infizierte Zellen. Nach 24 Stunden Serumentzug wurden die Zellen für weitere 24 Stunden mit EGF (10 ng/ml) stimuliert. Die Induktion der DNA-Synthese wurde durch die Messung der BrdU Inkorporation in die DNA bestimmt. **C.** Astrozyten wurden mit rekombinanten Lentiviren infiziert, die für ATF2 $\Delta$ N kodieren. Der Transgennachweis erfolgte mittels Westernblotanalyse von mock- und lentiviral infizierten Astrozyten. **D.** Astrozyten wurden mit rekombinanten Lentiviren infiziert, die für ATF2 $\Delta$ N kodieren. Als Kontrolle dienten mock-infizierte Zellen. Nach 24 Stunden

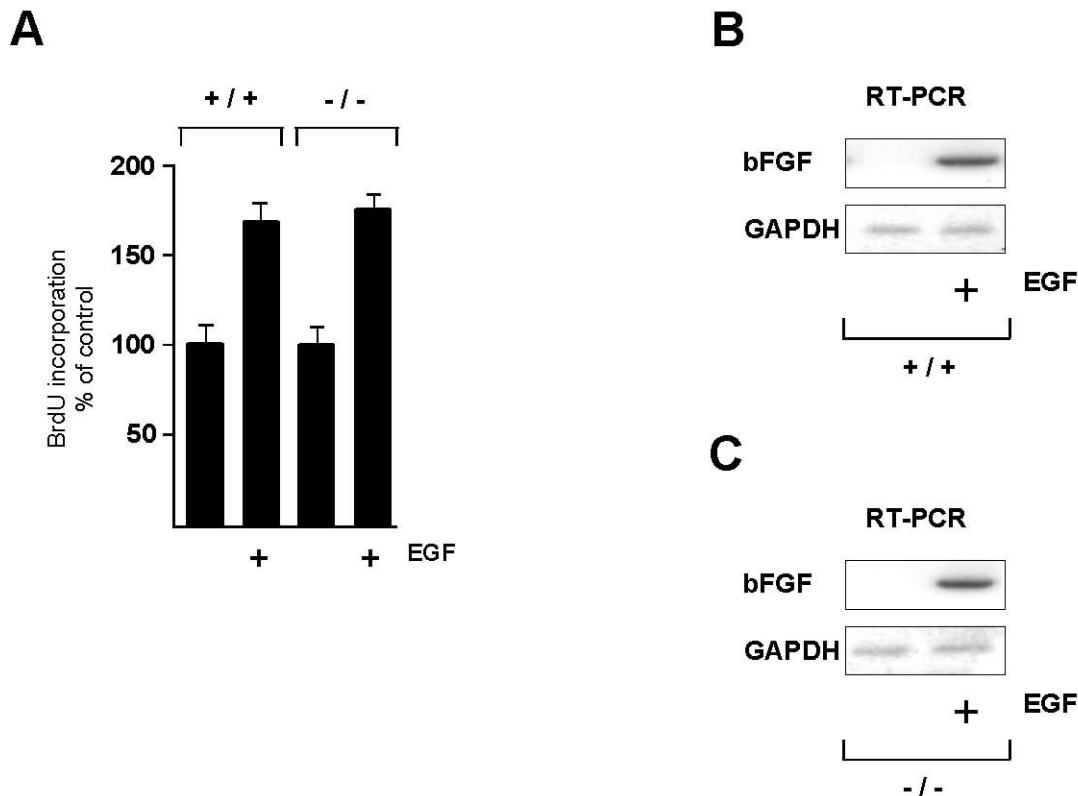


Serumentzug wurden die Zellen für weitere 24 Stunden mit EGF (10 ng/ml) stimuliert. Die Induktion der DNA-Synthese wurde durch die Messung der BrdU Inkorporation in die DNA bestimmt

#### ***IV.4.5 Vergleich der Wachstumsraten von Astrozyten aus Wildtyp- und Egr-1-defizienten Mäusen***

Bislang konnte gezeigt werden, dass Raf, ERK und der ternäre Komplexfaktor Elk-1 essentiell sind für die proliferative Antwort von EGF-stimulierten Astrozyten. Raf, ERK und Elk-1 sind in vielen zellulären Systemen auch für die Induktion der Egr-1 Biosynthese nötig (Cibelli et al., 2002; Bauer et al., 2005). Folglich besteht eine Korrelation zwischen der Mitogen-stimulierten Proliferation und der Biosynthese von Egr-1. Um eine Kausalität dieser beiden Mitogen-Antworten zu beweisen, wurde das Wachstumverhalten von Astrozyten untersucht, die entweder aus Wildtyp-Mäusen oder aus Egr-1-defizienten Mäusen isoliert wurden. Abbildung 54A zeigt, dass es keinerlei Unterschiede in den Wachstumsraten von EGF-induzierten Astrozyten gab, unerheblich ob sie aus Wildtyp oder Egr-1-defizienten Mäusen gewonnen wurden.

Das Wachstum von Zellen erfolgt in Folge einer Mitogenstimulation; bFGF wirkt als Mitogen für Astrozyten. Interessanterweise kann bFGF durch Egr-1 über zwei Egr-1 Bindestellen im proximalen Promotor des bFGF-Gens (Biesiada et al., 1996; Wang et al., 1997) transaktiviert werden. Folglich könnte Egr-1 über die Transaktivierung des bFGF-Gens das Wachstum von Astrozyten steuern. Deshalb wurde die Expression von bFGF mittels RT-PCR sowohl in Astrozyten aus Wildtyp- als auch aus Egr-1-defizienten Mäusen untersucht. Abbildung 54 B und C zeigen, dass ein EGF-Stimulation von Astrozyten, unabhängig von der Expression von Egr-1, zu einer gesteigerten Expression des bFGF-Gens führt.

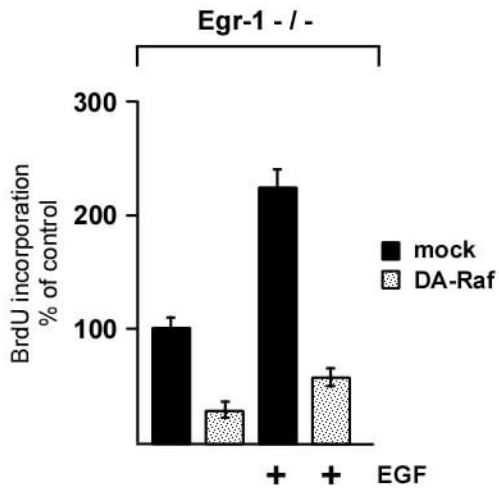
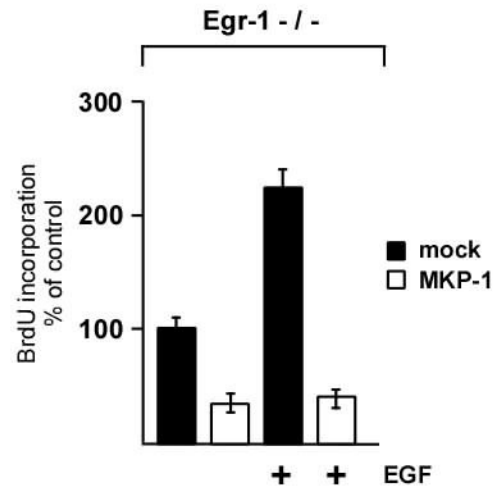
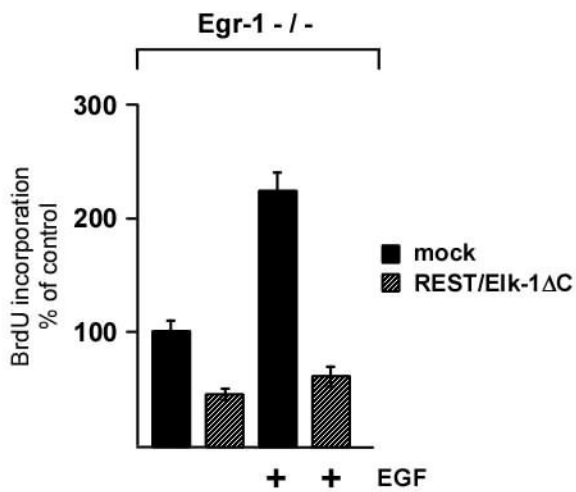
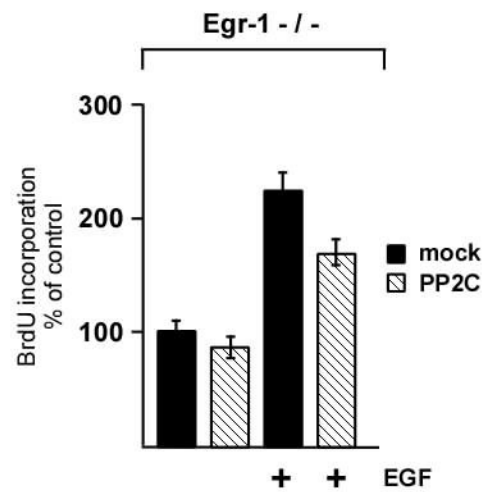


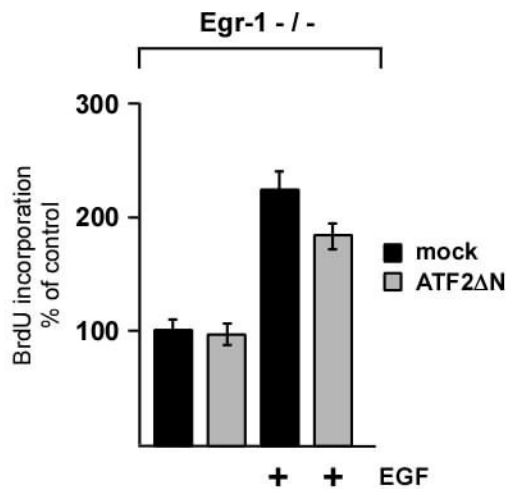
**Abbildung 54: Proliferation und bFGF-Synthese von Astrozyten aus Wildtyp- oder Egr-1-defizienten Mäusen.** **A.** EGF induziert die Proliferation von primären Astrozyten sowohl aus Wildtyp- als auch aus Egr-1-defizienten Mäusen. Die Zellen wurden mit EGF (10 ng/ml) stimuliert und der Effekt auf die DNA-Synthese mittels BrdU-Inkorporation in die DNA gemessen. **B. C.** Steigerung der bFGF mRNA Konzentration nach EGF-Stimulation in Astrozyten aus wildtyp Mäusen (B) oder aber Egr-1 knockout Mäusen (C). Die Gesamt-RNA wurde isoliert und die durch reverse Transkription erhaltene cDNA mittels PCR-Primern analysiert die zur bFGF cDNA komplementär sind.

#### ***IV.4.6 Die Rolle von Protein-Phosphatasen und des Ternären Komplexfaktors für die EGF-induzierte Proliferation von Astrozyten aus Egr-1 defizienten Mäusen***

Bisher konnte gezeigt werden, dass Raf, ERK und Elk-1 für die EGF-induzierte Proliferation von Astrozyten aus Wildtyp-Mäusen essentiell sind. Da die Proliferationsraten von EGF-stimulierten Astrozyten keinerlei Unterschied zeigten ob sie aus Wildtyp oder Egr-1-defizienten Mäusen isoliert wurden, sollte der Einfluss von Raf, ERK und Elk-1 für die Proliferation von Egr-1 defizienten Astrozyten überprüft werden. Dazu wurden aus Egr-1-defizienten Mäusen gewonnene Astrozyten mit Lentiviren infiziert, die entweder für DA-Raf, MKP-1 oder aber REST/Elk-1 $\Delta$ C kodieren. Als Kontrolle wurden Astrozyten aus Egr-1-defizienten Mäusen mit Lentiviren infiziert, die für PP2C oder aber ATF2 $\Delta$ N kodierten. Abbildung 55A, B und C zeigen, dass sowohl der ERK-Signalweg als auch der ternäre

Komplexfaktor Elk-1 für die EGF-induzierte Proliferation in Astrozyten aus Egr-1 defizienten Mäusen unerlässlich sind. Die Signalweiterleitung in EGF-stimulierten Astrozyten setzt sich folglich aus denselben Bausteinen zusammen, unabhängig vom genetischen Hintergrund.

**A****B****C****D**

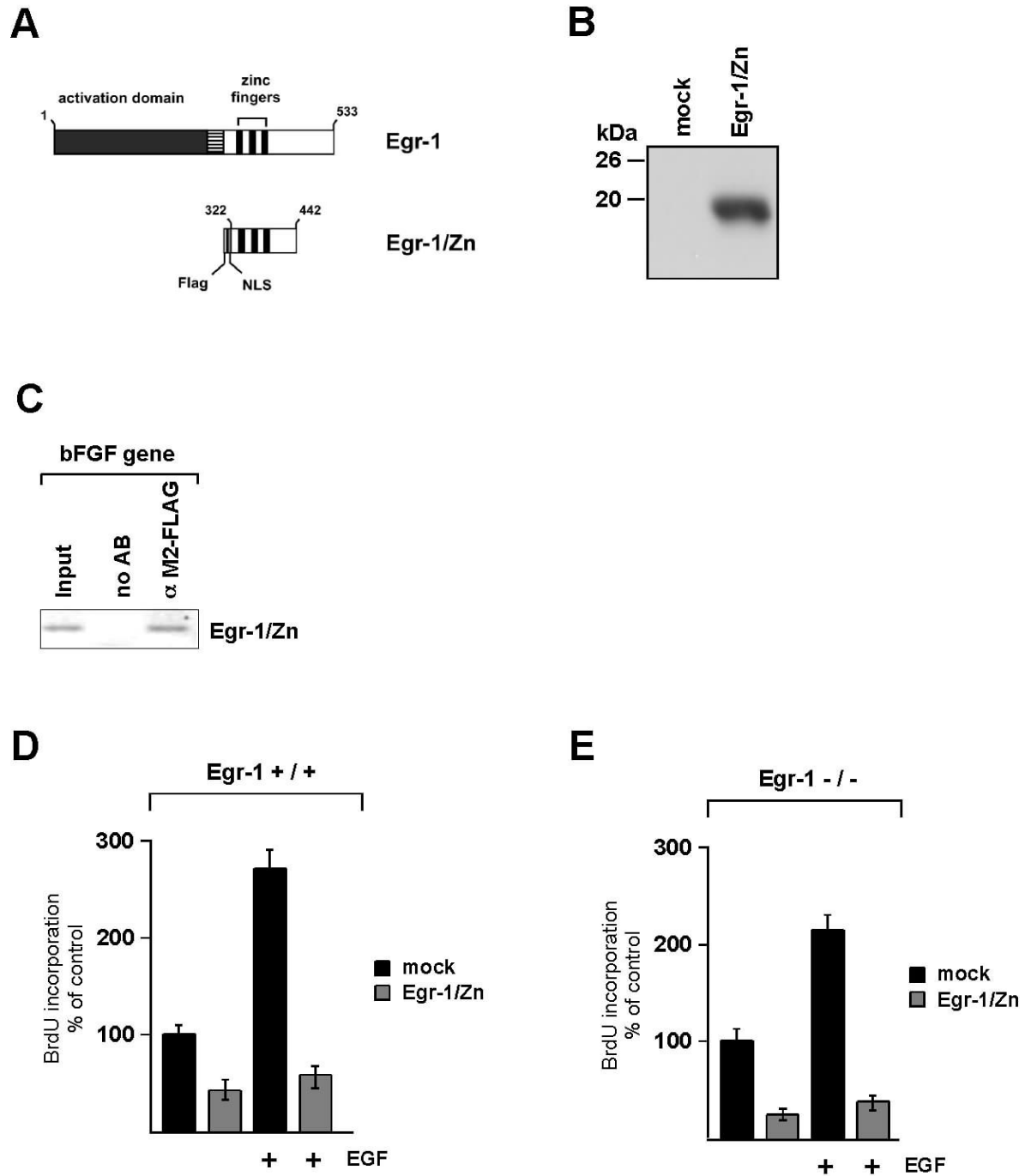
**E**

**Abbildung 55: Expression der MKP-1, oder dominant-negativen Mutanten des ternären Komplexfaktors Elk-1 oder von Raf verhindern die EGF-induzierte Proliferation von Astrozyten aus Egr-1-defizienten Mäusen.** Primäre Astrozyten aus Egr-1-defizienten Mäusen wurden entweder mit DA-Raf (A), MKP-1 (B), REST/Elk-1ΔC (C), PP2C (D) oder aber ATF2ΔN (E) kodierenden Lentiviren infiziert. Als Kontrolle dienen mock-infizierte Zellen. Die Induktion der DNA-Synthese wurde mittels BrdU-Inkorporation in die DNA bestimmt.

#### ***IV.4.7 Eine dominant-negative Mutante der Egr-Proteine verhindert das Wachstum von Astrozyten nach EGF-Stimulation***

Die bisherigen Ergebnisse könnten folgendermaßen interpretiert werden. Erstens: Egr-1 spielt keine Rolle in der Regulation der Astrozytenproliferation. Zweitens: Andere Mitglieder der Egr-Familie kompensieren den Verlust von Egr-1. Um die mögliche Kompensation der Funktionen zwischen den Egr-Familienmitgliedern aufzuheben wurden Astrozyten mit rekombinanten Lentiviren infiziert, die für eine dominant-negative Mutante von Egr-1 kodierten. Die Mutante Egr-1/Zn beinhaltet nur noch die Zinkfinger-DNA-Bindedomäne von Egr-1 (Abbildung 56A). Die N-Terminale Aktivierungsdomäne sowie die Bindungsstelle für die transkriptionellen Repressor NAB1 und NAB 2 waren deletiert, so dass Egr-1/Zn zwar noch an die Egr-Konsensussequenz in den regulatorischen Regionen seiner Zielgene binden konnte, aber deren Transkription nicht mehr aktivierte. Aufgrund der starken Homologie der Egr-Proteine untereinander verhindert die Expression dieser Mutante auch die Bindung der anderen Familienmitglieder an die Egr-Konsensussequenz. Durch ChIP-Experimente wurde gezeigt, dass die Mutante Egr-1/Zn an sein Zielgen bFGF gebunden wurde (Abbildung 56C) und die Bindung von endogenem Egr-1 verhinderte (Abbildung 56D). Abbildung 56E und F

zeigen, dass die Expression der dominant-negativen Mutante von Egr-1 die EGF-induzierte Proliferation von Astrozyten sowohl aus Wildtyp- als auch aus Egr-1-defizienten Mäusen blockierte. Die Ergebnisse beweisen, dass die Egr-Proteine die Proliferation von Astrozyten regulieren. Die Funktion von Egr-1 wird nach dessen Verlust in Egr-1-defizienten Mäusen durch andere Egr-Proteine kompensiert.

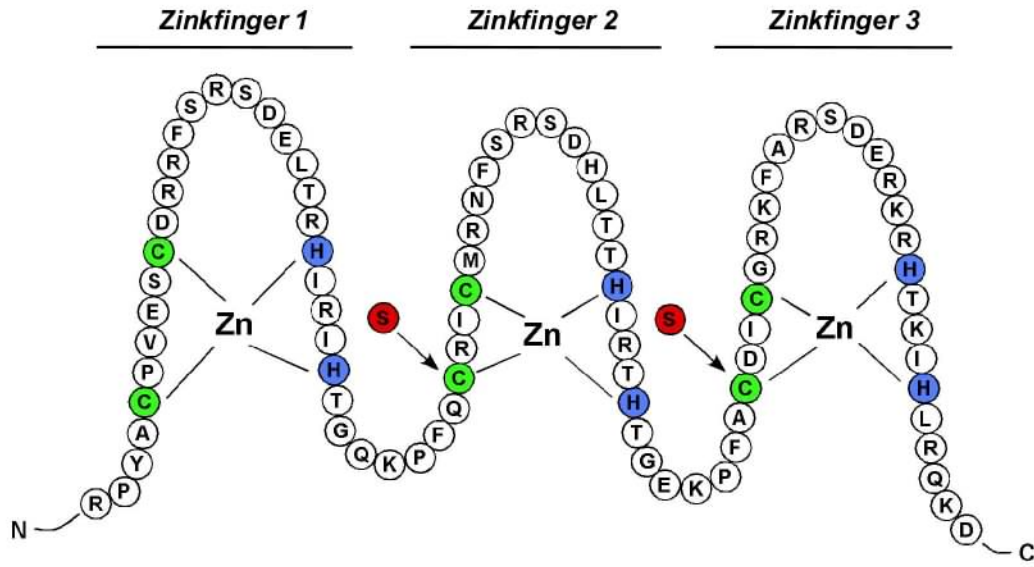


**Abbildung 56: Die Expression einer dominant-negativen Mutante von Egr-1 blockiert die EGF-induzierte Proliferation von Astrozyten.** **A.** Schematische Darstellung der modularen Struktur von Egr-1 und der dominant-negativen Mutante Egr-1/Zn. Angezeigt sind die N-terminale Aktivierungsdomäne und die Zinkfinger-DNA-Bindungsdomäne von Egr-1. **B.** Immunologischer Nachweis des Transgens. Astrozyten wurden mit Lentiviren infiziert, die für Egr-1/Zn kodieren. Als Kontrolle dienten mock-infizierte Zellen. Kernextrakte

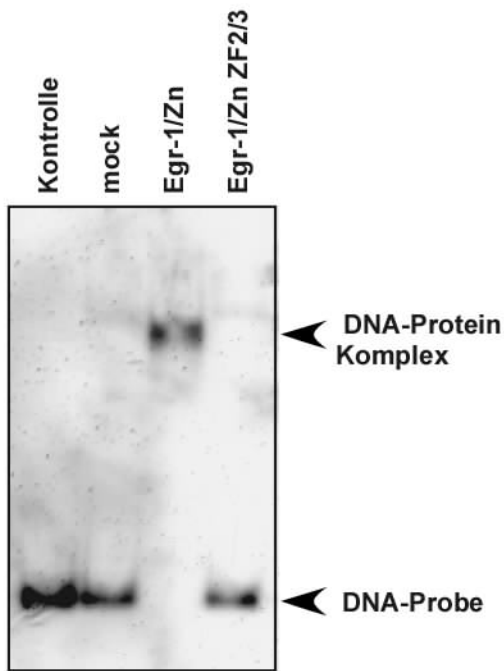
wurden präpariert und das Transgen mittels spezifischer Antikörper gegen das FLAG-Tag im Westernblot detektiert **C.** Die Egr-1 Mutante Egr-1/Zn bindet an die regulatorische Region des bFGF-Gens. Astrozyten wurden mit Lentiviren infiziert, die für Egr-1/Zn kodieren. ChIP-Experimente wurden mit M2-Agarose durchgeführt um selektiv die Flag-getaggte Mutante Egr-1/Zn zu präzipitieren. Die Immunpräzipitierten Fragmente wurden mit Primern amplifiziert, die die Egr-1 Bindestelle im bFGF Gen umspannen. Als Negativkontrolle diente Chromatin dem kein Antikörper zugesetzt wurde, als Positivkontrolle wurde nicht immunpräzipitiertes Gesamtchromatin amplifiziert. **D.** Die Egr-1 Mutante Egr-1/Zn verhindert die Bindung von Egr-1 an die regulatorische Region des bFGF-Gens. Astrozyten wurden mit Lentiviren infiziert die für Egr-1/Zn kodieren, als Kontrolle wurden mock-infizierte Zellen untersucht. Die Zellen wurden nach 24 h Serumentzug für eine Stunde mit EGF (10ng/ml) stimuliert. Die Immunpräzipitation erfolgte mit spezifischen Antikörpern gegen Egr-1. Die Immunpräzipitierten Fragmente wurden mit Primern amplifiziert, die die Egr-1 Bindestelle im bFGF Gen umspannen. Als Negativkontrolle diente Chromatin dem kein Antikörper zugesetzt wurde, als Positivkontrolle wurde nicht immunpräzipitiertes Gesamtchromatin amplifiziert. **E. F:** Astrozyten von Wildtyp (E) oder Egr-1-defizienten Mäusen (F) wurden entweder mock-infiziert oder aber mit Lentiviren infiziert, die für Egr-1/Zn kodieren. Die Zellen wurden mit EGF (10 ng/ml) stimuliert und die Induktion der DNA-Synthese mittels BrdU-Inkorporation gemessen.

ChIP-Experimente haben bewiesen, dass die dominant-negative Mutante von Egr-1 an das bFGF binden kann und dass sie fähig ist die Proliferation von EGF-stimulierten Astrozyten zu inhibieren. Um die Funktionalität und Spezifität der Mutante zu untersuchen wurde durch ortsspezifische Mutagenese im Zinkfinger 2 und Zinkfinger 3 ein Cystein durch ein Serin ausgetauscht. Dies führte zum der Verlust Bindungsfähigkeit der neugeschaffenen Mutante an die Egr-1 Bindestelle. Abbildung 57A zeigt die schematische Darstellung der Aminosäuresequenz der Egr-1 Zinkfinger; die ausgetauschten Aminosäuren sind rot markiert. Durch ein EMSA-Experiment konnte der Verlust der DNA-Bindungsfähigkeit der Mutante an die Egr-1 Bindestelle gezeigt werden (Abbildung 57B). Durch Mutagenese inhibierte Bindung der Egr-1/Zn-Mutante an die DNA der Zielgene resultierte in der Aufhebung der inhibitorischen Wirkung auf die Proliferation EGF-stimulierter Astrozyten (Abbildung 57D,E).

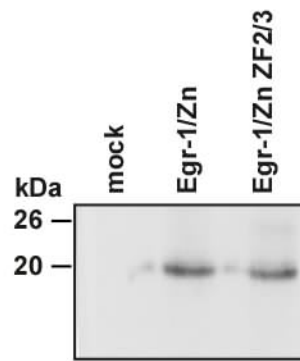
**A**

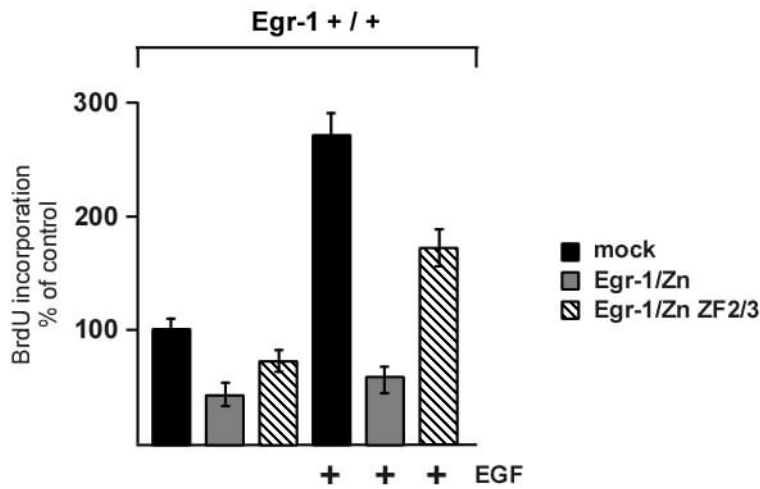
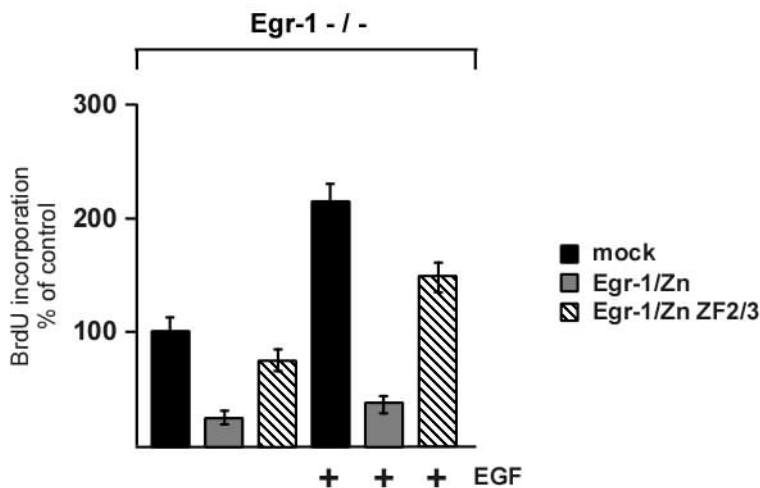


**B**



**C**



**D****E**

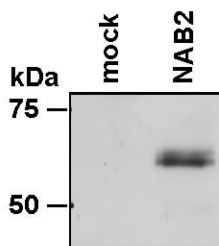
**Abbildung 57 Auswirkung des Verlustes der DNA-Bindungsfähigkeit der dominant-negativen Mutante von Egr-1.** **A.** Aminosäuresequenz der Zinkfinger-DNA-Bindungsdomäne von Egr-1. Cysteine und Histidine des Zinkfingerkomplexes sind farblich markiert. Die Mutationen sind rot markiert. **B.** Bindung der Egr-1 Mutanten an eine radioaktiv-markierte Probe, die vier Egr-1 Bindestellen beinhaltet. Als Negativkontrolle wurden mock-transfizierte Zellen untersucht. **C.** Immunologischer Nachweis der Transgene. **D. E.** Astrozyten von Wildtyp (D) oder Egr-1-defizienten Mäusen (E) wurden entweder mock-infiziert oder aber mit Lentiviren infiziert, die für Egr-1/Zn oder der Mutante Egr-1/Zn ZF2/3 kodieren. Die Zellen wurden mit EGF (10 ng/ml) stimuliert und die Induktion der DNA-Synthese mittels BrdU-Inkorporation gemessen.



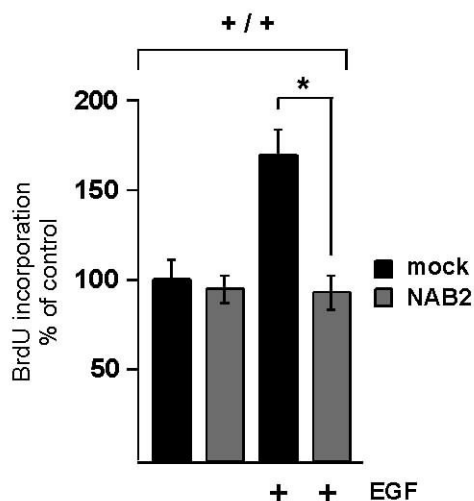
#### IV.4.8 Der Korepressor der Egr-Proteine NAB2 unterbindet die Proliferation von Astrozyten

Um den kompensatorischen Effekt der Egr-Proteine zu bestätigen wurde in Astrozyten der transkriptionelle Korepressor NAB2 exprimiert. NAB2 bindet nicht an die DNA sondern interagiert direkt mit Egr-1, Egr-2 und Egr-3, was zu einer verminderten Expression dieser Egr-Proteine führt. Egr-4 dagegen fehlt die NAB Bindedomäne. Die Expression von NAB2 in Astrozyten aus Wildtyp (B) und Egr-1-defizienten (C) Mäusen inhibierte die EGF-stimulierte Proliferation der Zellen (Abbildung 58 B, C). Folglich sind nur die Egr-Proteine 1,2 und 3 an der Regulation der Proliferation von Astrozyten beteiligt, da Egr-4 nicht durch NAB2 reguliert wird.

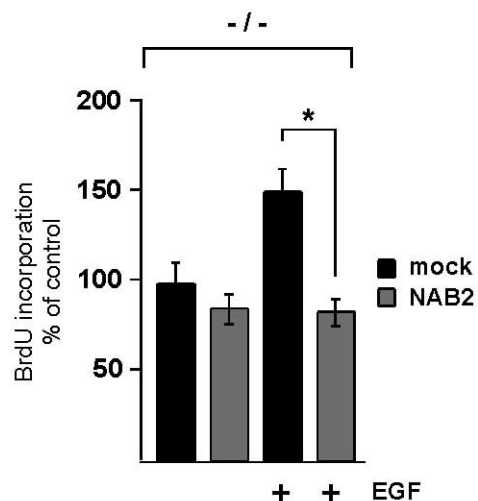
### A



### B



### C

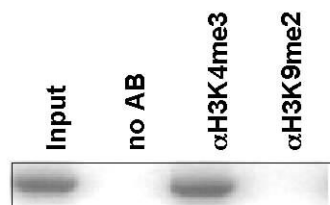


**Abbildung 58 Expression von NAB2 verhindert die Proliferation von Astrozyten.** A. Immunologischer Nachweis des Transgens. Astrozyten wurden mit Lentiviren infiziert, die für NAB2 kodieren. Als Kontrolle dienten mock-infizierte Zellen. Kernextrakte wurden präpariert und das Transgen mittels spezifischer Antikörper gegen den FLAG-Tag im Westernblot detektiert. B. C. Astrozyten von Wildtyp (B) und Egr-1-defizienten Mäusen (C) wurden entweder mock- oder aber mit Lentiviren infiziert die für NAB2 kodieren. Die Zellen wurden mit EGF (10 ng/ml) stimuliert und die Induktion der DNA-Synthese mittels BrdU-Inkorporation gemessen.

#### IV.4.9 Transaktivierung des *bFGF* Gens durch *Egr*-Proteine

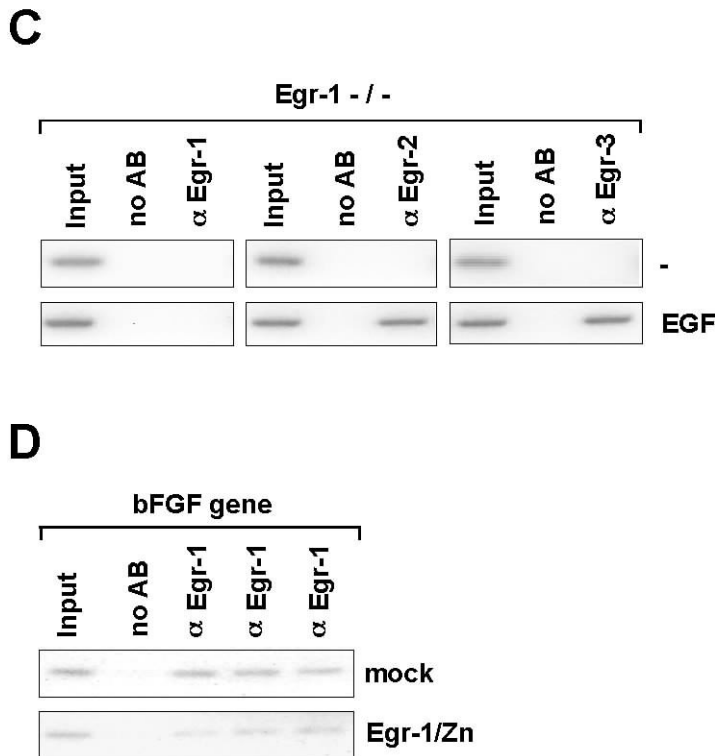
Die bisherigen Ergebnisse lassen darauf schließen, dass andere Mitglieder der *Egr*-Familie den Verlust von *Egr-1* in *Egr-1*-defizienten Mäusen kompensieren. Um diese Schlußfolgerung zu bestätigen, wurde die Stimulusinduzierte Bindung der *Egr*-Proteine an das *bFGF*-Gen untersucht. Dieses Gen liegt in einer offenen Konfiguration in Astrozyten vor, was sich daraus ableiten läßt, dass es in einen nukleosomalen Kontext eingebettet ist, in welchem das Histon H3 am Lysinrest 4 trimethyliert ist (Abbildung 59A). Daraufhin wurde mittels ChIP-Experimenten die Bindung der *Egr*-Proteine 1-3 an das *bFGF*-Gen untersucht und festgestellt, dass in aus Wildtyp-Mäusen gewonnenen Astrozyten nach EGF-Stimulation alle drei *Egr*-Proteine an das *bFGF*-Gen gebunden wurden (Abbildung 59B). In Astrozyten aus *Egr-1*-defizienten Mäusen dagegen konnte nur die Bindung von *Egr-2* und *Egr-3* an das *bFGF*-Gen gezeigt werden (Abbildung 59C). Die Expression der dominant-negativen Mutante von *Egr-1*, dem *Egr-1/Zn*, inhibiert die Bindung der *Egr*-Proteine an das *bFGF*-Gen (Abbildung 59D).

**A**



**B**





**Abbildung 59: ChIP-Experimente zeigen, dass Egr-1, Egr-2 und Egr-3 an das bFGF Gen bindet. A.** Epigenetische Konfiguration des bFGF-Gens in Astrozyten. **B.** Bindung von Egr-1, Egr-2 und Egr-3 unter physiologischen Bedingungen an das bFGF-Gen. **C.** Bindung von Egr-2 und Egr-3 an die regulatorische Region des bFGF-Gens in Astrozyten die aus Egr-1-defizienten Mäusen gewonnen wurde. **D.** Verminderte Bindung von Egr-1-3, wenn durch lentiviralen Gentransfer die Mutante Egr-1/Zn exprimiert wurde. Ein ChIP-Experiment wurde mit Chromatin durchgeführt das entweder aus EGF-stimulierten oder unstimulierten Zellen gewonnen wurde. Die Immunpräzipitierung erfolgte mit spezifischen Antikörpern gegen Egr-1, Egr-2 oder Egr-3. Die präzipitierten DNA-Fragmente wurden mittels Primern amplifiziert, die die Egr-1 Bindestelle im bFGF-Promotor umspannen.

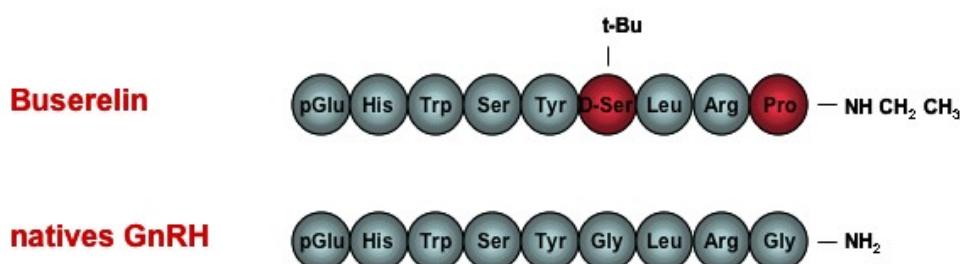
## V. Diskussion

Der Zinkfingertranskriptionsfaktor Egr-1 wird durch eine Vielzahl unterschiedlicher Stimuli aktiviert (Thiel & Cibelli, 2002; Rössler, et al., 2006). Dazu gehören Wachstumsfaktoren, Stresssignale durch Strahlung, Gewebsverletzung, Infektion, Hypoxie und Ischämie oder Membranpotentiale. Die Diversität der Aktivierungsmöglichkeiten der Egr-1 Expression spiegelt sich ebenso in der Rezeptorvielfalt wie auch in den Signalwegen wieder. Um die Signaltransduktion und Zielgene von Egr-1 näher zu beleuchten habe ich mich auf die Betrachtung dieser Vorgänge im endokrinen System und in Astrozyten beschränkt. Einblicke in den Einfluss von GPCR konnte durch den Einsatz von Buserelin und Carbachol zur Stimulation des GnRH- sowie des muskarinischen  $M_3$ - Acetylcholinrezeptor der Hypophysenzelllinie  $\alpha T3M3$  erreicht werden. Die Rolle von L-Typ  $Ca^{2+}$ -Kanälen konnte in  $\beta$ -Zellen des Pankreas studiert werden, die entweder mit Glukose, Tolbutamid, KCl oder aber dem Steroidhormon PregS stimuliert wurden.

### **Gonadotrope Hypophysenzellen ( $\alpha T3-1$ )**

In dieser Arbeit wurden unter anderem die Mechanismen untersucht, welche durch Stimulation des GnRH Rezeptors in einer Hypophysenzelllinie ( $\alpha T3-1$ ), die endogene GnRH-Rezeptoren exprimiert (Windle et al., 1990), eine Aktivierung der Egr-1 Biosynthese ermöglichen. Außerdem erlaubte die Verwendung von Zellen, die zusätzlich einen rekombinanten muskarinischen  $M_3$  Acetylcholinrezeptor exprimieren ( $\alpha T3M3$ ), die Signalwege und die Regulation der Egr-1 Aktivierung durch zwei Typen von  $G\alpha_{q/11}$  gekoppelten Rezeptoren zu vergleichen. Das Dekapeptid „Gonadotropin-Releasing Hormone“ (GnRH) ist der Hauptregulator in der neuroendokrinen Kontrolle der Reproduktion. Es stimuliert die *de novo* Synthese und Sekretion von Gonadotropinen aus der Hypophyse. GnRH wird vom Hypothalamus sezerniert und bindet an membranständige, heptahelikale Rezeptoren in gonadotropen Zellen der Hypophyse. Diese Rezeptoren sind bevorzugt mit  $G\alpha_{q/11}$  gekoppelt. Die Bindung von GnRH führt folglich zur Aktivierung von Phosphoinositol- und  $Ca^{2+}$ -Signalen und anderen wichtigen Signalmolekülen einschließlich der ERK-Signalkaskade (Caunt et al., 2006; Dobkin-Bekman et al., 2006). Die Stimulation von GnRH Rezeptoren verändert somit das Genexpressionsmuster von gonadotropen Hypophysenzellen und aktiviert die Transkriptionsfaktoren Egr-1, c-Jun und c-Fos

(Halvorson et al., 1999; Tremblay & Drouin, 1999; Wolfe & Call, 1999; Mulvaney & Roberson, 2000; Liu et al., 2002; Duan et al., 2002; Zhang & Roberson, 2006). Die Bedeutung von Egr-1 in der Hypophyse zeigt sich alleine schon in den Konsequenzen, die der Knock-out des Egr-1 Gens in Mäusen hat. Der Hypophysenvorderlappen von Egr-1 defizienten Mäusen besitzt eine geringere Größe was mit einer verringerten Anzahl Wachstumshormon-positiver Zellen assoziiert ist. Des Weiteren ist die Expression des luteinisierenden Hormons komplett inhibiert (Lee et al., 1996; Topilko et al., 1997). Folglich ist die Expression von Egr-1 Zielgenen essentiell für das Überleben und die Funktion der Zellen innerhalb des Vorderlappens, einschließlich der gonadotropen Hypophysenzellen die eine zentrale Rolle in der Kontrolle der Fertilität spielen. Das Ziel meiner Untersuchung war es zwei Signalkaskaden in gonadotropen Hypophysenzellen zu untersuchen, die beide mit  $G\alpha_{q/11}$ -gekoppelten Rezeptoren verbunden sind. Es wurden schon eine Vielzahl an Signalmolekülen entdeckt, die nötig sind, eine GnRH-Rezeptorstimulation mit einer gesteigerten Egr-1 Expression zu verbinden (Tremblay & Drouin, 1999; Duan et al., 2002). Trotzdem ist die Beschreibung des Signalwegs bei weitem noch nicht vollständig. Durch diese Arbeit konnten neue Verbindungen geschaffen werden indem die Vorgänge im Nukleus näher betrachtet wurden. Zusätzlich wurden Egr-1 Zielgene identifiziert, die aufgrund einer Buserelin- oder Carbacholstimulation von gonadotropen Hypophysenzellen exprimiert werden. Das in der Arbeit verwendete GnRH-Analogon unterscheidet sich in 2 Aminosäuren vom nativen GnRH. Die chemische Abwandlung führt zu einer erhöhten Resistenz gegen den enzymatischen Abbau durch Peptidasen und zu einer lang anhaltenden Gonadotropinfreisetzung bei wesentlich verringerter Wirkstoffdosis gegenüber GnRH. Buserelin ist hundert- bis zweihundertfach wirksamer als natürliches GnRH.



**Abbildung 60 Vergleich der Aminosäuresequenz von nativem GnRH zu seinem Analogon Buserelin.** Die Aminosäure Glycin an Position 6 wurde gegen t-Butyl-D-Serin ausgetauscht und das C-terminale Glycin entfernt und der C-Terminus als Ethylamid geschützt.

## **β-Zellen des Pankreas**

Eine erhöhte Glukosekonzentration gehört zum Hauptstimulus für eine Sekretion von Insulin und hat zudem noch grundlegende Effekte auf die Gentranskription. Mikroarraystudien haben aufgedeckt, dass mehr als 90 Gene in MIN6 Zellen nach Glukosestimulation aktiviert werden (Ohsugi et al., 2004). Deshalb war ich an der Aufklärung der Mechanismen der selektiven Gentranskription, als Folge von Stimulation der Zelle, interessiert. Ziel der Untersuchung war es die Signalwege zu entschlüsseln, die durch Glukose, Tolbutamid oder KCl induziert werden und zur Egr-1 Biosynthese führen. Die Behandlung der MIN6 Zellen mit Glukose, Tolbutamid oder KCl führt zu einem gesteigerten  $\text{Ca}^{2+}$ -Influx über die Öffnung von L-Typ  $\text{Ca}^{2+}$ -Kanälen. So erlaubte dieses Modellsystem die Untersuchung, wie der  $\text{Ca}^{2+}$ -Einstrom in die Zelle mit einer gesteigerten Transkription des Egr-1 Gens zusammenhängt.

Auch eine Stimulation von β-Zellen mit dem Steroidhormon PregS führt zur Sekretion von Insulin (J. Oberwinkler et al., unveröffentlichte Daten). Die notwendige Depolarisierung der Membran, die zum  $\text{Ca}^{2+}$ -Einstrom über L-Typ- $\text{Ca}^{2+}$ -Kanäle führt, erfolgt über die Aktivierung des TRPM3-Kanals durch PregS. PregS operiert als starkes Neurosteroid im Hirn, indem es die Übertragung verschiedenster Stimuli von Neuron zu Neuron moduliert und dabei in starkem Maße Lern- und Gedächtnisprozesse beeinflusst (Flood et al., 1992; Flood et al., 1995; Vallee et al., 1997; Tsutsui et al., 2000). PregS wirkt als positiver Modulator der NMDA-Rezeptoren (Wu et al., 1991) und als negativer Modulator für GABA-Rezeptoren (Majewska & Schwartz, 1987; Akk et al., 2001). Daraus ergibt sich auch die aktivitäts- und gedächtnissteigernde Wirkung von PregS. Zudem ist ein Mangel an Pregnenolon oder PregS mit psychischen Krankheiten wie Depressionen (George et al., 1994), Angststörungen (Bicikova et al., 2000; Semeniuk et al., 2001) oder auch Schizophrenie (Marx et al., 2006; Ritsner et al., 2007) assoziiert. Bislang wurden jedoch keine Studien über die Wirkung von PregS auf β-Zellen des Pankreas veröffentlicht. Die Entdeckung, dass eine PregS-Stimulation der β-Zelllinie INS-1 zur Biosynthese von Egr-1 führt und die anschließende Untersuchung der Zielgene von Egr-1 geben Hinweise auf die möglichen Effekte einer Steroidhormonstimulation auf den Pankreas.

## V.1 Signaltransduktion

### V.1.1 Kinetik der Stimulusinduzierten Egr-1 Expression

Tabelle 6 zeigt die Zellsysteme und Stimuli die zur Expression des Egr-1 Gens in dieser Arbeit verwendet wurden. Als Stimulusinduzierter Transkriptionsfaktor wird Egr-1 transient induziert. Die Zeitverläufe der Egr-1 Expression sind, unabhängig vom verwendeten Stimulus, nahezu identisch. Bereits nach einer halben Stunde kann man geringe Mengen Egr-1 im Westernblot nachweisen. Das Maximum der Expression wird schließlich nach einer Stunde erreicht und fällt anschließend ab bis nach maximal 5 Stunden kein Egr-1 mehr detektierbar ist.

Zelltyp	Stimulus	Rezeptor
Gonadotrope Hypophysenzellen ( $\alpha$ T3-1, $\alpha$ T3M3)	Buserelin	$G\alpha_{q/11}$ -gekoppelter Rezeptor
Gonadotrope Hypophysenzellen ( $\alpha$ T3M3)	Carbachol	$G\alpha_{q/11}$ -gekoppelter Rezeptor
$\beta$ -Zellen des Pankreas MIN6	Glukose Tolbutamid KCl	L-Typ $Ca^{2+}$ -Kanäle
$\beta$ -Zellen des Pankreas INS-1	Pregnenolonsulfat	L-Typ $Ca^{2+}$ -Kanäle
Astrozyten	EGF	Rezeptortyrosinkinase

**Tabelle 6:** Übersicht der extrazellulären Stimuli die in unterschiedlichen Zellsystemen zur Egr-1 Expression führen.

### ***V.1.2 Bedeutung membranständiger Effektormoleküle***

In Neuronen des Hypothalamus und in  $\alpha$ T3-1 Zellen führt die Stimulation von GnRH-Rezeptoren zur Transaktivierung des EGF-Rezeptors (Grosse et al., 2000; Shah et al., 2003; Shah et al., 2006). Um die Funktion des EGF-Rezeptors in den Buserelin- oder Carbachol induzierten Signalkaskaden zu untersuchen wurden die Zellen mit dem Tyrosinkinaseinhibitor AG1478 präinkubiert. Die Versuche zeigten, dass der EGF-Rezeptor ein wichtiger Bestandteil der Carbachol-induzierten Signalkaskade ist, welcher zur Aktivierung des Egr-1 Gens führt. Die Buserelin-induzierte Egr-1 Biosynthese wurde durch den Einsatz des Inhibitors nur wenig gehemmt, was auf eine weniger tragende Rolle des EGF-Rezeptors in der Signalweiterleitung hinweist.

In Glukose, Tolbutamid oder KCl-stimulierten MIN6 Zellen hatte die Verwendung des Tyrosinkinaseinhibitors keinerlei Effekt auf die Transkription des Egr-1 Gens. In MIN6 Zellen wird Egr-1 folglich rezeptorunabhängig induziert. Im Gegensatz dazu führt eine Stimulation von  $\beta$ -Zellen mit GLP-1 (glucagon like peptid 1) zur Transaktivierung des EGF-Rezeptors (Buteau et al., 2003).

Oberwinkler et al. (unveröffentlichte Daten) haben kürzlich einen spezifischen Liganden des TRPM3-Kanals gefunden. Die TRP-Kanäle sind Ionenkanäle und TRPM3 im speziellen ist spezifisch für  $\text{Ca}^{2+}$ -Ionen. PregS-Stimulation von INS-1 Zellen bewirkt einen  $\text{Ca}^{2+}$ -Einstrom in die Zelle über den TRPM3-Kanal, was eine Depolarisation der Membran nach sich zieht, welche wiederum das Öffnen von spannungsabhängigen  $\text{Ca}^{2+}$ -Kanälen bewirkt (Oberwinkler et al., unveröffentlichte Daten). Durch Verwendung einer spezifischen TRPM3 shRNA konnte der Einfluss dieses Kanals auf die Egr-1 Biosynthese nach PregS-Stimulation ausgeschlossen werden. Der Anstieg der intrazellulären  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration wird alleine durch L-Typ- $\text{Ca}^{2+}$ -Kanäle gewährleistet.

### ***V.1.3 Einfluss von $\text{Ca}^{2+}$ -Ionen auf die Stimulusinduzierte Egr-1 Biosynthese***

$\text{Ca}^{2+}$  ist einer der wichtigsten „second messenger“ der intrazellulären Signalübertragung. Aufgrund dieser zentralen Stellung liegt es nahe, dass auch die stimulusinduzierte Egr-1 Expression durch Änderung der intrazellulären  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentrationen vermittelt wird. Stimulation des GnRH- und des muskarinischen M3 Rezeptors führt zur Aktivierung der Phospholipase C, der Generierung von  $\text{IP}_3$  und dadurch zur Freisetzung von  $\text{Ca}^{2+}$ -Ionen ins



Zytosol über Aktivierung von  $IP_3$ -Rezeptoren des endoplasmatischen Retikulums. Es gibt unterschiedliche Strategien um den Einfluss von  $Ca^{2+}$  auf die Egr-1 Biosynthese zu untersuchen. Durch den Einsatz der membranpermeablen Verbindung BAPTA-AM kann man selektiv die intrazelluläre  $Ca^{2+}$ -Konzentration senken. EGTA wirkt als Chelator von freien  $Ca^{2+}$  im Extrazellularraum. Die Substanzen Nifedipin und Verapamil blockieren selektiv L-Typ  $Ca^{2+}$ -Kanäle und verhindern so den  $Ca^{2+}$ -Einstrom in die Zelle aus dem Extrazellularraum. Unabhängig vom Stimulus wurde in allen verwendeten Zelllinien die Biosynthese von Egr-1 und ATF3 inhibiert, wenn intrazelluläres  $Ca^{2+}$  durch BAPTA-AM cheliert wurde. Es wurde schon beschrieben, dass ein erhöhter  $Ca^{2+}$ -Spiegel innerhalb der Zelle für die GnRH-Signaltransduktion essentiell ist (Reiss et al., 1997; Mulvaney & Roberson, 2000). Auch nach Glukose, Tolbutamid oder KCl Stimulation konnte ein Anstieg der intrazellulären  $Ca^{2+}$ -Konzentration durch Öffnung spannungsabhängiger  $Ca^{2+}$ -Kanäle gezeigt werden (Bernal-Mizrachi et al., 2000). Die Verwendung des  $Ca^{2+}$ -Chelators BAPTA-AM erlaubt allerdings keine Auskunft über das Kompartiment aus dem die  $Ca^{2+}$ -Ionen zur Verfügung gestellt wurden. Deshalb wurde in MIN6 und INS-1 Zellen zusätzlich der Einfluss der L-Typ  $Ca^{2+}$ -Kanäle auf die Egr-1 Expression durch den Einsatz des  $Ca^{2+}$ -Kanalblockers Nifedipine untersucht. Sowohl nach Stimulation von MIN6 Zellen mit Glukose, Tolbutamid oder KCl, als auch nach Stimulation von INS-1 Zellen mit PregS, konnte der Einsatz von Nifedipine die Egr-1 Biosynthese verhindern. Folglich sind im Falle der  $\beta$ -Zellen des Pankreas der Einstrom von extrazellulärem  $Ca^{2+}$  durch L-Typ- $Ca^{2+}$ -Kanäle für die Egr-1 Transkription von essentieller Bedeutung. In INS-1 Zellen konnte dies weiter bestätigt werden, da auch die Inkubation der Zellen mit EGTA oder Verapamil zum selben Ergebnis führten. Zusammenfassend kann man sagen, dass die Aktivierung von  $G\alpha_{q/11}$ -gekoppelten Rezeptoren durch Buserelin oder Carbachol die Egr-1 Biosynthese durch die Freisetzung von  $Ca^{2+}$ -Ionen aus dem ER induziert. Eine Stimulation von  $\beta$ -Zellen des Pankreas mit Glukose, Tolbutamid, KCl oder PregS aktiviert hingegen die Transkription des Egr-1 Gens durch  $Ca^{2+}$ -Influx durch L-Typ- $Ca^{2+}$ -Kanäle.

#### ***V.1.4 Die Bedeutung $Ca^{2+}$ -abhängiger PKC-Isoenzyme***

Die Freisetzung von  $Ca^{2+}$  aus dem ER kann einerseits zur Transaktivierung des EGF-Rezeptors führen, andererseits auch zur Aktivierung der PKC. In  $\alpha T3$ -1 Zellen wurde gezeigt, dass GnRH über die Aktivierung der PKC, die Biosynthese von Egr-1 einleiten kann (Duan et al., 2002). In INS-1 Zellen dagegen hatte der Einsatz von PKC-Inhibitoren wie GF109203X

keinerlei Einfluss auf die Glukose-induzierte ERK Aktivierung (Arnette et al., 2003). Deshalb gingen die Autoren davon aus, dass es keinerlei Hinweis auf einen Einfluss konventioneller PKC-Isoformen auf die Signalkaskade gibt, die zur glukosevermittelten ERK-Aktivierung führt. Jedoch kam es zu einer konzentrationsabhängigen Inhibierung der ERK-Aktivierung nach einer Präinkubation von MIN6 Zellen mit RO31-8220, einem anderen Bisindoylmalemid-Derivat (Benes et al., 1998), was darauf hinweist, dass eine Aktivierung von PKC-Isoformen sehr wohl benötigt wird um ERK nach Glukosestimulation zu aktivieren. Dagegen sollte die KCl-induzierte ERK-Aktivierung unabhängig von der PKC verlaufen (Benes et al., 1998). In dieser Arbeit konnte der Einfluß der PKC auf die Biosynthese von Egr-1 bestätigt werden. Die Inhibierung der  $\text{Ca}^{2+}$ -sensitiven PKC-Isoformen blockierte sowohl die Buserelin- oder Carbachol-induzierte Egr-1 Expression in gonadotropen Hypophysenzellen als auch die Biosynthese von Egr-1 in Glukose, Tolbutamid oder KCl-stimulierten  $\beta$ -Zellen des Pankreas.

Ein Anstieg der intrazellulären  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration kann über Stimulation der PKC die Raf-Kinase aktivieren (Kolch, et al., 1993). Die PKC phosphoryliert Raf entweder direkt oder nutzt einen indirekten Weg über die Blockierung des Raf Kinase Inhibitory Proteins (Corbit et al., 2003). Über die Expression einer dominant-negativen Mutante von Raf konnte in INS-1 Zellen gezeigt werden, dass die Egr-1 Expression nach PregS Stimulation Raf-abhängig ist.

### ***V.1.5 Regulation der Egr-1 Genexpression durch die ERK-Kinasen***

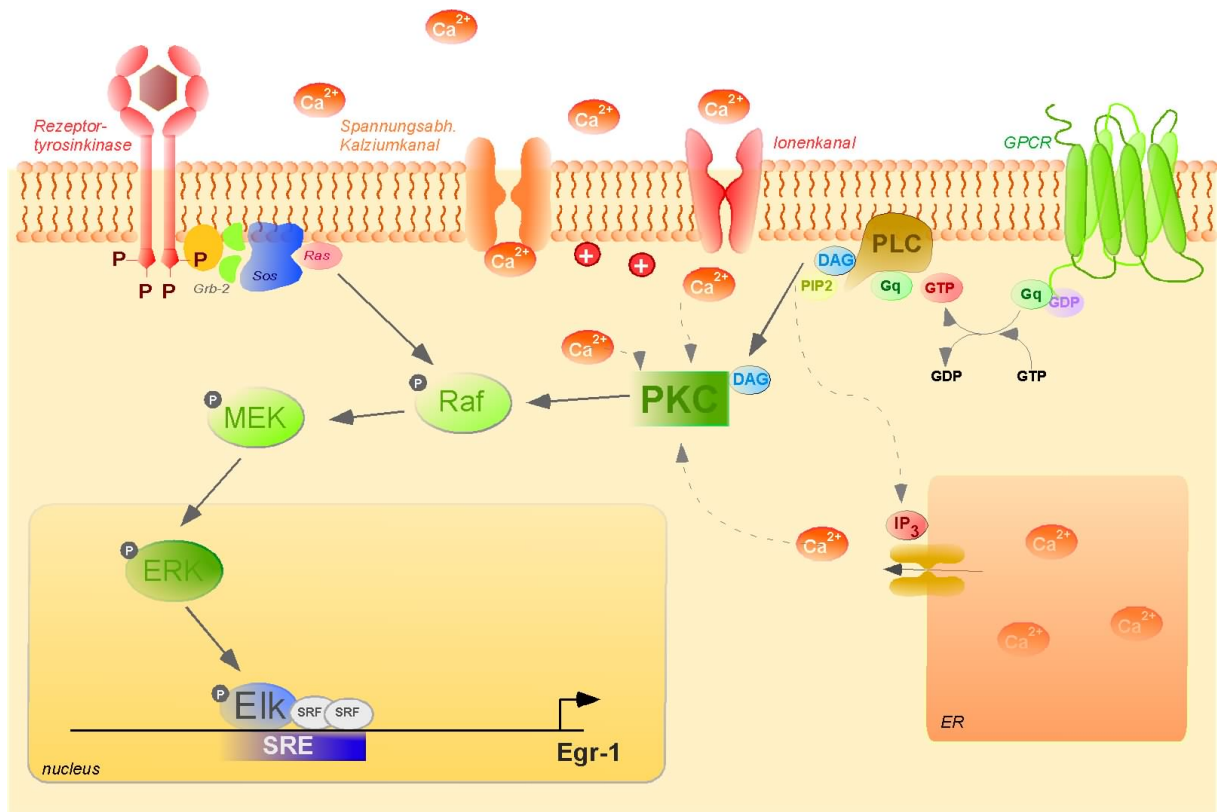
Eine ERK-Aktivierung gehört zu einer der Hauptstimulatoren für die Induktion der Egr-1 Gentranskription in den unterschiedlichsten zellulären Systemen (Rössler et al., 2006), sodass die Signalkaskade, die zur Egr-1 Biosynthese führt, möglicherweise auch in den untersuchten Zellen von einer Aktivierung von ERK abhängt. Jedoch hatte eine Präinkubation von  $\beta$ TC6-F7 Insulinomazellen mit PD98059 keine signifikanten Auswirkungen auf die Glukose induzierte Egr-1 mRNA Synthese (Bernal-Mizrachi et al., 2000). Dies würde einen Einfluss von ERK auf die Egr-1 Expression in Glukose stimulierten Zellen ausschließen. Deshalb wurde ein großer Einfluss der Proteinkinase A und der  $\text{Ca}^{2+}$ /Calmodulin-abhängigen Proteinkinasen angenommen. Jedoch zeigen die Experimente dieser Arbeit klar und deutlich, dass eine Inhibierung der ERK-Aktivierung in Glucose, Tolbutamid oder KCl stimulierten MIN6 Zellen auch zur Inhibierung der Egr-1 Biosynthese führte. Zusätzlich blockierte eine Überexpression der MKP-1, die Stimulusabhängige Egr-1 Biosynthese. Zielproteine der

Phosphatase MKP-1 sind ERK, p38 und JNK, nicht jedoch die PKA, so dass ein Einfluss der PKA auf die Expression von Egr-1 ausgeschlossen werden konnte. Basierend auf der Beobachtung, dass eine Überexpression der Ca<sup>2+</sup>/Calmodulin-abhängigen Proteinkinase IV zu einer gesteigerten Transkription eines GAL4-Elk-1 Fusionsproteins führte, wurde vorgeschlagen, dass diese Kinase Elk-1 in Insulinomazellen über den ERK-Signalweg aktiviert (Bernal-Mizrachi et al., 2001). Die hier gezeigten Ergebnisse, insbesondere die Präinkubation mit PD98059 und die Überexpression der MKP-1, schließen eine Rolle der Ca<sup>2+</sup>/Calmodulinabhängigen Proteinkinase IV in diesem Signalweg aus. Basierend auf diesen Resultaten muss die Ca<sup>2+</sup>/CaM-Proteinkinase IV eine Funktion oberhalb der MAP Kinase Kinase bestreiten, wenn sie überhaupt einen Einfluss auf diesen Signalweg hat. Allerdings gibt es darauf keinerlei Hinweise (Bernal-Mizrachi et al., 2001). Vielmehr steht diese Aussage ebenfalls im Konflikt mit der Tatsache, dass die Ca<sup>2+</sup>/CaM-Proteinkinase IV im Zellkern exprimiert wird. Daraus kann man schließen, dass in MIN6 Zellen eine gesteigerte Egr-1 Expression nach Glukose, Tolbutamid oder KCl- Induktion auf einer Signalkette basiert, die Ca<sup>2+</sup>-Einstrom, PKC und ERK einschließt. Zusätzlich konnte über die Generierung einer Zelllinie, die stabil ein Fusionsprotein aus Raf und dem Östrogenrezeptor exprimiert, gezeigt werden, dass der ERK-Signalweg für die Egr-1 Expression unabdingbar ist. Auch in  $\alpha$ T3-1- und INS-1 Zellen führte eine Stimulation der Zellen zur Aktivierung des ERK-Signalwegs. Der ERK-Signalweg ist also unabhängig von der Art des Stimulus und des Zelltyps eine der wichtigsten Komponenten der zur Egr-1 Biosynthese führt. In der Buserelin-stimulierten ATF3-Biosynthese dagegen zeigte sich, dass nicht ausschließlich eine Aktivierung der ERK-Kinase sondern auch des JNK-Signalwegs, eine maßgebliche Rolle spielt. Dies konnte sowohl durch lentiviral-vermittelte Expression der MKP-1 und 5, als auch durch die Verwendung des JNK-Inhibitors L-JNK1 bewiesen werden. In TNF $\alpha$ -induzierten vaskulären Endothelzellen wurde die ATF3 Biosynthese ebenfalls über ERK und JNK reguliert (Inoue et al., 2004). Im Gegensatz dazu war in Anisomycin-induzierten HeLa Zellen weder eine Aktivierung von JNK noch ERK für die ATF3 Biosynthese nötig (Lu et al., 2007). Folglich hängt die intrazelluläre Signalkaskade die zur ATF3 Biosynthese führt sowohl vom Stimulus als auch vom Zelltyp ab.

### ***V.1.6 Der ternäre Komplexfaktor Elk-1 reguliert die Egr-1 Expression***

Im Nukleus verbindet der ternäre Komplexfaktor Elk-1 die ERK-Signalkaskade mit der SRE vermittelten Gentranskription. Elk-1 bindet sowohl an die DNA als auch an den SRF um eine

biologische Aktivität zu erreichen. Die transkriptionelle Aktivität von Elk-1 hängt von seinem Phosphorylierungsstatus ab. Elk-1 wird durch mehrere Proteinkinasen phosphoryliert, unter anderem durch JNK und ERK, was zur Verstärkung der DNA-Bindung, zur Formierung des ternären Komplexes und zur SRE-vermittelten Transkription führt (Marais et al., 1993). Der Egr-1 Promotor enthält 5 dieser SRE's, die die Konsensussequenz CC[A/T]<sub>6</sub>GG besitzen. Zusätzlich befinden sich mehrere Bindestellen für den ternären Komplexfaktor in direkter Nachbarschaft zu den SRE, die die Ets Konsensuskernsequenz GGAA/T besitzen. Der transkriptionellen Aktivierung von Egr-1 geht häufig die Aktivierung von Elk-1 voraus, was darauf hinweist, dass die SRE's innerhalb des Egr-1 Promotors die signalinduzierte Aktivierung der Egr-1 Gentranskription vermitteln. Beispielsweise wurde in stimulierten glutamatergen corticostratial Neuronen eine strikte Raum-zeitliche Verbindung zwischen Elk-1 und der Egr-1 mRNA Synthese gezeigt (Sgambato et al., 1998). In der Tat wurde auch schon gezeigt, dass GnRH die Phosphorylierung von Elk-1 in  $\alpha$ T3-1 Zellen induziert (Duan et al., 2002). Auch eine Stimulation von MIN6 Zellen mit Glukose, Tolbutamid oder KCl bewirkte eine Phosphorylierung von Elk-1 (Bernal-Mizrachi et al., 2001). Diese Daten wurden nicht nur durch die Ergebnisse dieser Arbeit bestätigt, es konnte zudem gezeigt werden, dass Elk-1 unter physiologischen Bedingungen an die regulatorische Regionen im Egr-1 Gen gebunden wurde, wenn MIN6 Zellen mit Glukose, Tolbutamid oder KCl stimuliert wurden oder wenn in  $\alpha$ T3 Zellen die Stimulation mit Buserelin oder Carbachol erfolgte. In unstimulierten Zellen konnte keine Bindung von Elk-1 nachgewiesen werden. Schließlich konnte die Schlüsselrolle von Elk-1 für die stimulusabhängige Egr-1 Expression durch ein „loss-of-funktion“ Experiment bewiesen werden. Die Expression einer dominant-negativen Mutante von Elk-1 enthüllte, dass die Aktivierung des ternären Komplexfaktors die Stimulation der Zellen mit einer gesteigerten Egr-1 Biosynthese verband. Abbildung 61 zeigt eine Übersicht der rezeptorvermittelten Signalwege, die zur Aktivierung der Egr-1 Expression führen.



**Abbildung 61: Überblick über die rezeptorvermittelte Aktivierung der Egr-1 Transkription.** Die Bindung von EGF an seinen Rezeptor führt zur Dimerisierung des Rezeptors und Aktivierung der Tyrosinkinasefunktion. Über mehrere Adapterproteine (Grb-2, Sos) kommt es zur Aktivierung von Ras. Dieses monomere G-Protein aktiviert wiederum über die Raf Kinase, MEK und darüber die ERK-Signalkaskade. Phosphoryliertes ERK aktiviert im Zellkern den ternären Komplexfaktor Elk-1, der die SRE-vermittelte Induktion der Egr-1 Expression auslöst. Die Aktivierung eines GPCR durch seinen spezifischen Liganden führt zur G-Protein vermittelten Aktivierung der PLC. Die PLC spaltet PIP2 in IP3 und DAG, wobei DAG direkt zur Aktivierung der PKC führt, IP3 die Aktivierung über die Freisetzung von Kalziumionen aus dem ER vermittelt. Die PKC aktiviert ihrerseits direkt oder indirekt die Raf-Kinase und letztendlich über die Aktivierung des ERK-Signalwegs die Biosynthese von Egr-1. Der durch Aktivierung von Ionenkanälen verursachte Einstrom extrazellulären Kalziums in die Zelle führt zur Aktivierung von kalziumsensitiven PKC-Isoformen. Über die Aktivierung von Raf-MEK-ERK wird die Transkription des Egr-1 Gens durch Bindung von Elk-1 an die SRE induziert.

### V.1.7 Stimulusabhängiger Einfluss von bZIP-Proteinen auf die Egr-1

#### Expression

Eine Aktivierung des ERK-Signalwegs kann nicht nur in der Stimulation der Elk-1 Aktivität resultieren, es kann ebenso die transkriptionelle Aktivität von CREB und ATF1 erhöhen (Deak et al., 1998; Gupta & Prywes, 2002; Wiggin et al., 2002). In der Tat wurde schon gezeigt, dass GnRH die Phosphorylierung von Elk-1 (Duan et al., 2002) und CREB induziert (Neithardt et al., 2006). Zusätzlich aktiviert die Inkubation von  $\alpha$ T3 Zellen mit GnRH die Proteinkinase JNK und p38 und bewirkt damit eine Phosphorylierung von ATF2 (Roberson et al., 1999; Mulvaney & Roberson, 2000). In einer Reihe von Experimenten wurde die Rolle

von CREB und ATF2 in der Buserelin- oder Carbachol induzierten Signalkaskaden aufgeklärt. In  $\beta$ -Zellen des Pankreas beschränkte sich die Untersuchung auf CREB, da sowohl die Stimulation der MIN6 Zellen mit Glukose, Tolbutamid oder KCl, als auch die Stimulation von INS-1 Zellen mit PregS nur zu einer Phosphorylierung von CREB führten. Die Verbindung des ERK-Signalwegs mit der Phosphorylierung von CREB konnte in MIN6 Zellen nachgewiesen werden, indem der Phosphorylierungsstatus von CREB untersucht wurde, nachdem die Zellen mit dem MEK-Inhibitor PD98059 inkubiert wurden. Dabei konnte man feststellen, dass die Phosphorylierung von CREB in Glukose, Tolbutamid oder KCl-stimulierten MIN6 Zellen von der ERK-Signalkaskade abhängig ist. In  $\alpha$ T3-1 oder MIN6 Zellen resultierte die Stimulation mit dbcAMP/IBMX oder mit Anisomycin in der Aktivierung der Egr-1 Expression über die Aktivierung der cAMP-abhängigen oder stressregulierten Proteinkinasen. Diese Daten bestätigen die Ergebnisse, dass konstitutiv aktive Mutanten von ATF2 oder CREB ein Egr-1 Promotor/Luziferase Reportergen transaktivieren (Al Sarraj et al., 2005; Bauer et al., 2007). Weiterhin konnte gezeigt werden, dass sowohl CREB als auch ATF2 nach Stimulation von  $\alpha$ T3M3-Zellen mit Buserelin oder Carbachol nicht nur phosphoryliert sondern auch an das Egr-1 Gen gebunden wurden. In MIN6 Zellen konnte ebenfalls die Bindung von CREB an das Egr-1 Gen gezeigt werden. Die Expression einer dominant-negativen Mutante von CREB verminderte die stimulusinduzierte Egr-1 Biosynthese in  $\alpha$ T3-1 und MIN6 Zellen. Dies bestätigte, dass Phosphorylierung und Bindung von CREB an das Egr-1 Gen ein wichtiger Bestandteil der Signalkaskade zur Egr-1 Gentranskription sind. In PregS-stimulierten INS-1 Zellen hatte die Expression der Mutante jedoch keinerlei Effekt auf die Egr-1 Expression. Eine Beteiligung dieses Transkriptionsfaktors an der Aktivierung der Egr-1 Biosynthese wird demnach ausgeschlossen. Zusammenfassend kann man daraus folgern, dass eine kombinatorische Phosphorylierung und Aktivierung von Elk-1 und CREB für die Induktion der Biosynthese von Egr-1 in MIN6 und  $\alpha$ T3-1 Zellen Voraussetzung ist.

Weiterhin konnte gezeigt werden, dass CREB in  $\beta$ -Zellen des Pankreas die Insulin Gentranskription auf zwei Arten reguliert: CREB bindet einerseits unter physiologischen Bedingungen an die regulatorische Region des Insulingens und transaktiviert damit direkt das Gen. Andererseits bindet CREB zusätzlich an den Egr-1 Promoter und führt zu einer erhöhten Egr-1 Expression. Egr-1 wiederum aktiviert die Insulingentranskription über die Aktivierung des PDX-1-Gens, einem Egr-1 Zielgen (Eto et al. 2006; Eto et al. 2007).

Da die Untersuchung der Effekte einer dominant-negativen Mutante von Egr-1 auf die ATF3-Expression zeigte, dass diese die Biosynthese von ATF3 nur zum Teil hemmen kann, müssen folglich weitere Transkriptionsfaktoren an der Aktivierung der ATF3 Gentranskription beteiligt sein. Auf der Suche nach diesen anderen Transkriptionsfaktoren habe ich mich auf die bZIP-Proteine CREB, ATF2 und c-Jun konzentriert und eine Reihe von Experimenten durchgeführt, die Licht in die Rolle dieser Proteine in der ATF3 Gentranskription bringen sollten. Die Expression von dominant-negativen Mutanten von CREB und ATF2 verminderte die ATF3 Expression in  $\alpha$ T3-1 Zellen nach Buserelinstimulation. Dagegen hatte die Expression einer dominant-negativen Mutante von c-Jun keinerlei Effekt auf die Biosynthese von ATF3. ChIP-Experimente bestätigten, dass die phosphorylierten Formen von CREB und ATF2 jedoch nicht c-Jun nach Stimulation von  $\alpha$ T3-1 Zellen mit Buserelin an das ATF3 Gen binden. Folglich regulieren Egr-1, CREB und ATF2 die ATF3 Expression in Buserelin stimulierten gonadotropen Hypophysenzellen.

## V.2 Zielgene von Egr-1

Die Funktion von Egr-1 erschließt sich über die Transaktivierung seiner Zielgene. Egr-1 transaktiviert Gene, die für Proteine kodieren, die sowohl die Proliferation aktivieren als auch solche die Apoptose einleiten. In  $\alpha$ T3M3, MIN6 und INS-1 Zellen wurden Gene untersucht, die in schon anderen Zelltypen als Egr-1 Zielgene entdeckt wurden. Dazu gehören PTEN, TNF $\alpha$ , TGF $\beta$ , bFGF, CgB, ATF3, Synapsin I, Insulin und PDX-1.

**PTEN** wirkt als Tumorsuppressor (Simpson & Parsons, 2001), gehört zur Gruppe der proapoptotischen Gene (Lu et al., 1999) und ist in Tumorzellen häufig mutiert (Steck et al., 1997; Li et al., 1997). PTEN kodiert für eine Lipidphosphatase, die die Phosphatgruppe an der Position D3 von Phosphatidylinositol-3-Phosphat entfernt und so die Generierung des „second messengers“ IP<sub>3</sub> verhindert (Myers et al., 1998). PTEN katalysiert damit die Rückreaktion der Phosphatidylinositol-3-Kinase welche das Überleben der Zellen durch Aktivierung von PKB/AKT sichert. In Plattenepithelkarzinom- oder auch embryonalen Fibroblasten wird das PTEN Gen durch Egr-1 reguliert (Virolle et al., 2001).

**TGF $\beta$**  ist der Prototyp einer großen Gruppe von Zytokinen, die die Proliferation, Differenzierung, Adhäsion und den Stoffwechsel der extrazellulären Matrix kontrollieren (Massague, 1998; Derynck et al., 2001). TGF $\beta$  ist ein potenter Wachstumshemmer in den

meisten Epithelzellen, wirkt jedoch in Zellen mesenchymalen Ursprungs als Mitogen (Lee & Bae, 2002). Die Wachstumshemmung ist meist reversibel, jedoch kann es unter Umständen auch zur Apoptose führen. In einigen Zelltypen induziert TGF $\beta$  direkt Apoptose (Rotello et al., 1991; Chaouchi et al., 1995; Landström et al., 2000). Die Regulation des TGF $\beta$  Gens durch Egr-1 wurde in humanen Endothelzellen, Astrozytoma- oder auch Prostatakarzinomzellen beschrieben (Liu et al., 1999; Svaren et al., 2000; Virolle et al., 2001). Außerdem führte die Überexpression einer konstitutiv aktiven Mutante von Egr-1 in Myozyten zu einer signifikanten Steigerung der Expression von TGF $\beta$  und bFGF (Lee et al., 2005).

Der „basic fibroblast growthfactor“ (**bFGF**) ist ein multifunktionales Protein, das vorrangig für seine mitogene und angiogene Wirkung bekannt ist. Beruhend auf Zellkulturstudien zeigte sich, dass bFGF auf eine ganze Reihe aus dem Mesoderm- und Neuroektoderm-stammende Zelltypen mitogene Effekte ausübt. Zusätzlich zu einer Vielzahl *in vitro* Studien konnte auch im *in vivo* Model gezeigt werden, dass bFGF eine Rolle in der Angiogenese und der Wundheilung spielt (Folkman & Klagsbrun, 1987; Bikflavi et al., 1997). bFGF wurde sowohl aus normalem als auch malignem Gewebe isoliert (Baird et al., 1986; Rifkin & Moscatelli, 1989). Außerdem wird bFGF auch zu verschiedenen Zeitpunkten in der Entwicklung exprimiert was darauf hindeutet, dass bFGF eine Rolle in der Aufrechterhaltung der normalen Funktion des Gewebes, der embryonalen Entwicklung und der Entwicklung und Funktion von adulten Neuronen spielt (Slack et al., 1988; Joseph-Silverstein et al., 1989; Baird, 1994).

Der „tumor necrosis factor“ **TNF $\alpha$**  ist ein proinflammatorisches Zytokin und ist an zahlreichen Prozessen der Zelle beteiligt wie beispielsweise Apoptose, Proliferation und Differenzierung (Locksley et al., 2001; van Horssen et al., 2006). Das TNF $\alpha$  Gen wird in Zellen des Prostatakarzinoms durch Egr-1 reguliert (Biesiada et al., 1996).

Alle vier untersuchten Gene regulieren wichtige Prozesse in den Zellen, die zum Überleben und der Funktion der Zelle unerlässlich sind. Es konnte gezeigt werden, dass sowohl in der gonadotropen Hypophysenzelllinie  $\alpha$ T3-1 als auch in der  $\beta$ -Zelllinie MIN6 die Gene die für bFGF, TGF $\beta$  und TNF $\alpha$  kodieren durch Egr-1 reguliert werden. Dagegen konnte die Bindung von Egr-1 an das PTEN-Gen nur in MIN6 Zellen gezeigt werden. Das zeigt recht deutlich, dass die Regulation der Zielgene von Egr-1 stark zelltypabhängig ist.

In INS-1 Zellen wurden speziell Gene untersucht, die für eine normale  $\beta$ -Zellfunktion essentiell sind. Hauptfunktion dieses Zelltyps ist die Synthese und die Sekretion von Insulin.



Da das Insulingen jedoch über keine Egr-1 Bindestellen verfügt, kann die Regulation der Transkription nur über einen Mittler erfolgen. Im Jahr 2007 wurde erstmals eine Verbindung zwischen PDX-1 und Egr-1 gefunden (Eto et al., 2007). Das PDX-1 Gen ist für die Embryonalentwicklung des Pankreas essentiell. Im adulten Stadium reguliert PDX-1 die Insulinproduktion und Glukosehomöostase. Die Zerstörung des PDX-1/IPF-1 Gens in Mäusen oder im Menschen verhindert eine normale Entwicklung des Pankreas und führt zum Phänotyp der pankreatischen Agnesie (Jonsson et al., 1994; Schwitzgebel et al., 2003). In späteren Entwicklungsstadien reguliert PDX-1 die Generierung, Funktion und das Überleben der insulinproduzierenden  $\beta$ -Zellen des Pankreas (Dutta et al., 1998; Johnson et al., 2003; Holland et al., 2002). Da PDX-1 ein potenter Aktivator des Insulingens ist kann Egr-1 indirekt durch Aktivierung des PDX-1-Gens auch das Insulingen regulieren und trägt so dazu bei extrazelluläre Signale in eine Hormonantwort der  $\beta$ -Zellen des Pankreas zu übersetzen.

Das **Chromogranin B**- und das Synapsin I-Gen vermittelt die sekretorische Funktion innerhalb der  $\beta$ -Zellen. Chromogranin B gehört zur Gruppe der Granine, saurer, sekretorischer Proteine die man in den Vesikeln endokriner Zellen findet. Granine binden Peptidhormone und biogene Amine sowie Calcium und sind an drei wichtigen Prozessen beteiligt: Nach der Synthese von Botenstoffen (Hormone und Neurotransmitter) im Golgi-Apparat steuern Granine den Transfer der Botenstoffe in die Vesikel. Über eine partielle proteolytische Spaltung der Granine wird die Exozytose der granulären Inhaltsstoffe geregelt. Spaltprodukte der Granine, die mit den spezifischen Inhaltsstoffen kosezerniert werden, besitzen eigene autokrine, parakrine und endokrine regulatorische Eigenschaften (Taupenot et al., 2003). In neuroendokrinen Zellen konnte schon gezeigt werden, dass das CgB-Gen durch Egr-1 reguliert wird (Mahapatra et al., 2006).

**Synapsin I** reguliert die Neurotransmitterausschüttung in den Synapsen. Synapsin verankert dabei die synaptischen Vesikel an Komponenten des Zytoskeletts, was diese davon abhält zur präsynaptischen Membran zu wandern und dort die Transmitter zu entlassen. Wird Synapsin I allerdings durch  $\text{Ca}^{2+}$ /CaM-abhängige Proteinkinase II phosphoryliert, entlässt es die Vesikel, die ihren Inhalt in den synaptischen Spalt abgeben. 1999 wurde Synapsin auch aus  $\beta$ -Zellen des Pankreas isoliert und erstmals eine Verbindung zwischen Synapsin und der Exozytose von Insulin gezogen (Matsumoto et al., 1999; Longuet et al., 2005). Es wurde schon beschrieben, dass das Synapsin I-Gen durch Egr-1 reguliert wird (Thiel et al., 1994).

In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass Egr-1 unter physiologischen Bedingungen sowohl an das Synapsin I als auch an das Chromogranin B Gen bindet und die Aktivität eines Promotor/Luziferasereportergens steigert. Statt transienter Transfektion der Reporterplasmide wurde sich einer lentiviral basierten Technik bedient, die die Untersuchung der Aktivierung von Reportergenen erlaubte, die in einem chromosomalen Kontext eingebettet sind. Die geordnete Chromatinstruktur verursacht einen restriktiven Zustand, der eine Bindung von RNA-Polymerasen und Transkriptionsregulatoren an die DNA verhindert. Eukaryotische Genaktivierung wird als Beseitigung der Repression durch die nukleosomalen Strukturen des Chromatins betrachtet. Dagegen liegen transient transfizierte Plasmide bar im Zellkern vor und unterliegen keinerlei Repression (Smith & Hager, 1997) und ähneln daher eher einer prokaryotischen Genorganisation. Deshalb sind integrierte Transkriptionseinheiten ein passenderes Model um die transkriptionregulierenden Mechanismen zu untersuchen. Zusätzlich konnte auch die Synthese von Synapsin I im Westernblot nach PregS-Stimulation gezeigt werden. Zusammengefasst weisen die Ergebnisse darauf hin, dass Egr-1 für eine normale  $\beta$ -Zellfunktion essentiell ist, da es über die Aktivierung von PDX-1 das Insulingen reguliert und zusätzlich die Sekretion des gebildeten Insulins über die Gene von Synapsin I und Chromogranin B steuert.

Ein weiteres Zielgen von Egr-1 ist das Gen, das für den bZIP Faktor ATF3 kodiert (Bottone Jr, et al. 2005). ATF3 ist, abhängig vom Zelltypus, involviert in der Regulation von Zellwachstum (Fan et al., 2002), Apoptose (Mashima et al., 2001) und Stressantwort (Hai, et al. 1999). Die Funktion von ATF3 ist umstritten. Es wurde sowohl als Transkriptionsaktivator als auch als Repressor beschrieben, oder es könnte aber auch die biologischen Aktivitäten von anderen bZIP Faktoren wie CREB, c-Jun und ATF2 modulieren. Ebenfalls wurde gezeigt, dass Egr-1 das ATF3 Gen in kolorektalen Tumorzellen über eine im Promotor befindlichen Egr-1 Bindestelle transaktiviert (Bottone Jr et al., 2005). Die Expression einer dominant-negativen Mutante von Egr-1 und CHIP-Experimente konnten eindeutig den Einfluss von Egr-1 auf das ATF3-Gen beweisen.

### V.3 Funktionen von Egr-1 in Astrozyten

Im Nervensystem ist einer der besonderen Merkmale von Astrozyten ihre proliferative Eigenschaft. Zahlreiche Verletzungen des zentralen Nervensystems haben eine reaktive Gliose zur Folge, eine Reaktion der Astrozyten welche eine Erhöhung der Zellzahl, eine Ausdehnung zellulärer Prozesse und eine Steigerung der GFAP-Synthese beinhaltet. Zellkulturstudien zeigten dass Mitogene, wie beispielsweise der „epidermal growth factor“ (EGF) oder auch der „basic fibroblast growth factor“ (bFGF), die DNA-Synthese und Proliferation von primären Astrozyten und Gliomazellen induzieren (Kaufmann & Thiel, 2001; Riboni et al., 2001). Seit der Entdeckung von Egr-1 als eines der „early growth response“ Gene wurde die weitere Erforschung immer in Richtung der wachstumsfördernden und proliferativen Funktion dieses Zinkfingerproteins gelenkt. Tatsächlich wurde Egr-1 auch eine direkte Rolle in der Kontrolle der Proliferation von Astrozyten, Gliomazellen, glomeruläre Mesangialzellen, Keratinozyten und T-Zellen zugeschrieben (Perez-Castillo et al., 1993; Biesiada et al., 1996; Hofer et al., 1996; Kaufmann & Thiel, 2002; Rössler & Thiel, 2004). In einer anderen Studie wurde vorgeschlagen, dass Egr-1 eines der Schlüsselproteine in der Regulation der Astrozytenproliferation sei (Hu & Levin, 1994). Die Induktion der Egr-1 Biosynthese könnte also ein integraler Bestandteil des mitogenen Signalwegs sein und könnte die Signalkaskade über die Stimulation von Wachstumsfaktor- oder Wachstumsfaktorrezeptorsynthese weiterleiten. Allerdings stehen diese Berichte denen entgegen, die Egr-1 eine wachstumshemmende Funktion in Tumorzellen zuschreiben (Huang et al., 1995; Calogero et al., 2001; Calogero et al., 2004).

Die Biosynthese von Egr-1 wird stark durch die Aktivierung der „extracellular signal – regulated protein kinase“ ERK (Kaufmann & Thiel, 2001), der Proteinkinase die durch Mitogene aktiviert wird, induziert. Die Tatsache, dass Gene, die für Wachstumsfaktoren wie „insulin-like growth factor-II“, „platelet-derived growth factor“ A und B oder „transforming growth factor- $\beta$ 1“ kodieren, durch Egr-1 reguliert werden (Khachigian et al., 1995; Bae et al., 1999; Liu et al., 1999; Svaren et al., 2000), zeigt dass Egr-1 die mitogene Signalkaskade über Stimulation der Wachstumsfaktorsynthese fortsetzt. Es ist jedoch nötig hervorzuheben, dass die vorgeschlagene Rolle von Egr-1 in der Kontrolle des Zellwachstums größten Teils auf der Korrelation zwischen der Antwort auf Mitogene und der Induktion der Egr-1 Biosynthese durch Mitogene beruht. Die Verwendung von Zellen aus Egr-1 defizienten Mäusen konnte in einigen wenigen Fällen eine kausale Beziehung zwischen der Egr-1 Expression und dem

Zellwachstum herstellen. Eine verzögerte Leberregeneration und verminderte Tumorprogression bei Prostatakarzinomen wurde in diesem Zusammenhang beobachtet (Liao et al., 2004; Abdulkadir et al., 2001). In dieser Arbeit wurde versucht eine kausale Beziehung zwischen der Proliferation von Astrozyten und der Biosynthese von Egr-1 herzustellen.

Um die Bestandteile der Signalkaskade zu untersuchen, die zur Aktivierung der Egr-1 Biosynthese und der Proliferation von EGF-stimulierten Astrozyten führt, wurde mittels lentiviralem Gentransfer Proteine exprimiert, die die Signalweiterleitung unterbrechen sollten. Die Aktivierung des EGF-Rezeptors resultiert in der sukzessiven Aktivierung der Raf-MEK-ERK-Kinasen, welche schließlich die Aktivierung des ternären Komplexfaktors Elk-1 zur Folge hat. Die Expression einer dominant negativen Mutante von Raf konnte die Relevanz dieser Kinase für die Proliferation EGF-stimulierter Astrozyten zeigen. Raf ist assoziiert mit Proliferation und der Einleitung des Zellzyklus (Leicht, et al., 2007; Sobczak, et al., 2008). Raf ist außerdem einer der Hauptaktivatoren des ERK-Signalwegs. Die MKP-1 katalysiert die Dephosphorylierung und Inaktivierung von ERK im Nukleus. Die MKP-1 fungiert folglich als eine Art Inaktivierungsmechanismus im Nukleus, der die Weiterleitung der mitogenen Signalkaskade in den Kern verhindert. Es konnte gezeigt werden, dass eine Überexpression der MKP-1 in das Zellwachstum von EGF-stimulierten Astrozyten eingreift. Ähnliche Ergebnisse konnten in Fibroblasten gezeigt werden. Die Expression der MKP-1 verhinderte in diesem Fall die V<sup>12</sup>Ras-induzierte DNA Synthese (Sun et al., 1994). Die MKP-1 greift außerdem in den Zellzyklus ein, indem es die G1-spezifische Gentranskription und den Eintritt in die S-Phase verhindert (Brondello et al., 1995). Die Analyse von Egr-1 Promotor/Luziferase-Reportergenen zeigte, dass die proximalen SRE's des Egr-1 Promotors genügen um die Egr-1 Transkription nach EGF-Stimulation zu induzieren. Die transkriptionelle Aktivierung von Egr-1 wird oft über Aktivierung des ternären Komplexfaktors Elk-1 gewährleistet. Die Phosphorylierung von Elk-1 verknüpft die ERK-Signalkaskade mit der SRE-vermittelten Transkription. Die Inaktivierung des Elk-1 Gens oder der Gene anderer ternärer Komplexfaktoren in transgenen Mäusen brachte nur minimale Veränderungen des Phänotyps hervor (Ayadi et al., 2001; Cesari et al., 2004; Costello et al., 2004). Diese Befunde weisen darauf hin, dass die Funktion von Elk-1 durch andere ternäre Komplexfaktoren kompensiert wird. Deshalb haben wir den Einfluss des ternären Komplexfaktors auf die EGF-induzierte Proliferation von Astrozyten mittels einer dominant-negativen Mutante von Elk-1 untersucht. Da die Mutante REST/Elk-1ΔC sowohl an die DNA

als auch an die SRF bindet, ist es wahrscheinlich, dass sie die Aktivität anderer ternärer Komplexfaktoren wie SAP-1 und SAP-2 ebenfalls unterbindet. Die Expression dieser Elk-1 Mutante ließ erkennen, dass die Aktivierung des ternären Komplexfaktors essentiell ist um eine mitogene Stimulation mit der Proliferation von Astrozyten zu verbinden. Diese Beobachtungen stimmen mit früheren Untersuchungen überein, die zeigten, dass die Aktivierung des ternäre Komplexfaktor für die Proliferation von Fibroblasten benötigt wird (Vickers et al., 2004).

Der Vergleich von Astrozyten, die aus Wildtyp- oder Egr-1-defizienten Mäusen gewonnen wurden, zeigte, dass es keine Unterschiede in der Proliferationsrate der Zellen gab, wenn diese mit EGF stimuliert wurden. Daraus ergab sich die Schlussfolgerung, dass andere Mitglieder der Egr-1 Familie, welche an eine ähnliche GC-reiche Zielsequenz binden, den Verlust von Egr-1 kompensieren. Um eine funktionelle Redundanz zwischen den Egr-1 Proteinen auszuschließen, wurde ein dominant-negativen Ansatz gewählt. Die Expression einer dominant-negativen Mutante von Egr-1, welche die Bindungsstelle aller Egr-Proteine blockierte, verhinderte die EGF-induzierte Proliferation von Astrozyten. Das deutet darauf hin, dass Egr-1 oder andere Egr-Proteine benötigt werden, um ein mitogenes Signal in eine proliferative Antwort umzuwandeln. Durch ortsspezifische Mutagenese konnte die Bindung der dominant-negativen Mutante von Egr-1, dem Egr-1/Zn, an die Egr-Bindestelle von Egr-1 Zielgenen verhindert werden. Es zeigte sich, dass das Fehlen der DNA-Bindungsfähigkeit die reprimierende Aktivität der Egr-1/Zn-Mutante auf die EGF-induzierte Astrozytenproliferation aufhob. Die Proliferation der Zellen wurde ebenso durch die Überexpression von NAB2 unterbunden. Dieser Kofaktor hemmt die biologische Aktivität von Egr-1, Egr-2 und Egr-3 (O'Donovan et al., 1999). Somit konnte eine Beteiligung von Egr-4 an der Proliferationskontrolle in EGF-stimulierten Astrozyten ausgeschlossen werden. Zusammengefasst weisen diese Daten eine Verbindung zwischen der Aktivität von Egr-Protein und der Proliferation von Astrozyten nach und sprechen dafür, dass der Verlust von Egr-1 in Astrozyten durch andere Egr-Proteine kompensiert wird. Diese Hypothese konnte zusätzlich durch CHIP-Experimente bestätigt werden, die deutlich zeigten, dass in Astrozyten aus Wildtyp Mäusen, Egr-1, 2 und 3 an das bFGF-Gen gebunden wurden. Und auch in Astrozyten aus Egr-1-defizienten Mäusen wurden Egr-2 und 3 noch an das bFGF Gen gebunden, wenn die Zellen mit EGF stimuliert wurden. Das zeigt, dass der Verlust des Egr-1-Gens durch die Egr-Proteine 2 und 3 ausgeglichen werden kann. Wird in den Zellen jedoch die dominant-negative Mutante von Egr-1 exprimiert, blockierte die Bindung der Mutante an

die DNA die Bindung von Egr-1, 2 und 3 an das bFGF Gen. Die Proliferation von Astrozyten nach der Stimulation mit EGF wird folglich durch Egr-Transkriptionsfaktoren reguliert. Die Regulation erfolgt möglicherweise über eine autokrine Schleife durch die Induktion der bFGF Synthese durch Egr-Proteine.

## VI. Zusammenfassung

Egr-1 ist ein Zinkfingertranskriptionsfaktor, der durch Veränderung der Genexpression extrazelluläre Signale mit einer Langzeitantwort verbindet. In gonadotropen Hypophysenzellen erfolgte die Expression von Egr-1 nach Stimulation des „Gonadotropin Releasing Hormone“-Rezeptors mit dem GnRH Analogon Buserelin oder aber nach Stimulation des muskarinischen Acetylcholinrezeptors mit dem Acetylcholinrezeptor-Agonisten Carbachol. In  $\beta$ -Zellen des Pankreas wurde die Biosynthese von Egr-1 über Aktivierung der L-Typ  $\text{Ca}^{2+}$ -Kanäle durch Stimulation der Zellen mit Glukose, KCl, Tolbutamid oder dem Steroidhormon Pregnenolonsulfat induziert. Eine Analyse der Signalwege zeigte, dass eine erhöhte intrazelluläre  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration, Aktivierung der Proteinkinase C und des „Extracellular-Signal-Regulated-Protein-Kinase“-Signalwegs notwendig ist, um die Biosynthese von Egr-1 zu induzieren. Im Nukleus verbindet der ternäre Komplexfaktor Elk-1 den ERK-Signalweg mit der „Serum Response Element“-vermittelten Egr-1 Transkription. Abhängig vom Stimulus können auch die Transkriptionsfaktoren CREB und ATF2 zur Aktivierung der Egr-1 Expression beitragen. Die Untersuchung der Egr-1 Zielgene ergab eine zelltypspezifische Regulation der Gene die für bFGF,  $\text{TNF}\alpha$ ,  $\text{TGF}\beta$ , PTEN, PDX-1, Synapsin I, Chromogranin B und ATF3 kodieren. Die Analyse von Egr-1-defizienten Astrozyten zeigte, dass der Verlust von Egr-1 in der EGF-stimulierten Proliferation von Astrozyten durch die Egr-Proteine Egr-2 und Egr-3 kompensiert wird.

## VII. Summary

The Egr-1 gene encodes for a zinc finger transcription factor that couples extracellular signals to long term responses by altering gene expression. Stimulation of Gonadotropin-releasing hormone receptors with the GnRH analogue buserelin or stimulation of muscarinic M<sub>3</sub> acetylcholine receptors with the receptor agonist carbachol enhances expression of Egr-1 in a pituitary gonadotroph cell line. Egr-1 expression is additionally induced via L-type Ca<sup>2+</sup>-channels by treatment of pancreatic  $\beta$ -cells with glucose, KCl, tolbutamide, or the steroidhormone Pregnenolone sulfate. Signaling pathways leading to Egr-1 gene expression involve elevated cytosolic Ca<sup>2+</sup> levels, protein kinase C, and activation of the extracellular signal regulated protein kinase. In the nucleus, the ternary complex factor Elk-1 couples ERK-activation to serum response element-mediated transcription of the Egr-1 gene. Depending on the stimuli, other transcription factors like CREB or ATF2 participate in the activation of Egr-1 gene expression. The genes encoding bFGF, TNF $\alpha$ , TGF $\beta$ , PTEN, PDX-1, Synapsin I, Chromogranin B und ATF3 were identified as celltype-specific *bona fide* target genes of Egr-1. The analysis of Egr-1-deficient astrocytes revealed that the loss of Egr-1 in the EGF-induced proliferation of astrocytes is compensated by the Egr-proteins Egr-2 and Egr-3.



## VIII. Abkürzungsverzeichnis

%	Prozent
°C	Grad Celsius
Abb.	Abbildung
ADP	<u>A</u> denosin <u>d</u> iphosphat
Ak	<u>A</u> ntik <u>ö</u> rper
AMP	<u>A</u> denosin <u>m</u> onophosphat
APS	<u>A</u> mmonium <u>p</u> ersulfat
ATF	<u>a</u> ctivating <u>t</u> ranscription <u>f</u> actor
ATP	<u>A</u> denosin <u>t</u> riphosphat
BAPTA	1,2- <u>b</u> is(o- <u>a</u> minophenoxy)ethane-N,N,N',N'- <u>t</u> etra <u>a</u> cetic acid
BCA	<u>B</u> icin <u>h</u> oninic <u>a</u> cid
bFGF	<u>b</u> asic <u>f</u> ibroblast <u>g</u> rowth <u>f</u> actor
BME	<u>B</u> asal <u>M</u> edium <u>E</u> agle
bp	<u>b</u> ase <u>p</u> air(s)
BrdU	5- <u>B</u> rom-2'- <u>d</u> esoxy- <u>U</u> ridin
BSA	<u>b</u> ovine <u>s</u> erum <u>a</u> lbumine
bzw.	beziehungsweise
Cdk	<u>c</u> yclin <u>d</u> ependent <u>k</u> inase
cDNA	<u>c</u> opy oder <u>c</u> omplementary <u>d</u> esoxyibonucleic <u>a</u> cid
CgB	Chromogranin B
ChIP	<u>c</u> hromatin <u>i</u> mmunoprecipitation
CMV	<u>c</u> ytomegalo <u>v</u> irus
CnA	Calcineurin A
CO <sub>2</sub>	Kohlendioxid
CRE	<u>c</u> yclic AMP <u>r</u> esponse <u>e</u> lement
CREB	<u>c</u> yclic AMP <u>r</u> esponse <u>e</u> lement binding protein
Da	<u>D</u> alton
DAG	<u>D</u> iacylglycerol
DEPC	Diethylpyrocarbonat
d.h.	das heißt

DMEM	<u>D</u> ulbeccos <u>M</u> odified <u>E</u> agles <u>M</u> edium
DMSO	<u>D</u> imethylsulfoxid
DNA	<u>d</u> esoxyribonucleic acid
DTT	<u>D</u> ithiothreitol
EBS	Egr-1 binding site
ECL	<u>e</u> nhanced <u>c</u> hemo <u>l</u> uminescence
EDTA	<u>E</u> thylendiaminetetraacetat
EGF	<u>e</u> pidermal growth factor
Egr-1	<u>e</u> arly growth response 1
EGTA	Ethylenglykol-bis(aminoethylether)-N,N'-Tetraessigsäure
Elk	<u>E</u> ts like protein kinase
EMSA	electrophoretic mobility shift assay
ER	<u>e</u> strogen receptor
ERK	<u>e</u> xtracellular signal regulated protein kinase
EtOH	Ethanol
FCS	<u>f</u> etal calf serum (fötales Kälberserum)
g	Gramm
G418	Geneticindisulfat
GAPDH	<u>g</u> lycerinaldehyd-3-phosphate- <u>d</u> ehydrogenase
GFAP	glial fibrillary acidic protein
GFP	<u>g</u> reen fluorescent protein
GnRH	<u>g</u> onadotropin releasing hormone
GPCR	<u>G</u> -protein coupled receptor
h	Stunde(n)
H <sub>2</sub> O	Wasser
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	Wasserstoffperoxid
HBSS	<u>h</u> epes- <u>b</u> uffered <u>s</u> aline <u>s</u> olution
HCl	Salzsäure
HDAC	Histondeacetylase
HEPES	[4-(2- <u>H</u> ydroxyethyl)-piperazino]- <u>e</u> thansulfonsäure
HP-1	Heterochromatin Protein 1
HRE	hormone response element
HRP	<u>h</u> orseadish peroxidase
HSP90	heat shock protein 90

Ig	<u>I</u> mmunglobulin
IP	<u>I</u> mmunpräzipitation
IP3	Inositoltriphosphat
JNK	c-Jun N-terminal kinase
KCl	Kaliumchlorid
l	Liter
LTR	<u>l</u> ong <u>t</u> erminal <u>r</u> epat
MAPK	<u>m</u> itogen <u>a</u> ctivated <u>p</u> rotein <u>k</u> inase
MEK	mitogen-activated protein kinase kinase
MgCl <sub>2</sub>	Magnesiumchlorid
min	Minute(n)
MKP	<u>M</u> AP- <u>k</u> inase <u>p</u> hosphatase
mRNA	<u>m</u> essenger <u>r</u> ibonucleic <u>a</u> cid
MSK	<u>m</u> itogen- and <u>s</u> tress activated protein <u>k</u> inase
NAB	<u>N</u> GFI- <u>A</u> - <u>b</u> inding protein
NaCl	Natriumchlorid
NGF	nerve growth factor
NGFI	nerve growth factor inducible
NLS	<u>n</u> uclear <u>l</u> ocalization <u>s</u> ignal
NaOH	Natriumhydroxid
PAGE	<u>P</u> oly <u>a</u> crylamidgelelektrophorese
PBS	<u>p</u> hosphate <u>b</u> uffered <u>s</u> aline
PCR	<u>p</u> olymerase <u>c</u> hain <u>r</u> eaction
pH	pH-Wert
PI3K	<u>P</u> hosphoinositol- <u>3</u> - <u>K</u> inase
PKC	<u>P</u> roteinkinase <u>C</u>
PP2C	Proteinphosphatase 2 C
PTEN	<u>p</u> hosphatase and <u>t</u> ensin homolog
Raf	<u>r</u> apidly growing <u>f</u> ibrosarcoma
RNAi	<u>R</u> NA <u>i</u> nteference
Preg	Pregnenolon
PregS	Pregnenolonsulfate
Prog	Progesteron
REST	<u>R</u> E-1 <u>s</u> ilencing <u>t</u> ranscription factor

RPMI	<u>R</u> oswell <u>P</u> ark <u>M</u> emorial <u>I</u> nstitute
RT	Raumtemperatur
SDS	<u>s</u> odium <u>d</u> odecyl <u>s</u> ulphate
Sg II	Segretogranin II
SRE	<u>s</u> erum <u>r</u> esponse <u>e</u> lement
SRF	<u>s</u> erum <u>r</u> esponse <u>f</u> actor
SV40	<u>S</u> imian <u>V</u> irus 40
TBS(T)	<u>T</u> ris <u>b</u> uffered <u>s</u> aline (T <u>w</u> een <sup>®</sup> 20)
TEMED	N, N, N',N'- <u>T</u> etramethylethylendi <u>a</u> min
TGFβ	<u>T</u> ransforming <u>g</u> rowth <u>f</u> actor β
TNFα	<u>T</u> umor <u>N</u> ekrose <u>F</u> aktor α
TPA	12-O-tetradecanoyl-phorbol-13- <u>a</u> cetate
Tris	<u>T</u> ris(hydroxymethyl)-aminomethan
TRP	<u>t</u> ransient <u>r</u> eceptor <u>p</u> otential
VSV	vesicular stomatitis virus
v/v	Volumenprozent
w/v	Gewichtsprozent
WPRE	woodchuck hepatitis virus posttranscriptional regulatory element

## **Danksagung**

Herrn Prof. Dr. Thiel möchte ich für seine Förderung und wissenschaftliche Unterstützung danken, ganz besonders für all die Chancen und Möglichkeiten, die sich mir während meiner Doktorarbeit und auch danach durch ihn eröffnet haben.

Herrn Prof. Dr. Schmitz danke ich für seine Bereitschaft als Gutachter diese Dissertation zu beurteilen.

Ich möchte mich bei meiner Arbeitsgruppe bedanken, insbesondere bei Myriam Ekici; ohne ihre Freundschaft und Hilfsbereitschaft wäre der Laboralltag mit Sicherheit schwierig zu bewältigen gewesen, bei Jude Alsarraj, von der ich alles gelernt habe was ich für meine Laborarbeit brauchte, bei Verena Dexheimer für die herausragende Vorarbeit im ATF3-Projekt und bei Karl Bach für seine technische Unterstützung.

Der AG Stahl und AG Montenarh danke ich für die freundschaftliche Unterstützung, insbesondere Sabine Katharius für die Hilfe bei der Fluoreszenzmikroskopie.

Dr. Johannes Oberwinkler danke ich für die produktive Zusammenarbeit im INS-1 Projekt und für die Bereitstellung so mancher Chemikalie und Dr. Stephan Philipp dafür, daß er sich die Zeit genommen hat die TRPM3-Westernblots zu machen und die FACS-Analyse durchzuführen.

Und vor allem möchte ich meinen Eltern und meiner ganzen Familie danken, die mich während meiner gesamten Ausbildung unterstützt haben und immer für mich da waren.

**IX. Literaturverzeichnis**

Abdulkadir, S. A., Qu, Z., Garabedian, E., Song, S. K., Peters, T. J., Svaren, J., et al. (2001). Impaired prostate tumorigenesis in Egr1-deficient mice. *Nat.Med.* , 7 (1), 101-7.

Akk, G., Bracamontes, J., & Steinbach, J. H. (2001). Pregnenolone sulfate block of GABA(A) receptors: mechanism and involvement of a residue in the M2 region of the alpha subunit. *J.Physiol.* , 532 (3), 673-84.

Akkina, R. K., Walton, R. M., Chen, M. L., Li, Q. X., Planelles, V., & Chen, I. S. (1996). High-efficiency gene transfer into CD34+ cells with a human immunodeficiency virus type 1-based retroviral vector pseudotyped with vesicular stomatitis virus envelope glycoprotein G. *J Virol* , 70 (4), S. 2581-5.

Akwa, Y., Young, J., Kabbadj, K., Sancho, M. J., Zucman, D., Vourc'h, C., et al. (1991). Neurosteroids: biosynthesis, metabolism and function of pregnenolone and dehydroepiandrosterone in the brain. *J.Steroid.Biochem.Mol.Biol.* , 40 (1-3), 71-81.

Al Sarraj, J., Vinson, C., Han, J., & Thiel, G. (2005). Regulation of GTP cyclohydrolase I gene transcription by basic region leucine zipper transcription factors. *J Cell Biochem* , 96 (5), S. 1003-20.

Angel, P., Baumann, I., Stein, B., Delius, H., Rahmsdorf, H. J., & Herrlich, P. (1987). 12-O-tetradecanoyl-phorbol-13-acetate induction of the human collagenase gene is mediated by an inducible enhancer element located in the 5'-flanking region. *Mol Cell Biol.* , 7 (6), 2256-66.

Arnette, D., Gibson, T. B., Lawrence, M. C., January, B., Khoo, S., McGlynn, K., et al. (2003). Regulation of ERK1 and ERK2 by glucose and peptide hormones in pancreatic beta cells. *J Biol Chem* , 278 (35), S. 32517-25.

Asfari, M., Janjic, D., Meda, P., Li, G., Halban, P., & Wollheim, C. (1992). Establishment of 2-mercaptoethanol-dependent differentiated insulin-secreting. *Endocrinology* (130 (1)), S. 167-78.

Ashcroft, S. J., & Ashcroft, F. M. (1990). Properties and functions of ATP-sensitive K-channels. *Cell Signal.* , 2 (3), 197-214.

Bae, S. K., Bae, M. H., Ahn, M. Y., Son, M. J., Lee, Y. M., Bae, M. K., et al. (1999). Egr-1 mediates transcriptional activation of IGF-II gene in response to hypoxia. *Cancer Res.* , 59 (23), 5989-94.

Bain, J., McLauchlan, H., Elliott, M., & Cohen, P. (2003). The specificities of protein kinase inhibitors: an update. *Biochem J.* , 371 (1), 199-204.

Bain, J., Plater, L., Elliott, M., Shpiro, N., Hastie, C. J., McLauchlan, H., et al. (2007). The selectivity of protein kinase inhibitors: a further update. *Biochem J.* , 408 (3), 297-315.

Baird, A. (1994). Fibroblast growth factors: activities and significance of non-neurotrophin neurotrophic growth factors. *Curr.Opin.Neurobiol.* , 78-86.

Baird, A., Esch, F., Mormede, P., Ueno, N., Ling, N., Böhlen, P., et al. (1986). Molecular characterization of fibroblast growth factor: distribution and biological activities in various tissues. *Recent Prog.Horm.Res.* , 42, 143-205.

- Bauer, I., Al Sarraj, J., Vinson, C., Larsen, R., & Thiel, G. (2007). Interleukin-1beta and tetradecanoylphorbol acetate-induced biosynthesis of tumor necrosis factor alpha in human hepatoma cells involves the transcription factors ATF2 and c-Jun and stress-activated protein kinases. *J Cell Biochem* , 100 (1), S. 242-55.
- Bauer, I., Hohl, M., Al-Sarraj, A., Vinson, C., & Thiel, G. (2005). Transcriptional activation of the Egr-1 gene mediated by tetradecanoylphorbol acetate and extracellular signal-regulated protein kinase. *Arch Biochem Biophys* , 438 (1), S. 36-52.
- Benes, C., Poitout, V., Marie, J. C., Martin-Perez, J., Roisin, M. P., & Fagard, R. (1999). Mode of regulation of the extracellular signal-regulated kinases in the pancreatic beta-cell line MIN6 and their implication in the regulation of insulin gene transcription. *Biochem J* , 340, S. 219-25.
- Benes, C., Roisin, M. P., Van Tan, H., Creuzet, C., Miyazaki, J., & Fagard, R. (1998). Rapid activation and nuclear translocation of mitogen-activated protein kinases in response to physiological concentration of glucose in the MIN6 pancreatic beta cell line. *J Biol Chem* , 273 (25), S. 15507-13.
- Bernal-Mizrachi, E., Wen, W., Srinivasan, S., Klenk, A., Cohen, D., & Permutt, M. A. (2001). Activation of Elk-1, an Ets transcription factor, by glucose and EGF treatment of insulinoma cells. *Am J Physiol Endocrinol Metab* , 281 (6), S. E1286-99.
- Bernal-Mizrachi, E., Wice, B., Inoue, H., & Permutt, M. A. (2000). Activation of serum response factor in the depolarization induction of Egr-1 transcription in pancreatic islet beta-cells. *J Biol Chem* , 275 (33), S. 25681-9.
- Bicikova, M., Tallova, J., Hill, M., Krausova, Z., & Hampl, R. (2000). Serum concentrations of some neuroactive steroids in women suffering from mixed anxiety-depressive disorder. *Neurochem.Res.* , 25 (12), 1623-7.
- Biesiada, E., Razandi, M., & Levin, L. R. (1996). Egr-1 activates basic fibroblast growth factor transcription. Mechanistic implications for astrocyte proliferation. *J Biol Chem* , 271 (31), S. 18576-81.
- Bikflavi, A., Klein, S., Pintucci, G., & Rifkin, D. B. (1997). Biological roles of fibroblast growth factor-2. *Endocr.Rev.* , 18 (1), 26-45.
- Bottone Jr, F. G., Moon, Y., Alston-Mills, B., & Eling, T. E. (2005). Transcriptional regulation of activating transcription factor 3 involves the early growth response-1 gene. *J Pharmacol Exp Ther* , 315 (2), S. 668-77.
- Bottone, F. G., Moon, Y., Kim, J. S., Alston-Mills, B., Ishbashi, M., & Eling, T. E. (2005). The anti-invasive activity of cyclooxygenase inhibitors is regulated by the transcription factor ATF3 (activating transcription factor 3). *Mol.Cancer.Ther.* , 4 (5), 693-703.
- Brondello, J. M., McKenzie, F. R., Sun, H., Tonks, N. K., & Pouyssegur, J. (1995). Constitutive MAP kinase phosphatase (MKP-1) expression blocks G1 specific gene transcription and S-phase entry in fibroblasts. *Oncogene* , 10, 1895-904.
- Buteau, J., Foisy, S., Joly, E., & Prentki, M. (2003). Glucagon-Like Peptide 1 Induces Pancreatic  $\beta$ -Cell Proliferation Via Transactivation of the Epidermal Growth Factor Receptor. *Diabetes* , 52, 124-32.

- Cai, Y., Liu, Y., & Zhang, X. (2006). Induction of transcription factor Egr-1 gene expression in astrocytoma cells by Murine coronavirus infection. *Virology*, 355 (2), 152-63.
- Calogero, A., Arcella, A., De Gregorio, G., Porcellini, A., Mercola, D., Liu, C., et al. (2001). The early growth response gene EGR-1 behaves as a suppressor gene that is down-regulated independent of ARF/Mdm2 but not p53 alterations in fresh human gliomas. *Clin.Cancer Res.*, 7, 2788-96.
- Calogero, A., Lombardi, V., De Gregorio, G., Porcellini, A., Ucci, S., Arcella, A., et al. (2004). Inhibition of cell growth by EGR-1 in human primary cultures from malignant glioma. *Cancer Cell Int.*, 4, 1.
- Cao, X., Koski, R. A., Gashler, A., McKiernan, M., Morris, C. F., Gaffney, R., et al. (1990). Identification and Characterization of the Egr-1 Gene Product, a DNA-Binding Zinc Finger Protein Induced by Differentiation and Growth Signals. *Mol.Cell.Biol.*, 10 (5), 1931-39.
- Cao, X., Mahendran, R., Guy, G. R., & Tan, H. Y. (1993). Detection and Characterization of Cellular EGR-1 Binding to Its Recognition Site. *J.Biol.Chem.*, 268 (23), 16949-57.
- Caunt, C. J., Finch, A. R., Sedgley, K. R., & McArdle, C. A. (2006). GnRH receptor signalling to ERK: kinetics and compartmentalization. *Trends Endocrinol Metab*, 17 (8), S. 308-13.
- Cesari, F., Brecht, S., Vintersten, K., Vuong, L. G., Hofmann, M., Klingel, K., et al. (2004). Mice deficient for the ets transcription factor elk-1 show normal immune responses and mildly impaired neuronal gene activation. *Mol.Cell.Biol.*, 24 (1), 294-305.
- Chaouchi, N., Arvantakis, L., Auffredou, M. T., Blanchard, D. A., Vazquez, A., & Sharma, S. (1995). Characterization of transforming growth factor-beta 1 induced apoptosis in normal human B cells and lymphoma B cell lines. *Oncogene*, 11 (8), 1615-22.
- Chavrier, P., Zerial, M., Lemaire, P., Almendral, J., Bravo, R., & Charnay, P. (1988). A gene encoding a protein with zinc fingers is activated during Go/G1 transition in cultured cells. *EMBO*, 7 (1), 29-35.
- Chen, B. P., Liang, G., Whelan, J., & Hai, T. (1994). ATF3 and ATF3 delta Zip. Transcriptional repression versus activation by alternatively spliced isoforms. *J Biol Chem*, 269 (22), S. 15819-26.
- Chen, C., & Okayama, H. (1988). Calcium phosphate-mediated gene transfer: a highly efficient transfection system for stably transforming cells with plasmid DNA. *Biotechniques* (6(7)), S. 632-8.
- Chirgwin, J., Przybyla, A., MacDonald, R., & Rutter, W. (1979). Isolation of biologically active ribonucleic acid from sources enriched in ribonuclease. *Biochemistry*, 27 (18(24)), S. 5294-9.
- Chiu, R., Angel, P., & Karin, M. (1989). Jun-B differs in its biological properties from, and is a negative regulator of, c-Jun. *Cell*, 59 (6), 979-86.
- Christy, B. A., Lau, L. F., & Nathans, D. (1988). A gene activated in mouse 3T3 cells by serum growth factors encodes a protein with "zinc finger" sequences. *Proc.Natl.Acad.Sci. USA*, 85, 7857-61.
- Christy, B., & Nathans, D. (1989). DNA binding site of the growth factor-inducible protein Zif268. *Proc.Natl.Acad.Sci*, 86, 8737-8741.
- Christy, B., & Nathans, D. (1989). Functional Serum Response Elements Upstream of the Growth Factor-Inducible Gene zif268. *Mol. Cell. Biol.*, 9 (11), 4489-95.



- Cibelli, G., Jüngling, S., Schoch, S., Gerdes, H. H., & Thiel, G. (1996). Identification of a functional cAMP response element in the secretogranin II gene. *Eur J Biochem* , 236 (1), S. 171-9.
- Cibelli, G., Policastro, V., Rössler, O. G., & Thiel, G. (2002). Nitric oxide-induced programmed cell death in human neuroblastoma cells is accompanied by the synthesis of Egr-1, a zinc finger transcription factor. *J Neurosci Res* , 67 (4), S. 450-60.
- Cole, A. J., Saffen, D. W., Baraban, J. M., & Worley, P. F. (1989). Rapid increase of an immediate early gene messenger RNA in hippocampal neurons by synaptic NMDA receptor activation. *Nature* , 340 (6233), 474-6.
- Corbit, K. C., Trakul, N., Eves, E. M., Diaz, B., Marshall, M., & Rosner, M. R. (2003). Activation of Raf-1 signaling by protein kinase C through a mechanism involving Raf kinase inhibitory protein. *278* (15), S. 13061-8.
- Costello, P. S., Nicolas, R. H., Watanabe, Y., Rosewell, I., & Treisman, R. (2004). Ternary complex factor SAP-1 is required for Erk-mediated thymocyte positive selection. *Nat.Immunol.* , 5 (3), 289-98.
- Costes, S., Broca, C., Bertrand, G., Lajoix, A. D., Bataille, D., Bockaert, J., et al. (2006). ERK1/2 control phosphorylation and protein level of cAMP-responsive element-binding protein: a key role in glucose-mediated pancreatic beta-cell survival. *Diabetes* , 55 (8), S. 2220-30.
- Crosby, S. D., Puetz, J. J., Simburger, K. S., Fahrner, T. J., & Milbrandt, J. (1991). The Early Response Gene NGFI-C Encodes a Zinc Finger Transcriptional Activator and Is a Member of the GCGGGGGCG (GSG) Element-Binding Protein Family. *Mol.Cell.Biol.* , 11 (8), 3835-41.
- Crosby, S. D., Veile, R. A., Donis-Keller, H., Baraban, J. M., Bhat, R. V., Simburger, K. S., et al. (1992). Neural-specific expression, genomic structure, and chromosomal localization of the gene encoding the zinc-finger transcription factor NGFI-C. *Proc.Natl.Acad.Sci.* , 89, 4739-43.
- Datta, R., Taneja, N., Sukhatme, V. P., Qureshi, S. A., Weichselbaum, R., & Kufe, D. W. (1993). Reactive oxygen intermediates target CC(A/T)6GG sequence to mediate activation of the early growth response 1 transcription factor gene by ionizing radiation. *Proc.Natl.Acad.Sci.* , 90, 2419-22.
- Daub, H., Wallasch, C., Lankenau, A., Herrlich, A., & Ullrich, A. (1997). Signal characteristics of G protein-transactivated EGF receptor. *EMBO* , 16 (23), 7032-44.
- Daub, H., Weiss, F. U., Wallasch, C., & Ullrich, A. (1996). Role of transactivation of the EGF receptor in signalling by G-protein-coupled receptors. *Nature* , 379, 557-60.
- Davis, P., Ho, A., & Dowdy, S. (2001). Biological methods for cell-cycle synchronization of mammalian cells. *Biotechniques* , 30(6), S. 1322-6, 1328, 1330-1.
- Deak, M., Clifton, A. D., Lucocq, L. M., & Alessi, D. R. (1998). Mitogen- and stress-activated protein kinase-1 (MSK1) is directly activated by MAPK and SAPK2/p38, and may mediate activation of CREB. *EMBO J* , 17 (15), S. 4426-41.
- Derynck, R., Akhurst, R. J., & Balmain, A. (2001). TGF-beta signaling in tumor suppression and cancer progression. *Nat.Genet.* , 29 (2), 117-29.

- Dobkin-Bekman, M., Naidich, M., Pawson, A. J., Millar, R. P., Seger, R., & Naor, Z. (2006). Activation of mitogen-activated protein kinase (MAPK) by GnRH is cell-context dependent. *Mol Cell Endocrinol* , 252 (1-2), S. 184-90.
- Duan, W. R., Ito, M., Park, Y., Maizels, E. T., Hunzicker-Dunn, M., & Jameson, J. L. (2002). GnRH regulates early growth response protein 1 transcription through multiple promoter elements. *Mol Endocrinol.* , 16 (2), S. 221-33.
- DuBridg, R., Tang, P., Hsia, H., Leong, P., Miller, J., & Calos, M. (1987). Analysis of mutation in human cells by using an Epstein-Barr virus shuttle system. *Mol Cell Biol.* , 7(1), S. 379-87.
- Dull, T., Zufferey, R., Kelly, M., Mandel, R. J., Nguyen, M., Trono, D., et al. (1998). A third-generation lentivirus vector with a conditional packaging system. *J Virol* , 11 (72), S. 8463-71.
- Dutta, S., Bonner-Weir, S., Montminy, M., & Wright, C. (1998). Regulatory factor linked to late-onset diabetes? *Nature* , 392, 560.
- Ehrengruber, M. U., Muhlebach, S. G., Söhrman, S., Leutenegger, C. M., Lester, H. A., & Davidson, N. (2000). Modulation of early growth response (EGR) transcription factor-dependent gene expression by using recombinant adenovirus. *Gene* , 258 (1-2), 63-9.
- Eto, K., Kaur, V., & Thomas, M. K. (2006). Regulation of insulin gene transcription by the immediate-early growth response gene Egr-1. *Endocrinology* , 147 (6), S. 2923-35.
- Eto, K., Kaur, V., & Thomas, M. K. (2007). Regulation of Pancreas Duodenum Homeobox-1 Expression by Early Growth Response-1. *J.Biol.Chem.* , 282 (9), 5973-83.
- Falkenstein, E., Tillmann, H. C., Christ, M., Feuring, M., & Wehling, M. (2000). Multiple actions of steroid hormones--a focus on rapid, nongenomic effects. *Pharmacol Rev* , 52 (4), S. 513-56.
- Fan, F., Jin, S., Amundson, S. A., Tong, T., Fan, W., Zhao, H., et al. (2002). ATF3 induction following DNA damage is regulated by distinct signaling pathways and over-expression of ATF3 protein suppresses cells growth. *Oncogene* , 21 (49), 7488-92.
- Fehmann, H., Göke, R., & Göke, B. (1995). Cell and Molecular Biology of the Incretin Hormones Glucagon-Like Peptide-I and Glucose-Dependent Insulin Releasing Polypeptide. *Endocrine Reviews* , 16 (3), 390-410.
- Flood, J. F., Morley, J. E., & Roberts, E. (1992). Memory-enhancing effects in male mice of pregnenolone and steroids metabolically derived from it. *Proc.Natl.Acad.Sci.* , 89, 1567-71.
- Flood, J. F., Morley, J. E., & Roberts, E. (1995). Pregnenolone sulfate enhances post-training memory processes when injected in very low doses into limbic system structures: The amygdala is by far the most sensitive. *Proc.Natl.Acad.Sci.* , 92, 10806-10.
- Folkman, J., & Klagsbrun, M. (1987). Angiogenic factors. *Science* , 235 (4787), 442-7.
- Fried, M., & Crothers, D. M. (1981). Equilibria and kinetics of lac repressor-operator interactions by polyacrylamide gel electrophoresis. *Nucleic Acids Res.* , 9, 6505-25.
- Frödin, M., Sekine, N., Roche, E., Filloux, C., Prentki, M., Wollheim, C. B., et al. (1995). Glucose, other secretagogues, and nerve growth factor stimulate mitogen-activated protein kinase in the insulin-secreting beta-cell line, INS-1. *J Biol Chem* , 270 (14), S. 7882-9.

- Fu, M., Zhu, X., Zhang, J., Liang, J., Lin, Y., Zhao, L., et al. (2003). Egr-1 target genes in human endothelial cells identified by microarray analysis. *Gene* , 315, S. 33-41.
- Gashler, A. L., Swaminathan, S., & Sukhatme, V. P. (1993). A Novel Repression Module, an Extensive Activation Domain, and a Bipartite Nuclear Localization Signal Defined in the Immediate-Early Transcription Factor Egr-1. *Mol.Cell.Biol.* , 13 (8), 4556-71.
- Gashler, A., & Sukhatme, V. P. (1995). Early growth response protein 1 (Egr-1): prototype of a zinc-finger family of transcription factors. *Prog.Nucleic Acid Res.Mol.Biol.* , 50, 191-224.
- George, M. S., Guidotti, A., Rubinow, D., Pan, B., Mikalauskas, K., & Post, R. M. (1994). CSF neuroactive steroids in affective disorders: pregnenolone, progesterone, and DBI. *Biol.Psychiatry* , 35 (10), 775-80.
- Graham, F., Smiley, J., Russel, W., & Nairn, R. (1977). Characteristics of a Human Cell Line Transformed by DNA from Human Adenovirus Type 5. *J. gen. Virol.* , 36, S. 59-72.
- Gratzner, H. G. (1982). Monoclonal antibody to 5-bromo- and 5-iododeoxyuridine: A new reagent for detection of DNA replication. *Science* , 218 (4571), S. 474-5.
- Greenblatt, M. S., Bennett, W. P., Hollstein, M., & Harris, C. C. (1994). Mutations in the p53 tumor suppressor gene: clues to cancer etiology and molecular pathogenesis. *Cancer Res.* , 54 (18), 4855-78.
- Grimm, C., Kraft, R., Sauerbruch, S., Schultz, G., & Harteneck, C. (2003). Molecular and functional characterization of the melastatin-related cation channel TRPM3. *J Biol Chem* , 278 (24), S. 21493-501.
- Grosse, R., Roelle, S., Herrlich, A., Höhn, J., & Gudermann, T. (2000). Epidermal growth factor receptor tyrosine kinase mediates Ras activation by gonadotropin-releasing hormone. *J Biol Chem* , 275 (16), S. 12251-60.
- Gupta, P., & Prywes, R. (2002). ATF1 phosphorylation by the ERK MAPK pathway is required for epidermal growth factor-induced c-jun expression. *J Biol Chem* , 277 (52), S. 50550-6.
- Hagemann, C., & Rapp, U. R. (1999). Isotype-specific functions of Raf kinases. *Exp Cell Res* , 253 (1), S. 34-46.
- Hai, T., Wolfgang, C. D., Marsee, D. K., Allen, A. E., & Sivaprasad, U. (1999). ATF3 and stress responses. *Gene Expr.* , 7 (4-6), S. 321-35.
- Hallahan, D. E., Dunphy, E., Virudachalam, S., Sukhatme, V. P., Kufe, D. W., & Weichselbaum, R. R. (1995). C-jun and Egr-1 participate in DNA synthesis and cell survival in response to ionizing radiation exposure. *J.Biol.Chem.* , 270 (51), 30303-9.
- Hallahan, D. E., Sukhatme, V. P., Sherman, M. L., Virudachalam, S., Kufe, D., & Weichselbaum, R. R. (1991). Protein kinase C mediates x-ray inducibility of nuclear signal transducers EGR1 and JUN. *Proc.Natl.Acad.Sci.* , 88 (6), 2156-60.
- Halvorson, L. M., Kaiser, U. B., & Chin, W. W. (1999). The protein kinase C system acts through the early growth response protein 1 to increase LHbeta gene expression in synergy with steroidogenic factor-1. *Mol Endocrinol* , 13 (1), S. 106-16.

- Harris, D., Chuderland, D., Bonfil, D., Kraus, S., Seger, R., & Naor, Z. (2003). Extracellular Signal-Regulated Kinase and c-Src, But Not Jun N-Terminal Kinase, Are Involved in Basal and Gonadotropin-Releasing Hormone-Stimulated Activity of the Glycoprotein Hormone alpha-Subunit Promoter. *Endocrinol* , 144 (2), S. 612-22.
- Harris, D., Chuderland, D., Bonfil, D., Kraus, S., Seger, R., & Noar, Z. (2003). Extracellular signal-regulated kinase and c-Src, but not Jun N-terminal kinase, are involved in basal and gonadotropin-releasing hormone-stimulated activity of the glycoprotein hormone alpha-subunit promoter. *Endocrinology* , 144 (2), 612-22.
- Hazzalin, C. A., Le Panse, R., Cano, E., & Mahadevan, L. C. (1998). Anisomycin selectively desensitizes signalling components involved in stress kinase activation and fos and jun induction. *Mol Cell Biol* , 18 (4), S. 1844-54.
- Henninghausen, L., & Lubon, H. (1987). Interaction of protein with DNA in vitro. *Methods Enzymol.* , 152, 721-35.
- Hofer, G., Grimmer, C., Sukhatme, V. P., Sterzel, R. B., & Rupperecht, H. D. (1996). Transcription factor Egr-1 regulates glomerular mesangial cell proliferation. *J.Biol.Chem.* , 271 (45), 28306-10.
- Holland, A. M., Hale, M. A., Kagami, H., Hammer, R. E., & MacDonald, R. J. (2002). Experimental control of pancreatic development and maintenance. *Proc.Natl.Acad.Sci.* , 99, 12236-41.
- Holland, E. C., & Varmus, H. E. (1998). Basic fibroblast growth factor induces cell migration and proliferation after glia-specific gene transfer in mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* , 95 (3), S. 1218-23.
- Hu, R. M., & Levin, E. R. (1994). Astrocyte growth is regulated by neuropeptides through Tis 8 and basic fibroblast growth factor. *J.Clin.Invest.* , 93 (4), 1820-7.
- Huang, R. P., Fan, Y., de Belle, I., Niemeyer, C., Gottardis, M. M., Mercola, D., et al. (1997). Decreased Egr-1 expression in human, mouse and rat mammary cells and tissues correlates with tumor formation. *Int.J.Cancer* , 72 (1), 102-9.
- Huang, R. P., Liu, C., Fan, Y., Mercola, D., & Adamson, E. D. (1995). Egr-1 negatively regulates human tumor cell growth via the DNA-binding domain. *Cancer Res.* , 55, 5054-62.
- Inoue, K., Zama, T., Kamimoto, T., Aoki, R., Ikeda, Y., Kimura, H., et al. (2004). TNFalpha-induced ATF3 expression is bidirectionally regulated by the JNK and ERK pathways in vascular endothelial cells. *Genes Cells* , 9 (1), S. 59-70.
- James, A. B., Conway, A. M., & Morris, B. J. (2006). Regulation of the Neuronal Proteasome by Zif268 (Egr1). *J.Neurosci.* , 26, 1624-34.
- Johnson, C. M., Hill, C. S., Chawla, S., Treisman, R., & Bading, H. (1997). Calcium controls gene expression via three distinct pathways that can function independently of the Ras/mitogen-activated protein kinases (ERKs) signaling cascade. *J Neurosci* , 17 (16), S. 6189-202.
- Johnson, J. D., Ahmed, N. T., Luciani, D. S., Han, Z., Tran, H., Fujita, J., et al. (2003). Increased islet apoptosis in Pdx1+/- mice. *J.Clin.Invest.* , 111, 1147-1160.

- Jones, M. W., Errington, M. L., French, P. J., Fine, A., Bliss, T. V., Garel, S., et al. (2001). A requirement for the immediate early gene Zif268 in the expression of late LTP and long-term memories. *Nat.Neurosci.* , 4 (3), 289-96.
- Jonsson, J., Carlsson, L., Edlund, T., & Edlund, H. (1994). Insulin-promoter-factor 1 is required for pancreas development in mice. *Nature* , 371, 606-9.
- Josefsen, K., Sorensen, L. R., Buschard, K., & Birkenbach, M. (1999). Glucose induces early growth response gene (Egr-1) expression in pancreatic beta cells. *Diabetologia* , 42 (2), S. 195-203.
- Joseph, L. J., Le Beau, M. M., Jamieson, G. A., Acharya, S., Shows, T. B., Rowley, J. D., et al. (1988). Molecular cloning, sequencing, and mapping of Egr2, a human early growth response gene encoding a protein with "zinc-binding finger" structure. *Proc.Natl.Acad.Sci.* , 85, 7164-8.
- Joseph-Silverstein, J., Consigli, S. A., Lyser, K. M., & Ver Pault, C. (1989). Basic fibroblast growth factor in the chick embryo: immunolocalization to striated muscle cells and their precursors. *J.Cell.Biol.* , 108 (6), 2459-66.
- Jüngling, S., Cibelli, G., Czardybon, M., Gerdes, H. H., & Thiel, G. (1994). Differential regulation of chromogranin B and synapsin I gene promoter activity by cAMP and cAMP-dependent protein kinase. *Eur J Biochem* , 226 (3), S. 925-35.
- Kaneto, H., Miyatsuka, T., Kawamori, D., Yamamoto, K., Kato, K., Shiraiwa, T., et al. (2007). PDX-1 and MafA Play a Crucial Role in Pancreatic beta-Cell Differentiation and Maintenance of Mature beta-Cell Function. *Endocr J* .
- Kaufmann, K., & Thiel, G. (2001). Epidermal growth factor and platelet-derived growth factor induce expression of Egr-1, a zinc finger transcription factor, in human malignant glioma cells. *J.Neurol.Sci.* , 189, 83-91.
- Kaufmann, K., & Thiel, G. (2002). Epidermal growth factor and thrombin induced proliferation of immortalized human keratinocytes is coupled to the synthesis of Egr-1, a zinc finger transcriptional regulator. *J.Cell.Biochem.* , 85 (2), 381-91.
- Keyse, S. M. (1998). Protein phosphatases and the regulation of MAP kinase activity. *Semin Cell Dev Biol.* , 9 (2), S. 143-52.
- Khachigian, L. M., Anderson, K. R., Halnon, N. J., Gimbrone, M. A., Resnick, N., & Collins, T. (1997). Egr-1 is activated in endothelial cells exposed to fluid shear stress and interacts with a novel shear-stress-response element in the PDGF A-chain promoter. *Arterioscler.Thromb.Vasc.Biol.* , 17 (10), 2280-6.
- Khachigian, L. M., Williams, A. J., & Collins, T. (1995). Interplay of Sp1 and Egr-1 in the proximal platelet-derived growth factor A-chain promoter in cultured vascular endothelial cells. *J.Biol.Chem* , 270 (46), 27679-86.
- Kirsch, K. H., Korradi, Y., & Johnson, J. P. (1996). Mader: a novel nuclear protein over expressed in human melanomas. *Oncogene* , 12, 963-71.
- Ko, S. W., Vadakkan, K. I., Ao, H., Gallitano-Mendel, A., Wei, F., Milbrandt, J., et al. (2005). Selective contribution of Egr1 (zif/268) to persistent inflammatory pain. *J.Pain* , 6, 12-20.

- Kolch, W., Heidecker, G., Kochs, G., Hummel, R., Vahidi, H., Mischak, H., et al. (1993). Protein kinase C alpha activates RAF-1 by direct phosphorylation. *Nature*, *364* (6434), S. 249-52.
- Kool, J., Hamdi, M., Cornelissen-Steijger, P., van der Eb, A. J., Terleth, C., & van Dam, H. (2003). Induction of ATF3 by ionizing radiation is mediated via a signaling pathway that includes ATM, Nibrin1, stress-induced MAPkinases and ATF-2. *Oncogene*, *22* (27), S. 4235-42.
- Krämer, B., Meichle, A., Hensel, G., Charnay, P., & Krönke, M. (1994). Characterization of an Krox-24/Egr-1-responsive element in the human tumor necrosis factor promoter. *Biochim Biophys Acta*, *1219* (2), 413-21.
- Kumbrink, J., Gerlinger, M., & Johnson, J. P. (2005). Egr-1 induces the expression of its corepressor nab2 by activation of the nab2 promoter thereby establishing a negative feedback loop. *J.Biol.Chem.*, *280*, 42785-93.
- Kuo, M., & Allis, C. (1999). In vivo cross-linking and immunoprecipitation for studying dynamic Protein:DNA associations in a chromatin environment. *Methods*, *19*(3), S. 425-33.
- Landström, M., Heldin, N. E., Bu, S., Harmansson, A., Itoh, S., ten Dijke, P., et al. (2000). Smad7 mediates apoptosis induced by transforming growth factor beta in prostatic carcinoma cells. *Curr.Biol.*, *10* (9), 535-8.
- Lania, A., Filopanti, M., Corbetta, S., Losa, M., Ballaré, E., Beck-Peccoz, P., et al. (2003). Effects of hypothalamic neuropeptides on extracellular signal-regulated kinase (ERK1 and ERK2) cascade in human tumoral pituitary cells. *J Clin Endocrinol Metab*, *88* (4), S. 1692-6.
- Lee, J. L., Everitt, B. J., & Thomas, K. L. (2004). Independent cellular processes for hippocampal memory consolidation and reconsolidation. *Science*, *304* (5672), 839-43.
- Lee, K. Y., & Bae, S. (2002). TGF-beta dependent Cell Growth Arrest and Apoptosis. *J.Biochem.Mol.Biol.*, *35* (1), 47-53.
- Lee, S. L., Sadovsky, Y., Swirnoff, A. H., Polish, J. A., Goda, P., Gavrulina, G., et al. (1996). Luteinizing hormone deficiency and female infertility in mice lacking the transcription factor NGFI-A (Egr-1). *Science*, *273* (5279), S. 1219-21.
- Lee, Y. S., Jang, H. S., Kim, J. M., Lee, J. S., Lee, J. Y., Li Kim, K., et al. (2005). Adenoviral-mediated delivery of early growth response factor-1 gene increases tissue perfusion in a murine model of hindlimb ischemia. *Mol Ther*, *12* (2), S. 328-36.
- Leicht, D. T., Balan, V., Kaplun, A., Singh-Gupta, V., Kaplun, L., Dobson, M., et al. (2007). Raf kinases: function, regulation and role in human cancer. *Biochim.Biophys.Acta.*, *1773*, 1193-212.
- Lemaire, P., Revelant, O., Bravo, R., & Charnay, P. (1988). Two mouse genes encoding potential transcription factors with identical DNA-binding domains are activated by growth factors in cultured cells. *Proc.Natl.Acad.Sci.*, *85*, 4691-96.
- Lemaire, P., Vesque, C., Schmitt, J., Stunnenberg, H., Frank, R., & Charnay, P. (1990). The Serum-Inducible Mouse Gene Krox-24 Encodes a Sequence-Specific Transcriptional Activator. *Mol.Cell.Biol.*, *10* (7), 3456-3467.

- Li, J., Yen, C., Liaw, D., Podsypanina, K., Bose, S., Wang, S. I., et al. (1997). PTEN, a putative protein tyrosine phosphatase gene mutated in human brain, breast, and prostate cancer. *Science* , 275 (5308), 1943-7.
- Liao, Y., Shikapwahya, O. N., Shteyer, E., Dieckgraefe, B. K., Hruz, P. W., & Rudnick, D. A. (2004). Delayed hepatocellular mitotic progression and impaired liver regeneration in early growth response-1-deficient mice. *J.Biol.Chem.* , 279 (41), 43107-16.
- Lim, R. W., Varnum, B. C., & Herschman, H. R. (1987). Cloning of tetradecanoyl phorbol ester-induced 'primary response' sequences and their expression in density-arrested Swiss 3T3 cells and a TPA non-proliferative variant. *Oncogene* , 1 (3), 263-70.
- Liu, C., Adamson, E., & Mercola, D. (1996). Transcription factor EGR-1 suppresses the growth and transformation of human HT-1080 fibrosarcoma cells by induction of transforming growth factor beta 1. *Proc.Natl.Acad.Sci.* , 93 (21), 11831-6.
- Liu, C., Yao, J., de Belle, I., Huang, R. P., Adamson, E., & Mercola, D. (1999). The transcription factor Egr-1 suppresses transforming of human fibrosarcoma HT1080 cells by coordinating induction of transforming growth factor-beta1, fibronectin, and plasminogen activator inhibitor-1. *J Biol Chem* , 274 (7), S. 4400-11.
- Liu, F., Austin, D. A., Mellon, P. L., Olefsky, J. M., & Webster, N. J. (2002). GnRH activates ERK1/2 leading to the induction of c-fos and LHbeta protein expression in LbetaT2 cells. *Mol Endocrinol.* , 16 (3), S. 419-34.
- Locksley, R. M., Killeen, N., & Lenardo, M. J. (2001). The TNF and TNF receptor superfamilies: integrating mammalian biology. *Cell* , 104 (4), 487-501.
- Lois, C., Hong, E. J., Pease, S., Brown, E. J., & Baltimore, D. (2002). Germline Transmission and Tissue-Specific Expression of Transgenes Delivered by Lentiviral Vectors. *Science* , 295, 868-72.
- Longuet, C., Bronca, A., Costes, S., Hani, E. H., Bataille, D., & Dalle, S. (2005). Extracellularly regulated kinases 1/2 (p44/42 mitogen-activated protein kinases) phosphorylate synapsin I and regulate insulin secretion in the MIN6 beta-cell line and islets of Langerhans. *Endocrinology* , 146 (2), 643-54.
- Losel, R. M., Falkenstein, E., Feuring, M., Schultz, A., Tillmann, H. C., Rossol-Hasenroth, K., et al. (2003). nomic steroid action: controversies, questions, and answers. *Physiol Rev* , 83 (3), S. 965-1016.
- Lu, D., Chen, J., & Hai, T. (2007). The regulation of ATF3 gene expression by mitogen-activated protein kinases. *Biochem J* , 401 (2), S. 559-67.
- Lu, Y., Lin, Y. Z., LaPushin, R., Cuevas, B., Fang, X., Yu, S. X., et al. (1999). The PTEN/MMAC1/TEP tumor suppressor gene decreases cell growth and induces apoptosis and anoikis in breast cancer cells. *Oncogene* , 18 (50), 7034-45.
- Mahapatra, N. R., Mahata, M., Ghosh, S., Gayen, J. R., O'Connor, D. T., & Mahata, S. K. (2006). Molecular basis of neuroendocrine cell type-specific expression of the chromogranin B gene: Crucial role of the transcription factors CREB, AP-2, Egr-1 and Sp1. *J. Neurochem.* , 99 (1), 119-33.

- Mahapatra, N. R., Mahata, M., Ghosh, S., Gayen, J. R., O'Connor, D. T., & Mahata, S. K. (2006). Molecular basis of neuroendocrine cell type-specific expression of the chromogranin B gene: Crucial role of the transcription factors CREB, AP-2, Egr-1 and Sp1. *J.Neurochem.* , 99, 119-33.
- Majewska, M. D., & Schwartz, R. D. (1987). Pregnenolone-sulfate: an endogenous antagonist of the gamma-aminobutyric acid receptor complex in brain? *Brain Res.* , 404 (1-2), 355-60.
- Marais, R., Wynne, J., & Treisman, R. (1993). The SRF accessory protein Elk-1 contains a growth factor-regulated transcriptional activation domain. *Cell* , 73 (2), S. 381-93.
- Margolis, B., & Skolnik, E. Y. (1994). Activation of Ras by Receptor Tyrosine Kinases. *J.Am.Soc.Nephrol.* , 5, 1288-99.
- Marshak, S., Totary, H., Cerasi, E., & Melloul, D. (1996). Purification of the beta-cell glucose-sensitive factor that transactivates the insulin gene differentially in normal and transformed islet cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* , 93 (26), S. 15057-62.
- Marx, C. E., Stevens, R. D., Shampine, L. J., Uzunova, V., Trost, W. T., Butterfield, M. I., et al. (2006). Neuroactive steroids are altered in schizophrenia and bipolar disorder: relevance to pathophysiology and therapeutics. *Neuropsychopharmacology* , 31 (6), 1249-63.
- Mashima, T., Udagawa, S., & Tsuruo, T. (2001). Involvement of transcriptional repressor ATF3 in acceleration of caspase protease activation during DNA damaging agent-induced apoptosis. *J.Cell.Physiol.* , 188 (3), 352-8.
- Massague, J. (1998). TGF-beta signal transduction. *Annu.Rev.Biochem.* , 67, 753-91.
- Matheny, C., Day, M. L., & Milbrandt, J. (1994). The Nuclear Localization Signal of NGFI-A Is Located within the Zinc Finger DNA Binding Domain. *J.Biol.Chem.* , 269 (12), 8175-81.
- Matsumoto, K., Ebihara, K., Yamamoto, H., Tabuchi, H., Fukunaga, K., Yasunami, M., et al. (1999). Cloning from insulinoma cells of synapsin I associated with insulin secretory granules. *J Biol Chem* , 274 (4), S. 2053-9.
- McMahon, S. B., & Monroe, J. G. (1996). The role of early growth response gene 1 (egr-1) in regulation of the immune response. *J.Leukoc.Biol.* , 60, 159-66.
- Melloul, D. (2004). Transcription factors in islet development and physiology: role of PDX-1 in beta-cell function. *Ann N Y Acad Sci* , S. 28-37.
- Mercer, K. E., & Pritchard, C. A. (2003). Raf proteins and cancer: B-Raf is identified as a mutational target. *Biochim Biophys Acta* , 1653 (1), S. 25-40.
- Merrill, G. (1998). Cell synchronization. *Methods Cell Biol.* , 57, S. 229-49.
- Meyer, R. G., Küpper, J. H., Kandolf, R., & Rodemann, H. P. (2002). Early growth response-1 gene (Egr-1) promoter induction by ionizing radiation in U87 malignant glioma cells in vitro. *Eur J Biochem* , 269 (1), S. 337-46.
- Milbrandt, J. (1987). A nerve growth factor-induced gene encodes a possible transcriptional regulatory factor. *Science* , 238, 797-9.



- Mitchell, A., Dass, C. R., Sun, L. Q., & Khachigian, L. M. (2004). Inhibition of human breast carcinoma proliferation, migration, chemoinvasion and solid tumour growth by DNazymes targeting the zinc finger transcription factor EGR-1. *Nucleic Acids Res.* , 32 (10), 3065-9.
- Miyazaki, J., Araki, K., Yamato, E., Ikegami, H., Asano, T., Shibasaki, Y., et al. (1990). Establishment of a pancreatic beta cell line that retains glucose-inducible insulin secretion: special reference to expression of glucose transporter isoforms. *Endocrinology* , 127 (1), S. 126-32.
- Müller, H., Skerka, C., Bialonski, A., & Zipfel, P. F. (1991). Clone pAT 133 identifies a gene that encodes another human member of a class of growth factor-induced genes with almost identical zinc-finger domains. *Proc.Natl.Acad.Sci.* , 88, 10079-83.
- Mulvaney, J. M., & Roberson, M. S. (2000). Divergent signaling pathways requiring discrete calcium signals mediate concurrent activation of two mitogen-activated protein kinases by gonadotropin-releasing hormone. *J Biol Chem* , 175 (19), S. 14182-9.
- Myers, M. P., Pass, I., Batty, I. H., Van der Kaay, J., Stolarov, J. P., Hemmings, B. A., et al. (1998). The lipid phosphatase activity of PTEN is critical for its tumor supressor function. *Proc.Natl.Acad.Sci.* , 95 (23), 13513-8.
- Neithardt, A., Farshori, M. P., Shah, F. B., Catt, K. J., & Shah, B. H. (2006). Dependence of GnRH-induced phosphorylation of CREB and BAD on EGF receptor transactivation in GT1-7 neuronal cells. *J Cell Physiol* , 208 (3), S. 586-93.
- Nishi, H., Nishi, K. H., & Johnson, A. C. (2002). Early Growth Response-1 gene mediates up-regulation of epidermal growth factor receptor expression during hypoxia. *Cancer Res.* , 62 (3), 827-34.
- Oberwinkler, J. (2007). TRPM3, a biophysical enigma? *Biochem Soc Trans* , 35 (1), S. 89-90.
- Oberwinkler, J., Lis, A., Giehl, K. M., Flockerzi, V., & Philipp, S. E. (2005). Alternative splicing switches the divalent cation selectivity of TRPM3 channels. *J Biol Chem* , 280 (23), S. 22540-8.
- O'Donovan, K. J., Tourtellotte, W. G., Millbandt, J., & Baraban, J. M. (1999). The EGR family of transcription-regulatory factors: progress at the interface of molecular and systems neuroscience. *Trends Neurosci* , 22, 167-73.
- Ohsugi, M., Cras-Méneur, C., Zhou, Y., Warren, W., Bernal-Mizrachi, E., & Permutt, M. A. (2004). Glucose and insulin treatment of insulinoma cells results in transcriptional regulation of a common set of genes. *Diabetes* (53), S. 1496-508.
- Patwardhan, S., Gashler, A., Siegel, M. G., Chang, L. C., Joseph, L. J., Shows, T. B., et al. (1991). Egr-3, a novel member of the Egr family of genes encoding immediate-early transcription factors. *Oncogene* , 6 (6), 917-28.
- Pavletich, N. P., & Pabo, C. O. (1991). Zinc finger-DNA recognition: crystal structure of a Zif268-DNA complex at 2.1 Å. *Science* , 252 (5007), 809-17.
- Peng, Y., Du, K., Ramirez, S., Diamond, R. H., & Taub, R. (1999). Mitogenic up-regulation of the PRL-1 protein-tyrosine phosphatase gene by Egr-1. Egr-1 activation is an early event in liver regeneration. *J.Biol.Chem.* , 274, 4513-20.

- Perez-Castillo, A., Pipaon, C., Garcia, I., & Alemany, S. (1993). NGFI-A gene expression is necessary for T lymphocyte proliferation. *J.Biol.Chem.* , 268 (26), 19445-50.
- Prentki, M., & Matschinsky, F. M. (1987). Ca<sup>2+</sup>, cAMP, and phospholipid-derived messengers in coupling mechanisms of insulin secretion. *Physiol.Rev.* , 67 (4), 1185-248.
- Rajan, A. S., Aguilar-Bryan, L., Nelson, D. A., Yaney, G. C., Hsu, W. H., Kunze, D. L., et al. (1990). Ion channels and insulin secretion. *Diabetes Care.* , 13 (3), 340-63.
- Rea, S., Eisenhaber, F., O'Carroll, D., Strahl, B. D., Sun, Z. W., Schmid, M., et al. (2000). Regulation of chromatin structure by site-specific histone H3 methyltransferases. *Nature* , 406 (6796), S. 579-80.
- Reiser, J., Harmison, G., Kluepfel-Stahl, S., Brady, R. O., Karlsson, S., & Schubert, M. (1996). Transduction of nondividing cells using pseudotyped defective high-titer HIV type 1 particles. *Proc Natl Acad Sci U S A* , 93 (26), S. 15266-71.
- Reiss, N., Llevi, L. N., Shacham, S., Harris, D., Seger, R., & Naor, Z. (1997). Mechanism of mitogen-activated protein kinase activation by gonadotropin-releasing hormone in the pituitary of alphaT3-1 cell line: differential roles of calcium and protein kinase C. *Endocrinology* , 138 (4), S. 1673-82.
- Riboni, L., Viani, P., Bassi, R., Giussani, P., & Tettamanti, G. (2001). Basic fibroblast growth factor-induced proliferation of primary astrocytes. evidence for the involvement of sphingomyelin biosynthesis. *J Biol Chem* , 276 (16), S. 12797-804.
- Rifkin, D. B., & Moscatelli, D. (1989). Recent developments in the cell biology of basic fibroblast growth factor. *J.Cell.Biol.* , 109 (1), 1-6.
- Ritsner, M., Maayan, R., Gibel, A., & Weizman, A. (2007). Differences in blood pregnenolone and dehydroepiandrosterone levels between schizophrenia patients and healthy subjects. *Eur.Neuropsychopharmacol.* , 17 (%), 358-65.
- Roberson, M. S., Bliss, S. P., Xie, J., Navratil, A. M., Farmerie, T. A., Wolfe, M. W., et al. (2005). Gonadotropin-releasing hormone induction of extracellular-signal regulated kinase is blocked by inhibition of calmodulin. *Mol Endocrinol* , 19 (9), S. 2412-23.
- Roberson, M. S., Zhang, T., Li, H. L., & Mulvaney, J. M. (1999). Activation of the p38 mitogen-activated protein kinase pathway by gonadotropin-releasing hormone. *Endocrinology* , 140 (3), S. 1310-8.
- Rolli, M., Kotlyarov, A., Sakamoto, K. M., Gaestel, M., & Neiningner, A. (1999). Stress-induced stimulation of early growth response gene-1 by p38/stress-activated protein kinase 2 is mediated by a cAMP-responsive promoter element in a MAPKAP kinase 2-independent manner. *J Biol Chem* , 274 (28), S. 19559-64.
- Rössler, O. G., & Thiel, G. (2004). Brain-derived neurotrophic factor-, epidermal growth factor-, or A-Raf-induced growth of HaCaT keratinocytes requires extracellular signal-regulated kinase. *Am.J.Physiol.Cell Physiol.* , 285 (5), 1118-29.
- Rössler, O. G., Henss, I., & Thiel, G. (2008). Transcriptional response to muscarinic acetylcholine receptor stimulation: regulation of Egr-1 biosynthesis by ERK, Elk-1, MKP-1, and calcineurin in carbachol-stimulated human neuroblastoma cells. *Arch Biochem Biophys* , 470 (1), S. 93-102.

- Rössler, O. G., Stefano, L., Bauer, I., & Thiel, G. (2006). Stimulus-transcription coupling in the nervous system - The zinc finger protein Egr-1. (G. Weinheim, Hrsg.) *Thiel, G (Ed.) Transcription factors in die nervous system - Development, brain function and disease.* , S. 379-395.
- Rotello, R. J., Lieberman, R. C., Purchio, A. F., & Gerschenson, L. E. (1991). Coordinated regulation of apoptosis and cell proliferation by transforming growth factor beta 1 in cultured uterine epithelial cells. *Proc.Natl.Acad.Sci* , 88 (8), 3412-5.
- Rusnak, F., & Mertz, P. (2000). Calcineurin: form and function. *Physiol Rev* , 80 (4), S. 1483-521.
- Russo, M. W., Sevetson, B. R., & Milbrandt, J. (1995). Identification of NAB1, a repressor of NGFI-A- and Krox20- mediated transcription. *Proc.Natl.Acad.Sci* , 92, 6873-77.
- Saiki, R., Gelfand, D., Stoffel, S., Scharf, S., Higuchi, R., Horn, G., et al. (1988). Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. *Science* , 239(4839) (29), S. 487-91.
- Sakamoto, K. M., Bardeleben, C., Yates, K. E., Raines, M. A., Golde, D. W., & Gasson, J. C. (1991). 5' upstream sequence and genomic structure of the human primary response gene, Egr-1/TIS8. *Oncogene* , 5, 867-71.
- Santos-Rosa, H., Schneider, R., Bannister, A. J., Sherriff, J., Bernstein, B. E., Emre, N. C., et al. (2002). Active genes are tri-methylated at K4 of histone H3. *Nature* , 419 (6905), S. 407-11.
- Schönwasser, D. C., Marais, R. M., Marshall, C. J., & Parker, P. J. (1998). Activation of the mitogen-activated protein kinase/extracellular signal-regulated kinase pathway by conventional, novel, and atypical protein kinase C isotypes. *Mol Cell Biol.* , 18 (2), S. 790-8.
- Schwitzgebel, V. M., Mamin, A., Brun, T., Ritz-Laser, B., Zaiko, M., Maret, A., et al. (2003). Agenesis of Human Pancreas due to Decreased Half-Life of Insulin Promoter Factor 1. *J.Clin.Endo.Met* , 88 (9), 4398-406.
- Semeniuk, T., Jhangri, G. S., & Le Melleo, J. M. (2001). Neuroactive steroid levels in patients with generalized anxiety disorder. *J.NeuropsychiatryClin.Neurosci.* , 13 (3), 396-8.
- Sgambato, V., Vanhoutte, P., Pagès, C., Rogard, M., Hipskind, R., Besson, M. J., et al. (1998). In vivo expression and regulation of Elk-1, a target of the extracellular-regulated kinase signaling pathway, in the adult rat brain. *J Neurosci* , 18 (1), S. 214-26.
- Shah, B. H., Neithardt, A., Chu, D. B., Shah, F. B., & Catt, K. J. (2006). Role of EGF receptor transactivation in phosphoinositide 3-kinase-dependent activation of MAP kinase by GPCRs. *J Cell Physiol* , 206 (1), S. 47-57.
- Shah, B. H., Soh, J. W., & Catt, K. J. (2003). Dependence of gonadotropin-releasing hormone-induced neuronal MAPK signaling on epidermal growth factor receptor transactivation. *J Biol Chem* , 278 (5), S. 2866-75.
- Shenoy, A. R., & Visweswariah, S. S. (2003). Site-directed mutagenesis using a single mutagenic oligonucleotide and DpnI digestion of template DNA. *Anal.Biochem.* , 319, 335-6.
- Simpson, L., & Parsons, R. (2001). PTEN: life as a tumor suppressor. *Exp.Cell.Res.* , 29-41.

- Sirven, A., Pflumio, F., Zennou, V., Titeux, M., Vainchenker, W., Coulombel, L., et al. (2000). The human immunodeficiency virus type-1 central DNA flap is a crucial determinant for lentiviral vector nuclear import and gene transduction of human hematopoietic stem cells. *Blood*, *96* (13), S. 4103-10.
- Slack, J. M., Isaacs, H. V., & Darlington, B. G. (1988). Inductive effects of fibroblast growth factor and lithium ion on *Xenopus* blastula ectoderm. *Development*, *103* (3), 581-90.
- Smith, C. L., & Hager, G. L. (1997). Transcriptional regulation of mammalian genes in vivo. A tale of two templates. *J Biol Chem*, *272* (44), S. 27493-6.
- Sobczak, I., Galabova-Kovacs, G., Sadzak, I., Kren, A., Christofori, G., & Baccarini, M. (2008). B-Raf is required for ERK activation and tumor progression in a mouse model of pancreatic beta-cell carcinogenesis. *Oncogene*, *27*, 4779-87.
- Steck, P. A., Pershouse, M. A., Jasser, S. A., Yung, W. K., Lin, H., Ligon, A. H., et al. (1997). Identification of a candidate tumour suppressor gene, MMAC1, at chromosome 10q23.3 that is mutated in multiple advanced cancers. *Nat.Genet.*, *15* (4), 356-62.
- Stefano, L., Al Sarraj, J., Rössler, O. G., Vinson, C., & Thiel, G. (2006). Up-regulation of tyrosine hydroxylase gene transcription by tetradecanoylphorbol acetate is mediated by the transcription factors Ets-like protein-1 (Elk-1) and Egr-1. *J Neurochem.*, *97* (1), 92-104.
- Stefano, L., Rössler, O. G., Griesemer, D., Hoth, M., & Thiel, G. (2007). P2X7 receptor stimulation upregulates Egr-1 biosynthesis involving a cytosolic Ca<sup>2+</sup> rise, transactivation of the EGF receptor and phosphorylation of ERK and Elk-1. *J.Cell.Physiol.*, *213* (1), 36-44.
- Steinmüller, L., Cibelli, G., Moll, J. R., Vinson, C., & Thiel, G. (2001). Regulation and composition of activator protein 1 (AP-1) transcription factors controlling collagenase and c-Jun promoter activities. *Biochem J.*, *360* (3), 599-607.
- Sukhatme, V. P., Cao, X. M., Chang, L. C., Tsau-Morris, C. H., Stamenkovich, D., Ferreira, P. C., et al. (1988). A zinc finger-encoding gene coregulated with c-fos during growth and differentiation, and after cellular depolarization. *Cell*, *53* (1), S. 37-43.
- Sun, H., Tonks, N. K., & Bar-Sagi, D. (1994). Inhibition of Ras-induced DNA synthesis by expression of the phosphatase MKP-1. *Science*, *266*, 285-8.
- Svaren, J., Ehrig, T., Abdulkadir, S. A., Ehrenguber, M. U., Watson, M. A., & Milbrand, J. (2000). EGR1 target genes in prostate carcinoma cells identified by microarray analysis. *J Biol Chem*, *275* (49), S. 38524-31.
- Svaren, J., Sevetson, B. R., Apel, E. D., Zimonjic, D. B., Popescu, N. C., & Milbrandt, J. (1996). NAB2, ca Corepressor of NGFI-A (Egr-1) and Krox20, Is Induced by Proliferative and Differentiative Stimuli. *Mol.Cell.Biol.*, *16* (7), 3545-53.
- Swirnoff, A. H., Apel, E. D., Svaren, J., Sevetson, B. R., Zimonjic, D. B., Popescu, N. C., et al. (1998). Nab1, a Corepressor of NGFI-A (Egr-1), Contains an Active Transcriptional Repression Domain. *Mol.Cell.Biol.*, *18* (1), 512-24.
- Tabuchi, H., Yamamoto, H., Matsumoto, K., Ebihara, K., Takeuchi, Y., Fukunaga, K., et al. (2000). Regulation of insulin secretion by overexpression of Ca<sup>2+</sup>/calmodulin-dependent protein kinase II in insulinoma MIN6 cells. *Endocrinology*, *141* (7), S. 2350-60.

- Tanoue, T., Moriguchi, T., & Nishida, E. (1999). Molecular Cloning and Characterization of a Novel Dual Specificity Phosphatase, MKP-5. *J Biol Chem* , 274 (28), S. 19949-56.
- Taupenot, L., Harper, K. L., & O'Connor, D. T. (2003). The chromogranin-secretogranin family. *N.Engl.J.Med.* , 348, 1134-49.
- Thiel, G., & Cibelli, G. (2002). Regulation of life and death by the zinc finger transcription factor Egr-1. *J.Cell Physiol.* , 193, 287-92.
- Thiel, G., Kaufmann, K., Magin, A., Lietz, M., Bach, K., & Cramer, M. (2000). The human transcriptional repressor Protein NAB1: expression and biological activity. *Biochim.Biophys.Acta.* , 1493 (3), 289-301.
- Thiel, G., Lietz, M., & Cramer, M. (1998). Biological activity and modular structure of RE-1-silencing transcription factor (REST), a repressor of neuronal genes. *J Biol Chem* , 273 (41), S. 26891-9.
- Thiel, G., Lietz, M., & Hohl, M. (2004). How mammalian transcriptional repressors work. *Eur J Biochem* , 271 (14), S. 2855-62.
- Thiel, G., Schoch, S., & Petersohn, D. (1994). Regulation of Synapsin I Gene Expression by the Zinc Finger Transcription Factor zif268/egr-1. *J Biol Chem* , 269 (21), S. 15294-301.
- Thomas-Reetz, A. C., & De Camilli, P. (1994). A role for synaptic vesicles in non-neuronal cells: clues from pancreatic beta cells and from chromaffin cells. *FASEB J* , 8 (2), S. 209-16.
- Tian, J., & Karin, M. (1999). Stimulation of Elk1 transcriptional activity by mitogen-activated protein kinases is negatively regulated by protein phosphatase 2B (calcineurin). *J Biol Chem* , 274 (21), S. 15173-80.
- Topilko, P., Schneider-Maunoury, S., Levi, G., Trembleau, A., Gourdji, D., Draincourt, M., et al. (1997). Multiple Pituitary and Ovary Defects in Krox-24 (NGIF-A, Egr-1)-Targeted Mice. *Mol. Endo* (12(1)), S. 107-22.
- Tournier, C., Pomerance, M., Gavaret, J. M., & Pierre, M. (1994). MAP kinase cascade in astrocytes. *Glia* , 10, 81-8.
- Towbin, H., Staehelin, T., & Gordon, J. (1979). Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. *Proc Natl Acad Sci* , 76(9), S. 4350-4.
- Tremblay, J. J., & Drouin, J. (1999). Egr-1 is a downstream effector of GnRH and synergizes by direct interaction with Ptx1 and SF-1 to enhance luteinizing hormone beta gene transcription. *Moll Cell Biol* , 19 (4), S. 2567-76.
- Tsai-Morris, C., Cao, X., & Sukhatme, V. P. (1988). 5' flanking sequence and genomic structure of Egr-1, a murine mitogen inducible zinc finger encoding gene. *Nuc.Acid. Res.* , 16 (18), 8835-46.
- Tsutsui, K., Ukena, K., Usui, M., Sakamoto, H., & Takase, M. (2000). Novel brain function: biosynthesis and actions of neurosteroids in neurons. *Neurosci Res.* , 36 (4), 261-73.
- Vallee, M., Mayo, W., Darnaudery, M., Corpechot, C., Young, J., Koehl, M., et al. (1997). Neurosteroids: Deficient cognitive performance in aged rats depends on low pregnenolone sulfate levels in the hippocampus. *Proc.Natl.Acad.Sci.* , 94 (26), 14865-70.

- van Horssen, R., ten Hagen, T., & Eggermont, A. M. (2006). TNF- $\alpha$  in Cancer Treatment: Molecular Insights, Antitumor Effects, and Clinical Utility. *Oncologist*, *11*, 397-408.
- Vanhoutte, P., Barnier, J. V., Guibert, B., Pagès, C., Besson, M. J., Hipskind, R. A., et al. (1999). Glutamate induces phosphorylation of Elk-1 and CREB, along with c-fos activation, via an extracellular signal-regulated kinase-dependent pathway in brain slices. *Mol Cell Biol*, *19* (1), S. 136-46.
- Vickers, E. R., Kasza, A., Kurnaz, I. A., Seifert, A., Zeef, L. A., O'donnell, A., et al. (2004). Ternary complex factor-serum response factor complex-regulated gene activity is required for cellular proliferation and inhibition of apoptotic cell death. *Mol. Cell Biol.*, *24* (23), 10340-51.
- Virolle, T., Adamson, E. D., Baron, V., Birle, D., Mercola, D., Mustelin, T., et al. (2001). The Egr-1 transcription factor directly activates PTEN during irradiation-induced signalling. *Nat Cell Biol*, *3* (12), S. 1124-28.
- von der Kammer, H., Mayhaus, M., Albrecht, C., Enderich, J., Wegner, M., & Nitsch, R. M. (1998). Muscarinic acetylcholine receptors activate expression of the EGR gene family of transcription factors. *J Biol Chem*, *273* (23), S. 14538-44.
- Walsh, P., Metzger, D., & Higuchi, R. (1991). Chelex 100 as a medium for simple extraction of DNA for PCR-based typing from forensic material. *Biotechniques* (10(4)), S. 506-13.
- Wang, D., Mayo, M. W., & Baldwin Jr, A. S. (1997). Basic fibroblast growth factor transcriptional autoregulation requires EGR-1. *Oncogene*, *14* (19), S. 2291-9.
- Wei, F., Xu, Z. C., Qu, Z., Milbrandt, J., & Zhuo, M. (2000). Role of EGR1 in hippocampal synaptic enhancement induced by tetanic stimulation and amputation. *J.Cell.Biol.*, *149*, 1325-34.
- Wellbrock, C., Karasarides, M., & Marais, R. (2004). The RAF proteins take centre stage. *Nat Rev Mol Cell Biol*, *5* (11), S. 875-85.
- Wetzker, R., & Böhmer, F. D. (2003). Transactivation joins multiple tracks to the ERK/MAPK cascade. *Nat Rev Mol Cell Biol.*, *4* (8), 651-7.
- Wiggin, G. R., Soloaga, A., Foster, J. M., Murray-Tait, V., Cohen, P., & Arthur, J. S. (2002). MSK1 and MSK2 are required for the mitogen- and stress-induced phosphorylation of CREB and ATF1 in fibroblasts. *Mol Cell Biol*, *22* (8), S. 2871-81.
- Willars, G. B., McArdle, C. A., & Nahorski, S. R. (1998). Acute desensitization of phospholipase C-coupled muscarinic M3 receptors but not gonadotropin-releasing hormone receptors co-expressed in alphaT3-1 cells: implications for mechanisms of rapid desensitization. *Biochem.J.*, *333*, 301-8.
- Windle, J. J., Weiner, R. I., & Mellon, P. L. (1990). Cell lines of the pituitary gonadotrope lineage derived by targeted oncogenesis in transgenic mice. *Mol.Endocrinol.*, *4*, 597-603.
- Wolfe, M. W., & Call, G. B. (1999). Early growth response protein 1 binds to the luteinizing hormone-beta promoter and mediates gonadotropin-releasing hormone-stimulated gene expression. *Mol Endocrinol*, *13* (5), S. 752-63.
- Wolfgang, C. D., Liang, G., Okamoto, Y., Allen, A. E., & Hai, T. (2000). Transcriptional autorepression of the stress-inducible gene ATF3. *J Biol Chem*, *275* (22), S. 16865-70.

- Wu, F. S., Gibbs, T. T., & Farb, D. H. (1991). Pregnenolone sulfate: a positive allosteric modulator at the N-methyl-D-aspartate receptor. *Mol Pharmacol.* , 40 (3), 333-6.
- Xiao, D., Chinnappan, D., Pestell, R., Albanese, C., & Weber, H. C. (2005). Bombesin regulates cyclin D1 expression through the early growth response protein Egr-1 in prostate cancer cells. *Cancer Res.* , 65 (21), 9934-42.
- Xie, J., & Roberson, M. S. (2008). 3', 5'-cyclic adenosine 5'-monophosphate response element-dependent transcriptional regulation of the secretogranin II gene promoter depends on gonadotropin-releasing hormone-induced mitogen-activated protein kinase activation and the transactivator ATF3. *Endocrinology* , 149 (2), S. 783-92.
- Xie, J., Bliss, S. P., Nett, T. M., Ebersole, B. J., Seafon, S. C., & Roberson, M. S. (2005). Transcript profiling of immediate early genes reveals a unique role for activating transcription factor 3 in mediating activation of the glycoprotein hormone alpha-subunit promoter by gonadotropin-releasing hormone. *Mol Endocrinol* , 19 (10), S. 2624-38.
- Yamagata, K., Kaufmann, W. E., Lanahan, A., Papapavlou, M., Barnes, C. A., Andreasson, K. I., et al. (1994). Egr3/Pilot, a Zinc Finger Transcription Factor, is Rapidly Regulated by Activity in Brain Neurons and Colocalizes with Egr1/zif268. *Learn.Mem.* , 1, 140-52.
- Yan, S. F., Zou, Y. S., Soh-Won, J., Cohen, D. M., Buttrick, P. M., Cooper, D. R., et al. (1999). Hypoxia-associated induction of early growth response-1 gene expression. *J.Biol.Chem.* , 274 (21), 15030-40.
- Yao, J., Mackman, N., Edgington, T. S., & Fan, S. T. (1997). Lipopolysaccharide induction of the tumor necrosis factor-alpha promoter in human monocytic cells. Regulation by Egr-1, c-Jun, and NF-kappaB transcription factors. *J.Biol.Chem.* , 272 (28), 17795-801.
- Yokoyama, T., Takano, K., Yoshida, A., Katada, F., Sun, P., Takenawa, T., et al. (2007). DA-Raf1, a competent intrinsic dominant-negative antagonist of the Ras-ERK pathway, is required for myogenic differentiation. *J Cell Biol* , 177 (5), S. 781-93.
- Zhang, T., & Roberson, M. S. (2006). Role of MAP kinase phosphatases in GnRH-dependent activation of MAP kinases. *J Mol Endocrinol* , 36 (1), S. 41-50.
- Zipfel, P. F., Irving, S. G., Kelly, K., & Siebenlist, U. (1989). Complexity of the primary genetic response to mitogenic activation of human T cells. *Mol.Cell.Biol.* , 9, 1041-48.
- Zufferey, R., Donello, J. E., Trono, D., & Hope, T. J. (1999). Woodchuck hepatitis virus posttranscriptional regulatory element enhances expression of transgenes delivered by retroviral vectors. *J Virol* , 73 (4), S. 2886-92.
- Zufferey, R., Dull, T., Mandel, R. J., Bukovsky, A., Quiroz, D., Naldini, L., et al. (1998). Self-Inactivating Lentivirus Vector for Safe and Efficient In Vivo Gene Delivery. 72 (12), S. 9873-9880.

## X. Publikationen und Poster

### Publikationen

Franko, A., Mayer, S., Thiel, G., Mercy, L., Arnould, T., Hornig-Do, H.T., Wiesner, R.J., Goffart, S. CREB-1{alpha} is recruited to and mediates upregulation of the Cytochrome c promoter during enhanced mitochondrial biogenesis accompanying skeletal muscle differentiation. *Mol Cell Biol*, 28 (2008): 2446-59

Mayer, S.I., Dexheimer, V., Nishida, E., Kitajima, S., Thiel, G.. Expression of the transcriptional repressor ATF3 in gonadotrops is regulated by Egr-1, CREB and ATF2 following GnRH receptor stimulation. *Endocrinology* (2008) in press

Mayer, S.I., Thiel, G. (2008). Calcium influx into pancreatic  $\beta$ -cells induces expression of Egr-1 involving extracellular signal-regulated protein kinase and the transcription factors Elk-1 and CREB. *Eur.J.Cell.Biol.* (2008) in press

Mayer, S.I., Willars, G.B., Thiel, G. (2008). Egr-1 biosynthesis in busserelin and Carbachol-stimulated gonadotrops: signaling pathway, role of Elk-1, CREB and ATF2, and identification of Egr-1 target genes. *J.Cell.Biochem.* (2008) accepted

### Poster

Sabine I. Mayer, Gerald Thiel (2006) Upregulation of Egr-1 biosynthesis in pituitary gonadotropes following activation of GnRH and muscarinic acetylcholine receptors: signaling pathways and target genes. *Annual Meeting of the Study Group Neurochemistry (GBM), Witten, 28.-30. September, 2006; 10<sup>th</sup> Joint meeting of the Signal Transduction Society (STS), Weimar, 02.-04. November, 2006*

Sabine I Mayer, Gerald Thiel (2006) Analysis of signal transduction from the plasma membrane to the nucleus: Glucose, tolbutamide and potassium chloride promotes Egr-1 biosynthesis in pancreatic beta cells. *10<sup>th</sup> Joint meeting of the Signal Transduction Society (STS), Weimar, 02.-04. November, 2006*

Sabine I Mayer, Verena Dexheimer and Gerald Thiel (2006-2007) Gonadotropin-releasing hormone receptor stimulation upregulates ATF3 biosynthesis in pituitary cells involving a cytosolic  $Ca^{2+}$ -rise, activation of ERK and expression of Egr-1. *Annual Meeting of the Study Group Neurochemistry (GBM), Hamburg, 14.-15. September, 2006; Molecular Life Science GBM Fall meeting, Hamburg, 16.-19. September, 2007; 11<sup>th</sup> Joint meeting of the Signal Transduction Society (STS), Weimar, 01.-03. November, 2007*



Sabine I Mayer, Oliver G Rössler and Gerald Thiel (2007) Epidermal growth factor induced proliferation of astrocytes is regulated by extracellular signal-induced protein kinase and the transcription factors Elk-1 and Egr-1. *11<sup>th</sup> Joint meeting of the Signal Transduction Society (STS), Weimar, 01.-03. November, 2007*

Sabine I Mayer, Verena Dexheimer and Gerald Thiel (2008) Expression of activating transcription factor 3 in gonadotrops is regulated by Egr-1, CREB and ATF2 following Gonadotropin-releasing hormone receptor stimulation. *31. Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Zellbiologie, Marburg, 12.-15. März, 2008*