

Aus dem Med. Zentrum für Innere Medizin  
Klinik für Gastroenterologie und Stoffwechsel  
Direktor: Prof. Dr. med. T. M. Gress  
des Fachbereichs Medizin der Philipps-Universität Marburg  
in Zusammenarbeit mit dem Universitätsklinikum Gießen und  
Marburg GmbH, Standort Marburg

---

**Natriumbutyrat-induzierte Stimulation des humanen  
Gastrinpromotors und Identifizierung relevanter  
Response Elemente in den neuroendokrinen  
Pankreastumorzellen BON I**

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

dem Fachbereich Medizin  
der Philipps-Universität Marburg

vorgelegt von

**Nicole Freitag**  
aus Arnsberg

Marburg 2006

Angenommen vom Fachbereich Medizin  
der Philipps-Universität Marburg am: 23. Februar 2006

Gedruckt mit Genehmigung des Fachbereichs

**Dekan:** Prof. Dr. med. B. Maisch

**Referentin:** Prof. Dr. med. B. Simon, M.Sc. HCM

**Korreferentin:** Prof. Dr. med. R. Engenhardt-Cabillic

Für meine geliebten Eltern, Gabriele und Jürgen Freitag und für meinen Bruder Jörg,  
die immer für mich da sind.

Danke.

# Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis .....	I
1. Einleitung .....	1
1.1. Neuroendokrine gastroenteropankreatische (GEP) Tumore .....	1
1.2. Das gastrointestinale Peptidhormon Gastrin .....	2
1.2.1. Physiologische Expression von Gastrin.....	2
1.2.2. Onkofetale Expression von Gastrin im endokrinen Pankreas.....	3
1.2.3. Pathologische Expression von Gastrin in Tumoren .....	3
1.2.4. Struktur des Gastringens .....	4
1.2.5. Transkriptionelle Regulation des Gastringens .....	4
1.3. Zelluläre und nukleäre Effekte von Natrium-Butyrat.....	5
1.4. Mechanismen der eukaryontischen Genregulation.....	7
1.4.1. Regulation der Genexpression.....	7
1.4.2. Transkriptionelle Regulation durch Transkriptionsfaktoren.....	7
1.4.3. Die Familie der Sp-Transkriptionsfaktoren .....	8
1.5. Fragestellung .....	9
2. Material und Methoden.....	10
2.1. Laborgeräte.....	10
2.2. Chemikalien, Reaktionssysteme, Lösungen und Verbrauchsmaterial.....	10
2.2.1. Chemikalien, Reagenzien.....	10
2.2.2. Bakterienkultur und -stämme .....	11
2.2.3. Zellkultur.....	11
2.2.4. Zelllinien .....	12
2.2.5. Restriktionsendonukleasen und modifizierende Enzyme .....	12
2.3. Konstrukte und Vektoren.....	12
2.4. Sicherheitsvorkehrungen und Abfallbeseitigung .....	15
2.5. Molekularbiologische Standardverfahren .....	15
2.5.1. Spaltung von DNA mit Restriktionsendonukleasen.....	15
2.5.2. Entfernungen von Proteinen aus DNA-Lösungen.....	16
2.5.3. Fällern und Waschen von DNA.....	16

---

2.5.4.	Quantifizierung von DNA.....	16
2.5.5.	Transformation .....	17
2.5.6.	Präparative Plasmidgewinnung .....	17
2.5.7.	Restriktionsanalyse .....	17
2.5.8.	Agarosegelelektrophorese.....	18
2.6.	Zellbiologische Methoden.....	19
2.6.1.	Zelllinien und Kultivierung.....	19
2.6.2.	Einfrieren und Auftauen von Zellen.....	20
2.6.3.	Bestimmung der Zellzahl .....	20
2.6.4.	Behandlung mit Natriumbutyrat.....	20
2.6.5.	Transiente Transfektion .....	21
2.6.6.	Proteinquantifizierung nach dem Bio- Rad- Assay (nach Bradford) .....	22
2.6.7.	Bestimmung der Luciferase Aktivität.....	22
2.6.8.	Bestimmung der $\beta$ -Galaktosidase Aktivität .....	23
2.6.9.	Auswertung der Transfektionsergebnisse .....	23
3.	Ergebnisse .....	24
3.1.	Expression des humanen Gastrinpromotors in den neuroendokrinen Pankreastumorzellen BON I und Lokalisation <i>cis</i> -regulatorischer Elemente.....	24
3.2.	Natriumbutyrateabhängige transkriptionelle Regulation des humanen Gastrinpromotors in neuroendokrinen Pankreastumorzellen BON I .....	27
3.2.1.	Natriumbutyrat hemmt die Proliferation von BON I Zellen.....	27
3.2.2.	Dosisabhängige Natriumbutyrat-induzierte Stimulation der Gastrinpromotoraktivität in BON I Zellen.....	29
3.2.3.	Transiente Natriumbutyrat-induzierte Stimulation der Gastrinpromotoraktivität in BON I Zellen.....	31
3.3.	Identifizierung von Natriumbutyrat-Response Elementen (NaB-RE) im proximalen humanen Gastrinpromotor in BON I Zellen .....	35
3.4.	Regulation des Gastrinpromotors durch Sp-Transkriptionsfaktoren in BON I Zellen.....	44
3.5.	Regulation des Gastrinpromotors durch Sp-Transkriptionsfaktoren in <i>Drosophila melanogaster</i> SL2 Zellen.....	47

---

4.	Diskussion.....	53
4.1.	Natriumbutyrat inhibiert die Proliferation der neuroendokrinen Pankrastumorzellen BON I.....	53
4.2.	Der Gastrinpromotor ist ein Targetgen von Natriumbutyrat.....	54
4.3.	Zellspezifische Regulation des Gastrinpromotors durch Sp-Proteine.....	57
5.	Zusammenfassung.....	62
6.	Literaturverzeichnis.....	64
7.	Anhang.....	80
7.1.	Verwendete Abkürzungen.....	80
7.2.	Akademische Lehrer.....	83
7.3.	Danksagung.....	84

# 1. Einleitung

## 1.1. Neuroendokrine gastroenteropankreatische (GEP) Tumore

Neuroendokrine gastroenteropankreatische (GEP) - Tumore sind eine heterogene Gruppe benigner und maligner Neubildungen, die alle auf eine pluripotente endokrine Zelle neuroektodermalen Ursprungs zurückgehen. Feyrter gelang es erstmals 1938 ein „diffuses endokrines System“ durch argyrophilen Reaktionen histochemisch nachzuweisen. Pearse und Polak zeigten 1969 die Besonderheit endokriner Zellen: das „amine precursor uptake and decarboxylation“ (APUD), die Fähigkeit biogene Amine zu synthetisieren. Eine Klassifikation der neuroendokrinen Tumoren erfolgte durch Williams und Sander nach der embryologischen Abstammung in Tumoren des Vorderdarmes („foregut“), zu denen solche des Respirationstraktes, des Thymus, Oesophagus, Magens, Pankreas und proximalen Duodenums bis zur Papilla Vateri gerechnet werden, ferner des Mitteldarmes („midgut“), zu denen Tumoren des distalen Duodenums, Jejunums, Ileums, Meckelschen Divertikels, Appendix, Coecums, Colon ascendens und eines Teils des Colons transversums gezählt werden und drittens des Hinterdarmes („Hindgut“), zu denen die des distalen 1/3 des Colon transversums, Colon descendens, Sigmoids und Rektums gehören. Neuroendokrine GEP Tumore treten überwiegend sporadisch, selten auch hereditär im Rahmen eines Tumorsyndroms auf. Während die hereditär bedingten neuroendokrinen Tumore genetisch determiniert sind, ist die Ätiologie sporadisch auftretender GEP-Tumor noch weitgehend unklar. Dem MEN 1 Syndrom (Wermer-Syndrom) liegt eine autosomal-dominant vererbte Keimbahnmutation im Tumorsuppressorgen *MEN 1* auf Chromosom 11q13 zugrunde (Bartsch, 1998). Neuroendokrine Tumoren treten selten auch im Rahmen des von Hippel-Lindau-Syndromes oder der Neurofibromatose von Recklinghausen auf (Lubensky et al, 1998). Genetische Alterationen der Tumorsuppressor-Gene *p53* und *pRB* noch die Aktivierung von Onkogenen wie *K-ras*, *myc* oder *c-erb B2* haben pathogenetische Relevanz (Chesa et al, 1987; Höfler et al, 1988; Roncalli et al, 1991; Weber et al, 1996). Jedoch konnten in ca. 20% der sporadischen GEP Tumore somatische *MEN 1* nachgewiesen werden (Zhuang et al, 1997). Dagegen konnte in

unserer Arbeitsgruppe bei GEP Tumoren die Inaktivierung der Tumorsuppressorgene *p16<sup>INK4a</sup>* und *p15<sup>INK4b</sup>* entweder durch Verlust der Heterozygotie (LOH), durch homozygote Deletion oder durch Hypermethylierung der Promotorregion identifiziert werden (Bartsch et al, 2000). In nichtfunktionellen fortgeschrittenen neuroendokrinen Pankreastumoren konnten darüberhinaus Mutationen in *DPC 4* identifiziert werden (Bartsch et al, 1999). Die Tumoren des Pankreas können verschiedene Hormone wie Insulin, Glukagon, Somatostatin und PP, aber auch weitere Substanzen, die postpartal im Pankreas nicht mehr gebildet werden, wie Gastrin, vasoaktives intestinales Peptid (VIP), „growth hormon releasing factor“ und adrenokortikotropes Hormon produzieren (Capella et al, 1995). Klinisch können neuroendokrine Tumoren in funktionell aktive Tumoren, die ein klinisches Syndrom aufgrund ihrer Hormonexpression verursachen und funktionell inaktive Tumoren mit nur raumfordernder Wirkung unterschieden werden. Von den funktionell endokrin aktiven Pankreastumoren sind Insulinome am häufigsten, gefolgt von Gastrinomen. Insulinome liegen zu 97% im Pankreas und sind meistens benigne (Kaplin et al, 1983; Ectari, 1999). Gastrinome sind die Hauptursache für das Zollinger Ellison Syndrom und liegen zu 25% im Pankreas und zu ca. 70% im Duodenum. Im Gegensatz zu den Insulinomen sind Gastrinome häufig maligne (60-80%) (Perry, 2002; Jensen, 1998). Die übrigen funktionellen Pankreastumore treten seltener auf und sind häufig maligne (Warner, 2005).

## **1.2. Das gastrointestinale Peptidhormon Gastrin**

### **1.2.1. Physiologische Expression von Gastrin**

Gastrin wird in Pankreas, Gastrointestinaltrakt, den vagalen Kernen des ZNS und der Hypophyse exprimiert (Rehfeld, 1978; Brand und Fuller, 1988). Gastrin ist ein Peptidhormon mit großer klinischer und physiologischer Bedeutung. Zum einen wirkt es als Stimulus der Magensäuresekretion, zum anderen als Wachstums- und Differenzierungsfaktor im Gastroenteropankreatischen System (Johnson,1987).

### 1.2.2. Onkofetale Expression von Gastrin im endokrinen Pankreas

Gastrin wird während der Embryonalentwicklung im fetalen Pankreas und Kolonzellen während einer Phase des schnellen Wachstums exprimiert (Larsson et al, 1976; Luttichau et al, 1993; Brand und Fuller, 1988). Postpartal vermindert sich diese Expression sehr stark um dann wieder in gastrinproduzierenden Tumoren exprimiert zu werden. Die Gastrinome sind im Rahmen der Multiplen endokrinen Neoplasie Typ I Folge von Mutationen im *MEN 1* Tumorsuppressorgen, das einen Korepressor kodiert, der *JunD*, eine Komponente des Aktivator Proteins AP1.

### 1.2.3. Pathologische Expression von Gastrin in Tumoren

Die Rolle von Gastrin als epithelialer Wachstumsfaktor und Promotor von Malignität wurde nicht nur für das endokrine Pankreas, sondern auch für das Kolonkarzinom, Magen-, Pankreas- und Lungenkarzinom berichtet (Koh et al, 1997; Rehfeld et al, 1989; Ciccotosto et al, 1995; Tillotson et al, 1994). Chronische Überproduktion von Gastrin mag eine Rolle beim *Helicobacter pylori*-assoziiertem Magenkarzinom und MALT Lymphom spielen. Inkomplett prozessierte Gastrine können beispielsweise Kolonproliferation *in vitro* und *in vivo* induzieren. Studien haben eine Zunahme der Inselzellmasse in doppelt transgenen Mäusen, die TGF- $\alpha$  (ein EGF Rezeptor Ligand) und Gastrin im Pankreas exprimieren, gezeigt (Wang, 1993). Auch die Kombinationstherapie mit Epidermal Growth Factor (EGF) und Gastrin induzierte *in vivo* und *in vitro* eine Zunahme der funktionellen Inselzellmasse in Pankreasinseln und zwar wahrscheinlich durch Neogenese von humanen  $\beta$ -Inselzellen von Pankreasgangzellen.

Es konnte erst kürzlich gezeigt werden, dass in Pankreatischen intraepithelialen Neoplasien (PanIN) als Vorläufer des Pankreaskarzinoms im Vergleich zu normalen Pankreasgängen Gastrin exprimiert wird (Prasad et al, 2005). Auch beim Kolonkarzinom gelang es kürzlich, einen Link zwischen den Wnt und TGF- $\beta$  Signalkaskaden mit Gastrin herzustellen und zu postulieren, dass diese synergistische Interaktion relevant für die Kanzerogenese ist. Dabei konnte gezeigt werden, dass der murine Gastrinpromotor synergistisch durch TGF- $\beta$ /Smads und Wnt Signalling aktiviert wird (Lei et al, 2004). *K-ras*-Mutationen finden sich in 80% der duktaalen Pankreaskarzinome und auch häufig in kolorektalen Tumoren (Almoguera et al, 1988;

Forrester et al, 1987; Lee et al, 1994). Erst kürzlich wurde über eine Korrelation von *K-ras*-Mutationen mit erhöhter Gastringenexpression beim Kolonkarzinom berichtet (Nakata et al, 1998). Daher ist das Verständnis dafür, wie der *ras*-ERK Pathway die Gastringenregulation stimuliert für die Pathophysiologie der gastrointestinalen Transformation von Bedeutung. Es wird vermutet, dass eine abberante AP1 Regulation in gastrointestinalen Tumoren die Gastrinexpression moduliert.

Viele Studien haben Gene als Targets bestimmter onkogener Signalwege identifiziert. Wenig Aufmerksamkeit hat bisher die Regulation von Gastrin in neuroendokrinen Pankreastumorzellen erfahren, obwohl Gastrinome unter den neuroendokrinen Pankreastumoren häufig und meist maligne sind.

#### **1.2.4. Struktur des Gastringens**

Alle molekularen Formen von Gastrin werden von einem Gen abgeleitet. Das humane Gastringen liegt auf Chromosom 17, umfasst ca. 4,1 kb und hat 3 Exone: das nichtkodierende Exon 1, sowie Exon 2 und 3, die für den Preprogastrinvorläufer kodieren, aus dem nach mehreren enzymatischen Schritten das bioaktive Gastrin freigesetzt wird.

#### **1.2.5. Transkriptionelle Regulation des Gastringens**

Untersuchung zur Regulation des humanen Gastringens wurden durch die Klonierung der 5'-flankierenden Sequenzen ab 1984 möglich (Ito et al, 1984; Wiborg et al, 1984; Fuller et al, 1987). Experimente zur Transkription des Gastringens in Insel tumorzelllinien und transgenen Tieren zeigten, dass die 1.2 kb Promotorregion des humanen Gastringens zur pankreasspezifischen Gastrinexpression ausreicht (Wang et al, 1990; Wang et al, 1992). Der Promotor wurde spezifisch in fetalen, proliferierenden Inselzellvorläufern transgener Tiere exprimiert und war postpartum nicht mehr nachweisbar.

Das humane Gastringen hat eine „TATA Box“ als Transkriptionsinitiationssequenz. Es wurden bisher verschiedene *cis*-regulatorische Elemente des Gastrinpromotors, die auf die Gastrinexpression Einfluß nehmen durch Untersuchungen der Promotorregion sowohl des Ratten- als auch des humanen Gastringens beschrieben: ein Gastrin-negatives Element (GASNE) mit der Sequenz ATTCCTCTC, welche identisch ist mit

der negativ regulatorischen Region des  $\beta$ -Interferon Promotors und die Transkription des Gastrinpromotors in den Inselzellen inhibiert (Goodbourn et al, 1986). Ein Insulinhancer-ähnliches positives *cis*-regulatorisches Element NIR mit dem Sequenzmotiv CATATGG, welches im Insulinpromotor zu einer inselzellspezifischen Insulinsekretion führt (Nir et al, 1986; Wang und Brand, 1990) und eine, die GASNE Sequenz überlagernde RAP 1- Erkennungssequenz, die ein RAP 1 homologes Protein in Inselzelltumorzelllinien bindet und die Gastrinpromotoraktivität heraufreguliert (Simon et al, 1994). Im humanen Gastringenpromotor entspricht die RAP1 Seite einer GC-reichen Sequenz zwischen Nukleotid – 108 bis – 102, auch CACC-Box genannt, die Sp-Proteine bindet (Tillotson et al, 1994; Simon et al, 1997). DNA-Bindungsstudien zeigten, dass an das E-box Element im Gastrinpromotor zwei Helix-Loop-Helix Proteine binden: zum einen ein USF-ähnliches Protein (Gregor et al, 1990), zum anderen das E2A Protein (Murre et al, 1989). Es wurde gezeigt, dass der Heterodimerkomplex E2A/USF in Inselzellen den Gastrinpromotor aktiviert. Im Gegensatz dazu wurde die transkriptionelle Aktivierung durch Expression des Helix-Loop-Helix Proteins ID ohne basische DNA Bindungsdomäne verhindert (Benezra et al, 1990). Ferner wurde von den Arbeitsgruppen um Brand und Wang im Jahr 1990 ein Proteinfaktor in den Inselzellen nachgewiesen, der an das negativ regulatorische Element ATTCCT im humanen Gastrinpromotor bindet und zu einer Reduktion der Promotoraktivität führt. Andere Untersuchungen des humanen Gastringenpromotors beschrieben zwei weitere GC-reiche Elemente, die zwischen Nukleotiden –68 bis –53 (Merchant et al, 1991, 1995) und Nukleotiden –140 bis –127 (Bundgaard et al, 1995; Chung et al, 1995; Shiotani und Merchant, 1995) lokalisiert sind und den Transkriptionsfaktor Sp1 binden. Das GC-reiche Element gERE vermittelt basale und EGF-stimulierte Gastrintranskription. An gERE bindet auch der Komplex Sp3 und ZBP-89. Kürzlich wurde berichtet, dass die Aktivierung des Gastrinpromotors über das GC-reiche gERE *ras*-ERK abhängig ist (Merchant et al, 1999).

### **1.3. Zelluläre und nukleäre Effekte von Natrium-Butyrat**

Natriumbutyrat mit einem Molekulargewicht von 110,09 und der chemischen Formel CH<sub>3</sub>-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-COONa ist als Natrium-Salz der N-Buttersäure eine kurzkettige Carboxylsäure. Kurzkettige Fettsäuren werden in großen Mengen im Kolon durch

bakterielle Fermentation von Kohlenhydraten produziert. Sie spielen eine Rolle bei der Homöostase der Darmmukosa, indem sie Zellreifung, Differenzierung und Apoptose induzieren (Heerdt et al, 1994, 1997). Eine reduzierte Verfügbarkeit von Natriumbutyrat im Kolon kann zu Entzündungen führen (Wachtershauser et al, 2000; Gustafsson et al, 1998; Harig et al, 1989). Natriumbutyrat (NaB) bewirkt in millimolarer Konzentration eine Vielzahl von häufig reversiblen morphologischen und physiologischen Veränderungen in verschiedenen Zelltypen (Prasad et al, 1988). Diese betreffen regulatorische Mechanismen der Genexpression und des Zellwachstums. Die Hyperacetylierung der Histone durch HDAC Inhibition und ein Zellzyklusarrest ist fast immer zu beobachten. Andere Modifikationen wie Induktion von Proteinen (einschließlich Enzyme, Hormone), Inhibition der Zelldifferenzierung, Revertierung des malignen Phänotypes und Induktion integrierter Viren sind eher zellspezifisch.

Die meisten Veränderungen resultieren wahrscheinlich von der Histonhyperacetylierung, von Chromatinstrukturveränderungen und von Modifikationen des Zytoskeletts (Kruh et al, 1982). So wurde eine Hemmung der DNA-Synthese und der Zellteilung sowie eine reversible Modifikation der Zellmorphologie und der Wachstumsrate beschrieben (Hagopian et al, 1977; Ginsburg et al, 1973). Die Arbeitsgruppe um Riggs zeigte eine Natriumbutyrat-induzierte Hyperacetylierung von Histon 3 und 4 in Erythroleukämie- und HeLa Zellen, die auf reversibler Hemmung der Histondeacetylase (HDAC1) beruhte (Riggs et al, 1977; Vidali et al, 1978; Candido et al, 1978). HDAC1 Inhibition und Hyperacetylierung der Histone durch Histonacetylase kann zur Dekondensation des Chromatins führen und ermöglicht so Zugriff von Transkriptionsfaktoren und dem RNA Polymerase Komplex (Wolffe, 1996; Grunstein, 1997). Natriumbutyrat kann auch DNA Methylierung (de Haan et al, 1986), Stimulation zellspezifischer Genexpression und Wachstumsarrest induzieren (Toscani et al, 1988; Charollais et al, 1990; Karlsen et al, 1991; Wintersberger et al, 1983; Glauber et al, 1991; Philippe et al, 1987; Nakagawa et al, 1988).

Trotz der Kenntnis über die Histonacetylierung ist der genaue Mechanismus der Natriumbutyrat-induzierten transkriptionellen Aktivierung nicht hinreichend geklärt. Es ist zu vermuten, dass Natriumbutyrat über weitere, bisher nicht beschriebene Mechanismen auf die Genexpression Einfluss nehmen kann. Da die Stimulation der Genexpression des Histonproteins H10 durch Butyrat auch ohne *de novo* Proteinsynthese erfolgt, wurde vermutet, dass Butyrat auch über posttranslationale Modifikation am Transkriptionsprozess beteiligt sein könnte (Cuisset et al, 1997).

## **1.4. Mechanismen der eukaryontischen Genregulation**

### **1.4.1. Regulation der Genexpression**

Die korrekte Regulation der Genexpression sorgt dafür, dass spezifische Proteine auf ein spezifisches Signal hin produziert werden. Der erste Schritt, die Übertragung der Information von der DNA auf die mRNA (Transkription) ist von besonderer Bedeutung für die Genregulation. Weitere Kontrollstufen umfassen die posttranskriptionellen mRNA-Modifikationen, Genamplifikation, DNA-Methylierung, Translation und posttranslationale Proteinmodifikationen (Wingender, 1993).

### **1.4.2. Transkriptionelle Regulation durch Transkriptionsfaktoren**

Die zellspezifische Expression von Genen wird durch sogenannte *cis*-regulatorische DNA-Sequenzen innerhalb der Promotorregion eines Genes mitbestimmt. Die Expression und transkriptionelle Regulation eines Gens *in vivo* wird aber erst durch Transkriptionsfaktoren, die an *cis*-regulatorische DNA-Sequenzen binden, bestimmt (Maniatis et al, 1987). Die Bindungsdomänen dieser Proteine weisen, trotz unterschiedlicher Sequenzen, strukturelle und funktionelle Gemeinsamkeiten auf. Die Proteinstruktur besitzt mindestens zwei funktionelle Domänen die an die DNA binden und zu einer Transkriptionsaktivierung führen (Mitchell und Tijian, 1989). Die DNA-bindenden Proteine müssen sich der DNA-Doppelhelix anpassen und ihre spezifische Bindungssequenz erkennen. Es sind verschiedene Strukturmodelle DNA-bindender Domänen identifiziert worden.

### Homöodomänen:

Zunächst wurden Homöodomänen Proteine als Produkte von Drosophila-Genen entdeckt. Bei diesem Modell liegt die Proteinhelix quer über der DNA-Helix und steht dort in Kontakt mit Basenpaaren. Über der ersten Helix liegt eine zweite, die mit anderen Proteinen des Transkriptionsapparats Verbindung aufnimmt.

### Leucin-Zipper:

Eine andere DNA-bindende Domäne zeigte sich bei den Produkten der Protoonkogene *c-fos* und *c-jun*. Als Transkriptionsfaktoren wirken hier Leucinreissverschluss-Proteine, die eine charakteristische Wiederholung von vier bis fünf Leucinbausteinen im Abstand von sieben Aminosäuren aufweisen.

### Helix-Loop-Helix:

Helix- Loop- Helix Proteine binden ebenfalls die DNA als Homo- oder Heterodimere. Dieses Modell findet sich bei mehreren Proteinen, die bei Zellwachstum und – differenzierung eine bedeutende Rolle spielen, wie z.B. das Protein, welches vom dem *c-myc*-Protoonkogen codiert wird.

### Zink-Finger:

Als weiteres Strukturmodell der Transkriptionsfaktoren konnten Zinkfinger-Proteine identifiziert werden. Diese zeigen wiederholte Motive aus Cystein und Histidin, die sich zu drei-dimensionalen Struktur mit koordinierenden Zinkionen entfalten. Diese Zinkfinger – Proteine finden sich bei Proteinen der Lückengene (z.B. Krüppel) und bei den Steroidrezeptorfamilien.

### **1.4.3. Die Familie der Sp-Transkriptionsfaktoren**

Die Familie der Sp-Transkriptionsfaktoren besteht aus fünf Zinkfingerproteinen (Sp1, Sp2, Sp3, Sp4 und Sp5) die verschiedene Funktionen in der Zelle ausüben und deren Bindungsseiten ähnliche DNA-Kontaktstellen aufweisen, wie sie im Gastrinpromotor (GC/GT Boxen) gefunden werden (Kriwacki et al, 1992; Berg, 1989; Hagen et al, 1992, 1994; Majello et al, 1994). Die Transkriptionsfaktoren Sp1 bis Sp4 können an GC- oder GT-Boxen (GGGTGTGGC) binden (Hagen et al, 1992; Kingsley und Winoto, 1992). Sp1 Protein ist als aktivierender Transkriptionsfaktor bekannt (Bigger et al, 1997; Birnbaum et al, 1995; Kumar et al, 1995), wogegen der Transkriptionsfaktor Sp3 einerseits als Aktivator (Bigger et al, 1997; Liang et al, 1996; Netzker et al, 1997) und andererseits als Repressor der Sp1-vermittelten Aktivierung durch kompetitive Bindung

wirkt (Majello et al, 1994, 1995; Kumar und Butler; 1997, Hagen et al, 1995). Es wurde eine Regulation der Transkriptionsaktivierung und DNA Bindung von Sp1 durch Wachstumsfaktoren und cAMP deutlich (Ford et al, 1997; Rohlf et al, 1997; Yan und Ziff, 1997; Li et al, 1998). Sp1 Protein stimuliert die Transkription, insbesondere durch die GC Box 2, wohingegen der Effekt von Sp3 Protein zellspezifisch scheint. So führt Sp3 Protein in AGS Zellen zu einer Repression der Gastringenaktivität, in *Drosophila* SL2 Zellen hingegen zusammen mit Sp1 Protein zu einer Aktivierung (Hansen et al, 1999). Auch konnten Untersuchungen am Uteroglobulin und *c-myc* Promotor zeigen, dass Sp1 und Sp3 Faktoren oppositionelle transkriptionelle Aktivität durch Bindung an das gleiche *cis*-regulatorische Element im jeweiligen Promotor aufweisen (Hagen et al, 1992). Dieses lässt vermuten, dass die Funktion des Faktors Sp3 von Zelltyp oder exogenen Faktoren abhängig ist (Suske, 1999).

### **1.5. Fragestellung**

Gastrin zeigt im endokrinen Pankreas ein onkofetales Expressionsmuster mit pathologischer Wiederexpression als Targetgen in transformierten gastrinproduzierenden Pankreastumorzellen. In der vorliegenden Arbeit sollte daher die Regulation des Gastrinpromotors in den humanen neuroendokrinen Pankreastumorzellen BON I analysiert werden. Ziel war die Wirkung von Natriumbutyrat auf die Proliferation von BON I Zellen zu untersuchen, sowie die damit assoziierte Regulation der Gastrinpromotoraktivität mit Identifizierung natriumbutyrat-stimulierbarer *cis*-regulatorischer Elemente. Da sich während den Untersuchungen zeigte, dass GC-reiche Sequenzen des Gastrinpromotors relevant sind, wurde auch die Regulation des humanen Gastrinpromotors über seine GC-reichen Sequenzen durch Sp-Transkriptionsfaktoren untersucht.

## 2. Material und Methoden

### 2.1. Laborgeräte

Bakterienbrutschrank	Memmert, Schwalbach
Bakterieninkubator Certomat R	Braun, Melsungen
Luminometer Lumat LB 9501/16	Berthold, Wildbach
Spektralphotometer Uvikon 860	Kontron, Eching
Ultrazentrifuge L8-70M	Beckmann, München
Vakuumentrifuge Uni Vapo 100 H	UniEquip, Martinsried
Zentrifugen: Biofuge 13, Sepatech J2-21	Heraeus, Hanau Beckmann, München

### 2.2. Chemikalien, Reaktionssysteme, Lösungen und Verbrauchsmaterial

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

#### 2.2.1. Chemikalien, Reagenzien

Agarose für DNA-Elektrophorese	Sigma, Deisenhofen
Biorad Reagenz	BioRad, München
Borsäure	Merck, Darmstadt
BSA	Sigma, Deisenhofen
Chloroform	Merck, Darmstadt
Dithiothreitol (DTT)	Sigma, Deisenhofen
DMS	Fluka, Neu-Ulm
DNA-Längenstandards III und VIII	Boehringer, Mannheim

Ethidiumbromid	Serva, Mannheim
Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA)	Sigma, Deisenhofen
Glycerin	Sigma, Deisenhofen
HCl	Merck, Darmstadt
HEPES	Sigma, Deisenhofen
Kaliumchlorid	Sigma, Deisenhofen
KOH	Merck, Darmstadt
Methanol	Riedel de Haen, Seelze
Natriumchlorid	Roth, Karlsruhe
Natriumbutyrat	Sigma, Deisenhofen
Phenol	Roth, Karlsruhe
PMSF	Sigma, Deisenhofen

### 2.2.2. Bakterienkultur und -stämme

Agar, Hefeextrakt und Trypton	Gibco, Karlsruhe
Ampicillin	Bayer, Leverkusen
Petrischalen	Greiner, Frickenhausen
XL-1 Blue	Stratagene, Heidelberg
E. coli DH 5	(Hanahan, 1983)

### 2.2.3. Zellkultur

DMEM- Medium und HAM'S F12- Medium	PAA Lab., Austria
DMSO	Merck, Darmstadt
Drosophila Schneider Medium	Life Technologies
Fetales Kälberserum (FCS)	Gibco, Karlsruhe
Galacto-Light-Plus TM	Tropix, Bedford/USA
Gewebekulturflaschen	Greiner, Frickenhausen
Luciferase Assay System	Promega, Madison/USA
Trypsin/EDTA	PAA Lab., Austria
Penicillin/Streptomycin (10000U/ml)	Gibco, Karlsruhe
PBS- Puffer (Phosphat-buffered saline)	Gibco, Karlsruhe
Petrischalen für Gewebekultur	Gibco, Karlsruhe

Reporter Lysis Puffer 5x	Promega, Madison/USA
--------------------------	----------------------

#### 2.2.4. Zelllinien

Humane neuroendokrine Pankreastumorzelllinie BON I (Evers et al, 1991)

Schneider *Drosophila melanogaster* Zelllinie SL2 (Schneider, 1972)

#### 2.2.5. Restriktionsendonukleasen und modifizierende Enzyme

Restriktionsendonukleasen	Boehringer, Mannheim
	MBI, Vilnius/Litauen
	Pharmacia, Freiburg
	New England Biolabs, Schwalbach

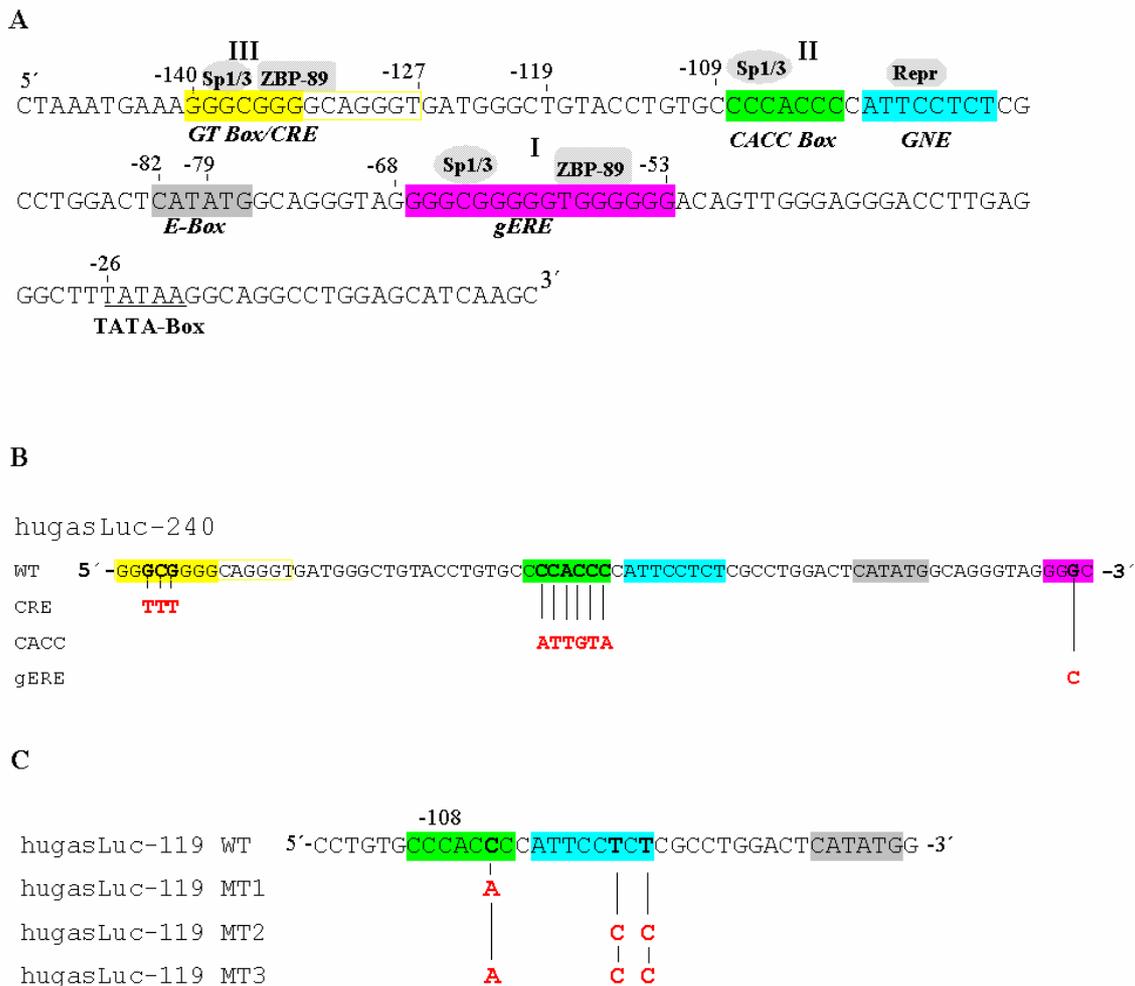
### 2.3. Konstrukte und Vektoren

pGL2-Basic Vektor	Promega, Madison, WI, USA
pGL2-Control Vektor	Promega, Madison, WI, USA
pSV- $\beta$ -Galaktosidase-Kontroll Vektor	Promega, Madison, WI, USA

Die Expressionsvektoren für *Drosophila* Schneider SL2 Zellen (pPac (Leervektor), pPacSp1, pPacSp3 und pPacSp4), der  $\beta$ -Galaktosidase Expressionsvektor p97b und die Expressionsvektoren für BON I Zellen (pRC-CMV, pRC-CMVSp1, pRC-CMVSp3, pRC-CMVSp4) wurden freundlicherweise von Prof. Guntram Suske, IMT, Marburg zur Verfügung gestellt.

Die Gastrinreportergenkonstrukte, die für die Untersuchungen benutzt wurden sind im Folgenden aufgelistet: hugasLuc -1300, hugasLuc -1145, hugasLuc -1035, hugasLuc -935, hugasLuc -835, hugasLuc -710, hugasLuc -600, hugasLuc -510, hugasLuc -400, hugasLuc -240, hugasLuc -190, hugasLuc -148, hugasLuc -119, hugasLuc -82, hugasLuc -79, hugasLuc -68, hugasLuc -40. Diese wurden anhand der Polymerasekettenreaktion (PCR) und dem Konstrukt hugasLuc -1300 als Template und nachfolgender Subklonierung der amplifizierten 5'-Fragmente in den promotorlosen

Expressionsvektor PGL2-Basic hergestellt (B. Simon). Neben den Wildtyp Sequenzen wurden auch Gastrinreportergenkonstrukte mit Mutationen wie hugasLuc-240 Mutante 1 (CRE (GT-Box) mutiert), hugasLuc-240 Mutante 3 (gERE/Sp1 Seite mutiert), hugasLuc-240 Mutante 12 (CRE (GT-Box) und CACC Seiten mutiert), hugasLuc-240 Mutante 13 (CRE (GT-Box) und gERE/Sp1 Seiten mutiert), hugasLuc-119 MT1 (Mutante 1), hugasLuc-119 MT2 (Mutante 2), hugasLuc-119 MT3 (Mutante 3) eingesetzt. Die Lokalisation der Mutationen innerhalb der Sequenz des proximalen Gastrinpromotors ist in Abbildung 1 A-C verdeutlicht.



### Abbildung 1: Sequenz des proximalen humanen Gastrinpromotors und Lokalisation angewandter Mutationen

A) Sequenz des proximalen humanen Gastrinpromotors. Die Positionen der bekannten *cis*-regulatorischen Elemente sind farbig markiert. Die Zahlen oberhalb der Sequenz entsprechen der Nukleotidposition. Bekannte Sp1-Bindungsseiten sind I bis III gekennzeichnet. B) Lokalisation der Mutationen in den Gastrinreportergenkonstrukten hugasLuc -240 und C) hugasLuc -119, die rot gekennzeichnet sind. WT, Wildtyp; Mt, Mutante. Sp1, ZBP-89 sind Transkriptionsfaktoren, deren Bindung an den entsprechenden *cis*-regulatorischen Elementen in anderen Zellsystemen nachgewiesen worden ist (siehe Einleitung).

## **2.4. Sicherheitsvorkehrungen und Abfallbeseitigung**

Gentechnische Arbeiten wurden gemäß den Richtlinien des Gentechnikgesetzes und der Gentechniksicherheitsverordnung nur in zugelassenen Räumen der Sicherheitsstufe S1 durchgeführt. Mit eukaryontischen Zellen kontaminierte Gefäße, Lösungen oder Abfälle wurden autoklaviert. Zum Schutz gegen Kontamination von Haut und Kleidung wurden Einweghandschuhe und Laborkittel getragen. Infektiöses Material wurde nach Autoklavieren oder Desinfektion entsorgt. Lösungsmittelreste und giftige Feststoffe wurde getrennt in entsprechenden Behältern gesammelt und der vorgeschriebenen Beseitigung zugeführt.

## **2.5 Molekularbiologische Standardverfahren**

Alle Arbeitsschritte wurden, falls nicht anders erwähnt, bei 4° C durchgeführt. Verwendete Medien, Puffer und Lösungen wurden mit Aqua bidest angesetzt und autoklaviert, bzw. sterilfiltriert. Ihre Zusammensetzung, sowie die Durchführung von Standardverfahren der Molekularbiologie, sofern sie nicht näher beschrieben werden, sind dem Methodenbuch „Molecular cloning, a laboratory manual“ (Sambrook et al, 1989) zu entnehmen.

### **2.5.1. Spaltung von DNA mit Restriktionsendonukleasen**

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

### 2.5.2. Entfernungen von Proteinen aus DNA-Lösungen

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

### 2.5.3. Fällen und Waschen von DNA

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

### 2.5.4. Quantifizierung von DNA

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

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

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

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

Der Reinheitsgrad der DNA ergibt sich aus dem Quotienten  $\text{OD}_{260}$  und  $\text{OD}_{280}$ , er sollte optimalerweise einen Wert zwischen 1,8 und 2 ergeben.

### 2.5.5. Transformation

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

### 2.5.6. Präparative Plasmidgewinnung

#### LB<sub>amp</sub>-Medium (1 Liter)

5 g NaCl, 5 g Yeast Extract, 10 g Bacto Trypton; Ampicillin 100 µg/ml

#### Tris-EDTA pH 8.0

10 mM Tris/HCl, 1 mM EDTA

Zur präparativen Plasmidgewinnung wurden Bakterienkulturen in 200 ml LB-Medium mit Ampicillin über Nacht angesetzt. Am Folgetag wurde nach Zentrifugation bei 4°C mit 5000 rpm zur Plasmidextraktion der Nucleobond® Kit PC 500 (Machery-Nagel) nach Anleitung des Herstellers verwendet. Das gewonnene Pellet wurde in 200 µl Tris-EDTA pH 8.0 gelöst und die DNA Konzentration photometrisch bestimmt. Die Überprüfung der Plasmide erfolgte mit Hilfe einer Restriktionsspaltung.

### 2.5.7. Restriktionsanalyse

Für den Restriktionsverdau wurden die Endonukleasen HIND III, NOT I, BAM/HI, PVU I, SMA I, XHO I, ECO R I, mit den entsprechenden Puffern und in geeigneter Menge im Verhältnis zur DNA eingesetzt. Anschließend wurde bei 37°C inkubiert, beim Einsatz der Endonuklease SMA I wurde bei 30°C „über Nacht“ verdaut.

### 2.5.8. Agarosegelelektrophorese

#### Reagenzien:

Agarose

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

Ethidiumbromid

BSA

DNA-Marker Nr. III (564 – 21226 bp) und VIII (1116 bis 110 bp) Fa. MBI Fermentas

#### Durchführung:

Zur Darstellung von DNA Fragmenten wie Produkten aus dem Restriktionsenzymverdau, wurde ein Flachbettagarosegel mit Ethidiumbromidzusatz hergestellt, um Nukleinsäuren unter UV-Licht (366 nm) nachzuweisen. Abhängig von der Länge des abzubildenden Fragmentes wurde das Gel entweder als 1%ige Lösung bei Fragmenten über 1000 Basenpaaren, als 2%ige Lösung bei Fragmenten zwischen 1000 und 200 bp oder als 3%ige Lösung bei Fragmenten unter 200 bp hergestellt. Zur Herstellung eines 1%igen Agarosegels wurden 0,5 g Agarose und 60 ml 0,5 x TBE pH 8,3 in einen Erlenmeyer- Kolben gegeben und in der Mikrowelle erhitzt, bis sich die Agarose löste. Danach wurden 3 µl (0,5 µg/ml) Ethidiumbromid hinzugegeben. Beim Arbeiten mit Ethidiumbromid ist Vorsicht geboten (Handschuhe und Schutzbrille), da es durch das Interkalieren in doppelsträngige DNA mutagene Wirkungen hervorrufen kann. Nachdem das Gemisch eine Temperatur von ca. 40° Celsius erreicht hatte, wurde es in eine Agarose-Gelkammer gegossen. Das erhärtete Gel wurde vorsichtig in eine Elektrophoreseapparatur gelegt und diese mit 0,5 x TBE-Puffer pH 8,3 aufgefüllt. Die Proben wurden in einzelne Fragmente gespalten, indem man die DNA mit Restriktionsenzymen, Puffer des jeweiligen Enzyms (1/10 des Reaktionsvolumens), 1 µg BSA und autoklaviertem Aqua bidest versetzte und 90-120 Minuten bei dem Temperaturoptimum der Enzyme inkubierte. Die „verdauten“ Proben wurden mit 1 µl Loading Dye (1/6 Loading Dye des Endvolumens) versetzt und in die Geltaschen injiziert. Jeweils 1-2µl der DNA-Marker Nr. III (564 – 21226 bp) oder VIII (1116 bis 110 bp) wurden verwendet. Die Auftrennung im Gel erfolgte bei einer Spannung von ca. 100 Volt über einen Zeitraum von ca. 1,5 Stunden. Die Ethidiumbromid-markierten DNA-Banden im Gel wurden unter UV-Licht photographisch dokumentiert.

## 2.6. Zellbiologische Methoden

### 2.6.1. Zelllinien und Kultivierung

#### Medien für BON I Zellen:

DMEM/HAM's F 12 mit L-Glutamin und Natrium Bicarbonat, 5% fetales Kälberserum (FCS) und 1% Penicillin/Streptomycin (Stock 1000 U/ml)

Transfektionsmedium: DMEM-Medium mit L-Glutamin, 10% fetales Kälberserum und 1% Penicillin/ Streptomycin

Medium für SL2 Zellen: Schneider *Drosophila* Medium mit 10% fetalem Kälberserum (FCS), 1% Penicillin/ Streptomycin, 1% L- Glutamin

Für die Untersuchungen wurden die humane neuroendokrine Pankreastumorzelllinie BON I, die initial aus einem neuroendokrinen Pankreastumor (Karzinoid) etabliert wurde (Evers et al, 1991) sowie die *Drosophila* Zellen Schneider SL2 (Schneider, 1972) verwendet. Die Durchführung der Versuche erfolgte an einem sterilen Arbeitsplatz in einem Labor der Sicherheitsstufe 1.

Die Zellen wurden in Gewebekulturflaschen oder –schalen in wassergesättigter Atmosphäre in einem Brutschrank bei 37°C (BON I) oder 25°C (SL2) unter Begasung mit 5% CO<sub>2</sub> und 95% Luft kultiviert. Zur Passagierung der Zellen (z.B. Gewebekulturflaschen) wurden diese mit 5 ml PBS-Puffer gewaschen und anschließend mit 2 ml Trypsin-EDTA-Lösung bei 37°C (BON I) und 25°C (SL2) im Brutschrank vom Boden gelöst. Nach vollständigem Ablösen wurde Trypsin durch Zugabe von 10 ml des Mediums inaktiviert. Diese Zellsuspension diente zur Passagierung (Gewebekulturflächen) oder der Vorbereitung der transienten Transfektion. Zu letzterem wurde die Suspension nach Zellzahlbestimmung mit DMEM/HAM's F12 Medium (BON I) oder Schneider –Medium (SL2) vermischt und auf Polyethylen beschichtete Petrischalen (Fa. Greiner) mit einer Fläche von 28 cm<sup>2</sup> mit 10% Konfluenz ausplattiert.

### **2.6.2. Einfrieren und Auftauen von Zellen**

Zellen, die nicht für Experimente benötigt wurden, wurden eingefroren und in Flüssigstickstoff gelagert. Für 10 Zellfraktionen von je einer (10 cm Durchmesser) Schale wurde ein Ansatz von 10 ml Gefriermedium vorbereitet. Dieses enthielt 5,5 ml Zellkulturmedium, 2,5 ml FCS und 2 ml DMSO. Die Zellen wurden in Trypsin/EDTA abgelöst und abzentrifugiert. Das Zellpellet wurde in 0,9 ml Kulturmedium resuspendiert und in ein Kryo-Röhrchen (2 ml) gegeben. Hierzu wurden tropfenweise 0,9 ml des Gefriermediums zugefügt und stufenweise in flüssigem Stickstoff eingefroren. Das Auftauen der Zellsuspension erfolgte schnell im warmen Wasserbad. Die aufgetauten Zellen wurden für 5 min bei 1200 Upm zentrifugiert, das Pellet in Medium aufgenommen und die Zellsuspension ausplattiert.

### **2.6.3. Bestimmung der Zellzahl**

Die Zellzählung erfolgte in einer Neubauer-Zählkammer unter dem Lichtmikroskop. Diese besteht aus neun 1mm<sup>2</sup> großen Quadraten, von denen die vier Eckquadrate nochmals in je 16 kleinere Quadrate unterteilt sind. Nach sachgerechtem Aufbringen eines Deckglases, erkennbar an sichtbaren Newtonschen Ringen an den Auflageflächen, beträgt der Abstand 0,1 mm und damit das Volumen eines Eckquadrates: 1 mm<sup>2</sup> x 0,1 mm = 0,1 mm<sup>3</sup> oder 10<sup>-4</sup> ml. Die Zellsuspension wurde 1:10 verdünnt und 0,5 ml mit der gleichen Menge 0,5% Trypanblau-Lösung gemischt. Mit einer kleinvolumigen Pipette wurde die Kammer gefüllt, nachdem die Zellen vorher gut in Suspension gebracht worden waren.

### **2.6.4. Behandlung mit Natriumbutyrat**

Eine 30 mM Natriumbutyrat Stocklösung wurde durch Zugabe von 0,11 g Natriumbutyrat zu 33,3 ml Zellkulturmedium hergestellt. Diese wurde durch einen Falcon Filter (Porengröße 0,2 µm) steril filtriert. Durch Verdünnung der Lösung mit sterilem Medium wurde die jeweilige Endkonzentration von 1mM bzw. 2 mM erreicht.

### 2.6.5. Transiente Transfektion

Calciumchlorid-Lösung (sterilfiltriert):	250 mM CaCl <sub>2</sub>
HBS (2x), pH 7,05 (sterilfiltriert)	50 mM HEPES, 10 mM KCl, 12 mM Dextrose, 280 mM NaCl, 1,5 mM Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>

Die transiente Transfektion ermöglicht die Übertragung von DNA in eukaryote Zellen. Auf diese Weise kann die transkriptionelle Regulation eines Promotorbereiches untersucht werden. Der Nachweis der Promotoraktivität erfolgte anhand des Luciferase-Reportergens (pGL2-Basic), das 3' der Gastrinpromotersequenz kloniert wurde (Simon et al, 1997). Unterschiede in der Transfektionseffizienz wurden durch Kotransfektion mit dem Kontrollplasmid pSV-β-Gal, welches Galaktosidase exprimiert, kontrolliert und normalisiert. Als Negativkontrolle diente das promotorlose pGL-2 Basic Plasmid. Zur Beurteilung der Transfektionseffizienz diente das pGL-2 Control Plasmid. Die transiente Transfektion erfolgte nach der Calcium-Phosphat-Methode (Wigler et al, 1997).

Nach Passagierung der Zellen und Erreichen einer 50% Konfluenz wurde zur Transfektion das Medium von den Petrischalen entfernt und jeweils 3 ml des Transfektionsmediums DMEM (BON I Zellen) oder Schneider *Drosophila*-Medium (SL2 Zellen) hinzugegeben. Hierzu wurden 250 µl CaCl<sub>2</sub> und 250 µl 2x konz. HBS pro Petrischale jeweils in ein Röhrchen gefüllt und jeweils mit 5 µg DNA und 2 µg pSV-β-Gal-Plasmid versetzt. Dieses Gemisch wurde unter 1-minütiger Luftzufuhr über eine Glaspipette langsam in ein zweites Röhrchen mit 250 µl 2x HBS überführt und 30-60 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wurden 500 µl des feinpräzipitierten Gemisches auf jeweils eine Petrischale ausplattiert und über Nacht im Brutschrank bei 37° C (BON I) / 25° C (SL2) inkubiert.

Am nächsten Tag wurde das Medium gewechselt. Es wurden pro Schale 3 ml Kulturmedium DMEM/HAM's F12, je nach Versuchsaufbau mit und ohne Natriumbutyrat bei BON I Zellen oder Schneider-Medium (SL2) hinzugegeben. Zu definierten Zeitpunkten wurden die Zellen in 0,5 ml PBS geerntet und die Luciferase- und β-Galaktosidaseaktivität bestimmt.

### **2.6.6. Proteinquantifizierung nach dem Bio- Rad- Assay (nach Bradford)**

BSA-Lösung (Rinderserumalbumin) (Konzentration 1 µg/µl)

Bio-Rad- Konzentrat der Fa. Bio-Rad, München

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

### **2.6.7. Bestimmung der Luciferase Aktivität**

Es wurde das Luciferase Assay System der Fa. Promega zur Quantifizierung der Genexpression verwendet. Luciferase ist ein Protein, welches aus 61 kDa besteht und nicht auf posttranslationale Prozesse der Enzymaktivität eingreift. Es eignet sich daher hervorragend als Reportergen. Wenn man Luciferin und ATP zu den Luciferase exprimierenden Zellen hinzufügt, katalysiert das Enzym eine Reaktion, bei der Luciferin oxidiert wird. Dabei entstehen AMP, Kohlendioxid und Licht. Die Lichtemission wird mit einem Luminometer gemessen. Die durch die Luciferase produzierten Lichtblitze besitzen die höchste quantitative Effizienz, die von Chemilumineszenzreaktionen bekannt ist. So ist die Luciferase Aktivität als Ausdruck der Gastrinpromotoraktivität zu bewerten.

Die in PBS geernteten Zellen wurden in Eppendorfcups 3 Minuten bei 13000 rpm zentrifugiert, der Überstand abgesaugt und das Pellet in 100µl Reporter-Lysis-Puffer (1:5 in Aqua bidest verdünnt) gelöst und zweimal in Flüssigstickstoff schockgefroren. Nach der Zellyse wurde der Ansatz erneut 3 Minuten bei 13000 rpm zentrifugiert und der Überstand in ein neues Reaktionsgefäß überführt. Zur Messung der Luciferaseaktivität wurden 5 µl des Überstandes in ein Plastik- Röhrchen der Firma Beckman pipettiert und im Lumaten (Fa. Bechthold) gemessen. Dabei wurden jeweils 100 µl Luciferase Assay Substrate injiziert. Der Leerwert betrug etwa 100 Light-Units und wurde automatisch von den Messwerten abgezogen.

### **2.6.8. Bestimmung der $\beta$ -Galaktosidase Aktivität**

Als interner Standard wurde das pSV- $\beta$ -Gal Plasmid kotransfiziert. Die  $\beta$ -Galaktosidase Bestimmung erfolgte mit Hilfe des Galacto-Light TM und Galacto-Light plus<sup>TM</sup> der Firma Tropix, Inc.; Massachusetts, USA. Es handelt sich hierbei um ein Chemiluminescent Reporter Assay zur Detection von  $\beta$ -Galactosidase in Zellysaten. Die Zellextrakte wurden bei 48°C für 50 Minuten erhitzt um die endogene  $\beta$ -Galactosidase Aktivität zu inaktivieren. Die benötigte Menge an Galacto-Light Reaction Buffer, bestehend aus Galacton Plus (100fach) und Galacto-Light Reaction Buffer Diluent, wurde auf Zimmertemperatur erwärmt. 5  $\mu$ l des vorinkubierten Zellextraktes wurden auf den Boden eines Meßröhrchens pipettiert und 66,6  $\mu$ l des Reaktionspuffers zeitversetzt alle 20 Sekunden hinzugegeben. Nach einer 60minütigen Inkubationszeit bei Raumtemperatur wurde je ein Röhrchen in den Luminometer gestellt. Der Leerwert betrug ca. 100  $\mu$ l Light Emission Accelerator und wurde automatisch abgezogen.

### **2.6.9. Auswertung der Transfektionsergebnisse**

Jede Transfektion wurde in der Regel mindestens zweimal durchgeführt, um die Reproduzierbarkeit zu gewährleisten. Bei jeder Transfektion wurden je drei gleiche Proben transfiziert und gemessen. Die gemessene Luciferase-Aktivität wurde auf die jeweilige  $\beta$ -Galaktosidase-Aktivität, die als interne Transkriptionskontrolle diente, bezogen und daraus der Mittelwert und die Standardabweichung bestimmt. Bei manchen Transfektionen war es notwendig die Proteinkonzentration als interne Kontrolle zu bestimmen. Die Auswertung erfolgte mittels Microsoft Excel. Die Signifikanz der Ergebnisse wurde mit Hilfe des t-Testes ermittelt. Der t-Test dient der Prüfung, ob zwei Stichproben mit Stichprobenumfang  $n_1$  und  $n_2$  dieselbe Grundgesamtheit zugrunde liegt. Mit ihm ist eine Aussage darüber möglich, ob die verwendeten Substanzen einen signifikanten Unterschied in der Menge der gemessenen Parameter im Vergleich zur Kontrolle besitzen, oder ob sie von dieser statistisch nicht zu unterscheiden sind.

### 3. Ergebnisse

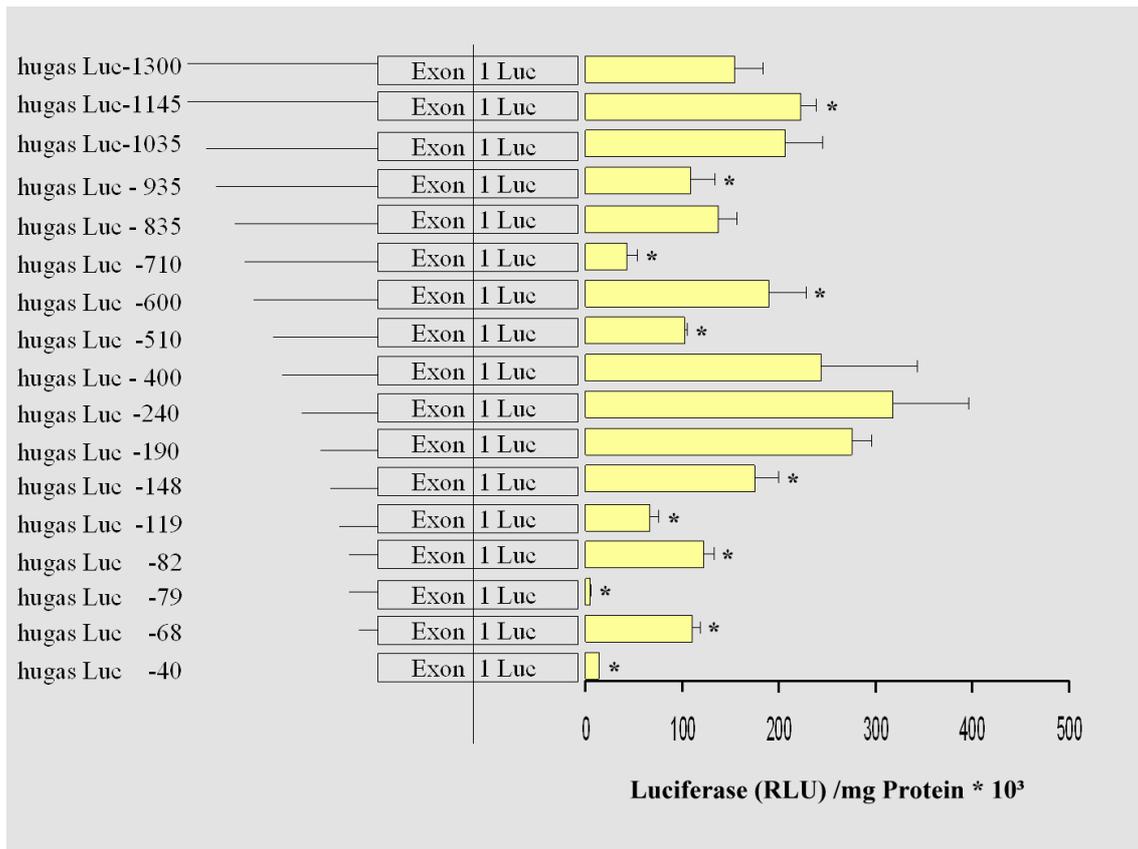
#### 3.1. Expression des humanen Gastrinpromotors in den neuroendokrinen Pankreastumorzellen BON I und Lokalisation *cis*-regulatorischer Elemente

Es sollte zunächst die Frage beantwortet werden, ob der Gastrinpromotor in den humanen neuroendokrinen Pankreastumorzellen BON I exprimiert wird. Darüberhinaus sollten in BON I Zellen relevante *cis*-regulatorische Elemente des Gastrinpromotors identifiziert werden. Dazu wurden verschiedene Gastrinreportergenkonstrukte hugasLuc -40, hugasLuc -68, hugasLuc -79, hugasLuc -82, hugasLuc -119, hugasLuc -148, hugasLuc -190, hugasLuc -240, hugasLuc -400, hugasLuc -510, hugasLuc -600, hugasLuc -710, hugasLuc -835, hugasLuc -935, hugasLuc -1035, hugasLuc -1145 und hugasLuc-1300 mithilfe der Calcium-Phosphat-Präzipitationsmethode transient in BON I Zellen transfiziert und nach 24 Stunden die Luciferaseaktivität als Ausdruck der Promotoraktivität in relativen Lichteinheiten (RLU) pro Proteinkonzentration gemessen. Die angewandten Gastrinreportergenkonstrukte und deren Promotoraktivität in BON I Zellen ist in Abbildung 2 dargestellt.

Die Deletion von Nukleotid (Nn) -1145 nach Nn-1035 führte zu einem Abfall der Promotoraktivität von 6,8%, von Nn-1035 nach Nn-935 zu einer Reduktion um 47,5%, von Nn-835 nach Nn-710 um 69,2% von Nn-600 nach Nn-510 um 46,0% und von Nn-240 nach Nn-190 um 13,2% als Hinweis für unterschiedlich stark positiv *cis*-regulatorische Elemente in den deletierten Promotorbereichen. Eine Reduktion der Promotoraktivität erfolgte auch nach Deletion von Nn-190 nach Nn-148 mit einem Abfall von 36,7% und von Nn-148 nach Nn-119 mit einem 62,1%igen Abfall. Eine starke, um 95,8%ige Reduktion der Promotoraktivität erfolgte nach Deletion von Nn-82 nach Nn-79, was auf ein stark positiv *cis*-regulatorisches Element weist. Ebenso führte die Deletion von Nn-68 nach Nn-40 zu einer 87,6%igen Reduktion der Promotoraktivität, sodass hier der Ausfall eines weiteren positiv *cis*-regulatorischer Elementes anzunehmen ist. Im Gegensatz dazu zeigten die Deletionen von Nn-1300 nach Nn-1145 einen Anstieg um 44,0%, von Nn-935 nach Nn-835 eine Zunahme um

26,3% und von Nn-710 nach Nn-600 einen sehr starken, 347,6%igen Anstieg der Promotoraktivität als Ausdruck für mögliche negativ *cis*-regulatorische Elemente in den deletierten Sequenzabschnitten. Desgleichen führte die Deletion von Nn-510 nach Nn-400 zu einer 138,3%igen Erhöhung, von Nn-400 nach Nn-240 zu einem Anstieg von 30,4% und von Nn-119 nach Nn-82 zu einer Zunahme um 84,8% der Promotoraktivität. Zu der stärksten, einer Erhöhung um 2068,5% der Promotoraktivität, führte die Deletion von Nn-79 nach Nn-68, so dass hier ein starkes negativ *cis*-regulatorisches Element zu vermuten ist.

Die Versuche zeigen, dass der humane Gastrinpromotor in BON I Zellen aktiv ist und starke *cis*-regulatorische Elemente im proximalen Promotorbereich lokalisiert sind.



**Abbildung 2: Promotoraktivität der 5'-Deletionskonstrukte des humanen Gastrinpromotors in der humanen neuroendokrinen Pankreastumorzelllinie BON I.**

In der linken Hälfte sind die Gastrinreportergenkonstrukte hugasLuc-1300 bis hugasLuc-40 schematisch dargestellt die transient in BON I Zellen transfiziert wurden. Die rechte Bildseite zeigt die Ergebnisse der Messung der Luciferaseaktivität als Ausdruck der Promotoraktivität der betreffenden Gastrinreporterkonstrukte. Die Luciferasewerte sind anhand der Proteinkonzentration normalisiert und in relativen Lichteinheiten (RLU) angegeben. Die Werte sind Mittelwerte  $\pm$  SEM aus drei Versuchen. \* bezeichnet statistisch signifikant bei  $p < 0,05$ .

## **3.2. Natriumbutyrateabhängige transkriptionelle Regulation des humanen Gastrinpromotors in neuroendokrinen Pankreastumorzellen BON I**

### **3.2.1. Natriumbutyrat hemmt die Proliferation von BON I Zellen**

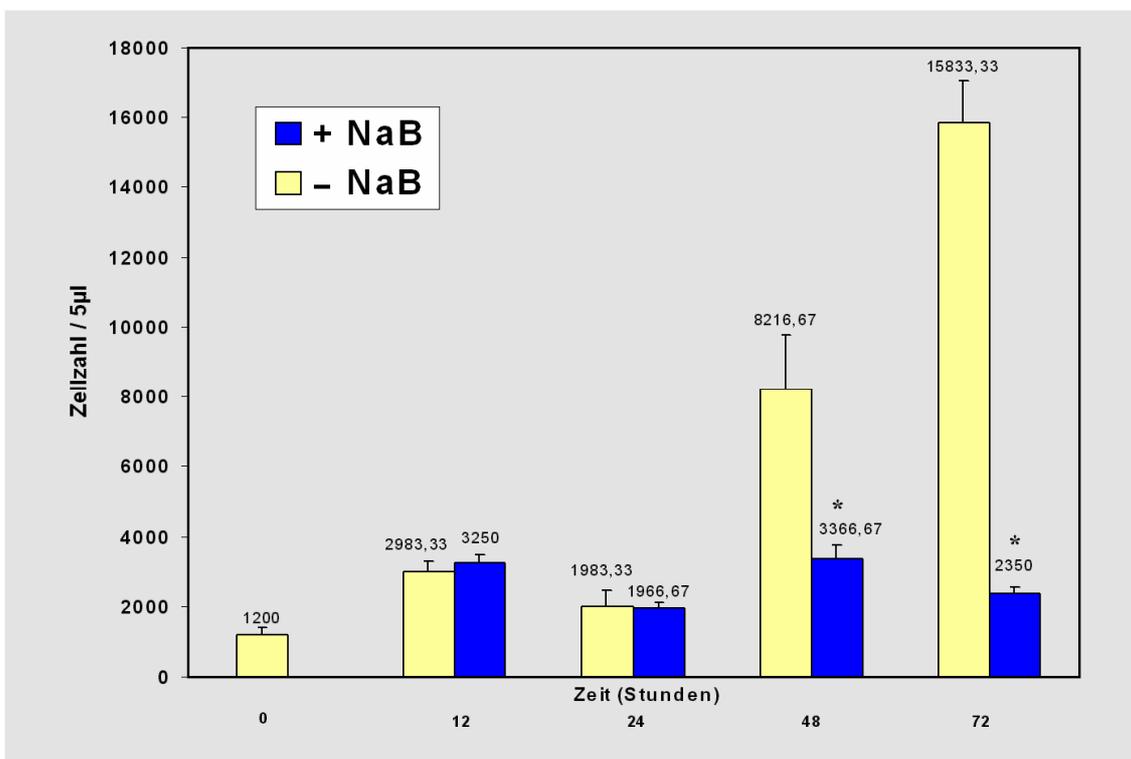
Um den Einfluß von Natriumbutyrat auf die BON I Pankreastumorzellen zu untersuchen, wurde zunächst die Zellproliferation unter Natriumbutyratbehandlung analysiert. Dazu wurden BON I Zellen entweder ohne (Kontrolle) oder mit 2 mM Natriumbutyrat (NaB) für 12, 24, 48 und 72 Stunden in serumfreien Medium inkubiert und anschließend die Zellzahl anhand der Neubauer-Zählkammer bestimmt. Nach 12 und 24 Stunden war nur eine geringe 2,5 bzw. 1,7-fache Zunahme der Zellproliferation nachzuweisen. Ein deutlicher Anstieg der Zellproliferation zeigte sich nach 48 Stunden und nach 72 Stunden mit einer 6,9-fachen bzw. 13,2-fachen Zunahme bezogen auf den Zeitpunkt 0. Ein Vergleich der unbehandelten BON I Zellen mit den natriumbutyrat - behandelten Zellen zeigte nach 12 -und 24-stündiger Inkubationszeit keine signifikante Differenz der Zellzahlen. Eine Proliferationshemmung wurde bei den mit 2 mM Natriumbutyrat behandelten Zellen erst nach 48-stündiger Inkubationszeit deutlich. Nach 48 Stunden lag die Zellzahl der behandelten Zellen etwa 2,4-fach niedriger, nach 72 Stunden sogar 6,7-fach niedriger als die der unbehandelten BON I Zellen.

Diese Ergebnisse in Abbildung 3 zeigen, dass die Behandlung mit 2 mM Natriumbutyrat zu einer Proliferationshemmung der neuroendokrinen Pankreastumorzellen BON I führt, die nach 48 Stunden Behandlung deutlich wird. Die Ergebnisse sind in Tabelle 1 und Abbildung 3 dargestellt und stellen Mittelwerte aus drei Versuchen dar.

**Tabelle 1:** Wirkung von Natriumbutyrat auf die Zellzahl der neuroendokrinen Pankreastumorzellen BON I

Inkubationszeit	Unbehandelte Zellen (Zellzahl / 5 $\mu$ l $\pm$ SEM)	Mit 2 mmol NaB behandelte Zellen (Zellzahl / 5 $\mu$ l $\pm$ SEM)
0 Std.	100 % (1200 $\pm$ 204,1)	
12 Std.	249 % (2983,33 $\pm$ 311,8)	271 % (3250 $\pm$ 248,3)
24 Std.	165 % (1983,33 $\pm$ 473,2)	164 % (1966,67 $\pm$ 154,6)
48 Std.	685 % (8216,67 $\pm$ 1547,2)	281 % (3366,67 $\pm$ 392,3)
72 Std.	1319 % (15.833,33 $\pm$ 1196,1)	196 % (2350 $\pm$ 216)

NaB, Natriumbutyrat; Std., Stunde. Die ermittelten Werte wurden auf die Kontrollgruppe (0 Std., unbehandelt) und deren prozentuale Abweichung (%) errechnet. Mittelwerte  $\pm$  SEM aus drei Versuchen.



**Abbildung 3:** Wirkung von Natriumbutyrat auf die Zellproliferation der neuroendokrinen Pankreastumorzelllinie BON I.

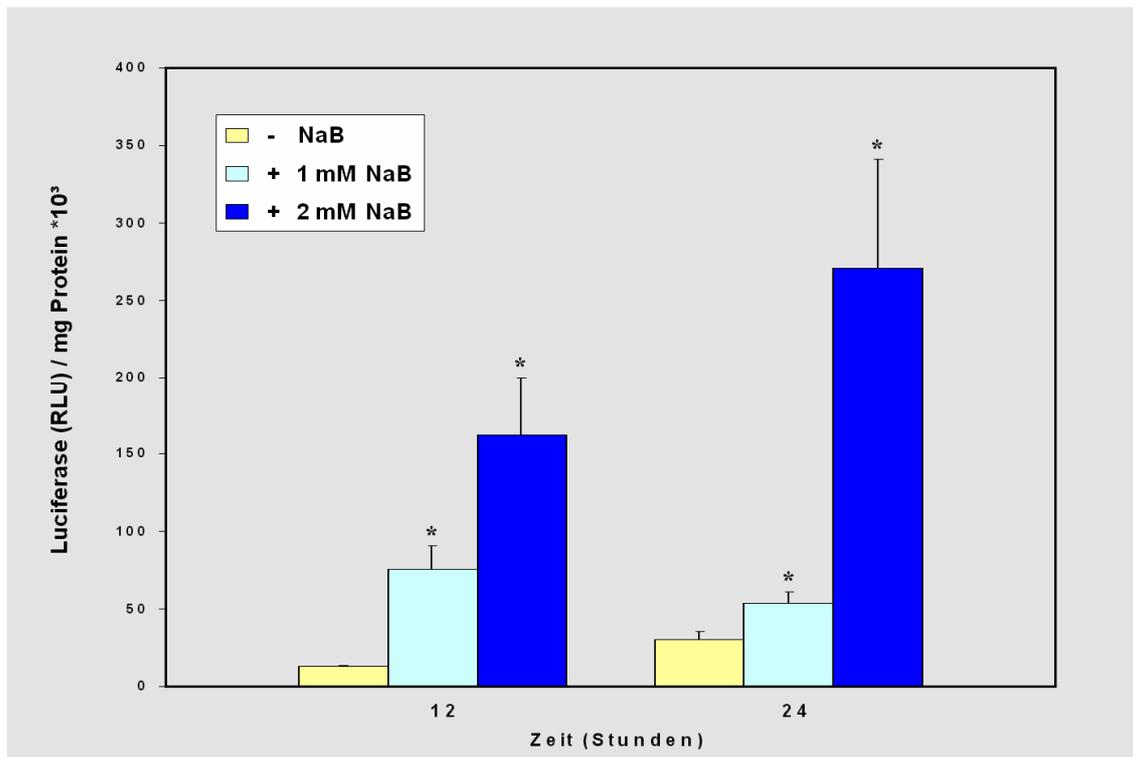
Die Zellen wurden ohne (- NaB, gelbe Säulen) oder mit 2 mM Natriumbutyrat (+ NaB, blaue Säulen) für 12, 24, 48 und 72 Stunden in serumfreien Medium inkubiert. Die Zellzählung erfolgte in einer Neubauer-Zählkammer. Mittelwerte  $\pm$  SEM aus drei Versuchen. \* bezeichnet statistisch signifikant bei  $p < 0,05$ .

### **3.2.2. Dosisabhängige Natriumbutyrat-induzierte Stimulation der Gastrinpromotoraktivität in BON I Zellen**

Es wurde im folgenden untersucht, ob Natriumbutyrat einen dosisabhängigen Einfluss auf die transkriptionelle Aktivität des humanen Gastrinpromotors in humanen neuroendokrinen Pankreastumorzellen BON I ausübt. Um die Frage zu beantworten, wurden die neuroendokrinen Pankreastumorzellen BON I mit dem Gastrinreportergenkonstrukt *hugasLuc-240* mithilfe der Calcium-Phosphat-Methode transient transfiziert. Anschließend wurden die Zellen ohne Natriumbutyrat (NaB) oder mit 1 mM oder 2 mM NaB für 12 und 24 Stunden behandelt. Die Bestimmung der Promotoraktivität erfolgte durch Messung der Luciferaseaktivität angegeben in relativen Lichteinheiten (RLU) und normalisiert mit der Proteinkonzentration. Das kotransfizierte Plasmid RSV- $\beta$ -Gal zeigte eine deutliche Stimulation durch die Natriumbutyratbehandlung, sodass die  $\beta$ -Galaktosidaseaktivität nicht zur Transfektionskontrolle herangezogen werden konnte.

Die Ergebnisse sind als Mittelwerte aus drei Versuchen in Abbildung 4 dargestellt. Die Gastrinpromotoraktivität stieg nach Zugabe von Natriumbutyrat sowohl nach 12 Stunden als auch nach 24 Stunden im Vergleich zu den unbehandelten Zellen an. Nach 12-stündiger Inkubation zeigte sich unter 1 mM Natriumbutyrat-Behandlung ein 5,8-facher Anstieg und unter 2 mM Natriumbutyrat ein 12,3-facher Anstieg der Gastrinpromotoraktivität im Vergleich zu den unbehandelten BON I Zellen. Nach 24-stündiger Inkubation mit 1 mM Natriumbutyrat war nur eine 1,8-fache Erhöhung, mit 2 mM Natriumbutyrat dagegen ein 9-facher Anstieg der Gastrinpromotoraktivität im Vergleich zu den unbehandelten Zellen festzustellen.

Diese Ergebnisse weisen darauf hin, dass Natriumbutyrat die Gastrinpromotoraktivität konzentrationsabhängig induzieren kann und lässt ein oder mehrere Natriumbutyrat-Response Elemente (NaB-RE) innerhalb der Nukleotide -240 und -40 im proximalen humanen Gastrinpromotor vermuten.



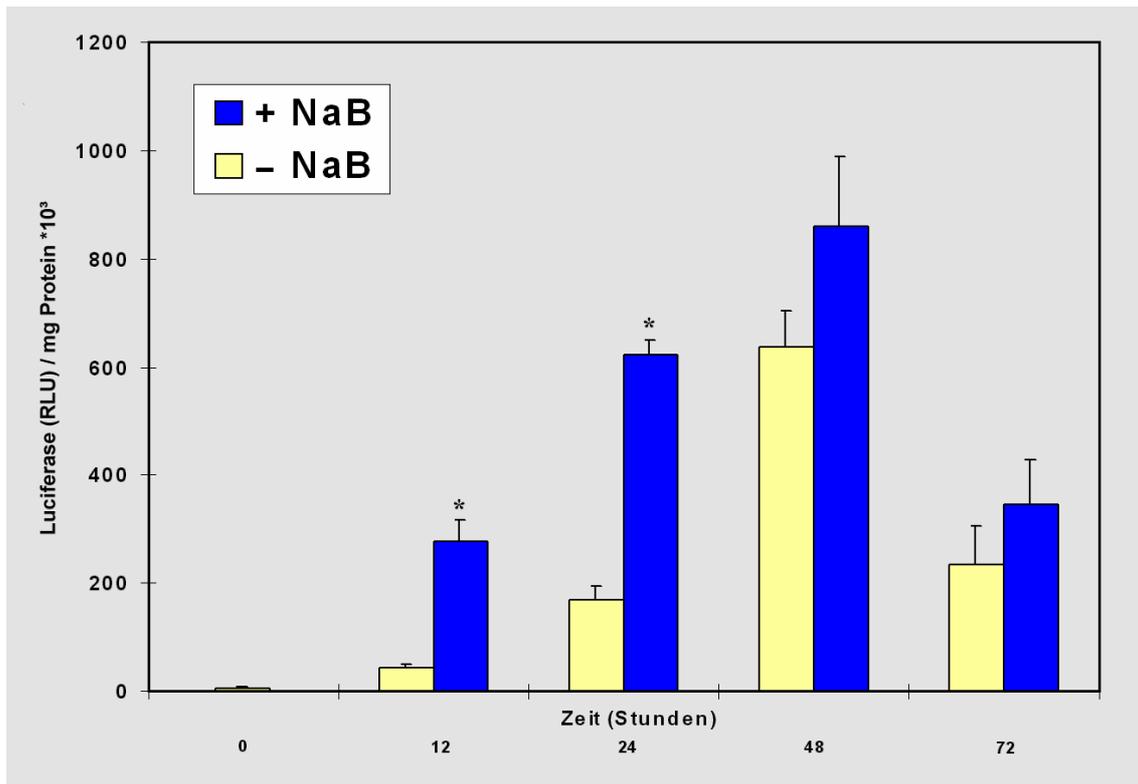
**Abbildung 4: Natriumbutyrat stimuliert konzentrationsabhängig die Gastrinpromotoraktivität.**

Die neuroendokrinen Pankreastumorzellen BON I wurden mit dem Gastrinreportergenkonstrukt *hugasLuc-240* (5 $\mu$ g) transient transfiziert. Nach 24 Stunden wurden die transfizierten BON I Zellen für 12 oder 24 Stunden ohne Natriumbutyrat (- NaB, gelbe Säulen) oder mit 1 mM (+ 1 mmol NaB, hellblaue Säulen) bzw. 2 mM NaB (+ 2 mmol NaB, dunkelblaue Säulen) in serumfreien Medium inkubiert und die Luciferaseaktivität und Proteinkonzentration bestimmt. Die Werte (Mittelwerte  $\pm$  SEM aus drei Versuchen) sind in relativen Lichteinheiten (RLU) normalisiert zur Proteinkonzentration angegeben. \* bezeichnet statistisch signifikant bei  $p < 0,05$ .

### **3.2.3. Transiente Natriumbutyrat-induzierte Stimulation der Gastrinpromotoraktivität in BON I Zellen**

Um den Einfluss der Natriumbutyrat-Inkubationszeit auf die Gastrinpromotoraktivität in neuroendokrinen Pankreastumorzellen BON I zu untersuchen, wurden BON I Zellen mit dem Gastrinreportergenkonstrukt *hugasLuc-240* mithilfe der Calcium-Phosphat-Methode transient transfiziert und über einen Zeitraum von 12, 24, 48 oder 72 Stunden ohne Natriumbutyrat (NaB) und mit 2 mM NaB inkubiert. Im Anschluss wurde die Luciferaseaktivität in relativen Lichteinheiten (RLU) als Ausdruck der Promotoraktivität gemessen. Die Kotransfektion mit RSV- $\beta$ -Gal führte zur natriumbutyrat-abhängigen Induktion von  $\beta$ -Galaktosidase, sodass diese als interne Kontrolle nicht angewandt werden konnte. Es wurde daher die Luciferaseaktivität in Relation zur Proteinkonzentration bestimmt.

Die Ergebnisse sind in Abbildung 5 dargestellt. Bei den unbehandelten BON I Zellen zeigte sich nach einer Inkubationszeit von 12 Stunden eine 8,4-fache Erhöhung, nach 24 Stunden eine weitere 3,9-fache Zunahme und ein 3,8-facher Anstieg nach 48stündiger Inkubation. Die weitere Inkubation bis 72 Stunden führte zu einer 2,7-fachen Reduktion der Gastrinpromotoraktivität. Der Vergleich der natriumbutyrat-behandelten Zellen mit den unbehandelten Zellen zeigte eine signifikante natriumbutyrat-induzierte Stimulation ( $p < 0,05$ ) der Gastrinpromotoraktivität sowohl nach 12 Stunden als auch nach 24 Stunden. Die mit Natriumbutyrat behandelten Zellen demonstrierten nach einer Inkubationszeit von 12 Stunden einen 6,5-fachen Anstieg im Vergleich zu den unbehandelten Zellen, nach 24-stündiger Inkubationszeit eine 3,7-fache Erhöhung. Nach längeren Inkubationszeiten, sowohl nach 48 als auch nach 72 Stunden, ließ sich noch lediglich ein 1,4 bzw. 1,5-facher Unterschied der Luciferaseaktivität in den natriumbutyrat-behandelten Zellen nachweisen.



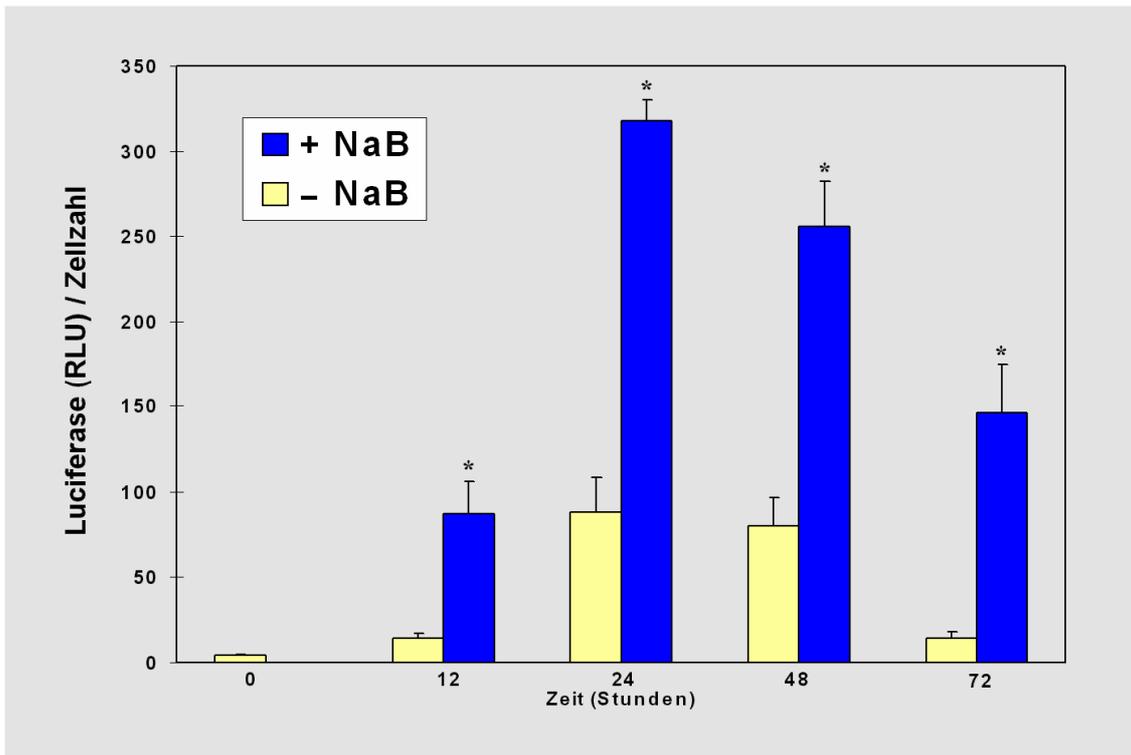
**Abbildung 5: Zeitabhängige Natriumbutyrat-induzierte Stimulation der Gastrinpromotoraktivität in neuroendokrinen Pankreastumorzellen BON I unabhängig von der Zellproliferation.**

Das Gastrinreporterkonstrukt hugasLuc-240 (5 µg) wurde transient in BON I Zellen transfiziert. Nach 24 Stunden Inkubation wurden die Zellen ohne (- NaB, gelbe Säulen) oder mit 2 mM Natriumbutyrat (+ NaB, blaue Säulen) in serumfreien Medium für 12, 24, 48 oder 72 Stunden behandelt und die Luciferaseaktivität und Proteinkonzentration bestimmt. Die Werte (Mittelwerte ± SEM aus drei Versuchen) sind in relativen Lichteinheiten (RLU) normalisiert zur Proteinkonzentration angegeben. \* bezeichnet statistisch signifikant bei  $p < 0,05$ .

Da Natriumbutyrat die BON I Zellproliferation deutlich hemmt (Abbildung 3) sollte die Natriumbutyrat-induzierte Aktivierung der Gastrinpromotoraktivität in Abhängigkeit der Zellzahl bestimmt werden, um so einen besseren Anhalt für die Stimulation von Natriumbutyrat auf den Gastrinpromotor in den BON I Zellen zu bekommen. Dazu wurden BON I Zellen wie oben beschrieben mit dem Gastrinreportergengenkonstrukt *hugLuc-240* transfiziert und ohne und mit 2 mM Natriumbutyrat (NaB) inkubiert. Als Ausdruck der Promotoraktivität wurde die Luciferase in relativen Lichteinheiten (RLU) auf die Zellzahl bezogen.

Die Ergebnisse sind in Abbildung 6 dargestellt. Es zeigte sich zu allen Zeitpunkten eine signifikante natriumbutyrat-induzierte Stimulation der Gastrinpromotoraktivität im Vergleich zu den unbehandelten Kontrollzellen. Nach 12-stündiger Inkubation erreichte die Gastrinpromotoraktivität der natriumbutyrat-behandelten Zellen das 5,9-fache, nach 24-stündiger Inkubationszeit das 3,6-fache und nach 48-stündiger Inkubation das 3,2-fache gegenüber den unbehandelten Kontrollzellen. Eine 10-fache Erhöhung der behandelten Zellen im Vergleich zu den unbehandelten wurde nach 72 Stunden Inkubation deutlich.

Diese Ergebnisse weisen auf eine deutliche Stimulation des Gastrinpromotors durch Natriumbutyrat in den humanen Pankreastumorzellen BON I zu allen untersuchten Zeitpunkten hin. Dabei zeigte sich der größte Unterschied zwischen den NaB-behandelten und unbehandelten Zellen nach 72 Stunden. Die stärkste Gastrinpromotoraktivität wiesen jedoch nach 24 Stunden die NaB-behandelten Zellen auf. Insgesamt zeigte sich eine transiente Aktivierung des Gastrinpromotors, sowohl in den NaB-behandelten als auch in den unbehandelten BON I Zellen.



**Abbildung 6: Natriumbutyrat stimuliert transient die Gastrinpromotoraktivität in neuroendokrinen Pankreastumorzellen BON I.**

Das Gastrinreportergengenkonstrukt hugasLuc -240 (5  $\mu$ g) wurde transient in BON I Zellen transfiziert. Nach 24 Stunden Inkubation wurden die Zellen ohne (- NaB, gelbe Säulen) oder mit 2 mM Natriumbutyrat (+ NaB, blaue Säulen) für 12, 24, 48 oder 72 Stunden in serumfreien Medium behandelt und die Luciferaseaktivität bestimmt und die Zellzahl ermittelt (Neubauer Zählkammer). Die Werte (Mittelwerte  $\pm$  SEM aus drei Versuchen) sind in relativen Lichteinheiten (RLU) normalisiert zur Zellzahl angegeben.

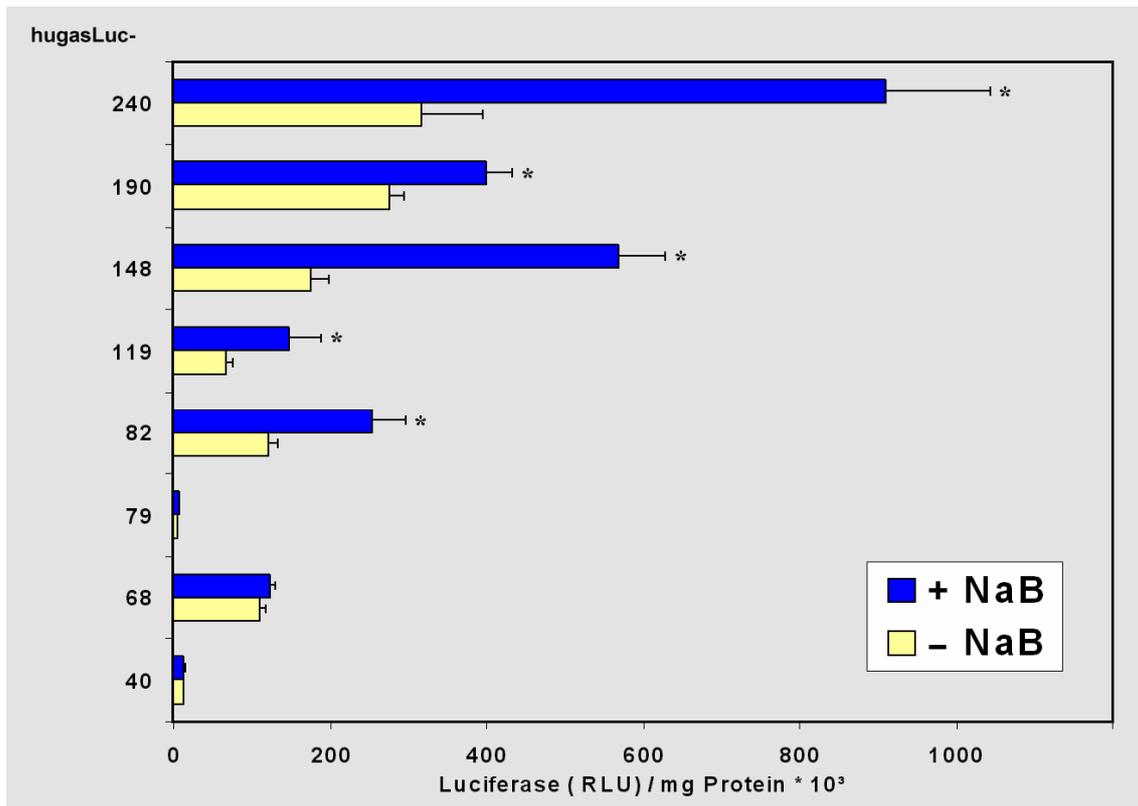
\* bezeichnet statistisch signifikant bei  $p < 0,05$ .

### **3.3. Identifizierung von Natriumbutyrat-Response Elementen (NaB-RE) im proximalen humanen Gastrinpromotor in BON I Zellen**

Die folgenden Untersuchungen hatten die Lokalisation *cis*-regulatorischer Elemente des humanen Gastrinpromotors, die die Natriumbutyrat-Induktion vermitteln zum Ziel. Dazu wurden verschiedene Deletionsmutanten des Gastrinpromotors, hugasLuc-240, hugasLuc-190, hugasLuc-148, hugasLuc-119, hugasLuc-82, hugasLuc-79, hugasLuc-68 und hugasLuc-40 transient mit der Calcium-Phosphat-Präzipitationsmethode in die neuroendokrinen Pankreastumorzellen BON I transfiziert. Die Zellen wurden nach 24 Stunden Inkubation ohne oder mit 2mmol Natriumbutyrat für 24 Stunden behandelt. Als Ausdruck der Promotoraktivität wurde die Luciferaseaktivität in relativen Lichteinheiten (RLU) bezogen auf die Proteinkonzentration angegeben

Die Ergebnisse sind in Abbildung 7 dargestellt. Natriumbutyrat führte mit Ausnahme des Deletionskonstruktes hugasLuc-40 bei allen anderen untersuchten hugasLuc-Deletionskonstrukten zu unterschiedlich starken Anstiegen der Gastrinpromotoraktivität im Vergleich zu den unbehandelten Zellen. Die stärkste natriumbutyrat-induzierte Stimulation der Gastrinpromotoraktivität zeigten die Deletionsmutanten hugasLuc-148 mit einer 3,3-fachen und hugasLuc-240 mit einer 2,9-fachen Erhöhung im Vergleich zu den unbehandelten Zellen. Die Aktivität des Promotordeletionskonstruktes hugasLuc-119 wurde durch Natriumbutyrat um das 2,2-fache und das Konstrukt hugasLuc-82 um das 2,1-fache erhöht. Das Promotordeletionskonstrukt hugasLuc-190 war mit einer 1,5-fachen Erhöhung der Promotoraktivität nur schwach induzierbar, die Deletionskonstrukte hugasLuc-68 und hugasLuc-79 wiesen keine signifikante Stimulierbarkeit auf und hugasLuc-40 zeigte gar keinen Anstieg der Gastrinpromotoraktivität unter Natriumbutyrat.

Die Ergebnisse weisen darauf hin, dass natriumbutyrat-induzierbare *cis*-regulatorische Elemente im proximalen humanen Gastrinpromotor in der Region zwischen den Nukleotiden -79 und -148 sowie den Nukleotiden -190 und -240 lokalisiert sind.



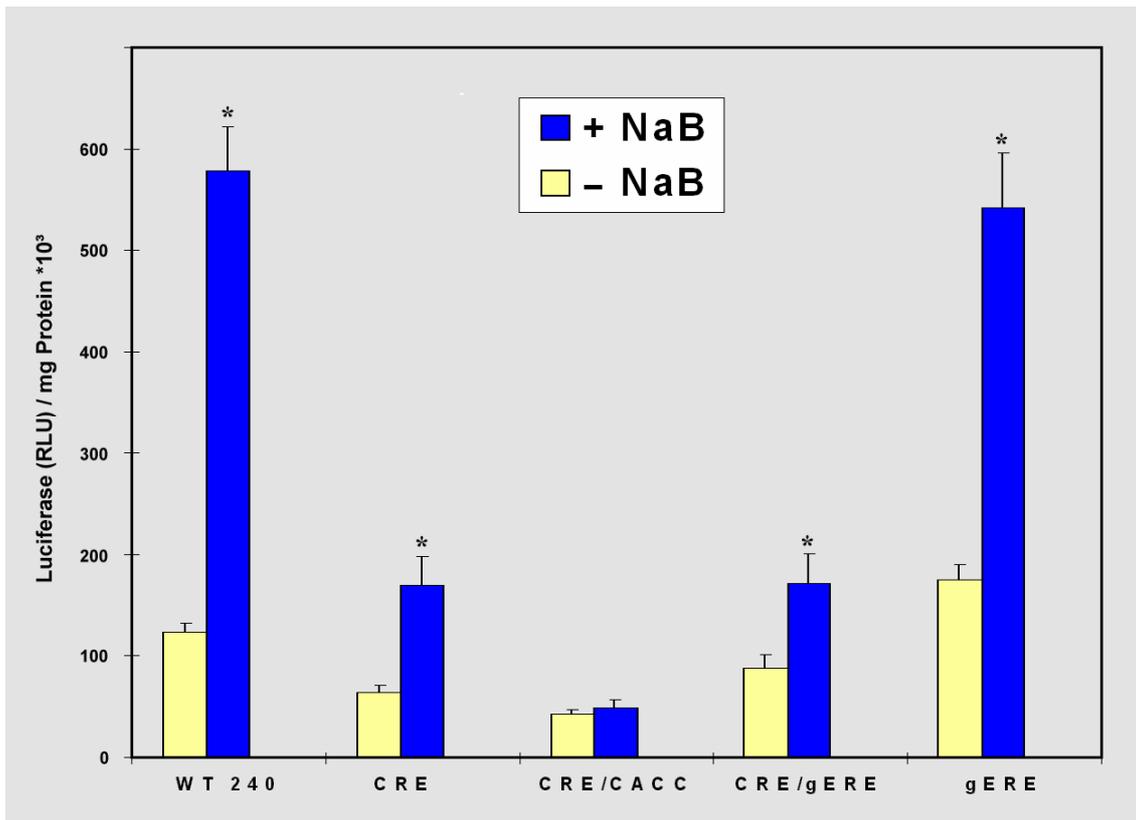
**Abbildung 7: Identifizierung von Natriumbutyrat Response Regionen im proximalen Gastrinpromotor.**

5'- Deletionsreportergenkonstrukte des Gastrinpromotors, hugasLuc-240, hugasLuc-190, hugasLuc-148, hugasLuc-119, hugasLuc-82, hugasLuc-79, hugasLuc-68 und hugasLuc-40 (jeweils 5 µg) wurden transient in BON I Zellen transfiziert. Nach 24 Stunden wurden die Zellen ohne (- NaB, gelbe Säulen) oder mit 2 mM Natriumbutyrat (+ NaB, blaue Säulen) in serumfreien Medium für 24 Stunden behandelt und die Luciferaseaktivität und Proteinkonzentration bestimmt. Die Werte (Mittelwerte ± SEM aus drei Versuchen) sind in relativen Lichteinheiten (RLU) normalisiert zur Proteinkonzentration angegeben. \* bezeichnet statistisch signifikant bei  $p < 0.05$

Zur Identifizierung der *cis*-regulatorischen Elemente, die für die Gastrinpromotoraktivität entscheidend sind, wurde neben dem Gastrinreportergenkonstrukt *hugasLuc-240* Mutanten mit bekannten *cis*-regulatorischen Elementen, die Sp1-Proteine binden können zur Transfektion eingesetzt. Diese Mutanten waren: *hugas-240CRE* (GT-Box mutiert), *hugas-240CRE/CACC* (GT-Box und CACC mutiert), *hugas-240CRE/gERE* (GT-Box und gERE mutiert) und *hugas-240gERE* (gERE mutiert) (siehe Material und Methoden, Abbildung 1). Die Mutante *hugas-240CRE* weist eine Trippelmutation (Nukleotide –138 bis –136) in einer GT-Box (Nukleotide –140 bis –127) des Gastrinpromotors auf. Die CACC-Box ist ein positives *cis*-regulatorisches Element (Nukleotide –108 bis –102). Die Mutante *hugas-240CRE/CACC* beinhaltet zusätzlich zur Mutation in der GT-Box eine 6-Basenpaar Blockmutation (Nn –107 bis –102) in der CACC-Box. Der Epidermale Growth Faktor (EGF) stimuliert die Gastringenexpression durch ein proximal im Gastrinpromotor gelegenes GC-reiches Element, das „Gastrin EGF response Element“ (gERE) (Nukleotide –68 bis –53). Das gERE beinhaltet zwei überlappende Domänen: die 5'-Domäne bindet Sp1 und die 3'-Domäne bindet zwei Proteinkomplexe, gERP1 und gERP2 (gastrin EGF responsive protein) (Mortensen et al, 1997). Die Mutante *hugas-240gERE* besitzt eine Punktmutation bei Nukleotide –65 im gERE. Die Mutante *hugas-240CRE/gERE* weist gleichzeitig Mutationen in der GT-Box und im gERE auf. Das Wildtyp Gastrinreportergenkonstrukt *hugasLuc-240WT* (WT240) und die oben genannten Mutanten wurden in BON I Zellen mit der Calcium-Phosphat-Präzipitationsmethode transient transfiziert. Nach einer Inkubationszeit von 24 Stunden wurden die transfizierten Zellen ohne oder mit 2 mM Natriumbutyrat behandelt. Die transkriptionelle Aktivität wurde anhand der Luciferaseaktivität in Relative light units (RLU) gemessen an der Proteinkonzentration angegeben. Die Ergebnisse sind in Abbildung 8 und 9 dargestellt. Bei dem Gastrinreportergenkonstrukt *hugasLuc-240wt* (WT240) wurde nach 2 mM Natriumbutyratbehandlung ein 4,7-facher Anstieg und bei *hugasLuc-240gERE* (gERE), bei dem nur das gERE Element mutiert vorliegt eine 3,1-fache Zunahme der Promotoraktivität im Vergleich zu den unbehandelten BON I Zellen deutlich. Natriumbutyratzugabe führte bei der Mutanten *hugasLuc-240CRE* (CRE, nur GT-box mutiert) zu einer noch 2,7-fachen und bei der Mutanten *hugasLuc-240CRE/gERE* (GT-Box und gERE Element mutiert) nur noch zu einer 2,0-fachen Stimulation der Promotoraktivität im Vergleich zu den unbehandelten BON I Zellen. Dagegen führte die 2 mM Natriumbutyratbehandlung bei der Doppelmутanten

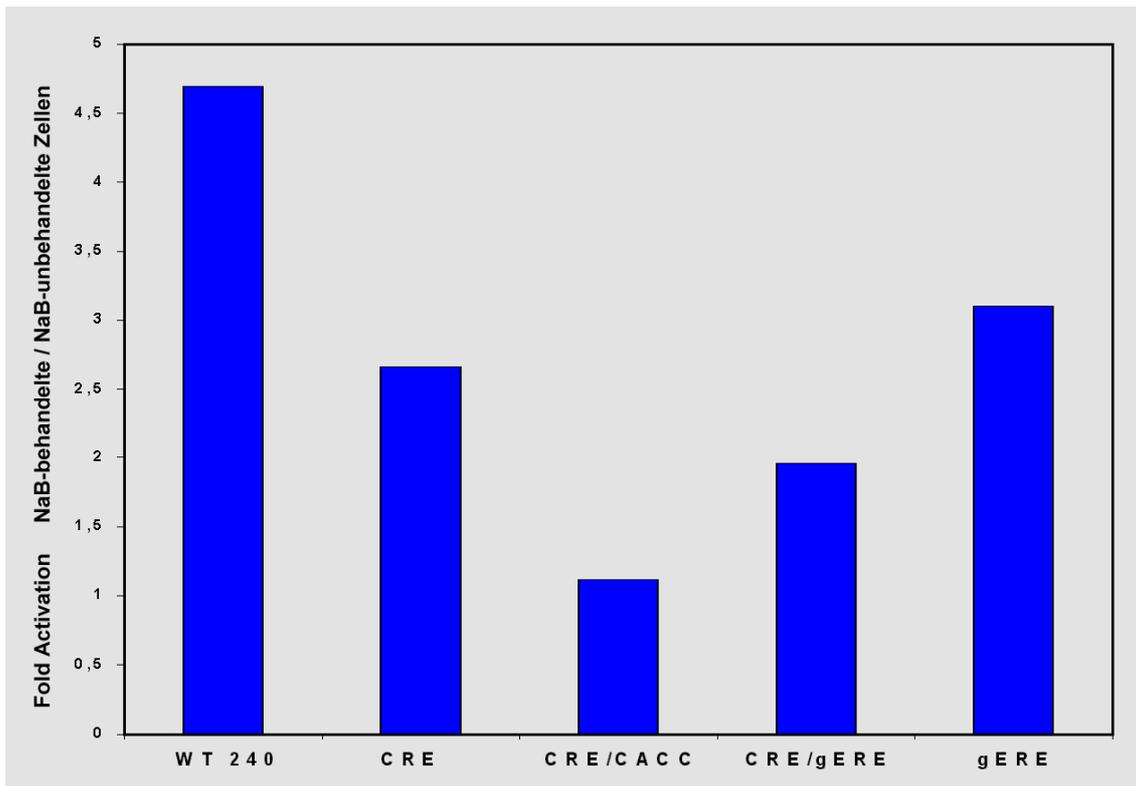
hugasLuc-240CRE/CACC (GT-Box und CACC-Box mutiert) zu keiner signifikanten Erhöhung der Gastrinpromotoraktivität mehr.

Diese Ergebnisse zeigen, dass 2 mM Natriumbutyrat zur stärksten Aktivierung beim Gastrinreportergengenkonstrukt hugasLuc-240WT führt. Mutationen in der GT-Box (CRE) führen bereits zu einer niedrigeren Stimulation der Gastrinpromotoraktivität. Die ausbleibende Stimulation durch Natriumbutyrat nach Transfektion der Doppelmutanten hugasLuc-240CRE/CACC weist aufgrund des Verlustes der NaB-Stimulation indirekt auch auf die Bedeutung der CACC-Box als Natriumbutyrat-Responsive Elemente hin. Das gERE schien keine Rolle bei der natriumbutyrat-induzierten Stimulation der Gastrinpromotoraktivierung zu spielen.



**Abbildung 8: Identifizierung von Natriumbutyrat-Response Elementen (NaB-RE) im proximalen Gastrinpromotor durch Mutationsanalyse.**

Die Gastrinreportergenkonstrukte hugasLuc-240 und die Mutanten hugasLuc-240CRE (GT-Box mutiert), hugasLuc-240CRE/CACC (zusätzlich CACC-Box mutiert), hugasLuc-240CRE/gERE (zusätzlich gERE mutiert) und hugasLuc-240gERE (gERE mutiert) (jeweils 5 µg) wurden transient in BON I Zellen transfiziert. Nach 24 Stunden wurden die Zellen für 24 Stunden ohne (- NaB, gelbe Säulen) und mit 2 mM Natriumbutyrat (+ NaB, blaue Säulen) in serumfreien Medium inkubiert und die Luciferaseaktivität als Ausdruck der Promotoraktivität bestimmt. Die Werte (Mittelwerte ± SEM aus drei Versuchen) sind in relativen Lichteinheiten (RLU) normalisiert zur Proteinkonzentration angegeben. \* bezeichnet statistisch signifikant bei  $p < 0,05$ .



**Abbildung 9: Vergleichende Darstellung der Natriumbutyrat-induzierten Promotoraktivität der verschiedenen hugasLuc-240 Mutanten.**

Versuch entspricht dem in Abbildung 8. Die Gastrinreportergenkonstrukte hugasLuc-240 und die Mutanten hugasLuc-240CRE (GT-Box mutiert), hugasLuc-240CRE/CACC (GT-Box und CACC-Box mutiert), hugasLuc-240CRE/gERE (GT-Box und gERE mutiert) und hugasLuc-240gERE (gERE mutiert) (jeweils 5 µg) wurden transient in BON I Zellen transfiziert. Nach 24 Stunden wurden die Zellen für 24 Stunden ohne und mit 2 mM Natriumbutyrat in serumfreien Medium inkubiert und die Luciferaseaktivität als Ausdruck der Promotoraktivität in relativen Lichteinheiten (RLU) pro Protein bestimmt. Das Ergebnis ist als Verhältnis der Werte der behandelten Zellen zu den unbehandelten BON I Zellen dargestellt (Fold Activation).

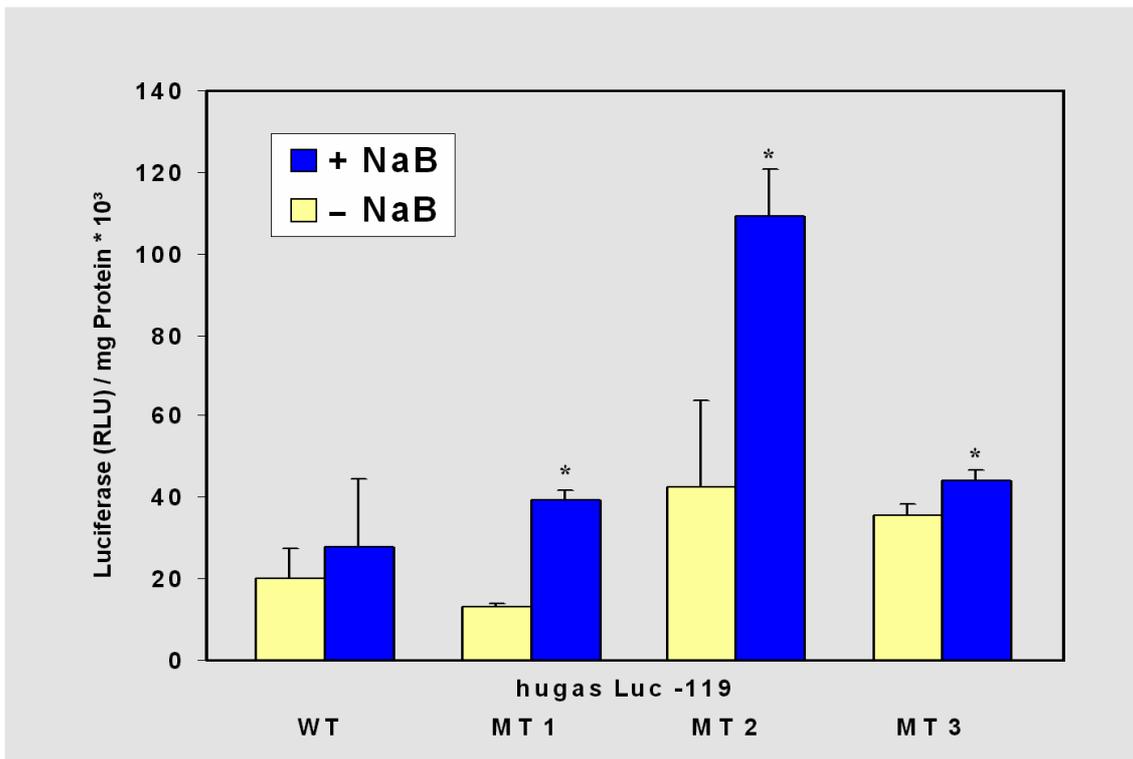
Um die Bedeutung der CACC-Box und 3'- angrenzenden bzw. überlappenden GNE Sequenz in der hGRD (human Gastrin Regulatory Domain, Simon et al, 1994) bei der Natriumbutyratinduktion genauer zu analysieren, wurden verschiedene Mutanten des Gastrinreportergenkonstruktes *hugasLuc-119* transient mit der Calcium-Phosphat-Präzipitationsmethode in BON I Zellen transfiziert und die Natriumbutyratstimulation untersucht (siehe Material und Methoden, Abbildung 1). Dazu wurden die Gastrinreportergenkonstrukte *hugasLuc-119MT1* (Punktmutation in CACC-Box, GNE intakt), *hugasLuc-119MT2* (GNE Doppelmutation, CACC-Box intakt) sowie *hugasLuc-119MT3* (Mutation CACC-Box und GNE) zur Transfektion eingesetzt. Nach 24 Stunden Inkubation wurden die transfizierten BON I Zellen entweder ohne oder mit 2 mM Natriumbutyrat behandelt. Die transkriptionelle Aktivität wurde anhand der Luciferaseaktivität in Relative light units (RLU) gemessen an der Proteinkonzentration angegeben.

Die Ergebnisse sind in Abbildung 10 dargestellt. Das Gastrinreportergenkonstrukt *hugasLuc-119MT1* mit der Punktmutation in der CACC-Box (auch RAP-1 Bindungselement genannt) zeigte ohne Natriumbutyrat im Vergleich zum Wildtypkonstrukt *hugasLuc-119* eine Reduktion der Gastrinpromotoraktivität um 34,5%. Vorausgegangene Untersuchungen haben gezeigt, dass Sp1-vermittelte transkriptionelle Aktivierung des Gastrinpromotors in Drosophilazellen SL2 hauptsächlich durch ein intaktes RAP-1 Bindungselement bedingt ist und durch die o.g. Punktmutation in der CACC-Box vermindert werden kann (Simon et al, 1997). Die *hugasLuc-119MT2* Mutante mit einer Doppelmutation im negativ *cis*-regulatorischen Element GNE zeigte ohne Natriumbutyrat dagegen eine Zunahme der Gastrinpromotoraktivität um 114,4% im Vergleich zum Wildtypkonstrukt. Die *hugasLuc-119MT3* mit Mutation in beiden Elementen, sowohl der CACC-Box als auch der GNE zeigte ohne Natriumbutyrat eine Zunahme der Gastrinpromotoraktivität um 79,4% im Vergleich zum Wildtypkonstrukt, etwa entsprechend der Aktivität der *hugasLuc-119MT2* Mutante, was sicher auf den Wegfall der inhibierenden Funktion von Bindungsproteinen am GNE zurückzuführen ist.

Die Behandlung mit 2 mM Natriumbutyrat führte nach Transfektion der *hugasLuc-119MT1* und *hugasLuc-119MT2* Mutanten zu einer Erhöhung der Gastrinpromotoraktivität im Vergleich zu den unbehandelten transfizierten BON I Zellen. Die Gastrinpromotoraktivität war bei den NaB-behandelten Zellen im Vergleich zu den Unbehandelten bei der *hugasLuc-119MT1* Mutante 3,0-fach erhöht, bei der

Mutanten *hugasLuc-119MT2* signifikant um das 2,6-fache. Dagegen führte Natriumbutyrat bei der Mutanten *hugasLuc-119MT3* nur zu einer 1,2-fache Erhöhung der Promotoraktivität. Die stärkste Natriumbutyratinduzierte Promotoraktivität war nach Transfektion der Mutanten *hugasLuc-119MT2* nachzuweisen.

Die Ergebnisse weisen darauf hin, dass in BON I Zellen die CACC-Box ein positiv *cis*-regulatorisches und das GNE Element ein negativ *cis*-regulatorisches Element ist. Die Einführung einer Punktmutation in der CACC-Box, die RAP1 bzw. Sp1 Bindung in *Drosophila* SL Zellen reduziert (Simon et al, 1997), zeigte auch in BON I Zellen eine Reduktion der Promotoraktivität als Hinweis darauf, dass möglicherweise Sp1-Bindung aufgrund der Punktmutation behindert wird. Die Punktmutation in der CACC-Box reicht nicht aus, um die Natriumbutyratstimulation zu verhindern. Die Mutation der Nukleotide -95 und -93 am 3'-Ende des GNE konnten die Natriumbutyratstimulation nicht verhindern, sondern führten zur Stimulation der Promotoraktivität. Erst die kombinierte Mutation beider Elemente, der CACC-Box und GNE führte zum Verlust der Natriumbutyrat-induzierten Promotorstimulation. Da *hugasLuc-119MT3* ein intaktes gERE Element hat scheint dieses Element für die Natriumbutyratstimulation keine wesentliche Rolle zu spielen.



**Abbildung 10: Hemmung der Natriumbutyrat-induzierten Stimulation des Gastrinpromotors durch Doppelmutation der CACC-Box und des GNE Elementes.**

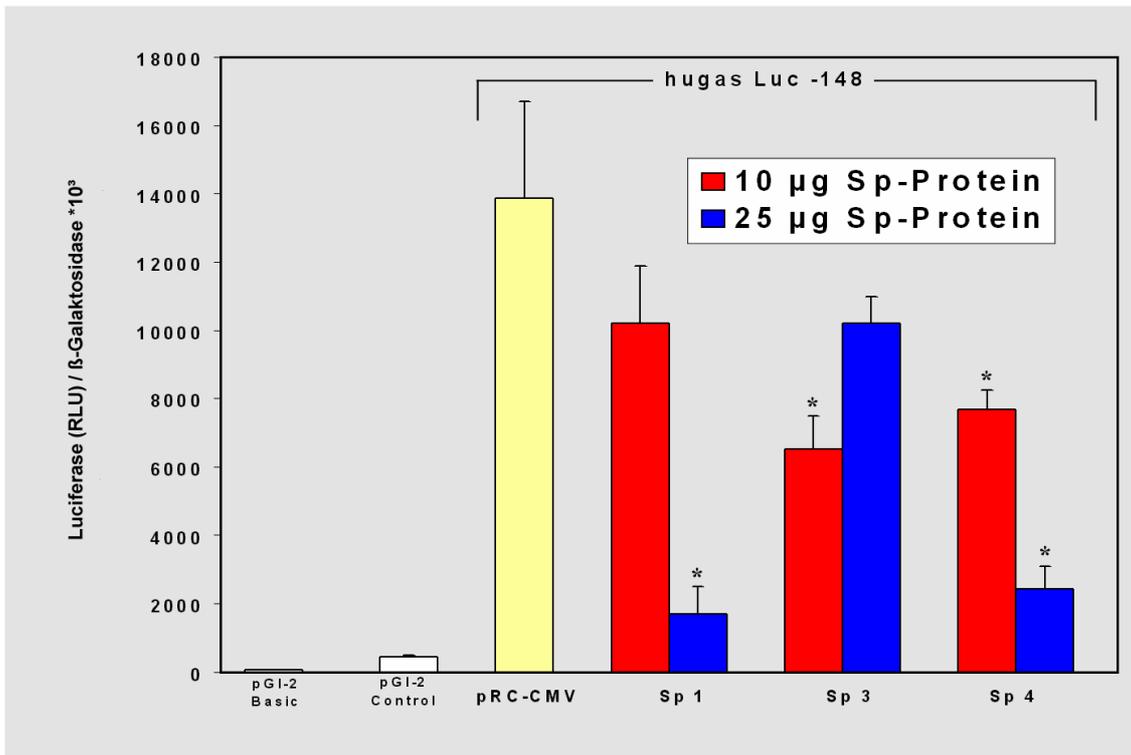
Die mutierten Gastrinreportergenkonstrukte hugasLuc-119MT1 (Punktmutation in CACC-Box), hugasLuc-119MT2 (zwei Punktmutationen in GNE), hugasLuc-119MT3 (Doppelmutation in CACC-Box und GNE) (jeweils 5 µg) wurden transient in BON I Zellen transfiziert. Nach 24 Stunden wurden die Zellen für 24 Stunden in serumfreiem Medium ohne (- NaB, gelbe Säulen) oder mit 2 mM Natriumbutyrat (+ NaB, blaue Säulen) inkubiert und die Luciferaseaktivität als Ausdruck der Promotoraktivität bestimmt. Die Werte (Mittelwerte ± SEM aus drei Versuchen) sind in relativen Lichteinheiten (RLU) normalisiert zur Proteinkonzentration angegeben. \* bezeichnet statistisch signifikant bei  $p < 0,05$ .

### 3.4. Regulation des Gastrinpromotors durch Sp-Transkriptionsfaktoren in BON I Zellen

In der proximalen Region des humanen Gastrinpromotors konnten in Voruntersuchungen drei unterschiedlich lokalisierte GC-reiche Sequenzen von (III) Nukleotid -140 bis -127 (GT-Box), (II) von Nukleotid -108 bis -102 (CACC-Box) und (I) von Nukleotid -68 bis -53 (gERE) anhand von DNA-Footprint Analysen *in vitro* als Sp-1 Bindungsseite identifiziert werden (Simon et al, 1997). Weiterhin konnte anhand einer Punktmutation in der CACC-Box/RAP-1 Bindungsseite (entspricht Region II) nach Transfektionsexperimenten in *Drosophila* SL2 Zellen gezeigt werden, dass die CACC-Box als Bindungsseite für die Sp-1 und Sp-3 vermittelte transkriptionelle Aktivierung von Gastrin relevant ist (Simon et al, 1997). Um die Relevanz der GC-reichen Sequenzen I bis III für die Gastrinpromotoraktivität in humanen neuroendokrinen Pankreastumorzellen zu untersuchen, wurden BON I Zellen zunächst mit dem Gastrinreportergenkonstrukt *hugasLuc-148* (beinhaltet die GC-reichen Sequenzen I bis III) und den Expressionsplasmiden pRC-CMV, pRC-CMVSp1, pRC-CMVSp3 und pRC-CMVSp4 sowie mit pSV- $\beta$ -Gal transient kotransfiziert. Bei der Transfektion ohne einen Sp-Expressionsvektor wurden 25  $\mu$ g des Leervektors pRC-CMV eingesetzt. Entsprechend wurde je nach der eingesetzten Konzentration der Sp-Expressionsvektoren bei jeder Transfektion mit dem Leervektor pRC-CMV auf insgesamt 25  $\mu$ g aufgefüllt. Nach 24 Stunden wurde die transkriptionelle Aktivität anhand der Luciferaseaktivität (RLU) bezogen auf die Galaktosidaseaktivität bestimmt. Die Ergebnisse sind in Abbildung 11 dargestellt.

Die Transfektion der Expressionsplasmide pRC-CMVSp1, pRC-CMVSp3 und pRC-CMVSp4 führte insgesamt zu einer Reduktion der Gastrinpromotoraktivität in Abhängigkeit der Konzentration der Sp-Protein exprimierenden Plasmide. Dabei zeigte sich nach Transfektion von 10  $\mu$ g pRC-CMVSp1 eine Reduktion der Gastrinpromotoraktivität im Vergleich zur Kontrolltransfektion um das 1,3-fache und bei 25  $\mu$ g um das 8,2-fache. Nach Transfektion von 10  $\mu$ g pRC-CMVSp3 war die Gastrinpromotoraktivität im Vergleich zur Kontrolltransfektion um das 2,1-fache und bei 25  $\mu$ g um das 1,4-fache erniedrigt. Die Transfektion von 10  $\mu$ g pRC-CMVSp4 führte zu einer Reduktion der Gastrinpromotoraktivität im Vergleich zur Kontrolltransfektion und 1,8-fache und war bei 25  $\mu$ g bis auf das 5,7-fache reduziert.

Die Ergebnisse zeigen nach Transfektion der Sp1 und Sp4 -Proteine konzentrationsabhängig eine Reduktion der Gastrinpromotoraktivität, wobei die Transfektion von 25 µg pRC-CMVSp3 zu einer höheren Promotoraktivität führte als nach Transfektion von 10 µg pRC-CMVSp3, jedoch unterhalb der Promotoraktivität der Kontrolltransfektion (nur Leervektor pRC-CMV) lag. Diese Beobachtung bestätigt die bereits auch in anderen eukaryonten Zellsystemen beobachtete Interferenz mit endogenen Sp-Proteinen, sodass die Untersuchungen zur Frage der Relevanz der Sp-Proteine als Transkriptionsfaktoren für den humanen Gastrinpromotor nicht zufriedenstellend in BON I Zellen untersucht werden konnte. Es wurden daher die Untersuchungen in *Drosophila* Schneider SL2 Zellen fortgeführt.



**Abbildung 11: Wirkung von Sp1, Sp3 und Sp4 Expression auf die Promotoraktivität des 5'-Deletionskonstruktes hugasLuc-148 in BON I Zellen.**

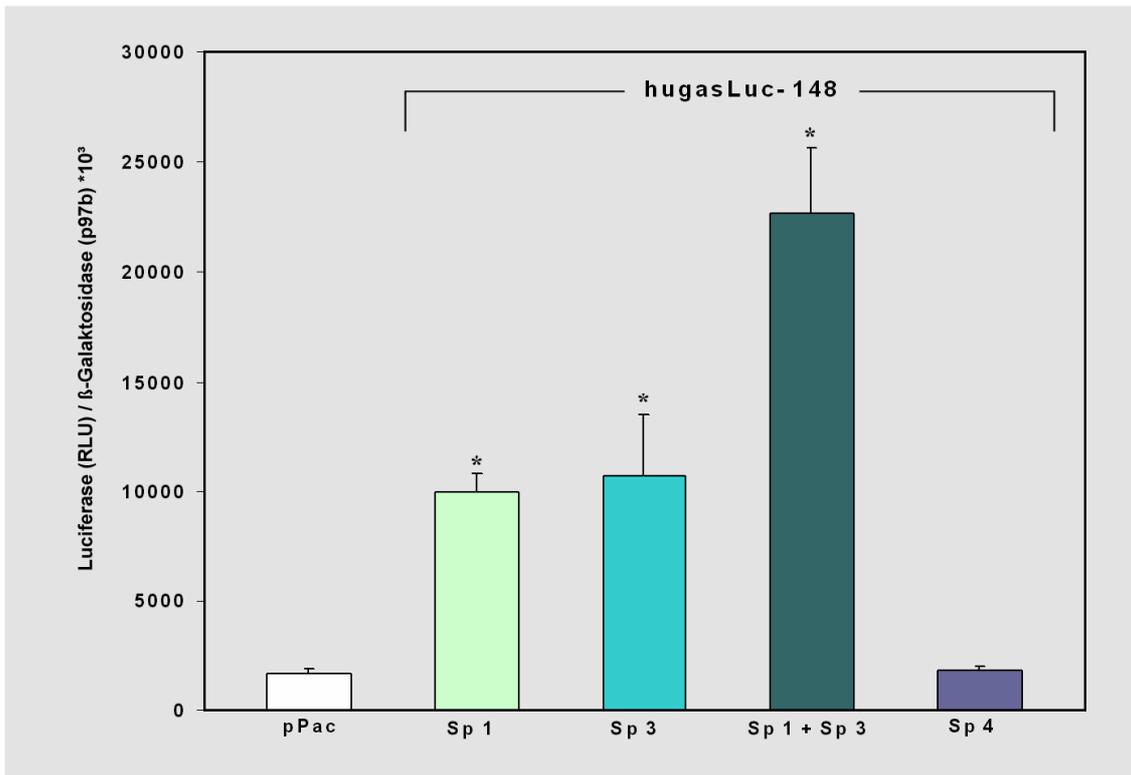
Das Gastrinreportergenkonstrukt hugasLuc-148 (5 µg) wurde mit pSV-β-Gal (2 µg) und jeweils dem Expressionsvektor pRC-CMV (gelbe Säule), pRC-CMVSp1, pRC-CMVSp3 oder pRC-CMVSp4 (10 µg / rote Säule oder 25 µg / blaue Säule) in BON I Zellen transfiziert. Jede Transfektion wurde ggfls. mit Leervektor pRC-CMV auf 25 µg Expressionsvektor aufgefüllt. Zur Kontrolle wurde pGL2-Basic Vektor (promotorlos) und pGL2-Control (Kontrolle der Transfektionseffizienz, weiße Säule) transfiziert. 24 Stunden nach Transfektion wurde die Luciferaseaktivität und β-Galaktosidasaktivität bestimmt. Die Werte (Mittelwerte ± SEM aus drei Versuchen) sind in relativen Lichteinheiten (RLU) bezogen auf die β-Galaktosidasaktivität angegeben. \* bezeichnet statistisch signifikant bei  $p < 0,05$  bezogen auf den Leervektor pRC-CMV.

### 3.5. Regulation des Gastrinpromotors durch Sp-Transkriptionsfaktoren in *Drosophila melanogaster* SL2 Zellen

Im Vergleich zu der humanen neuroendokrinen Pankreastumorzelllinie BON I Zellen exprimieren *Drosophila* SL2 Zellen keine Transkriptionsfaktoren aus der Sp-Familie und eignen sich daher als Modell für Untersuchungen zur transkriptionellen Aktivität des Gastrinpromotors in Abhängigkeit der GC-reichen Sequenzen I bis III und der Sp-Transkriptionsfaktoren. Daher wurden neben dem Gastrinreportergenkonstrukt hugasLuc-148 die Expressionsvektoren pPac (Leervektor), pPacSp1, pPacSp3 oder pPacSp4 in die *Drosophila* Zelllinie SL2 transient transfiziert. Zusätzlich wurde der  $\beta$ -Galaktosidase Expressionsvektor p97b kotransfiziert. 24 Stunden nach Transfektion wurde die transkriptionelle Aktivität des Gastrinreportergenkonstruktes anhand der Luciferaseaktivität (RLU) bezogen auf die Galaktosidaseaktivität bestimmt.

Die Ergebnisse sind in Abbildung 12 dargestellt. Kotransfektion von pPacSp1 führte im Vergleich zu der Kotransfektion mit nur des Leervektors pPac zu einer 6,0-fachen Steigerung der Aktivität des hugasLuc-148 Gastrinpromotorkonstruktes. Auch die Kotransfektion von pPacSp3 zeigte eine 6,5-fache Steigerung der Promotoraktivität von hugasLuc-148 gegenüber den nur mit Leervektor pPac kotransfizierten Kontrollzellen. Ein additiver Effekt konnte nach Transfektion sowohl von pPacSp1 und pPacSp3 mit einer 13,7-fachen Erhöhung der Gastrinpromotoraktivität beobachtet werden. Dagegen führte pPacSp4 zu keiner Veränderung der Aktivität des Promotorkonstruktes hugasLuc-148.

Die Ergebnisse zeigen, dass beide Transkriptionsfaktoren, Sp1 und Sp3 das Gastrinpromotorkonstrukt hugasLuc-148, das drei Sp-1 Bindungsseiten beinhaltet, nicht nur einzeln, sondern auch additiv die Transkription aktivieren können. Dagegen hatte Sp4 keinen transkriptionellen Effekt auf die Aktivität des Promotorkonstruktes hugasLuc-148.



**Abbildung 12: Sp1 und Sp3 aktivieren die Transkription des 5'-Deletionskonstruktes hugasLuc-148 in *Drosophila* SL2 Zellen.**

Das Gastrinreportergenkonstrukt hugasLuc-148 (10  $\mu$ g) und die Transkriptionsfaktoren pPacSp1 (Sp1), pPacSp3 (Sp3), pPacSp4 (Sp4) oder Leervektor (pPac) (jeweils 100 ng) wurden zusammen mit dem  $\beta$ -Galaktosidase Expressionsvektor p97b (3  $\mu$ g) transient in SL2 Zellen transfiziert. 24 Stunden nach Transfektion wurde die Luciferaseaktivität und  $\beta$ -Galaktosidasaktivität bestimmt. Die Werte (Mittelwerte  $\pm$  SEM aus drei Versuchen) sind in relativen Lichteinheiten (RLU) bezogen auf die  $\beta$ -Galaktosidaseaktivität angegeben. \* bezeichnet statistisch signifikant bei  $p < 0,05$  bezogen auf den Leervektor (pPac).

Um zu klären, ob und eventuell welche der drei GC-reichen Sequenzen im Gastrinpromotor die Sp1 und Sp3 Aktivierung vermitteln, wurde das Reportergenkonstrukt *hugasLuc-240WT* (Wildtypsequenz) oder die abgeleiteten Mutanten *hugasLuc-240CRE* (GT-Box mutiert, entspricht GC-Region III), *hugasLucCRE/CACC* (GT-Box und CACC mutiert, entspricht GC-Region III und II), *hugasLucCRE/gERE* (GT-Box und gERE mutiert, entspricht GC-Region III und I) oder *hugasLucgERE* (gERE mutiert, entspricht GC-Region I) mit den Transkriptionsfaktoren der Sp-Familie *pPacSp1* (Sp1), *pPacSp3* (Sp3) oder *pPacSp4* (Sp4) transient mit der Calcium-Phosphatpräzipitationsmethode in SL2 Zellen transfiziert. Kontrollzellen wurden mit dem Leervektor *pPac* kotransfiziert. Zusätzlich wurde jeweils der  $\beta$ -Galaktosidase Expressionsvektor *p97b* kotransfiziert.

Die *hugasLuc-240* Mutanten sind in Abbildung 1 dargestellt. Die Mutante *hugasLuc-240CRE* (GT-Box) weist eine Trippelmutation im cyclischen AMP response Element (CRE) auf (entspricht GT-Box oder GC-Region III). Die Mutante *hugasLuc-240CRE/CACC* enthält zusätzlich eine 3 Basenpaar Blockmutation in der CACC-Box, einem *cis*-regulatorisch aktivierenden Element (entspricht GC-Region II). Die Mutante *hugasLuc-240gERE* besitzt eine Punktmutation im Bereich des Gastrin Epidermal Growth Factor Response Elements gERE (entspricht GC-Region I) und die Mutante *hugasLuc-240CRE/gERE* besitzt zusätzlich die 6 Basenpaar Mutation im CRE (entspricht GT-Box oder GC-Region III). 24 Stunden nach der Transfektion wurde die transkriptionelle Aktivität anhand der Luciferaseaktivität (RLU) bezogen auf die Galaktosidaseaktivität bestimmt. Die Ergebnisse sind in Abbildung 13 dargestellt.

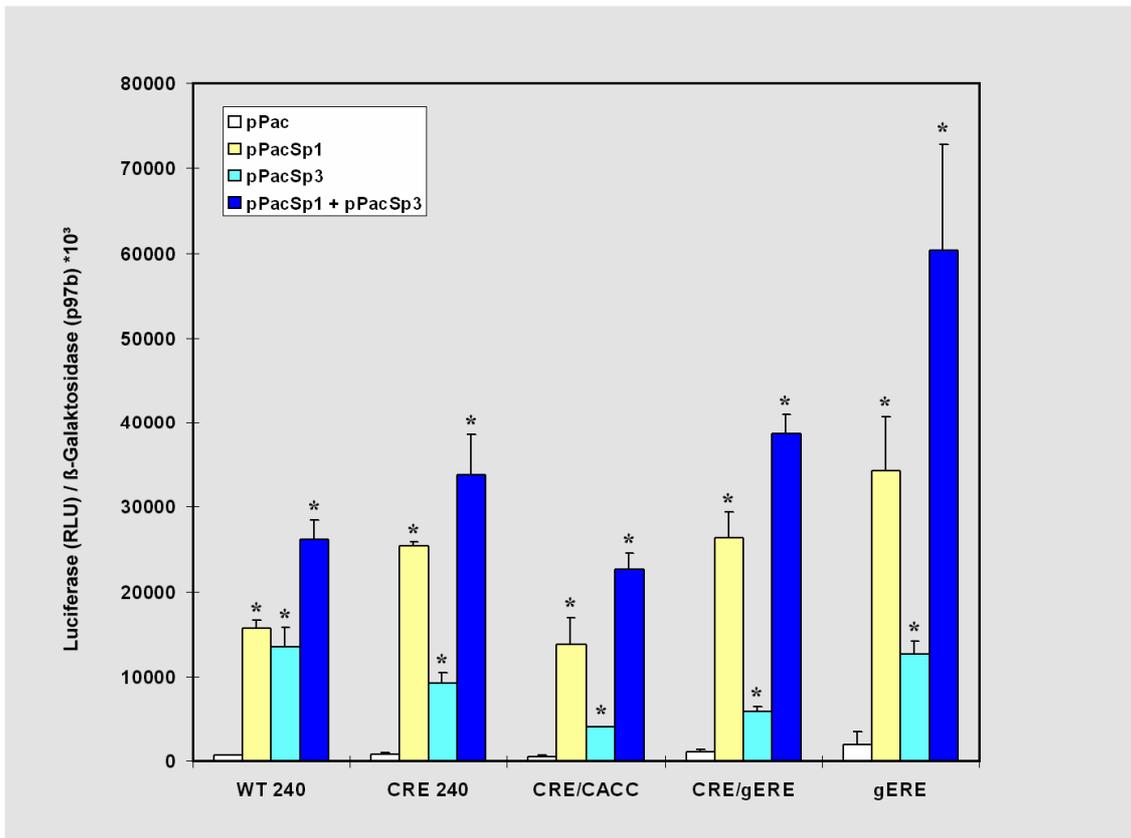
Bei allen Konstrukten zeigte sich nach Transfektion der Sp1 und Sp3 Expressionsvektoren ein Anstieg der Luciferaseaktivität. Die stärkste Promotoraktivierung zeigte die gemeinsame Sp1 und Sp3 Expression. Alleinige Sp1 Expression führte zu einer starken Erhöhung der Gastrinpromotoraktivität bei allen verwendeten Konstrukten. Dagegen führte der Transkriptionsfaktor Sp 3 zu geringerer Aktivierung und auch zur Reduktion der Promotoraktivität. So stieg die Aktivität des Reportergenkonstrukts *hugasLuc-240WT* mit dem kotransfizierten Transkriptionsfaktor Sp1 23,0-fach im Vergleich zur Kontrolle an, wobei das Sp3 Protein zu einer 19,8-fachen Erhöhung führte. Die gemeinsame Expression der Transkriptionsfaktoren Sp1 und Sp3 führte zu einer additiven 38,4-fachen Aktivitätszunahme des Gastrinpromotors im Vergleich zu den Kontrollzellen. Die Kotransfektion der Mutante *hugasLuc-240CRE* (GT-Box) mit dem Transkriptionsfaktor Sp1 erreichte eine

32,2-fache Erhöhung und mit Sp3 einen 11,7-fachen Anstieg der Promotoraktivität. Die gemeinsame Transfektion von Sp1 und Sp3 Protein führte dabei zu einer 43,0-fachen Aktivierung des hugasLuc-240CRE Konstruktes. Bei der Mutanten hugasLuc-240CRE/CACC (GT-Box und CACC mutiert) stieg die Aktivität 24,0-fach unter Sp1 Expression an, während die Sp3 Expression nur zu einer 6,9-fachen Zunahme der Promotoraktivität führte. Sp1 und Sp3 zeigten gemeinsam eine additive Wirkung mit einer 39,8-fachen Zunahme der transkriptionellen Aktivität. Bei der Mutanten hugasLuc-240CRE/gERE (GT-Box und gERE mutiert) zeigte sich eine 23,4-fache Steigerung durch den Transkriptionsfaktor Sp1, eine nur 5,2-fache durch Sp3 Expression aber eine 34,3-fache Erhöhung der Gastrinpromotoraktivität bei gemeinsamer Sp1 und Sp3 Expression. Die Mutante hugasLuc-240gERE zeigte die stärkste, nämlich 30,2-fache Aktivierung des Gastrinpromotors bei gemeinsamer Expression der Transkriptionsfaktoren Sp1 und Sp3. Die alleinige Sp1 Expression führte zu einer 17,1-fachen, die Sp3 Expression nur zu einer 6,3-fachen Steigerung der Promotoraktivität.

Diese Ergebnisse zeigen, dass durch die eingeführten Mutationen in den einzelnen oder gleichzeitig zwei GC-reichen Regionen I, II und III die Sp1-bedingte Aktivierung des hugasLuc-240 Konstruktes nicht verhindert wurde. Die Mutanten, mit Ausnahme von hugasLuc-240CRE/CACC (GT-Box und CACC mutiert) zeigten im Vergleich zum hugasLuc-240 Wildtypkonstrukt eine höhere transkriptionelle Aktivität nach pPacSp1 Transfektion. Die Mutationen in den verschiedenen GC-reichen Regionen hatten unterschiedlichen Einfluss auf die Sp3-vermittelte Aktivierung der Promotoraktivität, wobei diese im Vergleich zu Sp1 insgesamt niedriger war. Im Fall der Konstrukte hugasLuc-240CRE (GT-Box mutiert) und hugasLuc-240CRE/gERE (GT-Box und gERE mutiert), sowie insbesondere bei Kotransfektion von hugasLuc-240CRE/CACC (GT-Box und CACC mutiert) zeigte die Sp3 Expression zwar im Vergleich zum Kontrollvektor pPac eine Aktivierung der Promotoraktivität, diese war jedoch durch die Mutation in der GT-Box (CRE) und CACC-Box sowie der Mutation in der GT-Box und gERE im Vergleich zur Sp3-induzierten Aktivierung des hugasLuc-240WT reduziert.

Die Ergebnisse weisen darauf hin, dass die Mutationen in den GC-reichen Regionen I, II und III nicht zur Reduktion der Sp1-vermittelten Aktivierung des Gastrinpromotorkonstruktes hugasLuc-240 führten. Da höchstens ein oder zwei der GC-reichen Regionen mutiert waren ist es möglich, dass eine GC-reiche Region zur

Aktivierung des Gastrinpromotorkonstruktes ausreichend war. Es besteht auch die Möglichkeit, dass durch die Mutationen in den GC-reichen Regionen bei überlappenden *cis*-regulatorischen Elementen, wie Bsp im gERE (Sp1, ZBP-89) oder CACC/GNE weitere eventuell negativ regulatorische Transkriptionsfaktoren an ihrer Bindung an die DNA oder an andere Transkriptionsfaktoren behindert wurden, sodass auch bei Reduktion der Sp1 Bindung durch die eingeführten Mutation in den einzelnen GC-reichen Regionen die Gesamtaktivität des hugasLuc-240 nicht reduziert, sondern erhöht wurde.



**Abbildung 13: Sp1 und Sp3 aktivieren die Transkription vom 5'-Deletionskonstrukt hugasLuc-240 und abgeleiteten Mutanten in *Drosophila* SL2 Zellen.**

Die Gastrinreportergenkonstrukte hugasLuc-240WT und die Mutanten hugasLuc-240CRE (GT-Box mutiert), hugasLuc-240CRE/CACC (GT-Box und CACC mutiert), hugasLuc-240CRE/gERE (GT-Box und gERE mutiert) und hugasLuc-240gERE (gERE mutiert) (10 µg) sowie die Transkriptionsfaktoren pPacSp1 (Sp1), pPacSp3 (Sp3), pPacSp1 (Sp1) + pPacSp3 (Sp3) oder Leervektor (pPac) (jeweils 100 ng) wurden zusammen mit dem β-Galaktosidase Expressionsvektor p97b (3 µg) transient in SL2 Zellen transfiziert. Beim Einsatz von 100 ng Transkriptionsfaktor wurde jeweils 100 ng Leervektor (pPac) hinzugegeben, so dass eine Gesamtmenge von 200 ng erreicht wurde. 24 Stunden nach Transfektion wurde die Luciferaseaktivität und β-Galaktosidasaktivität bestimmt. Die Werte (Mittelwerte ± SEM aus drei Versuchen) sind in relativen Lichteinheiten (RLU) bezogen auf die β-Galaktosidaseaktivität angegeben. \* bezeichnet statistisch signifikant bei  $p < 0,05$  bezogen auf den Leervektor (pPac).

## **4. Diskussion**

### **4.1. Natriumbutyrat inhibiert die Proliferation der neuroendokrinen Pankreastumorzellen BON I**

Um die Regulation der Gastrintranskription in neuroendokrinen Pankreastumorzellen besser zu verstehen, wurde die Rolle des HDAC1 Inhibitors Natriumbutyrat (NaB) in der Regulation des humanen Gastrinpromotors in BON I Zellen untersucht. Der antiproliferative Effekt von NaB alleine oder in Kombination mit anderen Substanzen, auf Zellwachstum und die Expression von zellzyklusassoziierten Proteinen wurde in verschiedenen Zellsystemen wie beispielsweise in Leukämie-, Mamma-, Lungen- und Kolonkarzinomzelllinien untersucht (Urbano et al, 1998; Biffi et al, 1998; Cordel et al, 1997; Pellizaro et al, 2001). In Kolonepithelzellen bewirkte NaB paradoxe Effekte mit Induktion der Proliferation in normalen Zellen und Wachstumsinhibition der neoplastischen Zellen (Archer und Hodin, 1999). Dabei konnte gezeigt werden, dass die NaB-induzierte Differenzierung von Kolonkarzinomzellen Proteinkinase C und Jun-Kinase abhängig ist (Orchel et al, 2005). In Mammakarzinomzellen hemmte NaB die Proliferation sowohl in normalen als auch neoplastischen Zellen durch Inhibition der DNA Synthese und Apoptose (Tsubaki et al, 2001).

Untersuchungen in Ratteninsulinomazellen RINm5F hatten den Einfluss von Natriumbutyrat auf die Zellproliferation gezeigt. Die Inhibition der Proliferation erfolgte dosisabhängig zumindest teilweise durch Inhibition der DNA Synthese und ging mit neuroendokriner Zytodifferenzierung einher (Swarovsky et al, 1994). In der vorliegenden Arbeit führte in humanen neuroendokrinen Pankreastumorzellen die Behandlung mit NaB zu einer deutlichen Reduktion der Zellzahl im Vergleich zu den weiterproliferierenden unbehandelten Zellen. Nach 48 Stunden Inkubation betrug die Zellzahl der mit NaB behandelten BON I Zellen nur etwa 40 %, nach 72 Stunden nur noch 15 % der unbehandelten Zellen. Ob diese Reduktion durch Zellzyklusarrest oder Apoptose oder beide Mechanismen ausgelöst war, wurde in der vorliegenden Arbeit

nicht weiter analysiert, da die Gastrinpromotoruntersuchungen im Vordergrund stehen sollten.

NaB induziert in Endometrium und Ovarialkarzinomzellen einen Zellzyklusarrest am G1 Checkpunkt und einen Seneszenz Phänotyp (Terao et al, 2001). Zervixkarzinomzellen zeigen dagegen einen NaB-induzierten G2/M Arrest zusätzlich zum G0/G1 Arrest. Der Zellzyklusarrest führte bei niedriger NaB Konzentration zu einem Seneszenz-ähnlichen Phänotyp (SLP), möglicherweise durch  $p21^{WAF/CIP1}$  vermitteltem Entzug von der Zellzyklusprogression, bei höherer Konzentration zusätzlich zur Apoptose. Lichtmikroskopische Untersuchungen an BON I Zellen zeigten (nicht gezeigte Daten), dass im Gegensatz zu den mit 2 mM NaB behandelten BON I Zellen die Unbehandelten nach 48-stündiger Inkubationszeit mehrkernige Riesenzellen aufwiesen und elektronenmikroskopisch bei den mit NaB behandelten Zellen im Gegensatz zu den Unbehandelten eine erhöhte Granuladichte im Bereich des Nukleolus festgestellt werden konnte. Dies zeigt, dass NaB auch morphologische Veränderungen der BON I Zellen hervorruft, die aber noch näher zu charakterisieren sind.

#### **4.2. Der Gastrinpromotor ist ein Targetgen von Natriumbutyrat**

Gastrin wurde ursprünglich als gastrointestinales Regulatorisches Peptid dessen Hauptfunktion die Stimulation postprandialer Säuresekretion ist beschrieben. Zusätzlich zu seiner physiologischen Funktion in der Regulation der Magensäuresekretion wird Gastrin eine weitere Funktion, nämlich sein trophische Wirkung zugeschrieben. Eine prospektive Studie wies darauf hin, dass Hypergastrinämie mit einem erhöhten Risiko für ein Kolonkarzinom assoziiert ist, und zahlreiche Studien haben gezeigt, dass Gastrin das Wachstum vom kolorektalen Adenokarzinom stimuliert (Thorburn, 1998; Wang et al, 1996; Stepan et al, 1999; Smith und Watson, 2000; Song et al, 2005). Dies ist interessant im Hinblick darauf, dass Gastrin in Tumorzellen eine wesentliche Rolle in der Pathogenese von Tumoren spielen kann. So konnte erst kürzlich gezeigt werden, dass Gastrin  $\beta$ -Catenin Protein im Kolonkarzinom bei Mäusen stabilisieren kann. Gastrin erhöht nicht nur die  $\beta$ -Cateninexpression, sondern auch die seiner Targets, Cyclin D, wobei auch die  $\beta$ -Catenin Transkription und der Cyclin D Promotor aktiviert

wurden. Diese Beobachtungen unterstützen die Hypothese, dass die Regulation von Gastrin in Tumorzellen von Bedeutung ist.

Studien an Ratteninsulinomazellen hatten gezeigt, dass NaB einen Anstieg der Insulin-, Glukagon-, und Gastrin-spezifischen mRNA und entsprechender Hormone durch Steigerung der Gentranskription induziert (Philippe et al, 1987; Simon et al, 1994). NaB induziert eine Reihe von nukleären Veränderungen, die zur selektiven Veränderung der Gentranskription führen. Dies wurde auch für die Zellzyklus Gene, die durch NaB reguliert werden, wie Bsp. *p21<sup>WAF/CIP1</sup>* (Archer et al, 1998), *p16<sup>INK4a</sup>* (Schwartz et al, 1998), *Rb* (Vaziri et al, 1998), *Cyclin D1* (Lallemand et al, 1996), *Bcl-2* und *Bax* (Mandal et al, 1996; Hague et al, 1997) gezeigt. HDAC Inhibition und die Hyperacetylierung von Corehistonen durch Histoneacetylasen kann zur Dekondensation des lokalen Chromatin (Wolffe, 1996; Grunstein, 1997) führen. Dies erlaubt Zugang für Transkriptionsfaktoren und den RNA Polymerase Komplex, was in Aktivierung der Gentranskription resultiert (Wolffe, 1996; Grunstein, 1997).

In der vorliegenden Arbeit war von Interesse, welchen Einfluss Natriumbutyrat auf die Aktivität des humanen Gastrinpromotors in der humanen neuroendokrinen Pankreastumorzelllinie BON I hat. Die Transfektionsuntersuchungen in BON I Zellen zeigten, dass Natriumbutyrat die Gastrinpromotoraktivität konzentrationsabhängig induzierte. Promotoren von NaB-responsiven Genen haben sogenannte NaB-Responsive Elemente (NaB-RE) und die Wirkung wird häufig über Sp1-Sp3 DNA Erkennungssequenzen vermittelt (Davie, 2003). Um *cis*-regulatorische NaB-Response Elemente im Gastrinpromotor zu identifizieren, wurden trunkierte Gastrinpromotorgenkonstrukte dahingehend untersucht, ob sie durch NaB in BON I Zellen induzierbar sind. Ein signifikanter Verlust der Gastrinpromotoraktivität lokalisierte die NaB-Response Elemente in eine 50- bp Region (-190 und -240 Nn) und 69- bp Region (-79 und -148 Nn), die beide GC-reiche Sequenzen beinhalten. Mutationen in der GT-Box (CRE) führten zu einer 51,2% niedrigeren Stimulation der Gastrinpromotoraktivität. Der komplette Verlust der Natriumbutyratstimulation nach Transfektion der Doppelmutanten *hugasLuc-240CRE/CACC* (GT-Box und CACC mutiert) wies indirekt auf die Bedeutung auch der CACC-Box als Natriumbutyrat-Responsive Elemente hin. Das gERE (gERE mutiert) schien dagegen keine Rolle bei der natriumbutyrat-induzierten Stimulation der Gastrinpromotoraktivierung zu spielen. Alternativ wäre auch denkbar, dass die gERE Punktmutation nicht ausreichend war, um

die Natriumbutyrat-Stimulation zu inhibieren. Die CACC-Box war in BON I Zellen ein positiv *cis*-regulatorisches und das überlappende benachbarte GNE Element ein negativ *cis*-regulatorisches Element (zusammen als GRD, human gastrin Regulatory Domain bezeichnet). Die Einführung nur einer Punktmutation in die CACC-Box, die Sp1 Bindung in *Drosophila* SL Zellen reduzierte (Simon et al, 1997), zeigte auch in BON I Zellen eine Reduktion der Promotoraktivität als Hinweis darauf, dass möglicherweise Sp1-Bindung aufgrund der Punktmutation behindert wird. Allerdings war die Punktmutation nicht ausreichend, um die Natriumbutyratinduktion zu hemmen. Ebenso konnte die Mutation der zwei Nukleotide -95 und -93 am 3'-Ende des GNE die Natriumbutyratstimulation nicht verhindern, sondern führte sogar zur Stimulation, was möglicherweise dafür sprechen könnte, dass ein putativer Repressor an der Bindung behindert wurde. Erst die kombinierte Mutation beider Elemente, der CACC-Box und GNE führte zum Verlust der Natriumbutyrat-induzierten Promotorstimulation. Es ist anzunehmen, dass die Natriumbutyrat-vermittelte Stimulation durch Bindung oder Interaktion von Transkriptionsfaktoren oder Proteinkomplexen an beiden überlappenden Elementen der hGRD (Simon et al, 1994) bedingt ist und dass gERE für die Natriumbutyratstimulation keine wesentliche Rolle spielt.

Bai und Koautoren zeigten, dass ZBP-89 eine kritische Rolle in der Butyrataktivierung des *p21<sup>WAF/CIP1</sup>* Promotors spielt und präferentiell mit dem Transkriptionsfaktor p300 kooperiert (Bai et al, 2000). p300 ist eine Histoneacetylase, während HDAC1 (die durch NaB inhibiert wird) eine Histonedecetylase ist. Beide Proteine sind fundamental für die Transkriptionelle Regulation, die eine Feinabstimmung erfordert (Wolffe, 1996). ZBP-89 ist weit exprimiert und bindet an GC-reiche Sequenzen in vielen Promotoren, die Wachstum regulieren. In vielen Fällen scheint ZBP-89 die Promotoraktivität durch Antagonismus zu Sp1 zu reprimieren, das an das gleiche oder überlappendes Element bindet. Sp1 und ZBP-89 können auch die Transkription kooperativ regulieren (Wieczorek et al, 2000). Die Untersuchungen ließen vermuten, dass NaB die Interaktion von ZBP-89 und p300 stimuliert und erst im Folgenden Sp1 in einen Multiproteinkomplex über die Assoziation mit ZBP-89 rekrutiert wird. Daher könnte NaB in BON I Zellen als Target auch ZBP-89 haben, da die für Sp1 Bindung relevante Punktmutation in der CACC-Box des Gastrinpromotors in BON I Zellen nicht in der Lage war, die NaB-Stimulation zu verhindern. Möglicherweise war die zusätzliche

Mutation in GNE notwendig, um einen putativen Multiproteinkomplex, der die NaB-Stimulation wahrscheinlich vermittelt, zu dissoziieren (siehe Abbildung 14).

### 4.3. Zellspezifische Regulation des Gastrinpromotors durch Sp-Proteine

Sp1 Bindungsseiten weisen ähnliche DNA-Kontaktstellen auf wie sie im Gastrinpromotor gefunden werden (Berg, 1992; Hagen et al, 1992; Hagen et al, 1994). Im humanen Gastrinpromotor sind bisher drei *cis*-regulatorische Regionen mit Sp1 Erkennungssequenzen identifiziert worden. Von den drei GC Boxen liegt die GC-Region I zwischen Nukleotiden -68 bis -53 (gERE), die GC-Region II zwischen Nukleotiden -108 bis -102 (CACC Box) und die GC-Region III zwischen Nukleotiden -140 bis -127 (GT-Box) (Merchant et al, 1991; Tillotson et al, 1994; Bundgaard et al, 1995; Chung et al, 1995; Shiotani und Merchant, 1995; Simon et al, 1997). In der vorliegenden Arbeit wurde der Einfluß der Transkriptionsfaktoren Sp1, Sp3 und Sp4 auf die Gastrinpromotoraktivität untersucht. Die Transfektionen von Sp1 Proteinen in BON I Zellen bestätigte die Beobachtung von anderen Autoren, dass in eukaryonten Zellsystemen möglicherweise durch Interferenz mit endogenen Sp-Proteinen die Untersuchungen zur Frage der Relevanz der Sp-Proteine als Transkriptionsfaktoren für den humanen Gastrinpromotor nicht zufriedenstellend in BON I Zellen durchgeführt werden können. Es wurden daher *Drosophila* Schneider SL2 Zellen eingesetzt, die keine endogenen Sp-Proteine exprimieren. Diese Transfektionsuntersuchungen zeigten, dass sowohl Sp1 als auch Sp3 das Gastrinpromotorkonstrukt hugasLuc-148, das drei mögliche Sp1 Bindungsseiten beinhaltet, aktivierte. Darüberhinaus konnten Sp1 und Sp3 den Gastrinpromotor additiv aktivieren. Sp4 hatte dagegen keinen Effekt. Mutationen in den drei GC-reichen Regionen (putative Sp1-Bindungsseiten) des Gastrinpromotors führten nicht zur Reduktion der Sp1-vermittelte Aktivierung des Gastrinpromotorkonstruktes hugasLuc-240. Da in den Mutanten höchstens ein oder zwei der GC-reichen Regionen mutiert vorlag, wäre denkbar, dass eine GC-reiche Region zur maximalen Aktivierung des Gastrinpromotorkonstruktes ausreichen könnte. In vorausgegangenen Untersuchungen war gezeigt worden, dass Sp1 die Gastrintranskription des hugas-119 abhängig von einer intakten CACC-Box stimuliert

(Simon et al, 1997). In dieser Studie wurde ein Gastrinpromotorkonstrukt angewandt, das nur die CACC-Box und gERE beinhaltet, und somit die Wirkung der Gastrinpromotorsequenz -119 bis -240 und damit auch die Rolle der GC-Box außer Acht ließ. Das gERE vermittelt EGF Induktion des Gastrinpromotors durch Sp1 Aktivierung (Merchant et al, 1995; Ford et al, 1997). Untersuchungen von Hansen und Coautoren haben aber gezeigt, dass das gERE Element alleine für eine maximale Sp1 Aktivierung nicht ausreichend ist (Hansen et al, 1999).

Es bestünde aber auch die Möglichkeit, dass durch die Mutationen in den GC-reichen Regionen bei überlappenden anderen *cis*-regulatorischen Elementen, wie Bsp im gERE (Bindung von Sp1 und ZBP-89) eventuell negativ regulatorische Transkriptionsfaktoren an ihrer Bindung an die DNA oder an andere Transkriptionsfaktoren behindert würden, sodass auch bei Reduktion der Sp1 Bindung durch die eingeführten Mutation in den einzelnen GC-reichen Regionen die Gesamtaktivität des *hugasLuc-240* nicht reduziert, sondern erhöht würde.

Sp3 wurde initial als Inhibitor der Sp1 vermittelten Transkription in Abhängigkeit von mehreren GC-Boxen im Promotor in *Drosophila* Zellen beschrieben (Hagen et al, 1994; Majello et al, 1994; Birnbaum et al, 1995). Mittlerweile haben viele Studien belegt, dass Sp3 in *Drosophila* und eukaryonten Zellen auch Aktivierung vermitteln kann. Sp3 ist involviert in Repression und Aktivierung in Abhängigkeit von der jeweiligen Zelllinie (Udvadia et al, 1995; Ihn und Trojanowska, 1997), was möglicherweise Folge der Konkurrenz mit Sp1 um die Bindungsstelle im Promotor ist. Darüberhinaus wurde gezeigt, dass Sp3 in kürzeren und längeren Formen vorliegen kann, die in ihrer Fähigkeit zu stimulieren oder zu inhibieren unterschiedlich sind (Kennett et al, 1997). Western Blot Analysen haben gezeigt, dass in *Drosophila* Zellen das Produkt der pPacSp3 Expression hauptsächlich der(n) kürzeren Form(en) entspricht, die Sp1-vermittelte Aktivierung inhibieren (Kennett et al, 1997). Da in unseren und auch bei anderen Autoren (Simon et al, 1997; Hansen et al 1999) zusammen mit Sp1 additiv aktivierende Sp3 -Wirkung in *Drosophila*-Zellen beobachtet wurde, scheint der Effekt der Isoformen auch promotor-spezifisch zu sein. Die Transfektion des humanen Gastrinreportergenkonstruktes *gasCat-194* in AGS Zellen (Magenkarzinomzellen) zeigte, dass Sp3 die Promotoraktivität um 40% reduzierte, während das gleiche Gastrinreportergenkonstrukt in *Drosophila* Zellen alleine nur eine leichte Aktivierung, aber zusammen mit Sp1 eine synergistische Aktivierung zeigte (Hansen et al, 1999). In

der vorliegenden Untersuchung war die Sp1 Aktivierung des Gastrinpromotorkonstruktes weder von der GT-box oder der CACC-Box (äquivalent zur GT-Box in der Publikation von Hansen et al, 1999) noch gERE abhängig. Sp1 stimulierte die Transkription unabhängig von der GT-Box und gERE. Die Doppelmutante GT-Box /CACC führte zu keiner signifikanten Veränderung der Aktivität im Vergleich zum Gastrinpromotorkonstrukt ohne Mutation in diesen Elementen.

Vorangegangene Untersuchungen haben darauf hingewiesen, dass Sp1 als transkriptioneller Aktivator und Sp3 als transkriptioneller Repressor agieren (Black et al, 2001; Birnbaum et al, 1995; Ghayor et al, 2001). In der vorliegenden Untersuchung war Sp3 in *Drosophila* Zellen Transaktivator, in den BON I Zellen Repressor, soweit die Daten in den BON I Zellen interpretiert werden können durch die Interferenz mit endogenen Sp-Proteinen. Mögliche Erklärungen könnten sein, dass (i) die Ratio von Sp1 und Sp3, die für die Bindung der gleichen Erkennungsseite konkurrieren sich verändert hat. In *Drosophila* SL2 Zellen ist nach Sp1 Transfektion kein Sp3 Protein in der Zelle und vice versa. Darüberhinaus ist unklar, welches endogene Sp3, eine lange oder kurze Form in BON I Zellen vorliegt. (ii) In den SL2 Zellen und BON I Zellen sind unterschiedliche Transkriptionsfaktoren (TF) exprimiert, sodass die Interaktion zwischen Sp1 und Sp3 und verschiedenen TF für die Unterschiede verantwortlich sein könnten. (iii) Eine Rolle könnten auch die posttranslationale Modifikationen von Sp1 und Sp3 spielen, die die DNA-Bindungsaktivität regulieren.

Weitere Untersuchungen müssen klären, welche Rolle Sp1 und Sp3 in der NaB-Aktivierung des humanen Gastrinpromotors in BON I Zellen spielen. Viele Promotoren haben GC-reiche Seiten, die Sp1 binden können. Jedoch sind diese Seiten in vielen Fällen nicht alleine durch Sp1 oder Sp Familienmitglieder, sondern auch durch andere Zinkfingerproteine, die kompetitiv binden oder mit Sp1 kooperieren können, beeinflusst. Es wurde aktuell gezeigt, dass das Ebstein-Barr-Virus Protein BMRF1 den humanen Gastrinpromotor über die beiden GC-reichen Sequenzen, die GT-Box und gERE aktiviert (Holley-Guthrie et al, 2005). Nur die Doppelmutation der unabhängigen GT-Box und gERE Elemente konnte die Response verhindern. Auch diese Gruppe spekulierte als putatives Target ZBP-89 anstelle von Sp1, dessen Nachweis aber durch spezifische Mutationen in der überlappenden Erkennungssequenz schwierig ist. Die ZBP-89 Consensus Sequenz wird immer auch von Sp1/3 gebunden, aber nicht

notwendigerweise umgekehrt. Während Sp1 ein positiver Regulator ist, ist ZBP-89 selbst ein negativer Regulator, sodass möglicherweise in Abwesenheit eines Stimulators, wie BMFR1 oder Natriumbutyrat die relative Menge an Sp1 versus ZBP-89 am Gastrinpromoter die Aktivität reguliert.

Denkbar wäre daher für die NaB-vermittelte Aktivierung des humanen Gastrinpromotors in BON I Zellen ein ähnliche Regulation wie beim *IGFBP3* oder *p21<sup>WAF/CIP1</sup>* Promotor (Walker et al, 2001; Bai et al, 2000). Der Histone Deacetylase Inhibitor Natriumbutyrat führt zu einer erhöhten Histonacetylierung durch Hemmung der Histondeacetylase (HDAC1) und einer Induktion des Gastrinpromotors über die putativen NaB-RE: GT-Box und CACC-Box. Sp1 und Sp3 binden an die putativen NaB-RE und partizipieren bei der NaB Aktivierung des Gastrinpromotors, ohne dass es zu einer Veränderung ihres Bindungsmusters an den Gastrinpromotor kommt. Der p300 Koaktivator (akkumuliert unter NaB) bindet bevorzugt ZBP-89 und komplexiert mit Sp1 und Sp3 entweder direkt oder via unbekannte Kofaktoren. Der Multiproteinkomplex am Gastrinpromotor führt folglich zur Histonacetylierung und transkriptionellen Aktivierung des Promotors. Abwesenheit von NaB führt zur Dissoziation einzelner Faktoren.



## 5. Zusammenfassung

Gastrin zeigt im neuroendokrinen Pankreas ein onkofetales Expressionsmuster. In der vorliegenden Arbeit sollte daher die transkriptionelle Regulation von Gastrin in humanen neuroendokrinen Pankreastumorzellen BON I untersucht werden.

Zur Analyse der transkriptionellen Regulation von Gastrin wurden Reportergenkonstrukte eingesetzt und anhand von Transfektionsanalysen gezeigt, dass der humane Gastrinpromotor in BON I Zellen exprimiert wird. Mithilfe von verschiedenen 5'-Deletionsmutanten konnten relevante *cis*-regulatorische Elemente des Gastrinpromotors lokalisiert werden. Während der HDAC 1 Inhibitor Natriumbutyrat (NaB) die Proliferation von BON I Zellen inhibierte, wurde eine dosisabhängige NaB-vermittelte transiente Stimulation des humanen Gastrinpromotors in BON I Zellen beobachtet. Im weiteren gelang es anhand transienter Transfektionsanalysen Natriumbutyrat-Response Elemente (NaB-RE) zu lokalisieren und durch weitere Mutationsanalysen weiter zu charakterisieren. So konnten NaB-RE im proximalen Gastrinpromotor in einer 50 bp Region (-190 und -240 Nn) und 69 bp Region (-79 und -148 Nn), die beide GC-reiche Sequenzen beinhalten, identifiziert werden. Es ist anzunehmen, dass die NaB-vermittelte Stimulation durch Bindung oder Interaktion von Transkriptionsfaktoren oder Proteinkomplexe an beiden überlappenden Elementen der hGRD bedingt ist, da erst die kombinierte Mutation beider Elemente, der CACC-Box und GNE zum Verlust der Natriumbutyrat-induzierten Promotorstimulation führte.

Da sich während den Untersuchungen die Relevanz GC-reicher Sequenzen im proximalen Gastrinpromotor zeigte, wurde die Regulation des humanen Gastrinpromotors durch Sp1-Transkriptionsfaktoren untersucht. Transfektionsuntersuchungen zeigten, dass sowohl Sp1 als auch Sp3, nicht nur einzeln sondern auch additiv in *Drosophila* SL2 Zellen die Transkription des Gastrinpromotors aktivierten, während Sp4 keinen Effekt hatte. Mutationsanalysen zeigten, dass die Sp1-bedingte Aktivierung des Gastrinpromotors weder von der GT-box oder der CACC-Box noch von gERE alleine abhängig war. Da die Mutationen in nicht allen Elementen gleichzeitig vorlagen ist es möglich, dass nur eine der GC-reichen Regionen I-III zur Sp1-abhängigen Aktivierung des Gastrinpromotors ausreicht, oder aber dass durch die Mutation in einer GC-reichen Region überlappende *cis*-regulatorische Elemente, wie Bsp im gERE (Bindung von Sp1 und ZBP-89) eventuell negativ regulatorische

Transkriptionsfaktoren an ihrer Bindung an die DNA oder an andere Transkriptionsfaktoren behindert werden.

Die Ergebnisse führen zur Hypothese, dass die NaB-vermittelte Aktivierung des humanen Gastrinpromotors in BON I Zellen ähnlich wie beim *IGFBP3* oder *p21<sup>WAF/CIP1</sup>* Promotor reguliert wird. NaB führt zu einer erhöhten Histonacetylierung und Induktion des Gastrinpromotors über die putativen NaB-RE. Sp1 und Sp3 binden an diese und partizipieren bei der NaB Aktivierung des Gastrinpromotors, ohne dass es zu einer Veränderung ihres Bindungsmusters an den Promotor kommt. Der p300 Koaktivator (akkumuliert unter NaB) bindet bevorzugt ZBP-89 und komplexiert mit Sp1 und Sp3 entweder direkt oder via unbekannte Kofaktoren. Der Multiproteinkomplex am Gastrinpromotor führt folglich zur Histonacetylierung und transkriptionellen Aktivierung des Promotors. Die Abwesenheit von NaB führt dagegen wieder zur Dissoziation der einzelnen Faktoren.

## 6. Literaturverzeichnis

*Almoguera C, Shibata D, Forrester K, Martin J, Arnheim N, Perucho M.* Most human carcinomas of the exocrine pancreas contain mutant c-K-ras genes. *Cell.* 1988; 53: 549-554.

*Archer SY, Hodin RA.* Histone acetylation and cancer. *Curr Opin Genet Dev.* 1999; 9(2): 171-174 Review.

*Archer SY, Meng S, Shei A, Hodin RA.* p21 (WAF1) is required for butyrate-mediated growth inhibition of human colon cancer cells. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1998; 95: 6791-6796.

*Bai L, Merchant JL.* Transcription Factor ZBP-89 Cooperates with Histone Acetyltransferase p300 during Butyrate Activation of p21 waf1 Transcription in Human Cells. *J. Biol.Chem.* 2000; Vol.275, Issue 39: 30725-30733.

*Bartsch D, Barth P, Bastian D, Ramaswamy A, Gerdes B, Chaloupka B, Deiss Y, Simon B, Schudy A.* Higher frequency of DPC4/Smad4 alterations in pancreatic cancer cell lines than in primary pancreatic adenocarcinomas. *Cancer Lett.* 1999; 139(1): 43-49.

*Bartsch D, Kopp I, Bergenfelz A, Rieder H, Deiss Y, Munch K, Rothmund M, Simon B.* Germline mutations in the MEN1 gene: basis for predictive genetic screening and clinical management of multiple endocrine neoplasia type 1 (MEN1) families. *Dtsch Med Wochenschr.* 1998; 123(51-52): 1535-1540.

*Bartsch D, Kopp I, Bergenfelz A, Rieder H, Munch K, Jager K, Deiss Y, Schudy A, Barth P, Arnold R, Rothmund M, Simon B.* MEN1 gene mutations in 12 MEN1 families and their associated tumors. *Eur J Endocrinol.* 1998; 139(4): 416-420.

*Bartsch DK, Kersting M, Wild A, Ramaswamy A, Gerdes B, Schuermann M, Simon B, Rothmund M.* Low frequency of p16(INK4a) alterations in insulinomas. *Digestion.* 2000; 62(2-3): 171-177.

*Benezra R, Davis RL, Lassar A, Tapscott S, Thayer M, Lockshon D, Weintraub H.* Id: a negative regulator of helix-loop-helix DNA binding proteins. Control of terminal myogenic differentiation. *Ann N Y Acad Sci.* 1990; 599: 1-11.

*Berg JM.* Sp1 and the subfamily of zinc finger proteins with guanine-rich binding sites. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1992; 89(23): 11109-11110.

*Biffi A, Coradini D, Pellizzaro C, Pirronello E, Di Fronzo G.* Simultaneous but not sequential treatment with sodium butyrate improves the antiproliferative effect of alpha or beta- interferon on a breast cancer cell line. *Anticancer Res.* 1998; 18 (6A): 4109-4114.

*Bigger CB, Melnikova IN, Gardner PD.* Sp1 and Sp3 regulate expression of the neuronal nicotinic acetylcholine receptor beta4 subunit gene. *J Biol Chem.* 1997; 272(41): 25976-25982.

*Birnbaum MJ, van Wijnen AJ, Odgren PR, Last TJ, Suske G, Stein GS, Stein JL.* Sp1 trans-activation of cell cycle regulated promoters is selectively repressed by Sp3. *Biochemistry.* 1995; 34(50): 16503-16508.

*Black A, Black JD, Azizkhan-Clifford J.* Sp1 and Krüppel-like factor family of transcription factors in cell growth regulation and cancer. *J. Cell. Physiol.* 2001; 188: 143-160.

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

*Brand SJ, Fuller PJ.* Differential gastrin gene expression in rat gastrointestinal tract and pancreas during neonatal development. *J. Biol. Chem.* 1988; 263: 5341-5347.

*Bundgaard JR, Hansen TvO, Friis-Hansen L, Rourke IJ, van Solinge WW, Nielsen FC, Rehfeld JF.* A distal Sp1-element is necessary for maximal activity of the human gastrin promoter. *FEBS letter.* 1995; (369) 225-228.

*Candido EP, Reeves R, Davie JR.* Sodium butyrate inhibits histone deacetylation in cultured cells. *Cell.* 1978; 14(1): 105-113.

*Capella C, Heitz PU, Hofler H, Solcia E, Kloppel G.* Revised classification of neuroendocrine tumours of the lung, pancreas and gut. *Virchows Arch.* 1995; 425(6): 547-560.

*Charollais RH, Buquet C, Mester J.* Butyrate blocks the accumulation of CDC2 mRNA in late G1 phase but inhibits both the early and late G1 progression in chemically transformed mouse fibroblasts BP-A31. *J Cell Physiol.* 1990; 145(1): 46-52.

*Chesa PG, Rettig WG, Melamed MR, Old LJ, Niman NL.* Expression of p21 ras in normal and malignant human tissues: lack of association with proliferation and malignancy. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1987; 84: 3234-3238.

*Chung DC, Brand SJ, Tillotson LG.* Mutually exclusive interactions between factors binding to adjacent Sp1 and AT-rich elements regulate gastrin gene transcription in insulinoma cells. *J. Biol. Chem.* 1995, 270: 8829-8836.

*Ciccotosto GD, McLeish A, Hardy KJ, Shulkes A.* Expression, processing, and secretion of gastrin in patients with colorectal carcinoma. *Gastroenterology.* 1995; 109(4): 1142-1153.

*Cordel S, Heymann MF, Boisteau O, Oliver L, Le Pendu J, Gregoire M, Meflah K.* 5-Fluorouracil-resistant colonic tumors are highly responsive to sodium butyrate/interleukin-2 bitherapy in rats. *Int J Cancer.* 1997; 73(6): 924-928.

*Cuisset L, Tichonicky L, Jaffray P, Delpesch M.* The effects of sodium butyrate on Transcription are mediated through activation of a protein phosphatase. *J Biol Chem.* 1997; 272: 24148-24153.

*Davie JR.* Inhibition of histone deacetylase activity by butyrate. *J Nutr.* 2003; 133 (7 Suppl): 2485S-2493S. Review.

*de Haan JB, Gevers W, Parker MI.* Effects of sodium butyrate on the synthesis and methylation of DNA in normal cells and their transformed counterparts. *Cancer Res.* 1986; 46(2): 713-716.

*Ectari N.* Pancreatic endocrine tumors: diagnostic pitfalls. *Hepatogastroenterology.* 1999; 46: 679-690.

*Evers BM, Townsend CM Jr., Upp JR, Allen E, Hurlbut SC, Kim SW, Rajaraman S, Singh P, Reubi JC, Thompson JC.* Establishment and characterization of a human carcinoid in nude mice and effect of various agents on tumor growth. *Gastroenterology.* 1991; 101(2): 303-311.

*Ford MG, Del Valle J, Soroka CJ, Merchant JL.* EGF receptor activation stimulates endogenous gastrin gene expression in canine G cells and human gastric cell cultures. *J.Clin. Invest.* 1997; 99: 2762-2771.

*Forrester K, Almoguera C, Han K, Grizzle WE, Perucho M.* Detection of high incidence of K-ras oncogenes during human colon tumorigenesis. *Nature.* 1987; 327: 298-303.

*Fuller PJ, Stone DL, Brand SJ.* Molecular cloning and sequencing of a rat preprogastrin complementary deoxyribonucleic acid. *Mol Endocrinol.* 1987; 1(4): 306-311.

*Ghayor G, Chadjichristos C, Herrouin J-F, Ala-Kokko L, Suske G, Pujol J-P, Galera P.* Sp 3 represses the Sp1-mediated transactivation of the human COL2A1 gene in primary and de-differentiated chondrocytes. *J. Biol. Chem.* 2001; 276: 36881-36895.

*Ginsburg E, Salomon D, Sreevalsan T, Freese E.* Growth inhibition and morphological changes caused by lipophilic acids in mammalian cells. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1973; 70(8): 2457-2461.

*Glauber JG, Wandersee NJ, Little JA, Ginder GD.* 5'-flanking sequences mediate butyrate stimulation of embryonic globin gene expression in adult erythroid cells. *Mol Cell Biol.* 1991; 11(9): 4690-4697.

*Goodbourn S, Burstein H, Maniatis T.* The human beta-interferon gene enhancer is under negative control. *Cell.* 1986; 45(4): 601-610.

*Gregor PD, Sawadogo M, Roeder RG.* The adenovirus major late transcription factor USF is a member of the helix-loop-helix group of regulatory proteins and binds to DNA as a dimer. *Genes Dev.* 1990; 4(10): 1730-1740.

*Grunstein M.* Histone acetylation in chromatin structure and transcription. *Nature.* 1997; 389(6649): 349-352.

*Gustafsson JA.* Fatty acids in control of gene expression. *Nutr Rev.* 1998; 56(2 Pt 2): s20-21; discussion s54-75.

*Hagen G, Dennig J, Preiss A, Beato M, Suske G.* Functional analyses of the transcription factor Sp4 reveal properties distinct from Sp1 and Sp3. *J Biol Chem.* 1995; 270(42): 24989-24994.

*Hagen G, Müller S, Beato M, Suske G.* Sp 1- mediated transcriptional activation is repressed by Sp3. *EMBO J.* 1994; (13): 3843-3851.

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

*Hagopian HK, Riggs MG, Swartz LA, Ingram VM.* Effect of n-butyrate on DNA synthesis in chick fibroblasts and HeLa cells. *Cell.* 1977; 12(3): 855-860.

*Hague A, Diaz GD, Hicks DJ, Krajewski S, Reed JC, Paraskeva C.* Bcl-2 and bak may play a pivotal role in sodium butyrate-induced apoptosis in colonic epithelial cells; however overexpression of bcl-2 does not protect against bak-mediated apoptosis. *Int J Cancer.* 1997; 72: 898-905.

*Hanahan D, Meselson M.* Plasmid screening at high colony density. *Methods Enzymol.* 1983; 100: 333-342.

*Hansen TO, Bundgaard JR, Nielsen FC, Rehfeld JF.* Composite action of three GC/GT boxes in the proximal promotor region is important for gastrin gene transcription. *Mol Cell Endocrinol.* 1999; 155 (1-2): 1-8.

*Harig JM, Soergel KH, Komorowski RA, Wood CM.* Treatment of diversion colitis with short-chain-fatty acid irrigation. *N Engl J Med.* 1989; 320(1): 23-28.

*Heerdt BG, Houston MA, Augenlicht LH.* Potentiation by specific short-chain fatty acids of differentiation and apoptosis in human colonic carcinoma cell lines. *Cancer Res.* 1994; 54 (12): 3288-3293.

*Heerdt BG, Houston MA, Augenlicht LH.* Short-chain fatty acid-initiated cell cycle arrest and apoptosis of colonic epithelial cells is linked to mitochondrial function. *Cell Growth Differ.* 1997; 8(5):523-532.

*Höfler H, Ruhri C, Putz B, Wirnsberger G, Hauser H.* Oncogene expression in endocrine pancreatic tumours. *Virchows Arch.* 1988; (55): 355-361.

*Holley-Guthrie EA, Seaman WT, Bhende P, Merchant JL, Kenney SC.* The Epstein-Barr virus protein BMRF1 activates gastrin transcription. *J Virol.* 2005; 79(2): 745-755.

*Ihn H, Trojanowska M.* Sp3 is a transcriptional activator of the human alpha 2(I) collagen gene. *Nucleic Acids Res.* 1997; 25(18): 3712-3717.

*Ito R, Sato K, Helmer T, Jay G, Agarwal K.* Structural analysis of the gene encoding human gastrin: the large intron contains an Alu sequence. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1984;81(15): 4662-4666.

*Jensen RT.* Management of the Zollinger-Ellison syndrome in patients with multiple endocrine neoplasia type 1. *J Int Med.* 1998; 243: 477-488.

*Johnson LR.* Physiology of the gastrointestinal tract. Second Edition, Raven press. 1987.

*Kaplin EL, Fredland A.* The diagnosis and treatment of insulinomas. In *Endocrine surgery update*, eds Thompson NN, Vinik AI. New York: Grune and Stratton. 1983; 245-268.

*Karlsen AE, Fujimoto WY, Rabinovitch P, Dube S, Lernmark A.* Effects of sodium butyrate on proliferation-dependent insulin gene expression and insulin release in glucose-sensitive RIN-5AH cells. *J Biol Chem.* 1991; 266(12): 7542-7548.

*Kennett SB, Udvardia AJ, Horowitz JM.* Sp 3 encodes multiple proteins that differ in their capacity to stimulate or repress transcription. *Nucleic Acids Res.*, 25 (1997), 3110-3117.

*Kingsley C, Winoto A.* Cloning of GT box-binding proteins: a novel Sp1 multigene family regulating T-cell receptor gene expression. *Mol Cell Biol.* 1992; 12(10): 4251-4261.

*Koh TJ, Goldenring JR, Ito S, Mashimo H, Kopin AS, Varro A, Dockray GJ, Wang TC.* Gastrin deficiency results in altered gastric differentiation and decreased colonic proliferation in mice. *Gastroenterology.* 1997; 113(3): 1015-1025.

*Kriwacki RW, Schultz SC, Steitz TA, Caradonna JP.* Sequence-specific recognition of DNA by zinc-finger peptides derived from the transcription factor Sp 1. *Proc. Natl. Acad.* 1992; 89: 9759-9763.

*Kruh J.* Effects of sodium butyrate, a new pharmacological agent, on cells in culture. *Mol. Cell. Biochem.* 1982; 42: 65-82.

*Kumar AP, Butler AP.* Transcription factor Sp3 antagonizes activation of the ornithine decarboxylase promoter by Sp1. *Nucleic Acids Res.* 1997; 25(10): 2012-2019.

*Kumar AP, Mar PK, Zhao B, Montgomery RL, Kang DC, Butler AP.* Regulation of rat ornithine decarboxylase promoter activity by binding of transcription factor Sp1. *J Biol Chem.* 1995; 270(9): 4341-4348.

*Lallemant F, Courilleau D, Sabbah M, Redeuilh G, Mester J.* Direct inhibition of the expression of cyclin D1 gene by sodium butyrate. *Biochem Biophys Res Commun.* 1996; 229: 163-169.

*Larsson LI, Rehfeld JF, Sundler F, Hakanson R.* Pancreatic gastrin in foetal and neonatal rats. *Nature.* 1976; 262(5569): 609-610.

*Lee Y-H, Yano M, Liu S-Y, Matsunaga E, Johnson PR, Gonzalez FJ.* A novel cis-acting element controlling the rat CYP2D5 gene and requiring cooperativity between C/EBPB and an Sp1 factor. *Mol Cell Biol.* 1994; (14): 1383-1394.

*Lei S, Dubeykovskiy A, Chakladar A, Wojtukiewicz L, Wang TC.* The murine gastrin promoter is synergistically activated by transforming growth factor-beta/Smad and Wnt signaling pathways. *J Biol Chem.* 2004; 279(41): 42492-42502.

*Li JM, Datto MB, Shen X, Hu PPC, Yu Y, Wang XF.* Sp1, but not Sp3, functions to mediate promoter activation by TGF-beta through canonical Sp1 binding sites. *Nucleic Acids Res.* 1998; (26): 2449-2456.

*Liang Y, Robinson DF, Dennig J, Suske G, Fahl WE.* Transcriptional regulation of the SIS/PDGF-B gene in human osteosarcoma cells by the Sp family of transcription factors. *J Biol Chem.* 1996; 271(20): 11792-11797.

*Lubensky IA, Pack S, Ault D, Vortmeyer AO, Libutti SK, Choyke PL, Walther MM, Linehan WM, Zhuang Z.* Multiple neuroendocrine tumors of the pancreas in von Hippel-Lindau disease patients: histopathological and molecular genetic analysis. *Am J Pathol.* 1998; 153(1): 223-231.

*Luttichau HR, Van Solinge WW, Nielsen FC, Rehfeld JF.* Developmental expression of the gastrin and cholecystokinin genes in rat colon. *Gastroenterology.* 1993; 104(4): 1092-1098.

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

*Majello B, De Luca P, Suske G, Lania L.* Differential transcriptional regulation of c-myc promoter through the same DNA binding sites targeted by Sp1-like proteins. *Oncogene.* 1995; 10(9): 1841-1848.

*Mandal M, Kumar R.* Bcl-2 expression regulates sodium butyrate-induced apoptosis in human MCF-7 breast cancer cells. *Cell Growth Differ.* 1996; 7: 311-318.

*Maniatis T, Goodbourn S, Fischer JA.* Regulation of inducible and tissue-specific gene expression. *Science.* 1987; 236(4806): 1237-1245.

*Merchant JL, Demeduk B, Brand SJ.* A GC-rich element confers epidermal growth factor responsiveness to transcription from the gastrin promoter. *Mol. Cell. Biol.* 1991; 11: 2686-2696.

*Merchant JL, Du M, Todisco A.* Sp1 phosphorylation by Erk 2 stimulates DNA binding. *Biochem Biophys Res Commun.* 1999; 254: 454-461.

*Merchant JL, Shiotani A, Mortensen ER, Shumaker DK, Abraczinskas DR.* Epidermal growth factor stimulation of the human gastrin promoter requires Sp 1. *J. Biol. Chem.* 1995; 270: 6314-6319.

*Mitchell PJ, Tjian R.* Transcriptional regulation in mammalian cells by sequence-specific DNA binding proteins. *Science.* 1989; 245(4916): 371-378.

*Mortensen ER, Marks PA, Shiotani A, Merchant JL.* Epidermal growth factor and okadaic acid stimulate Sp1 proteolysis. *J Biol Chem.* 1997; 272(26): 16540-16547.

*Murre C, McCaw PS, Vaessin H, Caudy M, Jan LY, Jan YN, Cabrera CV, Buskin JN, Hauschka SD, Lassar AB.* Interactions between heterologous helix-loop-helix proteins generate complexes that bind specifically to a common DNA sequence. *Cell.* 1989; 58(3): 537-544.

*Nakata H, Wang SL, Chung DC, Westwick JK, Tillotson LG.* Oncogenic ras induces gastrin gene expression in colon cancer. *Gastroenterology.* 1998; 115: 1144-1153.

*Nakawaga T, Nelkin BD, Baylin StB, de Bustros A.* Transcriptional and Posttranscriptional Modulation of Calcitonin Gene Expression by Sodium n-Butyrate in Cultured Human Medullary Thyroid Carcinoma. *Cancer Research.* 1988; 48: 2096-2100.

*Netzker R, Weigert C, Brand K.* Role of the stimulatory proteins Sp1 and Sp3 in the regulation of transcription of the rat pyruvate kinase M gene. *Eur J Biochem.* 1997; 245(1): 174-181.

*Nir U, Walter MD, Rutter WJ.* Regulation of rat insulin 1 gene expression: evidence for negative regulation in nonpancreatic cells. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1986; 83(10): 3180-3184.

*Orchel A, Dzierzewicz Z, Parfiniewicz B, Weglarz L, Wilczok T.* Butyrate-induced differentiation of colon cancer cells is PKC and JNK dependent. *Dig Dis Sci.* 2005; 50(3): 490-498.

*Pearse AG.* The cytochemistry and ultrastructure of polypeptide hormone-producing cells of the APUD series and the embryologic, physiologic and pathologic implications of the concept. *J Histochem Cytochem.* 1969; 17(5): 303-313.

*Pellizaro C, Coradini D, Daniotti A, Abolafio G, Daidone MG.* Modulation of cell cycle-related protein expression by sodium butyrate in human non-small cell lung cancer cell lines. *Int J Cancer.* 2001; 91(5): 654-657.

*Perry RR.* Gastrinomas. In *Diffuse hormonal systems and endocrine syndromes*, eds Vinik A, Perry RR. 2002; Chapter 3.

*Philippe J, Drucker DJ, Chick WL, Habener JF.* Transcriptional regulation of genes encoding insulin, glucagon, and angiotensinogen by sodium butyrate in a rat islet cell line. *Mol Cell Biol.* 1987; 7(1): 560-563.

*Prasad NB, Biankin AV, Fukushima N, Maitra A, Dhara S, Elkahloun AG, Hruban RH, Goggins M, Leach SD.* Gene expression profiles in pancreatic intraepithelial neoplasia reflect the effects of Hedgehog signaling on pancreatic ductal epithelial cells. *Cancer Res.* 2005; 65(5): 1619-1626.

*Prasad S, Thakur MK.* Age-dependent effects of sodium butyrate and hydrocortisone on acetylation of high mobility group proteins of rat liver. *Biochem Int.* 1988; 16(2): 375-382.

*Rehfeld JF, Bardram L, Hilsted L.* Gastrin in human bronchogenic carcinomas: constant expression but variable processing of progastrin. *Cancer Res.* 1989; 49(11): 2840-2843.

*Rehfeld JF.* Lokalisation of gastrins to neuro- and adenohypophysis. *Nature.* 1978; 271(5647): 771-773.

*Riggs MG, Whittaker RG, Neumann JR, Ingram VM.* n-Butyrate causes histone modification in HeLa and Friend erythroleukaemia cells. *Nature.* 1977; 268(5619): 462-464.

*Rohlf C, Ahmad S, Borellini F, Lei J, Glazer RI.* Modulation of transcription factor Sp1 by cAMP-dependent protein kinase. *J. Biol. Chem.* 1997; 272: 21137-21141.

*Roncalli M, Springall DS, Varndell I, Gaitonde VV, Hamid Q, Ibrahim NBN, Grimelius L, Wilander E, Polak JM, Coggi G.* Oncoprotein immunoreactivity in human endocrine tumours. *J Pathol.* 1991; 163: 117-127.

*Rost FW, Polak JM, Pearse AG.* The melanocyte: its cytochemical and immunological relationship to cells of the endocrine polypeptide (APUD) series. *Virchows Arch B Cell Pathol.* 1969; 4(2): 93-101.

*Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T.* Molecular cloning. A laboratory Manual, 2<sup>nd</sup> ed. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY, 1989.

*Schneider I.* Cell lines derived from late embryonic stages of *Drosophila melanogaster*. *J Embryol Morphol.* 1972; Exp 27: 353-365.

*Schwartz B, Avivi-Green C, Polak-Charcon S.* Sodium butyrate induces retinoblastoma protein dephosphorylation, p16 expression and growth arrest of colon cancer cells. *Mol Cell Biochem.* 1998; 188: 21-30.

*Shiotani A, Merchant JL.* cAMP regulates gastrin gene expression. *Am. J. Physiol.* 1995; 269: 458-464.

*Simon B, Merchant JL, Eissele R, Kohler K, Arnold R.* Transient transcriptional activation of gastrin during sodium butyrate-induced differentiation of islet cells. *Regul Pept.* 1997; 70(2-3): 143-148.

*Simon B, Tillotson L, Brand SJ.* Activation of gastrin gene transcription in islet cells by a RAP1-like cis-acting promoter element. *FEBS Lett.* 1994; 351(3): 340-344.

*Simon B, Wattler F, Merchant JL, Munch K, Schutze HJ, Suske G, Arnold R.* RAP1-like binding activity in islet cells corresponds to members of the Sp1 family of transcription factors. *FEBS Lett.* 1997; 411(2-3): 383-388.

*Smith AM, Watson SA.* Gastrin and Gastrin receptor activation: an early event in the adenoma- carcinoma sequence. *Gut.* 2000; 47(6): 820-824.

*Song DH, Kaufman JC, Borodyansky L, Albanese C, Pestell RG, Wolfe MM.* Gastrin stabilises beta- catenin protein in mouse colorectal cancer cells. *Br J Cancer.* 2005; 92(8): 1581-1587.

*Stepan VM, Sawada M, Todisco A, Dickinson CJ.* Glycine- extended gastrin exerts growth-promoting effects on human colon cancer cells. *Mol. Med.* 1999; 5(3): 147-159.

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

*Swarovsky B, Eissele R, Eisenacher M, Trautmann ME, Arnold R.* Sodium butyrate induces neuroendocrine cytodifferentiation in the insulinoma cell line RINm5F. *Pancreas.* 1994; 9(4): 460-468.

*Terao Y, Nishida J, Horiuchi S, Rong F, Ueoka Y, Matsuda T, Kato H, Furugen Y, Yoshida K, Kato K, Wake N.* Sodium butyrate induces growth arrest and senescence-like phenotypes in gynecologic cancer cells. *Int J Cancer.* 2001; 94(2): 257-267.

*Thorburn CM, Friedman GD, Dickinson CJ, Vogelman JH, Orentreich N, Parsonnet J.* Gastrin and colorectal cancer: a prospective study. *Gastroenterology.* 1998; 115(2): 275-280.

*Tillotson LG, Wang TC, Brand SJ.* Activation of gastrin transcription in pancreatic insulinoma cells by a CACC promoter element and a 70-kDa sequence-specific DNA-binding protein. *J Biol Chem.* 1994; 269(3): 2234-2240.

*Toscani A, Soprano DR, Soprano KJ.* Molecular analysis of sodium butyrate-induced growth arrest. *Oncogene Res.* 1988; 3(3): 223-238.

*Tsubaki J, Choy WK, Ingermann AR.* Effects of sodium butyrate on expression of members of the insulin-like growth factor binding protein superfamily In human mammary epithelial cells. *J Endocrinol.* 2001; 169: 97-110.

*Udvardia AJ, Templeton DJ, Horowitz JM.* Functional interactions between the retinoblastoma (Rb)protein and Sp-family members: superactivation by Rb requires amino acids necessary for growth suppression. *Proc Natl. Acad Sci USA.* 1995; 92(9): 3953-3957.

*Urbano A, Koc Y, Foss FM.* Arginine butyrate downregulates p210 bcr-abl expression and induces apoptosis in chronic myelogenous leukemia cells. *Leukemia.* 1998; 12(6): 930-936.

*Vaziri C, Stice L, Faller DV.* Butyrate- induced G1 arrest results from p21-independent disruption of retinoblastoma protein-mediated signals. *Cell Growth Differ.* 1998; 9: 465-474.

*Vidali G, Boffa LC, Bradbury EM, Allfrey VG.* Butyrate suppression of histone deacetylation leads to accumulation of multiacetylated forms of histones H3 and H4 and increased DNase I sensitivity of the associated DNA sequences. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1978; 75(5): 2239-2243.

*Wachtershauser A, Stein J.* Rationale for the luminal provision of butyrate in intestinal diseases. *Eur J Nutr.* 2000; 39(4): 164-171.

*Walker GE, Wilson EM, Powell D, Oh Y.* Butyrate, a histone deacetylase inhibitor, activates the human IGF binding protein-3 promoter in breast cancer cells: molecular mechanism involves an Sp1/Sp3 multiprotein complex. *Endocrinology.* 2001; 142(9): 3817-3827.

*Wang RN, Rehfeld JF, Nielsen FC, Kloppel G.* Expression of gastrin and transforming growth factor-alpha during duct to islet cell differentiation in the pancreas of duct-ligated adult rats. *Diabetologia.* 1997; 40(8): 887-893.

*Wang TC, Bonner-Weir S, Oates PS, Chulak M, Simon B, Merlino GT, Schmidt EV, Brand SJ.* Pancreatic gastrin stimulates islet differentiation of transforming growth factor alpha-induced ductular precursor cells. *J Clin Invest.* 1993; 92(3): 1349-1356.

*Wang TC, Brand SJ.* Islet cell-specific regulatory domain in the gastrin promoter contains adjacent positive and negative DNA elements. *J Biol Chem.* 1990; 265(15): 8908-8914.

*Wang TC, Brand SJ.* Function and regulation of gastrin in transgenic mice: a review. *Yale J Biol Med.* 1992; 65(6): 705-713; discussion 737-740.

*Wang TC, Koh TJ, Varro A, Cahill RJ, Dangler CA, Fox JG, Dockray GJ.* Processing and proliferative effects of human progastrin in transgenic mice. *J Clin Invest.* 1996; 98(8): 1918-1929.

*Warner RP.* Enteroendocrine Tumors Other Than Carcinoid: A Review of Clinically Significant Advances. *Gastroenterology.* 2005; Vol. 128, Number 6.

*Weber BH, Brohm M, Stec I, Backe J, Caffier H.* A somatic truncating mutation in BRCA2 in a sporadic breast tumor: *Am J Hum Genet.* 1996; 59(4): 962-964.

*Wiborg O, Berglund L, Boel E, Norris F, Norris K, Rehfeld JF, Marcker KA, Vuust J.* Structure of a human gastrin gene. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1984; 81(4): 1067-1069.

*Wieczorek E, Lin S, Perkins EB, Law DJ, Merchant JL, Zehner ZE.* The zinc finger repressor, ZBP-89, binds to the silencer element of the human vimentin gene and complexes with the transcriptional activator, Sp1. *J. Biol. Chem.* 2000; 275: 12879-12888.

*Wigler M, Sweet R, Sim GK, Wold B, Pellicer A, Lacy E, Maniatis T, Silvestein S, Axel R.* Transformation of mammalian cells with genes from procaryotes and eucaryotes. *Cell* 1979; 16: 777-785.

*Williams ED, Sandler M.* The classification of carcinoid tumors. *Lancet.* 1963; 238-239.

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

*Wintersberger E, Mudrak I, Wintersberger U.* Butyrate inhibits mouse fibroblasts at a control point in the G1 phase. *J Cell Biochem.* 1983; 21(3): 239-247.

*Wolffe AP.* Histone deacetylase: a regulator of transcription. *Science.* 1996; 272(5260): 371-372.

*Yan GZ, Ziff EB.* Nerve growth factor induces transcription of the p21 WAF1/CIP 1 and cyclin D1 genes in PC12 cells by activating the Sp1 transcription factor. *J. Neurosci.* 1997; 17: 6122-6132.

*Zhuang Z, Vortmeyer AO, Pack S, Huang S, Pham TA, Wang C, Park WS, Agarwal SK, Debelenko LV, Kester M, Guru SC, Manickam P, Olufemi SE, Yu F, Heppner C, Crabtree JS, Skarulis MC, Venzon DJ, Emmert-Buck MR, Spiegel AM, Chandrasekharappa SC, Collins FS, Burns AL, Marx SJ, Lubensky IA.* Somatic mutations of the MEN1 tumor suppressor gene in sporadic gastrinomas and insulinomas. *Cancer Res.* 1997; 57(21): 4682-4686.

## 7. Anhang

### 7.1. Verwendete Abkürzungen

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

---

DTT	Dithiothreitol
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EGF	Epidermal growth factor
EGR-1	Early growth response gene 1
EtBr	Ethidiumbromid
EtOH	Ethanol
FCS	fötale Kälberserum
GRE	Glucocorticoid response element
h	Stunde
HSE	heat-shock promotor element
HSVtk	Herpes Simplex Thymidinkinase
IGF-1	Insulin-like growth factor I
kb	Kilobasen
KDa	Kilodalton
luc	Luciferase
M	Molar
MAPK	mitogen-activated proteinkinase
min	Minute
mg	milligramm
µg	mikrogramm
µl	mikroliter
mRNA	messenger RNA
NaNH <sub>4</sub> Oac	Natriumammoniumacetat
NET	neuroendokriner Tumor
NGF	Nerve growth factor
NIS	Natriumiodidsymporter
NTP	Nukleotidtriphosphat
OD	optische Dichte
OCT-1	Octamer factor 1
PAA	Polyacrylamid
PAGE	Polyacrylamidgelelektrophorese
PBS	Phosphat-buffered Saline
PCI	Phenol/Chloroform/Isoamylalkohol
PCR	Polymerase Kettenreaktion

---

PEG	Polyethylenglykol
PKA	Proteinkinase A
PKC	Proteinkinase C
PPAR/RXR	Peroxisome proliferator-activated receptors/retinoic x receptor
P/S	Penicillin/Streptomycin
RLU	Relative Light Units
RNA	Ribonukleinsäure
rpm	rounds per minute = Umdrehungen/Min
RPMI	Roswell Park Memorial Institute
RREB-1	Ras-responsive element binding protein 1
RT	Raumtemperatur
s.	siehe
sec	Sekunde
SRF	Serum response factor
SMS	Somatostatin
SP-1	Stimulating Protein 1
s.o.	siehe oben
STAT3	Signal transducer and activator of transcription
s.u.	siehe unten
TBE	Tris-Bor-EDTA-Puffer
TE	Tris-EDTA-Puffer
TEMED	N,N,N',N',Tetramethylethylendiamin
Tris-Cl	Tris-Hydroxymethyl-Aminomethan/HCl
t-RNA	transfer-RNA
U	Unit = Einheit enzymatischer Aktivität
UV	Ultraviolett
z.B.	zum Beispiel

## 7.2. Akademische Lehrer

Meine akademischen Lehrer waren die Damen und Herren in Marburg:

Arnold, Aumüller, Barth, Basler, Baum, Beato, Beyer, Daut, Engenhardt-Cabillic, Fischer, Geus, Görg, Gotzen, Gressner, Grimm, Hasilik, Herzum, Kern, Köhler, Kretschmer, Kummer, Jungclas, Lange, Koolmann, Maisch, Mannherz, Moll, Moosdorf, Mueller, Neubauer, Oertel, Richter, Röhm, Rosenow, Rotmund, Schachtschnabel, Schäfer, Schneider, Schott, Seitz, Simon, Slenczka, Steiniger, Vogelmeier, Voigt, von Wichert, Weihe, Werner, Westermann.

Meine akademischen Lehrer waren die Damen und Herren in Innsbruck:

Berger, Brauchle, Fritsch, Göttinger, Gunkel, Hinterhuber.

Meine akademischen Lehrer waren die Herren in Göttingen:

Gaebel, Passian, Pommer.

### **7.3. Danksagung**

Mein Dank gilt Frau Prof. Dr. med. Babette Simon für die thematische Anregung der vorliegenden Arbeit und für die Betreuung während der Durchführung. Herrn Prof. Dr. med. Rudolf Arnold danke ich für die freundliche Aufnahme in die Abteilung Gastroenterologie und das Überlassen des Laborplatzes. Den Mitarbeitern des Labors möchte ich für deren hilfsbereite Zusammenarbeit und das angenehme stets produktive Arbeitsklima danken.

Mein Dank gilt in erster Linie meinen Eltern Gabriele und Jürgen Freitag, meinem Bruder Jörg Freitag, sowie Patrick Nonhoff, die mich in jeder Hinsicht unterstützten.