

Mathias Gante
Dr.sc.hum.

Signaltransduktion zwischen Endoplasmatischem Reticulum und Nucleus: Einfluß von Brefeldin A auf die Regulation der Transkription der Gonadotropin- α -Untereinheit des Menschen

Geboren am 27.3.1967 in Berlin
Reifeprüfung am 5.6.1986 in Darmstadt
Studiengang in Fachrichtung Biologie vom WS 88/89 bis SS 94
Vordiplom am 25.6.1991 an der Technischen Hochschule Darmstadt
Diplom am 21.4.1994 an der Technischen Hochschule Darmstadt

Promotionsfach: Biochemie
Doktorvater: Prof. Dr.phil. nat. Wolfgang Ekkehard Merz

Das plazentare Glykoprotein-hormon hCG stimuliert die Progesteronsynthese des Corpus luteum im ersten Trimester der Schwangerschaft. Dabei kommt es bereits nach kurzer Zeit zu einem exponentiellen Anstieg der hCG-Sekretion. Die Regulation der Transkription der hCG-Untereinheiten ist bislang noch unzureichend geklärt. Vorversuche hatten gezeigt, daß die Transkriptionsrate der α -hCG-Untereinheit durch das Antibiotikum Brefeldin A (BFA) beeinflussbar war. Durch BFA wird der sekretorische Weg durch Akkumulation der Proteine im ER unterbrochen. In dieser Arbeit wurde die Regulation der Transkription der α -hCG-Untereinheit untersucht unter der Fragestellung, ob es einen Signaltransduktionsweg zwischen sekretorischem Weg und Nucleus gibt.

Aus einer genomischen λ -Phagen-DNA-Bank wurde die Promotersequenz des α -hCG-Gens mit 5'-flankierender Sequenz isoliert. Die Sequenz wurde zusammen mit dem Anfangsbereich des 1. Exons von α -hCG in einen Luciferase-Reporter-gen-Vektor kloniert (pGL α -1102/+50). Dieser Reporter-gen-Vektor wurde in JAR-Chorionkarzinomzellen transfiziert und nach Lyse der Zellen die Luciferaseaktivität gemessen. Behandelte man die Zellen mit 8-Bromo-cAMP, konnte die Promoteraktivität von α -hCG nach 12 h um das 3,5 fache erhöht werden, wobei die Induktion bis zu diesem Maximalwert ständig anstieg und sich auf diesem Niveau bis 48 h in etwa hielt. Wurden die Zellen mit BFA behandelt, konnte ein biphasischer Effekt beobachtet werden. An den Meßpunkten nach 10 min und 30 min kam es zu einer Erniedrigung der Promoteraktivität mit einer Induktion von 0,5 bzw. 0,9, während nach 60 min und 120 min mit einer Induktion von 1,9 bzw. 1,4 eine Erhöhung der Promoteraktivität festzustellen war.

Wurde den Zellen zunächst 8-Bromo-cAMP für 12 h appliziert und dann 1 h BFA zugegeben, konnte eine Induktion von 5,4 erreicht werden, was der Summe der zuvor gemessenen Einzelwerte entsprach. Der Wirkungsort des BFA-Effektes nach 1 h (Induktion 1,9 fach) wurde durch Transfektionsversuche mit Reporter-Gen-Konstrukten mit schrittweise kleineren Insertionen des α -hCG-Promoters auf den Bereich zwischen -938 bp und -1102 bp eingegrenzt. Ein diesen Bereich umspannendes DNA-Fragment wurde für Bandshift-Experimente eingesetzt. Kernproteinextrakte BFA-behandelter JAR-Zellen erzeugten einen Bandshift, womit die spezifische Bindung eines Proteins an dieses „BFA-responsive DNA-Fragment“ gezeigt war. In DNase I-Footprint-Experimenten konnten Kernproteinextrakte BFA-behandelter JAR-Zellen einen Footprint im Bereich zwischen -1036 bp und -1043 bp erzeugen. Es handelte sich hier um eine BFA-induzierte Protektion der DNA, da Kernproteinextrakte unbehandelter Zellen keinen Footprint bewirken konnten. In South-Western-Experimenten wurde ein 15 kDa-Protein identifiziert, das spezifisch an das „BFA-responsive DNA-Fragment“ bindet. Dieses Protein wird außerdem durch BFA induziert. Eine Reinigung dieses 15 kDa-Proteins konnte durch Verwendung einer DEAE A 25-Säule erreicht werden. Eine weitere Reinigung mit einer Affinitäts-Säule war nicht mehr möglich. Um das eigentliche Ziel einer Reinigung, nämlich die Charakterisierung und Sequenzierung dieses Proteins, zu erreichen, muß diese in größerem Maßstab und unter Verwendung verschiedener Säulen durchgeführt werden.

Bei dem „BFA-responsiven DNA-Bindeprotein“ (15 kDa) handelt es sich vermutlich um einen Transkriptionsfaktor, der im Bereich zwischen -1036 bp und -1102 bp des Promoters der α -hCG-Untereinheit bindet und die Transkription erhöht. Der beobachtete Effekt ist BFA-responsiv aber es läßt sich nicht sagen, ob er auch BFA-spezifisch ist. Der Vergleich mit Arbeiten anderer Arbeitsgruppen läßt vermuten, daß es sich hierbei um eine Reaktion auf die Akkumulation von Proteinen im ER, wie sie durch BFA erzeugt wird, handelt. Vermutlich sind hier die Komponenten eines Signaltransduktionsweges beschrieben worden, die eine Kommunikation zwischen sekretorischem Weg und dem Nucleus herstellen.