

## 2.5. Reportergenanalysen zur Untersuchung der *APM-1*-Promotor-/Enhancer-Aktivität

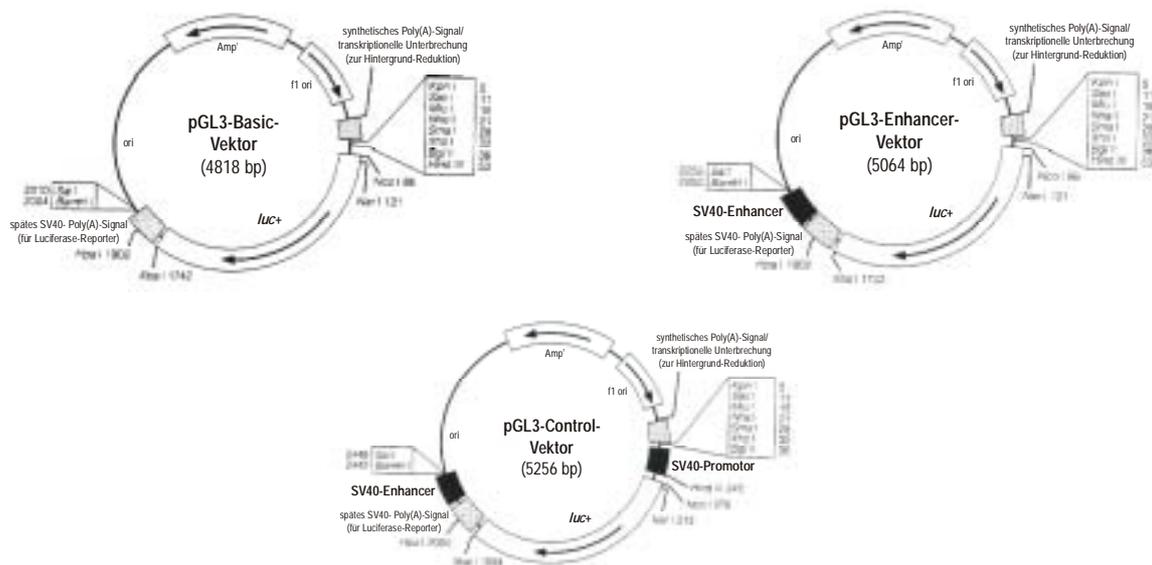
Die Analyse von cDNA-Fragmenten hatte ergeben, dass in Tumorzelllinien *APM-1*-Transkripte produziert werden, die mindestens drei verschiedenen Klassen von 5'-untranslatierten Regionen (UTRs) mit der Bezeichnung p2, a31 und 15C tragen. Die völlig unterschiedlichen Sequenzen der drei 5'-UTR-Klassen deuten darauf hin, dass die Herstellung der verschiedenen *APM-1*-RNAs von separaten Promotoren gestartet wird. Zur Charakterisierung der Transkriptionskontrollregionen waren die entsprechenden genomischen Bereiche mit den 5'-UTR-Sequenzen aus einer mit Chromosom-18-Sequenzen angereicherten Cosmid-Bibliothek identifiziert und isoliert worden (Nazari, 2000).

Mit 5'-UTR-spezifischen RT-PCR-Analysen konnten für p2, a31 und 15C Transkripte nachgewiesen und damit Hinweise auf die zugehörige Promotoraktivität erhalten werden (siehe Kap. 2.4.2. und 2.4.3.). Zum direkten Nachweis von Promotor- und Enhancer-Aktivität der genomischen Fragmente mit p2- und a31-UTR wurden im Rahmen dieser Doktorarbeit Luciferase-Reportergenanalysen durchgeführt (Alam und Cook, 1990). Dazu wurden Cosmid-Fragmente mit den genomischen Sequenzen aus der unmittelbaren Umgebung der 5'-UTRs durch Restriktionsverdau isoliert und in Luciferase-Reportervektoren umklontiert. Als Vektoren wurden zum einen die Plasmide pGL3-Basic und pGL3-Enhancer verwendet: pGL3-Basic enthält stromabwärts der multiplen Klonierungssequenz eine modifizierte Luciferase-cDNA aus *Photinus pyralis*, pGL3-Enhancer besitzt stromabwärts der Luciferase-cDNA zusätzlich einen SV40-Enhancer (Abbildung 1). Weiterhin wurde der Vektor pGUP.PA (5096 bp) mit einem stromaufwärts der Luciferase-cDNA gelegenen Minimal-Promotor eingesetzt. Zur Effizienzkontrolle des Reporter-Systems wurde der Vektor pGL3-Control verwendet, bei dem das Luciferase-Gen unter der Kontrolle von Promotor und Enhancer von SV40 steht (Abbildung 1).

Zur Regulation der Expression eines nachgeschalteten Gens muss eine Transkriptionskontrollregion bestimmte Elemente enthalten. Der Promotor definiert den Transkriptionsstart und dient als Anlagerungsstelle für die basale Transkriptionsmaschinerie. Die Promotor-Sequenz gibt die Richtung der Transkription vor und funktioniert daher orientierungsabhängig. Zusätzlich sind unmittelbar stromaufwärts des Promotors gelegene, sogenannte Promotor-proximale Elemente zur Bindung genspezifischer Transkriptionsfaktoren erforderlich. Zusätzlich werden Enhancer-Sequenzen zur Bindung weiterer Transkriptionsfaktoren benötigt. Sie können weit vom Transkriptionsstart entfernt liegen und wirken orientierungs- und positionsunabhängig.

Mit dem Vektor pGL3-Basic kann nur dann eine regulatorische Wirkung gemessen werden, wenn die inserierte Kontrollregion alle erforderlichen Elemente besitzt. Mit pGL3-Enhancer kann die Anwesenheit eines Promotors nachgewiesen werden. Der pGUP.PA-Vektor enthält lediglich eine minimale Promotor-Sequenz, so dass nur dann ein messbarer Effekt eintreten sollte, wenn zusätzliche Enhancer-Elemente eingeführt werden. Unter Berücksichtigung der orientierungsabhängigen Wirkung des Promotors wurden alle Fragmente in „sense“ (s)- und in „antisense“ (as)-Orientierung in Bezug auf das Luciferase-Gen inkloniert. Für jedes rekombinante Plasmid wurde der Erfolg der Neukonstruktion und die Insert-Orientierung durch Sequenzierung der Vektor/Insert-Übergänge bestätigt. Eine Übersicht sämtlicher Reporterkonstrukte ist in Tabelle 1 A und B zusammengestellt.

Die Untersuchung der transkriptionellen Aktivität erfolgte indirekt über eine Aktivitäts-Messung der nachgeschalteten Luciferase (de Wet et al., 1987). Dazu wurden die Konstrukte nach der Methode von Chen und Okayama (1987) transient in HeLa-Zellen transfiziert. Um materialbedingte Effekte auszuschließen, wurden die Transfektionen mit mindestens zwei verschiedenen DNA-Präparationen durchgeführt. Nach Ernte der Zellen wurde die absolute Luciferase-Aktivität in den Extrakten gemessen. Die relative Luciferase-Aktivität wurde durch Abgleich mit der vom co-transfizierten Standardisierungsplasmid pCMV-Gal beigesteuerten  $\beta$ -Galaktosidase-Aktivität bestimmt.



**Abbildung 1: Zirkuläre Plasmidkarten der Luciferase-Reportervektoren pGL3-Basic, pGL3-Enhancer und pGL3-Control**

*luc+*, cDNA, die eine modifizierte Luciferase aus *P. pyralis* codiert; Amp<sup>r</sup>, Ampicillin-Resistenzgen aus *E. coli*; f1 ori, Replikationsursprung aus filamentösen Phagen; ori, Ursprung der Plasmidreplikation aus *E. coli*. Die Pfeile in *luc+* und Amp<sup>r</sup> geben die Transkriptionsrichtung an; der Pfeil in f1 ori zeigt die Richtung der ssDNA-Synthese. Die Plasmide wurden bezogen von der Firma Invitrogen, aus deren Produktkatalog die (leicht veränderten) Plasmidkarten entnommen wurden.

**Tabelle 1 A: Luciferase-Reporterkonstrukte aus pGL3-Basic, pGL3-Enhancer und pGUP.PA mit p2-Fragment**

Reporterkonstrukt		Klonierungsstrategie			
Vektor	Insert <sup>a</sup>	Vektor-Linearisierung	Insert	Größe Insert	Größe Konstrukt
pGL3-Basic	p2-s	<i>Sst</i> I	<i>Sst</i> I-Fragment aus Cosmid G1152 (p2) <sup>b</sup>	3522 bp	8340 bp
	p2-as				
pGL3-Enhancer	p2-s	<i>Sst</i> I	<i>Sst</i> I-Fragment aus Cosmid G1152 (p2)		3522 bp
	p2-as				
pGUP.PA	p2-s p2-as	<i>Sma</i> I	<i>Sst</i> I-Fragment aus Cosmid G1152 (p2), Enden geglättet	3522 bp	

**Tabelle 1 B: Luciferase-Reporterkonstrukte aus pGL3-Basic, pGL3-Enhancer und pGUP.PA mit a31-PvuII- und a31-PstI-Fragmenten**

Reporterkonstrukt		Klonierungsstrategie			
Vektor	Insert <sup>a</sup>	Vektor-Linearisierung	Insert	Größe Insert	Größe Konstrukt
pGL3-Basic	a31-PvuII-s	<i>Hind</i> III+ <i>Bgl</i> II	<i>Hind</i> III+ <i>Bam</i> HI-Fragment aus Plasmid pBS-a31-PvuII	2006 bp	6824 bp
	a31-PvuII-as	<i>Sma</i> I	a31-PvuII-Fragment aus Cosmid N2448 <sup>b</sup> , Enden geglättet		
pGL3-Enhancer	a31-PvuII-s	<i>Hind</i> III+ <i>Bgl</i> II	<i>Hind</i> III+ <i>Bam</i> HI-Fragment aus Plasmid pBS-a31-PvuII		2006 bp
	a31-PvuII-as	<i>Mlu</i> I+ <i>Hind</i> III	<i>Mlu</i> I+ <i>Hind</i> III-Fragment aus Plasmid pGL3-Basic-a31-PvuII-as		
pGUP.PA	a31-PstI-s a31-PstI-as	<i>Pst</i> I	a31-PstI-Fragment aus Cosmid N2448 <sup>b</sup>	2289 bp	

<sup>a</sup> Die Inserts wurden in „sense“ (s)- und „antisense“ (as)-Orientierung zum Luciferase-Gen eingefügt.

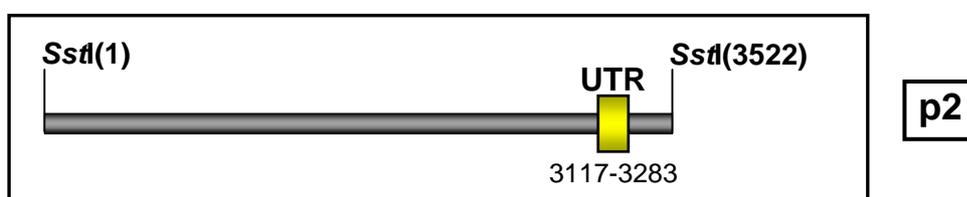
<sup>b</sup> Die Sequenzen sind in der Diplomarbeit von Nazari (2000) beschrieben.

### 2.5.1. Analyse der Promotor-/Enhancer-Aktivität der genomischen p2-Kontrollregion

Zur Analyse der p2-Kontrollregion wurde der Effekt des 3,5 kb großen *SstI*-Fragments, das die p2-UTR enthält, auf die Luciferase-Aktivität untersucht. Abbildung 2 zeigt eine schematische Darstellung des Fragments. Insgesamt wurde eine Serie von elf Messreihen durchgeführt. Die Daten einer repräsentativen Messreihe (Nr. 8) gibt Tabelle 2. Die relativen Luciferase-Aktivitäten (RLAs) der Reporterkonstrukte im Verhältnis zum entsprechenden Leervektor aus allen Messreihen sind in Tabelle 3 zusammengefasst und in Abbildung 3 graphisch dargestellt.

Das p2-Fragment in pGL3-Basic bewirkt eine orientierungsabhängige Steigerung der Luciferase-Expression mit 11- bis 51-facher Aktivierung in „sense“- , hingegen nur 1- bis 3-facher Aktivierung in „antisense“-Orientierung. Dies spricht dafür, dass eine aktive Transkriptionsinitiationsregion vorhanden ist. Die zum Teil starken Schwankungen der Aktivierungswerte sind wahrscheinlich auf die bei jeder Messreihe unterschiedlichen Transfektionseffizienzen und Ausbeuten an funktioneller Luciferase zurückzuführen. Die in Tabelle 3 und Abbildung 3 gezeigten Mittelwerte stellen deshalb eine Annäherung dar und dienen in erster Linie zur Orientierung. In analoger Weise sind die in den folgenden Kapiteln gebildeten Mittelwerte aller Messreihen zu interpretieren.

Mit pGL3-Enhancer erzeugt das p2-Fragment eine rund 20-fache Aktivierung in „sense“-Orientierung gegenüber einer nur 2-fachen Aktivierung in „antisense“-Orientierung. Daraus lässt sich auf die Anwesenheit eines Promotors schließen. Auch im Vektor pGUP.PA ist eine Aktivierung zu erkennen, allerdings ebenfalls orientierungsabhängig mit einem Unterschied zwischen „sense“- und „antisense“-Konstrukt von durchschnittlich 8-facher zu 2-facher Aktivierung. Möglicherweise liegt eine positionsabhängige Wirkung von Promotor-proximalen Sequenzen vor, die bei „sense“-Orientierung des Inserts wesentlich näher am Vektor-eigenen Promotor liegen als bei „antisense“-Orientierung.



**Abbildung 2: Schematische Darstellung des genomischen *SstI*-Restriktionsfragments mit der 5'-UTR der Transkriptklasse p2**

Das p2-Fragment wurde mit *SstI* aus Cosmid G1152 isoliert (Nazari, 2000). Das Cosmid entstammt einer mit Chromosom-18-Sequenzen angereicherten Bibliothek. Das gelbe Rechteck steht für das 5'-UTR-Exon. Die angegebenen Positionen beziehen sich auf die als Position 1 definierte *SstI*-Sequenz, die am 5'-Ende des Fragments liegt.

**Tabelle 2: Analyse transienter Transfektionen zur Bestimmung der Promotor-/Enhancer-Aktivität des p2-Fragments**

Reporter <sup>a</sup>	ALA <sup>b</sup>	$\beta$ -Gal <sup>c</sup>	RLA <sup>d</sup>	Mittelwert <sup>e</sup>
pGL3-Basic	94	156	0,60	<b>0,61</b>
	109	176	0,62	
pGL3-Basic-p2-s	1070	127	8,43	<b>7,28</b>
	656	107	6,13	
pGL3-Basic-p2-as	124	145	0,86	<b>0,78</b>
	133	189	0,70	
pGL3-Enhancer	2836	117	24,24	<b>25,94</b>
	2874	104	27,63	
pGL3-Enhancer-p2-s	42869	106	404,42	<b>593,10</b>
	111793	143	781,77	
pGL3-Enhancer-p2-as	6755	115	58,74	<b>48,90</b>
	3594	92	39,07	
pGUP.PA	122	145	0,84	<b>0,85</b>
	115	134	0,86	
pGUP.PA-p2-s	616	104	5,92	<b>5,95</b>
	406	68	5,97	
pGUP.PA-p2-as	177	191	0,93	<b>0,92</b>
	124	135	0,92	
pGL3-Control	1037685	169	6140,15	<b>5792,24</b>
	451880	83	5444,34	

<sup>a</sup> Verwendet wurden je 3  $\mu$ g der angegebenen Reporterplasmide

<sup>b</sup> ALA: Absolute Luciferase-Aktivität in Extrakten der in 60 mm-Schalen kultivierten und transfizierten HeLa-Zellen (Ausgangsdichte:  $1,5 \times 10^5$  Zellen pro Schale)

<sup>c</sup>  $\beta$ -Gal:  $\beta$ -Galaktosidase-Aktivität in den Zellextrakten nach Co-Transfektion mit 0,5  $\mu$ g pCMV-Gal

<sup>d</sup> RLA: Relative Luciferase-Aktivität, berechnet durch Division der ALA- durch die  $\beta$ -Gal-Werte

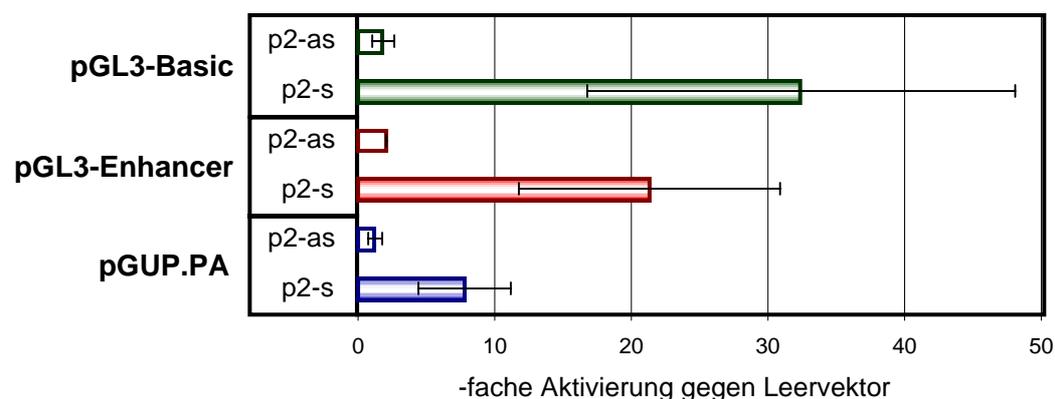
<sup>e</sup> gerundetes arithmetisches Mittel der RLA-Werte von jeweils zwei Parallelansätzen

**Tabelle 3: Promotor-/Enhancer-Aktivität des p2-Fragments: Übersicht der gerundeten RLA-Werte im Verhältnis zum Leervektor**

Reporter		-fache Aktivierung gegen Leervektor											Mittelwert <sup>a</sup>	StAbw <sup>b</sup>
		Messreihe												
Vektor	Insert	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11		
pGL3-Basic	p2-s	51	24	33	11	42	-	-	12	-	51	35	<b>32,4</b>	15,7
	p2-as	3	2	2	1	2	-	-	1	-	-	-	<b>1,8</b>	0,8
pGL3-Enhancer	p2-s	-	-	-	-	-	-	30	23	11			<b>21,3</b>	9,6
	p2-as	-	-	-	-	-	-	2	2	2			<b>2,0</b>	0,0
pGUP.PA	p2-s	-	-	-	7	3	10	7	7	13			<b>7,8</b>	3,4
	p2-as	-	-	-	1	1	2	1	1	2			<b>1,3</b>	0,5

<sup>a</sup> gerundetes arithmetisches Mittel aller Messreihen

<sup>b</sup> StAbw: Standardabweichung um die jeweiligen Mittelwerte



**Abbildung 3: Promotor-/Enhancer-Aktivität des p2-Fragments in HeLa-Zellen**

Graphische Darstellung der Daten aus Tabelle 3. Die Balken repräsentieren den Mittelwert aus elf Messreihen von gerundeten RLA-Werten dividiert durch die Werte der entsprechenden Leervektoren. Die Standardabweichungen sind durch Fehlerindikatoren angegeben. Die verwendeten Reporterplasmide mit dem in „antisense“ (as)- und „sense“ (s)-Orientierung zur Luciferase-cDNA inserierten p2-Fragment sind angegeben.

## 2.5.2. Analyse der Promotor-/Enhancer-Aktivität in der genomischen a31-Kontrollregion

Für die Untersuchungen zur transkriptionellen Aktivität der a31-Kontrollregion wurden zwei überlappende Cosmid-Fragmente eingesetzt (Abbildung 5). Das zunächst isolierte *Pst*I-2,3 kb-Fragment enthält die UTR etwa 0,9 kb vom 5'-Ende und ca. 1 bis 1,4 kb vom 3'-Ende entfernt. Um einen größeren Stromaufwärts-Bereich analysieren zu können und gleichzeitig den Promotor näher an das Reportergen zu platzieren, wurde zusätzlich ein 2 kb großes *Pvu*II-Fragment isoliert. In diesem Fragment liegt die a31-UTR mehr als 1,4 kb vom 5'-Ende und ca. 160 bis 560 bp vom 3'-Ende entfernt. Aufgrund der Schnittstellen wurde das *Pst*I-Fragment in pGUP.PA und das *Pvu*II-Fragment in die Vektoren pGL3-Basic und pGL3-Enhancer kloniert. Zur Analyse der a31-Kontrollregion wurde eine Serie von insgesamt sechs Messreihen durchgeführt. Die Daten einer repräsentativen Messreihe (Nr. 4) gibt Tabelle 4. Die relativen Luciferase-Aktivitäten (RLAs) der Reporterkonstrukte im Verhältnis zum entsprechenden Leervektor aus allen Messreihen sind in Tabelle 5 zusammengestellt und in Abbildung 4 graphisch dargestellt.

Basierend auf den Durchschnittswerten aller Messreihen liegen die Aktivitäten bei pGL3-Basic für beide Konstrukte so niedrig, dass keine signifikante Wirkung festgestellt werden kann. Im Enhancer-Vektor zeigt das *Pvu*II-Fragment bei rund 25-facher Aktivierung in „sense“-Orientierung gegenüber einer etwa 10-fachen Aktivierung in „antisense“-Orientierung einen deutlichen und orientierungsabhängigen Effekt. Daraus läßt sich auf die Anwesenheit eines Promotors in der a31-Region schließen. Im pGUP.PA-Vektor liegt eine insgesamt schwache Aktivierung vor. Dies spricht dafür, dass im a31-*Pst*I-Fragment Enhancersequenzen enthalten sind, die den vorhandenen Minimalpromotor aktivieren können. Die Tatsache, dass bei „sense“-Orientierung eine etwa 7-fache, und bei „antisense“-Orientierung des Inserts eine rund 4-fache Aktivierung gemessen wurde, deutet ähnlich wie bei p2 auf die Wirkung Promotor-proximaler Elemente hin.

Aufgrund der Zusammensetzung der isolierten genomischen Fragmente liegt in den Reporterkonstrukten ein großer Abstand zwischen dem vermuteten Promotor und dem Luciferase-Gen vor. Da bislang keine Analyse der Transkripte und ihrer 5'-Enden vorgenommen wurde, ist nicht bekannt, ob die Luciferase-RNA außer der a31-UTR auch die zwischenliegenden Intronsequenzen enthält oder nicht.

**Tabelle 4: Analyse transienter Transfektionen zur Bestimmung der Promotor-/Enhancer-Aktivität der a31- *PvuII*- und *PstI*-Fragmente**

Reporter <sup>a</sup>	ALA <sup>b</sup>	$\beta$ -Gal <sup>c</sup>	RLA <sup>d</sup>	Mittelwert <sup>e</sup>
pGL3-Basic	91	186	0,49	<b>0,41</b>
	92	270	0,34	
pGL3-Basic-a31- <i>PvuII</i> -s	175	222	0,79	<b>0,79</b>
	176	220	0,80	
pGL3-Basic-a31- <i>PvuII</i> -as	182	512	0,36	<b>0,30</b>
	166	693	0,24	
pGL3-Enhancer	9486	514	18,46	<b>22,89</b>
	14861	544	27,32	
pGL3-Enhancer-a31- <i>PvuII</i> -s	268577	432	621,71	<b>590,74</b>
	185283	331	559,77	
pGL3-Enhancer-a31- <i>PvuII</i> -as	91153	326	279,61	<b>374,40</b>
	70849	151	469,20	
pGUP.PA	140	379	0,37	<b>0,44</b>
	96	185	0,52	
pGUP.PA-a31- <i>PstI</i> -s	1404	444	3,16	<b>3,21</b>
	1272	391	3,25	
pGUP.PA-a31- <i>PstI</i> -as	537	232	2,31	<b>2,11</b>
	388	203	1,91	

<sup>a</sup> Verwendet wurden je 3  $\mu$ g der angegebenen Reporterplasmide

<sup>b</sup> ALA: Absolute Luciferase-Aktivität in Extrakten der in 60 mm-Schalen kultivierten und transfizierten HeLa-Zellen (Ausgangsdichte:  $1,5 \times 10^5$  Zellen pro Schale)

<sup>c</sup>  $\beta$ -Gal:  $\beta$ -Galaktosidase-Aktivität in den Zellextrakten nach Co-Transfektion mit 0,5  $\mu$ g pCMV-Gal

<sup>d</sup> RLA: Relative Luciferase-Aktivität, berechnet durch Division der ALA- durch die  $\beta$ -Gal-Werte

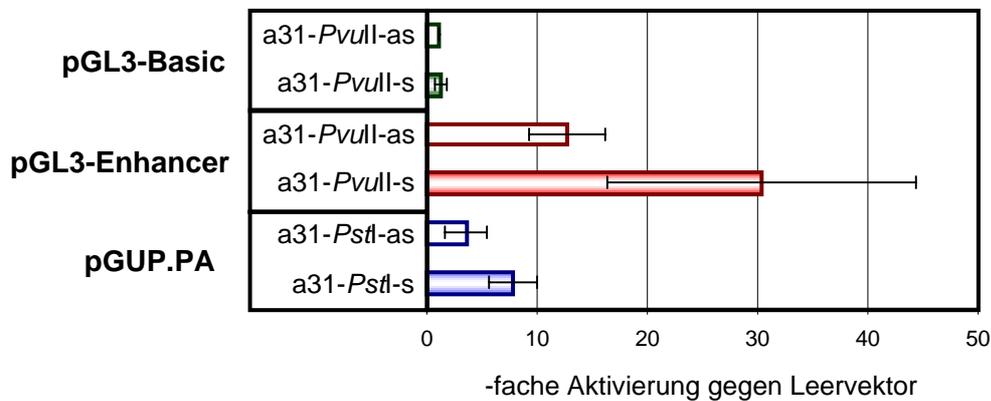
<sup>e</sup> gerundetes arithmetisches Mittel der RLA-Werte von jeweils zwei Parallelansätzen

**Tabelle 5: Promotor-/Enhancer-Aktivität der a31-*PvuII* und -*PstI*-Fragmente: Übersicht der gerundeten RLA-Werte im Verhältnis zum Leervektor**

Reporter		-fache Aktivierung gegen Leervektor							
		Messreihe						Mittelwert <sup>a</sup>	StAbw <sup>b</sup>
Vektor	Insert	1	2	3	4	5	6		
pGL3-Basic	a31- <i>PvuII</i> -s	–	–	–	2	1	1	<b>1,3</b>	0,6
	a31- <i>PvuII</i> -as	–	–	–	1	1	1	<b>1,0</b>	0,0
pGL3-Enhancer	a31- <i>PvuII</i> -s	–	–	–	26	46	19	<b>30,3</b>	14,0
	a31- <i>PvuII</i> -as	–	–	–	16	13	9	<b>12,7</b>	3,5
pGUP.PA	a31- <i>PstI</i> -s	6	6	9	7	11	–	<b>7,8</b>	2,2
	a31- <i>PstI</i> -as	1	2	5	5	5	–	<b>3,6</b>	1,9

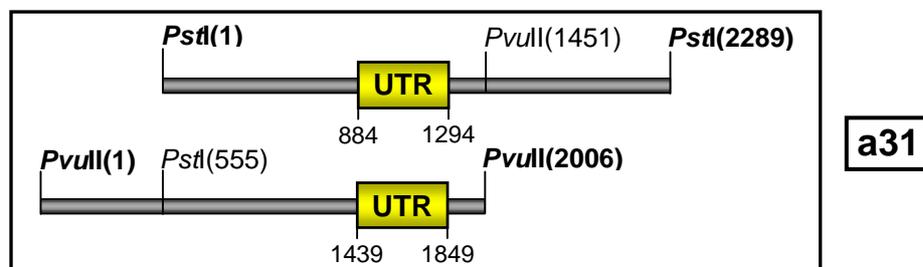
<sup>a</sup> gerundetes arithmetisches Mittel aller Messreihen

<sup>b</sup> StAbw: Standardabweichung um die jeweiligen Mittelwerte



**Abbildung 4: Promotor-/Enhancer-Aktivität der a31-*PvuII*- und -*PstI*-Fragmente in HeLa-Zellen**

Graphische Darstellung der Daten aus Tabelle 5. Die Balken repräsentieren den Mittelwert von gerundeten RLA-Werten dividiert durch die Werte der entsprechenden Leervektoren aus insgesamt elf Messreihen. Die Standardabweichungen sind durch Fehlerindikatoren angegeben. Die verwendeten Reporterplasmide mit den in „antisense“ (as)- und „sense“ (s)-Orientierung zur Luciferase-cDNA inserierten a31-Fragmenten sind angegeben.



**Abbildung 5: Schematische Darstellung genomischer Restriktionsfragmente mit der 5'-UTR der Transkriptklasse a31**

Die a31-Fragmente wurden mit *PstI* bzw. *PvuII* aus Cosmid N2448 isoliert (Nazari, 2000). Die Cosmide entstammen einer mit Chromosom-18-Sequenzen angereicherten Bibliothek. Die gelben Rechtecke stehen für die 5'-UTR-Exons. Die angegebenen Positionen beziehen sich auf die als Position 1 definierte Restriktionsschnittstelle, die jeweils das äußerste 5'-Ende der Fragmente markiert.

### 2.5.3. Analyse der Promotor-/Enhancer-Aktivität in der genomischen p2-Kontrollregion nach Behandlung mit TPA

In den Sequenzen der p2-Kontrollregion wurden vier potenzielle Bindungsstellen für den Transkriptionsfaktor AP-1 (activator protein-1) gefunden (Nazari, 2000). AP-1 ist ein dimerischer Komplex aus verschiedenen Kombinationen von Proteinen der Fos- und Jun-Familie und wird unter anderem durch Tumor-fördernde Phorbolester wie 12-*O*-Tetradecanoyl-13-phorbolacetat (TPA) aktiviert (Wisdom, 1999). Um zu ermitteln, ob AP-1 an der Regulation der APM-1-Transkription vom p2-Promotor aus beteiligt ist, wurden Reporteranalysen mit pGL3-Basic-p2-s nach Behandlung der transfizierten Zellen mit TPA durchgeführt. Diese Substanz wurde freundlicherweise von Dr. Rainer Schmidt (DKFZ) zur Verfügung gestellt.

Da TPA seine maximale Wirkung schnell entfaltet und nur kurzfristig stabil ist (R. Schmidt, persönliche Mitteilung), wurden Messungen zu verschiedenen Zeitpunkten innerhalb von sechs Stunden nach Behandlungsbeginn vorgenommen. Die Resultate zweier exemplarischer Analysen (Messreihen Nr. 3 und 4) sind in Tabelle 6 zusammengefasst und in Abbildung 6 graphisch dargestellt. Tabelle 7 zeigt eine Übersicht der gemittelten RLA-Werte im Verhältnis zum Leervektor aus insgesamt vier Messreihen. Die gemittelten Aktivierungswerte zeigen, dass es bis drei Stunden nach TPA-Behandlung zu einem Rückgang der Luciferase-Aktivität im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle kommt. Ab vier Stunden steigen die Werte wieder an und erreichen bei der Messung nach sechs Stunden nahezu das Ausgangsniveau. Dieser Effekt könnte das Ergebnis einer transienten Repression der Transkription sein.

Je nach Zusammensetzung kann AP-1 als positiver oder negativer Regulator von Promotoren fungieren (Faisst und Meyer, 1992). Die Resultate der Reporteranalysen unter TPA-Einwirkung deuten darauf hin, dass AP-1 in HeLa-Zellen möglicherweise einen reprimierenden Einfluss auf die am p2-Promotor gestartete *APM-1*-Transkription ausübt. Wie jedoch gezeigt wurde, ist AP-1 in HeLa-Zellen offenbar vorrangig aus c-Fos und c-Jun zusammengesetzt und spielt eine wichtige Rolle bei der transkriptionellen Aktivierung der humanen Papillomvirus (HPV)-Onkogene *E6* und *E7* (Rösl und Schwarz, 1997; Soto *et al.*, 1999; Soto *et al.*, 2000). Wegen der insgesamt eher schwachen TPA-Effekte in vorliegenden Untersuchungen wurde eine weitergehende Analyse nicht durchgeführt.

**Tabelle 6: Analyse transienter Transfektionen zur Bestimmung der Promotor/Enhancer-Aktivität des p2-Fragments nach TPA-Behandlung**

Reporter <sup>a</sup>	A	TPA <sup>b</sup>	ALA <sup>c</sup>	$\beta$ -Gal <sup>d</sup>	RLA <sup>e</sup>	Mittelwert <sup>f</sup>	B	TPA	ALA	$\beta$ -Gal	RLA	Mittelwert
pGL3-Basic	0	0	657	135	4,87	5,14	0	0	1224	182	6,73	7,24
			730	135	5,41				1264	163	7,75	
pGL3-Basic-p2-s	0	0	31596	200	157,98	150,73	0	0	15999	130	123,07	97,51
			28839	201	143,48				5109	71	71,96	
pGL3-Basic	1	1	5637	310	18,18	13,37	0,5	0,5	5519	171	32,27	20,18
			1710	200	8,55				1206	149	8,09	
pGL3-Basic-p2-s	1	1	62372	289	215,82	231,49	0,5	0,5	26295	187	140,61	129,30
			60803	246	247,17				17579	149	117,98	
pGL3-Basic	3	3	3512	336	10,45	9,95	2	2	2699	155	17,41	13,26
			3327	352	9,45				3430	377	9,10	
pGL3-Basic-p2-s	3	3	72379	492	147,11	143,78	2	2	35636	266	133,97	128,97
			51261	365	140,44				51198	413	123,97	
pGL3-Basic	6	6	2529	642	3,94	3,76	4	4	1500	430	3,49	3,46
			1713	479	3,58				1311	382	3,43	
pGL3-Basic-p2-s	6	6	48573	520	93,41	94,61	4	4	31432	464	67,74	64,66
			53368	557	95,81				18040	293	61,57	

Dargestellt sind die Resultate zweier unabhängig voneinander durchgeführter Experimente A und B

<sup>a</sup> Verwendet wurden je 3  $\mu$ g der angegebenen Reporterplasmide

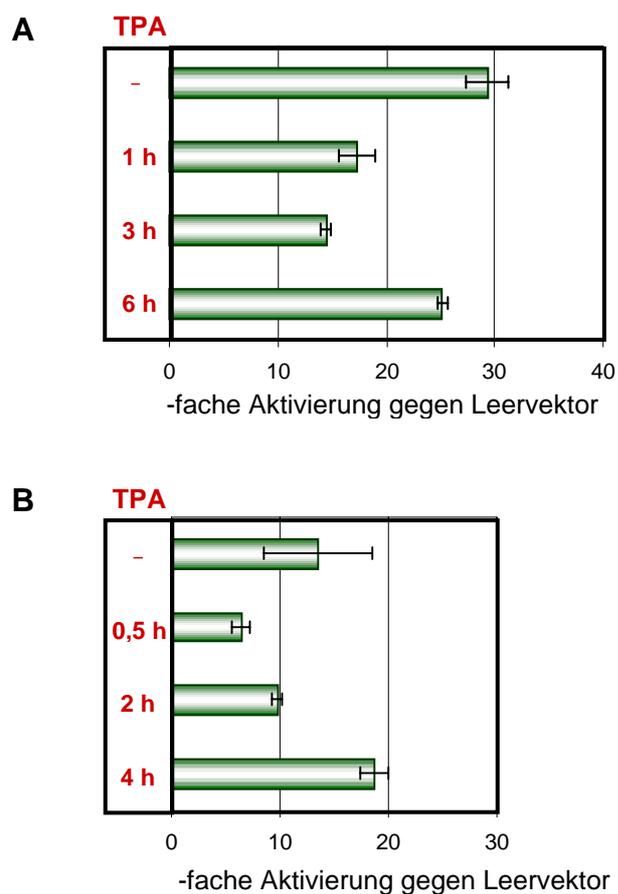
<sup>b</sup> Dauer der Behandlung mit  $10^{-7}$  M 12-*O*-Tetradecanoyl-13-phorbolacetat in Stunden

<sup>c</sup> ALA: Absolute Luciferase-Aktivität in Extrakten der in 60 mm-Schalen kultivierten und transfizierten HeLa-Zellen (Ausgangsdichte:  $1,5 \times 10^5$  Zellen pro Schale)

<sup>d</sup>  $\beta$ -Gal:  $\beta$ -Galaktosidase-Aktivität in den Zellextrakten nach Co-Transfektion mit 0,5  $\mu$ g pCMV-Gal

<sup>e</sup> RLA: Relative Luciferase-Aktivität, berechnet durch Division der ALA- durch die  $\beta$ -Gal-Werte

<sup>f</sup> gerundetes arithmetisches Mittel der RLA-Werte von jeweils zwei Parallelansätzen



**Abbildung 6: Promotor-/Enhancer-Aktivität des p2-Fragments in pGL3-Basic in HeLa-Zellen nach Behandlung mit TPA**

Graphische Darstellung der Daten aus Tabelle 6 A und B. Die Dauer der Behandlung mit TPA in Stunden (h) ist angegeben. Ansätze ohne Behandlung sind mit „-“ gekennzeichnet. Die Balken repräsentieren die gemittelten RLA-Werte der aufgeführten Parallelansätze mit dem Reporterkonstrukt pGL3-Basic-p2-s dividiert durch die entsprechenden Werte des Leervektors. Standardabweichungen um den jeweiligen Mittelwert sind durch Fehlerindikatoren angegeben.

**Tabelle 7: Promotor-/Enhancer-Aktivität des p2-Fragments in pGL3-Basic unter TPA-Einwirkung: Übersicht der gerundeten RLA-Werte im Verhältnis zum Leervektor**

Reporter	10 <sup>-7</sup> M TPA (Behandlung in Stunden)	-fache Aktivierung gegen Leervektor					
		Messreihe				Mittelwert <sup>a</sup>	StAbw <sup>b</sup>
		1	2	3	4		
pGL3-Basic- p2-s	0	19	25	30	14	22,0	7,0
	0,5	-	-	-	6	6,0	-
	1	3	10	18	-	10,3	7,5
	2	-	-	-	10	10,0	-
	3	11	7	14	-	9,0	2,8
	4	-	-	-	19	19,0	-
	6	-	11	25	-	18,0	9,9

<sup>a</sup> gerundetes arithmetisches Mittel aller Messreihen

<sup>b</sup> StAbw: Standardabweichung um die jeweiligen Mittelwerte